

66066

T.561

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química

Doctorado en Ciencias Químicas

AREVALO, F. J.
Estudios Sobre el Co

2009

66066

**“Estudios sobre el comportamiento electroquímico de
la progesterona. Implementación de técnicas
electroanalíticas para su detección y cuantificación”**

Fernando Javier Arévalo

Director de tesis: Dr. Héctor Fernández

Co-Directora de Tesis: Dra. Patricia G. Molina



CREER. CREAR. CRECER.



30 de Marzo de 2009

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Director de Tesis:

Dr. Héctor FERNÁNDEZ

Co-Director:

Dra. Patricia G. MOLINA

Aprobada por el jurado:

Dra. Ana M. Baruzzi

Dr. Leonides E. Sereno

Dr. Juan M. Marioli

65066

MFN:
Clasif:
0.100
T.561

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a toda mi familia, mis padres y hermanos, por haberme acompañado y ayudado durante todos estos años.

También quiero agradecer a Pato, Tito y Alicia, quienes me han formado y guiado a lo largo de este camino y me ayudaron a concretar este logro.

A todos los amigos que coseché en estos años, con los cuales compartimos hermosos momentos y nos hemos divertido tanto.

A todos mis compañeros del Departamento de Química y al personal no docente, por su gran colaboración.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por la prestación de sus instalaciones para la ejecución de este proyecto.

A CONICET quien me otorgó la beca de doctorado y me posibilitó la realización de la tesis.

Y en especial, quiero agradecer a la mujer que amo, Gaby, a la que conocí y con quien me casé durante este recorrido. Agradecerle por haberme dado todo su apoyo y amor desde que nos conocimos.

Por último, a los que siempre hicieron un pequeño aporte para que yo pueda hoy estar escribiendo esto.

***“Estudios sobre el comportamiento electroquímico
de la progesterona. Implementación de técnicas
electroanalíticas para su detección y
cuantificación”***

Fernando Javier Arévalo

2009

Resumen

Abstract

Resumen

En este trabajo de tesis se realizaron estudios acerca de las propiedades electroquímicas de la hormona progesterona en medios orgánicos y acuosos como así también el desarrollo de un biosensor capaz de determinar progesterona en muestras reales de suero animal.

Los estudios concernientes a la reducción electroquímica de progesterona sobre electrodos de carbono vítreo se realizaron en solución 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutil amonio en acetonitrilo. Las técnicas empleadas para tal fin fueron las voltamperometrías cíclica y de onda cuadrada, electrólisis a potencial controlado, cronoamperometría, simulación digital y espectroscopía de absorción UV-visible. Se logró determinar un mecanismo probable de electroreducción de progesterona, como así también los parámetros que lo caracterizaron.

Por otro lado, se realizaron estudios sobre la adsorción de progesterona en soluciones reguladoras de pH = 8 y se determinó la isoterma de adsorción que mejor describe la adsorción de la hormona con electrodos de carbono vítreo. Se determinaron los valores de energía la libre de Gibbs, de entalpía y de entropía de adsorción para el sistema de trabajo.

Por último, se llevó a cabo el desarrollo de un inmunosensor para determinar progesterona en forma indirecta en muestras de suero animal. El biosensor diseñado se basó en el empleo del anticuerpo monoclonal anti-progesterona, como así también en el uso de la enzima peroxidasa de rábano picante, para cuantificar la interacción de la progesterona con el anticuerpo utilizando un sustrato enzimático adecuado. El inmunosensor desarrollado fue del tipo amperométrico, el que mostró una gran sensibilidad. Así, esta metodología analítica se presenta como una alternativa favorable en cuanto a rapidez y confiabilidad en sus determinaciones. Se lograron alcanzar los límites de detección necesarios para la determinación de progesterona en sueros de origen animal.

Abstract

In this doctoral thesis, it was carried out studies about the electrochemical properties of progesterone hormone in both, organic and aqueous media as well as it was development a biosensor to be able to determine progesterone in real samples of animal serums.

The studies related to the electrochemical reduction of progesterone on glassy carbon electrodes were performed in 0.1 M tetrabutylammonium hexafluoro-phosphate + acetonitrile. The techniques employed were the cyclic and square wave voltammetries, controlled potential electrolysis, chronoamperometry, digital simulation and UV-visible absorption spectroscopy. It was possible to determine a probable progesterone electro reduction mechanism as well as their thermodynamic and kinetics parameters.

Studies about of the progesterone adsorption on glassy carbon electrodes were carried out in pH 8 buffer solutions. It was also deduced the adsorption isotherm which better describes the specific interaction of progesterone with carbon electrodes. Gibbs free energy, adsorption enthalpy and adsorption entropy of the system were calculated.

Finally, it was also studied the development of an immunosensor to determine progesterone in an indirect form in animal serum samples. The designed biosensor was based on the employment of anti-progesterone monoclonal antibody as well as the horseradish peroxidase enzyme, which was used to quantify the interaction of the progesterone with the antibody by means of an appropriate mediator enzymatic. The immunosensor was one of the amperometric types. It showed a great sensibility. Thus, this analytical methodology appears as a very convenient alternative to determine progesterone in a way fast and reliable. It was also possible to reach detection limits necessary to determine this hormone in serums of animal origin.

Objetivos del plan de Tesis Doctoral

Objetivos generales

Estudiar el comportamiento electroquímico de la progesterona, como así también implementar técnicas electroanalíticas más económicas y de mayor rapidez de ejecución que las actuales en vigencia, para la detección y cuantificación de esta sustancia vinculada a la reproducción humana y animal.

Objetivos específicos

- Estudiar el mecanismo de reacción electroquímica de la progesterona tanto sobre electrodos desnudos como modificados por películas de distinta naturaleza.
- Implementar técnicas electroanalíticas para la detección y cuantificación de la progesterona. Transferir la experiencia adquirida en el estudio del comportamiento electroanalítico del metabolito en medios simulados (formados por el reactivo comercial) al análisis de muestras reales (sueros bovinos).

Indice

Contenidos

Resumen	v
Abstract.....	vi
Objetivos.....	vii
Indice.....	ix
Contenidos.....	ix
Figuras.....	xiii
Tablas.....	xx
CAPITULO 1	
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de la progesterona	1
1.2. Funciones que desempeña la progesterona	2
1.3. Importancia de la cuantificación de progesterona	4
1.4. Técnicas actuales de detección.....	5
1.5. Química electroanalítica de la progesterona y compuestos similares.....	6
CAPITULO 2	
2. Fundamentos teóricos.....	9
2.1. Generalidades en electro-reducciones orgánicas.....	9
2.1.1. Reducción de esteroides	12
2.2. Generalidades de los Biosensores Electroquímicos	16
2.2.1. Clasificación de los biosensores	17
2.2.2. Características de los biosensores.....	18

2.2.3. Anticuerpos monoclonales	20
2.2.4. Interacción antígeno-anticuerpo	23
2.2.4.1. Puente Hidrógeno	23
2.2.4.2. Interacciones electrostáticas o coulómbicas	23
2.2.4.3. Fuerzas de Van der Waals.....	24
2.2.4.4. Interacciones hidrofóbicas	24
2.2.4.5. Fuerzas estéricas repulsivas	24
2.2.5. Afinidad entre el antígeno y el anticuerpo	25
2.2.6. Inmunosensores Electroquímicos	27
2.2.7. Formatos empleados con inmunosensores electroquímicos.....	30
2.2.8. Tiempo de incubación y temperatura.....	34
2.2.9. Unión del elemento de reconocimiento a la superficie del sensor.....	37
2.2.9.1. Adsorción física.....	38
2.2.9.2. Atrapamiento por una matriz	38
2.2.9.3. Entrecruzamiento.....	39
2.2.9.4. Enlace covalente con la superficie	40

CAPITULO 3

3. Técnicas Empleadas. Fundamentos Teóricos	43
3.1. Introducción.....	43
3.2. Naturaleza de las reacciones de electrodo.....	44
3.2.1. Procesos no-faradaicos	44
3.2.2. Procesos faradaicos.....	44
3.3. Celdas electroquímicas	45
3.4. Reversibilidad en procesos electroquímicos	48
3.4.1. Reversibilidad química.....	48
3.4.2. Reversibilidad termodinámica	48
3.4.3. Reversibilidad práctica.....	48
3.5. Variables existentes para experiencias electroquímicas	49
3.6. Factores que afectan la velocidad de reacción de electrodo y la corriente	51
3.6.1. Modos de transferencia de masa	52

3.7. Reacciones de electrodo controladas por transferencia de masa. Control difusional.....	56
3.8. Reacciones Controladas por la Velocidad de Transferencia de Electrones	59
3.9. Conceptos de reversibilidad, quasi-reversibilidad e irreversibilidad electroquímica	63
3.10. Fenómenos de adsorción	64
3.10.1. Adsorción física y quimisorción	65
3.10.2. Isotermas de adsorción	67
3.10.2.1. Isoterma de Langmuir.....	68
3.10.2.2. Isoterma de Freundlich	69
3.10.2.3. Isoterma de Temkin	70
3.10.2.4. Isoterma de Frumkin.....	71
3.11. Técnicas electroquímicas empleadas: clasificación y descripción	72
3.11.1. Voltamperometría cíclica (VC).....	73
3.11.1.1. Corriente de pico y potencial	77
3.11.2. Técnicas convolutivas o semiintegral	80
3.11.3. Cronoamperometría.....	83
3.11.4. Electrólisis a potencial controlado (coulometría)	86
3.11.5. Voltamperometría de pulsos.....	87
3.11.5.1. Voltamperometría de escalera.....	87
3.11.5.2. Voltamperometría de onda cuadrada (VOC).....	89
3.11.5.2.1. Teoría de la voltamperometría de onda cuadrada.....	91
3.11.5.2.2. Teoría de VOC para diferentes sistemas cinéticos	96
3.11.5.2.2.1. Reacción de transferencia de electrones lenta	96
3.11.5.2.2.2. Reacción de transferencia de carga seguida por una reacción química homogénea.....	98
3.12. Principios básicos de la técnica ELISA	100
3.12.1. Etapas para un ensayo ELISA	101
3.12.1.1. Fase sólida.....	101
3.12.1.2. Adición de reactivos	103
3.12.1.3. Incubación.....	103
3.12.1.4. Lavados.....	103

3.12.1.5. Agregado de conjugado con enzima.....	104
3.12.1.6. Desarrollo de color. Lectura.....	105
3.12.2. Formatos de ELISA.....	106
3.12.2.1. Enzimoimmunoensayo competitivo para la determinación de antígenos	106

CAPITULO 4

4. Metodología Experimental.....	109
4.1. Introducción.....	109
4.2. Instrumentos de electroquímica.....	109
4.2.1. Electrodo de trabajo.....	109
4.2.2.1. Tratamiento previo de los electrodos de trabajo	110
4.2.3. Electrodo de referencia	111
4.2.4. Contraelectrodos	111
4.2.5. Celdas	112
4.3. Reactivos y solventes.....	116
4.3.1. Reactivos	116
4.3.2. Solventes.....	116
4.3.3. Soluciones.....	117
4.3.4. Electrolitos soporte	118
4.4. Técnicas electroquímicas y equipamientos.....	118

CAPITULO 5

5. Resultados y discusión.....	121
5.1. Introducción.....	121
5.1.1. Elucidación del mecanismo de reducción de P4 en ACN	121
5.1.1.1. Voltamperometría cíclica.....	121
5.1.1.2. Voltamperometría de convolución	126
5.1.1.3. Electrólisis a potencial controlado	129
5.1.1.4. Voltamperometría de onda cuadrada.....	134

5.1.1.5. Determinación del mecanismo de reducción de P4 por VC.....	139
5.1.2. Adsorción de progesterona sobre electrodos de carbono vítreo	147
5.1.2.1. Determinación de los parámetros termodinámicos para la adsorción de P4	147
5.1.2.2. Dinámica de la transferencia electrónica heterogénea para P4 adsorbida	159
5.1.2.3. Determinación de P4 en muestras de suero por VOC	161
5.1.3. Desarrollo de un inmunosensor electroquímico para determinar P4	163
5.1.3.1. Generación de una superficie inmune	164
5.1.3.2. Conjugación de P4 con HRP	165
5.1.3.3. Estudios colorimétricos (ELISA)	169
5.1.3.4. Estudios con el inmunoreactor	174
5.2. Comparación de los límites de detección encontrados	184

CAPITULO 6

6. Conclusiones	187
6.1. Estudios cinéticos heterogéneos en solución y para procesos de adsorción	187
6.2. Inmunosensor electroquímico para la determinación de P4 en muestras de suero	188

CAPITULO 7

7. Bibliografía	189
-----------------------	-----

Figuras

Figura 1.1.1.	1
Figura 1.2.1. Comportamiento de las hormonas progesterona (P4) y luteinizante (LH) para la perra durante los eventos proestro y estro.	3
Figura 2.2.3.1. Representación de un anticuerpo	21

Figura 2.2.7.1. Enzimoinmunoensayo electroquímico competitivo para el antígeno....	33
Figura 2.2.7.2. Enzimoinmunoensayo electroquímico competitivo para el antígeno en solución e inmovilizado.....	34
Figura 2.2.7.3. Enzimoinmunoensayo electroquímico sándwich.....	34
Figura 3.5.1. Esquema de un sistema experimental para experiencias de potencial controlado.....	51
Figura 3.6.1. Variación de los perfiles de concentración de O con el tiempo luego de aplicar un potencial sobre el electrodo.....	56
Figura 3.7.1. Representación esquemática para el comportamiento i-E para una reacción Nernstiana.....	59
Figura 3.8.1. Efectos de un cambio de potencial sobre la energía libre de activación para la oxidación y reducción.....	61
Figura 3.11.1. Representación esquemática de la perturbación del potencial aplicado al electrodo de trabajo (a) y del voltamperograma cíclico resultante (b).....	74
Figura 3.11.2. Perfiles de concentración obtenidos para un experiencia de voltamperometría cíclica para la reducción de O y la oxidación de R.....	75
Figura 3.11.3. Voltamperogramas experimentales cíclicos y de convolución (obtenidos de A. J. Bard and L. R. Faulkner, "Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications, 2 nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, 2001, pag. 251) de: a) 1,84 mM p-nitrotolueno en ACN + 0,2 M (C ₂ H ₅) ₄ NClO ₄ , $v = 50 \text{ V s}^{-1}$. b) 0,5 mM Tert-nitrobutano en DMF + 0,1 M (C ₄ H ₉) ₄ I, $v = 17,9 \text{ V s}^{-1}$. Electrodo de trabajo: electrodo de Hg de gota pendiente (HMDE).....	81

Figura 3.11.4. a) Perturbación de potencial para una experiencia de cronoamperometría. b) Respuesta de la corriente a la perturbación aplicada.....	84
Figura 3.11.5. a) Programa de potencial aplicado al electrodo de trabajo. b) Voltamperograma obtenido.....	88
Figura 3.11.6. Forma de la onda cuadrada donde ΔE_{OC} es la amplitud de la onda cuadrada, ΔE_b es el incremento de barrido, τ es el período de la onda.....	89
Figura 3.11.7. Respuesta de corriente en función del tiempo para la función de onda cuadrada del potencial.	90
Figura 3.11.8. Voltamperogramas de onda cuadrada para una transferencia electrónica reversible para las corrientes normalizadas.	91
Figura 3.11.9. Relación de corriente de pico normalizada /ancho de medio pico ($\Delta\Psi_p/nW_{1/2}$) con la amplitud de la onda cuadrada para ΔE_b (mV) = a) 2,5; b) 10 y c) 25.	96
Figura 3.11.10.a). Posición del pico, $n(E_p-E_{1/2})$ en función de $\log k\tau^{1/2}$ para distintos valores de α : (A-L). b) Altura del pico ($\Delta\Psi_p$) en función de $\log k\tau^{1/2}$ para distintos valores de α : (A-L): 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 y 1.	97
Figura 3.11.11. Variación de la posición del pico, $n(E_p - E_{1/2})$, en función de $\log k\tau$ para distintos valores de K. $\log K$: (A-H): -2; -1; -0,5; 0; 0,5; 1; 2 y 3.	99
Figura 3.11.12. Variación de la corriente de pico ($\Delta\Psi_p$) en función de $\log k\tau$ para distintos valores de K. $\log K$: (A-H): -2; -1; -0,5; 0; 0,5; 1; 2 y 3.	99
Figura 3.11.13. Variación del ancho de medio pico ($W_{1/2}$) en función de $\log k\tau$ para distintos valores de K. $\log K$: (A-H): -2; -1; -0,5; 0; 0,5; 1; 2 y 3.	100
Figura 4.2.1. Esquema de una celda electroquímica de dos cuerpos empleada para las experiencias de VC y VOC.....	112

Figura 4.2.2. Esquema de una celda electroquímica de un cuerpo empleada para las experiencias de VOC de redisolución adsortiva.	114
Figura 4.2.3. Esquema de una celda electroquímica de tres cuerpos empleada para las experiencias de coulometría.	114
Figura 4.2.4. Esquema del reactor de flujo empleado para las experiencias de cronoamperometría.	115
Figura 5.1.1. Voltamperograma cíclico de P4 a $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$	122
Figura 5.1.2. Dependencia de $i_{\text{p,c}}$ con $\nu^{1/2}$. c_{P4}^* (\blacksquare) = $3,70 \times 10^{-3} \text{ M}$, (\bullet) = $1,80 \times 10^{-3} \text{ M}$, (\blacktriangledown) = $1,05 \times 10^{-3} \text{ M}$, (\blacktriangle) = $8,01 \times 10^{-4} \text{ M}$	123
Figura 5.1.3. Voltamperogramas cíclicos de P4 a distintas ν (V s^{-1}): a) 0,2; b) 3 y c) 5. $c_{\text{P4}}^* = 5,02 \times 10^{-4} \text{ M}$	124
Figura 5.1.4. Variación de la relación $i_{\text{p,a}} / i_{\text{p,c}}$ con ν . $c_{\text{P4}}^* = 5,02 \times 10^{-4} \text{ M}$	124
Figura 5.1.5. Dependencia de la diferencia entre el potencial de pico catódico y el potencial de pico anódico (ΔE_{p}) sobre la ν . $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$. Datos experimentales (\bullet) y ajuste de los datos experimentales (—).	125
Figura 5.1.6. a) Voltamperograma cíclico de P4 a $\nu = 0,025 \text{ V s}^{-1}$, $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$; b) Voltamperograma (a) convolucionado.	127
Figura 5.1.7. Relación entre E y $\log \{(I_L - I)/i\}$. $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$. $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	128
Figura 5.1.8. Perfil corriente-tiempo para la coulometría a potencial controlado. $E_{\text{aplicado}} = -2,400 \text{ V vs ECS}$. $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$	129
Figura 5.1.9. Absorbancia en función de c_{P4}^*	130

Figura 5.1.10. Voltamperogramas cíclicos de muestreo a distintos tiempos durante la electrólisis. $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $c_{\text{P4inicial}}^* = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$.	131
Figura 5.1.11. Espectros de absorbancia UV-visible a distintos tiempos durante la electrólisis. $c_{\text{P4 inicial}} = 1,12 \times 10^{-5} \text{ M}$.	132
Figura 5.1.12. Voltamperograma de onda cuadrada. $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$, $\Delta E_{\text{OC}} = 50 \text{ mV}$. $c_{\text{P4}}^* = 1,50 \times 10^{-4} \text{ M}$.	134
Figura 5.1.13. Variación de $i_{\text{p,n}}$ con $f^{1/2}$. $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$. $\Delta E_{\text{OC}} = 25 \text{ mV}$. $c_{\text{P4}}^* = 1,02 \times 10^{-3} \text{ M}$.	135
Figura 5.1.14. Variación de $i_{\text{p,n}}$ con ΔE_{OC} . $f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$. $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$.	136
Figura 5.1.15. Dependencia de $i_{\text{p,n}} / f^{1/2}$ con $f^{1/2}$ en VOC. $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$. $\Delta E_{\text{OC}} = 25 \text{ mV}$. $c_{\text{P4}}^* = 1,02 \times 10^{-3} \text{ M}$.	137
Figura 5.1.16. Variación de E_p con $\log \tau$. $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$. $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$. $\Delta E_{\text{OC}} = 25 \text{ mV}$.	138
Figura 5.1.17. Curva de calibración. Técnica: VOC. $f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$, $\Delta E_{\text{OC}} = 25 \text{ mV}$.	139
Figura 5.1.18. Dependencia de la función corriente experimental (ψ) sobre $\nu^{1/2}$ a diferentes concentraciones de P4. c_{P4}^* : \blacktriangle) $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, \blacksquare) $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y \bullet) $5 \times 10^{-3} \text{ M}$.	140
Figura 5.1.19. Variación del $E_{\text{p,c}}$ vs $\log \nu$. $c_{\text{P4}}^* = 1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$.	142
Figura 5.1.20. Variación del $E_{\text{p,c}}$ vs $\log c_{\text{P4}}^*$. $\nu = 0,025 \text{ V s}^{-1}$.	142
Figura 5.1.21. Voltamperogramas cíclicos de P4 experimentales (—) y ajustados (o) para $c_{\text{P4}}^* = 5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ a distintas velocidades de barrido, ν (V s^{-1}): a) 0.05; b) 0.175; c) 5.	145

- Figura 5.1.22.** Voltamperograma de onda cuadrada. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto. $T = 20$ °C. $c_{P4}^* = 5 \times 10^{-7}$ M. 149
- Figura 5.1.23.** Voltamperogramas de onda cuadrada. Método de limpieza a) felpa húmeda y alúmina, b) felpa húmeda con alúmina con posterior activación electroquímica por método de Anjo. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 70$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto. $T = 20$ °C. $c_{P4}^* = 3,00 \times 10^{-5}$ M. 150
- Figura 5.1.24.** ●) $c_{P4}^* = 3 \times 10^{-5}$ M. ▲) $c_{P4}^* = 1 \times 10^{-5}$ M, ▼) $c_{P4}^* = 1 \times 10^{-6}$ M, ◆) $c_{P4}^* = 4 \times 10^{-7}$ M. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $E_{adsorción} =$ circuito abierto, $T = 20$ °C. 152
- Figura 5.1.25.** Isotermas de adsorción de P4 sobre electrodos de CV. T(K): ■) 283; ◆) 293; ●) 313; ♥) 323. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s. $E_{adsorción} =$ circuito abierto. 153
- Figura 5.1.26.** Variación de ΔH_{ADS} con θ . $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto, $T = 20$ °C. 154
- Figura 5.1.27.** Isoterma de adsorción de Frumkin. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto, $T = 20$ °C. 155
- Figura 5.1.28. a y b)** Variación del parámetro de interacción lateral (g) y fuerza de adsorción (β) respectivamente, con la temperatura para la adsorción de P4 sobre electrodos de CV. 157
- Figura 5.1.29.** Dependencia de a) ΔG_{ADS} ; b) ΔH_{ADS} y c) $T \times \Delta S_{ADS}$ con la temperatura para la adsorción de P4 sobre electrodos de CV. 158
- Figura 5.1.30.** Cronoamperogramas de P4 absorbida sobre electrodos de CV para diferentes $t_{adsorción}$ (s): □) 50; ◊) 120; ⊖) 180. $c_{P4}^* = 6 \times 10^{-7}$ M. $E_{adsorción}$: circuito abierto. $E_i = -1,2$ V vs ECS; $E_f = -1,7$ V vs ECS. $T = 293$ K. 159

- Figura 5.1.31.** Curva de calibración en 5 % ACN-95 % solución reguladora pH = 8, mediante VOC. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto..... 162
- Figura 5.1.32.** Curva de calibración en 5 % ACN-95 % solución reguladora pH = 8 más 500 μ L de suero, mediante VOC. $c^*_{EI} = 4 \times 10^{-7}$ M. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto.. 163
- Figura 5.1.33.** Molécula de progesterona-3-carboximetiloxima (P4-3-CMO)..... 165
- Figura 5.1.34.** Ley de Lambert y Beer para solución de HRP en BPS de pH = 7. a) $\lambda = 402$ nm, b) $\lambda = 252$ nm..... 168
- Figura 5.1.35.** Espectros de absorción UV-Visible para a) solución de HRP (0,311 mg mL^{-1}) y b) solución de producto de síntesis de P4-3-CMO y HRP. 168
- Figura 5.1.36.** Placa de ELISA de 96 cubetas. Color desarrollado por el agregado de solución de OPD con H_2O_2 171
- Figura 5.1.37.** Optimización de la dilución de m-Ab-P4 y de P4-HRP mediante espectroscopia UV-Visible. $\lambda = 490$ nm. Factor de dilución de m-Ab-P4: ■) 1/50, ●) 1/100. 171
- Figura 5.1.38.** Optimización de P4-HRP. Ensayo ELISA colorimétrico para distintos factores de dilución de P4-HRP. a) 1/190, b) 1/100, c) 1/75, d) 1/55. Dilución de m-Ab-P4 = 1/50. 173
- Figura 5.1.39.** Representación esquemática del proceso de reducción enzimático en presencia de HRP conjugada, peróxido de hidrógeno y catecol para la determinación de P4. 175
- Figura 5.1.40.** Voltamperograma cíclico de catecol 1×10^{-3} M en SBC 0,01 M de pH = 5. Electrodo de trabajo: CV, $v = 0,025$ V s^{-1} 176

Figura 5.1.41. Variación de la corriente (I) en función del tiempo para dos concentraciones de P4-HRP. Factor de dilución: ●) 1/100, ■) 1/190. $c^*_{\text{catecol}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $c^*_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-3}$ M en SBC 0,01 M de pH = 5..... 178

Figura 5.1.42. Curva de calibración de P4. Dilución de m-Ab-P4 = 1/50. Dilución de P4-HRP = 1/100. $c^*_{\text{catecol}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $c^*_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-3}$ M en SBC 0,01 M de pH = 5..... 179

Figura 5.1.43. Correlación entre los métodos colorimétricos y amperométricos, para respuestas normalizadas..... 180

Figura 5.1.44. Variación de la corriente (I) en función del tiempo para diferentes concentraciones de P4 (ng mL^{-1}): ■) 1, ●) 5, ▲) 10. Dilución de P4-HRP = 1/100 $c^*_{\text{catecol}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $c^*_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-3}$ M en SBC 0,01 M de pH = 5.. 181

Figura 5.1.45. Curva de calibración de P4. Tiempo de lectura (minutos): a) 1 y b) 2. Dilución de m-Ab-P4 = 1/50. Dilución de P4-HRP = 1/100. $c^*_{\text{catecol}} = 1 \times 10^{-3}$ M, $c^*_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-3}$ M en SBC 0,01 M de pH = 5. 182

Figura 5.1.46. Correlación entre los métodos colorimétricos y amperométricos, para respuestas normalizadas..... 182

Tablas

Tabla 2.2.1.1. Criterios de clasificación de los biosensores. 17

Tabla 2.2.6.1. Ventajas y desventajas del empleo de anticuerpos en la construcción de biosensores. 29

Tabla 2.2.8.1. Constantes termodinámicas para la interacción de anticuerpos con algunas hormonas. 36

Tabla 3.12.1.1. Enzimas más empleadas para enzimoimmunoensayo, sustratos enzimáticos, colorantes y medio de reacción. 104

Tabla 3.12.1.2. Sistema enzimático con los correspondientes valores de λ de medida.	105
Tabla 5.1.1. Potencial formal (E_{fn}^0) y constantes de velocidad heterogénea (k_{fn}^0) para las reacciones de transferencia electrónica así como el coeficiente de difusión (D_{P4}) para la progesterona, constante de velocidad de dimerización (k_{dim}) y constante de equilibrio para la etapa de protonación (K_H^+) obtenidas para el ajuste de los voltamperogramas cíclicos a tres diferentes velocidades de barrido de acuerdo al Esquema 5.1.1 (ver texto). $C_{P4}^* = 5,0 \times 10^{-3}$ M. Medio de reacción: ACN + 0,1 M HTBA.	146
Tabla 5.1.2. Valores del parámetro estadístico χ^2 (χ^2) para cada una de las isotermas de adsorción.	156
Tabla 5.1.3. Parámetro de interacción lateral (g) y parámetros termodinámicos calculados para la adsorción de P4 sobre electrodos de CV.	158
Tabla 5.1.4. Parámetros cinéticos obtenidos para P4 adsorbida sobre electrodos de CV desde transitorios cronoamperométricos para diferentes tiempos de adsorción.	160
Tabla 5.1.5. Análisis estadístico para la respuesta del inmunoreactor.	183
Tabla 5.1.6. Análisis estadístico de la respuesta del inmunoreactor para dos muestras de suero con distintos agregados de P4.	184
Tabla 5.2.1. Comparación de los límites de detección encontrados para las distintas determinaciones realizadas en los medios empleados.	185

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la progesterona

Los esteroides son moléculas poli-cíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales, como también los hay sintéticos. Son compuestos cuya estructura deriva del sistema tetracíclico de androstrano. La progesterona (P4) es un esteroide, ya que su estructura deriva del mismo sistema de anillos. P4 es la 4-pregnona-3,20 diona, una cetona α,β no saturada cuya estructura química se muestra en la Figura 1.1.1 [1,2].

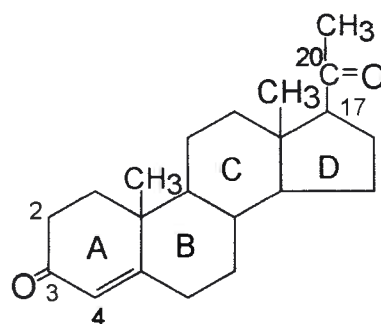


Figura 1.1.1

En los organismos humanos y animales existe una gran variedad de hormonas, las cuales se pueden dividir, desde un punto de vista químico, en hormonas polipeptídicas de estructura compleja y gran peso molecular, y las hormonas esteroides de bajo peso molecular. Las primeras representan aquellas hormonas producidas por el hipotálamo, neurohipófisis, adenohipófisis, etc. Las segundas son las hormonas esteroides producidas por la corteza adrenal, los ovarios, la placenta, etc. Algunas de estas hormonas son la progesterona, los estrógenos (estradiol, estrona y otros), las cuales están implicadas en el desarrollo, manutención y cambios cíclicos de las hembras, como así también son responsables de ciertas características sexuales y del comportamiento.

La P4 es la principal hormona esteroide producida por el ovario, a través de las células del cuerpo lúteo en todos los animales y en la mujer, como así también por la placenta en algunas especies durante la preñez, aunque también ha sido aislada desde la corteza adrenal [3].

1.2. Funciones que desempeña la progesterona

La P4 influye en el desarrollo de las glándulas mamarias y prepara el útero para la implantación del óvulo. Al aumentar sus niveles, induce en el útero cambios imprescindibles para la implantación del óvulo que ha sido fecundado. También interviene durante la preñez en la preparación de las mamas para la lactancia. En esta etapa, la principal función de la P4 es mantener la gestación en sus primeros estadios. El nivel de P4 en el organismo debe ser mantenido en valores suficientemente altos para asegurar el desarrollo del embrión, para lo cual, la liberación de P4 es controlada por el cuerpo lúteo y la placenta [3]. Niveles subóptimos de P4 lleva a la incapacidad del útero materno para mantener el desarrollo embrionario temprano. En consecuencia, monitorear los niveles de P4 es importante para diagnosticar su insuficiencia, siendo ésta una de las principales causas de falla reproductiva en las especies de interés del sector productivo (yegua, vaca, cabra, cerda, oveja y perra) [4].

La P4 es producida por tejidos endocrinos específicos (glándulas), y es vertida por estas glándulas a la circulación sanguínea.

Una vez producidas las hormonas y llevadas al torrente sanguíneo, no circulan por lo general en forma aislada, sino que viajan asociadas a proteínas transportadoras. Por ejemplo, la P4 y adrenocorticoesteroides viajan unidas a globulinas de corticoesteroides de unión (CGB) [3]. Esta unión a proteínas transportadoras protege a las hormonas de la degradación y eliminación, prolongando su tiempo de acción, aparte de aumentar la solubilidad de las mismas en la sangre. Asimismo, a la hora de entrar a la célula para ejercer su función fisiológica, la unión con la proteína transportadora debe romperse, ya que la hormona unida a la proteína es inactiva. Dado al bajo peso molecular de las hormonas esteroides, estas pueden difundir en la mayoría de las células del cuerpo, en donde la membrana plasmática no es una barrera [3].

Aunque la mayoría de las células del cuerpo están en contacto con todas las hormonas circulantes, solo unas pocas responden a la presencia de estas, y lo hacen de manera selectiva. Por ejemplo, las células poseen receptores en su superficie para las hormonas peptídicas, en cambio, las hormonas esteroides penetran las células y en el citoplasma y el núcleo se encuentran sus receptores.

Como se mencionó anteriormente, los ovarios representan la principal fuente de estrógenos y de P4. Cada ovario contiene dos clases diferentes de estructura glandular: los folículos de Graaf, que secretan estrógeno y el cuerpo lúteo, que secreta P4 y algo de estrógeno.

En el ciclo estro o ciclo de celo (ovulación) en los animales, se ponen de manifiesto modificaciones de los niveles hormonales en sangre. El término estro o celo designa el período en el que coincide la receptividad sexual y la ovulación. En este período se identifican diversas fases:

- Proestro: período de incremento de la actividad sexual que precede, pero que no incluye, la aceptación del macho.
- Metroestro: período de intensificación menos intenso de actividad sexual y en el que tiene éxito la receptividad.
- Dioestro: período entre dos estros en un ciclo regular.
- Poliestro: ciclo regular de estros.

En la Figura 1.2.1 se muestra el ciclo de ovulación para la perra, el que es similar para la mayoría de los animales.

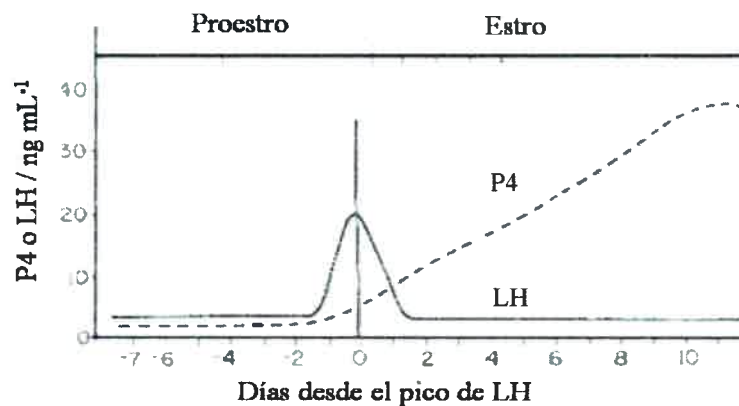


Figura 1.2.1. Comportamiento de las hormonas progesterona (P4) y luteinizante (LH) para la perra durante los eventos proestro y estro.

1.3. Importancia de la cuantificación de progesterona

El monitoreo seriado de los niveles de P4 se utiliza para determinar el momento más fértil próximo a la ovulación y así indicar o programar el servicio o la inseminación artificial en el tiempo justo, lo cual ayuda a mejorar los porcentajes de preñez de la especie en cuestión [5]. Dentro de la industria de reproducción animal, se puede programar un único apareamiento o una sola maniobra de inseminación artificial, dando por resultado una óptima tasa de concepción. Además, el día de la ovulación es una referencia más segura para la determinación del día del parto, en comparación con los días de conducta receptora o del apareamiento.

La presencia de la hormona natural P4 es prácticamente nula en sangre antes del período de ovulación (alrededor de 1 ng/mL en perras y 3 ng/mL en vacas), siendo abundante, por el contrario, en la segunda mitad del ciclo (alcanzando valores máximos de 38 ng/mL en perras y hasta 60 ng/mL en vacas). Durante la preñez, los niveles plasmáticos de P4 son todavía más abundantes. El crecimiento de los niveles de P4 en sangre es debido a la influencia de la hormona luteinizante (LH) en las células del cuerpo lúteo, las cuales, a partir del colesterol almacenado, secretan P4 [3]. Por esta razón, luego de la aparición del pico de LH, se produce un crecimiento de la concentración de P4. La P4 luego es destruida por el hígado. En el organismo, se transforma en 17-hidroxiprogesterona que es una sustancia inactiva que sirve como precursor de las hormonas de la corteza suprarrenal, eliminándose posteriormente en la orina como pregnandiol [6-9].

Una forma de conocer el día de ovulación óptimo es a través del monitoreo de los niveles de P4 en sangre [5]. Antes del período de ovulación, entre 24 a 72 horas aproximadamente, se produce el crecimiento de la concentración de LH hasta alcanzar su máximo, mientras que la concentración de P4 es mínima (ver Figura 1.2.1). Por ejemplo, en la perra, la ovulación comienza después del segundo día de la aparición del pico de LH. Se ha descrito que la duración de la preñez desde el pico de LH es de 64-66 días (promedio 65 días) y desde la ovulación es de 62-64 días (promedio 63 días). La duración de la preñez desde el momento del apareamiento es de 58-72 días para las perras.

Por otra parte, la P4 sérica aumenta en la sangre junto con el pico de LH, precediendo a la ovulación durante varios días.

Debido a que la medición de la LH sérica no es muy utilizada (requiere un muestreo diario de sangre), la medición de la concentración de P4 puede utilizarse como un indicador indirecto del pico de LH y de la subsiguiente ovulación. Debido a que el óptimo rendimiento reproductivo (tasa de concepción y tamaño de las crías) se produce en la perra 1 a 4 días después de la ovulación, la detección de la elevación de P4 sérica en el día o varios días después del pico de LH permite al veterinario y al cliente planificar y realizar un servicio y/o inseminación artificial en el momento oportuno.

La P4 sérica del canino aumenta a más de 1 ng/mL cuando comienza a elevarse la LH. Cuando ésta hace su "pico", la concentración de la P4 sérica en perras alcanza un nivel de 2 ng/mL. Luego, en el momento de la ovulación, la concentración se eleva de 3 hasta 40 ng/mL.

Fuera del ámbito veterinario, en lo que corresponde a la salud humana, la progesterona es ampliamente usada en procesos de terapia. Los procesos terapéuticos más conocidos son el empleo de progesterona como anticonceptivo (se administra ella sola o combinada con estradiol o mestranol en anticonceptivos orales), en combinación con otros estrógenos para terapia post-menopausia en mujeres como así también en tratamientos contra el cáncer de endometrio y próstata [10].

1.4. Técnicas actuales de detección

Las mediciones cuantitativas más comunes de los niveles de P4 sérica en animales, realizadas en laboratorios de análisis, están basadas en general en los métodos de ensayos de inmunoabsorbentes unidos a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) (ver Capítulo 3, Sección 12) o radioinmunoensayos (Radio Immuno Assay, RIA) [11]. En particular, en el área de estudio de reproducción de pequeños animales, se utilizan kits comerciales de ensayos cuantitativo (RIA) y semi-cuantitativo (ELISA) [12]. Este último, arroja como resultado un amplio intervalo de valores y no una medición exacta. Aparte, tanto RIA como ELISA, son métodos de detección de alto costo y, particularmente para ELISA, prolongados tiempos de análisis. En la mayoría de los kits, los resultados se aprecian por medio de cambios de color (de azul a celeste y de

celeste a blanco) con el subsiguiente riesgo de introducir error por subjetividad. No obstante, es una prueba mucho más fiable que la citología vaginal, ya que en un gran número de ocasiones no coincide el momento de concepción óptimo con los resultados obtenidos mediante la determinación del valor de P4 en sangre [5].

La electro-quimioluminiscencia (EQL) es la técnica comercial de mayor sensibilidad y, en condiciones normales, debiera arrojar como resultado un valor inferior a 1 ng mL^{-1} durante el proestro [11].

Otra manera es cuantificar progesterona es mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando como fase móvil una mezcla de etanol-agua, en donde la columna debe estar termostalizada a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ [10].

Hart y cols. han diseñado un biosensor amperométrico de pasta de carbono que detecta indirectamente P4 a través de la determinación de los productos involucrados en la reacción enzima-sustrato [13]. Por el mismo método de enzima inmunoensayo, Claycomb y cols. han diseñado un biosensor para la detección de P4 en leche [14,15].

Por otra parte, se han propuesto técnicas electroquímicas de pulso para la cuantificación de otra hormona esteroide, la gestodona, de estructura similar a la P4, en productos farmacéuticos [16]. En particular, se ha encontrado que la técnica de redisolución adsortiva con detección por voltamperometría de onda cuadrada ha permitido analizar gestodona a muy bajas concentraciones sin necesidad de procesos separativos previos y con una sensible reducción de tiempo y costo de análisis [16].

Se ha diseñado, recientemente, un inmunosensor amperométrico para la determinación de P4, en donde el elemento de transducción es un electrodo de teflón relleno con un compuesto de grafito, oro coloidal y tirosinasa. El límite de detección de P4 alcanzado fue $0,43 \text{ ng mL}^{-1}$ en muestras de leche [17]. No obstante, la implementación de metodologías sensibles, rápidas y de bajo costo para la cuantificación de P4 en muestras de suero bovinos es aún un desafío que impulsan su estudio y desarrollo.

1.5. Química electroanalítica de la progesterona y compuestos similares

Existen escasos estudios electroquímicos de hormonas esteroides en la literatura. Se han realizado estudios en medios acuosos [18-22] como en medios no acuosos

[23,24]. Sin embargo, estos estudios no han arrojado información acerca del mecanismo particular de electroreducción de la P4 como de otras hormonas esteroideas. En general, es aceptado que el mecanismo de reducción de estos compuestos involucra la reducción del grupo carbonilo en el C-3 presente en el anillo A conjugado con un doble enlace en el C-4 (ver Figura 1.1.1). Particularmente para P4, por medio de estudios realizados por polarografía DC y AC en dimetilformamida y acetonitrilo, empleando un electrodo de gota de mercurio, se ha determinado un valor de potencial de media onda ($E_{1/2}$) de -1,85 V (vs un alambre de plata como pseudo-referencia) y un número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica de 1.

Por lo tanto, es de particular interés el estudio de la reducción electroquímica de P4, a los fines de ampliar el conocimiento acerca de su mecanismo de electroreducción.

CAPITULO 2

2. Fundamentos teóricos

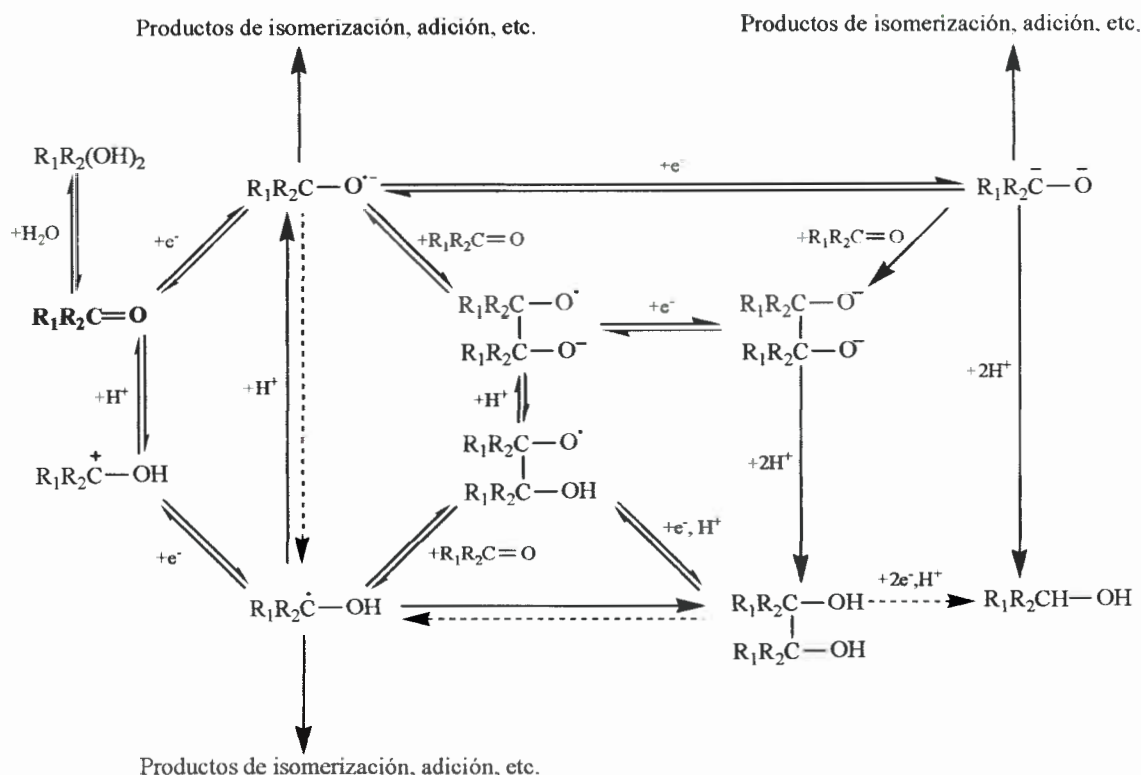
2.1. Generalidades en electro-reducciones orgánicas

La reducción electroquímica de grupos carbonílicos es, a menudo, difícil de realizar. Por lo general, en la mayoría de los sistemas acuosos, se emplea un electrodo de alto sobrepotencial de hidrógeno para el proceso de electroreducción [25].

Aquellos compuestos orgánicos que poseen grupos carbonilo en su forma libre son potencialmente electroreducibles. Sin embargo, si estos grupos se encuentran enmascarados formando, por ejemplo, acetales, se vuelven electroinactivos. En general, los aldehídos son más fáciles de reducir que las cetonas, las cuales, a su vez, se reducen en forma más fácil que los ácidos carboxílicos, ésteres y amidas.

La reducción de compuestos carbonílicos no derivatizados puede, como se indica en el esquema 2.1.1, depender de la estructura del sustrato, de las condiciones usadas durante la electrólisis (material del cátodo, electrolito soporte, pH del medio, presencia o ausencia de un posible dador de protones, solvente y concentración de partida de sustrato) y de la velocidad de reacción de un intermediario formado, si existiese. Por lo general, los procesos de reducción de estos compuestos carbonílicos van acompañados por complicaciones cinéticas posteriores a la transferencia de carga, como así también seguidos de transferencias monoelectrónicas [26].

La protonación del anión radical electrogenerado en la primera transferencia electrónica o la generación del anión radical en presencia de un metal “fuerte” (elevado valor de relación de carga/radio), como el Li^+ , lleva a un radical libre transitorio, el cual es reducido más fácilmente que el sustrato de partida. Este proceso termina resultando en un proceso bi-electrónico, a menos que exista una reacción de dimerización o una reacción química acoplada tan rápida que el proceso se transforme en un proceso mono-electrónico [26].



Esquema 2.1.1.

En general, la primera etapa electroquímica es una transferencia reversible de un electrón desde el electrodo al compuesto carbonílico (antes o después de la etapa de protonación). El anión radical formado desde compuestos aromáticos, o de grupos carbonilos conjugados con sistemas π , son relativamente estables. Los radicales formados desde compuestos alifáticos son usualmente imposibles de detectar [27-30]. Por ejemplo, el tiempo de vida media para el anión radical acetona en medio acuoso de 2-propanol es de 72 μs , mientras que el anión radical de la acetofenona tiene un tiempo de vida media de 1,5 ms [31]. Estos valores ilustran la diferencia existente entre compuestos alifáticos con compuestos aromáticos o con sistemas de dobles enlaces conjugados en la estabilidad del anión radical electrogenerado, es decir, que mayor estabilidad tiene el anión radical electrogenerado cuanto mayor sea la posibilidad de deslocalizar la carga. Se entiende por anión radical estable a la especie que puede detectarse por técnicas electroquímicas y espectroscópicas convencionales.

El solvente utilizado también juega un rol importante en la estabilidad del anión radical a través de sus energías de solvatación, por inducción a la formación de dímeros por interacciones electrostáticas, o bien por reacciones químicas homogéneas [26]. En éstas últimas se incluyen las que tienen lugar con grupos electrófilos. En medio no acuoso, el producto de reacción de la reducción de aldehídos y cetonas dependerá de la estructura molecular de cada uno de ellos, lo cual influirá en la estabilidad del anión radical electrogenerado y de la existencia de protones en el medio. En dimetilformamida (solvente aprótico) la reducción de aldehídos y cetonas exhibe dos picos catódicos. La aparición del segundo pico a potenciales más negativos se debe a la adición de un segundo electrón a la especie cargada negativamente, es decir, al cetil anión radical.

La separación de los dos picos dependerá, en gran medida, de la estabilidad del anión radical y de la disponibilidad de protones en el medio. Así, aldehídos y cetonas alifáticos, cuyo anión radical tiene baja estabilidad, puede sufrir una rápida protonación con una posterior reducción para producir su correspondiente alcohol. Por otro lado, el anión radical proveniente de un compuesto carbonílico aromático presenta una mayor estabilidad, lo cual le permite difundir desde la superficie del electrodo y sufrir una reacción de dimerización para formar un producto tipo pinacol [25].

Algunas reacciones pueden ocurrir en más de una etapa, tanto en la superficie del electrodo como en el seno de la solución. En ciertos casos se puede considerar la existencia de un equilibrio ceto-enólico en la reducción de compuestos carbonílicos, en donde una o ambas formas tautoméricas pueden ser electroreducibles.

La electroreducción de compuestos carbonílicos α - β -insaturados puede causar: (1) saturación del doble enlace-3,4, (2) reducción del carbonilo a alcohol, (3) tanto 1 como 2, (4) acoplamiento de dos moléculas a través del C-4 o del C-2, o a través del C-2 de una molécula y el C-4 de otra, (5) formación de oligómeros y polímeros por acoplamiento secuencial y (6) formación de compuestos organometálicos.

El mecanismo de reducción de los compuestos carbonílicos α , β -insaturados depende críticamente de la reacción ácido-base que precede, acompaña y sigue a la transferencia electrónica, y también depende del material de electrodo.

La naturaleza del electrodo empleado en el proceso de reducción de compuestos carbonílicos tiene un marcado efecto. Por ejemplo, la reducción de *p*-aminoacetofenona en medio ácido acuoso sobre un electrodo de mercurio lleva a la producción de su

correspondiente alcohol, mientras que si se emplea un electrodo metálico de cobre o níquel se produce un pinacol (producto de una dimerización) [25].

2.1.1. Reducción de esteroides

Los esteroides son moléculas poli-cíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales, como también los hay sintéticos. Los esteroides son compuestos cuya estructura deriva del sistema tetracíclico de andostrano [2].

La P4 (Figura 1.1.1), es, por lo tanto, un esteroide, ya que su estructura deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno. El estudio electroquímico de la P4 es posible debido a que el grupo Δ^4 -3-ceto es electroreducible [32].

La mayor parte de los esteroides posee un grupo funcional oxigenado (carbonilo u oxhidrilo) en el C-3 y una cadena lateral u otro grupo funcional en el C-17. La P4 posee un grupo carbonilo en el C-3, conjugado con un doble enlace en la posición α .

El carbonilo en el C-3 tiende a ser reducido en presencia de uno o dos enlaces etilénicos en la posición 1 y/o 4 del anillo A (Figura 1.1.1). Los datos existentes en la literatura fueron obtenidos en su mayoría en soluciones acuosas con pH regulado, debido al papel preponderante que tiene la etapa de protonación del sustrato de partida y del anión radical electrogenerado.

Este tipo de moléculas suele tener otro sitio electroactivo para producir una reducción, el carbonilo en el C-20, pero solo es susceptible a reducirse si posee grupos oxhidrilos vecinos, en donde este carbonilo se reduce a alcohol en soluciones reguladoras acuosas de pH intermedio [19].

Se encontró, tanto en medio acuoso como en solventes orgánicos [33], que el comportamiento electroquímico de esteroides tales como la deoxicorticosterona y compuestos relacionados dependen fuertemente del material de electrodo, del pH de la solución y del tipo de electrolito soporte utilizado, siendo la técnica elegida por exclusividad la polarografía, desde la década del sesenta hasta mediados de los noventa. Kabaskalian y cols. [34] también demostraron la aplicabilidad de la polarografía para la determinación de los corticoesteroides prednisona y cortisona. Cohen [35] estudió la reducción electroquímica de un número de Δ^4 -3-cetoesteroides y caracterizó su comportamiento de acuerdo a su estructura. De Boer y cols. [19] examinaron las

propiedades electroanalíticas de un gran grupo de corticoesteroides para su cuantificación en preparaciones farmacéuticas. Tales autores han resaltado que el grupo que se reduce a valores menos catódicos de potencial en estas moléculas es la cetona conjugada en el anillo A.

La reducción del grupo Δ^4 -3-ceto o $\Delta^{1,4}$ -3-ceto puede, en principio, verse afectada por distintos efectos estructurales, tales como:

- El efecto de los sustituyentes en distintas posiciones del anillo.
- El efecto de la posición de grupos electroactivos en sistema de anillos, el cual tiene particular importancia en sistemas de anillos complicados, como son los esteroides.
- El efecto del cambio o extensión del sistema de dobles enlaces conjugados.

La reducción electroquímica de los grupos carbonilos electroactivos, tanto en el anillo A como en el D, puede verse afectada por la presencia de sustituyentes (desde un metilo hasta un halógeno) en los anillos B y/o C. Estos efectos pueden observarse en la diferencia en el potencial de media onda ($E_{1/2}$) encontrados para la reducción de dichos compuestos [36]. Puede apreciarse una diferencia en el $E_{1/2}$ de 0,16 V en la reducción del carbonilo en el C-3 cuando en el C-17 está presente una cadena carbonada o un grupo metoxi. El efecto es más notorio cuando se encuentra presente un heteroátomo muy electronegativo, como el flúor o cloro.

Un aumento en el sistema conjugado produce un corrimiento en el valor del $E_{1/2}$ hacia valores más positivos de potencial. Por ejemplo, $\Delta^{1,4}$ -3-cetoesteroides son reducidos a un potencial de 0,16 V más positivo que los Δ^4 -3-cetoesteroides, y los $\Delta^{4,6}$ -3-cetoesteroides están corridos hacia valores menos negativos por 0,30 V, lo que indica que la conjugación cruzada es menos efectiva que la lineal.

Tal comportamiento se explica en función de la estabilidad del producto de la electroreducción. El proceso de reducción lleva a la formación de un anión radical en donde su estabilidad depende, entre otros factores, del sistema de electrones- π y del medio de reacción (mayor estabilidad, en general, en solventes orgánicos). El potencial

de reducción es menos catódico a medida que el medio es más polar y el sistema de electrones- π es mayor. Los orbitales moleculares π se encuentran mejor solapados entre sí cuando la conjugación es lineal que cuando la conjugación es cruzada, permitiendo una mejor deslocalización del anión radical electrogenerado. La tendencia de una molécula a tomar un electrón está gobernada por la energía del orbital molecular ocupado más alto [37], por lo tanto, no resulta sorprendente que las especies más fáciles de reducir por vía electroquímica sean aquellas que contienen mayor número de electrones π y heteroátomos con pares electrónicos no compartidos. Lo dicho explica el por qué del potencial de reducción menos negativo de cetosteroides $\Delta^{4,6}$ -3-ceto que Δ^4 -3-ceto [20].

Asimismo, estudios polarográficos en medio etanólico encontrados en la literatura para esteroides tales como deoxicorticosterona, prednisona, prednisolona, cortisona e hidrocortisona, esteroides halogenados y compuestos relacionados involucraron un mecanismo de dimerización [19].

Se pueden plantear distintas alternativas elementales para el anión radical que es electrogenerado. En general, siempre existe un proceso primario en la interfaz electrodo-solución, que puede expresarse mediante la siguiente ecuación:



donde A representa un esteroide con un sitio electroactivo en el C-3.

El anión radical generado tiene distintas vías o mecanismos de reacción posibles. En muchos casos, la reacción de transferencia electrónica es perturbada por una reacción química homogénea la que involucra al sustrato de partida o al anión radical electrogenerado, a través de los cuales, probablemente, pueda descomponerse por una reacción química de dimerización que, dependiendo del carácter nucleofílico del anión radical electrogenerado, pueda reaccionar con una molécula de sustrato de partida o con otro anión radical generando un pinacol [23,26], o una protonación por el sustrato de partida que no ha reaccionado, el cual posee hidrógenos ácidos [23].

