



CREER. CREAR. CRECER

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO
CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-
Químicas y Naturales.
Departamento de Química.



Doctorado en Ciencias Químicas

*“Estudios sobre el comportamiento electroquímico
de la micotoxina patulina y desarrollo de
metodologías electroanalíticas para su
determinación en alimentos”*

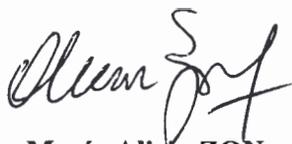
Gerardo Damián Chanique

Directora de Tesis: Dra. María Alicia Zon
Co-Director de Tesis: Dr. Héctor Fernández

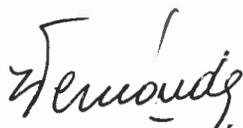
27 de Septiembre de 2012

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

Directora de Tesis:


Dra. María Alida ZON

Co-Director:


Dr. Héctor FERNÁNDEZ

Aprobada por el jurado:


Dr. Jorge Federico MAGALLANES

Dr. Leonides E. SERENO



Dra. Sofía Noemí CHULZE


E. Dora Noemí

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a toda mi familia, mi mamá Olguita y mis hermanos por haberme acompañado y ayudado durante estos años y en especial a mis abuelos Inés y Clever por haberme cuidado siempre y que en paz descansen.

A mis amigos, por todo el apoyo que siempre me han dado y lo que han hecho por mí, gracias Martín (Negro), Sebastián (Carioca), Martín (Pela), Guido (Conde), Pablo (Bestia), Enzo (Polka), Sofía, Hebe, Belén, Natalia y Diana.

A todos mis compañeros del Departamento de Química y en especial a los integrantes del “Gran Becario”, con quienes he compartido momentos inolvidables, gracias por la paciencia y la ayuda desinteresada.

También, a todos mis compañeros de laboratorio y en especial a los del grupo de electroquímica, con quienes he tenido el gusto de compartir gratos momentos entre medida y medida, Patricio, Vanesa, Sebastián, Melisa, Alejandro, Fernando, Adrián, Álvaro y Eliana.

Quiero agradecer a Alicia y Héctor (Tito) por la confianza que depositaron en mí y por haberme dejado ser parte de su grupo y en especial a Alejandro por haberme guiado y formado a lo largo de este camino.

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

A los organismos que me otorgaron las becas, FONCYT y SECyT/UNRC por la Beca de Nivel Inicial y a CONICET por la Beca Interna de Postgrado Tipo II.

“Estudios sobre el comportamiento electroquímico de la micotoxina patulina y desarrollo de metodologías electroanalíticas para su determinación en alimentos”

Gerardo Damián Chanique

2012

Resumen

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se aportó información original acerca de las propiedades electroquímicas de la micotoxina patulina en medios orgánicos y acuosos, como así también el desarrollo de una metodología electroanalítica para su determinación en alimentos, concretamente, en jugos de manzana.

Los estudios concernientes a la reducción electroquímica de patulina sobre electrodos de carbono vítreo se realizaron en solución de acetonitrilo + 0,1 M de perclorato de tetrabutil amonio y también en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M en el intervalo de pH de 4 a 7,5. Las técnicas empleadas para tal fin fueron las voltamperometrías cíclica y de onda cuadrada, electrólisis a potencial controlado, cronoamperometría y técnicas de espectroscopía UV-visible e infrarroja.

En cuanto a la determinación electroanalítica de patulina en jugos de manzana, se estudiaron diferentes alternativas y se probaron varios electrodos, definiendo finalmente una metodología que fue aplicada con éxito para la determinación de patulina en dichas matrices. Para implementar esta metodología, la patulina fue extraída de jugos de manzana, mediante un procedimiento de extracción líquido-líquido, utilizando acetato de etilo. El extracto fue resuspendido en acetonitrilo + 0,1 M de perclorato de tetrabutilamonio, y su concentración determinada mediante voltamperometría de onda cuadrada utilizando un electrodo de disco de carbono vítreo desnudo.

Hipótesis de trabajo

La estructura química de la micotoxina patulina revela la presencia de al menos un grupo carbonilo α,β no saturado, lo cual hace, que sea factible de ser reducida electroquímicamente y por tanto, se puede obtener una respuesta en corriente que sea proporcional a su concentración. Utilizando esta propiedad, se pretende desarrollar una metodología electro-analítica para su determinación en alimentos, en particular en aquellos derivados de las manzanas.

Objetivos del plan de Tesis Doctoral

Objetivos generales

Estudiar los mecanismos de reacción electroquímica de la micotoxina patulina, presente principalmente en frutas, como así también implementar técnicas más económicas y de mayor rapidez que las actuales en vigencia, para su determinación en alimentos destinados al consumo humano, empleando tanto electrodos convencionales como así también electrodos nano-estructurados.

Objetivos específicos

- Estudiar el mecanismo de reacción electroquímica de la micotoxina patulina, tanto sobre electrodos convencionales de distintos materiales como sobre electrodos nano-estructurados, tales como aquellos obtenidos a partir de nanotubos de carbono y modificados con el polímero quitosano.
- Desarrollar técnicas electro-analíticas, particularmente, las técnicas de pulso para la detección y cuantificación de patulina.
- Estudiar las propiedades electrocatalíticas de electrodos nano-estructurados sobre la descarga de patulina, a los efectos de evaluar sus capacidades como

una herramienta más para optimizar la aplicación de técnicas electroanalíticas en la determinación y cuantificación de esta micotoxina.

- Transferir la experiencia adquirida en el estudio del comportamiento electroanalítico de patulina en medios simulados (formados por los reactivos comerciales) al análisis de muestras de alimentos contaminados, particularmente, aquellos derivados de manzanas.

Índice

Contenidos

Resumen.....	iii
Hipótesis de Trabajo.....	v
Objetivos del Plan de Tesis Doctoral.....	v
Índice.....	vii
Contenidos.....	vii
Figuras.....	x
Tablas.....	xxi

CAPITULO 1

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades de las micotoxinas.....	1
1.2. Toxicidad de las micotoxinas.....	2
1.3. Análisis de las micotoxinas.....	4
1.4. Patulina.....	6
1.4.1. Características generales de patulina.....	6
1.4.2. Efectos sobre la salud y niveles permitidos de patulina.....	8
1.4.3. Reacciones químicas de patulina.....	10
1.4.4. Transformaciones biológicas de patulina.....	14
1.4.5. Análisis cuantitativo de patulina por métodos cromatográficos.....	16
1.4.5.1. Análisis de patulina mediante cromatografía de capa fina.....	17
1.4.5.2. Análisis de patulina mediante cromatografía gaseosa.....	18
1.4.5.3. Análisis de patulina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.....	19
1.4.6. Análisis cuantitativo de patulina mediante técnicas electroquímicas.....	21
1.4.7. Análisis cuantitativo de patulina mediante técnicas inmunoquímicas...	22

CAPITULO 2

2. Fundamentos teóricos.....	23
2.1. Reducción electroquímica de los grupos carbonilos.....	23
2.1.1. Aldehídos y cetonas no olefínicos.....	23
2.1.1.1. Mecanismo general.....	23
2.1.1.2. Productos de reducción, guías para selectividad.....	26
2.1.2. Compuestos carbonílicos olefínicos (con enlaces C=O).....	27
2.1.2.1. Mecanismo general.....	27
2.1.2.2. Compuestos carbonílicos α,β -no saturados.....	28
2.2. Influencia del catión en la reducción de compuestos orgánicos.....	30

CAPITULO 3

3. Técnicas empleadas. Fundamentos teóricos.....	32
3.1. Introducción.....	32
3.2. Naturaleza de las reacciones de electrodo.....	34
3.2.1. Procesos no-faradaicos.....	34
3.2.2. Procesos faradaicos.....	35
3.3. Celdas electroquímicas.....	35
3.4. El experimento electroquímico y las variables en las celdas electroquímicas.....	37
3.5. Factores que afectan la velocidad de la reacción de electrodo y la corriente.	40
3.6. Modos de transferencia de masa.....	42
3.7. Reversibilidad en procesos electroquímicos.....	45
3.7.1. Reversibilidad química.....	45
3.7.2. Reversibilidad termodinámica.....	46
3.7.3. Reversibilidad práctica.....	46
3.8. Reacciones de electrodo reversibles. Control difusional.....	47
3.9. Técnicas electroquímicas empleadas: descripción.....	50
3.9.1. Voltamperometría cíclica.....	50
3.9.1.1. Corriente de pico y potencial.....	54
3.9.2. Voltamperometría de convolución.....	57
3.9.3. Cronoamperometría.....	61
3.9.4. Electrólisis a potencial controlado.....	64
3.9.5. Voltamperometría de onda cuadrada.....	69
3.9.5.1. Introducción.....	69
3.9.5.2. Teoría de la voltamperometría de onda cuadrada.....	73

CAPITULO 4

4. Metodología Experimental.....	80
4.1 Introducción.....	80
4.2 Instrumentos de electroquímica.....	80
4.2.1. Electrodo de trabajo.....	80
4.2.2. Electrodo de referencia.....	81
4.2.3. Contraelectrodos.....	82
4.2.4. Celdas electroquímicas.....	82
4.2.4.1. Celda para voltamperometrías cíclica y de onda cuadrada.....	82
4.2.4.2. Celda para voltamperometría cíclica y de onda cuadrada de configuración alternativa.....	83
4.2.4.3. Celda para electrólisis a potencial controlado.....	84
4.3. Reactivos y solventes.....	86
4.3.1. Reactivos.....	86
4.3.2. Solventes.....	86
4.3.3. Soluciones.....	87
4.3.4. Electrolitos soportes.....	87
4.4. Técnicas electroquímicas y equipamientos.....	88
4.5. Equipamiento espectrofotométrico.....	88

CAPITULO 5

5. Resultados y discusión.....	89
5.1. Introducción.....	89
5.2. Medidas espectrofométricas.....	89
5.3. Medidas electroquímicas en acetonitrilo.....	90
5.3.1. Medio acetonitrilo / perclorato de tetrabutyl amonio.....	90
5.3.1.1. Voltamperometría cíclica.....	90
5.3.1.2. Cálculo del área del electrodo de trabajo.....	94
5.3.1.3. Voltamperometría de convolución.....	97
5.3.1.4. Electrólisis a potencial controlado.....	99
5.3.1.5. Voltamperometría de onda cuadrada.....	102
5.3.2. Medidas utilizando perclorato de litio como electrolito soporte.....	105
5.3.3. Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple.....	110
5.3.3.1. Cálculo de área del electrodo de trabajo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple.....	110
5.3.3.2. Voltamperometría cíclica con el electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple.....	111
5.3.3.3. Voltamperometría de onda cuadrada con el electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple.....	113
5.3.4. Medio acetonitrilo / perclorato de tetrabutyl amonio / ácido trifluoroacético.....	116
5.3.4.1. Voltamperometría cíclica.....	116
5.3.4.2. Voltamperometría de onda cuadrada.....	119
5.4. Estudios sobre el electrodo de referencia.....	122
5.5. Análisis de los productos de reducción de patulina.....	127
5.6. Estudios electroquímicos de 5-hidroximetilfurfural.....	129
5.6.1. Voltamperometría cíclica de 5-hidroximetilfurfural.....	131
5.6.2. Voltamperometría de onda cuadrada de 5-hidroximetilfurfural.....	133
5.7. Medidas en soluciones acuosas.....	134
5.7.1. Medidas en agua / perclorato de sodio.....	134
5.7.2. Medidas en solución buffer fosfato.....	138
5.7.2.1. Efecto de la activación del electrodo de trabajo en medio básico.....	140
5.7.2.2. Voltamperometría cíclica en soluciones reguladoras de fosfato.....	142
5.7.2.3. Voltamperometría de onda cuadrada en soluciones reguladoras de fosfato.....	145
5.7.2.4. Electrodo de carbono vítreo modificado con quitosano.....	150
5.8. Resumen de las metodologías desarrolladas.....	156
5.9. Análisis de PAT en muestras reales.....	157
5.9.1. Análisis de patulina en muestras de jugos de manzana turbios.....	158
5.9.2. Análisis de patulina en muestras de jugos de manzana clarificados.....	163
5.9.3. Curva de trabajo.....	169

CAPITULO 6

6. Conclusiones.....	173
----------------------	-----

CAPITULO 7

7. Referencias.....	175
---------------------	-----

Figuras

Figura 1.1.1. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.....	1
Figura 1.4.1. Estructura química de la micotoxina patulina.....	7
Figura 1.4.2. Estructuras de D-L PAT formando un dímero.....	8
Figura 1.4.3. Reducción de PAT con borohidruro de sodio.....	10
Figura 1.4.4. Estructura química del aminoácido cisteína.....	11
Figura 1.4.5. Posibles estructuras de resonancia de PAT.....	12
Figura 1.4.6. 8 compuestos químicos y sus isómeros, derivados de las reacción de PAT con cisteína.....	12
Figura 1.4.7. Ruta biosintética de PAT.....	15
Figura 1.4.8. PAT y sus productos de degradación biológica.....	16
Figura 1.4.9. Esquema de reacción de PAT en solución reguladora de fosfato de pH 4,7.....	22
Figura 2.1.1. Reducción de un caso idealizado de un grupo carbonilo. R= hidrocarbilo, R´= hidrocarbilo o H.....	24
Figura 2.1.2. Reducción del grupo carbonilo, en presencia de protones o de una sal de litio. M = H ⁺ o Li ⁺ , DIM= dimerización.....	24
Figura 2.1.3. Preprotonación del grupo carbonílico.....	25

Figura 2.1.4. Mecanismos de reducción de los grupos carbonílicos.....	26
Figura 2.1.5. Estructura modelo de un compuesto α,β -no saturado.....	28
Figura 3.4.1. Esquema de un sistema experimental para experiencias de potencial controlado. ER: electrodo de referencia, CE: contraelectrodo, ET: electrodo de trabajo.....	38
Figura 3.4.2. (a) Principio general utilizado. (b) En un experimento espectrofotométrico, la luz de diferentes longitudes de onda (λ) es la señal de excitación y la respuesta es la curva de la absorbancia (A). (c) En un experimento electroquímico, la señal de excitación es el salto de potencial aplicado (E) y la respuesta observada es la curva corriente-tiempo ($I-t$).....	39
Figura 3.5.1. Reacción general de electrodo.....	41
Figura 3.6.1. Los tres modos de transporte de masa.....	42
Figura 3.6.2. 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.....	45
Figura 3.8.1. Representación esquemática para el comportamiento de $I-E$ para una reacción Nernstiana.....	49
Figura 3.9.1. (a) Representación esquemática de la perturbación de potencial aplicado al electrodo de trabajo y (b) respuesta corriente-potencial obtenida (voltamperograma) para una cupla redox simple (ec. 3.9.1.).....	51
Figura 3.9.2. Perfiles de concentración obtenidos para una experiencia de voltamperometría cíclica para la reducción de O y la oxidación de R	52
Figura 3.9.3. Voltamperograma de barrido lineal en términos de la función corriente adimensional. Los valores sobre el eje del potencial están dados a 25 °C.....	54
Figura 3.9.4. Voltamperogramas cíclicos experimentales y de convolución de 1,84 mM p-nitrotolueno en ACN + 0,2 M PTEA con un electrodo HMDE, $v = 50 \text{ V s}^{-1}$	58
Figura 3.9.5. Voltamperogramas cíclicos experimentales y de convolución de 0,5 mM tert-nitrobutano en dimetil formamida (DMF) + 0,1 M TBAI, $v = 17,9 \text{ V s}^{-1}$..	59
Figura 3.9.6. Experiencia cronoamperométrica: a) Programa de potencial aplicado al electrodo de trabajo, b) respuesta corriente-tiempo resultante y c) cambio en los perfiles de concentración con el tiempo.....	62
Figura 3.9.7. a) Curva corriente-tiempo durante una electrolisis a potencial controlado (en formas adimensionales), b) Q vs t	68