Dependiendo del tipo de acoplamiento, se puede discriminar entre [38,39]:

-mecanismo de acoplamiento radical-radical ("DIM 1")



-mecanismo de acoplamiento radical-sustrato ("DIM 2")



donde A es el sustrato de partida y D es el dímero formado.

La descomposición química del anión radical está usualmente acompañada por la toma de electrones adicionales por el producto de descomposición.

En sistemas apróticos, la etapa de transferencia electrónica (a menudo "irreversible") está íntimamente ligada a reacciones ácido-base (reversibles) tal que, por lo general, los mecanismos de reducción son del tipo CEEC y EECC, donde E se refiere a una reacción heterogénea del sustrato sobre la superficie del electrodo y C se refiere a una reacción homogénea en solución, en la cual la etapa química es una reacción con un protón y el paso electroquímico es mono-electrónico [26].

En estos medios, a excepción de una reacción química acoplada posterior a la primera transferencia electrónica, se pueden discernir claramente dos ondas correspondientes a las dos transferencias electrónicas [26].

No obstante, en medio orgánico, tal como acetonitrilo (ACN), cabe resaltar la escasa información existente en la literatura.

2.2. Generalidades de los biosensores electroquímicos

La necesidad de llevar a cabo determinaciones analíticas de manera rápida, selectiva y con elevada sensibilidad ha dado lugar a la aparición y amplio desarrollo de diferentes formas de biosensores.

La utilización de transductores del tipo electroquímico, óptico, piezoeléctrico o térmico junto a la inclusión de enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, receptores celulares o hasta células enteras o tejidos vegetales ha dado lugar a una amplísima variedad de configuraciones y alternativas para la resolución de numerosos problemas analíticos y aplicación en diversos campos, como la salud, industria alimentaria, monitorización medioambiental, control de procesos industriales y también análisis para la agricultura [40].

Según la IUPAC, un biosensor se define como un tipo específico de sensor químico que comprende un elemento biológico de reconocimiento y un transductor físico-químico. El elemento biológico es capaz de reconocer la presencia, la actividad o la concentración de un analito específico en la solución. El reconocimiento puede ser por medio de interacciones específicas (biosensor basado en la afinidad ligando, cuando el elemento de reconocimiento es, por ejemplo, un anticuerpo, un segmento de ADN o un receptor celular) o una reacción biocatalítica (biosensor basado en enzimas). De la interacción del elemento de reconocimiento con el analito surge un cambio mensurable en alguna propiedad de la solución, generalmente, mediante la formación de un producto de reacción el cual es cuantificable [41].

Esta capa biológica interactúa con el analito a determinar, y los cambios químicos resultantes de esta interacción son interpretados por el elemento de transducción transformándolos en una señal eléctrica [41]. El modo de transducción puede ser variado, incluyendo modos electroquímicos y ópticos como también la medida de masas y calor. Idealmente, tal dispositivo debe ser capaz de producir una señal eléctrica, discreta o continua, proporcional a la concentración de un simple analito o un grupo relacionado de analitos. El resultado deseado de estos dispositivos es el de responder en forma continua y reversiblemente sin perturbar a la muestra.

2.2.1. Clasificación de los biosensores

Los biosensores se pueden clasificar en función del tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito, del método utilizado para detectar dicha interacción, de la naturaleza del elemento de reconocimiento o del sistema de transducción. En la Tabla 2.2.1.1 se muestran criterios de clasificación de los biosensores.

Tabla 2.2.1.1. Criterios de clasificación de los biosensores.

Tipo de interacción	Biocatalítica
	Bioafinidad
Detección de la interacción	Directa
	Indirecta
Elemento de reconocimiento	Enzima
	Receptor biológico
	Orgánulo, tejido o célula completa
	Anticuerpo
	Acido nucleico
Sistema de transducción	Electroquímico
	Optico
	Piezoelectrico
	Termométrico
	Nanomecánico

Existen diversos elementos de reconocimiento y formas de transducción, admitiendo diferentes combinaciones entre ellos, por ejemplo, el empleo de antígenos “marcados” (unidos covalentemente) con enzimas [11,13,42,43]. En la práctica, la elección del material biológico depende de las características del compuesto a analizar; por ejemplo, cuando se trata de determinar una sustancia alérgena se utilizan anticuerpos.

El elemento de transducción está condicionado por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que éste determina cual será la variación de las propiedades físico-químicas que ocurran como consecuencia de la interacción. Los sensores electroquímicos representan una importante subclase de sensores químicos en el cual un electrodo es usado como el elemento de transducción.

2.2.2. Características de los biosensores

Los **biosensores** deben poseer ciertas características para su empleo satisfactorio, que se indican a continuación:

Alta sensibilidad: deseable para el análisis de ciertos analitos, como por ejemplo, compuestos xenobióticos, con efectos tóxicos sobre la salud humana y animal incluso a concentraciones de partes por billón ($\mu\text{g/l}$).

Alta selectividad: para que el dispositivo interaccione exclusivamente con el compuesto de interés y no con otros de propiedades similares. Se consigue mediante el empleo de elementos de reconocimiento muy específicos.

Alta fiabilidad: los sistemas de transducción se diseñan de manera que no puedan ser alterados (o lo sean mínimamente) por la muestra y no tengan problemas de ruidos en la señal medida.

Tiempo de vida prolongado: que no obligue al empleo del dispositivo tras un corto período de tiempo desde su fabricación ni a sustituciones frecuentes del mismo si está integrado en la línea de producción de una industria. La estabilidad química, física y mecánica del elemento de reconocimiento condiciona su duración. Los componentes biológicos, por su propia naturaleza, cuentan con una vida media limitada.

Bajo costo de producción: en general, estos sistemas pueden fabricarse a escala industrial, lo cual redundaría en un más que considerable abaratamiento de los costos de producción. A pesar de ello, la disponibilidad limitada de algunas enzimas y la existencia de fases críticas en su construcción (procesos de inmovilización) dificultan, en algunos casos, la fabricación de biosensores en masa.

Tiempo de análisis corto: posibilita una actuación rápida, por ejemplo, la cuantificación realizada en procesos clínicos o la intervención para corregir algún parámetro en un proceso industrial. Muchos biosensores consumen pocos minutos en

cuantificar el compuesto de interés y no precisan un período de espera largo hasta el siguiente análisis.

Pretratamiento de la muestra: se busca que sea innecesario, lo que supone un ahorro de tiempo, material y reactivo. En ciertas determinaciones son imprescindibles las etapas de concentración y purificación. Estas permiten eliminar interferencias y asegurar la presencia de una cantidad suficiente del analito en el pequeño volumen utilizado.

Manejo sencillo: esta tecnología no requiere personal capacitado, como el que se requiere para llevar a cabo radioinmunoensayos o experiencias cromatográficas.

Capacidad de realizar análisis en tiempo real: esta característica es especialmente interesante en el control de procesos, ya que permite controlar los parámetros deseados de forma inmediata y automática.

Portátiles: para que sea posible realizar análisis in situ.

Automatizables: prescindir del control manual de estas unidades facilita su integración dentro de los sistemas que monitorean gran número de muestras.

Miniaturizables: gracias a los desarrollos en microelectrónica y nanotecnología se han logrado reducir las dimensiones de estos dispositivos. Así, pueden ensamblarse varios de ellos en un mismo sistema que realiza varias tareas a la vez y son aplicables a ensayos donde el tamaño físico del dispositivo, el volumen de la muestra o la localización de la medida son factores limitantes.

Capacidad multi-análisis: ciertos biosensores llevan a cabo la determinación de diferentes analitos de forma simultánea.

La mayoría de los biosensores no poseen todas las características mencionadas anteriormente, pero la combinación de algunas de ellas sitúan a estos dispositivos en una posición ventajosa frente a técnicas convencionales (por ejemplo, técnicas cromatográficas, espectroscópicas, etc).

Los **biosensores electroquímicos** combinan el poder analítico de las técnicas electroquímicas con la especificidad del proceso de reconocimiento biológico. La interacción de carácter biológico conlleva a producir una señal eléctrica la cual está relacionada con la concentración de un analito. Para este propósito, un reactivo biospecífico es inmovilizado o retenido sobre un electrodo disponible, el cual convierte

el evento de reconocimiento biológico en una respuesta amperométrica o potenciométrica [41]. El nivel de sofisticación y el avance tecnológico en la creación de biosensores electroquímicos ha llevado a la construcción de dispositivos compactos, económicos y de fácil uso.

2.2.3. Anticuerpos monoclonales

El empleo de anticuerpos monoclonales como elemento de reconocimiento en el armado de un sensor de afinidad, da lugar a la formación de *inmunosensores*. Los anticuerpos monoclonales aparecieron a mediados de los años setenta para convertirse en las herramientas principales de poderosas técnicas analíticas como los radioinmunoensayos y los enzimoimunoensayos.

Los inmunosensores electroquímicos han demostrado tener excelentes capacidades analíticas, límites de detección extremadamente bajos, buena reproducibilidad, simplicidad y el hecho importante de que pueden utilizarse con instrumentos de pequeño tamaño, lo que facilita el empleo en tareas de campo.

Por definición, una molécula no puede ser un antígeno (que deriva de *generador de anticuerpos*) sin un anticuerpo complementario, el cual es producido por los linfocitos en el organismo, dando lugar a receptores específicos en esta biomolécula para el antígeno.

Los anticuerpos poseen un peso molecular aproximado de 150 KDa y pertenecen al grupo de las inmunoglobulinas (Ig). Más específicamente, son glicoproteínas, es decir, son proteínas unidas a azúcares. Estas macromoléculas son capaces de reconocer otras moléculas, los antígenos. La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo radica en las secuencias variables de sus cadenas proteicas, generadas por recombinación de una serie de “gen cassette” en el proceso de producción de linfocitos B durante el desarrollo embrionario. La combinatoria de estas secuencias puede producir más de un billón de secuencias diferentes.

La producción de anticuerpos se realiza incubando un dado antígeno en un organismo. Para ello, lo más común es emplear ratones o conejos. Se extrae el anticuerpo generado para llevar a cabo su aislamiento y, en ocasiones, su purificación. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos

policlonales son poblaciones complejas de anticuerpos formadas por distintos tipos de anticuerpos que reconocen diferentes regiones del antígeno, mientras que los anticuerpos monoclonales son moléculas idénticas y poseen la misma especificidad, donde sólo reconocen un antígeno en particular. Los anticuerpos policlonales poseen mayor sensibilidad y menor especificidad que los monoclonales. De esta manera, a la hora de construir un inmunosensor se deberá considerar qué se desea potenciar sobre la respuesta eligiendo uno u otro según la característica de los anticuerpos empleados.

La estructura básica de un anticuerpo se esquematiza en la Figura 2.2.3.1. Está formado por cuatro cadenas proteicas, de las cuales dos son cadenas pesadas (H) y dos son cadenas livianas (L). Las primeras tienen un peso molecular promedio de 55 KDa, mientras que las segundas de 25 KDa. Los anticuerpos se dividen en varias clases que se identifican según el tipo de cadena pesada en: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.

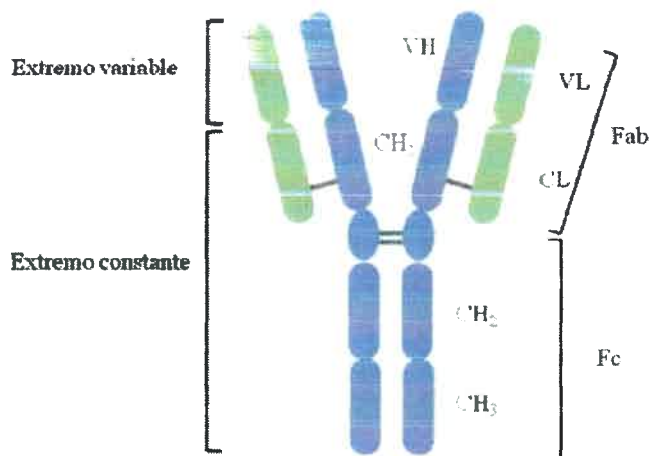


Figura 2.2.3.1. Representación de un anticuerpo.

Las cadenas pesadas se encuentran organizadas en cuatro dominios llamados VH, CH₁, CH₂ y CH₃ (C por constantes y V por variables), y las livianas en dos dominios, VL y CL. Cada uno de estos dominios posee puentes disulfuros intercatenarios entre las regiones variables y constantes. Los enlaces disulfuro que unen entre sí las cadenas pesadas están localizados entre los dominios CH₁ y CH₂. Esta porción de la molécula es reconocida como región bisagra.

Los elementos estructurales de los anticuerpos que les permiten su funcionalidad son:

- ❖ **Regiones Fc:** corresponde al extremo C-terminal de las dos cadenas pesadas. Este fragmento está constituido por la región constante de la cadena pesada y es característica de cada clase de inmunoglobulinas. Es en ésta región donde radican las funciones efectoras de la molécula. La región Fc es característica de la especie [11].
- ❖ **Fragmentos Fab:** corresponde al grupo N-terminal de las cadenas pesadas y livianas [11].

Los dominios variables de ambas cadenas son las que interactúan con el antígeno, o sea, es el sitio de reconocimiento, llamado paratopo.

Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno. Por una parte la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. Ambas propiedades pueden o no estar presentes en un determinado antígeno. Moléculas de pequeño tamaño, como los haptenos o péptidos son poco inmunogénicas y por ello se asocian a proteínas transportadoras de alto peso molecular o “carriers” para inducir una respuesta inmune adecuada (como sucede con la progesterona).

A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina epítipo o determinante antigénico. Un antígeno puede presentar un número variable de epítopes de estructura única o repetitiva. La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten por lo general un número elevado de epítopes distintos, mientras que los ácidos nucleicos y los polisacáridos, dada su repetitividad estructural, poseen un número escaso de epítopes diferentes. Las moléculas pequeñas, que para generar respuestas inmunes en el organismo se unen a proteínas transportadoras, presentan pocos epítopes. La estrona, como la mayoría de las hormonas existentes en el organismo, no genera respuesta inmune por sí sola, por lo tanto, debe unirse a una proteína de alto peso molecular. Por ejemplo, para generar respuesta inmune en el organismo, la estrona puede unirse a albúmina de suero bovino (ASB) [44].

La interacción entre antígeno y anticuerpo da lugar a la formación de múltiples enlaces no covalentes entre el antígeno y los residuos de amino ácidos pertenecientes al

sitio de unión en el anticuerpo. Las fuerzas atractivas de interacción son puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas o coulómbicas [11]. Estas interacciones por sí solas son débiles en comparación a la fuerza de un enlace covalente. Sin embargo, la multiplicidad de todas estas interacciones genera una unión estable entre el paratopo del anticuerpo y el epítoto del antígeno. Estas fuerzas son inversamente proporcionales a una potencia de la distancia entre los grupos interactuantes, lo que implica que, además de que el epítoto y paratopo deben presentar estructuras complementarias para obtener una energía de unión suficiente como para resistir la disrupción termodinámica, la distancia entre ellos debe ser la menor posible. La suma de estas fuerzas de atracción y de repulsión se conoce como afinidad del anticuerpo, expresada en función de una constante que relaciona la concentración de antígeno, anticuerpo y de complejo formado [11].

2.2.4. Interacción antígeno-anticuerpo

2.2.4.1. Puente hidrógeno

La formación de puentes hidrógeno en la interacción entre el epítoto y el paratopo se da en presencia de grupos amino, carboxilos e hidroxilos, los cuales actúan como dadores de hidrógenos. La formación de puentes hidrógeno son fuertemente dependientes de la distancia y operan a distancias entre 1,5 a 5 Å, debido a la competición existente entre el dador de hidrógeno y la proteína aceptora con el medio acuoso circundante.

2.2.4.2. Interacciones electrostáticas o coulómbicas

Esta forma de interacción es debida a las fuerzas de atracción entre cargas opuestas localizadas en las cadenas proteicas de la inmunoglobulina y el antígeno. Tal interacción es más efectivas para distancias pequeñas.

2.2.4.3. Fuerzas de Van der Waals

Son generadas por la interacción de nubes electrónicas pertenecientes a grupos polares. Fuerzas atractivas similares, llamadas fuerzas de dispersión de London, operan entre grupos hidrofóbicos no polares. Este tipo de interacción es dependiente de d^{-6} , (siendo d la distancia) y operan a pequeñas distancias.

2.2.4.4. Interacciones hidrofóbicas

Este tipo de interacción es producida por la asociación de grupos no polares, hidrofóbicos, cadenas de aminoácidos (cadenas de leucina, isoleucina, valina y fenilalanina que no forman puentes hidrógeno con el agua). Su gran estabilidad es debida a la alteración estructural del medioambiente acuoso cuando estos grupos comienzan a acercarse y excluyen el agua.

2.2.4.5. Fuerzas estéricas repulsivas

Las fuerzas intermoleculares atractivas son fuertemente dependientes de la distancia entre los grupos interactuantes. Para las interacciones electrostáticas, la fuerza de interacción es proporcional a d^{-2} y de d^{-7} para las fuerzas de Van der Waals. Por lo tanto, para que estas fuerzas ejerzan acción de interacción, las moléculas deben estar muy próximas entre sí.

Por otro lado, la repulsión estérica también es proporcional con la distancia (d^{-12}) en una forma sensible. Estas fuerzas repulsivas entre átomos no enlazados surgen de la interpenetración de sus nubes electrónicas, y serán determinantes para la existencia o no de la interacción antígeno-anticuerpo. Una mejor complementariedad entre las nubes electrónicas del determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo disminuirá las fuerzas repulsivas, y así crecerán las oportunidades de la formación de fuerzas atractivas moleculares.

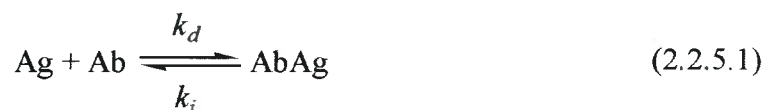
Dado que las fuerzas intermoleculares involucradas en la formación y estabilización del complejo antígeno-anticuerpo son variadas y heterogéneas, es dificultoso predecir las condiciones óptimas para la formación o disociación de tal

complejo. Sin embargo, se pueden realizar algunas generalizaciones. Por ejemplo, las interacciones electrostáticas entre el antígeno y el anticuerpo son particularmente dependientes del pH del medio y, para valores de pH alejados del intervalo entre 6-8, se produce la disrupción del complejo. Resultados equivalentes se obtienen cuando se aumenta significativamente la fuerza iónica [11]. La temperatura también posee un gran efecto en la reacción de interacción antígeno-anticuerpo.

En la literatura existen estudios acerca de los sitios de unión (epítopes) de los antígenos frente a un anticuerpo mediante cristalografía de rayos X [45]. Por ejemplo, se ha determinado que el sitio de interacción de la progesterona con el anticuerpo monoclonal antiprogesteroa es el anillo D. Ha sido propuesto mediante análisis tridimensional del sitio de unión del anticuerpo monoclonal antiprogesteroa que la alta afinidad de unión es debida a las interacciones producidas con el anillo D y puentes hidrógeno generados con el grupo cetona en el carbono 20. Estos efectos han sido corroborados empleando progesterona a la cual se le agregaron distintos sustituyentes en el anillo D. Se produce una disminución notable de la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno por la presencia de estos sustituyentes. En contraste, cambios producidos en el anillo A resultaron solo en una pequeña disminución en la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno, poniendo en evidencia que las interacciones están centradas en el anillo D [45].

2.2.5. Afinidad entre el antígeno y el anticuerpo

Para un anticuerpo monovalente o monoclonal (Ab), es decir, que solo interactúa con una molécula de antígeno, y un antígeno (Ag), la reacción inmunológica que se lleva a cabo es la de reconocimiento del antígeno (Ag) por el sitio de unión del anticuerpo (Ab) formando un complejo anticuerpo/antígeno (AbAg), representado en la ecuación 2.2.5.1:



donde k_d y k_i se corresponden a las constantes de velocidad de formación y disociación del complejo, respectivamente.

El término afinidad del anticuerpo se refiere a la fuerza de la interacción entre un determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo. Se define la constante de afinidad (K_{af}) del anticuerpo hacia el antígeno por la siguiente ecuación:

$$K_{af} = \frac{k_d}{k_i} = \frac{[AbAg]}{[Ag][Ab]} \quad (2.2.5.2)$$

Cuanto más grande sea la relación entre k_d y k_i , mayor será la afinidad del anticuerpo por el antígeno, formando una fuerte unión entre ambos [11]. En este caso, va a existir una baja tendencia hacia la disociación del complejo. En otras palabras, en estado de equilibrio existirá una gran cantidad de complejo formado lo cual implica que, para una cantidad constante de anticuerpo, se requiere menor cantidad de antígeno para alcanzar un 50 % de unión (mitad de saturación), valor requerido para anticuerpos de baja afinidad [11,46].

Un punto importante en el desarrollo de un inmunosensor es la reversibilidad que poseerá el mismo. Sin embargo, una alta reversibilidad para un inmunosensor implica una disminución en la sensibilidad. Esta dependencia puede ser mejor observada si uno analiza la K_{af} [46]. Como se mencionó anteriormente, a fin de obtener una buena sensibilidad y un intervalo operativo de trabajo considerable, se elige trabajar con concentraciones de antígeno marcado que arrojen una respuesta con un valor del 50 % del valor de la máxima respuesta. El 50 % de un ensayo indica el intervalo donde el ensayo opera con una buena sensibilidad. Por otra parte, es en esta región donde se alcanzan las medidas más exactas [46]. Para la reacción de interacción dada por la ecuación 2.2.5.1 y la ecuación 2.2.5.2, el 50 % de la señal indica que solo la mitad de los sitios de unión han sido ocupados. Se puede plantear una relación entre la K_{af} y la concentración de antígeno marcado para una señal del 50 % de la señal máxima:

$$[AbAg] = [Ab] \quad (2.2.5.3)$$

y

$$K_{af} = \frac{1}{[Ag_{0,5}]} \quad (2.2.5.4)$$

donde $[Ag_{0,5}]$ se corresponde a la concentración de antígeno libre encontrada cuando hay un 50 % de sitios de unión ocupados. $[Ag_{0,5}]$ es inversamente proporcional a la K_{af} . Esto indica que para la mitad de la saturación, una baja concentración de antígeno es necesaria para una alta afinidad del elemento de reconocimiento. Cuando se obtiene un ensayo muy sensible, el cual requiere una gran afinidad entre el anticuerpo y el antígeno (alto valor de K_{af}), se observa una pequeña concentración de Ag para alcanzar la mitad de la señal, siendo éste un indicativo que la unión del antígeno con el anticuerpo es prácticamente irreversible [11,46,47].

2.2.6. Inmunosensores electroquímicos

Un **biosensor de afinidad** es un dispositivo que pone de manifiesto la unión selectiva de ciertas biomoléculas (anticuerpos, receptores, oligonucleótidos) hacia una especie específica de analito (por ejemplo, un antígeno, una cadena complementaria de ADN, etc) sin que exista transformación catalítica, sino que se produce una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor. Luego, se traduce esta interacción en una señal eléctrica medible [48,49]. Dentro del grupo de los biosensores de afinidad, se pueden diferenciar los **inmunosensores**. Estos se caracterizan por presentar un anticuerpo como elemento de reconocimiento biológico y, por lo tanto, responsable de la especificidad del sensor.

En este caso, sobre la superficie de un soporte sólido suele unirse el anticuerpo o el antígeno de interés y participa de la interacción bioespecífica con el otro componente (si se retiene el antígeno, éste interaccionará con el anticuerpo, si se retiene el anticuerpo, este interaccionará con el antígeno de la muestra), seguido de la cuantificación del analito.

Los tipos de transductores empleados son electroquímicos (amperométricos, potenciométricos, conductimétricos, etc.), ópticos (fluorescentes, luminiscentes), o transductores sensibles a cambios de masa o propiedades térmicas [50].

Combinando la sensibilidad y la especificidad de la reacción de interacción entre un antígeno y un anticuerpo con la alta sensibilidad y la relativa simplicidad de las técnicas electroquímicas modernas, se pueden producir inmunosensores electroquímicos con gran sensibilidad, lo cual es importante en distintas áreas como diagnóstico clínico,

monitoreo del medioambiente, control de calidad de aguas y alimentos, análisis de bioprocesos [48].

Los resultados de los métodos inmunoquímicos son comparables con aquellos métodos de análisis químicos tradicionales, como ser los métodos cromatográficos y espectroscópicos, especialmente cuando la eficiencia de los pasos de preparación de la muestra es similar.

La sensibilidad y especificidad de un inmunosensor estará gobernada por la especificidad y afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo y del ruido y selectividad del transductor empleado [50]. En un sentido ideal, un inmunosensor debe ser un dispositivo multiuso, dada la reversibilidad de la interacción antígeno-anticuerpo hacia la regeneración del elemento inmovilizado. En la práctica, para alcanzar una sensibilidad adecuada, se necesita que el complejo antígeno-anticuerpo posea una afinidad alta, con valores de constante de afinidad superiores a 10^{10} M^{-1} [46]. Este requerimiento de un alto valor de constante de afinidad lleva a una difícil regeneración del elemento biológico unido a la superficie, por lo que suelen ser sistemas de un solo uso [51]. No obstante, el elemento biológico unido a la superficie puede regenerarse mediante la disociación del complejo a través de la aplicación de distintos agentes que cambian las condiciones del medio (como variaciones de pH, fuerza iónica), aunque estas condiciones suelen dañar la estructura del anticuerpo con el correr de los ensayos [52].

Los biosensores de afinidad, los cuales se basan en el uso de anticuerpos o elementos de reconocimiento, presentan, en ocasiones, un intervalo de concentración de trabajo estrecho, debido a que se puede producir una saturación del receptor y, a menudo, no permiten un monitoreo continuo de la concentración de analito, como se verá más adelante. Por otra parte, el elemento de reconocimiento debe estar en contacto directo con la muestra por lo que el empleo de estos inmunosensores en muestras con una matriz muy compleja puede ser dificultoso, más allá de la gran afinidad que presentan los receptores biológicos hacia una molécula en particular.

En la Tabla 2.2.6.1 se muestran las ventajas y desventajas de trabajar con anticuerpos en el armado de biosensores de afinidad.

Los **transductores electroquímicos** están formados por un sistema de tres electrodos (electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia) inmersos en

una celda electroquímica que contiene la solución. Los electrodos de trabajo son por lo general contruidos de una gran variedad de materiales, dentro de los cuales, los más comunes son: platino, oro, plata, carbono en sus distintas formas, niquel y paladio [49].

Tabla 2.2.6.1. Ventajas y desventajas del empleo de anticuerpos en la construcción de biosensores.

Ventajas	Inconvenientes
Elevadas sensibilidad y especificidad	Difícil regeneración
Estabilidad química	Requieren contacto directo de la muestra
Afinidad variable	No amplifican la señal
Respuesta rápida	No existe consumo del analito por lo que se saturan (rango de operación de concentración estrecho)
Bajo costo	No permiten detectar sustancias desconocidas

Los transductores electroquímicos usualmente se usan cuando se emplean enzimas o compuestos redox en el inmunoensayo para generar una señal eléctrica, por lo general, seguida por técnicas amperométricas.

Los detectores amperométricos son los detectores electroquímicos más empleados, ya que permiten una rápida detección, con límites de detección inferiores a 10^{-10} M cuando se emplean formatos de trabajos competitivos. Dado que la detección amperométrica es producida por una transferencia de electrones heterogénea (interfaz electrodo-solución), las medidas electroquímicas son más fáciles de realizar que las espectrofotométricas cuando se trabaja con muy pequeños volúmenes de muestra [49].

Dado que los anticuerpos y los antígenos son usualmente electroinactivos, o electroactivos a altos potenciales aplicados [53], a la hora de cuantificar una interacción antígeno-anticuerpo por una técnica amperométrica, se necesita unir uno de ellos a un compuesto electroactivo, o que produzca un compuesto electroactivo vía una reacción secundaria, como en el caso del empleo de enzimas como marcadores [49].

2.2.7. Formatos empleados con inmunosensores electroquímicos

Se emplean dos formatos de inmunoensayos: homogéneos y heterogéneos. Los *ensayos homogéneos* permiten llevar a cabo la reacción inmune en solución. En este caso se necesita el empleo de un antígeno y un anticuerpo libre y uno de los dos marcados (generalmente unidos a una enzima). Este ensayo puede ser realizado sin la necesidad de etapas de separación o lavados [49]. Si se trabaja con el antígeno o el anticuerpo unido a una superficie sólida, caso que será utilizado en este trabajo, se está en presencia de un *inmunoensayo heterogéneo*. Esta técnica necesita, generalmente, del marcado del antígeno con una enzima, según el transductor empleado. Por lo general, es necesario un paso de separación y lavado del sistema luego de la interacción antígeno-anticuerpo. Las constantes de asociación y disociación de dicha interacción en un inmunoensayo heterogéneo, sin embargo, pueden diferir significativamente de los valores hallados para la interacción en el seno de la solución. Esto ocurre debido a la necesidad del antígeno a difundir desde el seno de la solución hasta la superficie de la fase sólida y también es debido a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y la fase sólida y de la forma en que éste interaccione con la misma.

La interacción entre el antígeno y el anticuerpo se puede medir en *forma directa*, es decir, se mide el cambio en una propiedad producido por dicha interacción en tiempo real, ya sea con la biomolécula marcada o no, o se puede medir la interacción en *forma indirecta*.

La *detección directa* de la interacción del antígeno con el anticuerpo se basa en los cambios físicos que se producen en la superficie del biosensor de afinidad. Por ejemplo, mediante el empleo de la microbalanza de cristal de cuarzo, se puede observar cómo varía la frecuencia de resonancia del electrodo piezoeléctrico con el aumento de masa en su superficie debida a la reacción de interacción atígeno-anticuerpo [54,55]. También, por medio de espectroscopía de impedancia electroquímica, se puede seguir dicho proceso de interacción por medidas de la resistencia de la transferencia de carga de una molécula prueba en la superficie del sensor [56-58].

Para la cuantificación en *forma indirecta*, ya que no existe consumo de sustratos ni generación de productos, se suele utilizar una marcación con una enzima al receptor o bien al elemento que compita con el analito por la unión al receptor, dando lugar a una

reacción biocatalítica complementaria que es la que detecta el sistema de transducción. Para este último caso, la máxima señal medida se alcanza para concentraciones de antígeno tendiendo a cero.

Este formato de trabajo plantea como inconveniente el hecho de tener que unir covalentemente (marcar) una biomolécula o analito con una enzima mediante una reacción química, reacción que es compleja de llevar a cabo como así también la purificación de su producto de reacción [59]. Además, para este formato indirecto de trabajo, se requieren pasos posteriores de lavado a fin de separar el exceso de moléculas marcadas y de la adición de sustratos enzimáticos para que ocurra la reacción que cataliza la enzima que se usa como marcadora.

Por lo general, a la hora de marcar o conjugar un antígeno o un anticuerpo, se emplean enzimas oxidoreductasas, las cuales poseen valores grandes de constante de velocidad catalítica, como la enzima peroxidasa de rabano picante, glucosa oxidasa, β -galactosidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, cuyos productos de reacción son electroactivos, hecho importante cuando el transductor a emplear es electroquímico y, en soluciones turbias, donde los transductores ópticos no se podrían utilizar [60]. Asimismo, otra enzima muy empleada para los inmunoensayos indirectos es la fosfatasa alcalina. Esta enzima cataliza la reacción de defosforilación de varios fosfatos orgánicos, cuyos productos de reacción son electroactivos, tal es el caso del empleo de 1-naftilfosfato como sustrato enzimático, donde el producto de reacción es el 1-naftol, susceptible de ser oxidado electroquímicamente [13,50].

El ensayo directo es un ensayo no competitivo. La señal obtenida es directamente proporcional a la concentración de analito de la muestra. En este caso, se obtiene una mejor señal cuanto más grande es la concentración de anticuerpo inmovilizado, para asegurar que se una la mayor proporción de analito.

Cuando se trabaja en forma indirecta se realiza una competencia por los sitios de unión o paratopos del anticuerpo disponibles en cantidad limitada. En los ensayos indirectos, la señal medida es inversamente proporcional a la concentración de analito de la muestra. Los ensayos competitivos indirectos están basados en medidas de los sitios de unión del anticuerpo que no están unidos al analito proveniente de la muestra.

Para determinar un dado antígeno mediante los inmunosensores electroquímicos, generalmente, se une el anticuerpo específico para el antígeno de interés a la superficie

del electrodo. Luego, el electrodo se sumerge en una solución de concentración desconocida del antígeno y el antígeno marcado con una enzima de concentración conocida. Después de incubar un dado tiempo, a fin de dejar llevar a cabo la reacción inmune y la competencia por los sitios de unión del anticuerpo entre el antígeno y el antígeno marcado, se retira el electrodo de la solución y se enjuaga a fin de remover lo que no ha reaccionado específicamente. La cantidad de antígeno marcado unido al inmunosensor es determinada directamente desde la señal del transductor.

En las Figuras 2.2.7.1-2.2.7.3 se muestran tres configuraciones diferentes para enzimoimmunoensayos electroquímicos, los cuales son los ensayos más comunes, en donde el sistema de detección colorimétrico convencional es reemplazado por el biosensor [11,49].

En la Figura 2.2.7.1 se muestra un ensayo simple de competición para el antígeno. Se adapta al principio general del análisis de saturación. En este caso, el antígeno marcado compite con el antígeno presente en la muestra por los sitios de unión (paratopos) de una cantidad limitada de anticuerpo inmovilizado en una fase sólida, que puede o no ser la superficie del electrodo. Luego de un tiempo de incubación necesario para que se produzca la competición por el anticuerpo, se separa el complejo de anticuerpo unido con el antígeno y antígeno marcado con la enzima. La actividad enzimática asociada a la fase sólida está inversamente relacionada a la concentración de antígeno de la muestra.

En la Figura 2.2.7.2 se muestra un enzimoimmunoensayo electroquímico competitivo, en donde la competencia se da entre el antígeno en solución y el antígeno inmovilizado. En este caso, sobre la fase sólida se inmoviliza el antígeno. Luego, el sensor es llevado a una solución conteniendo antígeno proveniente de la muestra y se le agrega una cantidad limitada de anticuerpo marcado con una enzima. Se deja incubar al sistema. Se produce una competencia por el anticuerpo en solución entre el antígeno de la muestra y el antígeno inmovilizado. Luego, se remueve el sensor de la solución, y se mide la actividad enzimática asociada al complejo antígeno-anticuerpo formado en la superficie del sensor. La respuesta obtenida será inversamente proporcional a la concentración de analito soluble. En este caso, la unión del antígeno a la fase sólida no debe afectar, en gran medida, el epítopo del antígeno.

Por último, otro formato comúnmente empleado es el enzimoimmunoensayo tipo sándwich, el cual es una forma directa de medir la concentración de analito. Este formato se emplea cuando se quiere determinar antígenos con múltiples epítopes, en donde el analito quedará incluido entre dos anticuerpos. En la Figura 2.2.7.3 se muestra el formato del ensayo. En primer lugar, se inmoviliza el anticuerpo específico sobre una superficie sólida. Posteriormente, se lleva el sensor a una solución que contiene el analito, el cual interacciona con el anticuerpo inmovilizado. Se remueve el sensor, se lo lleva a una solución que contiene una cantidad conocida de anticuerpo marcado con una enzima. Como el antígeno posee más de un sitio de unión, se unirá al segundo anticuerpo. La actividad enzimática estará relacionada con la cantidad del segundo anticuerpo que ha interactuado, siendo la respuesta observada proporcional a la concentración de analito.

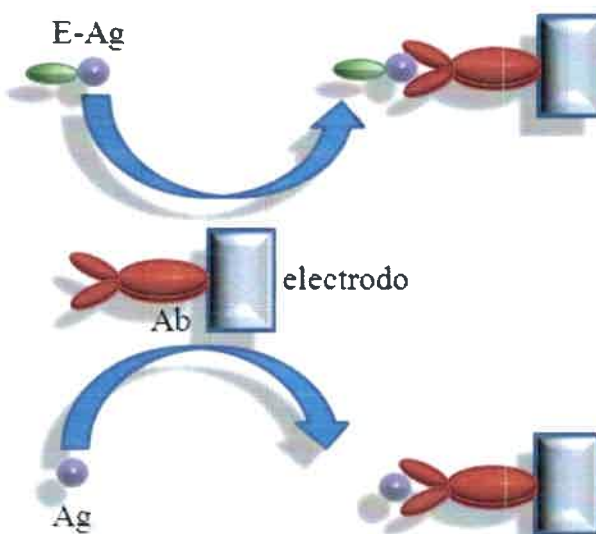


Figura 2.2.7.1. Enzimoimmunoensayo electroquímico competitivo para el antígeno. Abreviaciones: Ag = antígeno, Ab = anticuerpo, E-Ag = antígeno conjugado

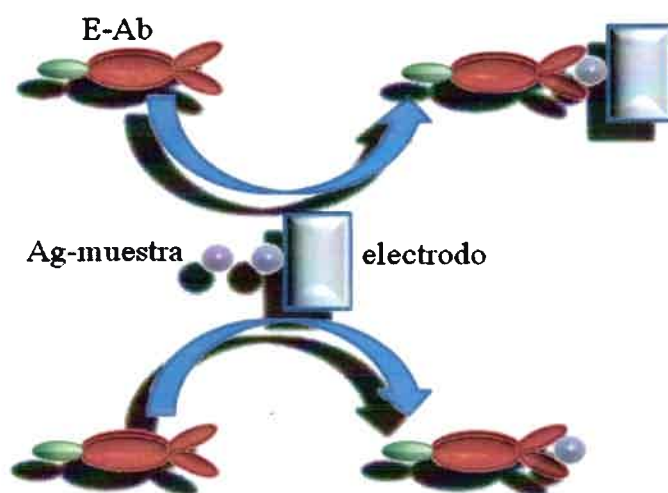


Figura 2.2.7.2. Enzimoinmunoensayo electroquímico competitivo para el antígeno en solución e inmovilizado. Abreviaciones: Ag-muestra = antígeno proveniente de la muestra, E-Ab = anticuerpo conjugado

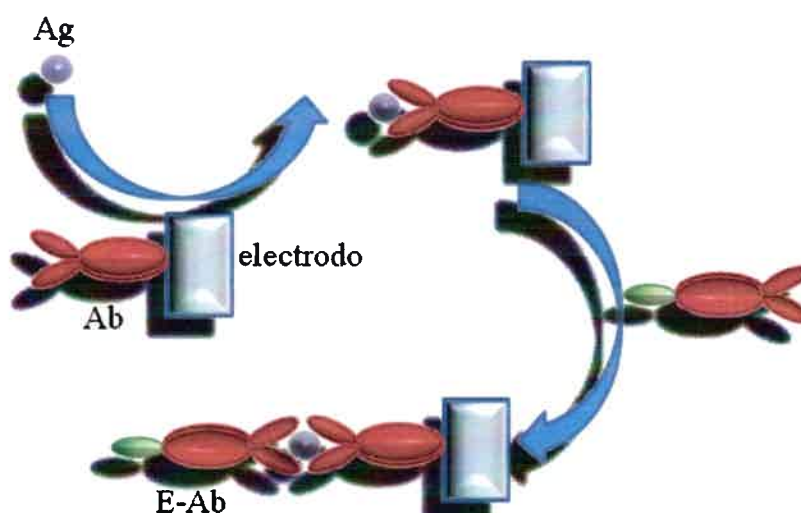


Figura 2.2.7.3. Enzimoinmunoensayo electroquímico sándwich. Abreviaciones: Ag-muestra = antígeno proveniente de la muestra, E-Ab = anticuerpo conjugado

2.2.8. Tiempo de incubación y temperatura

Un aspecto importante en el desarrollo de un inmunoensayo competitivo es el tiempo en que se debe llevar a cabo la incubación de los reactantes a fin de alcanzar el equilibrio de la reacción de interacción entre el elemento de bioafinidad y el analito

[49]. Es necesario, en la etapa de incubación, un dado tiempo a fin de alcanzar un equilibrio para los valores relativos de las constantes de velocidad de disociación del competidor (antígeno que compite por los sitios activos del anticuerpo con el analito) y el analito en la formación del complejo con el anticuerpo, como así también para sus concentraciones [61]. Este tiempo se denomina *tiempo de incubación*. Cuando la velocidad de disociación del complejo anticuerpo-competidor es mucho más rápida que la correspondiente a la disociación del complejo anticuerpo-analito, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es fuertemente dependiente de la concentración de analito, mientras que la constante cinética de disociación del complejo anticuerpo-competidor y la concentración del competidor son no significativas. Si por el contrario, cuando la velocidad de disociación del complejo anticuerpo-analito es mucho mayor que para el complejo anticuerpo-competidor, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio dependerá principalmente del competidor.

Si el tiempo de incubación no es determinado correctamente, la respuesta obtenida para el inmunoensayo dependerá de si existe un proceso de mezclado de los inmunoreactantes [62]. Existen básicamente tres formas de mezclado de reactivos: 1) un pre-mezclado del analito y el competidor, seguido por la adición de la solución donde se encuentra el anticuerpo inmovilizado (competición verdadera); 2) pre-mezclado del analito con el anticuerpo inmovilizado, seguida de la adición del competidor (desplazamiento del analito) y 3) preincubación del competidor con el anticuerpo inmovilizado, con posterior adición del analito (desplazamiento del competidor) [62].

Dependiendo de las constantes de velocidad de disociación del analito y el competidor con el anticuerpo, la distribución de las fracciones unidas con el anticuerpo puede variar en el tiempo y la sensibilidad del ensayo dependerá de que tan lejos del equilibrio se realice la medida [61].

La temperatura es, a menudo, un factor usado para modular la afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo. La dependencia entre la constante de equilibrio (afinidad) y la temperatura está dada por la siguiente ecuación:

$$K = Ae^{-\Delta G/RT} \quad (2.2.8.1)$$

donde K es la constante de equilibrio, ΔG es el cambio de energía libre, R es la constante de los gases, y A es una constante específica para cada reacción.

La dependencia de K con la temperatura juega un papel importante a fin de poder establecer la relación entre los roles relativos de los cambios de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) de la interacción antígeno-anticuerpo. Por medio de la ecuación de Van't Hoff (ecuación 2.2.8.2) y teniendo en cuenta que $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ se puede determinar las variaciones de ΔH y ΔS con la temperatura para la interacción del antígeno con el anticuerpo.

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (2.2.8.2)$$

En la Tabla 2.2.8.1 puede observarse la dependencia de ΔH y ΔS con la temperatura para moléculas pequeñas y algunas hormonas [63].

Como se observa en la Tabla 2.2.8.1, la contribución de ΔH^0 para estas hormonas es próximo a cero, siendo muy pequeña la dependencia de la constante de equilibrio con la temperatura, lo que demuestra que no hay un efecto considerable de la temperatura durante el proceso de incubación.

Tabla 2.2.8.1. Constantes termodinámicas para la interacción de anticuerpos con algunas hormonas.

Antígeno	ΔH^0 (Kcal mol ⁻¹)	ΔS^0 (Kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)	Variación de T (°C)	$K \times 10^{-9}$ l mol ⁻¹
Aldosterona	+3,0	42	5 a 37	5,0 a 2,9
Estradiol	-4,6	40	6 a 25	34 a 20
Estriol	0	51	4 a 37	2,1 a 2,0
Testosterona	-1,0	50	4 a 37	8,9 a 7,3

ΔH^0 y ΔS^0 son la variación de la entalpía y entropía de interacción.

K es la constante de equilibrio para dos diferentes temperaturas.

2.2.9. Unión del elemento de reconocimiento a la superficie del sensor

Para el armado de un biosensor, uno de los requerimientos principales a satisfacer es que el elemento biológico de reconocimiento pueda producir, al interaccionar con el analito, cambios físico-químicos en la cercanía del sensor. Por lo tanto, es crucial en el desarrollo de un biosensor de afinidad la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre una membrana o matriz. El material de base puede actuar únicamente como soporte del material de reconocimiento biológico o participar, además, en la transmisión de la señal al sistema de transducción.

La inmovilización no solo ayuda a retener y aproximar el biomaterial a la superficie del transductor o soporte, sino que ayuda a la estabilización del biosensor para su reutilización.

Existen diferentes metodologías para inmovilizar un elemento de bioreconocimiento sobre un dado soporte. Entre las técnicas empleadas, las más comunes son la adsorción física, el atrapamiento, el entrecruzamiento o reticulado (cross-linking), la formación de enlaces covalentes o una combinación de ellas. La elección de uno u otro depende de la naturaleza del elemento biológico, del tipo de transductor, de las propiedades físico-químicas del analito y las condiciones de trabajo del biosensor de afinidad [48].

Los requerimientos para una exitosa inmovilización de elementos de bioreconocimiento son [64]:

- I- Que el biomaterial pueda ser bien fijado sobre o dentro de la matriz (por ejemplo, al trabajar con matriz polimérica) con un mínimo de pérdida de actividad.
- II- Que las propiedades de reconocimiento biológico de la biomolécula permanezca luego de la inmovilización.
- III- Que exista una mínima disminución de la selectividad del elemento de reconocimiento fijado sobre la matriz en la construcción del biosensor de afinidad.
- IV- Mejorar la transferencia electrónica si se aplican medidas amperométricas como sistema de transducción de la señal.

Las formas de inmovilización más comunes son descritas a continuación [48,65]:

2.2.9.1. Adsorción física

Es el método más antiguo y más simple de los procesos de inmovilización. Se basa principalmente en las fuerzas de atracción de Van der Waals que actúan entre la molécula biológica (por ejemplo, anticuerpo) y la superficie del soporte sólido. Estos soportes son matrices de celulosa, gel de sílice, colágeno, hidroxiapatita, acetato. Para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos se emplean superficies de carbono en sus distintas formas. En la literatura existen trabajos en donde realizan inmunosensores electroquímicos empleando electrodos impresos de carbono [13,66-68]. La desventaja principal de la adsorción física del elemento de reconocimiento es que las fuerzas de interacción no pueden ser controladas fácilmente y la interacción es tan débil que parte de los anticuerpos se pierden (desorción) dependiendo de las condiciones experimentales tales como pH, fuerza iónica, temperatura y tipo de solvente. Las ventajas de trabajar con esta forma de retención de la biomolécula son su bajo costo, su sencillez, poseer una matriz regenerable y sin realizar modificación de la biomolécula.

Con el empleo de nanoestructuras de oro para el armado del biosensor de afinidad, se han logrado desarrollar sensores más estables, debido a que la fuerza de interacción entre el oro nanoestructurado y la biomolécula es más fuerte (quimioadsorción) [42,56,69,70]. Las nanoestructuras de oro proveen un micromedioambiente favorable para la inmovilización de biomoléculas reteniendo su actividad biológica [42]. Una interacción muy fuerte entre la superficie y el anticuerpo puede producir una disminución de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno.

2.2.9.2. Atrapamiento por una matriz

Por lo general se emplean matrices de agar, nylon, almidón, poliacrilamida, matrices compósitas rígidas de grafito-teflón y grafito-resina epoxi. También se emplean polímeros conductores, los cuales son considerados muy buenos sustratos para la inmovilización de biomoléculas [64]. Esta metodología se basa en la inclusión de anticuerpos en matrices de polímeros, en donde el elemento de reconocimiento queda retenido en las cavidades interiores de la matriz, impedido estéricamente de salir [56,71,72]. En este caso, se realiza una electropolimerización en una solución

conteniendo el monómero, de los cuales los más usados son el pirrol, acetileno, anilina, p-fenileno y tiofeno, y la molécula de bioreconocimiento. El más empleado es el monómero pirrol, el cual puede polimerizar a partir de una solución de pH neutra, facilitando el empleo de moléculas biológicas, que en su estado nativo se encuentran en medios cercanos a $\text{pH} = 7$ [64,73].

El atrapamiento electroquímico en la generación de biosensores se basa en la generación de películas de polímeros a partir de soluciones del monómero conjuntamente con la biomolécula, en donde la solución deberá tener un valor de pH diferente y alejado al valor del punto isoeléctrico de la biomolécula. De esta manera, durante la electropolimerización, la biomolécula actuará como dopante conjuntamente con los electrolitos presentes en la solución [44,74,75].

Esta forma de inmovilización posee las ventajas de su bajo costo, sencillez de ejecución, se necesita poca cantidad del elemento de bioreconocimiento, no se necesita modificar la biomolécula de reconocimiento y existe una gran proximidad entre el elemento transductor y la biomolécula de reconocimiento.

Las principales desventajas radican en la unión débil existente (atrapamiento por impedimento estérico para la salida de la biomolécula), se necesita un control estricto de la etapa de polimerización y el sensor es no regenerable.

2.2.9.3. Entrecruzamiento

Se basa fundamentalmente en la generación de uniones irreversibles de los elementos de reconocimiento entre sí mediante el empleo de reactivos bifuncionales creando una red tridimensional la cual se adsorbe sobre la superficie del sensor o se une químicamente a él. Los reactivos bifuncionales comúnmente empleados son glutaraldehído, hexameten-dí-isocianato, 2,4-dinitro-benceno.

Las ventajas de esta manera de inmovilizar el elemento biológico son su costo moderado, se genera una matriz estable en condiciones extremas, se produce una mínima pérdida del elemento biológico. Las desventajas son el empleo de sustancias químicas tóxicas y el hecho que se produce una matriz no regenerable.

2.2.9.4. Enlace covalente con la superficie

A través de enlaces covalentes se generan los sensores más estables en el tiempo con una mínima pérdida de elemento biológico. Se necesita contar con grupos funcionales en la biomolécula (por ejemplo, grupos carboxilos o aminos) como en la superficie del biosensor de afinidad. Generalmente, en proteínas, dichos grupos provienen de grupos aminoácidos. Los más importantes son los grupos amino terminal de la *L*-lisina y grupos carboxilos de *L*-aspartato y *L*-glutamato. En los anticuerpos, los grupos reactivos son los grupos amino terminales, que se sitúan en las cadenas livianas y pesadas de los fragmentos Fab, y los grupos carbonilos terminales de las cadenas pesadas encontradas en los regiones Fc (Figura 2.2.3.1).

En la práctica, se emplean superficies modificadas de diferentes maneras, como ser mediante el uso de polímeros conductores, por ejemplo, de polianilina. En este caso, los grupos aminos secundarios presentes en la cadena polimérica como también las aminos primarias presentes en las extremidades de los oligómeros pueden reaccionar con grupos aldehídos a través de un entrecruzamiento de moléculas formando enlaces del tipo enamina e imina [54,76]. Se emplea, a menudo, glutaraldehído como agente entrecruzante entre la superficie y la biomolécula, dado que ésta molécula posee grupos aldehído en sus extremos. El empleo de polímeros sobre la superficie del biosensor requiere la presencia de grupos funcionales reactivos, tales como grupos carboxílico y/o aminos [77-79].

El uso de electrodos de oro implica la modificación de la superficie de los mismos con tioles que posean en un extremo grupos carboxilo o amino [57,80,81]. El empleo de electrodos de oro ha sido utilizado en el desarrollo de electrodos de bioafinidad mediante el empleo de espectroscopía de impedancia electroquímica como también el uso de la microbalanza de cristal de cuarzo [57].

El empleo de vidrio de porosidad controlada funcionalizado con grupos amino terminales, también implica la generación de enlaces covalentes con el elemento biológico de afinidad. En este caso, se coloca sobre un soporte inerte el vidrio de porosidad controlada en donde se une covalentemente, mediante una unión con glutaraldehído, a los grupos amina del elemento de reconocimiento. El transductor, en

este caso, no es la matriz soporte, si no que se puede cuantificar, por ejemplo, mediante un electrodo sensible al producto de una reacción enzimática [82].

La gran ventaja de inmovilizar covalentemente el elemento biológico sobre la superficie del elemento transductor es la estabilidad en condiciones extremas lograda. Las desventajas son la generación de biosensores no regenerables, inviable para elementos biológicos sensibles al pH y la temperatura, el tratamiento con sustancias químicas tóxicas y su elevado costo.

Siempre que se ponga de manifiesto una unión química del elemento de reconocimiento con una molécula reactiva, se corre el riesgo de producir una alteración en el centro activo del elemento de reconocimiento, alterando sus propiedades.

CAPITULO 3

3. Técnicas Empleadas. Fundamentos Teóricos

En éste capítulo se describen los fundamentos teóricos de las técnicas empleadas. En una primera parte, aquellos relacionados a las técnicas electroquímicas y, al final, los principios básicos de la técnica de inmunoensayo ELISA.

3.1. Introducción

Examinar la manera en la cual una propiedad eléctrica de una celda electrolítica cambia con el tiempo, en respuesta a alguna perturbación del sistema es, tal vez, la forma más común y más utilizada para estudiar lo que ocurre en una interfaz electrodo-solución.

A menudo, el experimento es llevado a cabo para, entre otros fines, determinar la concentración de alguna especie en la solución electrolítica y, por otra parte, obtener información acerca de las velocidades y mecanismos de los procesos de electrodo. Una de las ramas de la electroquímica estudia los cambios químicos asociados con la transferencia de carga entre dos fases. La transferencia de carga puede ser *homogénea*, es decir, producirse en el seno de una fase (solución) o *heterogénea*, por ejemplo, cuando se produce sobre la superficie de un electrodo. Para asegurar el principio de electroneutralidad del sistema, dos o más hemireacciones de transferencia de carga deben llevarse a cabo simultáneamente en direcciones opuestas. Para el caso de transferencia de carga heterogénea, estas hemireacciones ocurren en electrodos diferentes. Cuando la suma de los cambios de energía libre para el proceso global de electrodo es negativa, es posible obtener energía eléctrica del sistema (celdas galvánicas), por otro lado, si los cambios de energía libre del sistema son positivos, hay que entregar energía eléctrica al sistema para obligar a que ocurra la reacción química correspondiente (electrólisis) [83].

3.2. Naturaleza de las reacciones de electrodo

Las reacciones de electrodo (heterogéneas) ocurren en la región de interfaz formada comúnmente entre un material metálico o no-metálico, conductor o semiconductor, y una solución electrolítica conductora. En esta región existe una distribución de cargas que difiere de la del seno de la solución. Como consecuencia de ello, existen distintos procesos fisicoquímicos que se producen en la interfaz. Estos pueden clasificarse como procesos *Faradaico* y *No-Faradaicos*. En todo proceso electroquímico que involucre una transferencia de electrones, los procesos faradaicos y no faradaicos se presentan simultáneamente en la interfaz electrodo-solución.

3.2.1. Procesos no-faradaicos

Para un intervalo de potencial aplicado, donde no hay transferencia electrónica en la interfaz electrodo-solución, debido a que no es termodinámica o cinéticamente favorable, ocurren procesos tales como reordenamientos de cargas iónicas, adsorción y/o desorción de reactivos, solventes, etc., y la estructura de la interfaz puede cambiar a medida que varía el potencial o la composición de la solución. Este cambio transcurre sin transferencia electrónica en la interfaz electrodo-solución, generando una corriente transitoria, llamada *corriente no faradaica* o *corriente de cargado de la doble capa* [84]. En general, los procesos no faradaicos están asociados a corrientes capacitivas, de adsorción, o relacionadas con fenómenos de superficie (pseudocapacitivas), y son capaces de influenciar significativamente en la respuesta electroquímica cuando se produzcan cambios en el área del electrodo, el potencial o la composición de la interfaz.

La corriente no faradaica se puede determinar directamente a partir de una medición electroquímica en el intervalo (“ventana”) de potencial de trabajo para una solución conteniendo solamente el electrolito soporte, es decir, en ausencia de la especie electroactiva de interés.