Figura 3.9.8. Programa de saltos de potencial aplicados al electrodo de trabajo en un experimento de VOC. ΔE_{oc} : amplitud de la onda cuadrada., ΔE_e : salto de la escalera, τ : período de la onda cuadrada, t_p : tiempo de pulso. (●) Puntos donde se realiza el muestreo de la corriente directa y (●) Puntos donde se realiza el muestreo de la corriente inversa.....	71
Figura 3.9.9. Respuesta en corrientes adimensionales en un experimento de VOC para una sistema reversible O/R con R inicialmente ausente y donde el barrido de potencial comienza más positivo que el E^o . El eje del tiempo corresponde a los medio ciclos indexados por m y el E^o para dicha cupla se alcanza cerca de $m = 15$. Los puntos corresponden a las corrientes muestreadas. $n\Delta E_{OC} = 50$ mV y $n\Delta E_e = 30$ mV.....	72
Figura 3.9.10. Corrientes normalizadas directa, inversa y neta de un voltamperograma de OC para una cupla redox simple (ecuación 3.9.1.) bajo control de difusión lineal semi infinita. $n \Delta E_{OC} = 0,050$ V; $n \Delta E_e = 0,010$ V.....	76
Figura 3.9.11. Igual que en Figura 3.9.10., pero $n \Delta E_{OC} = 0,010$ V.....	76
Figura 3.9.12. Igual que en Figura. 3.9.10., pero $n \Delta E_{OC} = 0$ V.....	77
Figura 3.9.13. Igual que en Figura 3.9.10, pero $n \Delta E_{OC} = 0,120$ V.....	77
Figura 3.9.14. Relación entre la corriente de pico neta normalizada y el producto $n W_{1/2}$ para $\Delta E_e =$ A) 0,025; B) 0,010 y C) 0,025 V.....	78
Figura 4.2.1. Esquema de la celda utilizada para las medidas en VC y VOC, CE: contraelectrodo, ET: electrodo de trabajo y ER: electrodo de referencia.....	83
Figura 4.2.2. Esquema alternativo de la celda utilizada para las medidas en VC y VOC, CE: contraelectrodo, ET: electrodo de trabajo y ER: electrodo de referencia.....	84
Figura 4.2.3. Esquema de la celda utilizada para las mediciones coulométricas, CE: contraelectrodo), ET: electrodo de trabajo y ER: electrodo de referencia y ETA: electrodo de trabajo auxiliar.....	85
Figura 5.2.1. Espectros de absorción UV-visible de PAT en ACN. Camino óptico, $b = 1$ cm. c_{PAT}^* = 1) $5,84 \times 10^{-6}$; 2) $1,30 \times 10^{-5}$; 3) $2,59 \times 10^{-5}$; 4) $3,89 \times 10^{-5}$; 5) $5,19 \times 10^{-5}$ y 6) $6,49 \times 10^{-5}$ M.....	89
Figura 5.2.2. Gráfico de la Ley de Lambert y Beer para PAT a $\lambda = 275$ nm (Datos de concentración y absorbancia de la Figura 5.2.1.).....	90
Figura 5.3.1. Voltamperogramas cíclicos para la reducción de PAT a distintas velocidades de barrido del potencial. Electrodo de trabajo: CV ($A = 0,071$ cm ²). Medio de reacción: ACN + 0,1 M PTBA. $c_{PAT}^* = 2,40 \times 10^{-4}$ M, $v =$ 1) 0,025; 2) 0,050; 3) 0,075; 4) 0,100; 5) 0,125; 6) 0,150; 7) 0,175; 8) 0,200 V s ⁻¹	91

Figura 5.3.2. Dependencia de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$, c_{PAT}^* (●)= $1,25 \times 10^{-4}$ M, (■)= $2,40 \times 10^{-4}$ M, (▼)= $4,04 \times 10^{-4}$ M, (▲)= $6,06 \times 10^{-4}$ M.....	92
Figura 5.3.3. Gráfico del $E_{p,c}$ vs $\log v$, realizado a partir de los datos de la Figura 5.3.1.....	92
Figura 5.3.4. Gráficos del $E_{p,c}$ en función del $\log c_{PAT}^*$	93
Figura 5.3.5. Gráfico de $I_{p,c}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0.1 M de PTBA. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$	93
Figura 5.3.6. Gráfico de $\Psi (i_{p,c} / v^{1/2} c_{PAT}^*)$ vs $v^{1/2}$. c_{PAT}^* (○)= $1,25 \times 10^{-4}$ M, (▲)= $2,40 \times 10^{-4}$ M, (▼)= $5,4 \times 10^{-4}$ M.....	94
Figura 5.3.7. Estructura química de ferroceno.....	95
Figura 5.3.8. Voltamperograma cíclico de ferroceno en ACN + 0,1 M de PTBA. $c_{Fc}^* = 1,11 \times 10^{-3}$ M, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$	95
Figura 5.3.9. Transitorio I-t para ferroceno en ACN + 0,1 M PTBA. $E_{apl} = 0,6 \text{ V}$, $c_{Fc}^* = 1,11 \times 10^{-3}$ M.....	96
Figura 5.3.10. Análisis del transitorio de la Figura 5.3.9. mediante la ecuación de Cottrell, en el intervalo de 0,1 a 1 s.....	97
Figura 5.3.11. Voltamperogramas cíclico (línea continua) y convolucionado (línea punteada) de PAT. $c_{PAT}^* = 2,95 \times 10^{-4}$ M en ACN + 0,1 M PTBA. $v = 0,075 \text{ V s}^{-1}$	98
Figura 5.3.12. Voltamperogramas cíclicos de PAT (—), en ACN + 0,1 M de PTBA, $c_{PAT}^* = 3,47 \times 10^{-4}$ M y su correspondiente blanco (---) antes de realizar la electrólisis. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$	99
Figura 5.3.13. Transitorios I / t obtenidos durante las electrólisis realizadas a intervalos de 15 min., en medio agitado y bajo las condiciones de la Figura 5.3.12., 1) electrólisis 1: carga: 0,807 C, 2) electrólisis 2: carga: 0,159 C, 3) electrólisis 3: carga: 0,083 C.....	100
Figura 5.3.14. Voltamperogramas cíclicos registrados antes (1) y luego de cada una de las tres electrólisis (2, 3 y 4) que se corresponden con la Figura 5.3.13., en ACN + 0,1 M de PTBA, $c_{PAT}^* = 3,47 \times 10^{-4}$ M y su correspondiente blanco (---) antes de realizar la electrólisis. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$	100
Figura 5.3.15. Gráfico de $\ln i$ vs t . pendiente = $-(1,73 \pm 0,05) \times 10^{-3}$; $r = 0,9981$	101
Figura 5.3.16. Gráfico de $\ln Q$ vs $\ln t$. Ordenada = $-(6,265 \pm 0,003)$; pendiente = $-(0,961 \pm 0,009)$; $r = 0,9999$	102
Figura 5.3.17. Voltamperograma de OC de PAT en ACN + 0,1 M PTBA. $c_{PAT}^* = 3,09 \times 10^{-4}$ M. 1) I_n , 2) I_d , 3) I_i . $\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$ y $f = 10 \text{ Hz}$.	103

- Figura 5.3.18.** Voltamperogramas de OC de PAT a distintas $f = 1) 10, 2) 20, 3) 30, 4) 40, 5) 60, 6) 70, 7) 80$ Hz. $c_{PAT}^* = 6,06 \times 10^{-4}$ M..... 103
- Figura 5.3.19** Dependencia de $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$, c_{PAT}^* : (■)= $1,25 \times 10^{-4}$ M, (●)= $2,40 \times 10^{-4}$ M, (▲)= $4,04 \times 10^{-4}$ M, (▼)= $6,06 \times 10^{-4}$ M..... 104
- Figura 5.3.20.** Gráfico de la $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0.1 M de PTBA. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 105
- Figura 5.3.21.** Voltamperogramas cíclicos de PAT tanto en ACN + 0,1 M PTBA, $c_{PAT}^* = 2,402 \times 10^{-4}$ M (1) y su respectivo blanco (2); como en ACN + 0,1M de $\text{LiClO}_4 (\text{H}_2\text{O})_3$, $c_{PAT}^* = 2,49 \times 10^{-4}$ M (3) y su respectivo blanco (4) a una $v = 0,050$ V s⁻¹..... 106
- Figura 5.3.22.** Voltamperogramas cíclicos de PAT, en ACN + 0,1 M $\text{LiClO}_4 (\text{H}_2\text{O})_3$ a una $v = 0,1$ V s⁻¹, en línea continua, 5 ciclos sucesivos desde 1 V hasta -1,6 V y en línea punteada desde 1,65 V (con 60 s de espera en ese potencial), hasta -1,6 V. $c_{PAT}^* = 2,41 \times 10^{-4}$ M..... 107
- Figura 5.3.23.** Gráfico de I_p vs $v^{1/2}$ en ACN + 0,1 M de $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$ en el intervalo de v entre 0,025 y 0,2 V s⁻¹, $c_{PAT}^* = 2,41 \times 10^{-4}$ M..... 108
- Figura 5.3.24.** Voltamperogramas cíclicos sucesivos de PAT, 1°, 2° y 3° barrido respectivamente, en ACN + 0,1 M de LiClO_4 a una $v = 0,050$ V s⁻¹, desde 1,65 V (con 60 s de espera en ese potencial) hasta -1,6 V. $c_{PAT}^* = 3,67 \times 10^{-4}$ M..... 108
- Figura 5.3.25.** Voltamperogramas cíclicos sucesivos de PAT, 1°, 2°, 3° y 4° barrido respectivamente, en ACN + 0,1 M $\text{LiClO}_4 (\text{H}_2\text{O})_3$ a una $v = 0,050$ V s⁻¹, desde 1,65 V (con 60 s de espera en ese potencial) hasta -1,6 V, y su respectivo blanco (---). $c_{PAT}^* = 3,67 \times 10^{-4}$ M..... 109
- Figura 5.3.26.** Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M PTBA, $c_{PAT}^* = 2,4 \times 10^{-4}$ M, $v = 0,050$ V s⁻¹. Electrodo de CV desnudo (línea punteada) y electrodo de CV modificado con NTCPM (línea continua), con sus respectivos blancos..... 111
- Figura 5.3.27.** Dependencia de I_p vs $v^{1/2}$ en ACN + 0,1 M PTBA, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM a distintas concentraciones de PAT. c_{PAT}^* : (■) = $1,27 \times 10^{-4}$ M, (●) = $2,49 \times 10^{-4}$ M, (▲) = $3,08 \times 10^{-4}$ M, (▼) = $3,47 \times 10^{-4}$ M..... 112
- Figura 5.3.28.** Dependencia del $E_{p,c}$ vs $\log v$, $c_{PAT}^* = 2,49 \times 10^{-4}$ M, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM..... 112
- Figura 5.3.29.** Dependencia del I_p vs c_{PAT}^* utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM, $v = 0,05$ V s⁻¹..... 113
- Figura 5.3.30.** Voltamperograma de OC de PAT en ACN + 0,1 M PTBA. 1) I_n , 2) I_d y 3) I_i . $c_{PAT}^* = 3,08 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM..... 114

- Figura 5.3.31.** Voltamperogramas de OC de PAT en ACN + 0,1 M PTBA. $c_{PAT}^* = 3,08 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz, utilizando un electrodo de CV desnudo (1) y uno modificado con NTCPM (2)..... 114
- Figura 5.3.32.** Gráfico del $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0,1 M PTBA, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM..... 115
- Figura 5.3.33.** Voltamperogramas cíclicos de PAT, en ausencia de ATFA (VC 1) y en presencia del mismo (VC 2 y VC 3). $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4}$ M, $c_{ATFA}^* =$ VC 1: 0 M, VC 2: $3,90 \times 10^{-4}$ M, VC 3: $7,8 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 116
- Figura 5.3.34.** Variación de las $I_{p,c}$ en función de las distintas relaciones de las concentraciones de ATFA respecto a PAT. (●) PAT y (■) PATH⁺. $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 117
- Figura 5.3.35.** Voltamperogramas cíclicos para la reducción de PATH⁺ a distintas velocidades de barrido del potencial, $v =$ 1) 0,025; 2) 0,050; 3) 0,075; 4) 0,100; 5) 0,125; 6) 0,150; 7) 0,175 y 8) 0,200 V s⁻¹..... 118
- Figura 5.3.36.** Dependencia de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$, entre $v = 0,025$ a $0,200$ V s⁻¹, a tres concentraciones de PAT, c_{PAT}^* : (●) = $1,24 \times 10^{-4}$ M; (■) = $2,40 \times 10^{-4}$ M y (▼) = $4,00 \times 10^{-4}$ M. En todos los casos se utilizó la relación $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$ 118
- Figura 5.3.37.** Voltamperogramas de OC de PAT, en ausencia de ATFA (VOC 1) y en presencia del mismo (VOC 2 y VOC 3), $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4}$ M, $c_{ATFA}^* =$ VC 1: 0 M, VC 2: $3,90 \times 10^{-4}$ M, VC 3: $7,80 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 119
- Figura 5.3.38.** Variación de la $I_{p,n}$ en función de la relación de las concentraciones de ATFA y PAT. $c_{PAT}^* = 1,24 \times 10^{-4}$ M. (●) PAT y (■) PATH⁺. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 120
- Figura 5.3.39.** Voltamperogramas de OC de PATH⁺ a distintas f : 1) 10; 2) 20; 3) 30; 4) 40; 5) 60; 6) 70; 7) 80; 8) 90; 9) 100 Hz. $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4}$ M. $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V y $\Delta E_e = 0,005$ V..... 120
- Figura 5.3.40.** Variación de la $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$, $c_{PAT}^* = 4 \times 10^{-4}$ M. $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$... 121
- Figura 5.3.41.** Gráfico del $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0.1 M PTBA + $1,5 \times 10^{-5}$ M de ATFA. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V, $f = 10$ Hz..... 122
- Figura 5.4.1.** Voltamperogramas cíclicos de una solución de ACN + 0,1 M PTBA (—) y otra idéntica + 400 μ L de agua (----). $v = 0,050$ V s⁻¹..... 123
- Figura 5.4.2.** Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M PTBA (VC 1) donde se muestra la influencia de los agregados de agua en la reducción de PAT en este medio. $c_{PAT}^* = 1,24 \times 10^{-4}$ M. VC 2 = con 80 μ l; VC 3= con 100 μ l, VC 4= con 300 μ l, VC 5= con 400 μ l de agua. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 124

- Figura 5.4.3.** Voltamperogramas cíclicos utilizando un electrodo de pseudo-referencia de plata en ACN + 0,1 M HTBA de Fc (----) y Fc + PAT (—). $c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4}$ M y $c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹ 125
- Figura 5.4.4.** Voltamperogramas cíclicos consecutivos en ACN + 0,1 M HTBA, $c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4}$ M y $c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4}$ M. VC 1: primer barrido, VC 2: segundo barrido, VC 3: tercer barrido, 4) cuarto barrido de potencial. $v = 0,050$ V s⁻¹ 126
- Figura 5.4.5.** Voltamperogramas cíclicos a distintas v en ACN + 0,1 M HTBA, $c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4}$ M y $c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4}$ M. $v =$ VC 1: 0,025; VC 2 : 0,050; VC 3 : 0,075; VC 4 : 0,100 V s⁻¹ 127
- Figura 5.5.1.** Espectros de absorción UV-vis, previo (—) y posterior (----) a la electrólisis a potencial controlado. $c_{PAT}^* = 3,47 \times 10^{-5}$ M..... 128
- Figura 5.5.2.** Espectros IR, previo (—) y posterior a la electrólisis a potencial controlado (----) en la zona de absorción de los grupos carbonilo..... 128
- Figura 5.5.3.** Espectros IR, previo (—) y posterior (----) a la electrólisis a potencial controlado en la zona de absorción de los grupos hidroxilo..... 129
- Figura 5.6.1.** Estructura química de HMF..... 130
- Figura 5.6.2.** Voltamperogramas cíclicos para la reducción de HMF en ACN + 0,1 M PTBA a distintas concentraciones. c_{HMF}^* : VC 1= 3,40; VC 2= 6,77; VC 3= 10,10; VC 4= 13,40; VC 5= 20,00; VC 6= 23,20 x 10⁻⁴ M. $v = 0,050$ V s⁻¹ 131
- Figura 5.6.3.** Gráfico de la $I_{p,c}$ vs c_{HMF}^* en medio ACN + 0.1 M de PTBA. $v = 0,050$ V s⁻¹ 132
- Figura 5.6.4.** Voltamperograma cíclico de una mezcla de PAT + HMF, en medio ACN + 0,1 M PTBA, $c_{HMF}^* = 9,81 \times 10^{-4}$ M, $c_{PAT}^* = 4,03 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹ 132
- Figura 5.6.5.** Voltamperograma de OC de HMF en ACN + 0,1 M PTBA. $c_{HMF}^* = 2,3 \times 10^{-3}$ M. VOC 1: I_i , VOC 2: I_n , VOC 3: I_d . $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 133
- Figura 5.6.6.** Voltamperograma de OC de PAT y HMF, en medio ACN + 0.1 M de PTBA. $c_{HMF}^* = 9,81 \times 10^{-4}$ M, $c_{PAT}^* = 4,03 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 134
- Figura 5.7.1.** Activación del electrodo de CV, por oxidación en medio básico. $E_{aplc.} = 1,2$ V durante 600 s..... 135
- Figura 5.7.2.** Voltamperogramas cíclicos de PAT en agua + 0,1 M NaClO₄ (—), $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M y su respectivo blanco (----). $v = 0,050$ V s⁻¹ 136
- Figura 5.7.3.** Voltamperogramas de OC de PAT en agua + 0,1 M NaClO₄ (—), $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M y su respectivo blanco (----). Parámetros de OC: $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 137