3.2.2. Procesos faradaicos

Son aquellos procesos en los que una transferencia de carga (electrones) ocurre a través de la interfaz electrodo-solución, procedente de una etapa de oxidación o de

reducción, según en la dirección en que fluyen los electrones, de una sustancia electroactiva en solución. Estos procesos son denominados faradaicos porque están gobernado por la *Ley de Faraday*, que establece que la carga eléctrica vinculada a la reacción del analito de interés involucra un cambio de $n[\text{mol}] \times 96487$ [coulombios/mol], es decir, la magnitud del cambio químico causada por el flujo de corriente es proporcional a la cantidad de carga que atraviesa la interfaz electrodo-solución [84]. La corriente faradaica es una indicación directa de la velocidad de reacción.

Por lo general, los procesos faradaicos son los que tienen mayor interés en estudios electroquímicos. Sin embargo, los efectos de los procesos no-faradaicos deben tenerse en cuenta en el análisis de los datos electroquímicos experimentales si se desea obtener información correcta acerca de la transferencia de carga.

El electrodo puede actuar como fuente o dador (reducción) o como receptor (oxidación) de electrones transferidos hacia o desde las especies en solución. Para que la transferencia electrónica ocurra, debe existir una correspondencia entre los niveles de energía de los orbitales electrónicos del dador y el aceptor respectivamente. Para un electrodo metálico, importa el nivel de energía más alto ocupado, denominado nivel de energía de Fermi (E_F) y, en las especies solubles, es simplemente el nivel de energía del orbital molecular más alto ocupado (orbital de valencia). Para que exista tal correspondencia, el nivel de energía de Fermi es modificado haciendo que el potencial del electrodo sea lo suficientemente negativo para que ocurra el proceso de reducción o positivo para que ocurra la oxidación de la especie en solución. Mediante el empleo de una fuente, generalmente un potencióstato, es posible ajustar los valores de potencial de electrodo para que los procesos faradaicos puedan llevarse a cabo, y controlar el camino y la extensión de una reacción de electrodo.

3.3. Celdas electroquímicas

La solución electrolítica es una de las fases que interviene en la interfaz de interés, a través de la cual la carga es transportada por el movimiento de los iones. Los electrolitos pueden ser soluciones líquidas, sales fundidas o sólidos iónicos conductores [84]. La segunda fase es un electrodo, en donde la carga es transportada por el

movimiento electrónico en su interior. Los electrodos son materiales conductores o semiconductores, los cuales pueden ser sólidos, por ejemplo, platino, níquel, oro, carbono en sus diferentes estados cristalinos, etc., o líquidos, como el mercurio. En la mayoría de las experiencias electroquímicas, el interés está centrado en los eventos que ocurren en una sola interfaz, en la cual se produce la oxidación o reducción de la molécula en estudio. Sin embargo, no se puede estudiar una interfaz aislada, sino un conjunto de interfaces llamadas *celdas electroquímicas*, compuestas, por lo general, por dos electrodos separados por una solución electrolítica.

Cuando se ponen en contacto dos fases, en la interfaz generada se desarrolla una diferencia de potencial característica para el sistema, por lo tanto, para una celda electroquímica, cabe esperar la existencia de una diferencia de potencial medible entre los electrodos, con o sin circulación de carga, la cual es la resultante de todas las diferencias de potencial eléctrico existente en cada una de las interfaces.

La magnitud de la diferencia de potencial en una interfaz afecta la energía relativa de los transportadores de carga en las dos fases, por lo tanto, controla la dirección de la transferencia de carga. Así, la medida y control de los potenciales de celda (diferencia de potencial entre los electrodos en una celda) es uno de los aspectos más importantes de la electroquímica experimental [84].

Cuando en un electrodo se produce una reacción electroquímica, en el otro electrodo también ocurrirá, pero será el proceso inverso. Cada una de estas reacciones electroquímicas se pueden plantear como hemireacciones independientes, las cuales describen los cambios químicos que se producen en la interfaz de los dos electrodos, donde cada hemireacción responde a la diferencia de potencial existente para cada electrodo.

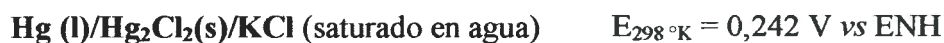
Por lo general, uno está interesado, en la mayoría de las veces, en una de estas hemireacciones. El electrodo donde ocurre la hemireacción de interés, se denomina *electrodo de trabajo o indicador*.

Es sabido que no se puede medir el potencial para una sola interfaz, dado que solo es medible la diferencia de potencial para dos conductores electrónicos. Sin embargo, los potenciales de electrodos de las hemireacciones, se pueden referir al potencial de un *electrodo de referencia*, lo cual es equivalente a controlar la energía de los electrones dentro del electrodo de trabajo. Este electrodo trabaja con una

hemireacción en condiciones normalizadas de manera que su potencial se mantiene constante para un gran intervalo de flujo de corriente. Luego, es posible asignar valores al potencial del electrodo de trabajo, en una escala cuyo cero es el valor de potencial del electrodo de referencia.

Normalmente se utilizan como electrodos de referencia interfaces cuasi-idealmente no polarizables diferentes del electrodo normal de hidrógeno, cuyo potencial absoluto se define como cero [84,85].

Para un electrodo de referencia, el cual es un sistema polarizable en ciertos límites, su potencial es fijo y, por lo tanto, cualquier cambio en la fuerza electromotriz (FEM) de la celda será atribuible al electrodo de trabajo. El electrodo de referencia generalmente más empleado es el electrodo de calomel saturado (ECS), el cual está representado por [85]:



Cuando el potencial del electrodo de trabajo es desplazado del estado de equilibrio hacia valores negativos, la energía de los electrones aumenta y, por lo tanto, pueden alcanzar niveles suficientes como para ocupar estados vacantes de mayor energía de las especies en el electrolito. En este caso, se produce un flujo de electrones desde el electrodo hacia la solución dando lugar a una *corriente de reducción*. Similarmente, la energía de los electrones puede ser disminuida mediante la imposición de un potencial más positivo en el electrodo de trabajo y, es posible que los electrones del soluto, los cuales se encuentran en los orbitales moleculares de mayor energía, fluyan hacia el electrodo, logrando un estado energéticamente más favorable. De esta manera, se genera un flujo de electrones desde el soluto en solución hacia el electrodo generando una *corriente de oxidación*. Existe un potencial característico para estos procesos redox llamado *potencial estándar*, E^0 , que tiene un valor determinado para cada cupla redox.

3.4. Reversibilidad en procesos electroquímicos

Es común emplear los términos *reversibles* e *irreversibles* para caracterizar un dado proceso electroquímico, para los cuales, su interpretación puede ser confusa. Por lo tanto, a continuación, se realiza una breve descripción de los conceptos de reversibilidad.

3.4.1. Reversibilidad química

Considerar la reacción de electrodo que ocurre en la superficie del electrodo en donde se produce la reducción de O:



En este caso, existe un flujo de electrones desde el electrodo hacia el soluto en solución. Cuando el fenómeno es opuesto al anterior, se tiene:



En este caso, se dice que el proceso de electrodo es químicamente reversible.

3.4.2. Reversibilidad termodinámica

Un proceso es termodinámicamente reversible cuando un cambio infinitesimal en su fuerza directriz hace que el proceso progrese en esa dirección. Un cambio reversible entre dos estados presupone una serie continua de estados de equilibrio, cuya sucesión involucra un intervalo de tiempo infinito.

3.4.3. Reversibilidad práctica

En las experiencias electroquímicas, los procesos ocurren a velocidades finitas. Sin embargo, hay procesos electroquímicos que pueden ocurrir en tiempos adecuados

(rápidos), de manera tal de poder emplear las relaciones termodinámicas con bastante exactitud. Para la siguiente cupla redox



donde r y o representan los coeficientes estequiométricos y n el número de electrones intercambiados. El proceso es llamado reversible en un sentido práctico y cumple con la ecuación de Nernst o alguna forma derivada de ella [84]:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f(\gamma_o)}{g(\gamma_r)} \quad (3.4.4)$$

donde $f(\gamma_o)$ y $g(\gamma_r)$ son funciones adecuadas que dan cuenta de la actividad de cada componente de la cupla redox y E^0 es el potencial estándar de la cupla redox.

Por lo general, dado que no es práctico trabajar con actividades, ya que casi siempre son desconocidos los coeficientes de actividad (γ) para las diferentes especies, es conveniente escribir la ecuación de Nernst en función de la concentración:

$$E = E_f^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_o^0}{c_r^0} \quad (3.4.5)$$

donde E_f^0 queda expresado en términos de los coeficientes de actividad de cada una de las especies, y se denomina *potencial formal*.

3.5. Variables existentes para experiencias electroquímicas

Un estudio electroquímico de un sistema dado consiste en conocer cómo se comportan ciertas variables del sistema, como lo son la corriente, el potencial o la concentración, manteniendo el resto de ellas constantes. Las variables de un sistema electroquímico se pueden clasificar en:

- **Variables eléctricas:** potencial (E), corriente (i) y carga (Q)
- **Variables de electrodo:** material, área superficial, geometría, condiciones de la superficie.
- **Variables de transporte de masa:** transferencia de materia por difusión, convección y migración, adsorción sobre la superficie del electrodo, concentraciones en la superficie.
- **Variables de la solución:** concentración de las especies electroactivas en el seno de la solución, concentración de otras especies (electrolito soporte, pH, etc), tipo de solvente.
- **Variables externas:** temperatura (T), presión (P) y tiempo (t).

Un sistema electroquímico experimental básico se observa en la Figura 3.5.1, en donde se muestra un generador de funciones, un potencióstato y el sistema de electrodos (electrodos de trabajo, referencia y contraelectrodo) los cuales se encuentran sumergidos en la solución de trabajo formando la celda electroquímica.

El potencióstato tiene el control del voltaje del par de electrodos trabajo-contraelectrodo, y ajusta este voltaje aplicado para mantener la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y referencia de acuerdo con el programa suministrado por el generador de funciones [84].

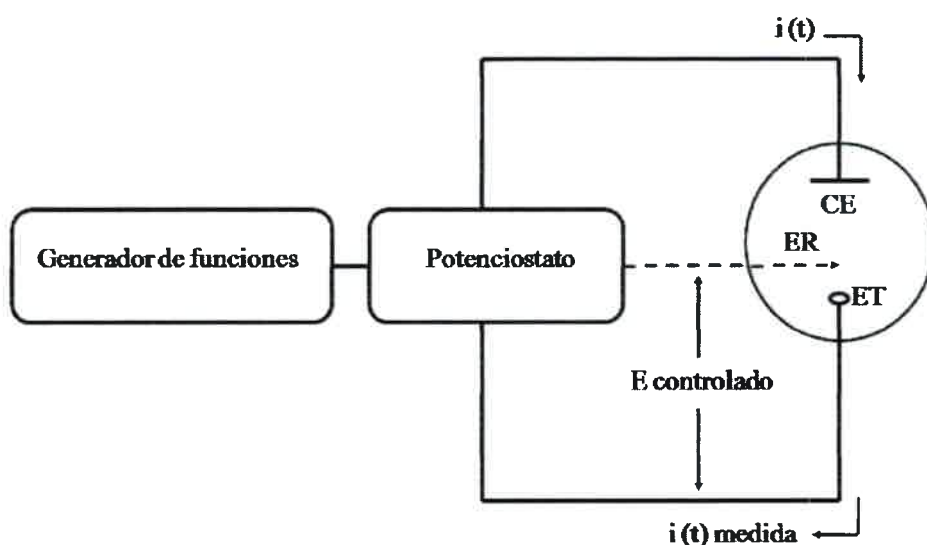


Figura 3.5.1. Esquema de un sistema experimental para experiencias de potencial controlado.

3.6. Factores que afectan la velocidad de reacción de electrodo y la corriente

Considerar la siguiente reacción global de electrodo



Esta reacción está compuesta por una serie de etapas que causan la reducción de la especie oxidada disuelta O , para dar el producto R , también en solución. La corriente (velocidad de reacción de electrodo), por lo general, se encuentra gobernada por la velocidad de diferentes procesos llevados a cabo [84]. Estos pueden resumirse en:

- fenómenos de transporte de masa desde el seno de la solución a la superficie del electrodo y viceversa.
- reacción de transferencia de electrones en la superficie del electrodo.
- reacciones químicas precedentes o posteriores a la transferencia electrónica heterogénea, tales como reacciones de dimerización o protonación.
- fenómenos sobre la superficie del electrodo, tales como adsorción, desorción, electrodeposición o formación de películas.

Cuando se alcanza una corriente de estado estacionario, las velocidades de todas las etapas involucradas en la reacción son las mismas. La magnitud de esta corriente se encuentra limitada por la reacción más lenta, la cual se denomina etapa determinante de la velocidad. Para un proceso de reacción global en donde la etapa determinante de la velocidad está controlada por la velocidad con que la especie llega o deja la superficie del electrodo, es decir, cuando la cinética de todas las reacciones de transferencia de carga y reacciones químicas homogéneas acopladas son mucho más rápidas que los procesos de transferencia de masa, se dice que la reacción está controlada por **difusión**. Por otro lado, si la etapa determinante de la velocidad de la reacción global es la reacción de transferencia de carga, se dice que el proceso tiene **control activado**.

Dependiendo de la escala de tiempo en que se realice el experimento, es posible estudiar ambos procesos separadamente y determinar los parámetros característicos de cada uno de ellos.

3.6.1. Modos de transferencia de masa

El movimiento de material desde un punto en la solución hacia otro, se debe a diferencias existentes en los potenciales eléctricos o químicos entre dos puntos de la solución, o a movimientos de un elemento de volumen de solución. Por lo tanto, los modos de transferencia de masa se pueden resumir en [84,86]:

- **Migración:** movimiento de iones bajo la influencia de un campo eléctrico.
- **Difusión:** movimiento de moléculas bajo la influencia de un gradiente de potencial químico, aplicable tanto a iones como a moléculas neutras. En un proceso de electrólisis, el gradiente de concentración se produce entre el electrodo de trabajo y el seno de la solución.
- **Convección:** se debe a la agitación mecánica de la solución (convección forzada) o por el movimiento del fluido existente en presencia de un gradiente de densidad, que puede ser la resultante de un gradiente de concentraciones, temperatura y/o presión (convección natural o libre).

El flujo de materia de una especie es una cantidad vectorial que denota la cantidad de la especie particular, sea en unidades de masa o molar, que durante un dado tiempo atraviesa un área unitaria. Se puede definir con referencia a coordenadas que permanezcan fijas en el espacio o a coordenadas que se mueven con la misma velocidad promedio que la masa.

Para una dada especie O, la cual se desplaza de un punto a otro dentro de la solución debido a la diferencia de potencial electroquímico ($\bar{\mu}$) existente en la solución a causa de un gradiente de concentración o por la existencia de un campo eléctrico (ϕ) (potencial aplicado a un electrodo de manera de producir una electrólisis en la superficie del mismo), se puede plantear, en general, el flujo de la especie O en dirección al mínimo del gradiente. El flujo J_O ($\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) es proporcional al gradiente, ∇ , de $\bar{\mu}_O$:

$$J_O \propto \nabla \bar{\mu}_O = i \frac{\partial \mu_O}{\partial x} + j \frac{\partial \mu_O}{\partial y} + k \frac{\partial \mu_O}{\partial z} \quad (3.6.2)$$

donde ∇ es el vector operador.

Para una transferencia de masa en una dirección, $\nabla = i \frac{\partial}{\partial x}$, (donde i es el vector unidad a lo largo del eje x es la distancia a un tiempo t), agregando la constante de proporcionalidad, se obtiene:

$$J_O(x,t) = - \left(\frac{c_O D_O}{RT} \right) \frac{\partial \bar{\mu}_O}{\partial x} \quad (3.6.3)$$

Si, aparte del gradiente electroquímico existente ($\bar{\mu}$), la solución es trasladada en la dirección de x a una velocidad v , se suma un término adicional a la ecuación 3.6.3:

$$J_O(x,t) = - \left(\frac{c_O D_O}{RT} \right) \frac{\partial \bar{\mu}_O}{\partial x} + c_O(x,t)v(x,t) \quad (3.6.4)$$

Siendo la $a_o \approx c_o$, la ecuación 3.6.3 se puede reordenar obteniendo la ecuación de *Nernst-Planck*:

$$J_o(x,t) = -D_o \frac{\partial c_o(x,t)}{\partial x} - \frac{z_o F}{RT} D_o c_o \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + c_o(x,t) v(x,t) \quad (3.6.5)$$

donde $J_o(x,t)$ ($\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) es el flujo de la especie O a una distancia x de la superficie del electrodo, D_o es el coeficiente de difusión de la especie O ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), $\frac{\partial c_o(x,t)}{\partial x}$ y $\frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x}$ son el gradiente de concentración y el gradiente de potencial a una distancia x y tiempo t , respectivamente, z_o es la carga, F es la constante de Faraday, c_o la concentración de la especie O y $v(x)$ (cm s^{-1}) es la velocidad con la cual un elemento de volumen en la solución se mueve a lo largo del eje x .

Los tres términos de la derecha de la ecuación 3.6.5 representan a la difusión, migración y convección, respectivamente, para la transferencia de masa en la solución.

A fin obtener una solución más simple de la ecuación diferencial *Nernst-Planck*, en la mayoría de las técnicas electroquímicas se minimizan la contribución del transporte de masa por migración y convección. El aporte migratorio se elimina mediante el agregado a la solución de una gran cantidad de un electrolito, inerte y electroinactivo, en una cantidad 100 veces más concentrado que la especie electroactiva de interés. En electroquímica convencional, se denomina electrolito soporte. Así, el número de transporte se aproxima a la unidad y, por lo tanto, el transporte de los iones del electrolito soporte se convierte en el principal responsable de la corriente migratoria, a la vez que disminuye la resistencia eléctrica de la celda durante el proceso faradaico. Tal electrolito es indispensable en presencia de solventes no acuosos debido a la gran resistencia eléctrica que presentan la mayoría de ellos.

Por otra parte, si se trabaja a tiempos de electrólisis cortos, sin agitar la solución y a temperatura constante, se minimiza el término convectivo, quedando la ecuación 3.6.5 sólo en función de la difusión.

El término difusivo se corresponde a la primera ley de *Fick*, la cual describe, para un sistema isobárico e isotérmico, el flujo de una sustancia O y su concentración

como una función del tiempo y la posición, expresado matemáticamente para un caso de difusión lineal, por medio de la ecuación 3.6.6:

$$J_o(x,t) = -D_o \frac{\partial c_o(x,t)}{\partial x} \quad (3.6.6)$$

Así, $J_o(x,t)$, representa la velocidad de transferencia de masa neta de O en unidades de cantidad por unidad de tiempo y área ($\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) y es proporcional al gradiente de concentración de la especie O .

El flujo difusional es también tiempo-dependiente. Tal dependencia está descrita por la segunda ley de *Fick*, la cual, para una difusión lineal es:

$$\frac{\partial c_o(x,t)}{\partial t} = D_o \frac{\partial^2 c_o(x,t)}{\partial x^2} \quad (3.6.7)$$

Esta ecuación refleja la velocidad de cambio con el tiempo para la concentración de O entre planos paralelos para la distancia x y $(x + dx)$. La segunda ley de *Fick* aquí planteada, es válida para planos paralelos el uno al otro y perpendiculares a la dirección de la difusión de la especie O , condiciones de difusión lineal [41,84].

Así, la resolución de un problema en condiciones de control por transferencia de masa o control difusional, consiste en resolver las ecuaciones diferenciales de las leyes de *Fick*. Esto permitirá conocer cómo varían las concentraciones en el tiempo y con la distancia al electrodo, lo que permitirá conocer la corriente $i = f(x,t)$, el potencial de electrodo y demás parámetros de interés.

Dada la reacción 3.6.1, al aplicar un potencial adecuado al electrodo de trabajo, se produce una electrolisis en cercanías del electrodo, generando una corriente i relacionada a la concentración de la especie O que se está reduciendo en la superficie del electrodo. La i es directamente proporcional al flujo J_o y al área superficial del electrodo (A):

$$i = -nFAJ_o(x,t) \quad (3.6.8)$$

donde n es el número de electrones intercambiados entre la especie O y la superficie del electrodo. Reemplazando la ecuación 3.6.6 en la ecuación 3.6.8 se tiene la corriente en función del gradiente de concentración de O,

$$i = nFAD_o \frac{\partial c_o(x,t)}{\partial x} \quad 3.6.9$$

En la Figura 3.6.1 se muestra un perfil de concentración con el tiempo para una reacción de electrodo cuando se aplica un potencial sobre el electrodo de trabajo.

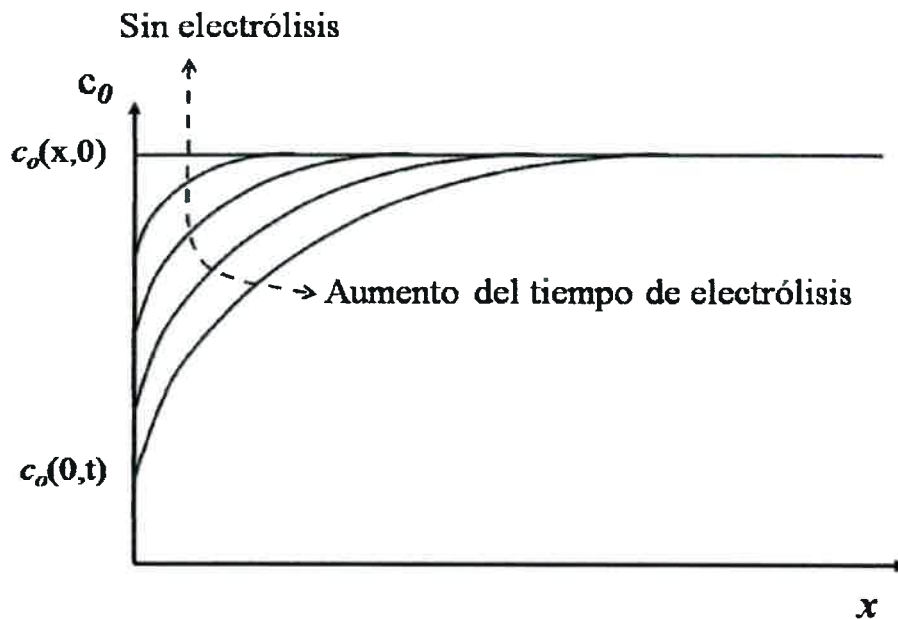


Figura 3.6.1. Variación de los perfiles de concentración de O con el tiempo luego de aplicar un potencial sobre el electrodo. $x = 0$ se corresponde a la superficie del electrodo.

3.7. Reacciones de electrodo controladas por transferencia de masa. Control difusional

Las reacciones de electrodos más simples son aquellas en las cuales la cinética de todas las transferencias electrónicas y reacciones químicas acopladas son muy rápidas comparadas a los fenómenos de transferencia de masa, es decir, con la velocidad

de llegada de las especies electroactivas a la superficie del electrodo. Las concentraciones en la superficie del electrodo de las especies involucradas en el proceso faradaico están relacionadas al potencial del electrodo mediante una forma de la ecuación de Nernst (ecuación 3.4.5) y las reacciones homogéneas pueden ser consideradas en equilibrio.

Este tipo de reacciones se las denomina *reversibles* o *nernstianas*, dado que las reacciones químicas obedecen a relaciones termodinámicas [84].

Considerando un proceso de electrodo (ecuación 3.6.1), en ausencia de migración, en donde la velocidad de transferencia de masa es la etapa determinante de la velocidad y es debida a la difusión de la especie hacia el electrodo, se puede escribir la ecuación de Nernst [41,84]:

$$E = E_f^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_O(x=0)}{c_R(x=0)} \quad (3.7.1)$$

donde $c_O(x=0)$ y $c_R(x=0)$ son las concentraciones de O y R para $(x=0)$.

Aplicando la hipótesis de la capa de difusión de Nernst, donde se plantea un perfil lineal de la concentración de O en función de la distancia x , la corriente de reducción de la especie O en $x=0$ es proporcional al gradiente de concentración de O:

$$\frac{i}{nFA} = m_O [c_O^* - c_O(x=0)] \quad (3.7.2)$$

donde c_O^* es la concentración de O en el seno de la solución y m_O es la constante de proporcionalidad, llamada coeficiente de transferencia de masa (con unidades de cm s^{-1}). El coeficiente de transferencia de masa se define como el cociente entre el coeficiente de difusión de la especie (D) y espesor de la capa de difusión de Nernst (δ). A medida que O es consumido, en cercanías de la superficie del electrodo aumenta la concentración de R:

$$\frac{i}{nFA} = m_R [c_R(x=0) - c_R^*] \quad (3.7.3)$$

donde m_R es el coeficiente de transferencia de R , c_R^* es la concentración de R en el seno de la solución, la cual es prácticamente nula para pequeños tiempos de electrólisis.

Como cabe esperar, las concentraciones de O y R para $x = 0$ serán dependientes del potencial aplicado E . $c_O(x=0) \approx 0$ cuando el E aplicado produce el consumo total de O sobre la superficie del electrodo. Para este caso, el gradiente de concentración de O es máximo, por lo que se alcanza el máximo valor de corriente (corriente límite, i_l):

$$i_l = nFAm_Oc_O^* \quad (3.7.4)$$

Cuando R está inicialmente ausente, $c_R^* = 0$, y $c_R(x=0)$ queda expresada según:

$$c_R(x=0) = \frac{i}{nFAm_R} \quad (3.7.5)$$

A partir de la ecuación de Nernst, e introduciendo las ecuaciones 3.7.4 y 3.7.5, se obtiene una ecuación en donde se observa la dependencia del potencial sobre la corriente:

$$E = E_f^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{m_O}{m_R} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{i_l - i}{i} \right) \quad (3.7.6)$$

La ecuación 3.7.6 pone de manifiesto la dependencia de la corriente con el potencial, como se ve en la Figura 3.7.1. Cuando la corriente toma el valor de la mitad de la corriente máxima, es decir $i = i_l/2$, se obtiene el *potencial de media onda* para la especie O que se está reduciendo, simbolizado por $E_{1/2}$, que es independiente de la concentración de sustrato y, por lo tanto, es característico del sistema de reacción y provee información termodinámica semicuantitativa, aún cuando se desconozcan los valores reales de D_O y D_R .

$$E = E_{1/2} = E_f^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{m_O}{m_R} \quad (3.7.7)$$

Así,

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{i_l - i}{i} \right) \quad (3.7.8)$$

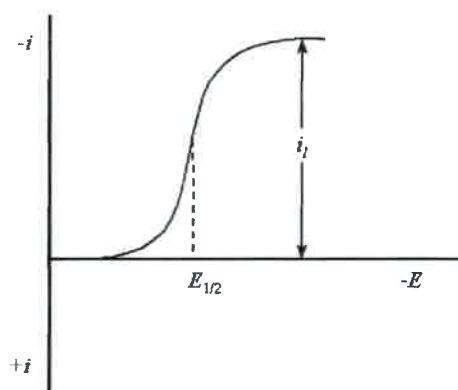


Figura 3.7.1. Representación esquemática para el comportamiento i - E para una reacción Nernstiana.

Cuando $m_O \approx m_R$, $E_{1/2} \approx E_f^0$ [41,84].

La ecuación 3.7.8 permite aplicar un criterio utilizado para evaluar la reversibilidad del sistema. Así, para un sistema reversible un gráfico de E vs $\ln [(i_l - i)/i]$ será lineal, con una pendiente de RT/nF , la cual, transformado el logaritmo neperiano en decimal, toma un valor de $59,1/n$ mV a 25°C [84]. De dicha pendiente es posible determinar también el número de electrones intercambiados en el proceso de electrodo.

3.8. Reacciones controladas por la velocidad de transferencia de electrones

Cuando en una reacción electroquímica la velocidad del proceso global de reacción está limitada por la velocidad de transferencia de electrones entre la banda de conducción del electrodo y el orbital molecular de la especie electroactiva, se está frente a un proceso controlado por la **transferencia de carga o de control activado**.

Para una reacción de electrodo, el equilibrio está caracterizado por la ecuación de Nernst. Considerando la siguiente reacción general de electrodo:



donde k_c y k_a son las constantes de velocidad del proceso catódico y anódico respectivamente.

La velocidad neta del proceso de reacción es

$$v_{net} = v_c - v_a = \frac{i}{nFA} \quad (3.8.2)$$

Para el proceso de reducción de O (proceso catódico) y la oxidación de R (proceso anódico), se pueden plantear las ecuaciones de velocidad en forma independiente:

$$v_c = k_c c_O(0,t) = \frac{i_c}{nFA} \quad (3.8.3)$$

$$v_a = k_a c_R(0,t) = \frac{i_a}{nFA} \quad (3.8.4)$$

para las concentraciones de O y R en la superficie del electrodo y a un tiempo t . Sustituyendo las ecuaciones 3.8.3 y 3.8.4 en la ecuación 3.8.2:

$$v_{net} = k_c C_O(0,t) - k_a C_R(0,t) \quad (3.8.5)$$

$$i = i_c - i_a = nFA[k_c c_O(0,t) - k_a c_R(0,t)] \quad (3.8.6)$$

La cinética de la reacción sobre la superficie del electrodo se ve fuertemente afectada por la diferencia de potencial interfacial, controlando la reactividad de la reacción. Por lo tanto, se ha desarrollado un modelo en función en los cambios de

energía libre de Gibbs (ΔG) con la coordenada de reacción, para explicar cómo afecta el potencial de electrodo los valores de k_c y k_a . En la Figura 3.8.1 se muestra el comportamiento asumido del perfil de energía libre a lo largo de la coordenada de reacción para un cambio en el potencial, donde la energía relativa del electrón residente en el electrodo cambia por $-F\Delta E = -F(E - E_f^0)$.

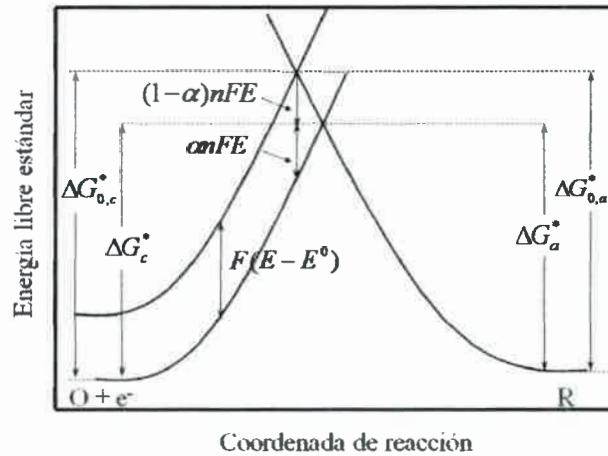


Figura 3.8.1. Efectos de un cambio de potencial sobre la energía libre de activación para la oxidación y reducción (ΔG_c^* y ΔG_a^* son las energías de activación catódica y anódica respectivamente, α es el coeficiente de transferencia y $(1 - \alpha)$ el respectivo anódico).

La curva $O + e$ se puede mover hacia arriba o hacia abajo según el cambio de potencial del electrodo. Si ΔE es positivo la curva de $O + e$ se mueve hacia arriba. La barrera para la oxidación (ΔG_a^*) comienza a hacerse menor que $\Delta G_{0,a}^*$ por una fracción del cambio total de energía. Esta fracción se denomina $1 - \alpha$, donde α toma valores entre cero y la unidad, dependiendo de la forma de la región de intersección. Así,

$$\Delta G_a^* = \Delta G_{0,a}^* - (1 - \alpha)nF(E - E_f^0) \quad (3.8.7)$$

Al potencial aplicado, la barrera catódica (ΔG_c^*) es mayor que $\Delta G_{0,c}^*$ por $\alpha F(E - E_f^0)$, por lo tanto

$$\Delta G_c^* = \Delta G_{0,c}^* + \alpha n F (E - E_f^0) \quad (3.8.8)$$

Asumiendo que las constantes de velocidad k_a y k_c siguen la ley de Arrhenius, e insertando las ecuaciones de la energía libre para las reacciones catódica y anódica, se obtiene:

$$k_c = A_c \exp(-\Delta G_{0,c}^* / RT) \exp[-\alpha n f (E - E_f^0)] \quad (3.8.9)$$

$$k_a = A_a \exp(-\Delta G_{0,a}^* / RT) \exp[-(1-\alpha) n f (E - E_f^0)] \quad (3.8.10)$$

donde $f = F/RT$. El primer producto para cada ecuación es independiente del potencial aplicado, y es igual a la constante de velocidad cuando $E = E_f^0$.

Se considerará el caso especial en el cual la interfaz está en equilibrio con la solución en la cual $c_O^* = c_R^*$. En esta situación, $E = E_f^0$ y $k_c c_O^* = k_a c_R^*$, entonces $k_c = k_a$. Así, E_f^0 es el potencial donde las constantes de velocidad catódica y anódica poseen el mismo valor. Este valor se denomina *constante de velocidad estándar* k^0 . Para valores de potencial diferentes, las constantes de velocidad para los procesos catódico y anódico, son:

$$k_c = k^0 \exp[-\alpha n f (E - E_f^0)] \quad (3.8.11)$$

$$k_a = k^0 \exp[(1-\alpha) n f (E - E_f^0)] \quad (3.8.12)$$

Reemplazando estas ecuaciones en la ecuación 3.8.6 se obtiene la ecuación que describe el comportamiento de la corriente con el potencial:

$$i = n F A k^0 [C_O(0,t) e^{-\alpha n f \eta} - C_R(0,t) e^{(1-\alpha) n f \eta}] \quad (3.8.13)$$

Esta ecuación y sus derivaciones son conocidas como la formulación para cinéticas de electrodo de *Butler-Volmer* [84], donde $\eta = E - E_f^0$, llamado sobrepotencial.

La importancia de las ecuaciones desarrolladas en éste capítulo radica en que se cumplen para todo proceso de electrodo y, para cada sistema de reacción particular, se necesita resolver las ecuaciones diferenciales mostradas para así obtener el comportamiento con la concentración y la relación de la corriente con el potencial de electrodo.

En general, un experimento de potencial controlado puede ser tratado mediante el empleo de la ecuación de *Butler-Volmer* (3.8.13) junto con las leyes de *Fick*, las cuales dan el comportamiento dependiente del tiempo de las concentraciones en la superficie del electrodo para las especies participantes. Por lo general, las soluciones del sistema de ecuaciones, no lleva a una solución cerrada o exacta. Por lo tanto, se está en la situación de obtener soluciones numéricas o bien soluciones aproximadas.

3.9. Conceptos de reversibilidad, quasi-reversibilidad e irreversibilidad electroquímica

Cuando la cinética del electrodo es muy rápida, la etapa determinante de la velocidad en el proceso de electrodo es la transferencia de masa de la especie electroactiva desde el seno de la solución a la superficie del electrodo. Así, las condiciones en $x = 0$ son condiciones de equilibrio. En este caso, se dice que las reacciones son **electroquímicamente reversibles** o **nernstianas**, y obedecen a la ley de Nernst. En este caso, los parámetros cinéticos α y k^0 no están explícitamente involucrados ($k^0 > 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$).

Cuando la cinética de electrodo comienza a hacerse más lenta (k^0 se hace más pequeña) los términos anódico y catódico de la ecuación 3.8.13 no son significativos simultáneamente. Esto es, cuando el término catódico tiene un valor apreciable, el correspondiente término anódico posee un efecto despreciable, y viceversa. A la hora de observar el comportamiento corriente-potencial, el proceso directo se encuentra fuertemente activado (por la aplicación de un sobrepotencial) y el inverso se encuentra totalmente inhibido, por lo que se trata de un proceso **electroquímicamente lento** o

irreversible ($k^0 < 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$). Si el proceso no es ni muy rápido ni muy lento ($10^{-4} \text{ cm s}^{-1} < k^0 < 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$), la ecuación de Butler-Volmer se cumple para todos los términos. La corriente involucra componentes activados apreciables de la transferencia de carga directa inverso, y se dice que el proceso es **electroquímicamente quasi-reversible** [84].

3.10. Fenómenos de adsorción

Los procesos de adsorción espontánea representan una herramienta poderosa para producir cambios en la composición química y estructura molecular de una superficie dada [87].

Dada una fase cualquiera, resulta evidente que las propiedades de las partículas (átomos o moléculas) ubicadas a muy cortas distancias de tales superficies deben ser diferentes de las que presentan aquellas que se encuentran en el seno del material. Esto define una energía superficial que es la responsable de los llamados fenómenos de superficie (tensión superficial, capilaridad, adsorción, etc.).

Cuando dos fases se ponen en contacto se origina una interfaz, caracterizada idealmente por un plano de separación entre ellas (plano interfacial). Toda interfaz, como para cualquier sistema fisicoquímico, alcanza su equilibrio, a presión y temperatura constante, haciendo mínimo el cambio de energía libre que está asociado con su formación. Esto implica una adecuación de la estructura superficial a la condición de mínimo en el cambio de la energía libre correspondiente. Así, por ejemplo, en una interfaz solución-sólido, donde en la solución existen una cantidad de moléculas (por ejemplo, algún tipo de molécula orgánica), en un tiempo finito, se produce la adsorción de estas moléculas (adsorbato) sobre la superficie del elemento sólido (electrodo) saturando los enlaces residuales de la superficie, para lo cual, su concentración en el plano del electrodo aumenta con respecto a la concentración en el seno de la solución constituyendo el fenómeno de adsorción. En consecuencia, aparece en las cercanías de la superficie del electrodo y, tomado en forma perpendicular a éste, un gradiente de concentración del adsorbato (en el orden de unos cientos de ángstroms de espesor). Un fenómeno análogo ocurre en el sólido en dirección del sólido masivo, si

bien la extensión de la región en la interfaz es, en este caso, mucho menor, siendo el fenómeno despreciable [88].

Para tales sistemas (interfaz solución-sólido), existe una dependencia del fenómeno de adsorción con la presión (P) y la temperatura (T). Por lo general, sobre todo cuando se trata de soluciones, la ecuación de estado de las partículas adsorbidas se representa bajo la forma de una isoterma de adsorción del tipo $C = C(P)$, dependiente únicamente de P, siendo C la cantidad de sustrato adsorbido. A T constante, la isoterma de adsorción expresa la relación entre la concentración superficial del sustrato en equilibrio con la concentración del sustrato en solución (C(P)).

3.10.1. Adsorción física y quimisorción

Dependiendo de la naturaleza de la adsorción, ésta se puede clasificar como adsorción física y quimisorción, no existiendo una línea divisoria clara entre los dos tipos de adsorción, pudiendo distinguírseles solo en situaciones extremas [88].

En la adsorción física el equilibrio adsorbato-adsorbente se alcanza rápidamente, siendo, por lo general, un proceso reversible y la desorción ocurre sin cambio de su composición. La adsorción física es el resultado de interacciones moleculares poco específicas, en donde el valor del calor de adsorción tiene órdenes de magnitud cercanos a 3-5 Kcal mol⁻¹. Por el propio proceso de adsorción física, el sustrato puede adsorberse en forma de multicapas, sobre una capa quimisorbida o, conjuntamente, con esta última.

La quimisorción posee una mayor especificidad química y una energía de adsorción suficientemente grande como para compararla con la energía de formación de un enlace químico. La quimisorción se limita a una monocapa [88]. En este caso, el proceso de desorción puede estar acompañado por cambios químicos.

Otra característica que distingue ambas formas de adsorción es la velocidad con que se lleva a cabo cada uno de los procesos. La adsorción física es un proceso que, por lo general, ocurre rápidamente y, en la mayoría de los casos, a altas temperaturas no ocurre.

La quimisorción puede ser un proceso lento (la velocidad da una idea de la magnitud de la energía de activación), disminuyendo su velocidad a medida que la temperatura se hace más pequeña [88]. Por lo general, a temperaturas bajas, la

quimisorción puede ser tan lenta que sólo se observa adsorción física, mientras que a temperaturas altas, la adsorción física es muy pequeña y sólo ocurre quimisorción.

En los procesos de adsorción electroquímica, el comportamiento del sistema, en general, corresponde al de monocapas localizadas, aunque esto depende de la naturaleza del material de electrodo.

Cuando en solución se encuentran moléculas neutras (generalmente moléculas orgánicas neutras) y tienden a adsorberse sobre la superficie del electrodo, se produce un fenómeno de competición entre el adsorbato y las moléculas de solvente por los sitios disponibles sobre el electrodo, en donde actúan fuerzas de interacción del tipo molécula neutra-material de electrodo, molécula neutra-molécula neutra, material de electrodo-solvente y solvente-solvente.

Al modificar el potencial de electrodo (apartarlo de la situación de circuito abierto), el agua (solvente) y los iones presentes en solución (positivos o negativos, según sea el potencial) resultan más fuertemente adsorbidos y la adsorción de las moléculas neutras se hace cada vez más difícil. Cuando se trata de moléculas dipolares con sitios diferenciados de naturaleza hidrofílica o hidrofóbica, las orientaciones de las moléculas adsorbidas están determinadas por la polarización del electrodo [88].

Por lo general, la superficie de los sólidos no es uniforme, expresada en función de los calores y entropías de adsorción. La dependencia del calor de adsorción con el grado de recubrimiento se puede explicar considerando que la superficie del adsorbente es heterogénea y, por lo tanto, existe una distribución de sitios de energía. Esta heterogeneidad superficial resulta de imperfecciones superficiales, impurezas y/o la presencia de diferentes planos cristalinos.

Por otra parte, la dependencia del calor de adsorción con el grado de recubrimiento es función de las posibles interacciones entre las moléculas adsorbidas. En procesos de adsorción física el efecto aparece como interacciones laterales atractivas atribuidas a fuerzas de interacción de Van der Waals de moléculas vecinas. Las interacciones laterales atractivas tienden a reforzar la estabilidad de la "película" adsorbida.

En la adsorción en fase líquida, donde la especie que se adsorbe se encuentra en solución, se produce una competencia entre el adsorbato y el solvente por los sitios de

adsorción, produciendo un cambio en la entropía de adsorción, debido a que se produce, en general, un intercambio de varias moléculas de solvente por molécula de adsorbato.

3.10.2. Isotermas de adsorción

Mediante medidas electroquímicas se puede determinar la cantidad de sustrato adsorbido en la superficie del electrodo. La cantidad de material en una monocapa de adsorbato depende, entre otros factores, del tamaño de la molécula adsorbida y de su orientación sobre la superficie del electrodo.

Se puede plantear la relación entre la cantidad de sustrato i , adsorbido sobre el electrodo, por unidad de área, Γ_i , su actividad en el seno de la solución, a_i , y el estado eléctrico del sistema, o sea, en función del potencial aplicado al electrodo, E , o de la carga, q^m , correspondiente al proceso electroquímico sufrido por el sustrato adsorbido sobre el electrodo. A temperatura constante, esta relación está definida por una *isoterma de adsorción* [84].

Partiendo de la condición de equilibrio existente entre el sustrato adsorbido y el sustrato en solución, se puede plantear la igualdad existente de los potenciales electroquímicos (μ) de ambos

$$\bar{\mu}_i^A = \bar{\mu}_i^b \quad (3.10.1)$$

donde los superíndices A y b se refieren a i adsorbido e i en el seno de la solución respectivamente. Así, se tiene

$$\bar{\mu}_i^{0,A} + RT \ln a_i^A = \bar{\mu}_i^{0,b} + RT \ln a_i^b \quad (3.10.2)$$

donde los términos $\bar{\mu}_i^0$ son los potenciales estándar electroquímicos, R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. Siendo la energía libre de adsorción estándar ($\Delta \bar{G}^0$) una función del potencial de electrodo, se define

$$\Delta \bar{G}_i^0 = \bar{\mu}_i^{0,A} - \bar{\mu}_i^{0,b} \quad (3.10.3)$$

así

$$a_i^A = a_i^b e^{-\Delta \bar{G}_i^0 / RT} = \beta_i a_i^b \quad (3.10.4)$$

donde

$$\beta_i = e^{-\Delta \bar{G}_i^0 / RT} \quad (3.10.5)$$

La ecuación 3.10.4 representa la forma general de una isoterma de adsorción, con a_i^A como una función de a_i^b y β_i [84].

Se pueden desarrollar distintos modelos de isotermas de adsorción que tienen en consideración diferentes aspectos de la interacción adsorbato y superficie del electrodo, que relacionan a_i^A con Γ_i , las cuales se utilizan a fin de poder comparar y comprender los resultados experimentales. A continuación se describen aquellas isotermas más comunes y de interés en el presente trabajo [84].

3.10.2.1. *Isoterma de Langmuir*

Esta isoterma implica las siguientes condiciones [84]:

- I- La cantidad de sustancia adsorbida se limita a una monocapa (Γ_s).
- II- Todos los sitios superficiales poseen igual energía de adsorción.
- III- No existe interacción adsorbato-adsorbato.
- IV- Las moléculas adsorbidas están localizadas, es decir, están enlazadas a la superficie del electrodo en sitios definidos (excluyendo cualquier movimiento de traslación de la molécula sobre la superficie).

Esta última suposición indica que la energía de traslación para que la molécula se mueva de un sitio a otro es igual a la energía necesaria para su desorción.

La forma general de la isoterma de Langmuir es:

$$\frac{\Gamma_i}{\Gamma_s + \Gamma_i} = \beta_i a_i^b \quad (3.10.6)$$

donde Γ_s es la cantidad de adsorbato necesario para saturar la superficie limitada a la formación de una monocapa. Tal isoterma también se puede expresar en términos del grado de recubrimiento de la superficie (θ), expresada como $\theta = \frac{\Gamma_i}{\Gamma_s}$. Así, la isoterma de Langmuir queda [84]:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \beta_i a_i^b \quad (3.10.7)$$

Expresada en términos de la concentración analítica de la especie i (C_i^b):

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \beta_i C_i^b \quad (3.10.8)$$

donde el coeficiente de actividad de la especie i está incluida en el parámetro β_i .

3.10.2.2. *Isoterma de Freundlich*

La superficie de los sólidos no es, en general, uniforme, lo que se demuestra por la no uniformidad de los calores y entropías de adsorción [88]. Por lo tanto, se puede plantear una distribución de sitios de energía, donde la cantidad adsorbida, determinada experimentalmente, se corresponde a la suma de todas las cantidades adsorbidas sobre diferentes regiones de la superficie del adsorbente. La resolución de la distribución de sitios de energía planteada como una integral implica obtener la función de distribución de los sitios activos o de las energías de adsorción en la superficie del adsorbente.

Cuando esta función de distribución diferencial contiene un exponencial en $\Delta\bar{G}$, resulta en la *isoterma de Freundlich* [89], cuya expresión es:

$$\theta = AC_i^{b/n} \quad (3.10.9)$$

o, escrita en su forma linealizada como:

$$\ln(\theta) = \ln A + \frac{1}{n} \ln C_i^b \quad (3.10.10)$$

donde $A = RTnb'$, y $b' = be^{\frac{\Delta\bar{G}}{RT}}$, siendo C_i^b la concentración de adsorbato en el seno de la solución. El parámetro b es una constante que depende la energía de interacción adsorbato-adsorbente, del tiempo de adsorción, del área del sitio de interacción, del peso molecular del adsorbato y de la temperatura. El parámetro A es una medida de la capacidad adsorbente del sustrato y n da una idea de la intensidad de adsorción y debe ser mayor que 1.

La *isoterma de Freundlich*, en los casos límites, se aparta de la realidad porque predice un valor de θ infinito para C_i^b infinita. A partir de un análisis similar, se desprende que, para θ próximo a cero, $\Delta\bar{G}$ tendría que acercarse a infinito. Por lo tanto, la utilidad de las ecuaciones 3.10.9 y 3.10.10, queda restringida a un intervalo de grado de recubrimiento intermedio. Básicamente, la ecuación de la *isoterma de Freundlich* es empírica [90] y está sujeta a la habilidad que se posea para el ajuste de los valores experimentales.

3.10.2.3. *Isoterma de Temkin*

En el caso que se considere una dependencia lineal entre $\Delta\bar{G}$ y el grado de recubrimiento, se obtiene la *isoterma de Temkin* [84,88]. Esta isoterma tiene la forma:

$$\Gamma_i = \frac{RT}{2g} \ln(\beta_i \alpha_i^b) \quad (3.10.11)$$

donde el parámetro g tiene dimensiones de energía por unidad de área y expresa una medida de la interacción adsorbato-adsorbato, que se hace significativo cuando el recubrimiento de la superficie es importante.

Esta ecuación también posee casos límites en su comportamiento:

Cuando $\alpha_i^b \rightarrow 0$, entonces θ es indeterminado matemáticamente y, cuando $\alpha_i^b \rightarrow \infty$, se tiene que $\theta \rightarrow \infty$. En ambos casos, la predicción matemática se aparta del comportamiento físico de la adsorción. Por lo tanto, la *isoterma de Temkin* opera correctamente para valores de $0,2 < \theta < 0,8$ [84,88].

3.10.2.4. *Isoterma de Frumkin*

Una derivación de la isoterma de *Langmuir* es la *isoterma de Frumkin*, la cual tiene en cuenta la existencia de interacciones a largo alcance entre las especies adsorbidas a través de un término de corrección que depende del cuadrado del grado de recubrimiento.

La *isoterma de Frumkin* tiene la siguiente expresión [84]:

$$\beta_i \alpha_i^b = \frac{\Gamma_i}{\Gamma_s - \Gamma_i} e^{\frac{2g\Gamma_i}{RT}} \quad (3.10.12)$$

El parámetro g indica cómo son las interacciones entre las moléculas adsorbidas. Si $g > 0$, las interacciones adsorbato-adsorbato son atractivas, mientras que si $g < 0$ las interacciones son repulsivas. Cuando $g \rightarrow 0$ la isoterma de *Frumkin* tiende a la isoterma de *Langmuir*.

También se puede escribir en función del grado de recubrimiento del electrodo como:

$$\beta_i C_i^* = \frac{\theta}{1-\theta} e^{g\theta} \quad (3.10.13)$$

donde $g' = 2g\Gamma_s/RT$. Los valores de g' están comprendidos entre $-2 < g' < 2$, siendo g' también función del potencial [84]. El coeficiente de actividad de la especie i está incluida en el parámetro β , la cual expresa la fuerza de adsorción y está definida como [91,92]:

$$\beta = \frac{1}{c_{\text{solvente}}} \exp(-\Delta G_{\text{ADS}}/RT) \quad (3.10.14)$$

donde c_{solvente} es la concentración del solvente, ΔG_{ADS} es la energía libre de adsorción y los demás parámetros son los usuales.

3.11. Técnicas electroquímicas empleadas: clasificación y descripción

En el estudio aquí realizado se han empleado técnicas a potencial controlado bajo condiciones de corriente distinta de cero. En estas técnicas, el potencial es aplicado de acuerdo a un programa de trabajo, en donde el mismo puede ser constante o variable en el tiempo de una manera predeterminada, y la corriente se mide en función del tiempo o del potencial. La corriente medida se debe a la reacción de transferencia de electrones producida en la superficie del electrodo, originando así una corriente de oxidación (transferencia de electrones desde el analito hacia el electrodo de trabajo) o de reducción (transferencia de electrones desde el electrodo de trabajo hacia el analito) [84]. No se puede imponer a un sistema electroquímico el valor de la corriente y el potencial simultáneamente; siempre que se condicione una, la otra queda como grado de libertad y evoluciona según las características del sistema electroquímico en estudio.

Dependiendo del tipo de control eléctrico que se ejerza sobre el sistema, las técnicas electroquímicas se clasifican en:

a) Potenciostáticas: son aquellas en donde se controla el potencial aplicado al sistema, mediante el empleo de una perturbación según una función perfectamente conocida en el tiempo, $E = f(t)$, la cual es característica de cada técnica. Para cada técnica potenciostática existe una respuesta en corriente característica, donde se encuentra la información del sistema en estudio.

b) **Galvanostáticas:** son aquellas donde se controla la corriente y el potencial es la variable dependiente.

En este trabajo solo se emplearon las técnicas del primer tipo, por lo que se describirán con detalle.

3.11.1. Voltamperometría cíclica (VC)

La voltamperometría cíclica es, tal vez, la técnica electroquímica más versátil y efectiva para el estudio de mecanismos de reacción de sistemas electroquímicos. Permite obtener información termodinámica de procesos redox, de la cinética de reacción de transferencia de electrones heterogénea y de las reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción si existiesen. Generalmente, para un sistema electroquímico desconocido, los primeros estudios se realizan utilizando voltamperometría cíclica a fin de caracterizar la reacción de transferencia electrónica.

La voltamperometría cíclica se caracteriza por la aplicación de una perturbación de potencial en forma de variación lineal con el tiempo en una solución no agitada. El registro de la respuesta a la perturbación, la corriente, en función del potencial aplicado se denomina voltamperograma. La perturbación aplicada y la respuesta típica obtenida en corriente se muestran en las Figuras 3.11.1.a y 3.11.1.b para la siguiente reacción de electrodo:



La perturbación del potencial está dada en forma lineal y, varía en el tiempo a una velocidad de barrido v ($V s^{-1}$) expresado por medio de la siguiente ecuación:

Para el 1º hemiciclo

$$(0 < t \leq \lambda) \quad E = E_i - vt \quad (3.11.2)$$

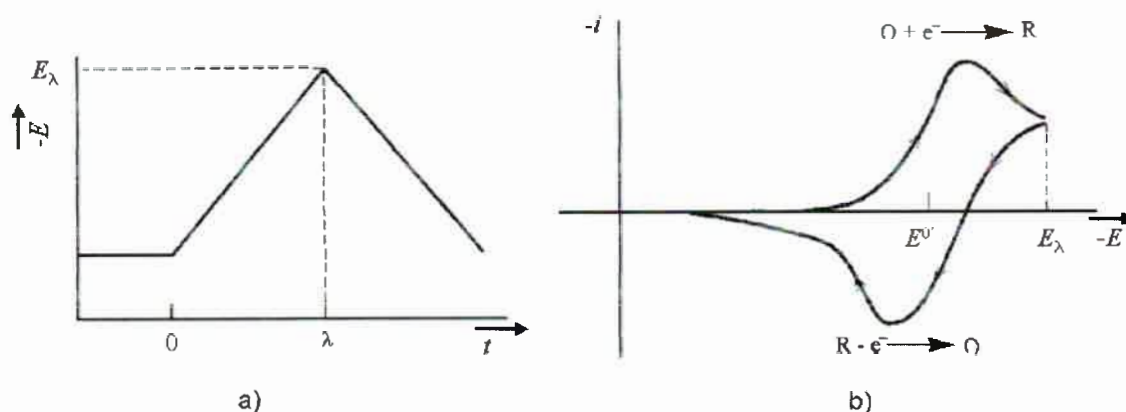


Figura 3.11.1. Representación esquemática de la perturbación del potencial aplicado al electrodo de trabajo (a) y del voltamperograma cíclico resultante (b).

Para el caso de experiencias de voltamperometría cíclica, se debe aplicar una segunda perturbación que comienza en el valor de potencial en que terminó la primera.

Para el 2º hemiciclo

$$(t > \lambda) \quad E = E_i - 2v\lambda + vt \quad (3.11.3)$$

La forma característica de los picos en los voltamperogramas cíclicos son causados por la formación de la capa de difusión de la especie electroactiva en cercanías del electrodo al comenzar el barrido de potencial. Para la reacción de electrodo 3.11.1, cuando el potencial aplicado al electrodo es E_i , no hay reacción faradaica (Figura 3.11.2.a). El aporte de corriente se debe exclusivamente a corriente no faradaica o capacitiva. A medida que el potencial se va haciendo más catódico y se acerca a $E^{0'}$ (Figura 3.11.2.b), la concentración de la especie electroactiva O en cercanías a la superficie del electrodo comienza a disminuir debido a que se reduce, produciendo un aumento en la corriente como así también un aumento en el flujo de O desde el seno de la solución hacia el electrodo. Cuando el potencial es más negativo que $E^{0'}$, la corriente seguirá incrementando hasta alcanzar un máximo de valor, debido al consumo total de O en la superficie el electrodo. El gradiente de concentración de O en este punto es máximo (Figura 3.11.2.c). Si el potencial se sigue incrementando, se produce un aumento en el espesor de la capa difusional. La corriente cae como consecuencia de que

la misma muestra una dependencia con $t^{1/2}$, independiente del potencial (llegada de O desde el seno de la solución debido al gradiente de concentración). Este comportamiento arroja la formación del pico en el voltamperograma, tanto para voltamperometría lineal como cíclica [41,84,86].