Figura 5.7.4. Voltamperogramas cíclicos de PAT en agua + 0,1 M NaClO ₄ + agregados de HClO ₄ . $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $c_{HClO_4}^*$: VC 1 = 0, VC 2 = 0,21; VC 3 = 0,68; VC 4 = 1,35; VC 5 = 1,91; VC 6 = 2,46; VC 7 = 3,11; VC 8 = 4,18; VC 9 = 4,82; VC 10 = $5,86 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s ⁻¹	137
Figura 5.7.5 Voltamperogramas de OC de PAT en agua + 0,1 M NaClO ₄ + agregados de HClO ₄ . $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $c_{HClO_4}^*$: VOC 1 = 0, VOC 2 = 0,21; VOC 3 = 0,68; VOC 4 = 1,35; VOC 5 = 1,91; VOC 6 = 2,46; VOC 7 = 3,11; VOC 8 = 4,18; VOC 9 = 4,82; VOC 10 = $5,86 \times 10^{-4}$ M. Parámetros de OC, $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.....	138
Figura 5.7.6. Influencia de los valores de pH, en la estabilidad de PAT, en solución buffer McIlvaine.....	139
Figura 5.7.7. Voltamperogramas cíclicos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6, de los electrodos de CV activado (—) y sin activar (----) en medio básico. $v = 0,05$ V s ⁻¹	140
Figura 5.7.8. Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6, de los electrodos de CV activado (—) y sin activar (----), con sus respectivos blancos. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,05$ V s ⁻¹	141
Figura 5.7.9. Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7 (voltamperogramas cíclicos en línea continua) y sus respectivos blancos (voltamperogramas cíclicos en líneas punteadas). $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. (a): electrodo activado, (b): electrodo sin activar. Se muestran dos velocidades de barrido, 0,010 (—) y 0,050 (—) V s ⁻¹	142
Figura 5.7.10. Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M, a distintos valores de pH: VC 1 = 4; VC 2 = 5; VC 3 = 6; VC 4 = 7 y VC 5 = 7,5. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. (a): $v = 0,010$ V s ⁻¹ , (b): $v = 0,050$ V s ⁻¹	143
Figura 5.7.11. Gráficos de $I_{p,n}$ vs $v^{1/2}$ de PAT en soluciones reguladoras de fosfato a distintos valores de pH: (●) = 7,5; (■) = 7,0; (▲) = 6,0; (▼) = 5,0; (◄) = 4,0. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M.....	143
Figura 5.7.12. Gráficos de $E_{p,c}$ vs log v de PAT en soluciones reguladoras de fosfato a distintos valores de pH: (●) = 7,5; (■) = 7,0; (▲) = 6,0; (▼) = 5,0; (◄) = 4,0. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M.....	144
Figura 5.7.13. Gráficos de $E_{p,c}$ vs pH de PAT en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M, a distintas velocidades de barrido, v : (■) = 0,025; (●) = 0,050; (▲) = 0,075; (▼) = 0,100; (◄) = 0,125; (►) = 0,150; (●) = 0,175; (○) = 0,200 V s ⁻¹ . $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M.....	145
Figura 5.7.14. Voltamperogramas de onda cuadrada de PAT en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M de pH 4 (a) y de pH 7 (b). $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. En las gráficas se muestran las 3 corrientes: 1) I_n , 2) I_d y 3) I_i . Parámetros de OC, $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.....	146

- Figura 5.7.15.** Gráficas de $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$ de PAT en soluciones reguladoras de fosfato a distintos valores de pH: (●) = 7,5; (■) = 7,0; (▲) = 6,0; (▼) = 5,0; (◄) = 4,0. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V..... 146
- Figura 5.7.16.** Graficas de I_p vs $f^{1/2}$ de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 4. (●): $I_{p,n}$, (▲): $I_{p,d}$ y (▼): $I_{p,i}$. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V..... 147
- Figura 5.7.17.** Voltamperogramas de OC de PAT en solución reguladora de fosfato de pH 4, mostrando las tres corrientes, 1): I_n , 2): I_d y 3): I_i . $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V, $f =$ (a) 10; (b) 30; (c) 70; y (d) 100 Hz.. 148
- Figura 5.7.18.** Graficas de $E_{p,c}$ vs pH de PAT en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M, utilizando VPD. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{pulso} = 0,025$ V, $\Delta E_{incr.} = 0,005$ V..... 149
- Figura 5.7.19.** Estructura química del polímero quitosano..... 150
- Figura 5.7.20.** Vista lateral de una película de quitosano representativa, sobre un electrodo de oro, sumergida en aceite mineral para contraste óptico..... 151
- Figura 5.7.21.** Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano (—) y otro sin modificar (----), con sus respectivos blancos. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 152
- Figura 5.7.22.** Voltamperogramas cíclicos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 5, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano.1) voltamperograma del blanco, 2): primer ciclo, 3) décimo ciclo en presencia de PAT. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 153
- Figura 5.7.23.** Voltamperogramas cíclicos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano.1) voltamperograma del blanco, 2): primer ciclo, 3) quinto ciclo en presencia de PAT. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 153
- Figura 5.7.24.** Voltamperogramas de OC de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. $c_{PAT}^* = 1,30 \times 10^{-6}$ M. 1): VOC 1 previo a los ciclados, 2): VOC 2 primer barrido posterior a los ciclados y 3): segundo barrido posterior los ciclados. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 25$ Hz..... 154
- Figura 5.7.25.** Voltamperogramas de OC de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. c_{PAT}^* : 1) = 0,32, 2) = 0,65, 3) = 1,30, 4) = 2,27, 5) = 3,25 $\times 10^{-6}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 25$ Hz. 155

- Figura 5.7.26.** Gráfico de $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 25$ Hz..... 155
- Figura 5.9.1.** Voltamperogramas cíclicos de una solución de ACN + 0,1 M HFTBA (----) y del mismo medio con el agregado del extracto de jugo de manzana (—). $v = 0,050$ V s⁻¹..... 159
- Figura 5.9.2.** Voltamperogramas cíclicos de ACN + 0,1 M HFTBA + extractos de jugo de manzana, sin contaminar (----) y contaminado con PAT (—). $c_{PAT}^* = 1,29 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 159
- Figura 5.9.3.** Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar. Concentraciones de los estándares, $c_{est}^* = 2)$: 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 160
- Figura 5.9.4.** Voltamperogramas de OC de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar. Concentraciones de los estándares, $c_{est}^* = 2)$: 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 160
- Figura 5.9.5.** Gráfico de $I_{p,n}$ vs la concentración de las adiciones estándares (c_{est}^*). $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 161
- Figura 5.9.6.** Voltamperogramas cíclicos del extracto de jugo de manzana contaminado con PAT en ACN + 0,1 M HFTBA + agregados de HMF. $c_{PAT}^* = 5,1 \times 10^{-5}$ M. $c_{HMF}^* = 1)$ 0,51; 2) = 1,0; 3) = $2,1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 162
- Figura 5.9.7.** Voltamperogramas de OC del extracto de jugo de manzana contaminado con PAT en ACN + 0,1 M HFTBA + agregados de HMF. $c_{PAT}^* = 5,1 \times 10^{-5}$ M. $c_{HMF}^* = 1)$ 0,51; 2) = 1,0; 3) = $2,1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 162
- Figura 5.9.8.** Voltamperogramas cíclicos de ACN + 0,1 M HFTBA + extractos de jugo de manzana comercial, sin contaminar (----) y contaminado con PAT (—). $c_{PAT}^* = 1,29 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 164
- Figura 5.9.9.** Voltamperogramas de OC de ACN + 0,1 M HFTBA + extractos de jugo de manzana comercial, sin contaminar (----) y contaminado con PAT (—). $c_{PAT}^* = 1,29 \times 10^{-5}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 164
- Figura 5.9.10.** Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana comercial contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar. Concentraciones de los estándares, $c_{est}^* = 2)$: 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 165

- Figura 5.9.11.** Voltamperogramas de OC de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana comercial contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar. Concentraciones de los estándares, c_{est}^* = 2): 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 166
- Figura 5.9.12.** Gráfico de $I_{p,n}$ vs la concentración de las adiciones estándares en jugo de manzana comercial (c_{est}^*). $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 167
- Figura 5.8.13.** Voltamperogramas cíclicos del extracto de jugo de manzana comercial luego de la determinación de PAT (1) + 6 adiciones estándares de HMF. c_{HMF}^* = 2): 0,05; 3): 0,34; 4): 0,62; 5): 0,90; 6): 1,17; 7): $1,44 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹..... 167
- Figura 5.9.14.** Voltamperogramas de OC del extracto de jugo de manzana comercial luego de la determinación de PAT (1) + 6 adiciones estándares de HMF. c_{HMF}^* = 2): 0,05; 3): 0,34; 4): 0,62; 5): 0,90; 6): 1,17; 7): $1,44 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 168
- Figura 5.9.15.** Gráfico de $I_{p,n}$ vs las concentraciones de las adiciones estándares de HMF (c_{HMFest}^*) en jugo de manzana comercial. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 169
- Figura 5.9.16.** Voltamperogramas de OC de PAT en un extracto de jugo de manzana comercial. c_{PAT}^* = 1): 0,46; 2): 0,68; 3): 0,90; 4): 1,12; 5): 1,33; 6): $1,74 \times 10^{-6}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 170
- Figura 5.9.17.** Gráfico de $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en jugo de manzana comercial, de acuerdo a la Figura 5.8.16. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 171
- Figura 5.9.18.** Voltamperogramas de OC de PAT en un extracto de jugo de manzana comercial, donde entre cada voltamperograma el electrodo de trabajo fue pulido. c_{PAT}^* = 1): 4,62; 2): 6,86; 3): $9,06 \times 10^{-7}$ M; 4): 1,33; 5): 1,74; 6): 2,14; 7): 4,36; 8): 6,53; 9): 8,54 y 10): $12,8 \times 10^{-6}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 171
- Figura 5.9.19.** Gráfico de $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en jugo de manzana comercial, de acuerdo a la Figura 5.8.17., $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz..... 172

Tablas

Tabla 1.2.1. Clasificación de las micotoxinas según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC).....	3
Tabla 2.1.1. Comparación de los $E_{1/2}$ de compuestos carbonílicos α,β -no saturado, con aquellos correspondientes a los carbonilos saturados.....	29
Tabla 5.3.1. Características de los picos de reducción de PAT que se corresponden con la Figura 5.3.21.....	107
Tabla 5.8.1. Resumen de las distintas metodologías electroanalíticas para la determinación de PAT.....	157

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de las micotoxinas

Las palabra “*micotoxina*” deriva de las griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno, respectivamente, son compuestos que se originan cuando la fase de crecimiento del hongo llega a su etapa final y alcanza la fase estacionaria. En esta etapa es cuando se produce la liberación de las micotoxinas [1] (Figura 1.1.1.). Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos de diferentes especies, que contaminan granos de cereales, frutas y alimentos derivados de ellos en todo el mundo [2].

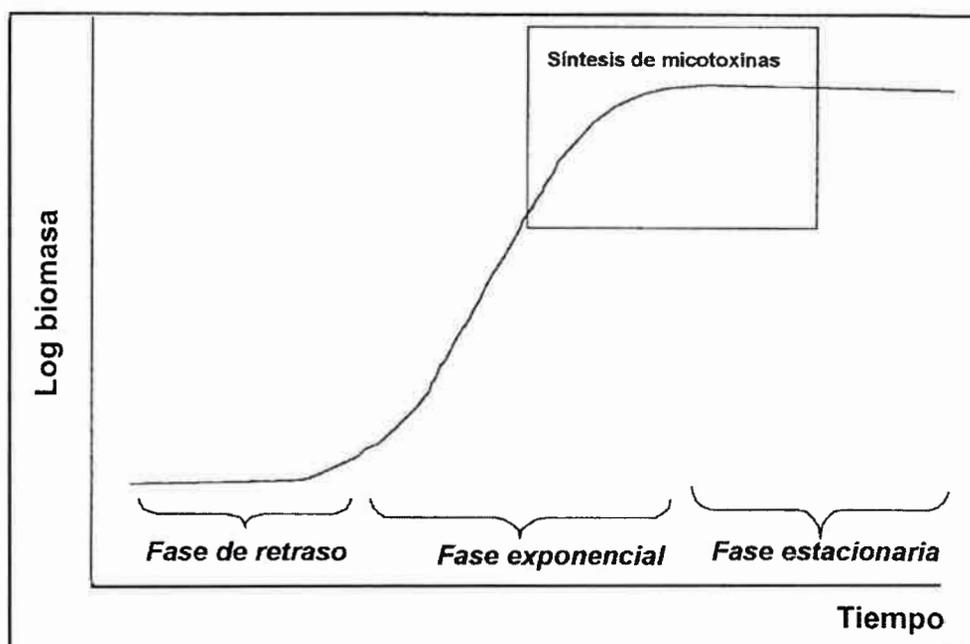


Figura 1.1.1. Fases de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.

Las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas ($PM < 700 \text{ g mol}^{-1}$). Estos metabolitos constituyen un conjunto de moléculas química y toxicológicamente diferentes, pero que se agrupan únicamente, debido a que pueden causar enfermedad y muerte en seres humanos y otros vertebrados [3]. La mayor parte de estos metabolitos

secundarios se originan en la ruta policetónica. Sin embargo, existen también otras rutas bio-sintéticas, pero son más complejas y, esta complejidad, se relaciona con un menor número de especies fúngicas capaces de producir micotoxinas [4]. Debido a sus diversas estructuras, orígenes biosintéticos, sus diversos efectos biológicos y su producción por un amplio número de especies fúngicas, resultan difíciles de clasificar. Así, se las puede clasificar desde el punto de vista clínico (hepato-tóxicas, neuro-tóxicas, nefro-tóxicas, inmuno-tóxicas, etc.), por su estructura química (lactosas, cumarinas, etc.), de acuerdo al hongo productor (toxinas de *Penicillium*, de *Aspergillus*, etc.) o bien, de acuerdo a su origen biosintético (policétidos, derivados de amino ácidos, etc.) aunque, ninguna de estas clasificaciones resulta realmente satisfactoria [3].

Estos metabolitos secundarios contaminan los alimentos de consumo humano, los alimentos balanceados para animales o bien, las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades denominadas "micotoxicosis".

Hay que tener en cuenta que, en un alimento, puede estar presente una micotoxina en particular o bien, se puede dar la presencia de varias micotoxinas en forma simultánea, lo que puede provocar efectos sinérgicos en su acción sobre el organismo, aumentando así la toxicidad.

1.2. Toxicidad de las micotoxinas

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y una gran variedad de especies animales afectando a distintos órganos, especialmente al hígado, riñón o bien, a distintos sistemas como el nervioso, endocrino o inmunitario. Los síntomas causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas [5, 6, 7].

En términos generales, el riesgo de intoxicación aguda por micotoxinas en el hombre es bajo o moderado en comparación con intoxicaciones de origen microbiológico o por contaminantes químicos. No obstante, según Kuipper-Goodman [8], en la exposición crónica y, teniendo en cuenta la severidad de las lesiones (especialmente el cáncer), las micotoxinas presentan mayor riesgo tóxico que los contaminantes de origen antropogénico, aditivos alimentarios y plaguicidas.

En cuanto a la toxicidad crónica, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC; *International Agency for Research on Cancer*) [9], clasifica varias

micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre, de acuerdo a los siguientes grupos:

-Grupo 1: el agente es carcinogénico en humanos.

-Grupo 2A: agente probablemente carcinogénico en humanos, existe limitada evidencia sobre humanos, pero suficiente con animales.

-Grupo 2B: agente posiblemente carcinogénico; la evidencia en humanos es limitada y tampoco, hay suficiente evidencia con animales de experimentación.

-Grupo 3: el agente no es clasificable como carcinogénico para humanos y no puede incluirse en otro grupo.

-Grupo 4: el agente, probablemente, no es carcinogénico en humanos. La evidencia disponible, tanto en humanos como en animales de experimentación así lo sugiere.

En la Tabla 1.2.1., se resume la evaluación realizada por la IARC en relación al poder carcinogénico de distintas micotoxinas.