En el caso de la voltamperometría cíclica, la existencia de la onda anódica (barrido inverso) se explica si se tiene en cuenta que al potencial E_λ (potencial de inversión) existe un exceso de R sobre la superficie del electrodo, siendo λ el tiempo al cual se invierte la dirección del barrido de potencial. Así, cuando el potencial aumenta en la dirección inversa al barrido inicial, la especie R se oxida dando lugar a una corriente anódica gobernada por fenómenos similares a los descritos previamente para el proceso directo [41,84,86] (Figura 3.11.2.d).

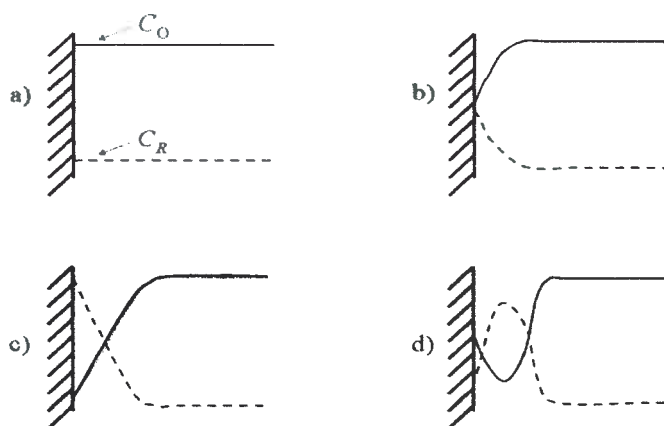


Figura 3.11.2. Perfiles de concentración obtenidos para un experiencia de voltamperometría cíclica para la reducción de O y la oxidación de R.

Se deben resolver las ecuaciones diferenciales de difusión de *Fick* para la variación de las concentraciones en función de la distancia a la superficie del electrodo x y el tiempo de electrólisis t de las especies presentes en donde, inicialmente, solo se encuentra O presente, para el caso de difusión lineal semi-infinita.

Asumiendo que la velocidad de transferencia electrónica es lo suficientemente rápida tal que en la superficie del electrodo las concentraciones de O y R se ajustan a la relación dictada por la ecuación de Nernst en donde, para el barrido de potencial del primer hemiciclo se tiene:

$$\frac{C_o(0,t)}{C_R(0,t)} = f(t) = \exp\left[\frac{nF}{RT}(E_t - vt - E_f^0)\right] \quad (3.11.4)$$

en donde la relación de concentraciones es una función del tiempo.

Las soluciones matemáticas de las ecuaciones diferenciales de *Fick* son complejas. Diferentes autores encontraron las soluciones para las ecuaciones diferenciales planteadas para ésta técnica, utilizando diferentes métodos. Se han aplicado técnicas de transformada de Laplace, soluciones numéricas directas usando el método de las diferencias finitas y la conversión del problema de las condiciones de contorno a una ecuación integral [93].

La dependencia entre la corriente y el potencial se puede establecer en términos de variables adimensionales, según la siguiente expresión [93]:

$$i = nFAc_o^*(\pi D_o \sigma)^{1/2} \chi(\sigma, t) \quad (3.11.5)$$

donde n es el número de electrones intercambiados, A es el área del electrodo, c_o^* es la concentración de la especie O en el seno de la solución, D_o su coeficiente de difusión y $\chi(\sigma, t)$ es una función corriente adimensional, definida según la siguiente ecuación integral:

$$\int_0^\sigma \frac{\chi(z)}{(\sigma - z)^{1/2}} dz = \frac{1}{1 + \xi \theta S(\sigma)} \quad (3.11.6)$$

en la que $\xi = (D_o/D_R)^{1/2}$, $\theta = \exp[(nF/RT)(E_t - E_f^0)]$, $S = \exp(-\sigma)$ y $\sigma = (nFv/RT)$ para el primer hemiciclo, v es la velocidad de barrido y los demás factores tienen los significados usuales.

Así, para cualquier valor de $S(-\sigma)$, el cual es una función de E , $\chi(\sigma, t)$ se puede obtener mediante la resolución de la ecuación 3.11.6, y así conocer el valor de corriente para cada potencial. La resolución de la ecuación 3.11.6 ha sido llevada a cabo de

diferentes maneras. Los valores de $\chi(\sigma, t)$ versus el potencial se encuentran tabulados y, a partir de ellos, es posible construir voltamperogramas cíclicos teóricos.

3.11.1.1. Corriente de pico y potencial

Para un sistema *reversible simple*, la función $\pi^{1/2}\chi(\sigma, t)$ alcanza su valor máximo, a 25 °C, de 0,4463 cuando $n(E_p - E_{1/2}) = -28,50$ mV. Así, la corriente alcanza su máximo valor llamada corriente de pico (i_p) [84,93]:

$$i_p = 0,4463nFAc_o^* \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2} D_o^{1/2} \quad (3.11.7)$$

siendo el valor de potencial correspondiente, E_p , el potencial de pico y $E_{1/2}$ el potencial de media onda polarográfico definidos como:

$$E_p = E_f^0 - \frac{RT}{nF} \ln \xi - \frac{0,0285}{n} \quad (3.11.8)$$

$$E_{1/2} = E_f^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_o^{1/2}}{D_R^{1/2}} \quad (3.11.9)$$

Así, el pico catódico aparece 28,5 mV después del $E_{1/2}$ del sistema. Por lo tanto, i_p es proporcional a $v^{1/2}$ y E_p es independiente de la velocidad de barrido.

Otra forma de caracterizar el sistema es mediante el potencial de medio pico ($E_{p/2}$) que es el valor encontrado cuando la corriente vale la mitad de la i_p en donde, a 25 °C, se tiene:

$$E_{p/2} = E_{1/2} + 28,0/n \text{ mV} \quad (3.11.10)$$

Por lo tanto, para sistemas reversibles simples, a 25 °C, se obtiene como criterio de diagnóstico que:

$$|E_p - E_{p/2}| = 56,5/n \text{ mV} \quad (3.11.11)$$

En el caso de voltamperometría cíclica, la resolución de las ecuaciones diferenciales se realiza bajo las mismas condiciones iniciales y de contorno que las mencionadas previamente, para $t > \lambda$ (donde λ es el tiempo donde se invierte el sentido de barrido del potencial).

Cuando el potencial de inversión (E_λ) es al menos 35 mV más catódico que el potencial de pico, se puede analizar la relación de corrientes de pico anódica y catódica, en donde dicha relación debe ser unitaria e independiente de la velocidad de barrido, siendo este un criterio de diagnóstico importante para demostrar la ausencia de posibles reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga [93]. También se tiene que cumplir para un sistema reversible simple que:

$$\Delta E_p = (E_{p,a} - E_{p,c}) = 2,303 RT/nF \quad (3.11.12)$$

Para sistemas *totalmente irreversibles*, la solución del sistema de ecuaciones diferenciales es similar y también requiere la solución numérica de una ecuación integral [93]. Así, la corriente está dada por:

$$i = nFAc_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \left(\frac{\alpha n_\alpha F}{RT} \right)^{1/2} \pi^{1/2} \chi(b,t) \quad (3.11.13)$$

También se cumple una proporcionalidad entre i y $v^{1/2}$, pero se encuentra presente en la ecuación el coeficiente de transferencia α . El potencial de pico se encuentra caracterizado por la siguiente ecuación:

$$E_p = E_f^0 - \frac{RT}{\alpha n_\alpha F} \left[0,780 + \ln \left(\frac{D_o^{1/2}}{k^0} \right) + \ln \left(\frac{\alpha n_\alpha F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (3.11.14)$$

donde el E_p es dependiente de v , siendo éste un importante criterio de diagnóstico.

En sistemas *cuasi-reversibles*, donde existen limitaciones a la cinética de transferencia de electrones, la reacción del proceso inverso debe ser considerada. La corriente queda expresada por la siguiente función:

$$i = nFAC_o^*D_o^{1/2}v^{1/2}\left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2}\Psi(E)v^{1/2} \quad (3.11.15)$$

donde $\Psi(E)$ es una función del coeficiente de transferencia α y de k^0 . Asimismo, si bien no se muestra la ecuación correspondiente, el E_p también es dependiente de dichos parámetros [84,94].

En sistemas más complejos, por ejemplo con reacciones químicas homogéneas acopladas al proceso de transferencia de cargas, la respuesta electroquímica difiere con respecto a la de un sistema simple. Los criterios de diagnóstico utilizados para su caracterización se basan, por lo general, en las variaciones de E_p e i_p con respecto a la concentración en el seno de la solución o la velocidad de barrido, i_{pa}/i_{pc} , etc., que adoptan características propias según el mecanismo particular que se trate [93,95].

Para el caso particular aquí estudiado, descrito en el Capítulo 5, se obtuvo un mecanismo de electroreducción de progesterona del tipo electroquímico-químico (dimerización)-electroquímico-químico (protonación), siendo la etapa determinante de la velocidad la reacción homogénea de dimerización y $E_{f1}^0 = E_{f2}^0$, el sistema de ecuaciones empleado para la corriente y el potencial son complejas, así como los criterios de diagnósticos empleados. En este caso, la formulación matemática ha sido desarrollada asumiendo una transferencia electrónica que responde a la ley de Nernst y que las reacciones químicas son muy rápidas. Esto implica que el estado estacionario es establecido por compensación mutua de la difusión y la velocidad de la etapa determinante del paso homogéneo y también entre la reacción química que produce y destruye la especie intermediaria. Por ejemplo, la ecuación encontrada del E_p para este sistema es compleja y, para una transferencia monoelectrónica, se muestra a continuación [38]:

$$E_p = E_{f1}^0 - 0,456\frac{RT}{nF} + \frac{2RT}{nF}\ln\frac{RT}{nF}k_c c^* v^{-1} \quad (3.11.16)$$

donde k_c es la constante de velocidad para la reacción homogénea de dimerización en un acoplamiento radical-sustrato.

3.11.2. Técnicas convolutivas o semiintegral

Un tratamiento matemático de las curvas i - E obtenidas por VC permite transformar las mismas y obtener respuestas similares a las encontradas en voltamperometría de estado estacionario, las cuales suelen presentar mayores ventajas a la hora de procesar los datos experimentales. Esta transformación se basa en el principio de la convolución, la cual consiste en aplicar la integral de convolución a las curvas experimentales corriente-tiempo o corriente-potencial [84,96]:

$$I = \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{i(v)}{(t-v)^{1/2}} dv \quad (3.11.16)$$

Así, una cantidad proporcional a la concentración del reactivo que difunde a la superficie del electrodo puede ser obtenida directamente de los datos experimentales.

Con los datos obtenidos de las nuevas curvas es posible obtener información del mecanismo de reacción de electrodo, como así también de los parámetros cinéticos del mismo.

La función I es calculada por una técnica de integración numérica a través de diferentes algoritmos. Los datos i - t son divididos en N intervalos iguales de tiempo entre $t = 0$ y $t = t_f$, indexados por j . Así, $I(t)$ se transforma en $I(k\Delta t)$, donde k varía entre 0 y N , representando a $t = 0$ y $t = t_f$, $\Delta t = t_f/N$. Un algoritmo conveniente, el cual representa una definición para la corriente convolucionada $I(t)$ es [84]:

$$I(t) = I(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{i(j\Delta t - \frac{1}{2}\Delta t)\Delta t}{\sqrt{k\Delta t - j\Delta t + \frac{1}{2}\Delta t}} \quad (3.11.17)$$

Para una reacción reversible simple en un experimento de voltamperometría cíclica, las curvas de $I(t)$ vs E para el barrido directo e inverso son superponibles, con $I(t)$ volviendo a cero para potenciales suficientemente positivos (Figura 3.11.3.a).

Para sistemas cuasi-reversibles, $I(t)$ del barrido directo e inverso no coinciden, produciéndose una distorsión, debido al corrimiento de los valores de $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ (Figura 3.11.3.b).

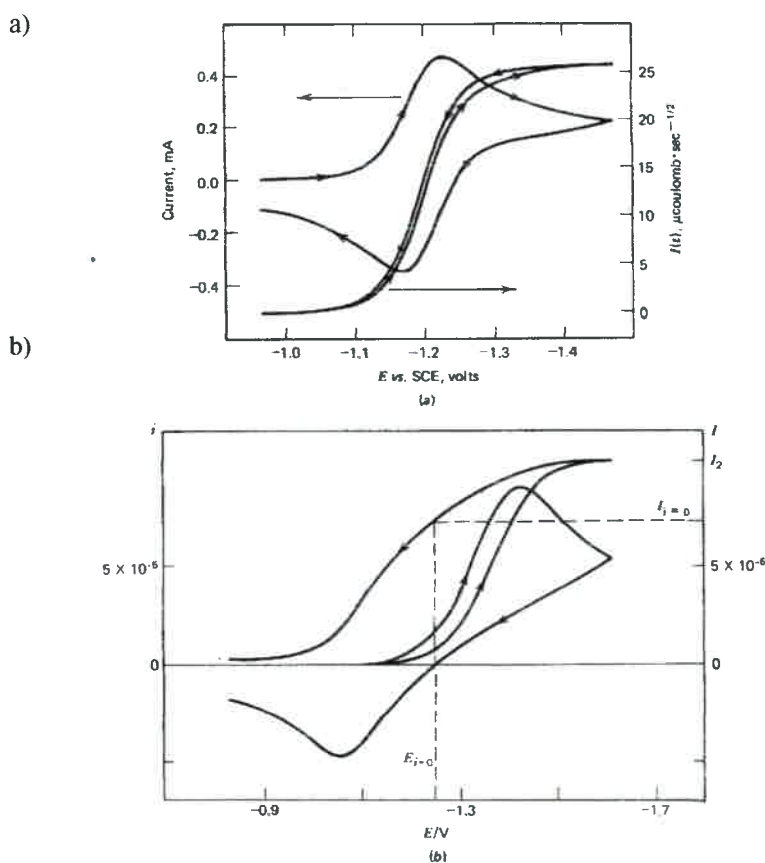


Figura 3.11.3. Voltamperogramas experimentales cíclicos y de convolución (obtenidos de A. J. Bard and L. R. Faulkner, "Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, 2001, pag. 251) de: a) 1,84 mM *p*-nitrotolueno en ACN + 0,2 M $(C_2H_5)_4NClO_4$, $v = 50 V s^{-1}$. b) 0,5 mM *Tert*-nitrobutano en DMF + 0,1 M $(C_4H_9)_4I$, $v = 17,9 V s^{-1}$. Electrodo de trabajo: electrodo de Hg de gota pendiente (HMDE).

Para un **sistema reversible**, la corriente límite convolucionada (I_l) está definida por [84,96]:

$$I_l = nFAD_o^{1/2}c_o^* \quad (3.11.18)$$

donde I_l es independiente de la velocidad de barrido. El potencial también puede expresarse en función de I_l :

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_l - I(t)}{I(t)} \quad (3.11.19)$$

donde $E_{1/2}$ es el potencial de media onda el cual ha sido definido anteriormente. La ecuación anterior es idéntica a la obtenida para experiencias en estado estacionario. Un gráfico de E vs $\log [(I_l - I(t))/I(t)]$ será lineal, con pendiente igual a $2,303 (RT/nF)$ (ó $\frac{59,1}{n}$ mV a 25 °C). De la ordenada al origen de dicho gráfico es posible calcular el $E_{1/2}$ de la reacción.

Por medio de la técnica de convolución de los voltamperogramas cíclicos se han desarrollados criterios de diagnóstico para ayudar en la elucidación de mecanismos de reacción heterogéneos complejos. Estos criterios de diagnóstico se basan, fundamentalmente, en el análisis de los gráficos obtenidos para E vs $f(I(t))$, donde $f(I(t))$ representa diferentes funciones logarítmicas que involucran a $I(t)$, a la corriente límite convolucionada I_L y la corriente experimental $i(t)$ [96]. Por ejemplo, para un mecanismo ECE, donde E representa una transferencia monoelectrónica, la variación de E con $f(I(t))$ es descripta mediante la siguiente ecuación:

$$E = E^0 + 2,303 \frac{RT}{2nF} \log \frac{k}{(1+K)^2} + 2,303 \frac{RT}{nF} \log \frac{I_L - I(t)}{i(t)} \quad (3.11.20)$$

donde E^0 es el potencial estándar para la primera transferencia electrónica heterogénea, k es la suma de las constantes de velocidad de las reacciones homogéneas de ida y de vuelta y K es la constante de equilibrio para la reacción homogénea. El valor de pendiente esperado es de 0,0591 V/década a 25 °C [96].

Por otra parte, el mismo mecanismo ECE, bajo un control cinético puro, la expresión matemática que expresa la corriente límite convolucionada es [96]:

$$I_L = 2nFAD^{1/2}c^* \quad (3.11.21)$$

donde n es el número de electrones intercambiados por molécula de sustrato electrolizada y los demás parámetros poseen el mismo significado con el cual se los describió anteriormente. Es importante resaltar que la ecuación 3.11.21 depende únicamente de la concentración del sustrato de partida. Bajo la condición de control difusional nos permite calcular el coeficiente de difusión de la especie electroactiva para un mecanismo ECE con E^0 próximos.

3.11.3. Cronoamperometría

En un experimento de voltamperometría transistoria, el electrodo de trabajo inicialmente está a un valor de potencial en donde no existe flujo de corriente. Este estado es perturbado por la imposición de un cambio instantáneo del potencial, conocido como pulso de potencial, observándose una variación en la corriente [41,84,86,97,98].

La técnica consiste en cambiar, instantáneamente, el potencial del electrodo de trabajo desde un valor E_1 , en el cual no ocurren procesos faradaicos, hasta un valor, E_2 , en el cual el sistema alcanza el valor de corriente límite difusional. Es decir, al valor de potencial E_2 , la concentración de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo es cero y, por lo tanto, el gradiente de concentración es máximo. Bajo estas condiciones la corriente está controlada por difusión. En la Figura 3.11.4 se muestran la perturbación de potencial en el tiempo y el transitorio de corriente en el tiempo obtenido como respuesta.

Para un sistema reversible simple (Ecuación 3.11.22) bajo control difusional, con la especie R inicialmente ausente, para conocer la respuesta en corriente, es necesario conocer la dependencia funcional de la concentración con la distancia desde el electrodo y el tiempo de electrólisis. Dicho comportamiento es obtenido mediante la resolución de las ecuaciones diferenciales de las leyes de Fick, para cada una de las especies intervinientes bajo ciertas condiciones iniciales y de contorno.

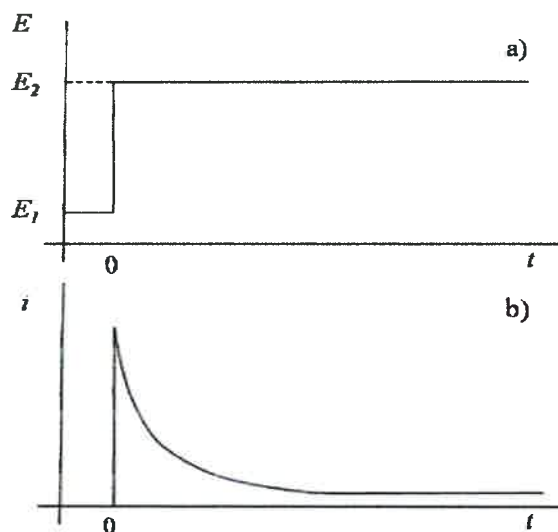


Figura 3.11.4. a) Perturbación de potencial para una experiencia de cronoamperometría. b) Respuesta de la corriente a la perturbación aplicada.

Las condiciones iniciales ($t = 0$) son:

$$c_O(x,0) = c_O^* \quad \text{y} \quad c_R(x,0) = 0$$

donde c_O^* es la concentración de la especie electroactiva O en el seno de la solución.

Una vez comenzada la electrólisis ($t > 0$) se tiene:

$$\begin{aligned} \text{si } x > 0 & \quad c_O(0,t) = 0 \\ \text{si } x \rightarrow \infty & \quad c_O(x,t) = c_O^* \quad \text{y} \quad c_R(x,t) = 0 \end{aligned}$$

$$D_O \frac{\partial c_O(x,t)}{\partial x} = D_R \frac{\partial c_R(x,t)}{\partial x} \quad (3.11.23)$$

$$i(t) = nFAD_o \left(\frac{\partial c_o(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (3.11.24)$$

siendo n el número de electrones intercambiados en la reacción de electrodo.

La ecuación 3.11.23 indica el balance de flujo de las especies O y R sobre la superficie del electrodo y la ecuación 3.11.24 establece que en un sistema controlada por difusión la corriente está determinada por el flujo de O en la superficie del electrodo ($x = 0$).

La resolución del sistema difusional se realiza mediante la aplicación del método de transformada de Laplace, que convierte la ecuación diferencial parcial obtenida en una ecuación diferencial ordinaria, la que se resuelve en el espacio de Laplace con la utilización de las condiciones iniciales y de contorno indicadas [84]. Se evalúa el flujo de material electroactivo a través de la ecuación 3.11.24, luego de reemplazar el gradiente de concentración por una expresión obtenida de aplicar la antitransformada de Laplace. El resultado obtenido es la expresión de la corriente en el espacio real. Para el caso de difusión lineal y semi-infinita, se obtiene la ecuación de *Cottrell* [41,84,86]:

$$i(t) = \frac{nFAD_o^{1/2} c_o^*}{(\pi t)^{1/2}} \quad (3.11.25)$$

Un gráfico de $i(t)$ vs $t^{1/2}$ arroja una línea recta cuya pendiente permite determinar el coeficiente de difusión de la especie electroactiva si se conoce n , el área electroactiva del electrodo y la concentración de O en el seno de la solución. La desviación de la linealidad en este gráfico puede poner en evidencia, entre otras cosas, la presencia de reacciones químicas homogéneas acopladas a la transferencia de carga o la existencia de procesos de adsorción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo.

Sin embargo, existen restricciones instrumentales y del sistema electroquímico que limitan la utilidad de ésta técnica. A tiempos muy cortos se predicen corrientes muy elevadas, pero debido a limitaciones del instrumental de medida y a la existencia de los fenómenos capacitivos, las corrientes experimentales no coinciden con lo predicho por la teoría a estos tiempos. Por otro lado, a tiempos largos de electrólisis, la ecuación de Cottrell predice corrientes muy pequeñas, pero a causa de los efectos convectivos en la

solución, generados por los gradientes de densidad, las corrientes observadas son mayores que las esperadas. Por lo tanto, la zona de trabajo de la ecuación 3.11.25 está comprendida aproximadamente entre los 20 μ s y los 60 segundos, dependiendo del instrumental y diseño de la celda electroquímica empleados y las dimensiones del electrodo de trabajo.

3.11.4. Electrólisis a potencial controlado (coulometría)

La coulometría es, esencialmente, una técnica que mide la carga eléctrica (coulombios) transferida durante una reacción electroquímica. Esta es una técnica no estacionaria, en donde se produce una transformación masiva de la sustancia electroactiva. Es una simple técnica electroquímica, la cual está basada en la ley de Faraday. Si Q es la cantidad de carga necesaria para oxidar o reducir por completo una especie i presente en la solución electrolítica, entonces se tiene que:

$$|Q| = nFN_i = nFVc_i \quad (3.11.26)$$

donde n es el número de electrones transferidos en la reacción, N_i es el número de moles que reaccionaron, V es el volumen de la solución y c_i es la concentración molar de la especie i . Conociendo la concentración de la especie de interés, por medio de una coulometría se puede determinar el valor de n . Generalmente, las experiencias de coulometría se llevan a cabo aplicando un potencial constante al electrodo de trabajo, el cual es mantenido a lo largo de la experiencia. Por lo general, a fin de completar la reacción en tiempos pequeños, se trabaja en soluciones agitadas. La respuesta obtenida del sistema se puede presentar, generalmente, como un decaimiento exponencial de la corriente con el tiempo hasta valores próximos al 3-1 % de su valor inicial.

Este método permite, por lo general, determinar el rendimiento faradaico del proceso de electrodo y su estequiometría, por medio de técnicas auxiliares, y detectar reacciones químicas lentas acopladas a la transferencia de carga.

El área debajo de la curva se corresponde con la carga necesaria para producir la electrólisis masiva de la especie electroactiva de interés. Para sistemas electroquímicos

complicados, analizar las curvas obtenidas puede arrojar información importante acerca del mecanismo de reacción.

3.11.5. Voltamperometría de pulsos

Las técnicas voltamperométricas de pulso han sido desarrolladas a fin de disminuir los límites de detección de las medidas voltamperométricas. Debido fundamentalmente a un aumento sustancial en la relación entre las corrientes faradaica y la no faradaica, tales técnicas permiten determinar concentraciones por debajo de 10^{-8} M. La mayoría de las técnicas de pulso están basadas en experimentos en los que se aplican pequeños saltos de potencial [84]. Sobre el electrodo de trabajo se aplica una secuencia de estos saltos de potencial, cada uno con una duración menor a 50 ms. Por cada pulso de potencial, se producen un salto y un decaimiento de corriente; si se muestrea la misma a tiempos largos de pulso, es decir, donde la contribución de la corriente capacitiva es mínima, se produce una discriminación de la corriente capacitiva y la medida se, basa fundamentalmente, en corrientes faradaicas.

La diferenciación entre las distintas técnicas de pulso radica en la forma de la onda de potencial de excitación y en el muestreo de la corriente. En este trabajo, en particular, se hizo empleo de la voltamperometría de onda cuadrada; por ello, se hará hincapié, particularmente, en la descripción de la misma.

3.11.5.1. Voltamperometría de escalera

La voltamperometría de escalera es una técnica donde intervienen una sumatoria de pulsos de potencial. En la Figura 3.11.5 se muestra un esquema representativo de la función de potencial aplicada y la corriente que resulta de la suma de pulsos aplicados al electrodo [41,97,98].

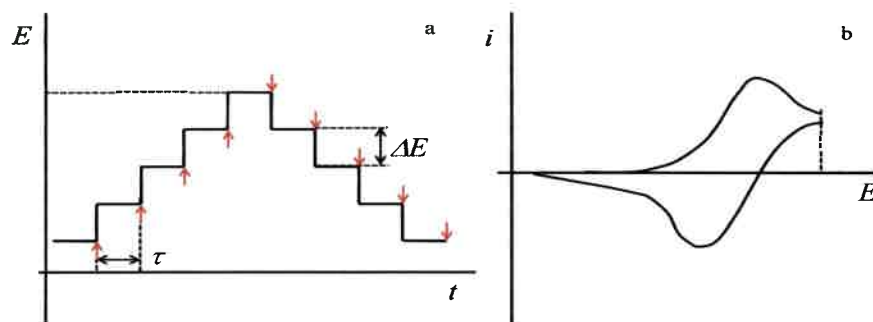


Figura 3.11.5. a) Programa de potencial aplicado al electrodo de trabajo. Las corrientes (\downarrow) se registran antes de aplicar un nuevo pulso. τ y ΔE son la duración y la amplitud del pulso, respectivamente ; b) Voltamperograma obtenido.

En la práctica, la corriente es medida a un cierto tiempo, t_m , antes de que se produzca un nuevo salto de potencial, es decir, salvo en el primer pulso, la corriente para cada paso posterior depende del potencial total aplicado, de manera que es posible escribir la expresión de corriente, para un proceso simple $O + ne^- \rightleftharpoons R$, como:

$$i(t, E) = \frac{nFAD_O^{1/2}c_O^{1/2}}{(\pi t_m)^{1/2}} \psi(E) \quad (3.11.27)$$

donde

$$\psi(E) = \frac{1}{(1 + \xi\theta)} \quad (3.11.28)$$

siendo:

$$\theta = \exp\left[\frac{nF}{RT}(E - E^{0'})\right] \quad \text{y} \quad \xi = \sqrt{\frac{D_O}{D_R}}$$

En la ecuación 3.11.28, E toma valores relacionados con el paso previo, por lo que $E = E_j + j\Delta E$, siendo j el número de pulso y ΔE la amplitud del pulso.

Si ΔE y la duración del pulso, τ , disminuyen la corriente se aproxima al valor esperado en un barrido lineal donde $E = E_i + vt$.

En la técnica de voltamperometría de escalera, la corriente registrada a un dado potencial es ligeramente menor que la correspondiente a la técnica de barrido lineal de potencial y su pico voltamperométrico aparece corrido a potenciales menores respecto al obtenido en un barrido lineal o cíclico de potencial [86,98].

3.11.5.2. Voltamperometría de onda cuadrada (VOC)

Los primeros trabajos referidos al empleo de esta técnica aparecen en el año 1969 [99,100].

Esta técnica presenta una perturbación al electrodo de trabajo mediante la aplicación de una variación del potencial en el tiempo en forma de una onda cuadrada simétrica. La forma de la onda se muestra en la Figura 3.11.6 [101,102].

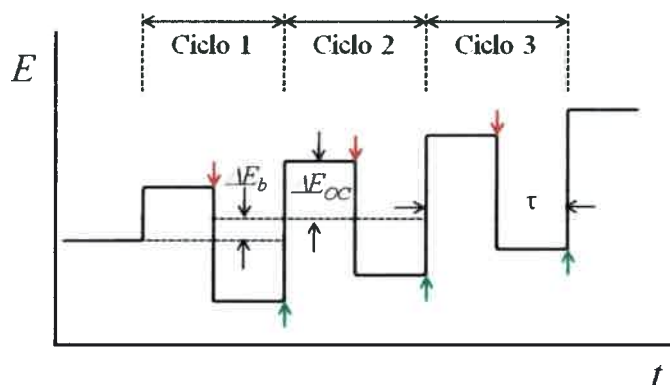


Figura 3.11.6. Forma de la onda cuadrada donde ΔE_{OC} es la amplitud de la misma, ΔE_b es el incremento de barrido, τ es el período de la onda, (↓) (↑) se corresponden al muestreo de corriente directa e inversa respectivamente.

La VOC es una técnica dinámica en la cual se aplica al electrodo de trabajo un tren de pulsos como el mostrado en la Figura 3.11.6. Los parámetros de interés son la altura del pulso ΔE_{OC} (también llamada amplitud de la onda cuadrada) la cual tiene una progresión monótonica en el tiempo, el incremento de barrido ΔE_b , el período de la onda τ y el tiempo del pulso t_p , definido como la mitad de un período. El parámetro

tiempo también puede ser descripto alternativamente por la frecuencia f , donde $f = \tau^{-1}$ o $f = 1/2t_p$.

La corriente es muestreada dos veces por ciclo, una vez al final del primer hemiciclo y otra vez al final del segundo hemiciclo (pulso inverso) en los decaimientos exponenciales para el potencial aplicado (Figura 3.11.7). Ya que la modulación de la amplitud de la onda cuadrada es muy grande, el pulso inverso puede causar la reacción opuesta a la producida en el primer hemiciclo.

La corriente muestreada en el primer hemiciclo corresponde a la corriente registrada en el barrido directo de potencial (Ψ_d) y, la corriente muestreada sobre el segundo hemiciclo corresponde a la corriente registrada en el barrido inverso de potencial (Ψ_i). De esta manera se generarán dos corrientes, en donde la diferencia entre ellas genera una corriente neta o diferencial ($\Delta\Psi$), las cuales se muestran en la Figura 3.11.8 para un sistema reversible simple.

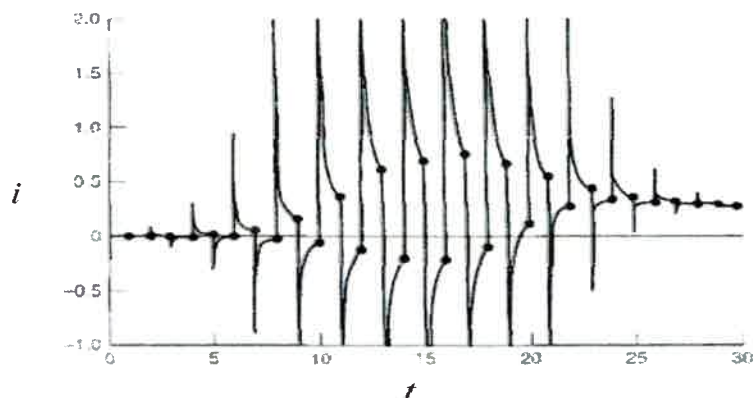


Figura 3.11.7. Respuesta de corriente en función del tiempo para la función de onda cuadrada del potencial.

$\Delta\Psi$ es una función simétrica alrededor del potencial de medio pico y proporcional a la concentración. La gran sensibilidad de la técnica radica en el hecho que la corriente neta posee la contribución de dos corrientes, por lo tanto, para procesos reversibles, la corriente medida es mayor que para el proceso directo o inverso [41]. Por otro lado, las corrientes capacitivas o de blanco son efectivamente eliminadas dada la manera en el muestreo de corriente. También, la forma y posición de la corriente

diferencial es independiente de la geometría que controla la difusión y el transporte convectivo de la materia [41,102].

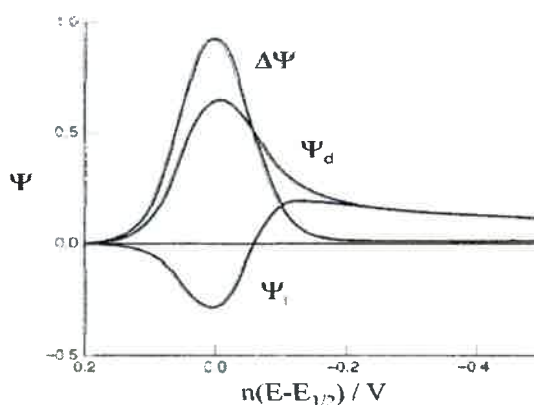


Figura 3.11.8. Voltamperogramas de onda cuadrada para una transferencia electrónica reversible para las corrientes normalizadas. $\Delta\Psi$: corriente neta, Ψ_d : corriente directa y Ψ_i : corriente inversa.

La función del potencial de onda cuadrada aplicada en el tiempo es:

$$E_m = E_i - \left[\frac{m+1}{2} \right] \Delta E_b - \Delta E_{oc} (1 + (-1)^{m+1}) \quad (3.11.29)$$

donde m es en número de ciclos aplicados [41,102].

3.11.5.2.1. Teoría de la Voltamperometría de Onda Cuadrada

La solución de las ecuaciones difusionales para diferentes sistemas químicos para esta técnica es compleja. Para los casos de sistemas electroquímicamente reversibles se puede plantear el teorema de superposición [103]. Para casos más complejos se emplean otras aproximaciones usando las ecuaciones integrales adecuadas, como es el desarrollo propuesto por Rifkin y Evans [104].

Para un caso *reversible simple* como el mostrado por la ecuación 3.11.30 se plantean las ecuaciones diferenciales para cada especie [104,105]:



Al inicio de la electrólisis ($t = 0$) solo O está presente y, asumiendo una difusión lineal semi-infinita, las condiciones de contorno del sistema y la ecuación de Nernst son:

$$c_O(x,0) = c_O(\infty,t) = c_O^* \quad (3.11.31)$$

$$c_R(x,0) = c_R(\infty,t) = 0 \quad (3.11.32)$$

$$E = E_f^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_O(0,t)}{c_R(0,t)} \quad (3.11.33)$$

La ley de conservación de flujo y las ecuaciones de difusión para ambas especies son:

$$D_O \left(\frac{\partial c_O(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} = D_R \left(\frac{\partial c_R(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (3.11.34)$$

$$\frac{\partial c_O(x,t)}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 c_O(x,t)}{\partial x^2} \quad (3.11.35)$$

$$\frac{\partial c_R(x,t)}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 c_R(x,t)}{\partial x^2} \quad (3.11.36)$$

Encontrar la solución de las ecuaciones de difusión para las formas oxidada y reducida lleva a considerar el valor de la corriente i_j que es la corriente en el j -ésimo hemi-ciclo, muestreada a un tiempo $t_i + j\left(\frac{\tau}{2}\right) = t_i + jt_p$, donde t_i es el tiempo transcurrido hasta el potencial E_i .

Para una función de onda cuadrada como la mostrada en la Figura 3.11.6, se obtiene una ecuación para la corriente, la cual está en función del tiempo y el potencial.

La corriente en el j -ésimo medio ciclo, i_j , es medida al tiempo $t_i + jt_p$, y se expresa como:

$$i_j = \frac{nFA\sqrt{D_o C_o^*}}{\sqrt{\pi t_p}} \sum_{m=1}^j \frac{Q_{m-1} - Q_m}{\sqrt{j-m+1}} \quad (3.11.37)$$

para $j = 1, 3, 5, \dots$, donde t_p está dado en segundos y:

$$Q_m = \frac{\xi_m}{1 + \xi_m} \quad (3.11.38)$$

donde

$$\xi_m = \exp\left[\frac{nF(E_m - E_{1/2}^r)}{RT}\right] \quad (3.11.39)$$

El parámetro E_m representa la función de potencial en el tiempo (ecuación 3.11.29) y $E_{1/2}^r$ es el potencial de media onda reversible para la reacción de electrodo. Los parámetros E_m , θ_m y Q_m son definidas sólo para $m > 1$. Los valores impares de m corresponden a las corrientes muestreadas en los hemi-ciclos directos (corriente directa) y los valores pares de m denotan los muestreos de corriente para el hemi-ciclo inverso (corriente inversa). Si se considera la diferencia en corrientes, se llega a la corriente diferencial:

$$i_j - i_{j+1} = \Delta i_j = \frac{nFA\sqrt{D_o C_o^*}}{\sqrt{\pi t_p}} \sum_{m=1}^j \frac{Q_{m-1} - 2Q_m + Q_{m+1}}{\sqrt{j-m+1}} \quad (3.11.40)$$

donde $j = 1, 3, 5, \dots$. Δi_j es la corriente diferencial al potencial E_j .

Es común en VOC hacer uso de la corriente adimensional (Ψ), la cual se define como:

$$\psi_j = i_j \frac{\sqrt{\pi p}}{nFA\sqrt{C_o^*D_o}} = \sum_{m=1}^j \frac{Q_{m-1} - Q_m}{\sqrt{j-m+1}} \quad (3.11.41)$$

la cual también se la puede definir en función de τ y $1/f$

$$\psi_j = i_j \frac{\sqrt{\pi\tau}}{nFA\sqrt{C_o^*D_o}} = i_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{C_o^*D_o}f} \quad (3.11.42)$$

La corriente diferencial adimensional se expresa según:

$$\Delta\psi_j = \Delta i_j \frac{\sqrt{\pi p}}{nFA\sqrt{C_o^*D_o}} = \sum_{m=1}^j \frac{Q_{m-1} - 2Q_m + Q_{m+1}}{\sqrt{j-m+1}} \quad (3.11.43)$$

La corriente normalizada $\Delta\Psi_j$ alcanza su máximo valor cuando el término j -ésimo es igual a cero o $E_j = E'_{1/2}$. Esta característica de posición y simetría permite una rápida inspección del voltamperograma y se mantiene aún cuando $n\Delta E_{OC} \rightarrow 0$ y $\Delta E_b \rightarrow 0$, es decir, cuando cada valor de corriente tiende a la respuesta característica para una voltamperometría de barrido lineal.

Es posible variar el valor de $n\Delta E_{OC}$, pero debe observarse como influye esta variación en la respuesta de corriente diferencial (Δi), ya que pueden obtenerse voltamperogramas pobremente definidos tanto para valores de $n\Delta E_{OC}$ pequeños como para valores grandes de $n\Delta E_{OC}$. Por lo tanto, se deberá elegir aquel valor de $n\Delta E_{OC}$ de modo tal de obtener el máximo valor para Δi sin que el voltamperograma registrado presente distorsiones.

El ancho de pico a la altura media del voltamperograma de corriente diferencial ($W_{1/2}$) es de aproximadamente $90,5/n$ [mV] para pequeñas amplitudes de la onda cuadrada (ΔE_{OC}). El $W_{1/2}$ aumenta con el incremento de ΔE_{OC} .

Si se considera el empleo de esta técnica con fines analíticos, se deberá optimizar la corriente neta en términos de sensibilidad, es decir, se debe maximizar $\Delta\Psi_p/nW_{1/2}$, donde $\Delta\Psi_p$ es la corriente de pico neta normalizada.

La dependencia de la corriente diferencial ($\Delta\Psi$) con el ΔE_b es menor que con ΔE_{OC} . El efecto que tiene el ΔE_b en la técnica radica en la resolución de los voltamperogramas. Siendo la velocidad de barrido de potencial proporcional a $\frac{\Delta E_b}{\tau}$, aumentando ΔE_b se puede aumentar la velocidad en la adquisición de datos, disminuyendo el tiempo del experimento. Sin embargo, grandes valores de ΔE_b producen voltamperogramas de onda cuadrada con una pequeña adquisición de valores de corriente registrados para un determinado intervalo de potencial barrido, generando errores en las mediciones de $\Delta\Psi_p$ y de E_p , siendo éste el potencial de pico.

La dependencia de $\Delta\Psi_p$ con respecto a ΔE_{OC} y ΔE_b se muestra en la Figura 3.11.9 para tres valores diferentes de ΔE_b . Como puede apreciarse, un valor de 50 mV para ΔE_{OC} produce la mayor corriente, siendo este comportamiento prácticamente independiente de $n\Delta E_b$.

Con fines analíticos, es adecuado emplear los siguientes valores para los parámetros de amplitud de la onda e incremento de barrido:

$$n\Delta E_b = 10 \text{ mV}$$

$$n\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$$

Con estos valores, para un sistema electroquímico simple, se tiene que $nW_{1/2} = 126 \text{ mV}$ a 25°C [84,98,102].

La corriente diferencial es proporcional a $f^{1/2}$, por lo que la mayor sensibilidad se obtiene trabajando a altas frecuencias. El rango de operación experimental típico para las frecuencias es de 10 a 1000 Hz. Con frecuencias menores a 10 Hz disminuye el rango efectivo de barrido de potencial y, dependiendo del sistema en estudio, se pueden observar diferentes efectos sobre los voltamperogramas con frecuencias mayores a 300 Hz.

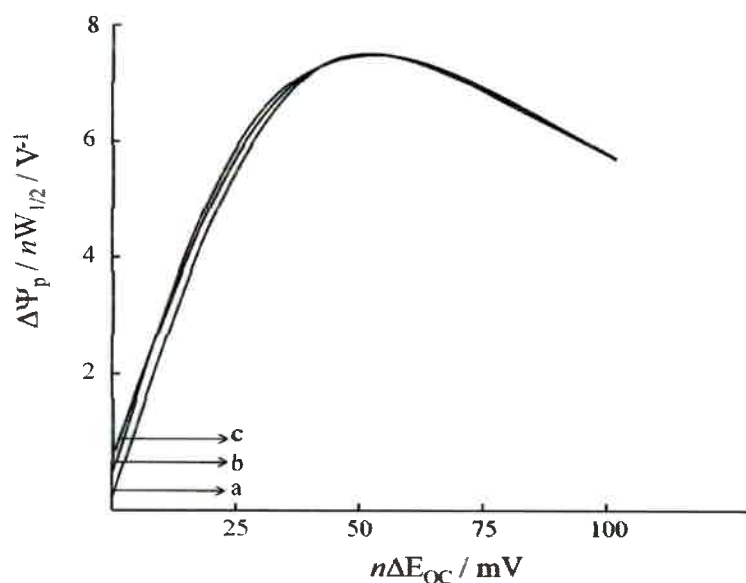


Figura 3.11.9. Relación de corriente de pico normalizada / ancho de medio pico ($\Delta\Psi_p/nW_{1/2}$) con la amplitud de la onda cuadrada para ΔE_b (mV) = a) 2,5; b) 10 y c) 25.

3.11.5.2.2. Teoría de VOC para diferentes sistemas cinéticos

La VOC, en virtud de la eliminación de las corrientes de blanco, puede ser utilizada para la elucidación de diferentes mecanismos de reacción de electrodo a concentraciones más bajas que las empleadas por las técnicas electroquímicas convencionales. De esta manera, se pueden determinar parámetros cinéticos característicos para cada reacción de acuerdo a su mecanismo más probable.

3.11.5.2.2.1. Reacción de transferencia de electrones lenta

Para una reacción de electrodo del tipo de la ecuación 3.11.44:



donde $k = k_a^0 / D_R^{(1-\alpha)/2} D_O^{\alpha/2}$, siendo k_a^0 la constante de velocidad estándar (cm/s) y α el coeficiente de transferencia de carga. Por analogía con otras técnicas, se espera que para una transferencia de carga lenta la altura del pico de corriente disminuya, aumente el ancho de medio pico y el potencial de pico se corra hacia valores más negativos

(reducciones), en comparación de un sistema reversible. La magnitud de cada efecto depende del parámetro adimensional $k\tau^{1/2}$. Existe una dependencia de E_p con α , en donde, para valores crecientes del $\log k\tau^{1/2}$, es decir, constantes de velocidad grandes o tiempos de medidas grandes, se produce un aumento en su valor como se muestra en la Figura 3.11.10.a, (aproximación a sistemas reversibles). En la región comprendida entre $1 < \log k\tau^{1/2} > -1$ se produce una transición, en donde el comportamiento se asemeja a un sistema cuasi-reversible, mientras que para $\log k\tau^{1/2} < -1$ el sistema se comporta en forma irreversible [106].

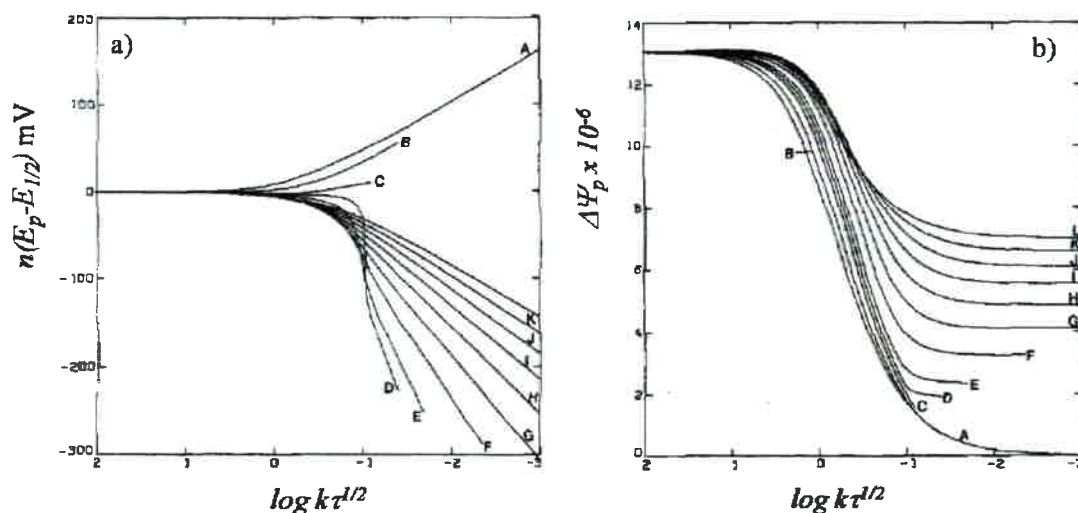


Figura 3.11.10.a). Posición del pico, $n(E_p - E_{1/2})$ en función de $\log k\tau^{1/2}$ para distintos valores de α : (A-L). **b)** Altura del pico ($\Delta\Psi_p$) en función de $\log k\tau^{1/2}$ para distintos valores de α : (A-L): 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 y 1.

La corriente de pico adimensional también depende de la cantidad $k\tau^{1/2}$. Para valores grandes de $k\tau^{1/2}$, $\Delta\Psi_p$ se aproxima al valor característico de sistemas reversibles, mientras que para valores suficientemente pequeños de $k\tau^{1/2}$ se alcanza la zona de comportamiento de sistemas irreversibles (Figura 3.11.10.b) [106].

3.11.5.2.2.2. Reacción de transferencia de carga seguida por una reacción química homogénea

Para un mecanismo de reacción tipo EC (ecuación 3.11.45.a y 3.11.45.b), donde la transferencia electrónica es reversible, se ha determinado su comportamiento por VOC.



En este caso, se analizó la variación de potencial de pico como así también la corriente de pico y el ancho de medio pico en función de K , donde $K = k_d / k_i$. El E_p se corre hacia valores más catódicos con el aumento del $\log K\tau$ (ver Figura 3.11.11), en armonía con los resultados encontrados por voltamperometría cíclica. Para grandes valores de $K\tau$, se obtiene una dependencia lineal, con pendiente de 29,6/n mV a 25 °C (Figura 3.11.11).

Como cabe esperar, $\Delta\psi_p$ disminuye a medida que K se hace mayor, poniendo en evidencia una competición entre la oxidación de R y la reacción química homogénea, mientras que pequeños valores de K no influyen significativamente en la magnitud de $\Delta\psi_p$ (Figura 3.11.12).

El ancho de medio pico no se ve fuertemente afectado con el valor de K . Por ejemplo, para un valor de $\log K$ de 3, el ancho de medio pico se disminuye 13 mV (Figura 3.11.13).

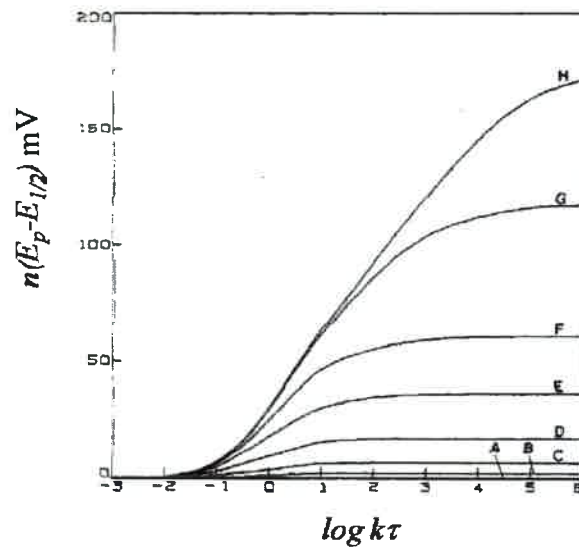


Figura 3.11.11. Variación de la posición del pico, $n(E_p - E_{1/2})$, en función de $\log k\tau$ para distintos valores de K . $\log K$: (A-H): -2; -1; -0,5; 0; 0,5; 1; 2 y 3.

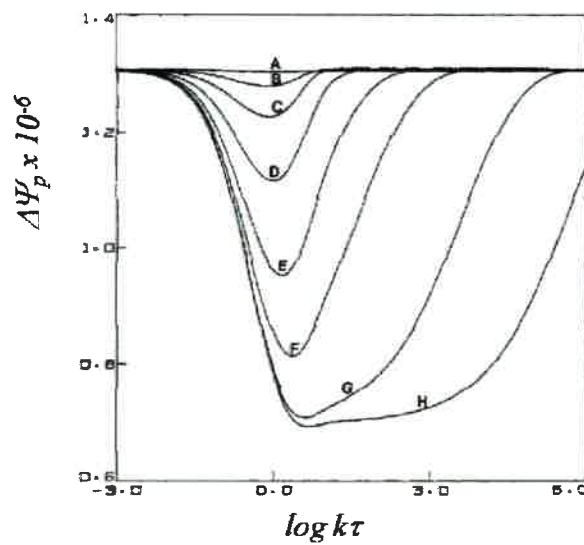


Figura 3.11.12. Variación de la corriente de pico ($\Delta\Psi_p$) en función de $\log k\tau$ para distintos valores de K . $\log K$: (A-H): -2; -1; -0,5; 0; 0,5; 1; 2 y 3.

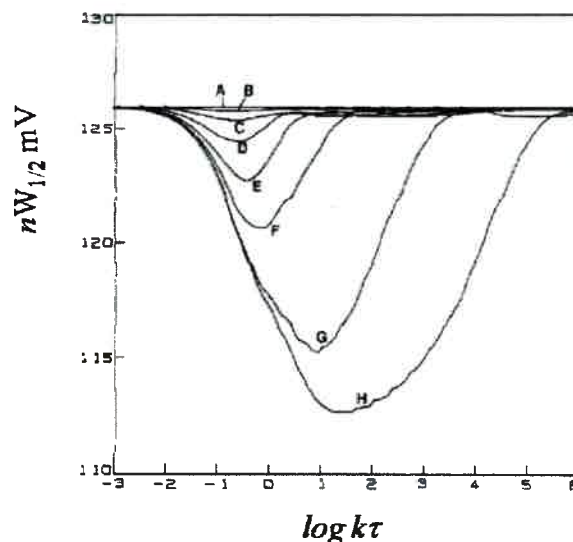


Figura 3.11.13. Variación del ancho de medio pico ($W_{1/2}$) en función de $\log k\tau$ para distintos valores de K . $\log K$: (A-H): -2; -1; -0,5; 0; 0,5; 1; 2 y 3.

3.12. Principios básicos de la técnica ELISA

En este capítulo se desarrollará una descripción de la técnica de *Ensayos de Inmunosorbentes Unidos a Enzimas*, denominado comúnmente ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Su empleo es indispensable para la detección y cuantificación de antígenos y anticuerpos [107].

Desde su presentación, en el año 1971, los ensayos inmunoenzimáticos han sido aplicados en la investigación básica, diagnóstico clínico y en el campo de la biotecnología. Tanto antígenos como anticuerpos pueden ser detectados y cuantificados de manera específica. La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno o un anticuerpo, inmovilizado sobre una fase sólida, mediante anticuerpos o antígenos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

Este formato de ELISA ha sido muy empleado dada las siguientes bondades que posee [47]:

- Los antígenos o anticuerpos pueden ser pasivamente adsorbidos, mediante interacciones hidrofóbicas, a una superficie sólida compuesta por placas de 96 pocillos de plástico, ópticamente transparentes en la región del espectro UV-Visible, a fin de aumentar su capacidad de adsorción hacia proteínas.
- Ya que uno de los reactivos en la técnica ELISA es unido a una fase sólida, la separación del reactivo unido de aquel libre se realiza fácilmente mediante procedimientos de lavado (enjuagado de cada pocillo con solución reguladora de un pH adecuado).
- El resultado del ensayo, generalmente, es un cambio de color el cual puede ser observado directamente por el ojo o mediante el empleo de espectrofotómetros multicanales diseñados especialmente.

La posibilidad de inmovilizar por adsorción pasiva permite una gran flexibilidad en el diseño del ensayo.

3.12.1. Etapas para un ensayo ELISA

Las principales etapas de un experimento clásico de ELISA son [47]:

- Adsorción del antígeno o el anticuerpo en la fase sólida del pocillo.
- La adición de un muestra prueba y los subsecuentes reactivos
- La incubación de los reactivos
- Separación de los reactivos unidos de los libres por lavado de los pocillos.
- La adición de un agente marcado con una enzima.
- Agregado de un sustrato enzimático capaz de desarrollar color.
- Lectura espectrofotométrica para revelar el ensayo.

3.12.1.1. Fase sólida

Las placas más usadas son aquellas de 96 pocillos fabricadas de cloruro de polivinilo (pocillos flexibles) y poliestireno (pocillos rígidos). Los anticuerpos o antígenos son unidos a la fase sólida fácilmente mediante adsorción pasiva, por interacciones hidrofóbicas entre las subestructuras de las proteínas y la pared del

pocillo. Las interacciones son independientes de la carga neta de la proteína y, así, cada proteína tiene una constante de unión diferente. Las proteínas, dentro de las cuales se encuentran las inmunoglobulinas, poseen la mayoría de los residuos hidrofílicos hacia afuera de la molécula, mientras que los residuos hidrofóbicos están orientados hacia adentro. A fin de asegurar una mayor interacción con la fase sólida, se suele desnaturalizar parcialmente la proteína a fin de exponer en mayor grado los grupos hidrofóbicos.