Tabla 1.2.1. Clasificación de las micotoxinas según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC)

MICOTOXINAS	IARC
Aflatoxinas	1
Aflatoxinas M ₁	2B
Citrinina	3
Esterigmatocistina	2B
Fumonisina B ₁	2B
Ocratoxina A	2B
Patulina	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> (zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)	3
Toxinas derivadas de <i>Fusarium sporotrichioides</i> (toxina T-2)	3

1.3. Análisis de las micotoxinas

El análisis de micotoxinas es necesario durante el proceso productivo cuando empieza el almacenamiento de las materias primas (granos, frutas, etc.) y, es aquí, donde comienza la responsabilidad de la industria agro-alimentaria. Se deben comprar productos de buena calidad y evitar así que el insumo contaminado llegue a los animales o a los seres humanos. Además, se debe tener un programa adecuado de manejo de materiales para disminuir la posibilidad de que las materias primas y el alimento lleguen a contaminarse. Dentro de este programa, es importante contar con métodos de análisis químicos que sean confiables. Por consiguiente, el análisis de las micotoxinas adquiere una gran importancia, pues cualquier acción a tomar, ya sea un reclamo al vendedor de las materias primas o una modificación en la dieta o manejo, está fundamentada en el valor informado por los laboratorios.

La determinación de micotoxinas no es algo simple, dado que ellas se encuentran distribuidas de manera heterogénea en el insumo. Sin embargo, de manera simple, el análisis puede dividirse en tres etapas cruciales a saber:

- Toma de la muestra en el lote.
- Molienda o procesado de la muestra y toma de la sub-muestra.
- Extracción y cuantificación de las micotoxinas.

El primer factor que llega a tener una influencia directa en el resultado es el muestreo. El problema del muestreo es, en el caso de las micotoxinas, un problema importante y representa la mayor fuente de error en los resultados [10]. Sobre este aspecto, hay consenso respecto a que un mal procedimiento de muestreo lleva a resultados que difieren de un laboratorio a otro. Por lo tanto, se recomienda seguir un procedimiento de muestreo preestablecido y que el tamaño de muestra para el análisis, por ejemplo en granos, no sea inferior a 5 Kg [11]. El envío de la muestra al laboratorio debe hacerse en bolsa de papel "Kraft" para el caso de granos y alimentos.

Una vez que la muestra llega al laboratorio, ésta pasa por un proceso de preparación, que en el caso de granos consiste en la molienda, o procesado para el caso de frutas y el cuarteo para obtener una sub-muestra pequeña, pero representativa, para ser analizada.

Por último se realiza un proceso de extracción mediante el uso de solventes orgánicos o mezclas de ellos con agua. La eficiencia de la extracción de las micotoxinas va a depender del tipo de solvente utilizado, de la matriz que se trate, de la técnica empleada, etc. Posterior a esto, en algunos métodos, se realiza un proceso de purificación para eliminar las impurezas que pueden interferir en la cuantificación.

Para la cuantificación existen diferentes métodos de análisis que pueden ser utilizados, pero la selección se debe basar en que el método a emplear sea confiable, aplicable y práctico [12]. La confiabilidad se refiere a su exactitud en la determinación y a su variabilidad o precisión y es el parámetro más importante a considerar desde el punto de vista analítico. Además, es necesario que el método se aplique a una variedad amplia de muestras y que sea práctico con respecto al costo, al tiempo de análisis y a la capacitación de los operarios para su realización.

El método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés, "*High-Performance Liquid Chromatography*") es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial por la AOAC (*Association of the Official Analytical Chemists*) y como método de referencia, para algunas micotoxinas. Otros métodos de referencia son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés, *Thin-Layer Chromatography*). Sin embargo, tanto HPLC como GC requieren de instrumentación de elevado costo y de una alta capacitación del usuario. Por consiguiente, en los últimos años se han desarrollado métodos inmunoquímicos para facilitar el análisis. La ventaja de estos métodos es que son rápidos, simples y de bajos requerimientos instrumentales. Por consiguiente, en el caso de tener que realizar un gran número de análisis en serie, los métodos inmunoquímicos representan una buena alternativa. Sin embargo, su mayor desventaja es que se presentan interferencias que ocasionan falsos positivos que conllevan a una interpretación errónea de los resultados. Por lo tanto, los valores positivos obtenidos con estos métodos conviene que sean confirmados mediante un método de referencia.

Los métodos inmunoquímicos comerciales se pueden dividir, básicamente, en métodos que utilizan columnas de inmunoafinidad y métodos ELISA (ensayos inmuno-adsorbentes ligados a enzimas). Aunque el método de columnas de inmunoafinidad fue originalmente desarrollado para la cuantificación mediante fluorimetría, en la actualidad las columnas han sido utilizadas para la purificación y concentración de las micotoxinas, para su posterior detección mediante HPLC, GC y TLC. En cuanto a los

métodos ELISA, estos son generalmente utilizados para un monitoreo (“screening”) rápido.

Otro aspecto importante es que el método analítico utilizado por el laboratorio haya sido desarrollado y validado para el tipo de matriz a analizar.

1.4. Patulina

La micotoxina patulina (PAT), es un metabolito secundario tóxico, producido por diferentes especies de hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Byssoschlamys*, siendo *P. expansum* la especie productora más importante y que se aísla con mayor frecuencia, sobre todo en manzanas y sus productos derivados [3, 13].

PAT se puede encontrar como contaminante natural en diferentes tipos de frutas (manzanas, peras, duraznos, damascos, uvas, bananas, ananá y frutillas) pero se aísla con mayor frecuencia en las manzanas y peras y sus productos derivados, tales como los jugos y el puré [14].

PAT fue descubierta como un antibiótico de amplio espectro, capaz de inhibir a más de 75 especies bacterianas diferentes (tanto “Gram” positivas como negativas), en la década de 1940 por varios grupos. Debido a esto, ha tenido nombres tales como, expansina, clavacina, claviformina, miocina C, etc. Inicialmente, se sugirió que este compuesto podría ser utilizado para el tratamiento de la congestión nasal, pero luego se observó, que no sólo era tóxica para otras bacterias, virus y hongos, sino también, para los vertebrados y las plantas superiores [15], hasta que durante la década de 1960, debido a los estudios que indicaban sus propiedades tóxicas, fue clasificada como una micotoxina [3].

1.4.1. Características generales de patulina

Químicamente, PAT es una γ -lactona heterocíclica α,β -insaturada, con la fórmula empírica $C_7H_6O_4$, cuyo origen biosintético es la ruta de los policétidos y cuya denominación según la IUPAC es, 4-hidroxi-4H-furo [3,2-c] piran-2(6H)-ona. En la Figura 1.4.1., se observa la estructura química de PAT, la numeración de sus átomos de carbono y se indican los grupos reactivos que posee la molécula.

A pesar de su aparentemente simple estructura, PAT ha producido un gran interés en el campo de la química de los productos naturales. Una inspección cuidadosa

de su estructura, revela su pronunciada reactividad y su sensible funcionalidad en el pequeño sistema de anillos bi-cíclico que posee, es decir, un hemiacetal cíclico, un enol éster, un acetal alílico y un dienoato conjugado [16].

Posee un peso molecular de 154 g mol^{-1} y se presenta como un sólido blanco, cristalino y con un punto de fusión entre 105 a $108 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta molécula es estable en medios de pH bajos y es resistente al tratamiento térmico, lo que hace difícil removerla de los alimentos a través de la pasteurización [17].

Su máximo de absorbancia se sitúa en 275 nm y el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) en ACN, determinado en nuestro laboratorio, fue de $16500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ($r = 0,9999$), el cual está en buen acuerdo con el valor informado en la literatura de $16600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para un solvente como el etanol [18].

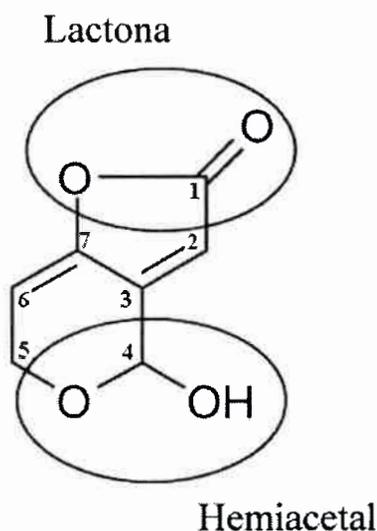


Figura 1.4.1. Estructura química de la micotoxina patulina.

PAT es soluble en agua, etanol, acetato de etilo, cloroformo, acetona, acetonitrilo, ligeramente soluble en éter etílico y benceno e insoluble en éter de petróleo, pentano y hexano. Es inestable en soluciones alcalinas, en soluciones de compuestos sulfurosos pierde su actividad biológica, y es destruida durante el proceso fermentativo para la producción de vino o sidra, debido a su degradación por las levaduras [3, 13, 19]. Esta micotoxina, también pierde su actividad biológica en soluciones alcalinas, ya que hidroliza y, por otro lado, es reducida en presencia de SO_2 [18].