Cada pocillo posee una capacidad finita de unión, la cual varía entre 50 y 500 ng/pocillo para una variedad de proteínas, cuando se agrega un volumen de 50 μ L.

La velocidad y alcance de unión entre la proteína y la fase sólida depende de:

- Coeficiente de difusión de la macromolécula
- La relación del área superficial dispuesta a la unión/volumen de solución de proteína.
- La concentración de la sustancia a unirse
- La temperatura de incubación
- El tiempo de adsorción

El factor más importante a tener en cuenta es la concentración del antígeno o anticuerpo a unir a la fase sólida. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio para ver qué concentración produce la mayor señal. Una alta densidad de anticuerpos unidos puede generar multicapas adsorbidas, las cuales pueden eluirse en los lavados. Para el antígeno unido, una alta densidad puede producir una inhibición del epítotope del antígeno en la interacción con el anticuerpo por impedimento estérico. Concentraciones bajas de antígeno producirán una pobre sensibilidad de la técnica. Otro factor a tener presente es la orientación con que se produce la adsorción, dado que puede afectar el paratopo del anticuerpo.

La temperatura de incubación en esta etapa también influye. Para interacciones hidrofóbicas, una mayor temperatura aumenta la velocidad de unión. Generalmente, la adsorción se realiza a 37 °C, o bien a 4 °C toda la noche, o una combinación de ambas. También existe una dependencia de la velocidad de unión con la fuerza iónica y el pH de la solución, siendo particular para cada caso.



3.12.1.2. Adición de reactivos

Para inmunoensayos, se agregan pequeños volúmenes de reactivos, medidos en forma exacta y reproducible. Los volúmenes generalmente empleados oscilan entre 50 y 100 μL /pocillo, pero dependerá del volumen agregado en la etapa de inmovilización.

3.12.1.3. Incubación

La reacción entre antígenos y anticuerpos depende de su distribución, tiempo, temperatura y pH de la solución en la cual se lleva a cabo la incubación. Por lo general, la temperatura de incubación es 37 °C. Cuando la temperatura es menor, el tiempo necesario para la incubación es mayor.

La incubación se puede realizar en forma agitada o estacionaria. El efecto de la rotación favorece al mezclado de los reactivos durante la incubación y facilita la interacción con las moléculas adsorbidas en la fase sólida, particularmente importante cuando se trabaja con soluciones densas como el suero. En la incubación estacionaria, el mezclado y llegada del reactivo a la pared del pocillo solo se da por la difusión de los mismos. Por lo tanto, para alcanzar un máximo de reacción, se necesita un mayor tiempo de incubación [47].

Generalmente, antes de la etapa de incubación de los reactantes, se adiciona un agente que tiende a evitar las adsorciones no específicas. Por ejemplo, proteínas provenientes de la muestra pueden unirse a parte de la superficie del pocillo que se encuentra libre de elemento de reconocimiento. Para evitar este efecto se agrega, por lo general, una alta concentración de sustancias inmunológicamente inertes preparadas en una solución reguladora adecuada. Esta molécula, como está en una alta concentración, se adsorberá sobre el plástico descubierto. Como agente bloqueante, generalmente se utiliza albúmina de suero bovino.

3.12.1.4. Lavados

El propósito del lavado es el de separar los reactivos unidos de los no unidos o libres. Se realiza mediante el agregado de solución reguladora, al pH indicado, a cada pocillo. Generalmente, el lavado se realiza al menos por tres veces. El método más

empleado es el de cubrir completamente el pocillo. La solución de lavado, en la mayoría de los casos es solución reguladora de fosfato de pH entre 7 y 7,5 de concentración 0,1 M. Si se está realizando un inmunoensayo, no se emplea agua, dado que se produce la inactivación irreversible del anticuerpo.

3.12.1.5. Agregado de conjugado con enzima

El empleo de reactivos conjugados con enzimas es intrínseco de la técnica de ELISA. La respuesta se determinan midiendo el desarrollo de color producido por el agregado de sustrato o una combinación de sustrato y un colorante. Las enzimas más comúnmente empleadas son la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la β -galactosidasa y la ureasa [47]. En la Tabla 3.12.1.1 se muestran las enzimas más empleadas, los sustratos enzimáticos y los colorantes para cada una de ellas.

La más empleada de las enzimas mostradas es la HRP. La mayor precaución a tener en cuenta para su uso es conocer la concentración óptima de sustrato, ya que un exceso de peróxido de hidrógeno inhibe la actividad enzimática.

Tabla 3.12.1.1. Enzimas más empleadas para enzimoimmunoensayo, sustratos enzimáticos, colorantes y medio de reacción.

Enzima marcadora pm / gr mol ⁻¹	Sustrato enzimático	Colorante	Solución reguladora
Peroxidasa de rábano picante (40000)	H ₂ O ₂ (0,004 %)	Orto-fenilendiamina (OPD)	Fosfato/citrato 0,1 M, pH 5,0
	H ₂ O ₂ (0,004 %)	Tetrametil-benzidina (TMB)	Acetato 0,1 M, pH 5,6
	H ₂ O ₂ (0,002 %)	Ac. Sulfónico de 2,2'-Azino di- etilbenzotiazolina (ABTS)	Fosfato/citrato 0,1 M pH 4,2
	H ₂ O ₂ (0,02 %)	Di-aminobenzidina (DAB)	Tris o fosfato pH 7,4
Fosfatasa alcalina (100000)	<i>p</i> -nitrofenil fosfato 2,5 mM	<i>p</i> -nitrofenil fosfato (pnpp)	Dietanolamina 10mM y MgCl ₂ 0,5 M, pH 9,5
β -galactosidasa 540000	<i>o</i> -nitro-fenil β -D- galactopiranoside 3 mM	<i>o</i> -nitro-fenil β -D- galactopiranoside (ONPG)	MgCl ₂ y 2-mercaptoetanol 0,01 M/ fosfato pH 7,5
Ureasa 483000	Urea	Bromocresol (BC)	Fosfato/citrato 0,1 M pH 4,8

La unión de la enzima al antígeno o al anticuerpo puede afectar la especificidad de un ensayo, debido a que se puede producir una modificación química que altere los

determinantes antigénicos (epítopes) del antígeno o los sitios de unión del anticuerpo. Los requerimientos para una óptima conjugación son:

- 1- Simplicidad y rapidez
- 2- Reproducibilidad (relación constante de reactivo a enzima)
- 3- Alto grado de conversión para la reacción, y una baja producción de polímeros de enzima y reactivo
- 4- Bajo grado de inactivación del reactivo y la enzima
- 5- Fácil separación del producto marcado del que no está marcado
- 6- Larga estabilidad sin pérdida de actividad inmunológica y enzimática.

3.12.1.6. Desarrollo de color. Lectura

Una vez llevada a cabo la reacción inmune, se agregan los reactivos necesarios para la reacción enzimática, la cual dará lugar el desarrollo de color en cada pocillo de la placa de ELISA. De acuerdo a la enzima utilizada y al sustrato enzimático empleado, el producto coloreado tendrá un color característico el cual podrá ser cuantificado mediante lecturas en un espectrofotómetro a la longitud de onda de máxima absorción de la solución. La condición necesaria para que estos colorantes y sustratos enzimáticos puedan emplearse a la hora de medir espectrofotométricamente es que el producto de reacción del colorante sea soluble. En la Tabla 3.12.1.2 se muestra, para cada sustrato enzimático y colorante, la longitud de onda de máxima adsorción.

Tabla 3.12.1.2. Sistema enzimático con los correspondientes valores de λ de medida.

Enzima marcadora	Sistema	Color desarrollado	Longitud de onda de lectura λ (nm)	Solución de frenado de reacción
Peroxidasa de rábano picante	OPD	Naranja/marrón	492	1,25 M H ₂ SO ₄
	TMB	Amarillo	450	SDS 1 %
	ABTS	Verde	414	No se frena
	DAB	Marrón	450	No se frena
Fosfatasa alcalina	pnpp	Amarillo/verde	405	2 M Na ₂ CO ₃
β -galactosidasa	ONPG	Amarillo	420	2 M Na ₂ CO ₃
Ureasa	BC	Púrpura	588	1 % mertiolato

3.12.2. Formatos de ELISA

La nomenclatura existente acerca de las diferentes experiencias para llevar a cabo una experiencia de ELISA es extensa y confusa. Generalmente, se emplea el término *inmuno* acompañada con otra palabra que indica el tipo de marcador empleado. Por ejemplo, si se emplea como marcador de moléculas un radioisótopo, da lugar a los radioinmunoensayos. De la misma manera, existen fluoroinmunoensayos, quimioluminoensayos y enzimoimmunoensayos [11]. Dentro de un dado formato de trabajo, por ejemplo enzimoimmunoensayos, se puede realizar otra clasificación, la cual dependerá de qué se quiera determinar, es decir, si se quiere determinar un antígeno o un anticuerpo. En la literatura existen muchos ensayos diferentes [11,47], pero los formatos más comúnmente empleados son:

- a)- *enzimoimmunoensayo competitivo para determinación de antígenos;*
- b)- *determinación de antígenos usando anticuerpos marcados;*
- c)- *método sandwich para determinación de antígenos;*
- d)- *enzimoimmunoensayo para determinación de anticuerpos.*

Es de mayor interés en este trabajo el enzimoimmunoensayo competitivo para la determinación de antígenos, por lo tanto, se desarrollará a continuación.

3.12.2.1. Enzimoimmunoensayo competitivo para la determinación de antígenos

Un ensayo competitivo implica que dos reactivos traten de unirse a un tercero, por ejemplo, dos antígenos (uno marcado a una enzima) compiten por una cantidad limitada de anticuerpo. La competición propiamente dicha implica el agregado simultáneo de los dos competidores a donde se encuentra el anticuerpo inmovilizado.

Por lo tanto, se producen dos reacciones:





donde Ab es el anticuerpo inmovilizado, Ag es el antígeno y Ag-E es el antígeno conjugado con la enzima (antígeno marcado). Para que exista una verdadera competición entre Ag-E y Ag no debe existir un gran exceso de uno respecto al otro, dado que si no, sólo se va a ver favorecida una de las reacciones (por un principio de acción de masas). Por ejemplo, para un gran exceso de Ag-E, este se unirá casi por completo a los anticuerpos inmovilizados en la fase sólida dada su gran concentración, no dejando interaccionar significativamente a Ag con el anticuerpo. Para concentraciones similares de Ag y Ag-E, los valores de K_{af} y K'_{af} serán cercanas, si bien la primera siempre será mayor.

Una vez producida la reacción, el sistema antígeno-anticuerpo se separa del antígeno libre. La actividad enzimática en la fracción libre o en la unida al anticuerpo se determina luego de la separación. El punto final de la reacción es un cambio de color debido a la degradación enzimática del sustrato. La intensidad del mismo se mide espectrofotométricamente y resulta ser inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

El término “competitivo”, en realidad, no es correctamente aplicado. No ocurre una verdadera competición dado que los sitios de unión del anticuerpo nunca son completamente saturados [11]. Todos los inmunoensayos dependen de la medida de una *fracción ocupada* por el analito sobre todos los sitios de unión del anticuerpo.

Para el ensayo competitivo para el antígeno, uno mide los sitios ocupados por el Ag-E, no por el Ag, por lo tanto, se realiza una medida relativa de los sitios *no ocupados* por el antígeno. Como se posee una cantidad limitada de anticuerpos inmovilizados y una cantidad constante de Ag-E, en realidad, éste tipo de ensayos se deberían llamar de *reactivo limitado*. No obstante, usualmente se emplea el término competitivo.

CAPITULO 4

4. Metodología Experimental

4.1. Introducción

En este capítulo se describen todos los dispositivos y elementos que han sido utilizados para llevar a cabo las experiencias electroquímicas desarrolladas y el análisis de datos. Se describirán también las técnicas auxiliares de espectroscopía de absorción UV-visible, las cuales fueron empleadas para complementar los estudios electroquímicos llevados a cabo.

4.2. Instrumentos de electroquímica

4.2.1. Electroodos de trabajo

Para las experiencias de voltamperometría cíclica y voltamperometría de onda cuadrada, se utilizó un electrodo de carbono vítreo (CV) con un área electroquímica de $0,077 \text{ cm}^2$. Este electrodo constó de un disco de aproximadamente 3 mm de diámetro, inserto en un cilindro de teflón de 3,5 cm de largo, acoplado a su vez a un tubo de vidrio de 12 cm de largo. El contacto eléctrico entre el carbono vítreo y un cable conector de cobre convencional se realizó mediante una pequeña gota de mercurio que moja ambos componentes. La parte superior del electrodo se ajustó a la tapa de teflón mediante un adaptador también realizado de teflón.

El valor del área del electrodo se determinó experimentalmente mediante experiencias cronoamperométricas realizadas en una solución de ferroceno $1 \times 10^{-3} \text{ M} + 0,1 \text{ M}$ de NaClO_4 como electrolito soporte en acetonitrilo. Conociendo el valor del coeficiente de difusión del ferroceno en este medio ($2,32 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [108]), a partir de un gráfico de i vs $t^{1/2}$ se determinó, con el valor de la pendiente, el área electroquímica del electrodo (Ecuación 3.11.25) [84].

Se empleó un cilindro de CV inserto en un cuerpo de teflón de 3 cm de largo y 8 mm de diámetro como electrodo para las experiencias de electrólisis a potencial. El cuerpo de teflón se introdujo en una varilla de vidrio, la cual llevó en su interior un alambre de cobre convencional el cual se empleó a fin de realizar el contacto eléctrico. El contacto eléctrico entre la barra de carbono vítreo y el cable conector de cobre se realizó mediante una pequeña gota de mercurio que moja ambos componentes. El área geométrica de este electrodo fue de $2,64 \text{ cm}^2$.

Para las experiencias cronoamperométricas en el desarrollo del inmunosensor de P4 se empleó un electrodo de disco de CV convencional, fabricado de manera similar al comentado anteriormente, con un diámetro de 4 mm.

4.2.2.1. Tratamiento previo de los electrodos de trabajo

Para las experiencias de VC y VOC realizadas en acetonitrilo y las experiencias cronoamperométricas llevadas a cabo en solución reguladora de citrato-fosfato de pH = 5, el electrodo de trabajo de CV fue pretratado antes de su uso. El pretratamiento consistió en un pulido mecánico sobre un paño húmedo conteniendo alúmina de $0,3 \mu\text{m}$ primero y posteriormente con alúmina de $0,05 \mu\text{m}$. Posterior al pulido, se colocó el electrodo en un recipiente con agua y se lo sonicó por 10 minutos a efecto de retirar restos de alúmina. Se lo enjuagó con abundante agua y fue posteriormente secado.

Para las experiencias de voltamperometría de onda cuadrada con redisolución adsorptiva en solución acuosa reguladora de pH = 8, el electrodo se sometió a una activación electroquímica donde, previamente, al electrodo se le realizó una limpieza mecánica como la comentada anteriormente. El proceso de activación electroquímico empleado fue el método de Anjo y col. [109], el cual consistió en aplicar un potencial de 1,2 V vs ECS durante 300 segundos al electrodo de CV el que se encontraba sumergido en una solución 1 M KOH. A fin de verificar que la activación del electrodo fuera la misma para cada experiencia, se compararon las curvas de i vs t para cada salto de potencial.

El electrodo de barra de CV empleado para las experiencias de electrólisis a potencial controlado se limpió mediante pulido mecánico con un paño húmedo conteniendo primeramente alúmina de $0,3 \mu\text{m}$ y posteriormente con alúmina de $0,05$

μm . El electrodo, posteriormente, fue enjuagado con abundante agua y secado previo a su uso.

4.2.3. Electrodo de referencia

- a) Electrodo de calomel saturado (ECS)

El ECS consistió en un tubo de 6 mm de diámetro, el cual tuvo dos ramas. En una de las ramas se soldó un alambre de Pt, se colocó Hg purificado de manera de cubrir toda la superficie del Pt y sobre él se agregó la pasta de calomel (Hg_2Cl_2 , KCl (saturado)). La otra rama, que realiza el contacto con la solución, se rellenó con agar- KNO_3 3%. Este actuó como puente salino. El electrodo finalmente se rellenó con una solución saturada de KCl. Una vez preparado el electrodo, se comparó su potencial frente a otro ECS de calidad certificada y se verificó, una vez alcanzado el equilibrio, que la diferencia de potencial no fuese mayor que ± 1 mV a temperatura ambiente.

Estos electrodos fueron construidos en nuestro laboratorio, y fueron periódicamente controlados.

- b) Electrodo de alambre de plata

Se utilizó un alambre de plata puro como electrodo de pseudo-referencia. Este alambre, se pulió con una lija al agua de granulometría 600, se enjuagó con abundante agua y se secó con aire templado. Su potencial permaneció prácticamente constante durante las experiencias.

4.2.4. Contraelectrodos

Para las experiencias de VC y VOC en las celdas convencionales se empleó un alambre de Pt enroscado en forma de resorte. Para las experiencias de electrólisis a potencial controlado se utilizó una chapa de acero inoxidable de gran área. El tratamiento previo a su uso para estos electrodos se lavó en solución de mezcla sulfonítrica durante dos horas, con posterior enjuagado con agua.

Para las experiencias de flujo, se usó un caño de acero inoxidable como contraelectrodo, el cual se encontró dentro del cuerpo de la celda y sirvió como transportador de solución reguladora.

4.2.5. Celdas

Los estudios electroquímicos se realizaron empleando una celda tubular de tamaño convencional de tres electrodos, con dos compartimientos y con burbujeador de gases incorporado [41,86]. Un cuerpo se encontró separado del otro por medio de un capilar de Luggin-Haber con un área de sección transversal pequeña (Figura 4.2.1).

En el compartimiento principal se colocó el electrodo de trabajo, el cual se encontró enfrentado y a la misma altura que el capilar de Luggin-Haber que proviene del otro compartimiento, junto con el contraelectrodo. Tanto el electrodo de trabajo como el contraelectrodo se encontraron sujetos a una tapa maquinada de teflón. Esta tapa también tuvo un orificio por donde ingresó una manguera de teflón para desgasar la solución y otro que sirvió como salida del gas circulante. En el otro compartimiento va el electrodo de referencia. Este segundo compartimiento tuvo un volumen considerable por debajo del capilar de Luggin-Haber que conecta ambos cuerpos, que permitió retener e impedir la contaminación de la solución de trabajo debido a los componentes propios del electrodo de calomel saturado. El volumen de la celda es de 10 mL como máximo.

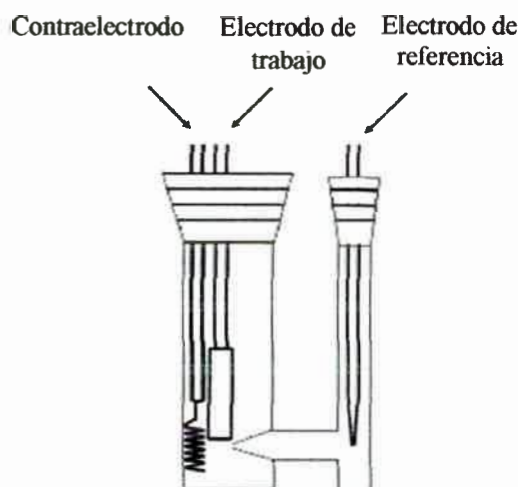


Figura 4.2.1. Esquema de una celda electroquímica de dos cuerpos empleada para las experiencias de VC y VOC.

La celda empleada para las experiencias de voltamperometría de onda cuadrada de redisolución adsorptiva en medio no agitado fue de un solo cuerpo de vidrio, la cual contenía una tapa esmerilada de vidrio con orificios, también esmerilados en su extremo, para el ingreso de los electrodos como así también para el ingreso de una desgasador y salida de gas (Figura 4.2.2). Esta celda tuvo en su exterior un recubrimiento de vidrio (“camisa”) que permitió que circule agua que provino de un crióstato para la correcta termostatación de la solución de trabajo. El volumen de trabajo de esta celda fue de 10 mL.

También se colocó en línea con la celda anteriormente descrita y el crióstato, otra celda, también de un solo cuerpo, la cual permitió también termostatar la solución de trabajo. En esta celda se produjo la adsorción de la P4 sobre el electrodo. El volumen de operación de esta celda fue de 5 mL.

La celda utilizada para las experiencias de coulometría fue un modelo convencional de vidrio, con una estructura de tres cuerpos, donde en cada cuerpo se ubicaron los distintos tipos de electrodos (Figura 4.2.3). El compartimiento principal fue capaz de alojar un volumen máximo de 20 mL. El brazo lateral es el que alojó al contraelectrodo. El mismo se encontró unido al cuerpo principal por bocas esmeriladas, recubiertas por una cinta de teflón, a fin de evitar pérdidas. La comunicación entre los compartimientos catódico y anódico se encontró separada por un papel de fibra de vidrio que permitió el pasaje de solución, pero retardó la difusión de las especies desde un compartimiento a otro.

La celda tuvo, además, un capilar de Luggin-Haber, en el cual fue colocado el electrodo de referencia de calomel saturado, mediante una trampa que evita, en lo posible, la difusión de agua, KNO_3 o material orgánico proveniente del agar, componentes propios del puente salino del electrodo de calomel saturado, hacia el seno de la solución.

La tapa fue un cabezal maquinado de teflón que se ajustó a presión sobre la boca esmerilada de la celda. La tapa contuvo 4 orificios en los cuales fueron el electrodo de trabajo propio de la experiencia de coulometría, un electrodo de muestreo para las experiencias voltamperométricas, un burbujeador de teflón y por último, un orificio que sirvió como salida del gas circulante.

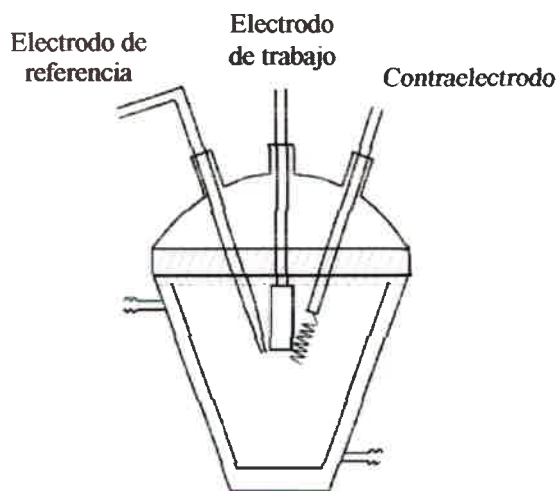


Figura 4.2.2. Esquema de una celda electroquímica de un cuerpo empleada para las experiencias de VOC de redisolución adsortiva.

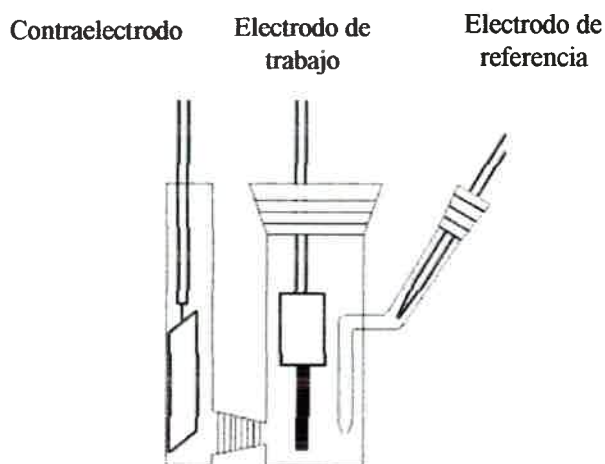


Figura 4.2.3. Esquema de una celda electroquímica de tres cuerpos empleada para las experiencias de coulometría.

Para los ensayos cronoamperométricos realizados en el sistema de análisis de inyección de flujo se utilizó un reactor que opera con un volumen de trabajo de 20 μL , cuyo cuerpo principal fue construido de acrílico, como se ve en la Figura 4.2.4.

En la cámara del reactor, la cual se llenó por el solvente (carrier), se encontró el inmunoreactor rotatorio y el sistema de detección. Como tapa de la cámara se utilizó un electrodo de CV. El reactor rotatorio fue un disco de teflón modificado en su superficie con el anticuerpo monoclonal anti progesterona (ver más adelante), el cual contuvo, en su interior, una barra magnética para llevar a cabo la rotación del disco.

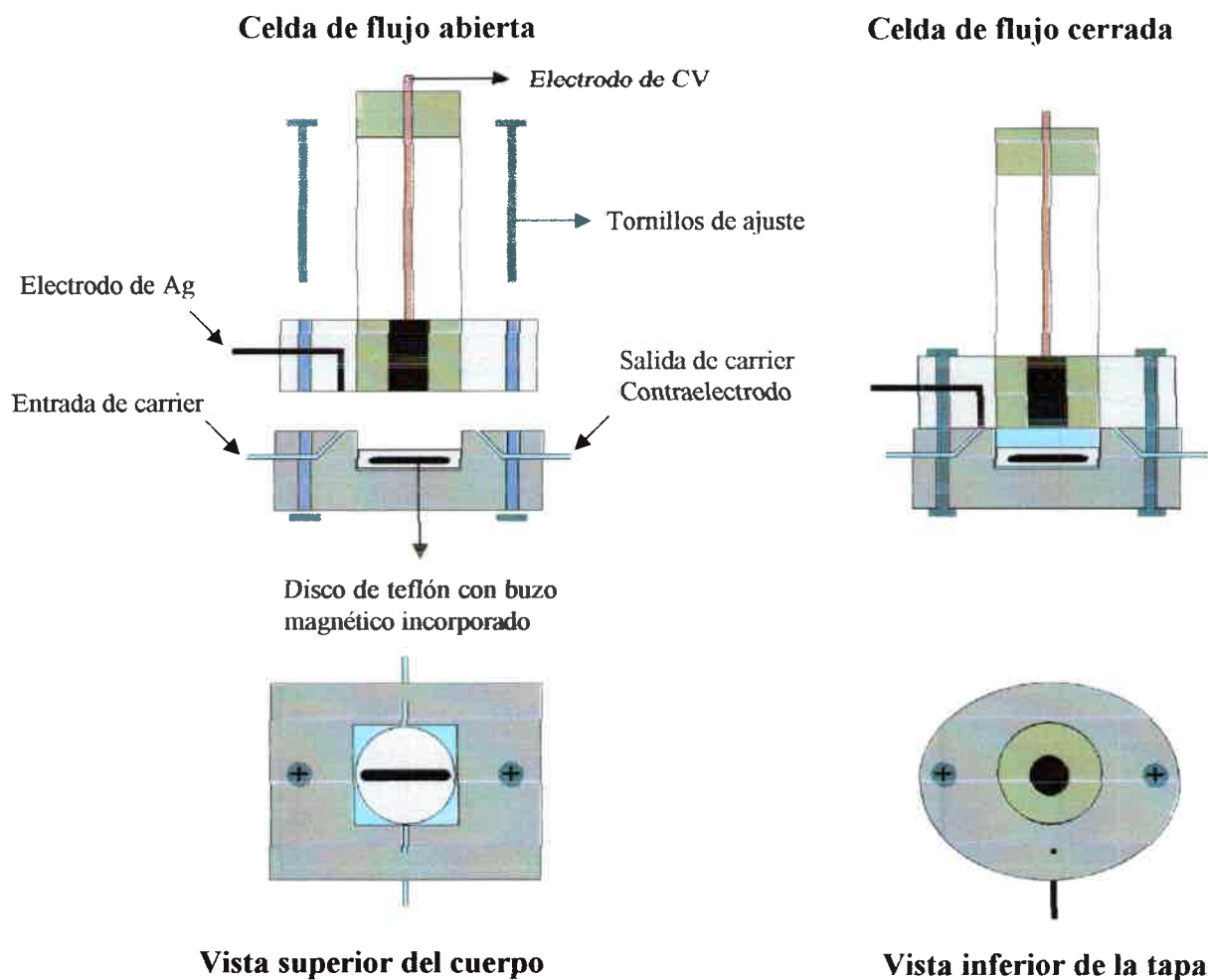


Figura 4.2.4. Esquema del reactor de flujo empleado para las experiencias de cronoamperometría.

La entrada y salida de solución en la cámara se realizó por medio de dos caños de acero inoxidable de pequeño diámetro, de los cuales uno actuó como contraelectrodo. En la tapa de la celda se encontró el electrodo de pseudo-referencia, electrodo de Ag, el cual se ubicó sobre el canal de llenado de la cámara, estando siempre en contacto con la solución.

La tapa de acrílico, la cual contuvo el electrodo de CV y el electrodo de pseudo-referencia, se ajustó al cuerpo de acrílico por medio de dos tornillos, que al presionar, impidió la salida de solución al trabajar bajo condiciones de flujo. En la celda, una vez armada, la superficie del disco modificado con el anticuerpo quedó enfrentada a la superficie del electrodo de CV.

4.3. Reactivos y solventes

4.3.1. Reactivos

La P4 utilizada fue adquirida de Sigma, de alta pureza, la cual no necesitó tratamiento de purificación previo. Se debió mantener a una temperatura inferior de 25 °C y protegida de la luz. El anticuerpo monoclonal antiprogesterona (m-Ab-P4) fue de Sigma y se debió mantener a -4 °C a fin de evitar su descomposición.

Se utilizó progesterona-3-carboximetiloxima (P4-3-CMO) (Sigma-Aldrich), la cual se unió a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma). A fin de realizar la reacción entre P4-3-CMO y HRP se utilizó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (Sigma), y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (Fluka). El glutaraldehído (25 % solución acuosa) y el H₂O₂ fueron adquiridos de Merck. El vidrio de porosidad controlada modificado en su superficie con grupos 3-aminopropil (VPCAP), con un diámetro medio de poro de 1400 Å y un área superficial de 24 m² mg⁻¹, fue obtenido de Electro Nucleonics (Fairfiel, NJ, USA), conteniendo 48,2 μmol gr⁻¹ de grupo amino. El catecol utilizado fue adquirido a BDH Chemicals Ltd. (Poole England). Para seguir la reacción inmunológica en la placa de ELISA, se utilizó ortofenilendiamina (OPD) obtenida de Sigma.

4.3.2. Solventes

El solvente utilizado fue ACN Sintorgan (calidad HPLC) fue utilizado para la determinación del mecanismo de electroreducción de P4 en este medio. Previo a su uso, se lo sometió a un proceso de secado por medio de tamices moleculares. Se colocó un litro de solvente en un recipiente perfectamente limpio, y se agregó aproximadamente 200 gr de tamices moleculares de 3 Å (Merck), previamente tratados. Se cerró el recipiente herméticamente y se dejó el solvente en contacto con los tamices moleculares durante 48 horas antes de su uso. Los tamices moleculares, previamente, se enjuagaron con agua tridestilada y se secaron en la estufa por 72 horas a 300 °C. El solvente así tratado quedó en condiciones para ser utilizado en las mediciones electroquímicas y espectroscópicas.

Para los estudios relacionados a la adsorción de P4 sobre electrodos de carbono vítreo se utilizó una solución formada por 5 % de ACN y 95 % de solución acuosa reguladora de pH = 8.

Las soluciones reguladoras (ver más adelante) fueron preparadas a partir de sus sales en agua calidad HPLC (Sintorgan).

Para la conjugación de P4 con HRP se utilizó dimetilformamida (Aldrich), la cual se trató previamente con tamices moleculares de 4 Å (Merck).

4.3.3. Soluciones

- Solución reguladora de ácido bórico-hidróxido de sodio-ácido clorhídrico de pH = 8, 0,05 M (SBB) (Merck p.a.). No requirió ningún tratamiento previo a su uso.
- Solución reguladora de fosfato de pH = 7, 0,01 M (SBP): se empleó fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) (Merck p.a.) e hidróxido de potasio (Merck p.a.).
- Solución reguladora de citrato-fosfato de pH = 5; 0,01 M (SBC): se preparó a partir de citrato disódico ($Na_2C_6H_6O_7$) (Merck p.a.) y K_2HPO_4 .
- Solución reguladora de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)-citrato de sodio de pH = 2; 0,05 M.

La SBP 0,01 M de pH = 7 se empleó en el momento de llevar a cabo la reacción inmune. El valor de pH y de fuerza iónica son los recomendados por Sigma. Trabajar a valores de fuerza iónica más alta puede demorar la interacción antígeno-anticuerpo, sabida que la interacción depende de fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, etc. La misma disminución en la velocidad de interacción puede aparecer trabajando a valores de pH alejados de 7. La SBC 0,01 M de pH = 5 se empleó a la hora de realizar la reacción enzimática. La máxima velocidad de reacción enzimática se alcanza para un valor de pH = 5 [82]. El efecto de la fuerza iónica es el mismo que el comentado para la interacción antígeno-anticuerpo.

A la hora de romper el complejo antígeno-anticuerpo se empleó SBC 0,05 M de pH = 2. Es decir, se aumentó bruscamente la fuerza iónica y se disminuyó significativamente el valor del pH.

Para ajustar los valores de pH se emplearon soluciones de ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH). Ambos fueron comerciales, de marca Merck p.a..

4.3.4. Electrolitos soporte

En las experiencias electroquímicas en ACN se utilizó hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (HTBA), Fluka de grado electroquímico, como electrolito soporte. El HTBA se secó previo a su uso. Para ello se lo llevó a una estufa de vacío a 25 °C por 24 horas, a fin de extraer la mayor cantidad de agua ocluida. Luego se elevó gradualmente la temperatura hasta alcanzar 50 °C, la que se mantuvo constante durante otras 24 horas. El HTBA seco se conservó en desecador con gel de sílice anhidro en vacío permanente.

En las experiencias de VOC de redisolución adsortiva, la solución reguladora de ácido bórico-hidróxido de sodio-ácido clorhídrico de pH = 8 se empleó como electrolito soporte.

Para las experiencias cronoamperométricas en la celda de flujo, como electrolito soporte se empleó la solución reguladora de citrato-fosfato (SBC) de pH = 5.

4.4. Técnicas electroquímicas y equipamientos

Las técnicas electroquímicas empleadas en este trabajo de tesis fueron:

- 1- Voltamperometría cíclica (VC)
- 2- Voltamperometría de onda cuadrada (VOC)
- 3- Voltamperometría de onda cuadrada de redisolución adsortiva (VOCRA)
- 4- Cronoamperometría (CA)
- 5- Electrólisis a potencial controlado (EPC)

Para las experiencias de VC, VOC y EPC se emplearon los potenciostatos AUTOLAB PGSTAT30, AUTOLAB PGSTAT12, ambos acoplados a una PC, con software's electroquímicos incorporados.

Para los ensayos de cronoamperometría en el sistema de inyección de flujo se utilizó un potenciostato BAS CV27, el cual no posee la interfaz para conectar una PC. La lectura de corriente se realizó en la ventana digital del mismo equipo.

Se realizaron ensayos de espectroscopía UV-visible. Para ello se empleó un espectrofotómetro UV-visible, Hewlett Parckard, modelo HP8453. Las celdas empleadas fueron de cuarzo y tuvieron un camino óptico de 0,1 y 1 cm. Estos ensayos

fueron realizados con el objetivo de caracterizar la P4, como así también el producto de electrólisis de la misma. Asimismo, también se lo empleó para la caracterización de la enzima HRP. Para la lectura de los productos obtenidos en las placas de ELISA se utilizó una placa comercial de 96 posillos.

A fin de termostatar las soluciones de trabajo, se empleó un crióstato Cole-Palmer.

La agitación del inmunoreactor de teflón se realizó por medio de un agitador magnético (Metrohm E649 de Metrohm AG, Herisau, Switzerland).

Para el sistema de inyección de flujo se utilizó una bomba peristáltica Gilson Minipuls 3 peristaltic pump, Gilson Electronics, Middleton, WI, USA. Los tubos utilizados por la bomba para llevar la solución desde el reservorio hasta el inmunoreactor fueron Tygon, (Fisher Accu-Rated, 1 mm de diámetro interno, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA). El resto de los tubos empleados fueron de teflón, de 1 mm de diámetro interno, Cole-Parmer, Chicago, IL, USA. Para inyectar la muestra se utilizó una bomba BAS Beehive, modelo MD-1020, acoplada a una microjeringa de 2,5 mL, BAS, modelo MD-1001, Bioanalytical System Inc, USA. De esta manera, por medio de la bomba y la microjeringa se introduce la muestra al inmunoreactor sin la necesidad de emplear un inyector multicanal, sino mediante el empleo de una conexión de acero inoxidable en forma de T.

El procesamiento y análisis de datos se llevó a cabo mediante el empleo del software Origin 7.0.

Las simulaciones y ajustes de los voltamperogramas cíclicos se realizaron utilizando el software BAS DigiSim® 2.1.

CAPITULO 5

5. Resultados y discusión

5.1. Introducción

En este capítulo se muestran los resultados experimentales obtenidos de la electroreducción de P4 sobre electrodos de carbono vítreo en ACN con HTBA 0,1 M como electrolito soporte y su análisis. Por otro lado, se describe el fenómeno de adsorción de P4 sobre electrodos de carbono vítreo en solución de 5 % ACN y 95 % de solución acuosa reguladora de pH = 8. Por último, se describe el desarrollo de un inmunosensor capaz de determinar P4 en muestras de suero.

5.1.1. Elucidación del mecanismo de electroreducción de P4 en ACN

La elección de este solvente se basó, fundamentalmente, en la solubilidad que tuvo la P4 y en la estabilidad relativa que tuvo la especie electrogenerada.

5.1.1.1. Voltamperometría cíclica

En la Figura 5.1.1 se muestra un voltamperograma cíclico de una solución de P4 de concentración $1,00 \times 10^{-3}$ M realizado a una velocidad de barrido $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, empleando un electrodo de CV como electrodo de trabajo. Tomando como potencial de partida $E = -1,8 \text{ V}$, el hemiciclo inicial (catódico) mostró un único pico bien definido con un $E_p = -2,33 \text{ V vs ECS}$. Este pico se correspondió con la generación, en la superficie del electrodo de CV, de un anión radical debido a la reducción del carbonilo conjugado situado en el anillo A [19]. Cuando se invirtió el barrido (hemiciclo posterior), con un potencial de inversión de $E_i = -2,42 \text{ V}$, no se observó ningún pico de oxidación en este intervalo de potencial y a esta ν , contrariamente a lo que se esperaría para una cupla redox reversible al invertir la dirección del barrido de potencial [84].

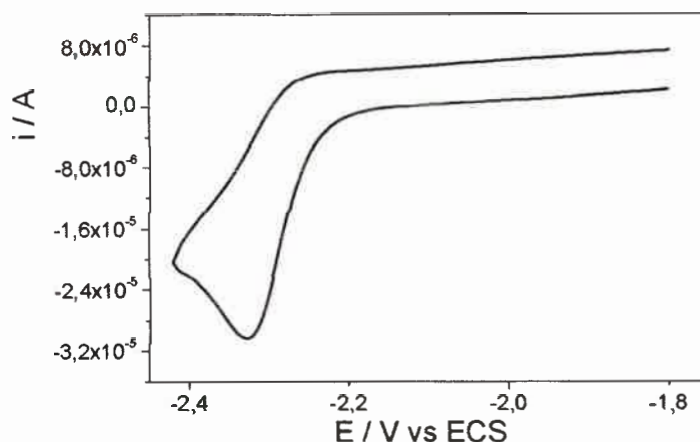


Figura 5.1.1. Voltamperograma cíclico de P4 a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $c_{P4} = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Como se puede inferir del voltamperograma, la electroreducción de P4 posee un mecanismo complejo involucrado en el proceso de electrodo. El pico de reducción de P4 fue reproducible y muy estable.

También se realizaron voltamperogramas cíclicos con una ventana mayor de barrido de potencial, abarcando desde $E = 1,5 \text{ V}$, con un potencial de inversión de $E = -2,45 \text{ V}$, retornando al valor de partida. No se encontró ningún otro pico que el mostrado en la figura anterior. En todo el intervalo de concentraciones utilizado, el comportamiento fue el mismo. Para ciclos sucesivos con idénticos valores de potencial de partida e inversión, solo se mantuvo el pico de reducción correspondiente a P4 sin la aparición de otros de picos.

Para conocer las características del proceso de electrodo, se realizó un estudio con v , encontrándose una relación lineal entre la $i_{p,c}$ en función de $v^{1/2}$ para diferentes concentraciones de P4, en un intervalo de velocidades de barrido bajas (desde $0,025 \text{ V s}^{-1}$ hasta $0,4 \text{ V s}^{-1}$) (Figura 5.1.2). La linealidad entre $i_{p,c}$ con $v^{1/2}$ puso en evidencia un control difusional para el proceso de electrodo [84].

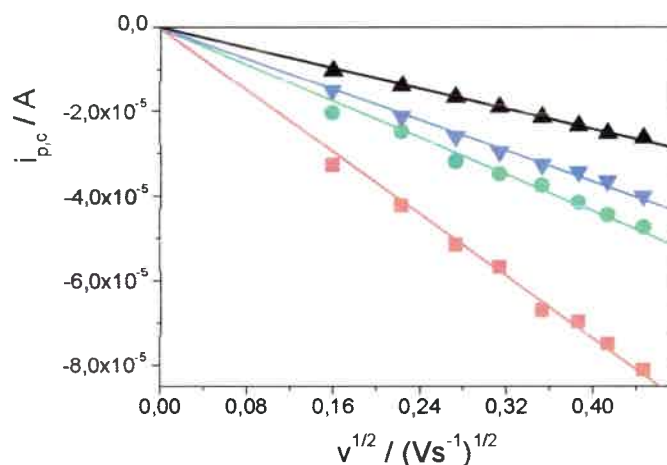


Figura 5.1.2. Dependencia de $i_{p,c}$ con $v^{1/2}$. c_{P4}^* (\blacksquare) = $3,70 \times 10^{-3} \text{ M}$, (\bullet) = $1,80 \times 10^{-3} \text{ M}$, (\blacktriangledown) = $1,05 \times 10^{-3} \text{ M}$, (\blacktriangle) = $8,01 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Para v más grandes que $0,4 \text{ V s}^{-1}$, la recta de $i_{p,c}$ con $v^{1/2}$ se desvía de la linealidad, haciéndose cóncava.

A $v = 0,2 \text{ V s}^{-1}$ comenzó a insinuarse, en el barrido anódico, una onda correspondiente a la oxidación del producto electrogenerado en la reducción de P4. Se varió v entre $0,15 \text{ V s}^{-1}$ y 5 V s^{-1} y el sistema se comenzó a comportar como cuasi-reversible (Figura 5.1.3). Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados para P4 en DMF [23,24].

La altura del pico anódico disminuyó con la disminución de la velocidad de barrido indicando la pérdida del anión radical electrogenerado por una reacción química posterior a la transferencia de carga. Se pueden aplicar distintos criterios de diagnóstico a fin de aproximarse al tipo de mecanismo de reacción de electrodo que tiene el sistema. Por ejemplo, para procesos catódicos, la relación de corriente de pico anódico a corriente de pico catódico ($i_{p,a}/i_{p,c}$) es la unidad para procesos de electrodo reversibles. Generalmente, dicha relación se aparta de la unidad, siendo el cociente menor a uno, ante la existencia de procesos químicos homogéneos acoplados a la transferencia de carga [95]. La relación $i_{p,a}/i_{p,c}$ se incrementó conforme la velocidad de barrido aumentaba, alcanzando valores cercanos a la unidad para $v > 4 \text{ Vs}^{-1}$ (Figura 5.1.4), lo que demostró que la reacción homogénea acoplada a la transferencia de carga tuvo una

constante de velocidad que pudo ser determinada en el intervalo de tiempo empleado en las distintas experiencias. Tal tendencia se alcanzó más rápidamente cuando la solución de P4 fue más diluida. Estos resultados estuvieron de acuerdo con lo predicho por la teoría para un mecanismo con una transferencia electrónica inicial (E) seguida por una reacción química homogénea, donde E representa una reacción de transferencia electrónica heterogénea reversible o cuasi-reversible.

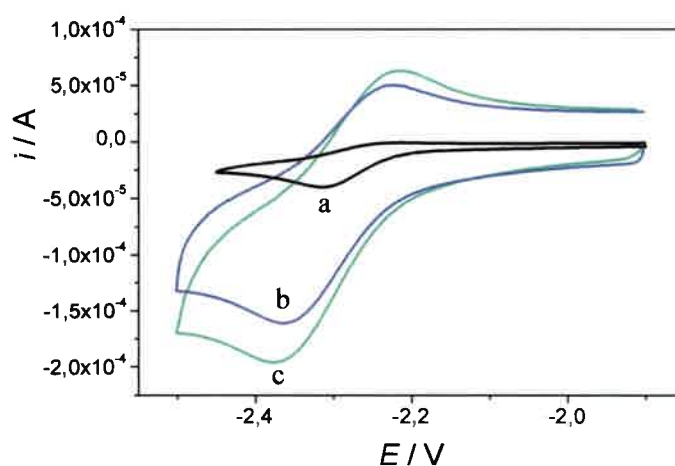


Figura 5.1.3. Voltamperogramas cíclicos de P4 a distintas v ($V s^{-1}$): a) 0,2; b) 3 y c) 5. $c_{P4}^* = 5,02 \times 10^{-4}$ M.

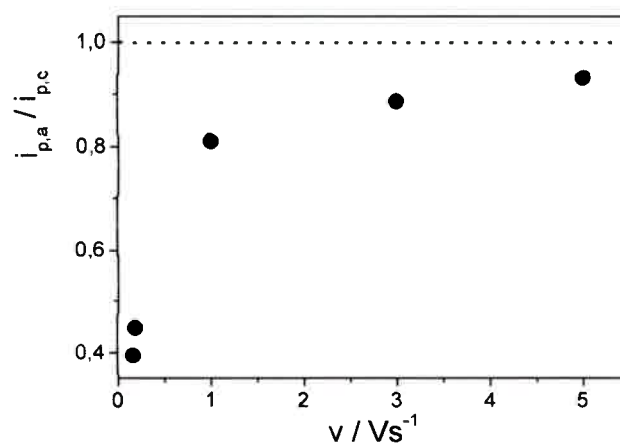


Figura 5.1.4. Variación de la relación $i_{p,a}/i_{p,c}$ con v . $c_{P4}^* = 5,02 \times 10^{-4}$ M.

A altas ν , donde la $i_{p,a}$ se aproxima a la $i_{p,c}$, se espera que la diferencia de los potenciales de pico (ΔE_p), para un proceso reversible tienda a $0,059/n$ V [84]. Experimentalmente, aún con compensación por caída ohmica, se encontró que el ΔE_p es mayor al valor teórico predicho para una transferencia reversible. La diferencia entre los potenciales de ΔE_p aumentó con el incremento de ν (Figura 5.1.5), como predice la teoría para una transferencia electrónica heterogénea cuasi-reversible [94].

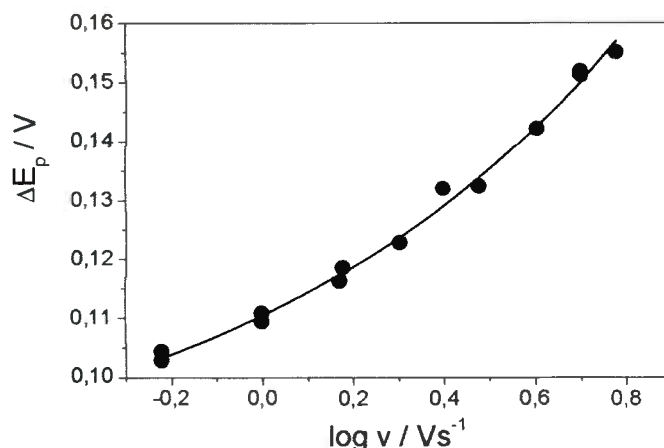


Figura 5.1.5. Dependencia de la diferencia entre el potencial de pico catódico y el potencial de pico anódico (ΔE_p) sobre la ν . $c_{P4}^* = 1,00 \times 10^{-3}$ M. Datos experimentales (\bullet) y ajuste de los datos experimentales (\longrightarrow) a través de la ecuación $\Delta E_p = 0,03135 \exp(\log \nu / 0,8557) + 0,07905$.

De la variación de ΔE_p con $\log \nu$ se calculó la constante de velocidad formal heterogénea (k_f^0) usando el formalismo de Nicholson [94] a través de:

$$\ln \psi = 1,4129 \ln \left[\frac{(\Delta E_p - 54,8259)}{31,0342} \right] \quad (5.1.1)$$

donde ψ es la función corriente y $k_f^0 = \psi [\pi (nF/RT) \nu D_{P4}]^{1/2}$. Para cinco valores de ΔE_p (entre 0,110 y 0,150 V) obtenidos para distintas ν y siendo $D_{P4} = (1,70 \pm 0,05) \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (ver más adelante), se obtuvo un valor promedio de $k_f^0 = (0,021 \pm 0,003) \text{ cm} \text{ s}^{-1}$, siendo este un valor típico para una reacción heterogénea cuasi-reversible [84].

Por otro lado, se encontró una variación de la diferencia entre el potencial de pico y el potencial de medio pico ($E_{p/2} - E_p$). Así, ($E_{p/2} - E_p$) varió en el intervalo de 0,049 a 0,060 V para bajas ν (0,025 hasta 0,4 V s⁻¹) y altas ν (superiores a 5 V s⁻¹) respectivamente.

Sobre la base de estos resultados, se pudo predecir que el mecanismo de electroreducción de P4 consistió en una reacción de transferencia electrónica heterogénea cuasi-reversible seguida por una reacción química homogénea relativamente lenta, la cual involucraría al anión radical generado en la reducción heterogénea de P4, cuyo producto participaría en una segunda reacción de transferencia de electrones heterogénea (interpretada por medio de la desviación de la linealidad de la curva i_p vs $\nu^{1/2}$), como se demostrará más adelante. Tal es lo esperado para moléculas con grupos carbonilo presentes en su estructura [26].

5.1.1.2. Voltamperometría de convolución

Cuando existe una reacción homogénea posterior a la transferencia de carga, en donde el producto de la reacción heterogénea (por ejemplo, un anión radical) participa en la reacción homogénea, el perfil de $I(t)$ para el barrido inverso no será el mismo que para un simple mecanismo reversible. Para este caso, el camino de la $I(t)$ del proceso inverso no se superpuso al de $I(t)$ del proceso directo y no volvió al origen debido al consumo del anión radical electrogenerado. El observar estos perfiles de corriente convolucionada, sirvió para afirmar la existencia de complicaciones cinéticas posteriores a la transferencia de carga [84,96]. En la Figura 5.1.6 se muestran un voltamperograma cíclico para la reducción de la P4 con su correspondiente voltamperograma convolucionado. Del mismo, una vez realizada la sustracción de la corriente de blanco, se infirió que la $I(t)$ no retorna a cero por el camino de ida cuando el barrido de vuelta ha finalizado. Este comportamiento indicó que el producto de la etapa de reducción es consumido por una reacción química homogénea acoplada a la reacción de transferencia electrónica inicial [84,96]. Experimentalmente se encontró que los voltamperogramas cíclicos convolucionados a partir de voltamperogramas cíclicos realizados a $\nu > 1$ V s⁻¹, en donde existe una competencia directa entre el tiempo de la

experiencia y la velocidad de reacción homogénea, la corriente convolucionada para el barrido inverso se aproximó a la corriente convolucionada para el barrido directo.

Se realizó un análisis de E vs $f(I(t))$ para distintos mecanismos de reacción heterogénea en donde, la mejor regresión lineal de los datos experimentales se obtuvo empleando la ecuación para un mecanismo ECE (electroquímico-químico-electroquímico) (ecuación 3.11.20). El gráfico de E vs $f(I(t))$ fue lineal (Figura 5.1.7), encontrándose un valor de pendiente promedio de $(0,057 \pm 0,002)$ V/década, valor cercano al predicho por la teoría para un mecanismo ECE para una transferencia monoelectrónica de $0,0591$ V/década a 25 °C [96] (ver Capítulo 3, Sección 11.2).

Cabe aclarar que la misma pendiente teórica está también establecida para otros mecanismos de reacción con complicaciones cinéticas posteriores a la etapa de transferencia heterogénea de electrones [96]. Es por ello que el resultado obtenido del análisis logarítmico realizado para los voltamperogramas cíclicos convolucionados es solo indicativo y de carácter semi-cuantitativo.

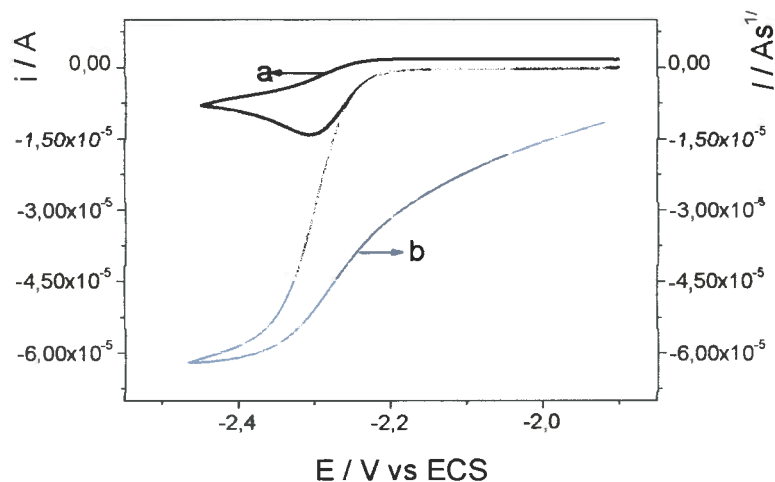


Figura 5.1.6. a) Voltamperograma cíclico de P4 a $v = 0,025$ $V s^{-1}$, $c_{P4}^* = 1,00 \times 10^{-3}$ M; b) Voltamperograma (a) convolucionado.

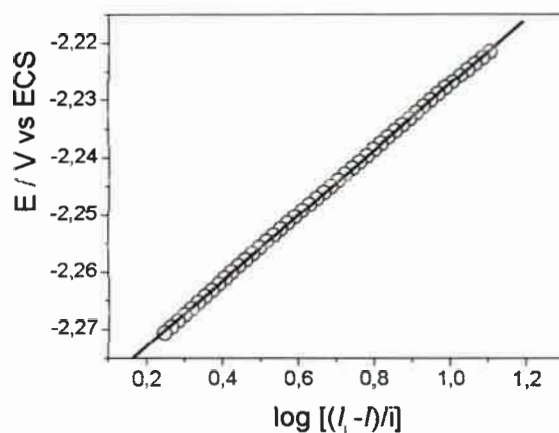


Figura 5.1.7. Relación entre E y $\log \{(I_L - I)/i\}$. $c_{P4}^* = 1,00 \times 10^{-3} M$. $V = 0,05 V s^{-1}$. Pendiente: $0,057 \pm 0,002 V/decada$. $r = 0,999$.

A partir de la ecuación 3.11.21 obtenida para un mecanismo ECE, bajo control cinético puro, conociendo el valor de I_L , fue posible determinar el coeficiente de difusión de P4 (D_{P4}). En este caso, asumiendo un $n = 1$, se determinó tentativamente D_{P4} , obteniéndose un valor promedio de $D_{P4} = (1,70 \pm 0,05) \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$. La suposición de $n = 1$ se basó en los datos bibliográficos obtenidos [23,24].

Para el caso en que el número de electrones de la transferencia electrónica es desconocido, existe una alternativa, la cual es un método aproximado, para la determinación del D es independiente de n . Este método está basado en la combinación de los datos para dos moléculas a través de la ecuación de Einstein-Stokes [110]. Es decir, se basa en la comparación de la molécula en estudio frente a una molécula cuyo D se encuentre perfectamente establecido para el medio de reacción de trabajo, asumiendo que ambas moléculas solvatadas son esféricas en el medio de reacción y que los radios de las moléculas solvatadas son proporcionales a sus respectivos pesos moleculares (pm). Es bien conocido que el ferroceno (Fc), en medio no acuoso, sufre una reacción heterogénea de oxidación monoelectrónica [111] y que, en solución ACN + 0,1 M de $NaClO_4$ su coeficiente de difusión (D_{Fc}) es $2,32 \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$ [108]. Combinando la ecuación de Einstein-Stokes para cada molécula se tiene:

$$D_{P4}(pm_{P4}) = D_{Fc}(pm_{Fc}) \quad (5.1.2)$$

de donde se obtuvo un $D_{P4} = 1,44 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, que concuerda de buena manera con el valor obtenido desde los voltamperogramas cíclicos convolucionados. Este resultado afirma que la suposición de $n = 1$ realizada para el cálculo de D_{P4} por voltamperometría de convolución fue correcto.

5.1.1.3. Electrólisis a potencial controlado

Esta experiencia se realizó en una celda de tres cuerpos, como la que se describió en la Figura 4.2.3. La relación área/volumen fue de aproximadamente $5,6 \text{ cm}^{-1}$ (área del electrodo de trabajo y volumen de solución a electrolizar).

Se electrolizó una solución de P4 de $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$, preparada en ACN + 0,1 M HTBA a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo una atmósfera de Argón. Al electrodo de trabajo se le aplicó un potencial $0,06 \text{ V}$ más catódico que el E_p , a fin de tener la seguridad de estar en condiciones de corriente límite.

En la Figura 5.1.8 se muestra la respuesta típica del sistema, una vez restada la contribución de la corriente de blanco. Como se puede apreciar, en ningún momento se alcanzó un valor de corriente correspondiente al 3-1 % del valor inicial, sino que el valor de corriente constante se correspondió aproximadamente a 11 % del valor de corriente inicial.

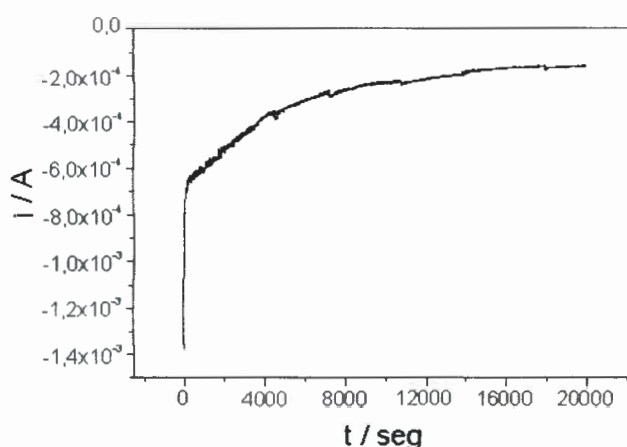


Figura 5.1.8. Perfil corriente-tiempo para la coulometría a potencial controlado. $E_{aplicado} = -2,400 \text{ V vs ECS}$. $c_{P4} = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$.

A medida que la electrólisis se llevó a cabo, la solución fue cambiando de color, desde incoloro a amarillo, llegando al final de la electrólisis a un color amarillo-anaranjado. Durante el transcurso de la electrólisis se realizaron experiencias de VC y espectroscopía de absorción UV-visible. Para las experiencias espectrofotométricas se realizaron, durante el transcurso de la electrólisis, pequeños muestreos de solución a fin de ver la existencia o no de alguna especie electrogenerada responsable del cambio de color, como producto de reacción en el medio de electrólisis. Los ensayos de espectrofotometría UV-visible se realizaron inmediatamente después de la toma de la muestra, en ausencia de oxígeno, debido a que la exposición de la muestra al oxígeno por períodos de tiempo cortos (minutos) produjo la desaparición del producto de electrólisis. Los voltamperogramas cíclicos se realizaron en la misma solución mediante un electrodo de CV.

La P4, en ACN, tiene la propiedad de absorber radiación electromagnética a 237 nm. Se realizó un gráfico de absorbancia en función de la concentración de P4, y se encontró que el sistema cumple con la ley de Lambert y Beer (Figura 5.1.9).

Experimentalmente se obtuvo un coeficiente de extinción molar (ϵ^{237}) de $17185 \pm 190 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [53]. Este valor es un promedio de 3 determinaciones. Se halló, por esta técnica, un límite de detección (I_d) = $5,50 \times 10^{-6} \text{ M}$ en una solución pura de P4.

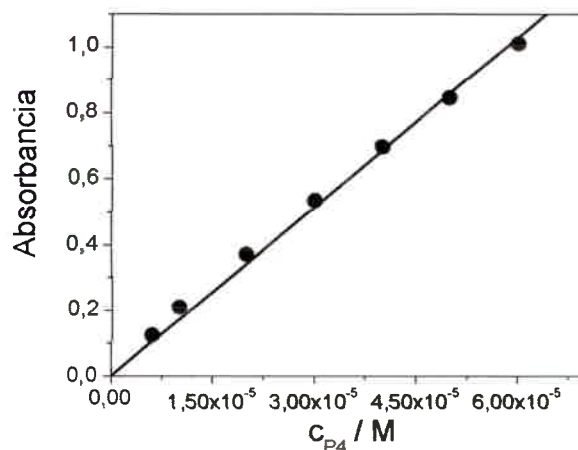


Figura 5.1.9. Absorbancia en función de c_{P4} . Técnica: espectrofotometría UV-Visible. Pendiente: 17185 M^{-1} . $r = 0,999$.

En la Figura 5.1.10 se muestran los distintos voltamperogramas de muestreo realizados durante la electrólisis. Como se puede apreciar, durante el transcurso de la electrólisis, se produjo la desaparición paulatina del pico de reducción de P4 hasta su total desaparición al final de la misma. Asimismo, con el avance de la experiencia comenzaron a aparecer tres picos de oxidación (I, II y III), con potenciales de oxidación $E_I = 0,060$ V, $E_{II} = 0,600$ V y $E_{III} = 1,255$ V, los cuales fueron muy inestables frente a la presencia de aire.

En la Figura 5.1.11 se muestran los espectros UV-visible correspondientes al avance de la electrólisis. A fin de no alterar el volumen de solución a electrolizar, se tomaron alícuotas del orden de los μL , lo que explica los bajos valores de absorbancia y la pérdida de resolución para tiempos superiores de electrólisis. Se puede apreciar que el pico de absorción de P4 disminuyó a medida que avanzó el tiempo de electrólisis en forma armónica con lo observado por las experiencias de VC. Los espectros se realizaron en un intervalo de longitud de onda (λ) de 200 nm a 800 nm. Para el intervalo comprendido entre 400 nm y 800 nm no apareció ningún pico o banda de absorción.

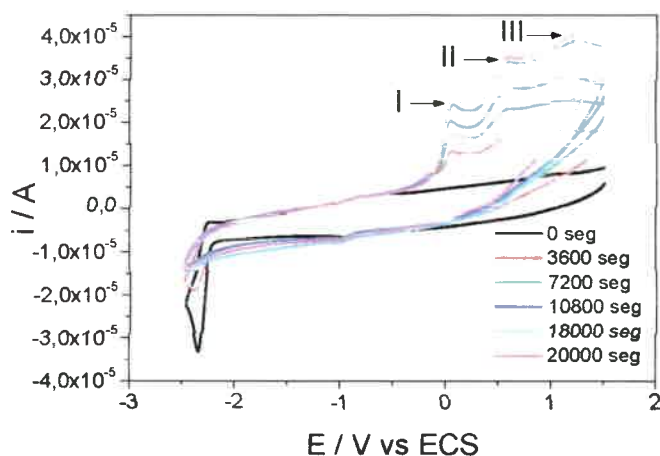


Figura 5.1.10. Voltamperogramas cíclicos de muestreo a distintos tiempos durante la electrólisis. $v = 0,1$ V s^{-1} . $C_{P4\text{inicial}} = 1,00 \times 10^{-3}$ M.

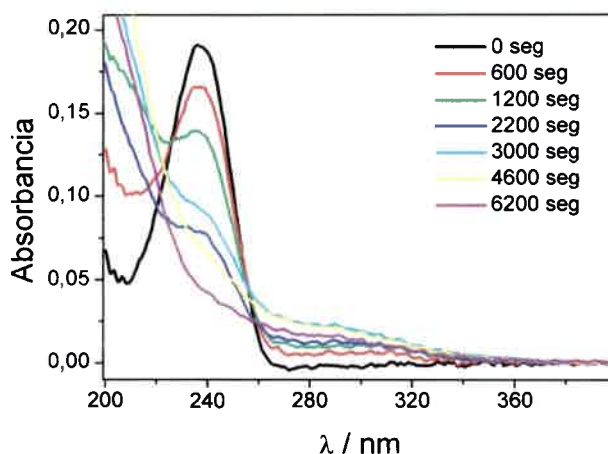


Figura 5.1.11. Espectros de absorción UV-visible a distintos tiempos durante la electrólisis. $C_{P4 \text{ inicial}} = 1,12 \times 10^{-5} M$.

Contrario a lo que se esperaba por la aparición del color amarillo-anaranjado, no se produjo la aparición de una banda de absorción definida con la consecuente desaparición de P4 de la solución electrolizada, aunque si fue evidente el aumento de absorbancia con el tiempo de electrólisis en la zona comprendida entre 270 y 330 nm. Los cambios observados en los espectros UV-visible a lo largo de la electrólisis fueron indicadores de que el/los producto/s del proceso de reducción fueron inestables bajo las condiciones experimentales estudiadas en el tiempo de escala de la coulometría.

Por otro lado, se realizaron experiencias de Espectroscopía Infrarroja para el producto de la reacción de reducción, las cuales no arrojaron ningún resultado, probablemente debido a la gran inestabilidad del producto de reacción.

El cálculo del número aparente de electrones (n_{ap}) se realizó considerando que el sistema no es simple, que posee complicaciones cinéticas posteriores a la transferencia de carga y recordando que esta técnica sólo permite la detección de complicaciones cinéticas lentas.

El n_{ap} se calculó de dos maneras diferentes:

- integrando el perfil $i-t$ completo.
- determinándolo a partir de tiempos cortos de electrolisis.

Para obtener la carga total de electrólisis, se integró el perfil $i-t$ una vez restada la contribución de la corriente de blanco. Como la $c_{P_4}^*$ es perfectamente conocida, se obtuvo la carga y se calculó n_{ap} por medio de la ecuación 3.11.24 [84]. El valor obtenido (2,75) fue mayor al esperado. Este valor de n_{ap} , mayor al esperado, podría deberse a la reducción de otros productos generados en el medio de reacción durante la electrólisis. Es por ello que el cálculo del n_{ap} se realizó a tiempos cortos de electrólisis. Cabe esperar que a tiempos cortos de electrólisis se encuentren diferencias con lo observado a largos tiempos de reacción, comprobado con sistemas similares [112].

Para determinar el n_{ap} a tiempos cortos de electrólisis se utilizó un modelo simple cuyas ecuaciones fundamentales son:

$$i(t) = i_0 \exp(-p_0 t) \quad (5.1.3)$$

$$Q(t) = Q^0 (1 - e^{-p_0 t}) \quad (5.1.4)$$

donde i_0 es la corriente a $t = 0$, Q^0 es la carga consumida durante la electrólisis, p_0 es un parámetro análogo a una constante de pseudo-primer orden definida como $p_0 = m_0 A/V$, siendo m_0 el coeficiente de transferencia de masa, A el área del electrodo y V el volumen de solución [84].

A tiempos cortos, haciendo un desarrollo en serie y considerando solo el primer término de la misma, la ecuación 5.1.4 se transforma en:

$$\ln Q(t) = \ln Q^0 + \ln p_0 + \ln t \quad (5.1.5)$$

Así, n_{ap} se calculó a partir de la combinación de la ordenada al origen y la pendiente de gráficos lineales de $\ln Q(t)$ vs $\ln t$ y $\ln i(t)$ vs t , respectivamente.

A tiempos menores de 100 segundos, el valor encontrado para el número de electrones intercambiados por moléculas de sustrato electrolizado (n_{ap}) fue de $0,89 \pm 0,09$, valor que se aproxima a la unidad. Este valor estuvo muy de acuerdo con aquel determinado primeramente por técnicas dinámicas [23,24] y da sustento adicional al valor utilizado ($n = 1$) en el cálculo de D_{P_4} realizado en el Capítulo 5, Sección 1.1.2. Por otra parte, el valor encontrado para p_0 fue de $0,00158 \text{ s}^{-1}$.

Una vez electrolizada completamente P4, se realizó una nueva electrólisis, a un potencial de 0,06 V más anódico que el potencial de los picos I, II y III. Los muestreos sucesivos durante la electrólisis por VC no arrojaron indicios de la regeneración de P4. Por otra parte, se observó una disminución del color amarillo-anaranjado de la solución a medida que avanzaba la electrólisis produciéndose la disminución de los picos citados.

5.1.1.4. Voltamperometría de onda cuadrada

En este trabajo, la VOC fue empleada con fines analíticos como así también como herramienta complementaria de la VC para dilucidar el posible mecanismo de electroreducción de P4 en ACN sobre electrodos de carbono vítreo.

En la Figura 5.1.12 se muestra un voltamperograma de onda cuadrada para una $c_{P4}^* = 1,50 \times 10^{-4}$ M. Como se puede apreciar en la Figura 5.1.12, i_n presentó una gran corriente en comparación con i_d . Esto fue debido a que la corriente neta, i_n , (corriente diferencial) contiuvo la contribución de la corriente de oxidación del anión radical electrogenerado (i_i).

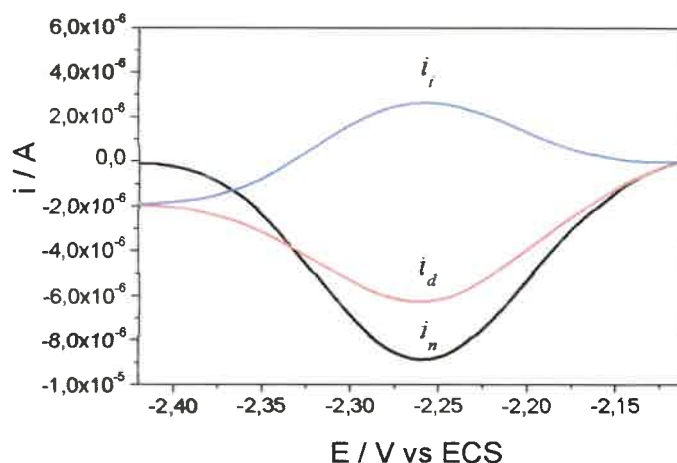


Figura 5.1.12. Voltamperograma de onda cuadrada donde se muestran las corrientes directa (i_d), inversa (i_i) y neta (i_n). $f = 10$ Hz, $\Delta E_b = 5$ mV, $\Delta E_{OC} = 25$ mV. $c_{P4}^* = 1,50 \times 10^{-4}$ M.

A tan pequeños valores de frecuencia, como de $f = 10$ Hz, se obtuvo un gran valor de corriente de oxidación correspondiente a la oxidación del producto de la

electroreducción de P4. Este valor de frecuencia se corresponde a una velocidad de barrido de potencial de $0,050 \text{ V s}^{-1}$. Por VC, tal lo indicado anteriormente, para apreciar el pico de oxidación del producto de reducción de P4 se necesitaron altas ν . Pero por VOC, en un ciclo de potencial, la corriente se muestrea dos veces, un muestreo corresponde a la corriente de reducción de P4 y el otro muestreo corresponde a la corriente de oxidación de su producto de reducción, debido a que no existe remoción de la capa de difusión y no hay tiempo suficiente para que la especie difunda completamente hacia el seno de la solución, por lo tanto, es de esperar la aparición del pico de oxidación a menores velocidades de barrido [102].

El comportamiento difusional encontrado por VC fue observado igualmente por VOC, en donde la relación entre la $i_{p,n}$ (corriente de pico neta) y $f^{1/2}$ fue lineal (Figura 5.1.13). A fin de elegir las condiciones óptimas de ΔE_b y ΔE_{OC} , se realizó un estudio variando cada uno de ellos por separado a una concentración de P4 constante. Para ΔE_b , se encontró un aumento lineal de la $i_{p,n}$ con el incremento de ΔE_b (no se muestra Figura). El aumento indiscriminado de ΔE_b llevó a una ganancia de la función corriente, pero se perdió resolución en el voltamperograma debido a que el número de muestreos de corriente en el barrido de potencial fue cada vez menor [98]. Por lo tanto, se trabajó con un valor de $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$.

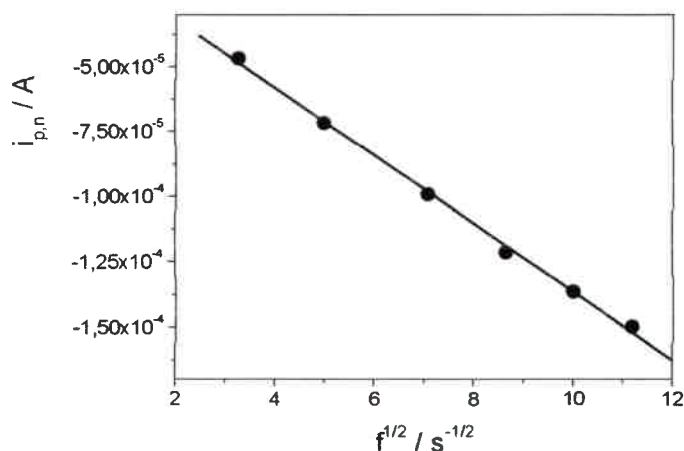


Figura 5.1.13. Variación de $i_{p,n}$ con $f^{1/2}$. $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$. $\Delta E_{OC} = 25 \text{ mV}$. $c_{P4}^* = 1,02 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Se sabe que para valores crecientes de ΔE_{OC} se produce un incremento de la función corriente, pero también conlleva un aumento del ancho del pico (W) que, cuando se trata de experiencias analíticas, es un inconveniente por posible pérdida de resolución en la identificación de componentes. Se llevó a cabo un estudio con ΔE_{OC} , tal como se muestra en la Figura 5.1.14, en donde se puede apreciar un aumento de la $i_{p,n}$ con el incremento de ΔE_{OC} hasta valores de 50 mV, para luego disminuir lentamente. Estos resultados encontrados se corresponden a lo predicho por la teoría para una reacción de electrodo en donde interviene sólo 1 electrón en el proceso de transferencia de carga [98,102]. En realidad, en este caso, en donde existen complicaciones cinéticas posteriores a la transferencia de carga, dada la forma de muestreo de la corriente por VOC, solamente se observó la reacción heterogénea, ya que la velocidad de la experiencia fue menor a la velocidad de la reacción homogénea posterior a la transferencia de carga. Por lo tanto, se eligió trabajar con $\Delta E_{OC} = 25$ mV.

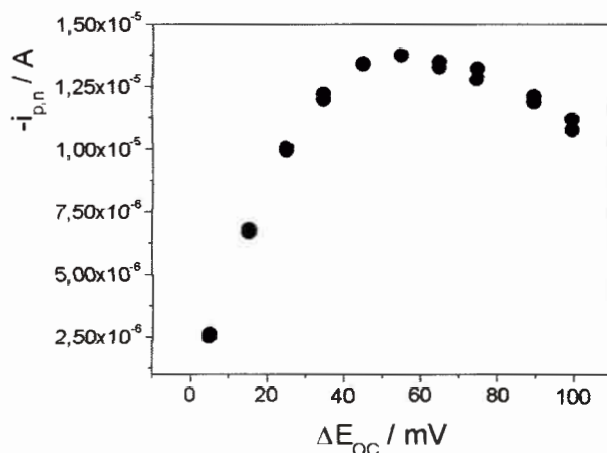


Figura 5.1.14. Variación de $i_{p,n}$ con ΔE_{OC} . $f = 100$ Hz, $\Delta E_b = 5$ mV. $c_{P4}^* = 1,00 \times 10^{-4}$ M. Estudio realizado por duplicado.

Estos valores de ΔE_{OC} y ΔE_b elegidos estuvieron de acuerdo a una situación de compromiso entre sensibilidad y resolución.

Para mecanismos de reacción de electrodo con complicaciones cinéticas posteriores a la transferencia de carga, teóricamente se predice una disminución de la

función corriente en función del aumento de la f [113]. La variación experimental de $(i_{p,n})/f^{1/2}$ en función de $f^{1/2}$, se muestra en la Figura 5.1.15 para el proceso de electrodo.

Este comportamiento estuvo en buen acuerdo con la variación teórica predicha para un mecanismo del tipo EC [106]. Sin embargo, la mayoría de las reacciones electroquímicas para reactantes orgánicos usualmente toman lugar a través de mecanismos que involucran más de una reacción química acoplada y/o transferencia de carga, es decir, mecanismos tipos ECC, ECE, EEC, ECEC, etc. [26,114].

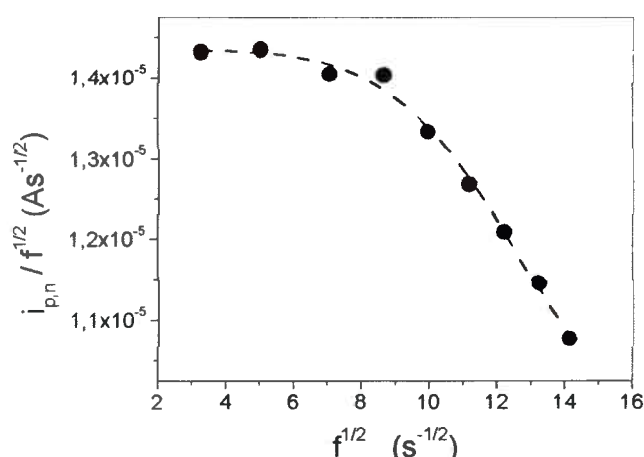


Figura 5.1.15. Dependencia de $i_{p,n} / f^{1/2}$ con $f^{1/2}$ en VOC. $\Delta E_b = 5$ mV. $\Delta E_{OC} = 25$ mV. $c_{P4}^* = 1,02 \times 10^{-3}$ M.

El tratamiento teórico para reacciones de electrodo del tipo EC en VOC predice que el ancho de medio pico ($W_{1/2}$) es de $0,126/n$ V 25 °C [113].

El valor encontrado, para un intervalo de f de 10 a 200 Hz, fue de $(0,128 \pm 0,002)$ V, lo cual permitió inferir, para la primera transferencia electrónica, un valor de $n = 1$, estando en concordancia con lo propuesto en Capítulo 5, Sección 1.1.2.

Por otro lado, en VOC se pueden aplicar criterios similares a la VC, que se basan en la dependencia de la posición del pico neto ($E_{p,n}$) en función del $\log t_p$, donde t_p es el tiempo del pulso. Para un mecanismo de reacción EC, cabe esperar una dependencia lineal de $E_{p,n}$ con $\log t_p$, [106]. Como es de esperar, el $E_{p,n}$ se corrió hacia valores más catódicos al aumentar la frecuencia, en armonía con la VC. En la Figura 5.1.16 se muestra un gráfico de $E_{p,n}$ vs $\log t_p$ de donde se obtuvo un valor de pendiente de 0,026 V/década para un intervalo de f de 10 Hz a 200 Hz. El valor predicho por la teoría para

un mecanismo EC para $\partial E_{p,n} / \partial \log t_p$ es $0,029/n$ V a 25 °C, de donde se desprende que el valor hallado experimentalmente concuerda razonablemente bien, nuevamente poniendo en manifiesto un $n = 1$.

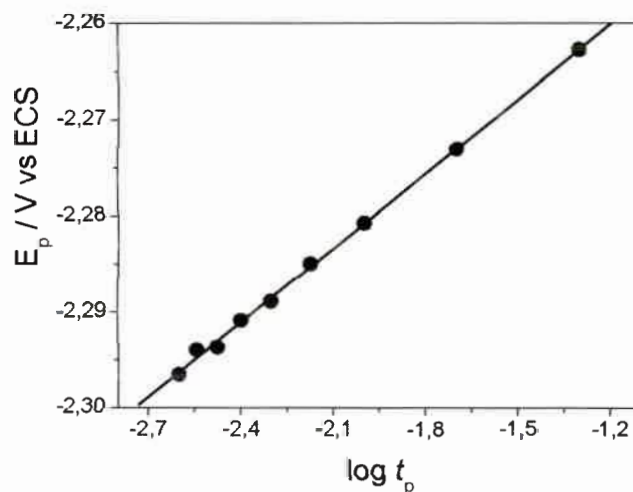


Figura 5.1.16. Variación de E_p con $\log t_p$, $c_{P4}^ = 1,00 \times 10^{-3}$ M. $\Delta E_b = 5$ mV. $\Delta E_{OC} = 25$ mV. $r = 0,989$.*

Sin embargo, no hay un estudio teórico para VOC acerca de sistemas más complicados que EC, EEC, CE o reacciones químicas catalíticas. Por lo tanto, estos resultados tuvieron una relevancia semi-cuantitativa y ofrecieron solo una posible ruta para la elucidación del mecanismo de reducción de P4.

Por otro lado, se encontró una relación lineal entre $i_{p,n}$ y c_{P4}^* en el intervalo de concentraciones de 4×10^{-6} M a 1×10^{-3} M. A fin de conocer cuál es el límite de detección de P4 trabajando con electrodos de carbono vítreo en ACN con los parámetros utilizados propios de la técnica, se realizó una curva de calibración donde se graficó $i_{p,n}$ vs c_{P4}^* (Figura 5.1.17). La regresión lineal que describió dicha relación lineal fue realizada por el procedimiento de los mínimos cuadrados, donde cada punto representó un promedio de dos medidas, y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$i_{p,n} [\text{A}] = (0,193 \pm 0,003) [\text{A M}^{-1}] \times c_{P4}^* [\text{M}] \quad (5.1.6)$$

con un coeficiente de correlación $r = 0,998$. El error en la pendiente es la desviación estándar. La ordenada al origen fue prácticamente despreciable. El límite de detección experimental, según una relación señal/ruido 3:1 fue de $I_d = 5,00 \times 10^{-7} \text{ M}$ (157 ng mL^{-1}).

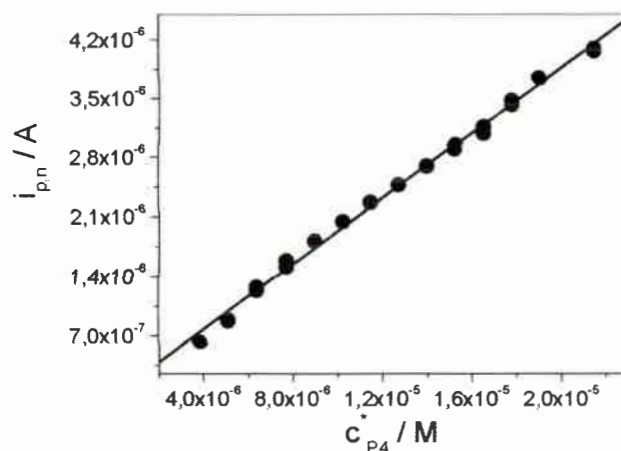


Figura 5.1.17. Curva de calibración. Técnica: VOC. $f = 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 5 \text{ mV}$, $\Delta E_{OC} = 25 \text{ mV}$. Pendiente: $0,193 \pm 0,003 \text{ A M}^{-1}$. $r = 0,998$.

5.1.1.5. Determinación del mecanismo de reducción de P4 por VC

La variación de la función corriente experimental con respecto a parámetros experimentales, como lo es la velocidad de barrido, puede arrojar información acerca del mecanismo de reacción para un proceso de electrodo [84,93]. Para una reacción de electrodo simple, es de esperar que la función corriente experimental no varíe para cualquier velocidad de barrido. La presencia de complicaciones cinéticas homogéneas posteriores al proceso de transferencia de carga heterogénea lleva a cambios en las curvas de la función corriente con la velocidad de barrido.

La existencia de una complicación cinética posterior al proceso heterogéneo, llevó a realizar el estudio de la función corriente, definida como $\Psi = i_{p,c} / (v^{1/2} c_{P4}^* \text{ A})$ [$\text{A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}$] en función de $v^{1/2}$ para distintas concentraciones de P4. En la Figura 5.1.18 se muestra la variación de Ψ vs $v^{1/2}$ para tres concentraciones de P4 diferentes, 0,5; 1 y $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ para un intervalo de v comprendido entre $0,025 \text{ V s}^{-1}$ y $0,200 \text{ V s}^{-1}$.

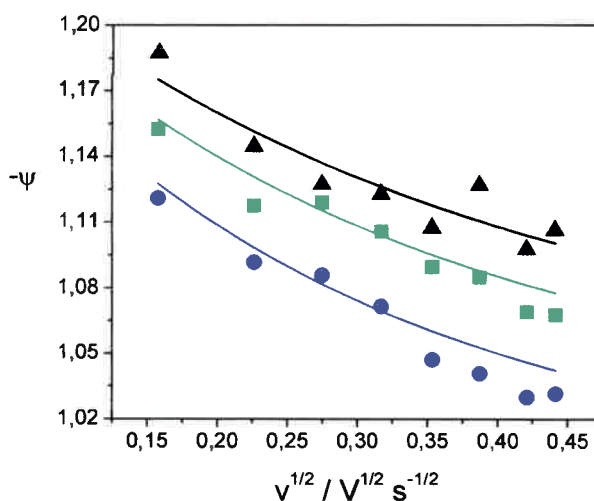


Figura 5.1.18. Dependencia de la función corriente experimental (ψ) sobre $v^{1/2}$ a diferentes concentraciones de P4. c_{P4}^* : \blacktriangle) $5 \times 10^{-4} M$, \blacksquare) $1 \times 10^{-3} M$ y \bullet) $5 \times 10^{-3} M$. Símbolos rellenos: datos experimentales. Línea continua: datos simulados para el esquema de reacción propuesto (ver más adelante, Esquema 5.1.1).

Como puede observarse de la Figura 5.1.18, Ψ disminuyó a medida que v aumentó. Por otro lado, Ψ fue aumentando, para una v constante, a medida que c_{P4}^* disminuyó. Estos resultados, obtenidos para una escala de tiempo propio de una experiencia voltamperométrica, son enteramente consistentes con una reacción de segundo orden acoplada a una reacción de transferencia electrónica heterogénea inicial [84,115,116]. Sin embargo, para tiempos de electrólisis mayores, otras reacciones pudieron llevarse a cabo. La ocurrencia de tales reacciones puede ser entendida por la desviación de la unidad (aumento) del número de electrones n obtenido de las experiencias de electrólisis a potencial controlado a tiempos largos (Capítulo 5, Sección 1.1.3). En la literatura se ha encontrado que, durante procesos de electrólisis en ACN que llevan a la formación de un compuesto básico, puede ocurrir una reacción de cianometilación [117]. Este hecho fue atribuido a la formación del anión del ACN el cual entra en una reacción en cadena llevando a la adición del acetonitrilo al grupo carbonilo. La producción del anión acetonitrilo se da a través de una serie de reacciones, tal como la reacción de protonación por parte del ACN hacia un dianión orgánico [117]. El resultado encontrado de n para la reducción de la P4 mediante su determinación a

tiempos largos de electrólisis está de acuerdo con estudios realizados para procesos de reducción de compuestos carbonílicos insaturados en ACN, en donde, para reacciones de electrólisis a potencial controlado, existe para n una desviación marcada desde la unidad [112].

Para un proceso de electrodo reversible simple, el E_p es independiente de ν y c^* . Cuando existe alguna complicación cinética que acompaña la transferencia de carga, el E_p se vuelve dependiente de ν y c^* . Se encuentra que el E_p se vuelve más positivo o negativo, según se trate de una oxidación o reducción respectivamente, a medida que ν aumenta [84]. En el caso de la reducción de P4, el potencial de pico catódico $E_{p,c}$ varió con $\log \nu$ en dirección catódica (Figura 5.1.19). Se encontró un valor experimental de pendiente de $-0,026 \pm 0,007$ V/década para la variación de $E_{p,c}$ con $\log \nu$. Por otra parte, cuando se varió la concentración de P4, se obtuvo un corrimiento anódico de $E_{p,c}$ con el incremento de la misma (c_{P4}^*), encontrándose una pendiente de $0,025 \pm 0,002$ V / década para $E_{p,c}$ vs $\log c_{P4}^*$ (Figura 5.1.20). Estos resultados son cercanos a los predichos por la teoría para un mecanismo del tipo e-RSC-e-p [38], es decir, una reacción de electro-dimerización a través de un acoplamiento radical-sustrato (DIM 2) seguido de una electroreducción del dímero anión radical para formar un dímero dianión y una posterior reacción de protonación, donde la etapa determinante de la velocidad es la reacción de acoplamiento radical-sustrato (RSC) (esquema 5.1.1), que arrojan $\partial E_{p,c} / \partial \log \nu = -0,0296$ V/década y $\partial E_{p,c} / \partial \log c^* = 0,0296$ V/década a 25 °C [38].

También se encontró que la diferencia entre los potenciales de pico (E_p) y de medio pico ($E_{p/2}$), expresada como $(E_{p/2} - E_p)$, fue $(0,053 \pm 0,004)$ V, siendo este resultando consistente con lo predicho por la literatura para una reacción de dimerización DIM 2, cuando la reacción de dimerización es la etapa determinante de la velocidad [115]. Dado que no se ha desarrollado una función corriente teórica adecuada para un mecanismo de reacción complicado, el cálculo del coeficiente de difusión por métodos convencionales de VC no fue posible.

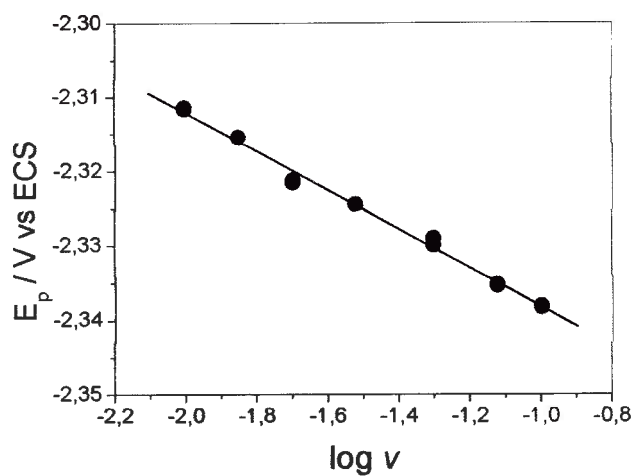


Figura 5.1.19. Variación del $E_{p,c}$ vs $\log v$. $c_{P4}^* = 1,00 \times 10^{-4} M$. Pendiente: $-0,026 \pm 0,007 V/\text{decada}$. $r = 0,994$.

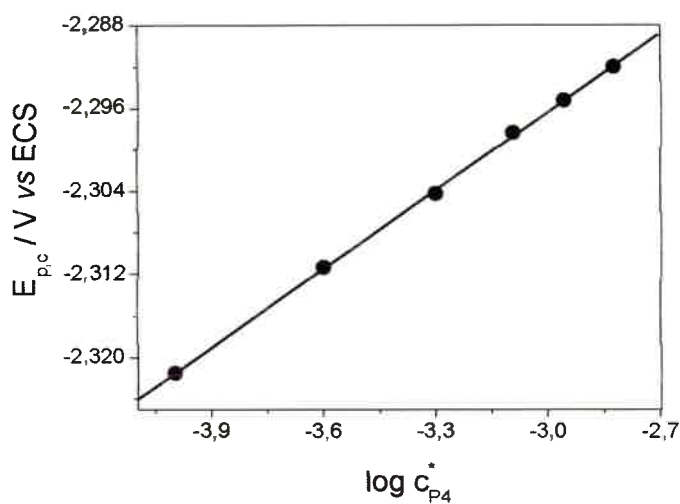
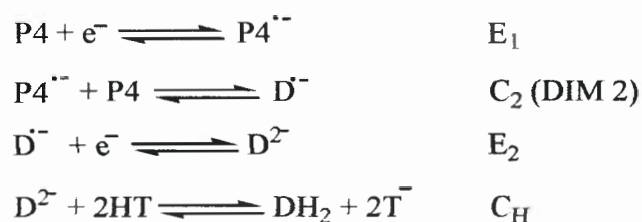


Figura 5.1.20. Variación del $E_{p,c}$ vs $\log c_{P4}^*$ $v = 0,025 V s^{-1}$. Pendiente: $0,025 \pm 0,002 V/\text{década}$. $r = 0,994$.

Con los datos obtenidos se planteó el siguiente mecanismo de electroreducción de P4 (Esquema 5.1.1):



Reacción global:



Esquema 5.1.1. Esquema de la reacción de reducción heterogénea de P4 en ACN + 0,1 M HFTB. HT representa un dador de H⁺, que podría ser agua residual o el mismo solvente.

La reactividad de aniones radicales electrogenerados ha sido extensamente estudiada [39,118], incluyendo el análisis para mecanismos de reacción de dimerización, teniendo en cuenta competiciones de reacciones radical-radical y radical-sustrato, mediante simulación digital [39].

Mediante el empleo de la simulación digital de voltamperogramas cíclicos, se estudiaron diferentes mecanismos de reducción, con diferentes etapas, tanto heterogéneas como homogéneas. Los voltamperogramas simulados se realizaron a diferentes velocidades de barrido como así también diferentes concentraciones de sustrato. El objetivo de tal desarrollo fue el de comparar los valores simulados con los experimentales para los distintos criterios de diagnóstico aplicados [39,84,115,116,118]. De esta manera, se construyeron diferentes curvas de función corriente teórica ($\Psi_{\text{teórica}}$) para distintas concentraciones de P4 y diferentes velocidades de barrido (abarcando los valores experimentales usados). Los valores teóricos obtenidos fueron comparados con la función corriente experimental (Ψ_{exp}). Los valores simulados que mejor se ajustaron a los datos experimentales se correspondieron al mecanismo de reducción de P4 mostrado en el Esquema 5.1.1. En la Figura 5.1.18 se puede apreciar una muy buena correspondencia entre los valores experimentales y simulados. Estas similitudes entre Ψ_{exp} y $\Psi_{\text{teórica}}$ confirmaron el comportamiento de segundo orden propuesto.

Empleando el mecanismo de reducción de P4 mostrado en el Esquema 5.1.1, se realizaron determinaciones teóricas para la $\partial E_p / \log v$ y $\partial E_p / \log c_{P4}^*$ mediante la simulación de voltamperogramas cíclicos. Los valores encontrados fueron $(-0,026 \pm 0,003)$ V/década y $(0,023 \pm 0,002)$ V/década, respectivamente, los cuales estuvieron en muy buen acuerdo con los valores determinados experimentalmente $(-0,026 \pm 0,007$ y $0,025 \pm 0,002)$.

El mecanismo de reacción propuesto indica que el proceso global de reacción implica un electrón por molécula de P4 electrolizada. La fuente dadora de protones para la etapa de protonación pudo ser agua residual o el mismo solvente (ACN). El ACN puede ser un dador activo de protones, partiendo del hecho de que su pK_a es similar al del agua cuando se lo mide en dimetilsulfóxido [119]. Dado que el ACN empleado en todos las experiencias fue tratado previamente con tamices moleculares, cabe esperar una enorme diferencia entre la cantidad de moléculas de solvente comparada a la posible cantidad de moléculas de agua residual, por lo tanto, es altamente probable que el ACN actúe como fuente dadora de protones en la reacción de protonación mostrada en el Esquema 5.1.1. Además, la presencia del anión ACN producido por la posible deprotonación del ACN como consecuencia de la formación de una base fuerte (dímero dianión) durante el proceso electrolítico, como se discutió anteriormente, llevaría a la incorporación del ACN al producto de electrólisis [117].

A los fines de realizar una verificación completa del modelo de mecanismo de reacción prpuesto, o sea, dimerización de segundo orden con acoplamiento radical sustrato (Esquema 5.1.1), se realizó un ajuste de los voltamperogramas cíclicos experimentales para distintas velocidades de barrido. Se encontró un muy buen ajuste, tal como se muestra en la Figura 5.1.21.

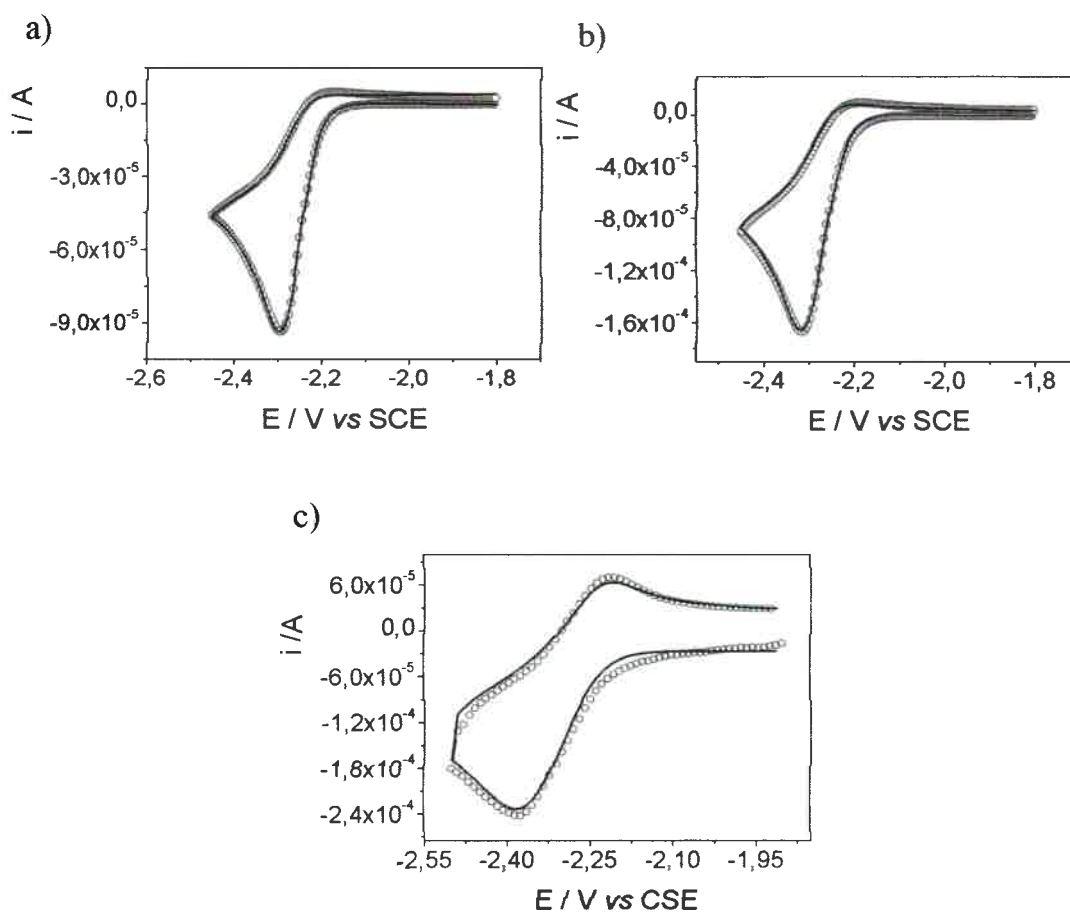


Figura 5.1.21. Voltamperogramas cíclicos de P4 experimentales (—) y ajustados (○) para $c_{P4}^* = 5,0 \times 10^{-3} M$ a distintas velocidades de barrido, v ($V s^{-1}$): a) 0,05; b) 0,175; c) 5.

Los parámetros de las diferentes etapas del mecanismo de reacción propuesto, tales como las constantes de velocidad heterogénea (k_{f1}^0 y k_{f2}^0) y potenciales formales (E_{f1}^0 y E_{f2}^0) para la cupla sustrato/anión radical, constantes de velocidad de dimerización y de protonación (k_{dim} y K_{H^+}) de las etapas químicas así como el coeficiente de difusión de P4 fueron calculados por medio del ajuste digital de los voltamperogramas experimentales. Para los ajustes se supuso que el coeficiente de transferencia catódico (α) para ambas transferencias electrónicas es 0,5. Los parámetros obtenidos por el ajuste de los voltamperogramas experimentales se muestran en la Tabla 5.1.1.

Tabla 5.1.1. Potenciales formales (E_{fn}^0) y constantes de velocidad heterogéneas (k_{fn}^0) para las reacciones de transferencia electrónica así como el coeficiente de difusión (D_{P4}) para la progesterona, constante de velocidad de dimerización (k_{dim}) y constante de equilibrio para la etapa de protonación (K_H^+) obtenidas de los ajustes de los voltamperogramas cíclicos a tres diferentes velocidades de barrido de acuerdo al Esquema 5.1.1 (ver texto). $c_{P4}^* = 5,0 \times 10^{-3}$ M. Medio de reacción: ACN + 0,1 M HTBA.

$v /$ $V s^{-1}$	$E_{f1}^0 /$ V	$10^2 k_{f1}^0 /$ $cm s^{-1}$	$10^{-6} k_{dim} / M^{-1}$ s^{-1}	$E_{f2}^0 /$ V	$k_{f2}^0 /$ $cm s^{-1}$	$10^{-4} K_H^+$	$10^5 D_{P4} /$ $cm^2 s^{-1}$
0,050	-2,332	1,9	2,1	-2,328	0,139	1,4	1,59
0,175	-2,332	1,9	2,2	-2,336	0,167	1,8	1,60
5	-2,326	1,9	2,1	-2,329	0,112	1,0	1,55
Valores promedio							
	-2,330 ($\pm 0,001$)	$1,9 \pm 0,0$	$2,1 \pm 0,05$	$-2,331 \pm 0,004$	$0,14 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,4$	$1,58 \pm 0,03$

(1) 1^{ra} transferencia electrónica; (2) 2^{da} transferencia electrónica.

El valor de k_{f1}^0 obtenido por el ajuste de los voltamperogramas cíclicos concordó razonablemente bien con el calculado por el método de Nicholson (ver Capítulo 5, Sección 1.1.1).

El valor hallado para la constante de dimerización (k_{dim}) fue bastante cercano a los observados en la literatura para compuestos orgánicos [112,120-124]. El valor promedio obtenido para el coeficiente de difusión de P4 fue bastante cercano al calculado anteriormente (Capítulo 5, Sección 1.1.2). Por otra parte, la constante formal de velocidad para las dos transferencias heterogéneas fueron próximas a las esperadas para transferencias reversibles o cuasi-reversibles de compuestos carbonílicos conjugados, cuando los constituyentes de la cupla redox son similares en estructura y tamaño en solventes dipolares no-acuosos [125].

El dímero obtenido mediante el acoplamiento del radical monoanión de P4 (generado en la primera transferencia electrónica heterogénea) con el sustrato podría ser un pinacol, el cual ha sido propuesto para procesos de reducción de enonas, sustancias estructuralmente relacionadas a la P4, sobre electrodos de mercurio en una solución de metanol/medio acuoso [20]. Sin embargo, el producto de dimerización no pudo ser

detectado trabajando a microescala. Se intentó llevar a cabo la prueba del periodato [20], pero dada la gran inestabilidad del dímero y la escasa cantidad del mismo producida en el proceso electrolítico a pequeños tiempos de electrólisis (largos tiempos no se emplearon a fin de evitar la reacción de cianometilación) la misma no arrojó resultados positivos.

5.1.2. Adsorción de progesterona sobre electrodos de carbono vítreo

En esta sección se muestran los estudios acerca de la termodinámica de la adsorción de P4 sobre la superficie de electrodos de carbono vítreo a través de la determinación de la energía libre de adsorción de Gibbs, de la entalpía y de la entropía de adsorción. El modelo de isoterma de adsorción el cual mejor describió dicho proceso de adsorción también se discutirá. Por otra parte, se determinó la constante de velocidad heterogénea aparente para la reacción de transferencia electrónica de la P4 adsorbida.

En principio, dado que existe un gran desarrollo de biosensores de P4 en donde se hace uso de la adsorción de anticuerpos sobre superficies de carbono [13,41,126,127], con el objetivo de llevar a cabo su determinación analítica y, dado que la P4 se adsorbe sobre electrodos de carbono vítreo, se comenzó estudiando el comportamiento de la adsorción de P4, como así también bajo qué condiciones experimentales dicha adsorción es óptima.

Las medidas electroquímicas se realizaron en una celda de blanco conteniendo 5 % ACN + 95 % solución acuosa reguladora de pH = 8.

La técnica empleada fue exclusivamente la voltamperometría de onda cuadrada, dado las pequeñas concentraciones de P4 empleadas.

5.1.2.1. Determinación de los parámetros termodinámicos para la adsorción de P4

La adsorción de P4 sobre electrodos de CV se llevó a cabo en una celda de tres electrodos que contenía solamente la solución de 5 % de ACN + 95 % de solución amortiguadora de pH = 8 con P4 y en donde se sumergió el sistema de tres electrodos. Esta solución se encontraba termostalizada a la temperatura de trabajo deseada. En otra celda, la celda de medición, se colocó la solución conteniendo un 5 % ACN + 95 % solución reguladora de pH = 8, a la misma temperatura que la anterior, y donde se

realizaron los voltamperogramas de onda cuadrada. Por lo tanto, una vez efectuada la adsorción de P4 durante un tiempo determinado ($t_{\text{adsorción}}$), se transfirió el electrodo de carbono vítreo a la celda de medida. Entonces, para todos los experimentos, se aplicó un potencial inicial (E_i) por 10 s, después del cual los voltamperogramas fueron realizados bajo las siguientes condiciones: $E_i = -1,2$ V y $E_f = -1,9$ V. Los valores de f , ΔE_b , y ΔE_{OC} fueron de 80 Hz, 10 mV y 50 mV respectivamente, como se verá más adelante. De esta manera, la respuesta electroquímica observada se debió únicamente a la descarga del sustrato adsorbido, no existiendo un aporte difusional en la respuesta de corriente.

En la Figura 5.1.22 se muestra un voltamperograma de onda cuadrada con sus tres corrientes características, corriente diferencial o neta (i_n), corriente directa (i_d) y corriente inversa (i_i) para la P4 adsorbida en el electrodo. Como se puede observar, P4 adsorbida sobre el electrodo presentó un único pico de reducción, con un potencial de pico (E_p) de $-1,65$ V vs ECS. En comparación con los estudios realizados sobre la reducción electroquímica de P4 en ACN con el mismo material de electrodo, la reducción ocurrió a un potencial de reducción bastante menos catódico. En medio orgánico la reducción aparece a un E_p de $-2,33$ V vs ECS.

También es posible observar en el voltamperograma de la Figura 5.1.22, que únicamente existió el proceso de reducción sobre el electrodo, no ocurriendo, en el muestreo inverso de potencial, el correspondiente proceso de oxidación del anión radical electrogenerado, poniendo en evidencia un mecanismo de reducción de P4 con complicaciones cinéticas posteriores a la transferencia de carga, tal lo encontrado previamente en medio no acuoso aprótico. El ancho de medio pico en VOC ($W_{1/2}$) tuvo un valor de $(0,171 \pm 0,005)$ V. A los fines analíticos se estudió solamente la respuesta de la i_n .

Cuando se realizó un voltamperograma de onda cuadrada inmediatamente posterior al mostrado anteriormente, no se encontró el pico de reducción de P4, indicando la posibilidad de que toda la P4 adsorbida se redujo y/o reaccionó de manera tal que no quedaron restos de P4 sobre la superficie del electrodo. Luego, a este electrodo se lo trasladó a la celda con la solución de trabajo a fin de adsorber nuevamente P4, realizar su correspondiente reducción de P4 y comprobar así la reproducibilidad del voltamperograma. Sin embargo, no se observó la aparición de pico

alguno, es decir, luego de la reducción de P4 se pasivó la superficie del electrodo. Por lo tanto, se tuvieron que buscar las condiciones de limpieza de la superficie del electrodo para que la adsorción de P4 sea reproducible.

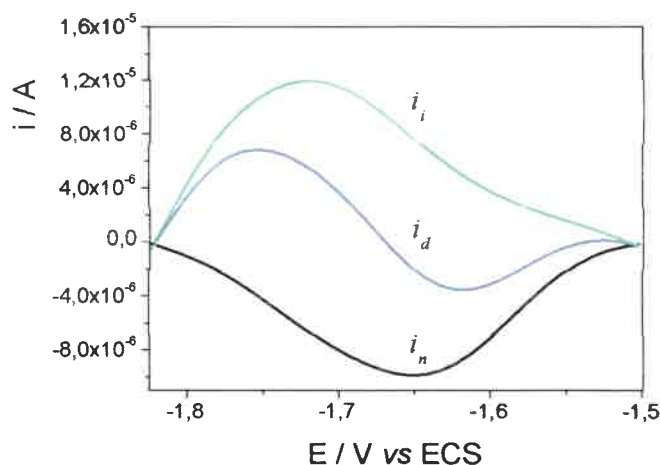


Figura 5.1.22. Voltamperograma de onda cuadrada. $f = 80 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 10 \text{ mV}$, $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$, $t_{adsorción} = 180 \text{ s}$, $E_{adsorción} = \text{circuito abierto}$. $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. $c_{P4}^* = 5 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Los primeros métodos de limpieza consistieron en ciclados sucesivos en la celda de blanco, tanto en la zona anódica como en la catódica, para regenerar la superficie electrocatalítica del electrodo y así reproducir la adsorción de P4. Esta tarea no arrojó resultados positivos. Por lo tanto, se empezó con un pulido mecánico del electrodo sobre una felpa húmeda conteniendo alúmina (primeramente con alúmina de $0,3 \mu\text{m}$ y luego con alúmina de $0,05 \mu\text{m}$) y, posteriormente, vibración ultrasónica en agua tridestilada, tratamiento que fue aplicado previamente a la etapa de adsorción de P4. La $i_{p,n}$ correspondiente a la reducción de P4 bajo estas condiciones fue poco reproducible (ver Figura 5.1.23.a).

A los fines de ganar en señal y reproducibilidad, luego del pulido mecánico se realizó la activación electroquímica propuesta por Anjo y col. [109], como se describió en el Capítulo 4, Sección 2.2.1. Posteriormente, se enjuagó el electrodo con solución acuosa reguladora de $\text{pH} = 8$ y se realizó la adsorción de P4 y su electroreducción. Experimentalmente, se encontró no sólo una mayor reproducibilidad de los distintos voltamperogramas de onda cuadrada, sino que, además, la $i_{p,n}$ fue mucho mayor a la

obtenida anteriormente, como se observa en la Figura 5.1.23.b para la misma concentración de P4.

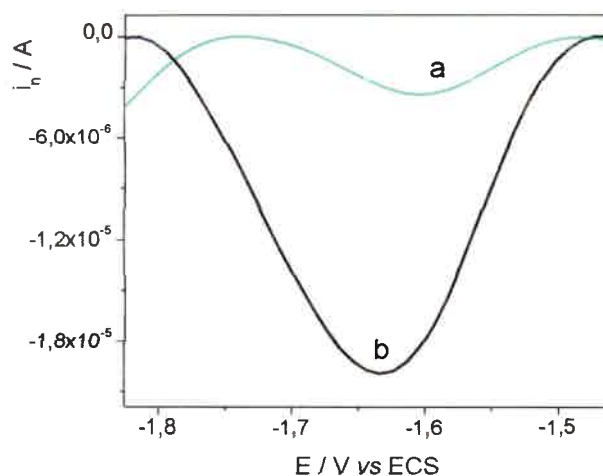


Figura 5.1.23. Voltamperogramas de onda cuadrada. Método de limpieza a) felpa húmeda y alúmina, b) felpa húmeda con alúmina con posterior activación electroquímica por método de Anjo [109]. $f = 80 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 10 \text{ mV}$, $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$, $t_{adsorción} = 70 \text{ s}$, $E_{adsorción} = \text{circuito abierto}$. $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. $c_{P4}^* = 3,00 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Tal como se puede observar en la Figura 5.1.23, se produjo un pequeño corrimiento del E_p en dirección catódica cuando el electrodo fue activado por el método de Anjo y col [109]. Se ha demostrado que los pasos de activación del electrodo son necesarios a la hora de obtener respuestas reproducibles sobre electrodos de carbono. Los métodos de pulido no presentan una activación adecuada, expresada en términos de la reversibilidad de la repuesta electroquímica de las catecolaminas [128,129]. La activación descrita por Anjo y col. [109] sobre electrodos de carbono vítreo genera una superficie funcionalizada, favoreciendo al comportamiento reversible visto en la descarga de las catecolaminas. Además, con este procedimiento, en comparación con la activación en medio ácido o neutro, no se generan grandes corrientes de blanco o de cargado de la doble capa [109].

Experimentalmente, se encontró que la mejor forma de obtener reproducibilidad y sensibilidad en la adsorción de P4 sobre electrodos de carbono vítreo, expresada en la lectura de corriente para los voltamperogramas de onda cuadrada, fue mediante la activación descrita por Anjo y col. [109]. En principio, el fenómeno de activación es a menudo explicado por la formación de grupos quinona/hidroquinona en la superficie del

carbono vítreo [130]. La interacción entre estos grupos funcionales y el grupo cetona presente en el anillo A de la P4 pudo ser la responsable de la significativa adsorción sobre la superficie del electrodo de carbono vítreo activado electroquímicamente.

Conjuntamente con el método de activación comentado anteriormente y, para verificar el estado de la superficie del electrodo, después de la activación electroquímica y antes de la adsorción de P4, se realizaron voltamperogramas de onda cuadrada en una celda de blanco, y se corroboró, en muy buena medida, que las corrientes capacitivas para cada blanco eran prácticamente las mismas, lo que, en principio, indicó la similitud de la superficie del electrodo después de su limpieza con activación electroquímica.

Se continuaron los estudios buscando los mejores parámetros característicos de VOC para el sistema bajo estudio. Para ello, se realizó un estudio variando la f , ΔE_b , y ΔE_{OC} , dentro del intervalo de 5 a 200 Hz, 5 a 50 mV y de 5 a 100 mV, respectivamente.

Se encontró que la $i_{p,n}$ aumentó con el aumento de f y, a fin de evitar efectos capacitivos indeseados en la descarga de P4 (debidos al área del electrodo), se eligió trabajar con una f de 80 Hz para el resto de las experiencias.

Los valores de ΔE_b , y ΔE_{OC} seleccionados fueron de 10 y 50 mV respectivamente. Estos valores estuvieron de acuerdo con una situación de compromiso entre la sensibilidad y la resolución. Es conocido que, para valores crecientes de ΔE_{OC} , se produce un incremento de la función corriente, pero también conlleva a un aumento de $W_{1/2}$, que cuando se trata de experiencias analíticas es un inconveniente por posible pérdida de resolución en la identificación de los componentes. El aumento indiscriminado de ΔE_b lleva a una ganancia de la función corriente, pero se pierde la resolución en el voltamperograma debido a que el número de muestreos de corriente en el barrido de potencial es cada vez menor (ver Capítulo 3, Sección 11.4.2.1).

A fin de optimizar la adsorción de P4 sobre la superficie del electrodo, se estudió la dependencia de la respuesta en corriente con el tiempo de adsorción ($t_{adsorción}$) y el potencial de adsorción ($E_{adsorción}$).

El estudio con el $t_{adsorción}$ de P4 se llevó a cabo a 20 °C, para distintas concentraciones, a fin de encontrar el $t_{adsorción}$ que produce la saturación de la superficie del electrodo, obteniendo la máxima corriente para cada concentración. Para c_{P4}^* superiores a 3×10^{-5} M, la superficie del electrodo fue saturada a $t_{adsorción}$ pequeños y la $i_{p,n}$ alcanzó su máximo valor, denominada corriente de pico neta máxima ($i_{p,n,max}$), como

se ve en la Figura 5.1.24. Para concentraciones de P4 mayores la $i_{p,n}$ no creció y permaneció constante, indicando la saturación de la superficie. Para c_{P4}^* menores a $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, la saturación de la superficie se alcanzó para tiempos superiores a 180 s (Figura 5.1.24). Por lo tanto, se dedujo que la adsorción de P4 sobre la superficie del electrodo de carbono vítreo presentó una cinética rápida.

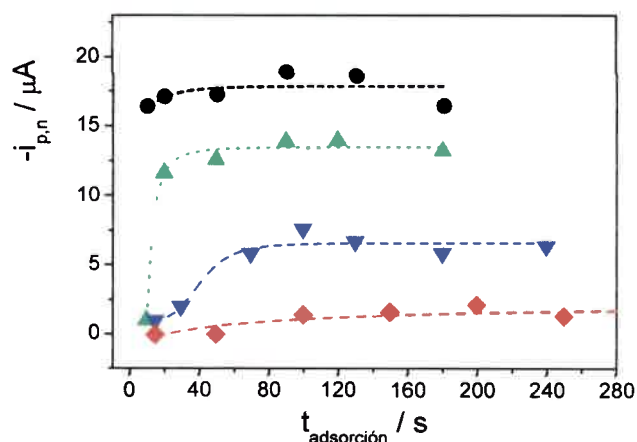


Figura 5.1.24. ●) $c_{P4}^* = 3 \times 10^{-5} \text{ M}$, ▲) $c_{P4}^* = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$, ▼) $c_{P4}^* = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$, ◆) $c_{P4}^* = 4 \times 10^{-7} \text{ M}$. $f = 80 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 10 \text{ mV}$, $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$, $E_{adsorción} = \text{circuito abierto}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Así, se eligió un $t_{adsorción}$ de 180 s para el resto de las experiencias, a fin de asegurar la máxima adsorción de P4, aún para las concentraciones más bajas.

Luego, se realizó el estudio del $E_{adsorción}$. Para ello se varió el $E_{adsorción}$, tomando valores tanto anódicos como catódicos, hasta E próximos al E_p de P4. La respuesta fue independiente del $E_{adsorción}$ en el intervalo de potencial estudiado, poniendo en evidencia la ausencia de interacciones coulombicas entre la superficie del electrodo y la molécula de P4. Por ello, la adsorción de P4 fue convenientemente realizada a potencial de circuito abierto.

Para seguir investigando las características del proceso de adsorción de P4, se realizó un estudio a fin de observar el efecto de la temperatura. Para esto, se analizó la respuesta voltamperométrica a distintas concentraciones de P4 empleando distintas temperaturas (ver Figura 5.1.25).

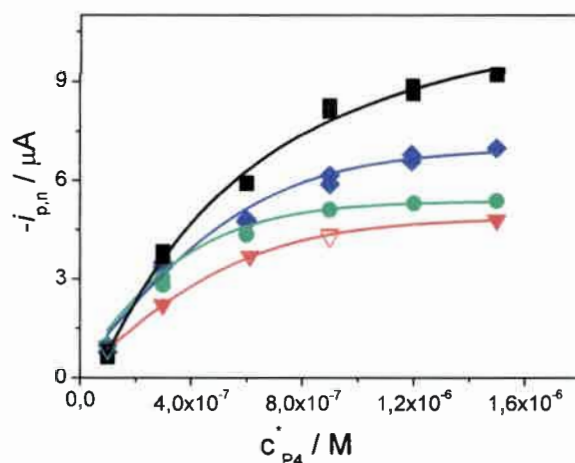


Figura 5.1.25. Isothermas de adsorción de P4 sobre electrodos de CV. $T(K)$: ■) 283; ◆) 293; ●) 313; ▼) 323. $f = 80 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 10 \text{ mV}$, $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$, $t_{\text{adsorción}} = 180 \text{ s}$. $E_{\text{adsorción}} = \text{circuito abierto}$.

Para una dada concentración de P4, la $i_{p,n}$ disminuyó a medida que la temperatura se incrementó, mostrando que la disminución de la temperatura facilitó la adsorción de P4 sobre la superficie del electrodo de CV (Figura 5.1.25). Este comportamiento permitió inferir el carácter exotérmico que acompañó a la adsorción de P4 sobre el electrodo de carbono vítreo. De las gráficas logradas se obtuvieron las isothermas de adsorción, para las cuales se definió el recubrimiento de la superficie como $\theta = i_{p,n}/i_{p,n,\text{max}}$ [131].

La dependencia de $i_{p,n}$ con la temperatura o, lo que es lo mismo, la dependencia de θ con la temperatura permitió calcular el calor de adsorción (ΔH_{ADS}) del proceso [90]. A partir de la ecuación de Clasius-Clapeyron, se realizó un gráfico de ΔH_{ADS} en función de θ , el cual se muestra en la Figura 5.1.26. Los puntos para θ tendiendo a cero fueron extrapolados por medio de una función teórica.

A menudo, el ΔH_{ADS} sufre una disminución marcada con el aumento del grado de recubrimiento del electrodo mostrando una dependencia no lineal con θ . Esta dependencia no lineal entre ΔH_{ADS} y θ indicó que el sistema no pudo ser ajustado por el modelo de isoterma de Langmuir, debido a la no uniformidad de la superficie como así también posibles interacciones del tipo dipolo-dipolo de las moléculas adsorbidas vecinas más cercanas [132,133].

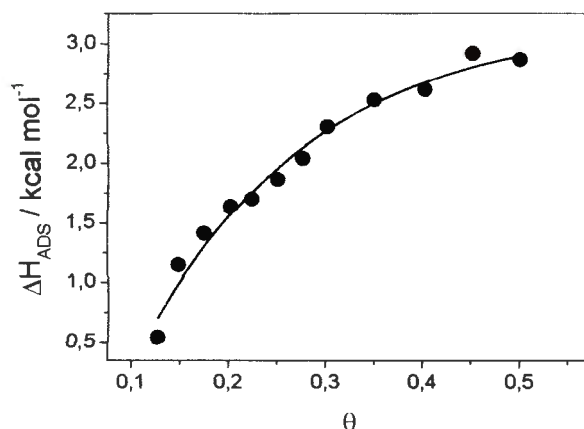


Figura 5.1.26. Variación de ΔH_{ADS} con θ . $f = 80 \text{ Hz}$, $\Delta E_b = 10 \text{ mV}$, $\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$, $t_{adsorción} = 180 \text{ s}$, $E_{adsorción} = \text{circuito abierto}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los datos mencionados anteriormente indicaron posibles interacciones de largo alcance entre las moléculas de P4 adsorbidas sobre el electrodo expuestas por las variaciones de ΔH_{ADS} con θ [88].

A la hora de analizar los modelos de isothermas de adsorción que mejor describieran el proceso de adsorción de P4 sobre electrodos de carbono vítreo, se probaron los modelos más relacionados con sistemas similares al del presente trabajo. Uno de los modelos más sencillos, el de la isoterma de *Langmuir*, está asociado a ciertas características ideales para un dado proceso de adsorción, en donde se esperaría para este modelo una independencia del ΔH_{ADS} con el grado de recubrimiento lo que, dada la variación de ΔH_{ADS} vs θ encontrada para P4, indica que la isoterma de *Langmuir* no corresponde a este sistema bajo estudio. Por lo tanto, los modelos de isothermas que se trataron fueron aquellos que tienen en cuenta sitios discretos de adsorción como así también posibles interacciones de las moléculas adsorbidas [84,88,90,132].

Las isothermas analizadas fueron:

- isoterma de *Frumkin*
- isoterma de *Temkin*
- isoterma de *Freundlich*

las cuales son las más conocidas y aplicadas en experiencias electroquímicas.

Estas fueron analizadas en su forma no linealizada a fin de poder discriminar entre ellas por medio de criterios estadísticos tales como el estimador χ^2 (χ^2), el que dió una medida de la calidad del ajuste de los valores experimentales. El modelo de isoterma que mejor ajustó los datos experimentales fue la isoterma de *Frumkin* (ver Figura 5.1.27), la cual se describió en el Capítulo 3, Sección 10.2.4 (Ecuación 3.10.12). Dicho ajuste arrojó el valor más pequeño de χ^2 , el cual fue calculado mediante el empleo del método de los cuadrados mínimos no lineales aplicados sobre el conjunto de los datos experimentales para cada ecuación, comparado con las isothermas de *Freundlich* y *Temkin*, tal como es mostrado en la Tabla 5.1.2. Por lo tanto, se consideró que este modelo de isoterma fue el que mejor describió la adsorción de P4 sobre electrodos de carbono vítreo en solución acuosa reguladora de pH = 8.

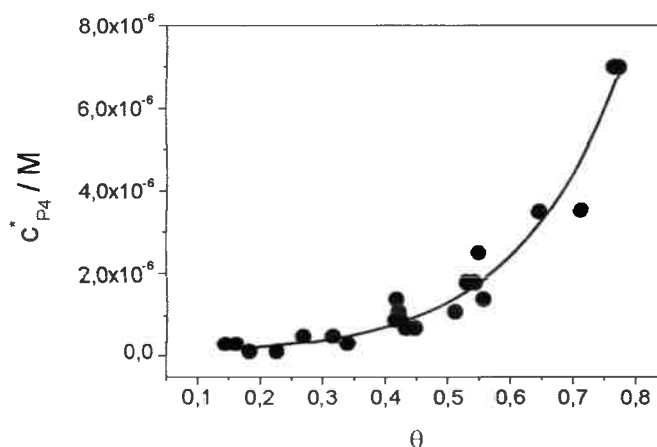


Figura 5.1.27. Isoterma de adsorción de Frumkin. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, y $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto, $T = 20$ °C.

Tabla 5.1.2. Valores del parámetro estadístico χ^2 (χ^2) correspondiente al ajuste de los datos experimentales a cada una de las isotermas de adsorción.

Modelos de Isotermas	χ^2
Frumkin	$1,56 \times 10^{-13}$
Temkin	$3,9 \times 10^{-13}$
Freundlich	$7,9 \times 10^{-13}$

La isoterma de *Frumkin* ofreció una idea de las interacciones laterales que pueden existir entre las moléculas adsorbidas dentro de la monocapa por medio del parámetro g y de la fuerza de la adsorción β (Ecuación 3.10.12) [90]. Estos parámetros fueron determinados para las isotermas desarrolladas a diferentes temperaturas (Figura 5.1.25) y se muestran en la Tabla 5.1.3. Los valores estimados de g y β fueron dependientes de la temperatura. Tal dependencia se muestra en las Figuras 5.1.28.a y 5.1.28.b, respectivamente. El parámetro de interacción lateral g tuvo valores positivos para todas las temperaturas estudiadas, lo que indicó una interacción atractiva entre moléculas de adsorbatos vecinas, cuya magnitud disminuyó con el aumento de la temperatura. Este comportamiento fue razonable ya que para las mayores temperaturas, la cantidad de moléculas adsorbidas fue menor, por lo tanto, era de esperar menor interacción entre ellas.

La fuerza de adsorción β también varió no linealmente con la temperatura (Figura 5.1.28.b). Los valores de β fueron pequeños para bajas temperaturas y aumentaron significativamente para $T > 280$ K. Por lo tanto, para g y β , existió un comportamiento complementario: β se incrementó con la temperatura y g disminuyó.

El ΔG_{ADS} se calculó a partir de los parámetros arrojados por el modelo de isoterma de *Frumkin* [90,134] (Ver Tabla 5.1.3). Se encontró una dependencia no lineal entre ΔG_{ADS} y la temperatura. Los valores negativos obtenidos para todas las temperaturas indicaron que el proceso global de adsorción sobre la superficie del electrodo de CV fue energéticamente favorable. La Figura 5.1.29.a muestra la variación

no lineal de ΔG_{ADS} con la temperatura. De hecho, la curva de ΔG_{ADS} vs T pudo ser ajustada por una ecuación polinomial de tercer orden.

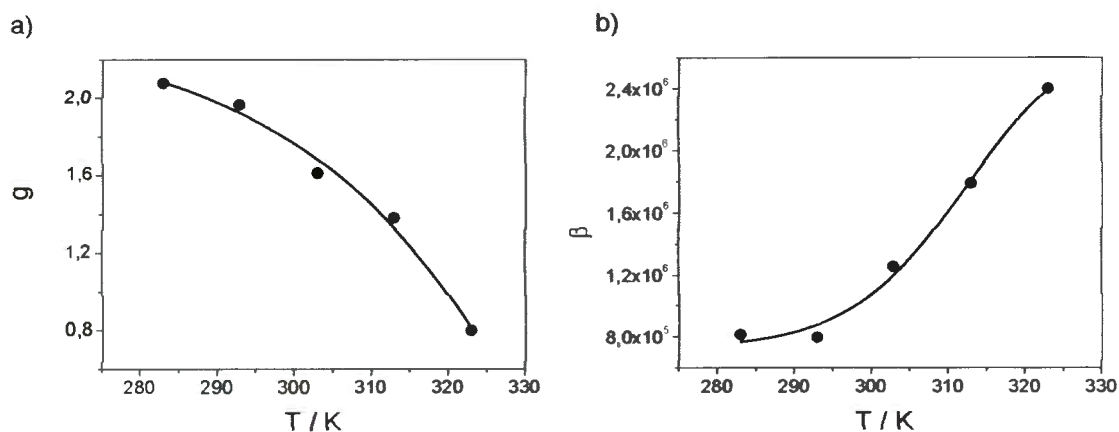


Figura 5.1.28. a y b) Variación del parámetro de interacción lateral (g) y fuerza de adsorción (β) respectivamente, con la temperatura para la adsorción de P4 sobre electrodos de CV.

El ΔS_{ADS} se obtuvo por medio de la siguiente relación fundamental de la termodinámica, la cual describe la variación de ΔG_{ADS} con T para un proceso reversible a presión constante:

$$\Delta S_{ADS} = - \left(\frac{\partial G_{ADS}}{\partial T} \right)_P \quad (5.1.7)$$

Una vez determinado el ΔS_{ADS} y para una dada temperatura, se pudo determinar ΔH_{ADS} por medio de la siguiente relación:

$$\Delta H_{ADS} = \Delta G_{ADS} + T\Delta S_{ADS} \quad (5.1.8)$$

Los valores encontrados para ΔS_{ADS} y ΔH_{ADS} se muestran en la Tabla 5.1.3. La no linealidad entre el ΔG_{ADS} y la temperatura indicó que ΔS_{ADS} y ΔH_{ADS} también son dependientes de la temperatura, como se aprecia en la Figuras 5.1.29.b y 5.1.29.c. Los valores de ΔH_{ADS} concordaron razonablemente bien con los obtenidos mediante la ecuación de Clasius-Clapeyron (Figura 5.1.26) para una temperatura de 293 K.

Tabla 5.1.3. Parámetro de interacción lateral (g) y parámetros termodinámicos calculados para la adsorción de P4 sobre electrodos de CV.

T (K)	β (M ⁻¹)	g	$-\Delta G_{ADS}$ (kcal mol ⁻¹)	ΔH_{ADS} (kcal mol ⁻¹)	$10^2 \Delta S_{ADS}$ (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)
283	0,82±0,02	2,07±0,03	5,97	-3,12	1,01
293	0,80±0,03	1,96±0,04	6,17	4,76	3,73
303	1,26±0,02	1,61±0,03	6,65	8,14	4,88
313	1,79±0,01	1,38±0,04	7,09	6,86	4,46
323	2,40±0,03	0,79±0,05	7,50	0,41	2,45

El término entrópico $T \times \Delta S_{ADS}$ es el factor dominante que determinó el signo de ΔG_{ADS} . Aunque a bajas temperaturas este término decreció, su contribución permanece dominante sobre ΔH_{ADS} . Por lo tanto, la adsorción de P4 sobre electrodos de CV se encontró entrópicamente dominada.

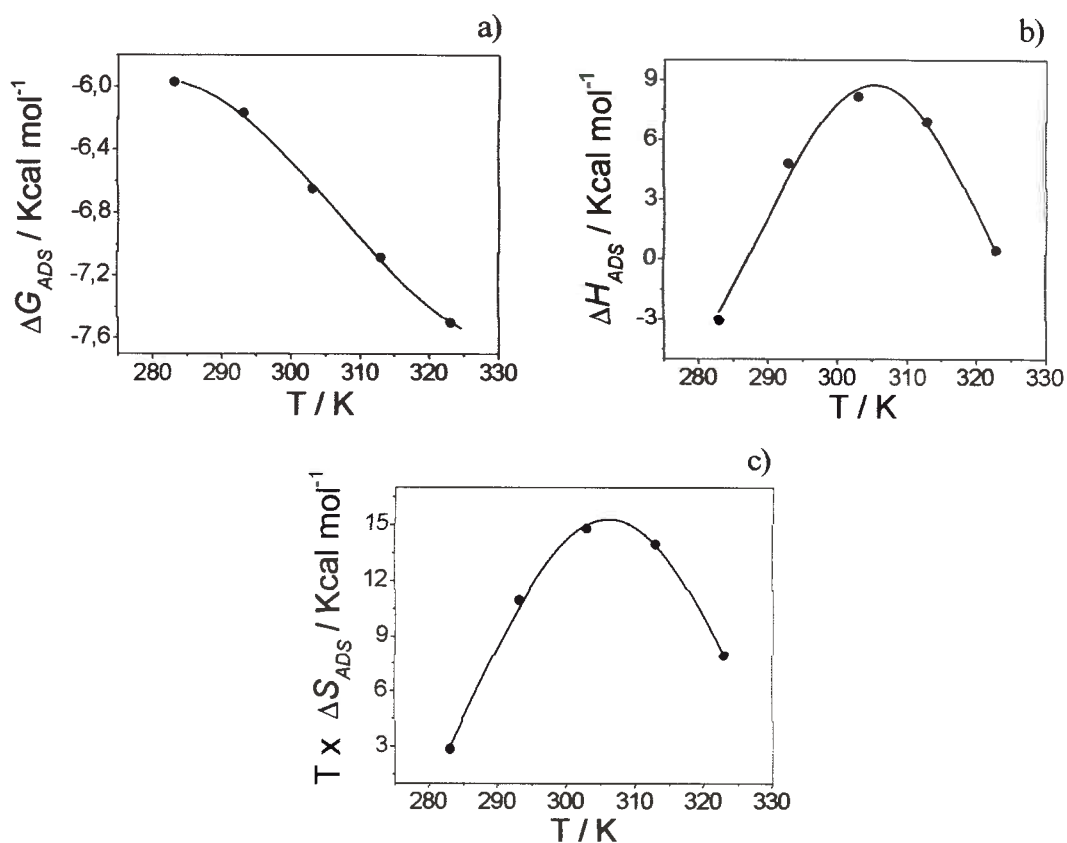


Figura 5.1.29. Dependencia de a) ΔG_{ADS} ; b) ΔH_{ADS} y c) $T \times \Delta S_{ADS}$ con la temperatura para la adsorción de P4 sobre electrodos de CV.

5.1.2.2. Dinámica de la transferencia electrónica heterogénea para P4 adsorbida

La dinámica de la transferencia electrónica es bien conocida y depende de la fuerza del acoplamiento electrónico entre el adsorbato y la superficie del electrodo. Por lo tanto, midiendo la constante de velocidad de transferencia heterogénea de electrones, k , durante la adsorción de una monocapa se puede obtener una señal indirecta del efecto del tiempo de acumulación sobre el modo de unión del adsorbato a la superficie del electrodo.

Para una reacción electroquímica ideal que involucra especies unidas a la superficie, la corriente *Faradaica* (i_F) obtenida de un salto de potencial que cambia la composición redox de la monocapa exhibe un único decaimiento exponencial en el tiempo, de acuerdo a la siguiente ecuación [84,135]:

$$i_F(t) = kQ \exp(-kt) \quad (5.1.9)$$

donde k es la constante de velocidad aparente para la reacción global y Q es la carga total que fluye en la transformación redox.

La Figura 5.1.30 ilustra respuestas cronoamperométricas típicas observadas para la reducción de P4 a diferentes $t_{\text{adsorción}}$, las cuales fueron ajustadas con una ecuación no lineal.

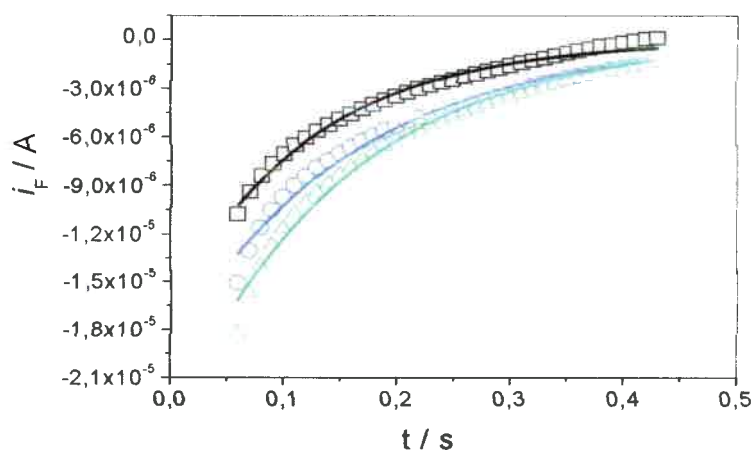


Figura 5.1.30. Cronoamperogramas de P4 adsorbida sobre electrodos de CV para diferentes $t_{\text{adsorción}}$ (s): □) 50; ○) 120; ∇) 180. $c_{\text{P4}}^* = 6 \times 10^{-7} \text{ M}$, solución reguladora pH = 8. $E_{\text{adsorción}}$: circuito abierto. $E_i = -1,2 \text{ V vs ECS}$; $E_f = -1,7 \text{ V vs ECS}$. $T = 293 \text{ K}$.

En estos experimentos, el potencial inicial aplicado (E_i) fue -1,2 V vs ECS y el potencial final (E_f) fue de -1,7 V vs ECS. La forma de los cronoamperogramas dependió del $t_{\text{adsorción}}$. Como se puede observar de la Figura 5.1.30, la forma de los transitorios dependió del tiempo de adsorción, esto es, para tiempos de acumulación elevados, se observó un decaimiento monoexponencial. Los valores de los parámetros cinéticos para P4 adsorbida sobre electrodos de CV para cada $t_{\text{adsorción}}$ calculados mediante el ajuste de los cronoamperogramas con la ecuación 5.1.9 se muestran en la Tabla 5.1.4.

Tabla 5.1.4. Parámetros cinéticos obtenidos para P4 adsorbida sobre electrodos de CV desde transitorios cronoamperométricos para diferentes tiempos de adsorción.

$t_{\text{adsorción}}$ (s)	k (s^{-1})	$-10^6 Q$ (C)	$10^{10} \Gamma^a$ (mol cm^{-2})	$10^{14} \chi^{2,b}$	r^c
50	$7,80 \pm 0,20$	$2,00 \pm 0,02$	$5,60 \pm 0,30$	7,25	0,9937
120	$5,65 \pm 0,06$	$2,97 \pm 0,01$	$8,30 \pm 0,40$	1,60	0,9988
180	$6,13 \pm 0,05$	$3,48 \pm 0,01$	$9,70 \pm 0,40$	1,84	0,9991

^a Γ : recubrimiento superficial calculado por medio de $\Gamma = Q/nFA$ con $n = 1$ y $A = 0,077 \text{ cm}^2$.

^b Función Chi cuadrado.

^c Coeficiente de correlación.

Para $t_{\text{adsorción}}$ de 120 s y 180 s los valores de k son muy próximos entre sí ($5,65 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ y $6,13 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$), pero para 50 s, el valor es significativamente mayor ($7,80 \pm 0,20 \text{ s}^{-1}$). La constante de velocidad heterogénea de transferencia de electrones dependió del grado de recubrimiento de la superficie. Este comportamiento es interpretado en términos del proceso de adsorción inicial que involucra un adsorbato que fue relativamente bien acoplado a la superficie (k mayores) a menores recubrimientos superficiales, mientras que a altos recubrimientos superficiales los adsorbatos vecinos pudieron afectar la comunicación electrónica (k menores). Sin embargo, los datos dinámicos de adsorción fueron enteramente consistentes con la adsorción procedente de un mecanismo en un solo paso [136].

La observación de una única constante de velocidad interfacial sugirió que el micromedioambiente de un centro redox individual es similar al de sus vecinos o que existe una rápida interconvertibilidad. Si la interconversión de sitios distintos ocurre en

una corta escala de tiempo, hace que todos los sitios redox sufran una transferencia electrónica idéntica. En este caso, k fue representativa de un promedio de moléculas adsorbidas que sufren una transferencia electrónica.

Una vez caracterizado el proceso de adsorción y, encontrados los parámetros óptimos para llevar a cabo dicho proceso, se comenzaron a realizar estudios con fines analíticos.

5.1.2.3. Determinación de P4 en muestras de suero por VOC

En la Figura 5.1.31 se muestra una curva de calibración realizada por VOC bajo las condiciones óptimas encontradas para esta técnica en soluciones con el reactivo comercial (Capítulo 5, Sección 1.2.1). Cada determinación fue realizada por duplicado. La regresión lineal fue llevada a cabo por el método de los mínimos cuadrados lineales, a fin de encontrar los valores correspondientes a la pendiente y la ordenada al origen. El límite de detección, según una relación señal/ruido de 3:1, fue de $1,12 \times 10^{-7}$ M. Esta concentración equivale a $35,34 \text{ ng mL}^{-1}$ (35,34 ppb). Mediante la adsorción de P4 sobre el electrodo de carbono vítreo se ha logrado una sensibilidad muy buena para determinar P4 en soluciones acuosas reguladoras de $\text{pH} = 8$, pero insuficiente a la hora de determinar la hormona a niveles fisiológicos (concentraciones de $\text{P4} < 10 \text{ ng mL}^{-1}$).

La linealidad de la curva de calibración se mantuvo hasta una concentración de P4 de $1,10 \times 10^{-6}$ M, para concentraciones superiores se observó una desviación negativa de la linealidad, producto del propio fenómeno de adsorción.

Se agregó P4 ex profeso a muestras de suero correspondientes a un padrillo, en la cual los niveles existentes de P4 son insignificantes. Se prepararon soluciones de suero a distintas concentraciones de P4 en el intervalo de $2,00 \times 10^{-7}$ a $1,00 \times 10^{-5}$ M para realizar una curva de calibración. Luego, se prepararon soluciones agregando 500 μL de suero a 5 mL de solución 5 % ACN-95 % solución reguladora $\text{pH} = 8$. Los voltamperogramas de onda cuadrada, en la ventana de potencial empleada, no mostraron la descarga de otro componente distinto de P4, resultado, en principio, no esperado debido a la gran variedad de componentes tales como grasas, proteínas y la existencia de otras hormonas, presentes en el suero. Tal vez, la posible aparición de otras señales se vio minimizada debido al bajo volumen de suero agregado. En cuanto a

la señal correspondiente de P4, se observó una disminución de la corriente de reducción P4 en comparación a igual concentración de la misma en soluciones acuosas reguladoras de pH = 8. Este resultado indicaría una posible competencia entre P4 y los componentes propios del suero en el proceso de adsorción por los sitios disponibles en la superficie del electrodo.

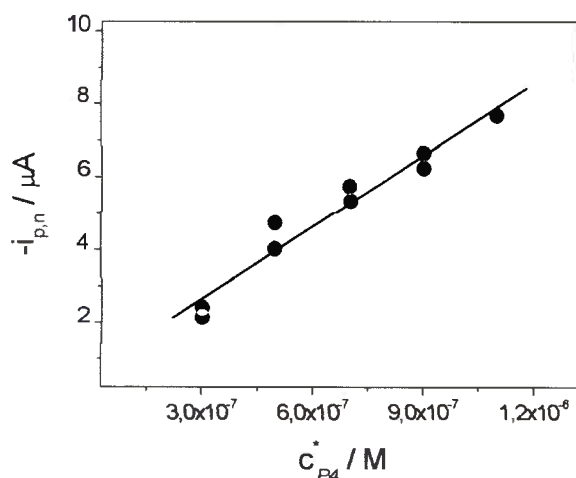


Figura 5.1.31. Curva de calibración en 5 % ACN-95 % solución reguladora pH 8, mediante VOC. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto. Sensibilidad = $6,51 \times 10^6 \mu A M^{-1}$, ordenada = $0,7321 \mu A$, $r = 0,976$.

Por tal motivo, a la hora de realizar la detección en suero fue necesario el empleo de la técnica de adición estándar interno de P4, de manera tal que la señal de reducción de P4 se vea menos afectada por posibles interferentes. En la Figura 5.1.32 se muestra la curva de i_p vs c_{P4}^* empleando la solución de suero-ACN-solución reguladora mediante el agregado de un estándar interno de P4 de 4×10^{-7} M. Todas las mediciones fueron realizados por duplicado.

Se realizó una regresión lineal mediante el empleo del método de los mínimos cuadrados lineales para obtener los valores de la pendiente y ordenada al origen. El efecto de la matriz del suero pudo inferirse en la ligera disminución del valor de la sensibilidad ($5,0889 \times 10^6 \mu A M^{-1}$) como así también por el aumento de la ordenada al origen.

Con los datos de pendiente y ordenada al origen, se calculó la concentración que se correspondería al estándar interno, la cual arrojó un valor de $2,62 \times 10^{-7}$ M. Por lo tanto, el error relativo porcentual del método fue 34 %.

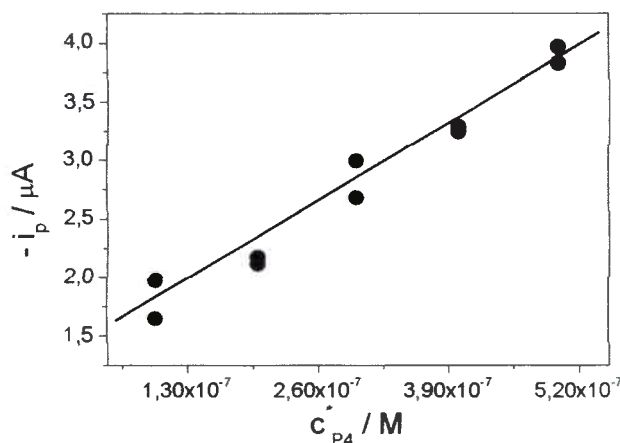


Figura 5.1.32. Curva de calibración en 5 % ACN-95 % solución reguladora pH 8 más 500 μ L de suero, mediante VOC. $c_{EI}^* = 4 \times 10^{-7}$ M. $f = 80$ Hz, $\Delta E_b = 10$ mV, $\Delta E_{OC} = 50$ mV, $t_{adsorción} = 180$ s, $E_{adsorción} =$ circuito abierto. Sensibilidad = $5,0889 \times 10^6 \mu A M^{-1}$, ordenada = $1,3359 \mu A$, $r = 0,976$. $c_{determinada} = 2,62 \times 10^{-7}$ M.

Se consideró que este valor pueda estar indicando una marcada influencia de la matriz del suero. No obstante, este resultado poco satisfactorio para la determinación de P4 en suero y la experiencia recogida fue de importancia para repensar el desarrollo de otra metodología basada en el electroanálisis para la determinación de P4 en suero (en el orden de los ppb). Los resultados de ello se proporcionan en la siguiente sección.

5.1.3. Desarrollo de un inmunosensor electroquímico para determinar P4

Se llevó a cabo el desarrollo de un inmunosensor con la finalidad de determinar P4 mediante el empleo de un reactor amperométrico de inyección de flujo continuo/detenido, cuya forma de trabajo se explicara más adelante.

El principio de la determinación se basó en la capacidad de reconocimiento (biorreconocimiento) que posee el anticuerpo monoclonal anti P4 (m-Ab-P4) hacia la molécula de P4. Dicho evento de biorreconocimiento permitió desarrollar un “Enzimo

inmunoensayo competitivo para P4”, es decir, se llevó a cabo una competencia entre una molécula de P4 unida covalentemente a una enzima (se denominará P4 marcada) la cual compitió con la P4 libre presente en la muestra por una cantidad limitada de anticuerpos inmovilizados en una fase sólida en donde, luego de un proceso de incubación y lavado, se midió la actividad enzimática asociada a la P4 marcada, cuya señal medida fue inversamente relacionada a la concentración de analito, por lo tanto, cuanto más pequeña fue la concentración de P4 de la muestra, mayor fue la señal medida (ver Capítulo 3, Sección 12.2).

5.1.3.1. Generación de una superficie inmune

Para llevar a cabo las experiencias, se utilizó el reactor (inmunoreactor) mostrado en el Capítulo 4, Sección 2.5 (Figura 4.2.4). Sobre el disco rotatorio de teflón se llevó a cabo el evento de biorreconocimiento. Para tal fin, sobre uno de las caras del disco se colocó una cinta que tuvo sus dos lados con pegamento (cinta de doble faz). Posteriormente, se asentó de manera suave la parte del disco con cinta sobre una superficie plana que tuvo el vidrio de porosidad controlada modificado en su superficie con grupos aminopropil (VPCAP), ejerciendo una leve presión. Así, se generó un disco modificado con grupos aminos en la superficie expuesta a la solución, los cuales fueron susceptibles de unirse covalentemente con moléculas biológicas bajo ciertas condiciones.

A fin de generar una superficie inmunoreactiva, el disco modificado fue puesto a reaccionar con una solución acuosa al 5 % p/p de glutaraldehído en solución reguladora de carbonato de pH = 10 por dos horas a temperatura ambiente. En esta etapa, se produjo una reacción entre el grupo amino presente en VPCAP y los extremos carbonílos del glutaraldehído, dando lugar a uniones iminas estables, quedando grupos carbonílos de la molécula de glutaraldehído residuales sin reaccionar (extremo opuesto de la cadena carbonada). Posteriormente, el disco se lavó con solución reguladora (SBP) de pH = 7 para remover el glutaraldehído que no reaccionó. Luego se agregó un volumen suficiente para cubrir todo el disco (30 μ L) de solución de m-Ab-P4, formándose una gota sobre el disco. Se llevó a cabo la reacción por 24 horas a 5 °C en ambiente húmedo. En este caso, nuevamente se produjo una unión covalente imina entre

el grupo carbonilo del glutaraldehído y los grupos amino presentes en el anticuerpo (los más importantes son los grupos amino terminales de la *L*-lisina). Luego se enjuagó el disco con SBP de pH = 7 para eliminar las moléculas de m-Ab-P4 que no reaccionaron. El disco modificado se introdujo en la celda de flujo con la superficie modificada expuesta hacia arriba, quedando enfrentada al electrodo de CV. Una vez usado, el disco fue guardado a 5 °C en la misma solución reguladora hasta su nuevo uso.

5.1.3.2. Conjugación de P4 con HRP

El formato de trabajo para determinar P4 fue indirecto, o sea, mediante una competencia entre P4 de la muestra y P4 marcada, por lo tanto, se necesitó conjugar a la P4 con una enzima. La enzima empleada fue una peroxidasa de rábano picante (HRP). Esta enzima fue elegida dada la gran actividad que posee en un valor de pH cercano al valor de pH óptimo para el empleo del m-Ab-P4. Por otro lado, el empleo de la HRP es comúnmente acompañado con diferentes mediadores redox, los cuales son cuantificados aplicando pequeños sobrepotenciales catódicos [82,137-139]

Para tal motivo, se empleó una molécula de P4 funcionalizada en su extremo con un grupo carboxilo a fin de poder llevar a cabo la unión covalente entre la hormona y la enzima. Para ello, se utilizó P4-3-CMO (Figura 5.1.33), que posee un grupo carboxilo disponible por medio de una cadena lateral en el C-3 del anillo A. Fue importante conocer cuál es el epítipo del antígeno a la hora de unir éste a una enzima, a fin de asegurarse que dicha unión no se produzca en la zona de interacción con el anticuerpo para no impedir el reconocimiento del anticuerpo hacia el antígeno. Como se comentó en el Capítulo 2, Sección 2.2.4.5, el epítipo de P4 se encuentra en el anillo D [45].

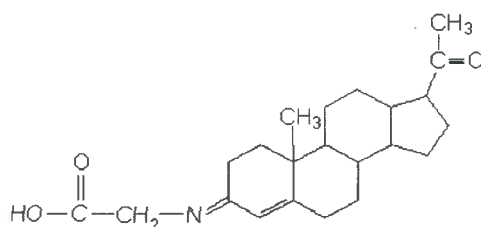
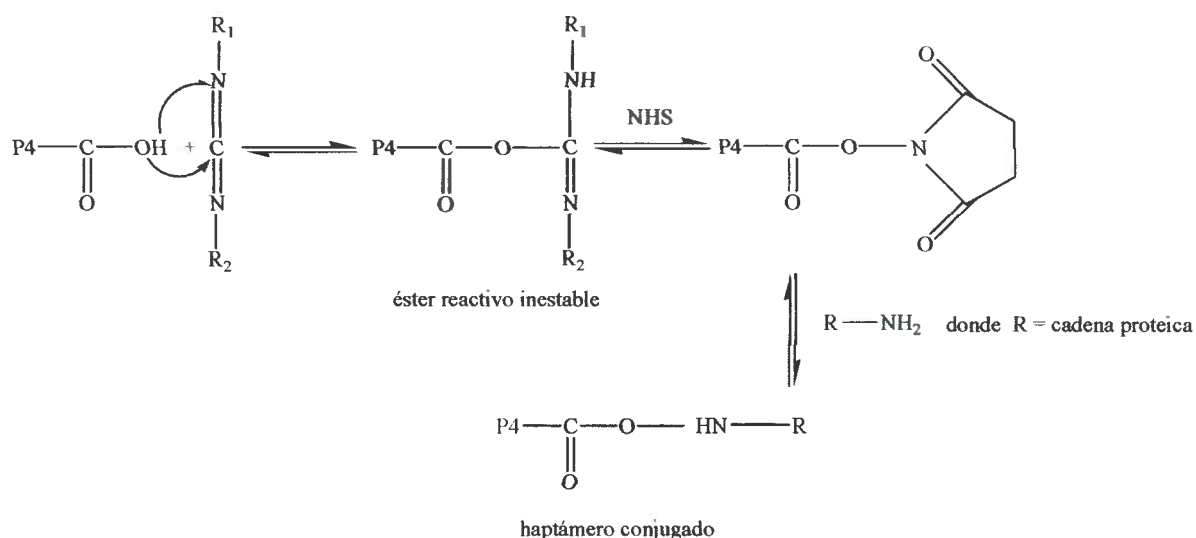


Figura 5.1.33. Molécula de progesterona-3-carboximetiloxima (P4-3-CMO).

La reacción de unión entre la P4-3-CMO y la HRP se realizó por el método de A. Basu [140], con pequeñas modificaciones en las cantidades agregadas. En breve, 7,9 mg de P4-3-CMO fueron disueltos en 600 μL de DMF. Por otro lado, en 400 μL de agua destilada, se agregaron 18 mg de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (actúa como activante del grupo carboxilo) y 33 mg de 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil)carbodiimida (EDAC). La EDAC es un agente de entrecruzamiento entre grupos carboxilos y grupos amino primario, que no agrega carbonos al producto de reacción (no alarga la cadena carbonada). La mezcla acuosa se agregó suavemente a la solución de esteroide. La solución de reacción se guardó a 4 °C en la oscuridad agitando constantemente para favorecer la activación del grupo carboxilo del esteroide durante 5 horas. Una solución formada por 2,5 mg de HRP en 2,5 mL de agua destilada se agregó lentamente a la solución de esteroide activado. La solución se guardó por 24 horas a 4 °C agitando en la oscuridad. En esta etapa, se produjo la unión del esteroide con la enzima. Los pasos de la reacción se muestran en el Esquema 5.1.2.

Luego de que la reacción se llevara a cabo, el conjugado de P4-HRP fue dializado contra agua destilada empleando una membrana de diálisis de celulosa con un valor de corte de 12 KDa, durante 5 días, buscando la eliminación de la P4-3-CMO que no reaccionó, dado que la HRP posee un peso molecular promedio de 40 KDa. El conjugado obtenido fue guardado a 4 °C hasta su uso.

Para verificar la unión entre P4-3-CMO y HRP, se empleó la espectroscopía UV-visible. Tanto la P4-3-CMO como HRP presentan bandas de absorción en el espectro UV-visible [141]. En SBP de pH = 7, la HRP presentó muchas bandas de absorción. Aquí se informan algunas longitudes de onda (λ), correspondientes a los máximos de bandas de absorción de interés, con sus correspondientes coeficientes de extinción molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) [141]: el grupo hemo absorbe a 402 nm con un $\epsilon = 68800$ (ver Figura 5.1.34), banda a 243 nm ($\epsilon = 31900$), banda a 246 nm ($\epsilon = 28100$), banda a 250 nm ($\epsilon = 25600$) debido a cadenas proteicas de bajo peso molecular, entre otras. La P4-3-CMO presentó una banda de absorción en el mismo medio con un máximo de absorción a una longitud de onda de 252 nm ($\epsilon = 13900 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).



Esquema 5.1.2. Reacción de síntesis entre la progesterona-3-carborximetiloxima y la peroxidasa de rábano picante (HRP).

La relación de sustitución, definida como el número promedio de moléculas de esteroide covalentemente unida a la enzima, se calculó por la relación de la concentración de esteroide contra la concentración de enzima medida a 402 nm. La evaluación de la concentración de esteroide se realizó a su máximo de absorbancia después de haber sustraído la contribución a la absorbancia por la enzima a la misma longitud de onda [141]. Para realizar la correlación entre el esteroide y la enzima, se preparó una solución de 1 mg mL⁻¹ de HRP en agua destilada, la cual se dializó con la misma membrana de diálisis empleada en la etapa de purificación de los productos de síntesis del esteroide frente a agua destilada durante 3 días, con el fin de eliminar las cadenas proteicas de peso molecular menor a los 12 KDa que pudieran afectar las medidas de absorbancia a 252 nm.

En las Figuras 5.1.34 a y b, se muestra la Ley de Lambert y Beer para la HRP sometida a diálisis a dos longitudes de onda: 402 nm y 252 nm respectivamente.

En la Figura 3.1.35 se muestran los espectros de absorción para la solución obtenida del producto de síntesis y de una solución de HRP dializada (0,311 mg mL⁻¹). Los valores de absorbancia obtenidos a 402 y 252 nm para el producto de la síntesis son:

$$A^{402} = 0,205$$

$$A^{252} = 0,463$$

Por la ley de Lambert y Beer obtenida a 402 nm, se calculó la concentración de HRP presente en el producto de síntesis. La c_{HRP}^* fue de $1,71 \text{ mg mL}^{-1}$ ($4,28 \times 10^{-5} \text{ M}$), y la absorbancia correspondiente a la enzima a 252 nm fue de $A_{252} = 0,116$.

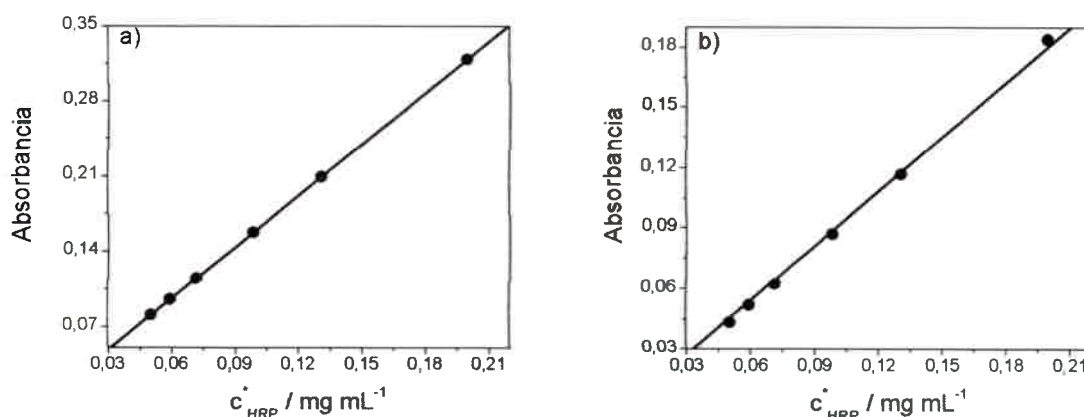


Figura 5.1.34. Ley de Lambert y Beer para HRP en BPS de pH = 7. a) $\lambda = 402 \text{ nm}$, b) $\lambda = 252 \text{ nm}$. La pendiente de la curva a): $1,595 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon_{HRP}^{402} = 63800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y b): $0,900 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon_{HRP}^{252} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

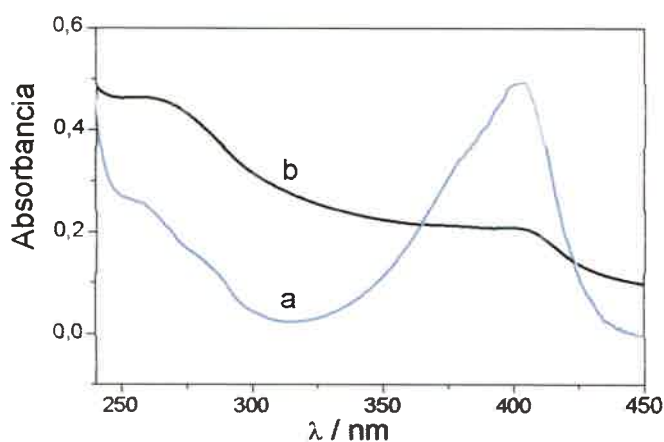


Figura 5.1.35. Espectros de absorción UV-Visible para a) solución de HRP ($0,311 \text{ mg mL}^{-1}$) y b) solución de producto de síntesis de P4-3-CMO y HRP.

Dado que las absorbancias son aditivas, midiendo a una $\lambda = 252 \text{ nm}$, para la solución de conjugado se tiene:

$$A_{\text{TOTAL}} = A_{\text{P4-3-CMO}} + A_{\text{HRP}}$$

$$A_{\text{P4-3-CMO}} = 0,463 - 0,116 = 0,347$$

Empleando el $\epsilon_{\text{P4-3-CMO}}$ de la literatura, se obtuvo una concentración de P4-3-CMO unida a HRP (de ahora en más P4-HRP) de $3,32 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($1,04 \times 10^5 \text{ ng mL}^{-1}$ de P4), considerando la dilución de la muestra medida, siendo este un valor aproximado que demuestra que la síntesis dio resultado positivo. La relación de unión entre moléculas de P4-3-CMO y HRP fue aproximadamente 8, valor significativamente mayor al encontrado en la literatura para la unión de esteroides a HRP [141], lo cual indicó que parte de P4-3-CMO no se unió a la enzima, pero que tampoco se eliminó durante el proceso de dializado, como se verá más adelante.

5.1.3.3. Estudios colorimétricos (ELISA)

Un factor primordial en el desarrollo de un inmunosensor es la concentración de anticuerpo (m-Ab-P4) inmovilizado, a los efectos de permitir obtener una señal óptima, la cual sea capaz de discriminar pequeñas y grandes concentraciones del antígeno.

Dada la posibilidad de trabajar en una placa de ELISA de 96 pocillos, lo cual permitió plantear 96 reacciones en forma simultánea, la determinación de la concentración de m-Ab-P4 a usar se realizó por la técnica ELISA, mediante medidas espectrofotométricas.

En una placa de 96 cubetas se realizaron diferentes diluciones de m-Ab-P4 en SBP 0,01 M de pH = 7 abarcando un intervalo de diluciones desde 1/50 hasta 1/4000, a los efectos de encontrar la señal más intensa. El procedimiento empleado, en detalle, fue el siguiente, basado en el descrito en líneas generales en el Capítulo 3, Sección 12.1 [47]:

- incubación del m-Ab-P4 en las cubetas de la placa de ELISA a 37 °C por 2 horas. La temperatura de incubación es la temperatura aproximada para la cual se supone que los anticuerpos actúan en el organismo. Se coloca el mismo volumen por cada cubeta.
- enjuagado de las cubetas con SBP 0,01 M de pH = 7 por tres veces.
- agregado de solución al 3 % de leche descremada hasta completar todo el volumen de las cubetas (400 μ L), a fin de evitar adsorciones no específicas. Se incuba 30 minutos a 37 °C.
- enjuagado las cubetas con SBP 0,01 M de pH = 7 por tres veces.
- agregado de solución de conjugado P4-HRP, el mismo volumen para cada cubeta. Se incuba a 37 °C por 30 minutos.
- enjuagado con SBP 0,01 M de pH = 7 por tres veces.
- agregado de un reactivo que desarrolle color cuando se produce la reacción enzimática (ortofenilendiamina, OPD) conjuntamente con H₂O₂, (ver Capítulo 3, Sección 12.1.5). De nuevo, el mismo volumen para todas las cubetas. Se deja reaccionar hasta que se produzca el desarrollo del color producto del cambio de estado rédox de la OPD. La reacción se detiene mediante el agregado de H₂SO₄ 4 N.

La interacción del anticuerpo con la placa de ELISA se produce fundamentalmente por medio de interacciones hidrofóbicas [48].

En la Figura 5.1.36 se muestra una placa de ELISA en donde se llevó a cabo una de las determinaciones del factor de dilución del m-Ab-P4. En esta placa, de izquierda a derecha, se disminuyó la dilución de la solución comercial de m-Ab-P4, mientras que de abajo hacia arriba disminuyó la dilución de solución de P4-HRP.

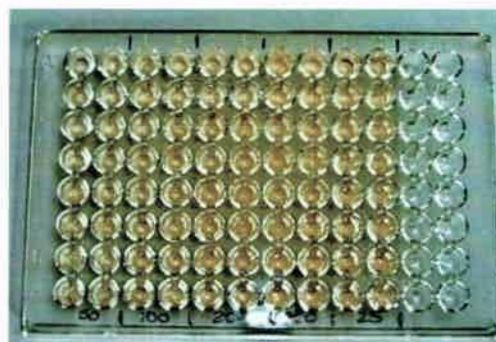


Figura 5.1.36. Placa de ELISA de 96 cubetas. Estudio enfocado hacia la determinación del factor de dilución de *m-Ab-P4* para distintas diluciones de *P4-HRP*. Color desarrollado por el agregado de solución de OPD con H_2O_2 .

En la Figura 5.1.37 se muestran los resultados obtenidos para diluciones de *m-Ab-P4* de 1/50 y 1/100 y distintas diluciones de *P4-HRP*. Diluciones mayores de *m-Ab-P4* arrojaron valores pequeños de absorbancia. Cabe aclarar que el reactivo comercial de *m-Ab-P4* no trae especificado ni la concentración del mismo como tampoco la actividad asociada a la cantidad de paratopos por unidad de volumen. Por otro lado, si bien se realizó una estimación semi-cuantitativa de la concentración de *P4-HRP* (Capítulo 5, Sección 1.3.2), no es un valor exacto, por lo que es más preciso hablar de diluciones de las soluciones originales.

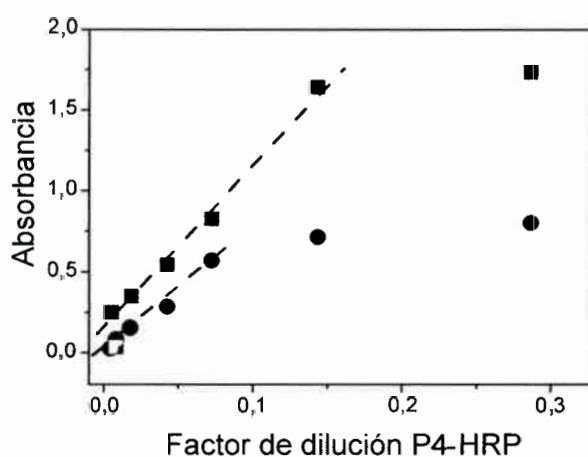


Figura 5.1.37. Optimización de la dilución de *m-Ab-P4* y de *P4-HRP* mediante espectroscopia UV-visible. $\lambda = 490 \text{ nm}$. Factor de dilución de *m-Ab-P4*: ■) 1/50, ●) 1/100.

Se desprende de la Figura 5.1.37 que, a medida que la cantidad de m-Ab-P4 creció (menor dilución), la absorbancia también aumentó. Para diluciones superiores a 1/500, no se observó una señal de absorbancia significativa. Por lo tanto, cabe suponer que mayor cantidad de m-Ab-P4 produciría aún mayor señal. Se podría trabajar a mayor concentración de m-Ab-P4 hasta alcanzar un máximo de adsorción de anticuerpo por la placa, en donde, por más anticuerpo que se agregue, la señal debido a la presencia de un antígeno conjugado no crecerá. También puede ocurrir que a concentraciones altas de m-Ab-P4 se produzca la formación de capas de anticuerpo una por encima de otra, en donde la interacción con el antígeno se dé únicamente con la capa externa, la cual es susceptible de desprenderse durante los lavados sucesivos, arrojando una lectura errónea [11,47]. Por otra parte, la saturación del mismo puede llevar a la imposibilidad de diferenciar pequeñas concentraciones de P4 en el ensayo competitivo [127]. Por lo tanto, dado que las lecturas de absorbancia son relativamente grandes, se eligió trabajar con una dilución 1/50 del reactivo comercial de m-Ab-P4.

La concentración de P4-HRP también incidirá en el comportamiento del inmunosensor. Pequeñas concentraciones de P4-HRP implicará pequeñas señales como respuesta, y no permitirá la discriminación de diferentes concentraciones de P4. La lectura estará acompañada por un error mayor. Por el contrario, para grandes concentraciones de conjugado, lo que se verá afectado es el ensayo de competencia entre P4 y P4-HRP. Para bajas concentraciones de P4 y altas de P4-HRP, los sitios de unión del m-Ab-P4 serán enlazados a los epítopes de la P4-HRP prácticamente en su totalidad (principio de acción de masas), dado que se encuentra en un gran exceso y no existirá competencia alguna entre P4 y P4-HRP.

Por lo general, se utilizan valores de concentración de conjugado (P4-HRP en este caso) los cuales caen dentro de la recta de un gráfico de señal vs concentración de conjugado, más precisamente una concentración que arroje una señal cercana al 50 % de la señal máxima, que es lo establecido generalmente para este tipo de ensayos (ver Capítulo 2, Sección 2.5) a fin de lograr una competencia para un amplio intervalo de concentración de antígeno (P4 en este caso).

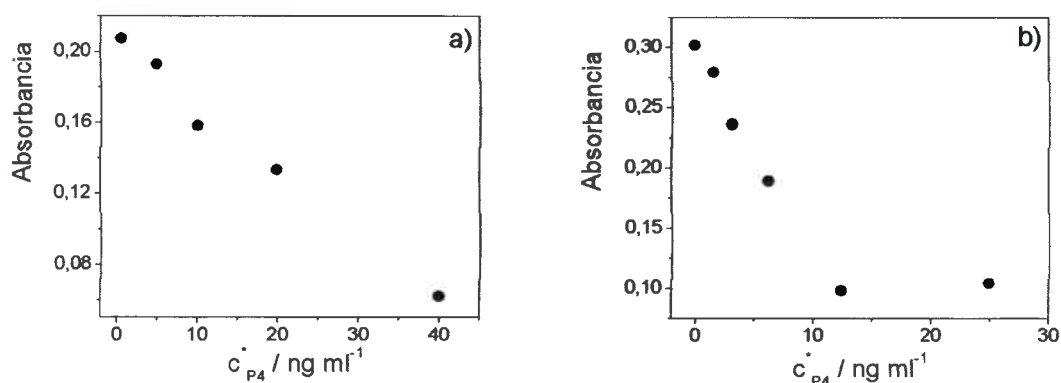
Dado que no se conoció con certeza la concentración de la solución de P4-HRP sintetizada y, habiendo encontrado una relación de P4 a HRP demasiado grande (ver Capítulo 5, Sección 1.3.2), a fin de elegir la concentración óptima de P4-HRP se realizó

un ensayo competitivo colorimétrico para diferentes concentraciones de P4-HRP, las cuales dieron una señal menor al 50 % de la señal máxima.

En la Figura 5.1.38 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo competitivo con distintas diluciones de P4-HRP. Un aumento en la concentración de P4-HRP produjo un aumento de la absorbancia, pero acotó el intervalo de concentración de P4 donde se mantiene la linealidad con la absorbancia, afectando claramente la competencia entre la P4 y la P4-HRP por los sitios activos del anticuerpo, o sea, se produjo una saturación del anticuerpo para bajas concentraciones de P4.

A la hora de elegir la concentración de conjugado se debe lograr un compromiso entre la sensibilidad y el intervalo de concentración para construir la curva de calibración. La concentración de P4-HRP elegida para diseñar el inmunoreactor se correspondió a una dilución 1/100, ya que se obtuvo una mayor pendiente y un amplio intervalo de linealidad de concentraciones de P4, los cuales se correspondieron a los valores de interés cuantitativo.

La rápida saturación del anticuerpo mostrada en el ensayo competitivo también soportó la suposición de que en el producto de síntesis dializado contiene P4-3-CMO que no ha reaccionado, la cual también participó del ensayo de competencia afectando el intervalo de concentraciones de P4 que compitió con P4-HRP (ver Capítulo 5, Sección 1.3.2).



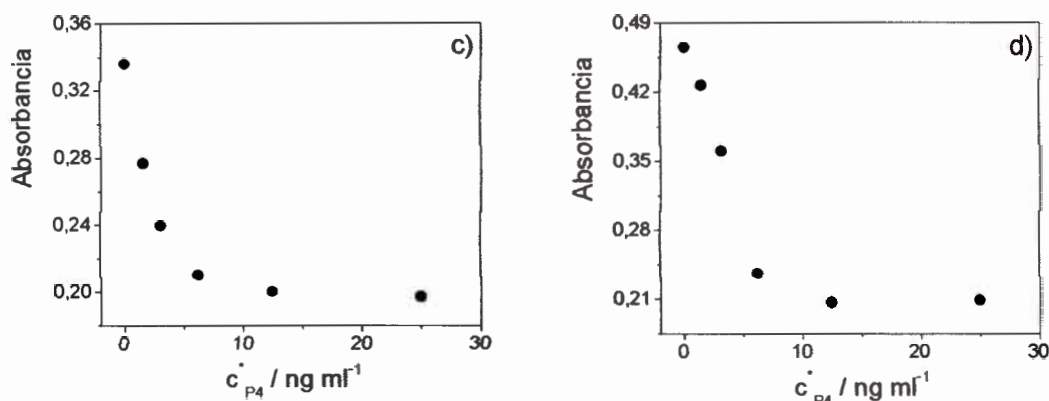


Figura 5.1.38. Optimización de P4-HRP. Ensayo ELISA colorimétrico para distintos factores de dilución de P4-HRP. a) 1/190, b) 1/100, c) 1/75, d) 1/55. Dilución de m-Ab-P4 = 1/50.

5.1.3.4. Estudios con el inmunoreactor

Los resultados obtenidos de los ensayos colorimétricos se utilizaron para la puesta a punto del inmunoreactor. El principio de funcionamiento del inmunoreactor consistió en la realización de la reacción inmune sobre la superficie del disco de teflón, el cual posee el m-Ab-P4 unido covalentemente por medio de VPCAP dentro de la celda de flujo, como se explicó en el Capítulo 5, Sección 1.3.1. Luego, se agregó H_2O_2 , sustrato de la enzima, conjuntamente con un mediador redox (catecol). En presencia de H_2O_2 , se generó un ciclo catalítico en donde el H_2O_2 fue reducido a H_2O por la HRP, la cual sufrió una oxidación. La enzima fue regenerada mediante la oxidación del catecol presente, el cual fue, a su vez, reducido sobre el electrodo de CV aplicando un potencial de $-0,150 \text{ V}$ vs alambre de Ag. De esta manera, la corriente de reducción estuvo relacionada a la cantidad de HRP presente (ver Figura 5.1.39), por lo tanto, fue proporcional a la cantidad de P4-HRP e inversamente proporcional a la cantidad de P4, dando lugar a una determinación en forma indirecta de la cantidad de hormona presente.

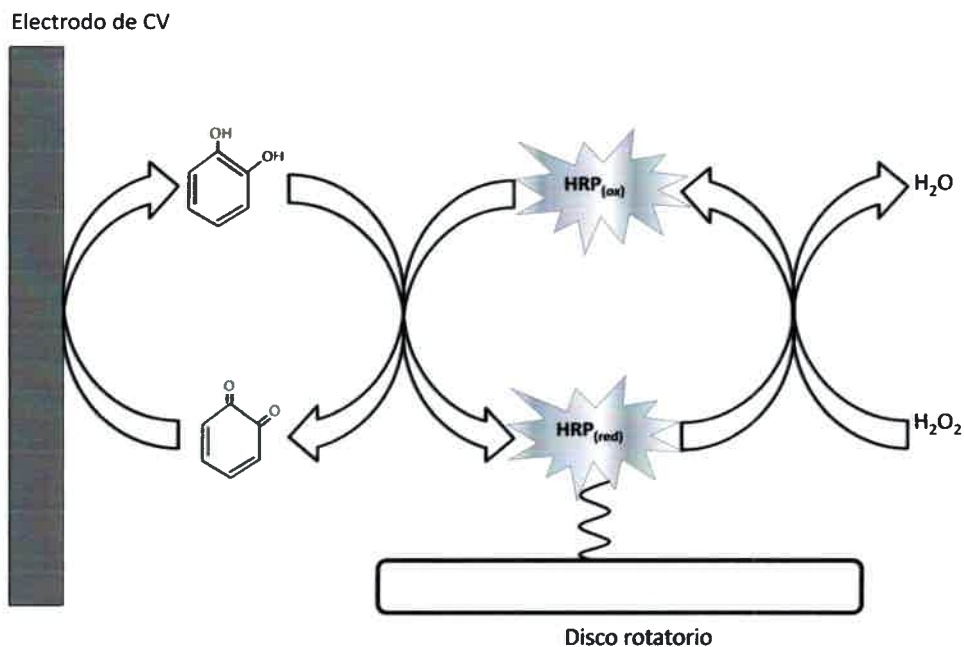


Figura 5.1.39. Representación esquemática del proceso de reducción enzimática en presencia de HRP conjugada, peróxido de hidrógeno y catecol para la determinación de P4.

En la Figura 5.1.40 se muestra un voltamperograma cíclico para la oxidación del catecol obtenido en SBC 0,01 M de pH = 5, el cual mostró un pico de oxidación a un potencial ($E_{p,ox}$) de 0,239 V vs Ag/AgCl y un pico de reducción complementario a un potencial ($E_{p,red}$) de 0,141 V vs Ag/AgCl. Este voltamperograma cíclico se obtuvo con la misma solución reguladora empleada en el inmunoreactor, pero en una celda convencional de dos cuerpos. Como en la celda de flujo se empleó un electrodo de pseudo-referencia de Ag y, dada la distribución de los electrodos en el reactor, se eligió aplicar para todas las experiencias un potencial de -0,150 V vs Ag con el fin de asegurar la completa reducción de la benzoquinona generada.

La implementación de un programa de flujo continuo - flujo detenido y la presencia de dos elementos independientes en el reactor (disco rotatorio y electrodo, ver Figura 5.1.39) permitió (i) bajas condiciones de carga del inmunoreactor, (ii) operación instantánea bajo condiciones de velocidad inicial alta, (iii) fácil detección del producto acumulado y (iv) disminución de la constante aparente de Michaelis-Menten (K'_M), lo que produjo un aumento en la velocidad de la reacción enzimática. Se alcanzó una

homogeinización más completa debido a que la celda actuó como una cámara de mezclado facilitando el arribo del antígeno a los sitios específicos de unión del anticuerpo, el arribo del sustrato enzimático a los sitios activos de la enzima y una liberación más eficiente de los productos de los mismos sitios. El resultado neto fue un aumento considerable en la corriente medida.

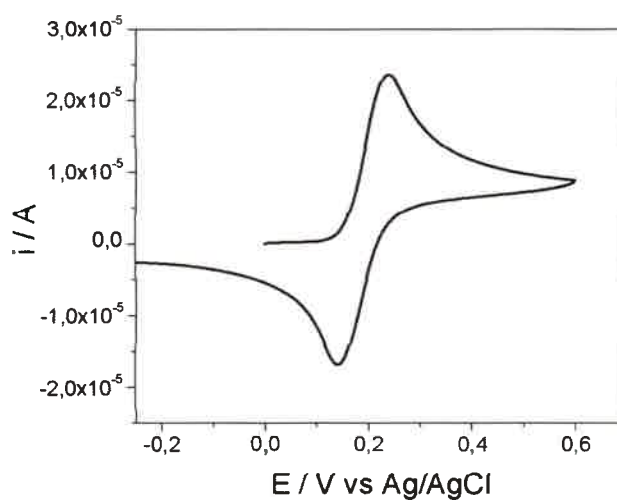


Figura 5.1.40. Voltamperograma cíclico de catecol $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ en SBC $0,01 \text{ M}$ de $\text{pH} = 5$. Electrodo de trabajo: CV, $v = 0,025 \text{ V s}^{-1}$.

El formato de trabajo del inmunoreactor fue el siguiente:

- inmovilización de $30 \mu\text{L}$ de solución $1/50$ de m-Ab-P4 sobre el disco.
- se llevó el disco a la celda, se hizo circular SBF $0,01 \text{ M}$ de $\text{pH} = 7$ a una velocidad de flujo (v) = 2 mL min^{-1} mientras el disco giraba a 180 r.p.m.
- se detuvo el flujo, se agregaron $200 \mu\text{L}$ de solución de leche descremada al 3% en SBF de $\text{pH} = 7$, impulsada por una bomba a través de una jeringa. Se dejó el flujo detenido agitando por 10 minutos a 180 r.p.m. La leche descremada actuó como agente bloqueante impidiendo adsorciones inespecíficas.
- se hizo circular SBF $0,01 \text{ M}$ de $\text{pH} = 7$ para enjuagar el disco y la celda a $v = 2 \text{ mL min}^{-1}$.

- se detuvo el flujo y se agregaron 150 μL de solución de P4 y HRP-P4 en SBP 0,01 M de pH = 7. A flujo nulo, se mantuvo el disco rotando por 30 minutos a 180 r.p.m. Se produjo la reacción de competencia por los paratopos del anticuerpo inmovilizado.
- se enjuagó el inmunoreactor haciendo circular SBF 0,01 M de pH = 7 a $v = 2 \text{ mL min}^{-1}$.
- por último, se detuvo el flujo y se agregaron 150 μl de una solución $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de H_2O_2 más $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de catecol en SBC 0,01 M de pH = 5. Cuando ingresó la solución, se aplica un potencial de -0,150 V vs Ag al electrodo de CV. Se agitó a 180 r.p.m. Todos los pasos desde el paso 2 se llevaron a cabo a 37 °C.
- la ruptura del complejo P4-mAb-P4 se realizó con SBC 0,05 M de pH = 2, a flujo detenido por 10 minutos.

Al momento de aplicar el potencial de reducción al electrodo de CV, la solución se encontró a flujo detenido agitándose a 180 r.p.m., por lo tanto, se alcanzó un gran valor de corriente en pocos segundos, oxidación de la benzoquinona, debido al ciclo catalítico. La corriente creció hasta el consumo del sustrato enzimático (H_2O_2) en la cámara del inmunoreactor. Los valores de concentración empleados para el H_2O_2 , como para las soluciones reguladoras utilizadas, fueron extraídas de la literatura, dado que existe un extenso estudio sobre ello (ver Capítulo 3, Sección 12). En la Figura 5.1.41 se muestra cómo varió la respuesta de corriente obtenida en función del tiempo de reacción en el inmunoreactor para dos concentraciones distintas de conjugado cuando se lee el valor de corriente cada un minuto. La respuesta en corriente creció linealmente a medida que el tiempo aumenta hasta el consumo del sustrato enzimático, a partir de lo cual, dicha linealidad comenzó a perderse.

Como era de esperar, a mayor concentración de P4-HRP se obtuvo una mayor corriente de reducción. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos para las experiencias colorimétricas de ELISA. Por lo tanto, se utilizó una solución de P4-HRP con un factor de dilución 1/100 de la solución original para el resto de las experiencias.

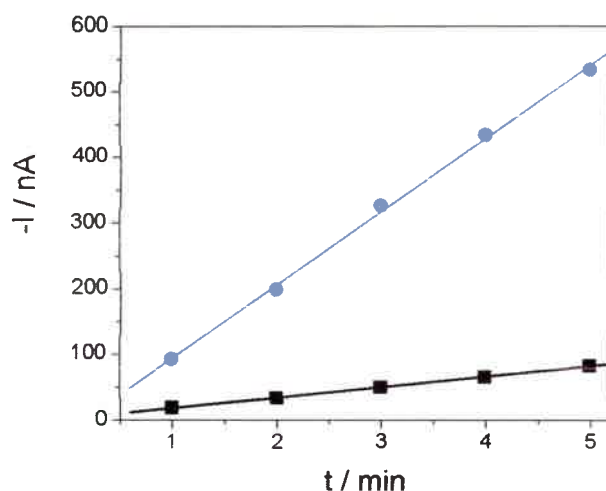


Figura 5.1.41. Variación de la corriente (I) en función del tiempo para dos concentraciones de P4-HRP. Factor de dilución: ●) 1/100, ■) 1/190. $c^*_{catecol} = 1 \times 10^{-3} M$, $c^*_{H_2O_2} = 1 \times 10^{-3} M$ en SBC 0,01 M de pH = 5. El flujo se detuvo por 5 minutos. Velocidad de rotación = 180 rpm.

La respuesta en corriente fue dependiente de la velocidad de rotación del disco de teflón cuando se aplicó el potencial de reducción de -0,150 V vs Ag. Si bien no se llevó a cabo un estudio detallado, se ha encontrado que la corriente aumentó para velocidades de rotación superiores a 60 r.p.m. hasta 180 r.p.m., para velocidades de rotación superiores la corriente permaneció prácticamente constante. El empleo de altas velocidades de rotación puede favorecer la disociación del complejo antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, para el resto de las experiencias se eligió trabajar con una velocidad de rotación de 180 r.p.m.

Con los valores de m-Ab-P4 y P4-HRP optimizados (dilución 1/50 y 1/100 respectivamente), se realizó un ensayo de competición entre P4 y P4-HRP para los valores de concentración de P4 de interés (inferiores a 25 ng mL^{-1}). En la Figura 5.1.42 se muestra la curva de calibración para el ensayo competitivo, elaborada para un tiempo de lectura de corriente de 1 minuto. La ecuación que mejor describió los valores experimentales fue:

$$I [\text{nA}] = 91,270 [\text{nA}] - 3,182 [\text{nA ng}^{-1} \text{ mL}] \times c^*_{P4} [\text{ng mL}^{-1}] \quad (5.1.10)$$

El coeficiente de correlación (r) obtenido fue de $-0,992$.

Para el mismo ensayo, se realizó la curva de calibración leyendo la corriente a tiempos mayores. Para tiempos de lectura superiores a 2 minutos, se produjeron fluctuaciones entre las lecturas de corriente y la concentración. El ensayo competitivo realizado en el inmunoreactor mostró el mismo comportamiento que el encontrado por el método de ELISA colorimétrico (ver Figura 5.1.38.b), en donde se alcanzó una respuesta lineal para concentraciones de P4 menores a 15 ng mL^{-1} . Para concentraciones de P4 mayores, la respuesta obtenida se desvió de la linealidad, debido probablemente a la saturación de los anticuerpos unidos a la superficie del disco, como es comúnmente encontrado para ensayos competitivos similares, en donde las curvas de calibración poseen formas sigmoideas [11,47].

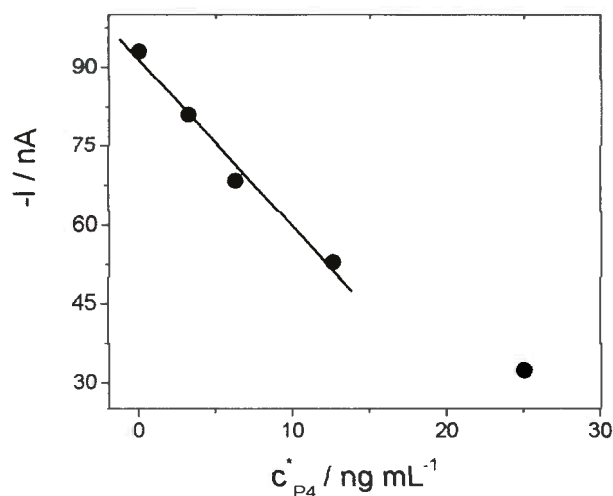


Figura 5.1.42. Curva de calibración de P4. Dilución de $m\text{-Ab-P4} = 1/50$. Dilución de $P4\text{-HRP} = 1/100$. $c_{\text{catecol}}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $c_{\text{H}_2\text{O}_2}^* = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ en SBC $0,01 \text{ M}$ de $\text{pH} = 5$. El flujo se frenó por 1 minuto. Velocidad de rotación = 180 rpm .

Se realizó una correlación entre el método amperométrico y el método colorimétrico ELISA. Trabajando con escalas normalizadas (se normalizaron dividiendo cada valor por el mayor para cada método) se obtuvo una excelente correlación con una pendiente = $1,04$, una ordenada al origen = $0,002$ y un coeficiente de correlación de $0,992$ (Figura 5.1.43).

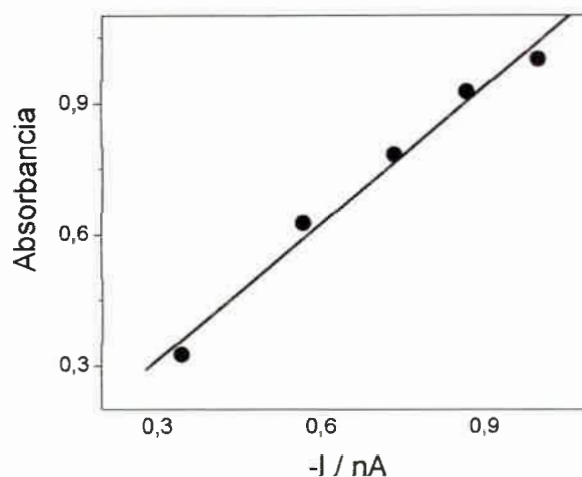


Figura 5.1.43. Correlación entre los métodos colorimétrico y amperométrico, para respuestas normalizadas. Pendiente: 1,04; ordenada al origen = 0,002; $r = 0,992$ y $SD = 0,034$.

Con el objetivo de disminuir el tiempo de la experiencia y buscando también ampliar el intervalo de concentraciones de P4 en el ensayo competitivo, se disminuyó la velocidad de rotación del disco de teflón y el tiempo de incubación de P4 y P4-HRP. Por lo tanto, el ensayo de competencia se realizó con un tiempo de 15 minutos y con una velocidad de agitación del disco de teflón de 40 r.p.m. En la Figura 5.1.44 se muestra la variación de la corriente con el tiempo para tres concentraciones distintas de P4. Como cabe esperar, al ser menor el tiempo para la interacción antígeno-anticuerpo, la corriente observada fue menor a la encontrada anteriormente. Sin embargo, los valores de corriente observados fueron significativos, con la ventaja de haber disminuido el tiempo de competencia a la mitad, siendo éste aspecto importante para una técnica analítica.

Bajo estas nuevas condiciones, se realizó una curva de calibración con tiempos de lectura de 1 y 2 minutos. Todos los puntos fueron realizados por triplicados. Las curvas se muestran en las Figuras 5.1.45.a y 5.1.45.b, respectivamente. Como se encontró anteriormente, la linealidad entre la corriente y la concentración se mantuvo hasta $12,5 \text{ ng mL}^{-1}$. Para concentraciones mayores, la corriente tendió a ser constante (la curva tiende a una forma sigmoide en el extremo). La región lineal para ambas figuras fue descrita por las siguientes ecuaciones:

Tiempo de lectura = 1 minuto

$$I [\text{nA}] = 35,460 [\text{nA}] - 3,052 [\text{nA ng}^{-1} \text{ mL}] \times c^*_{\text{P4}} [\text{ng mL}^{-1}] \quad (5.1.11)$$

$$r = -0,998$$

Tiempo de lectura = 2 minutos

$$I [\text{nA}] = 52,202 [\text{nA}] - 3,196 [\text{nA ng}^{-1} \text{ mL}] \times c^*_{\text{P4}} [\text{ng mL}^{-1}] \quad (5.1.12)$$

$$r = -0,998$$

Como se puede apreciar en las curvas de trabajo anteriormente planteadas, los valores de ordenada al origen fueron menores que la de la curva de trabajo mostrada en la Figura 5.1.42. Esto hecho fue debido a los menores valores de corriente leídos dado que hubo un menor tiempo de incubación en la etapa de competición entre P4 y P4-HRP. Sin embargo, los valores de pendiente fueron similares para todos los casos, por lo que la sensibilidad fue similar cuando el ensayo competitivo se realizó incubando por 30 minutos o por 15 minutos, con la ventaja en este último caso de disminuir el tiempo de la experiencia a la mitad.

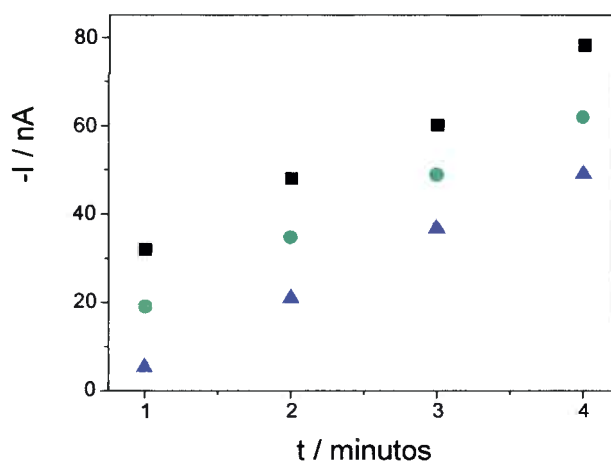


Figura 5.1.44. Variación de la corriente (I) en función del tiempo para diferentes concentraciones de P4 (ng mL^{-1}): ■ 1, ● 5, ▲ 10. Dilución de P4-HRP = 1/100 $c^*_{\text{catecol}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $c^*_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ en SBC 0,01 M de pH = 5. Velocidad de rotación = 180 r.p.m. El flujo se detuvo por 5 minutos.

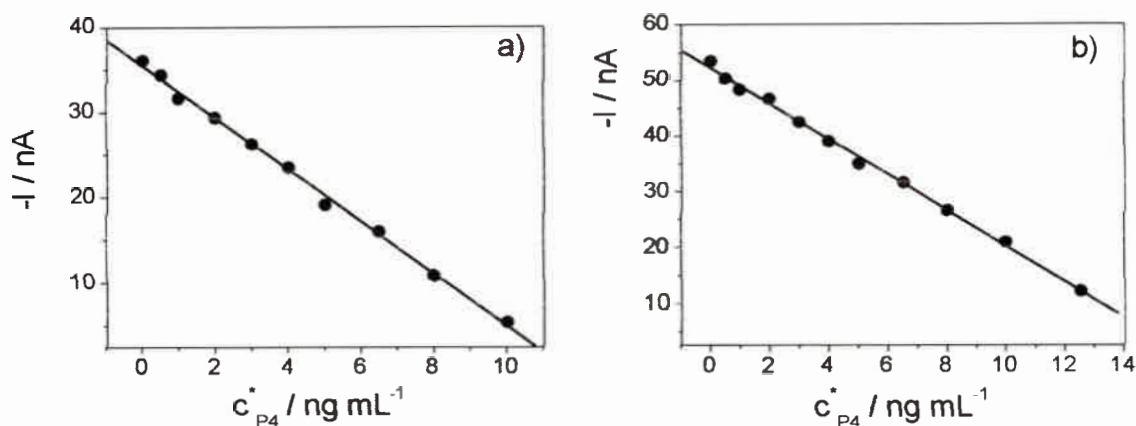


Figura 5.1.45. Curva de calibración de P4. Tiempo de lectura (minutos): a) 1 y b) 2. Dilución de *m*-Ab-P4 = 1/50. Dilución de P4-HRP = 1/100. $c^*_{catecol} = 1 \times 10^{-3} M$, $c^*_{H_2O_2} = 1 \times 10^{-3} M$ en SBC 0,01 M de pH = 5. El flujo se detuvo por 2 minutos. Velocidad de rotación = 180 rpm. Los puntos son un promedio de tres mediciones.

La respuesta de la técnica amperométrica de flujo continuo/detenido cuando se leyó a dos minutos, se comparó con la respuesta de absorbancia obtenida para los ensayos de ELISA colorimétrico (técnica comúnmente empleada para la cuantificación de hormonas). Nuevamente, se encontró una muy buena correlación entre ambos métodos (Figura 5.1.46).

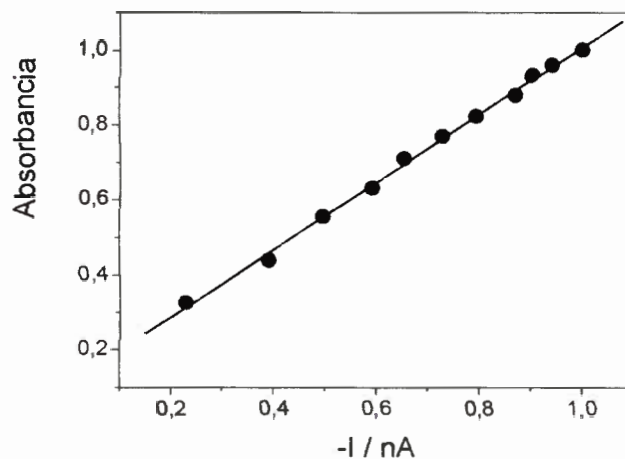


Figura 5.1.46. Correlación entre los métodos colorimétricos y amperométricos, para respuestas normalizadas. Pendiente: 1,04; ordenada al origen = 0,002; $r = 0,992$ y $SD = 0,034$.

Por lo tanto, el formato final de trabajo para el inmunoreactor amperométrico propuesto es:

- 1- Inmovilización de 30 μL de solución 1/50 de m-Ab-P4 sobre el disco.
- 2- Se lleva el disco a la celda, se hizo circular SBF 0,01 M de pH = 7 a una velocidad de flujo (v) = 2 mL min^{-1} mientras el disco giró a 180 r.p.m.
- 3- Se detiene el flujo, se agregaron 200 μL de solución de leche descremada al 3 % en SBF de pH = 7. Se deja el flujo detenido agitando por 10 minutos a 180 r.p.m.
- 4- Se hace circular SBF 0,01 M de pH = 7 para enjuagar el disco y la celda a $v = 2$ mL min^{-1} .
- 5- Se detiene el flujo y se agregan 150 μL de solución de P4 y HRP-P4 en SBP 0,01 M de pH = 7. A flujo nulo, se mantiene el disco rotando por 15 minutos a 40 r.p.m.
- 6- Se enjuaga el disco haciendo circular SBF 0,01 M de pH = 7 a $v = 2$ mL min^{-1} .
- 7- Se detiene el flujo y se agregan 150 μl de una solución 1×10^{-3} M de H_2O_2 + 1×10^{-3} M de catecol en SBC 0,01 M de pH = 5. Cuando ingresa la solución, se aplica un potencial de -0,150 V vs Ag. Se agita a 180 r.p.m. Todos los pasos, desde el paso 2, se llevan a cabo a 37 °C.
- 8- La ruptura del complejo P4-mAb-P4 se realiza con SBC 0,05 M de pH = 2, a flujo detenido por 10 minutos.

De esta manera, se realizó un análisis estadístico para la determinación de P4 en SBP 0,01 M de pH = 7, como se observa en la Tabla 5.1.5.

Tabla 5.1.5. Análisis estadístico para la respuesta del inmunoreactor.

MCM	0,5 ng mL ⁻¹
S (nA ng ⁻¹ mL)	3.196
CV	4,51 %

MCM = menor concentración medida.

Sensibilidad (S): definida como la pendiente de la regresión lineal de la corriente.

Coefficiente de variación (CV) para una concentración de P4 de 5 ng mL⁻¹, medida por triplicado.

Bajo las condiciones encontradas, se realizó la determinación de P4 en una muestra de suero de un padrillo. Como la muestra de suero proviene de un padrillo, el

contenido de P4 en la misma es prácticamente nulo, por lo tanto, al suero se le agregó solución de P4 preparada en BPS 0,01 de pH = 7, de manera tal que la concentración de BPS fuese la menor posible en el suero, y así evitar una gran dilución del mismo. De esta forma, se prepararon dos muestras de suero conteniendo 1 y 5 ng mL⁻¹ de P4. A las muestras de suero se le agregó una cantidad constante de P4-HRP, de manera tal de tener una dilución 1/100 de conjugado para poder realizar el ensayo competitivo. Las muestras de suero fueron introducidas en el inmunoreactor sin pretratamiento previo alguno. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.1.6. Las muestras fueron medidas por triplicado.

Por otro lado, la estabilidad del inmunosensor fue relativamente alta. La unión del anticuerpo sobre el disco rotatorio, vía enlace covalente con los grupos amino de VPCAP, fue muy estable. El disco rotatorio con el anticuerpo fue usado y posteriormente guardado a 5 °C en SBP 0,01 M de pH = 7. De esta manera, el disco con el m-Ab-P4 inmovilizado presentó una estabilidad de 25 días, la cual fue determinada para una concentración constante de P4-HRP. Luego de este período de tiempo, la respuesta presentó una disminución paulatina con el correr de los días, indicando la descomposición del anticuerpo.

Tabla 5.1.6. Análisis estadístico de la respuesta del inmunoreactor para dos muestras de suero con distintos agregados de P4.

P4 en dos muestra de suero (ng mL ⁻¹)	I / (nA) ^a	Valor de P4 determinado (ng mL ⁻¹)	CV %	Recuperación %
1	48,76	1,08	4,02	108
5	35,90	5,10	5,80	102

^aLos valores de corriente representan un promedio de tres mediciones.

5.2. Comparación de los límites de detección encontrados

Durante el desarrollo de ésta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo determinaciones de P4 mediante el empleo de diferentes técnicas electroanalíticas en medio orgánico y acuoso, bajo distintas modalidades. A modo comparativo, en la Tabla 5.2.1 se presentan

los resultados obtenidos para la cuantificación de P4 en los diferentes medios estudiados.

Tabla 5.2.1. Comparación de los límites de detección encontrados para las distintas determinaciones realizadas en los medios empleados.

Técnica Empleada	Solución de trabajo	Límite de detección / ng mL ⁻¹
VOC (determinación directa)	ACN + 0,1 M de HTBA	157 ng mL ⁻¹
VOC (determinación directa)	5 % ACN + 95 % SBB 0,05 M de pH = 8	35,34 ng mL ⁻¹
Cronoamperometría (inmunoensayo)	SBP 0,01 M de pH = 7	0,5 ng mL ⁻¹

Como se puede apreciar de los valores mostrados en la Tabla 5.1.2, el límite de detección de P4 más pequeño se alcanzó cuando la determinación se realizó por medio de un inmunoensayo competitivo empleando cronoamperometría en una celda de flujo (Capítulo 5, Sección 5.1.3). Este resultado pone en evidencia que el empleo de biosensores, en este caso inmunosensores, constituye una herramienta fundamental y con grandes ventajas a la hora de determinar analitos de origen biológico, ya sea animal o vegetal, como en este caso.

Si bien la VOC es una técnica analítica por excelencia, la determinación de P4 de manera directa no arrojó resultados satisfactorios para determinar la hormona en a niveles de trazas. Cuando se llevó a cabo la adsorción de P4 en la superficie del electrodo (Capítulo 5, Sección 5.1.2) se ganó significativamente en sensibilidad en comparación a la determinación de la hormona presente solución de ACN.

El empleo de un anticuerpo monoclonal permitió la captura de la P4 presente en el medio y, mediante un ensayo competitivo, se logró un límite de detección muy bajo empleando la cronoamperometría, aparte de mostrar una gran selectividad por P4, siendo de gran importancia a la hora de trabajar con muestras complejas como lo es el suero bovino. Estos resultados fueron consistentes con los encontrados en la literatura para la determinación de P4 y hormonas similares [16,17].

CAPITULO 6

6. Conclusiones

En este trabajo de Tesis Doctoral se han desarrollado diferentes estudios acerca de la progesterona (P4) con distintas finalidades. Por lo tanto, las conclusiones se presentan en dos secciones, abarcando, por un lado, los estudios cinéticos heterogéneos de P4, tanto en solución como para los procesos superficiales y, por el otro, la determinación analítica de P4 en sueros bovinos mediante el desarrollo de un inmunosensor electroquímico.

6.1. Estudios cinéticos heterogéneos en solución y para procesos de adsorción

Se ha avanzado significativamente en la elucidación del mecanismo de la reducción electroquímica de progesterona sobre electrodos de carbono vítreo en ACN + 0,1 M $N(C_4H_9)_4PF_6$. Los resultados encontrados permitieron generar una propuesta para el mecanismo de electroreducción de P4, en la cual se contempla la formación de un anión radical en una primera transferencia electrónica, seguida de una reacción de dimerización sustrato/anión radical, el cual produce un dímero anión radical, que es posteriormente electroreducido a dímero dianión en una segunda transferencia electrónica. El dianión es protonado luego, posiblemente, por el mismo solvente. Los parámetros cinéticos, termodinámicos y difusionales de las reacciones heterogéneas y homogéneas fueron obtenidos, para el mecanismo propuesto, tanto por el análisis clásico de los datos experimentales como por el ajuste digital de los voltamperogramas cíclicos obtenidos.

En solución acuosa reguladora de pH = 8, la P4 se adsorbe sobre la superficie de electrodos de CV. Se obtuvo la isoterma de adsorción que mejor describe la interacción específica de P4 con la superficie de electrodos de CV, siendo la isoterma de *Frumkin* el modelo que mejor ajusta los datos experimentales. La adsorción está caracterizada por una dependencia de la energía libre de Gibbs con la temperatura. Se determinó la existencia de interacciones laterales entre moléculas vecinas de P4 adsorbidas, las

cuales se ven debilitadas con el aumento de la temperatura. Se determinaron los parámetros termodinámicos que caracterizan dicho proceso de adsorción y también la constante de velocidad heterogénea aparente de transferencia de electrones para la P4 adsorbida.

6.2. Inmunosensor para la determinación de P4 en muestras de suero

Se logró desarrollar un inmunosensor electroquímico de P4 con capacidad para determinar la misma a niveles de trazas en el intervalo de concentraciones de interés en sueros de origen animal, particularmente bovino. Asimismo, se pudo determinar P4 en tales muestras de suero sin la necesidad de pretratamiento alguno, lo cual indica la gran selectividad del anticuerpo empleado y la escasa a nula acción de posibles interfrentes. Por otro lado, cabe resaltar que la determinación de P4 se lleva a cabo en un sistema de flujo cerrado, en donde cada paso es controlado mediante la adición de volúmenes perfectamente medibles, arrojando valores de carácter cuantitativo en tiempos y a costos muy razonables. Por ello, esta metodología surge como una alternativa atractiva a las técnicas actuales de determinación de P4 en suero. Además, se logró sintetizar con éxito la unión entre dos moléculas biológicas (progesterona y enzima peroxidasa de rábano picante), lo cual permitió la realización de un ensayo competitivo. Este resultado es importante, dada la imposibilidad de conseguir en forma comercial la progesterona conjugada con una enzima a la fecha de ejecución de este trabajo.



CAPITULO 7

7. Bibliografía

- 1 W. B. Pratt, *J. Cell. Biochem.*, **35** (1987) 51.
- 2 C. W. Bardin, (Eds), "Progesterone and progestins". Raven Press, New York, 1982.
- 3 L. E. McDonald, (Ed) "Veterinary endocrinology and reproduction" 4th Ed. Lea & Febinger, Philadelphia, London. 1989.
- 4 P. L. Senger. "The luetal phase of the oestrus cycle". En: "Pathways to Pregnancy and Parturition". Current Conceptions, Inc. Washington State University. Pullman, WA, USA, 1997.
- 5 G. England, W. Concannon. "Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations". En: "Recent advances in small animal reproduction". International Veterinary Information Service. www.ivis.org. Ithaca, New York, USA, 2002.
- 6 Y. Gao, *Br. Vet. J.*, **144** (1988) 262.
- 7 R. B. J. Herp, *Agric. Sci.*, **81** (1973) 151.
- 8 H. Kindahl, J.O. Lindell, L. E. Edquist, 9th International Congress on Animal Reproduction and AI. (España), **2** (1980) 17.
- 9 G. E. Lamming, D. Wathes, A. R. J. Peters, *Reprod. Fert.*, **30** (1981) 155.
- 10 V. Pucci, F. Bugamelli, R. Mandrioli, B. Luppi, M. Raggi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30** (2003) 1549.
- 11 S. S. Deshpande, "Enzyme Immunoassays, from concept to product development". Chapman & Hall (Eds), New York, 1996.
- 12 P. W. Concannon, G. England, J. Verstegen (Eds), "Recent Advances in small Animal Reproduction". International Veterinary Information, Ithaca, New York, 2002.
- 13 J. P. Hart, R. M. Pemberton, R. Huxton, R. Wedge, *Biosens. Bioelectron.*, **12** (1997) 1113.
- 14 R. W. Claycomb, M. J. Delwiche, C. J. Munro, R. H. Bon Durant, *Biosens. Bioelectron.*, **13** (1998) 1165.
- 15 R. W. Claycomb, M. J. Delwiche, *Biosens. Bioelectron.*, **13** (1998) 1173.

- 16 J. J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, G. Castañeda Peñalvo, *Electroanal.*, **11** (1999) 268.
- 17 V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Seldeño, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, **596** (2007) 86.
- 18 L. G. Chatten, R. N. Yadav, D. K. Madan, *Pharm. Acta Helv.*, **51** (1976) 381.
- 19 H. S. De Boer, J. Den Hartigh, H. H. J. L. Ploegmakers, W. J. Van Oort, *Anal. Chim. Acta*, **102** (1978) 141.
- 20 H. S. De Boer, W. J. Van Oort, P. Zuman, *Anal. Chim. Acta*, **130** (1981) 111.
- 21 J. Wang, P.A.M. Farias, J.S. Mahmoud, *Anal. Chim. Acta* **171** (1985) 195.
- 22 M. M. Ghoneim, W. Baumann, E. Hammam, A. Tawfik, *Talanta* **64** (2004) 857.
- 23 A. L. Woodson, D. E. Smith, *Anal. Chem.*, **42** N° 2, (1970) 242.
- 24 J.C. Schaar, D. E. Smith, *Anal. Chem.*, **54** (1982) 1589.
- 25 M. R. Rifi, F. H. Covitz (Eds), "Introduction to Organic Electrochemistry. Techniques and Applications in Organic Synthesis", 1974, Marcel Dekker, New York.
- 26 M. M. Baizer, H. Lund (Eds), "Organic Electrochemistry: An Introduction and a Guide", 3rd Ed., 1997, Marcel Dekker, New York.
- 27 A. Yamura, T Sekine, K. Sugino, *J. Electrochem. Soc. Jpn.*, **34** (1966) 110.
- 28 W. N. Epimakhov, *Electrochimia*, **6** (1970) 322.
- 29 A. Albisson, G. Mousset, J. Simonet, *C. R. Acad. Sci. Ser. C*, **272** (1971) 646.
- 30 R. M. Powers, R. A. Day, *J. Org. Chem.*, **24** (1995) 722.
- 31 M. Gratzel, A. Henglein, K. M. Bansal, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **77** (1973) 6.
- 32 A. M. Bond, I. D. Heritage, *Anal. Chim. Acta*, **127** (1981) 135.
- 33 M. Brezina, P. Zuman, "Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy", Interscience, New York, 1958.
- 34 P. Kabaskalian, S. De Lorenzo, J. McGlotten, *Anal. Chem.*, **28** (1956) 1669.
- 35 A. I. Cohen, *Anal. Chem.*, **35** (1963) 128.
- 36 P. Zuman, *Talanta*, **12** (1965) 1337.
- 37 A. J. Bard, A. Ledwith, H. J. Shines; "Advances in Physical Organic Chemistry", V. Gold, D. Bethell (Eds), Academic Press, N° 13, 1976.
- 38 L. Nadjo, J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **44** (1973) 327.
- 39 V. D. Parker. *Acta Chemica Scand.*, **52** (1998) 154.
- 40 M. Velasco-García, T. Mottram, *Biosystems Engineering*, **84** (2003) 1.

- 41 J. Wang (Ed). "Analytical Electrochemistry", 3rd Ed., 2006, Jhon Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- 42 G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Baggiani, L. Anfossi, C. Tozzi, *Anal. Chim. Acta*, **417** (2000) 95.
- 43 V. Carralero, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingaron, *Electroanal.*, **19** (2007) 853.
- 44 H. Gao, J. Lu, Y. Cui, X-X. Zhang, *J. Electroanal. Chem.*, **592** (2006) 88.
- 45 D. E. Mais, J. S. Hayes, R. B. Heap, M. W. Wang, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **54** (1995) 63.
- 46 B. Hock, *Anal. Chim. Acta*, **347** (1997) 177.
- 47 J. R. Crowther, "ELISA, Theory and Practice. Methods in Molecular Biology". 42sd Ed. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 1995.
- 48 L. D. Mello, L. T. Kubota, *Food Chemistry*, **77** (2002) 237.
- 49 L. Gorton (Ed), "Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques", 44rd Ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 2005.
- 50 P. D'Orazio, *Clin. Chim. Acta*, **334** (2003) 41.
- 51 C. L. Morgan, D. L. Newman, C. P. Price, *Clin. Chem.*, **42** (1996) 193.
- 52 R. H. Hall, *Microbes and Infection*, **4** (2002) 425.
- 53 F. J. Arévalo, P. G. Molina, M. A. Zón, H. Fernández, *J. Electroanal. Chem.*, **619-620** (2008) 46.
- 54 V. V. R. Sai, S. Mahajan, A. Q. Contractor, S. Mukherji, *Anal. Chem.*, **78** (2006) 8368.
- 55 H. Anderson, M. Jönsson, L. Vestling, U. Lindberg, T. Aastrup, *Sensors & Actuators B* **123**(2007) 27.
- 56 G. Farace, G. Lillie, T. Hianik, P. Payne, P. Vadgama, *Bioelectrochem.*, **55** (2002) 1.
- 57 A. Tlili, A. Abdenlghani, S. Ameer, N. Jaffrezic-Reanult, *Mat. Sci. Eng. C* **26** (2006) 546.
- 58 H. Huang, P. Ran, Z. Liu, *Bioelectrochem.*, **70** (2007) 257.
- 59 Y. C. Wang, Z. Q. Guo, Y. Z. Li, W. B. Chang, *Biomed. Environ. Sci.*, **15** (2002) 103.
- 60 J. P. Gosling, *Clin. Chem.*, **36** (1990) 1408.
- 61 H. J. Motulsky, L. C. Mahan, *Mol. Pharmacol.*, **25** (1983) 1.

- 62 P. Önnérjford, S. A. Eremin, J. Ennéus, G. Marko-Varga, *J. Immunol. Methods*, **213** (1998) 31.
- 63 P. M. Keane, W. H. C. Walker, J. Gauldie, G. E. Abraham, *Clin. Chem.*, **22** (1976) 70.
- 64 A. Ramanavicius, A. Ramanaviciene, A. Malinauskas, *Electrochim. Acta*, **51** (2006) 6025.
- 65 S. F. D'Souza, *Biosens. Bioelectron.*, **16** (2001) 337.
- 66 D. Butler, G. Guilbault, *Sensors & Actuators B* **113** (2006) 692.
- 67 G. Volpe, G. Fares, F. delli Quadri, R. Draisci, G. Ferretti, C. Marchiafava, D. Moscone, G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta*, **572** (2006) 11.
- 68 L. Micheli, R. Grecco, M. Badea, D. Moscone, G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.*, **21** (2005) 588.
- 69 D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, *Anal. Chem.*, **80** (2008) 1582.
- 70 E. M. Abad-Villar, M. T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, *Anal. Chim. Acta*, **409** (2000) 149.
- 71 S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.*, **14** (1999) 443.
- 72 J. J. Gooding, C. Wasiowych, D. Barnett, D. Brynn Hibbert, J. N. Barisci, G. G. Wallace, *Biosens. Bioelectron.*, **20** (2004) 260.
- 73 B. D. Malhotra, A. Chaubey, S. P. Singh, *Anal. Chim. Acta*, **578** (2006) 59.
- 74 A. Sargent, T. Loi, S. Gal, O. A. Sadik, *J. Electroanal. Chem.*, **470** (1999) 144.
- 75 S. Grant, F. Davis, K. A. Law, A. C. Barton, S. D. Collyer, S. P. J. Higson, T. D. Gibson, *Anal. Chim. Acta*, **537** (2005) 163.
- 76 R. N. Silva, E. R. Asquieri, K. F. Fernandes, *Process Biochem.* **40** (2005) 1155.
- 77 F. Darain, S-U. Park, Y-B. Shim, *Biosens. Bioelectron.*, **18** (2003) 773.
- 78 F. Darain, D-S. Park, J-S. Park, Y-B. Shim, *Biosens. Bioelectron.*, **19** (2004) 1245.
- 79 H. Korri-Youssoufi, C. Richard, A. Yassar, *Mat. Sci. Eng., C* **15** (2001) 307.
- 80 M. Murata, M. Nakayama, H. Irie, K. Yakabe, K. Fukuma, Y. Katayama, M. Maeda, *An. Sci.*, **17** (2001) 387.
- 81 A. Tlili, A. Abdelghani, S. Ameer, N. Jaffrezic-Renault, *Mat. Sci. Eng. C* **26** (2006) 546.
- 82 G. A. Messina, A. A. J. Torriero, I. E. De Vito, R. A. Olsina, J. Raba, *Anal. Biochem.*, **337** (2005) 195.

- 83 C. M. Brett, A. M. Oliveira Brett, "Electrochemistry Principles, Methods and Applications" Oxford Science Publications, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- 84 A. J. Bard, L. R. Faulkner (Eds), "Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications", Jhon Wiley & Sons, New York, USA, 2001.
- 85 D. J. Ives, G. J. Janz, "Reference Electrodes", Academic press, New York, 1994.
- 86 P. T. Kissinger and W. R. Heineman, "*Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*". 2da. Ed., Marcel Dekker Inc., Estados Unidos, 1996.
- 87 A. Ulman, "An Introduction to Ultrathin Organics Films: from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly", Academic Press, Boston, MA, 1991.
- 88 A. J. Arvia, M. C. Giordano, "Electrocatalisis. Aspectos básicos y sus aplicaciones". Coop. Gral. Belgrano, Buenos Aires, Argentina, 1982.
- 89 H. Freundlich, "Colloid and Capillary Chemistry", Methuen, London, 1926.
- 90 A. W. Adamson (Ed), "Physical Chemistry of Surfaces", Jhon Wiley & Sons Inc. New York, USA, 1990.
- 91 E. Giannakopoulos, Y. Deligiannakis, *Langmuir* **23** (2007) 2453.
- 92 J. Lyklema, *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, vol. 2, Academic Press, London, 1995.
- 93 R. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.*, **36** (1964) 706.
- 94 R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, **37** (1965) 1351.
- 95 R. S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.*, **37** (1965) 178.
- 96 J. C. Imbeaux, J. M. Savèant, *J. Electroanal. Chem.*, **44** (1973) 169.
- 97 J. Osteryoung, "*Primer on Electrochemistry*", State University of New York at Buffalo, Buffalo, New York, 1980.
- 98 K. B. Oldham and J. C. Myland, "*Fundamentals of Electrochemical Science*", Academic Press, Estados Unidos, 1994.
- 99 L. Ramaley, M. S. Krause, Jr., *Anal. Chem.*, **41** (1969) 1362.
- 100 M. S. Krause, Jr., L. Ramaley, *Anal. Chem.*, **41** (1969) 1365.
- 101 J. H. Christie, J. A. Turner and R. A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **49** (1977) 1899.
- 102 J. G. Osteryoung, R. A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 101A.
- 103 T. Cambara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **27** (1954) 527.
- 104 S. C. Rifkin, D. H. Evans, *Anal. Chem.*, **48** (1976) 1616.
- 105 J. Osteryoung, J. J. O'Dea, *J. Electroanal. Chem.*, **14** (1986) 209.

- 106 J. J. O'Dea, J. Osteryoung, R. A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **53** (1981) 695.
- 107 A. Pérez, E. Guerra, A. Labrada, *Biotecnología Aplicada*, **16** (1999) 31.
- 108 M. A. Zón, M. B. Moressi, L. Sereno, H. Fernández, *Bol. Soc. Chil. Quím.*, **39** (1994) 139.
- 109 D. M. Anjo, M. Kahr, M. M. Khodabakhsh, S. Nowinski, M. Wagner, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2603.
- 110 J. O'M Bockris, A. K. Reddy, *Modern Electrochemistry*, vol. 1, Plenum Publishing Corp., New York, 1973.
- 111 A.M. Bond, M. Fleischman, J. Robinson, *J. Electroanal. Chem.* **168** (1984) 299.
- 112 C. C. Van Kierk, G. Fioravanti, L. Mattiello, L. B. Rampazzo, N. A. Macías-Ruvalcaba, D. H. Evans, *J. Electroanal. Chem.*, **582** (2005) 151.
- 113 M. Lovric, S. Komosky-Lovric, *J. Electroanal. Chem.*, **248** (1988) 239.
- 114 K. B. Oldham, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 2296.
- 115 C. P. Andrieux, L. Nadjo, J. M. Saveant, *J. Electroanal. Chem.*, **26** (1970) 147.
- 116 C. P. Andrieux, L. Nadjo, J. M. Saveant, *J. Electroanal. Chem.*, **42** (1973) 223.
- 117 E. M. Abbot, A. J. Bellamy, J. B. Kerr, I. S. MacKirdy, *J. Chem. Soc. Perkin Trans., II* (1982) 425.
- 118 F. Effenberger, W. D. Stohrer, K. E. Mack, F. Reisinger, W. Seufert, H. A. Kramer, R. Foll, E. Vogelmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990) 4849.
- 119 F. G. Bordwell, *Acc. Chem. Res.*, **21** (1988) 456.
- 120 L. Nadjo, J. M. Saveant, *J. Electroanal. Chem.*, **33** (1971) 419.
- 121 J. W. Hayes, I. Ruzic, D. E. Smith, G. L. Booman, J. L. Delmastro, *J. Electroanal. Chem.*, **51** (1974) 269.
- 122 J. M. Saveant, D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.*, **61** (1975) 251.
- 123 M. B. Moressi, M. A. Zón, H. Fernández, *Can. J. Chem.*, **80** (2002) 1232.
- 124 N. A. Macías-Ruvalcaba, D. H. Evans, *J. Electroanal. Chem.*, **585** (2005) 150.
- 125 K. Izutsu, in: *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*, Wiley-VCH, New York, 2002.
- 126 R. M. Pemberton, J. P. Hart, J. A. Foulkes, *Electrochim. Acta*, **43** (1998) 3567.
- 127 R. M. Pemberton, J. P. Hart, T. T. Mottram, *Biosens. Bioelectron.*, **16** (2001) 715.
- 128 I. F. Hu, D. Karweik, T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem. Interfacial*, **188** (1985) 59.
- 129 J. Rusling, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 57.

- 130 R. L. McCreery, Carbon electrodes: Structural Effects on Electron Transfer Kinetics, in: *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker: New York, **1991**, 17, 221.
- 131 P. G. Molina, M. A. Zón, H. Fernández, *Electroanalysis*, **12** (2000) 791.
- 132 W. J. Moore, "Physical Chemistry", 4th Ed. Prentice-Hall Inc. New Jersey, USA, 1972.
- 133 J. O. Bockris, S. U. M. Khan, *Surface Electrochemistry: a molecular level approach*, Plenum Press, New York, 1993.
- 134 P. Pérez, C. Teijeiro, D. Marin, *Langmuir* **18** (2002) 1760.
- 135 C. D. E. Chidsey, *Science* **251** (1991) 919.
- 136 R. J. Foster, L. R. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 5444.
- 137 H. Lua, M. P. Kreuzer, K. Takkinen, G. G. Guilbault, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007) 1756.
- 138 G. Conneely, M. Aherne, H. Lu, G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, **583** (2007) 153.
- 139 D. Tang, R. Yuan, Y. Chai, *Anal. Chem.*, **80** (2008) 1582.
- 140 A. Basu, *Clinica Chimica Acta* **336** (2006) 287.
- 141 G. Giraudi, C. Baggiani, C. Giovannoli, *Anal. Chim. Acta*, **337** (1997) 93.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



66066

66066