Esta molécula, es aislada como una mezcla óptimamente inactiva, de isómeros D y L, determinados por la configuración del grupo oxidrilo del carbono 4 [20]. El grupo hemiacetal que posee es muy reactivo y, bajo las circunstancias apropiadas, reacciona como un aldehído [21].

La estructura cristalina de PAT revela la presencia de las dos enantioformas de PAT (D-PAT y L-PAT), que se encuentran en una relación 1:1 formando dímeros a través del grupo hemiacetálico, ya que se establecen puentes de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del anillo pirano de una molécula de D-PAT con el átomo de hidrógeno de L-PAT y viceversa [20, 22], tal como se muestra en la Figura 1.4.2.

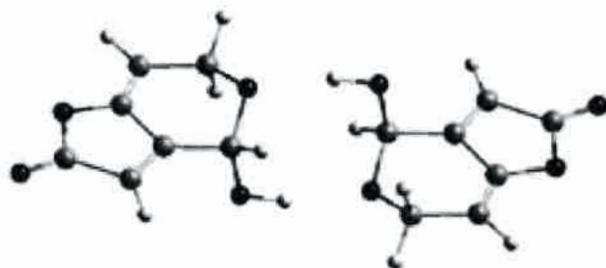


Figura 1.4.2. Estructuras de D-L PAT formando un dímero.

Los hongos productores de esta micotoxina contaminan las frutas, así, PAT es transferida a los jugos debido a su solubilidad en agua y dada su estabilidad al tratamiento térmico en medios ácidos, puede permanecer en una cantidad importante en los jugos procesados [23]. Como ya se mencionó, de las especies productoras de esta micotoxina, la que más se destaca es *P. expansum*, la cual, contamina habitualmente las manzanas y los productos derivados de ellas, los cuales se constituyen en la fuente más importante de patulina en la dieta humana [24, 25, 26].

1.4.2. Efectos sobre la salud y niveles permitidos de patulina

La valoración de los riesgos que la ingesta de PAT posee para la salud humana está basada en un amplio número de estudios realizados durante los últimos cincuenta años en diversos países [15]. Se han atribuido a la ingesta de PAT distintos síntomas agudos, crónicos, y otros, a nivel celular. Los síntomas agudos incluyen, nerviosismo,

convulsiones, distensión pulmonar, hemorragia intestinal y degeneración de células epiteliales [27]. Los síntomas crónicos incluyen, neurotoxicidad [28], genotoxicidad, inmunotoxicidad, inmunosupresión [29] y efectos mutagénicos y teratogénicos [30]. A nivel celular, esta micotoxina puede causar, ruptura de la membrana plasmática [27], inhibición de la síntesis de proteínas [31] e inhibición de la síntesis de ADN y ARN [32].

PAT es una molécula electrofílica, cuyos efectos tóxicos se cree que, en parte, son causados por la unión covalente de la micotoxina a los grupos sulfhidrilos existentes en las células (-SH, o tioles), de proteínas y del glutatión [17, 33].

Los productos contaminados con PAT, provocan un serio riesgo en la salud de los consumidores, en particular para aquellos grupos de riesgo, como lo son los niños, ya que son los que consumen, mayormente, productos derivados de las manzanas, sobre todo en los primeros años de vida [15].

Como ya se mencionó, la IARC ha clasificado a PAT dentro del grupo 3, debido a que no puede ser clasificada como carcinogénico para humanos y no puede incluirse en otro grupo [9], pero, como consecuencia de los distintos efectos adversos que posee sobre la salud de los consumidores, varios organismos internacionales han fijado límites para su presencia en alimentos. Así, la agencia de Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) ha recomendado un nivel máximo permitido de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (50 partes por billón, ppb) para jugos de fruta y sus productos derivados [34] y la Unión Europea a través de la reglamentación 1881/2006 del Mercado Común Europeo ha fijado niveles de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para jugos de fruta y sus productos derivados, $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (25 ppb) para productos de manzana sólidos y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (10 ppb) para jugos de manzana y productos de manzana sólidos consumidos por los niños [35].

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO) a través de un Comité de Expertos, estableció un límite provisional máximo de ingesta diaria permitida de PAT de $0,4 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corporal [15].

En cuanto a la incidencia que posee PAT en nuestro país, Funes y Resnik [36], encontraron que el 21,6 % de 51 productos sólidos y semisólidos de manzanas y peras, estaban contaminados con PAT, (en el intervalo de 17-221 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de producto, promedio de muestras positivas $61,7 \mu\text{g Kg}^{-1}$), siendo aún más altos los niveles de PAT si se toman en cuenta para su análisis solamente productos de manzana sólidos (promedio de muestras positivas, $123 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Los autores recomiendan que deban

realizarse esfuerzos para reducir los niveles de PAT en el mercado argentino, ya que dichos niveles, superan los recomendados por los Organismos Internacionales.

1.4.3. Reacciones químicas de patulina

Esta molécula, al poseer un grupo hemiacetal, reduce la solución de Fehling y decolora el permanganato de potasio [18].

A su vez, la reducción del grupo hemiacetalítico puede ser llevada a cabo mediante medios químicos, como la reducción con borohidruro de sodio (BH_4Na) para producir el E-ascladiol [37], un compuesto que es 25 % menos tóxico que PAT y que posee la misma estructura de lactona α,β -no saturada, como se muestra en la Figura 1.4.3.

En este tipo de reacciones, el ión borohidruro (BH_4^-), es quien actúa como agente reductor, básicamente, es la fuente de iones hidruro (H^-).

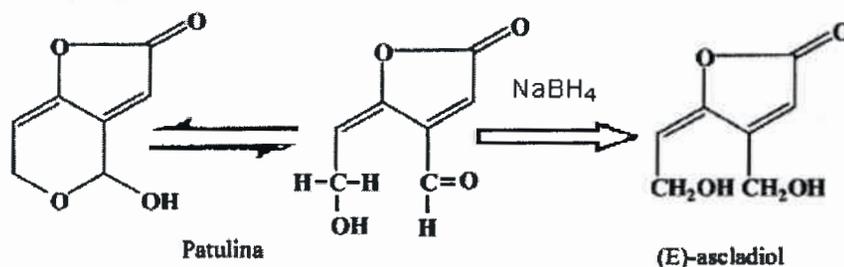


Figura 1.4.3. Reducción de PAT con borohidruro de sodio.

La reacción, comúnmente, es llevada a cabo en dos partes. En la primera, se forma un complejo entre 4 moléculas orgánicas y una de BH_4^- y, en la segunda etapa, se produce la liberación del complejo y la incorporación de otro protón a la molécula orgánica. Esta reacción ocurre por el mecanismo de adición nucleofílica, debido a que en la estructura de los grupos carbonilos, el enlace $\text{C}=\text{O}$ se encuentra polarizado, dada la mayor electronegatividad que posee el átomo de oxígeno respecto del átomo de carbono. Así, el átomo de carbono, con una densidad de carga positiva, es atacado por el ión H^- , el cual actúa como nucleófilo. Entonces, en la primera etapa de la reacción, que se puede realizar en solución alcohólica o acuosa ligeramente alcalina, se incorporan los 4 H^- a cada una de las moléculas orgánicas y, en la segunda etapa, se libera el complejo

por el agregado de una fuente extra de protones, como puede ser un ácido diluido o agua. Como resultado, se obtiene un alcohol primario, si lo que se redujo era un aldehído o un alcohol secundario si lo que se redujo, era un cetona.

La desaparición de PAT de los alimentos, es atribuida a su rápida reacción con proteínas o aminoácidos, como la cisteína (Figura 1.4.4.), que contienen grupos sulfhidrilos [25]. El mecanismo de reacción de PAT con cisteína es complejo y se puede postular que involucra una adición del tipo Michael, del grupo sulfhidrilo al doble enlace del sistema de la lactona no saturado, donde una molécula de PAT reacciona con más de una molécula de cisteína [38].

Por definición, el mecanismo de la reacción de Michael incluye el ataque nucleófilo del ion enolato sobre el carbono β del compuesto carbonílico insaturado, seguido de protonación.

En un principio, se postuló que el mecanismo de reacción involucraba la adición del tiol a las posiciones 4 y 7, de acuerdo a la numeración indicada en la Figura 1.4.5., pero un examen cuidadoso de la molécula de PAT indica la posibilidad de una variedad de estructuras de resonancia con, al menos, seis sitios capaces de sufrir un ataque nucleofílico (2, 3, 4, b, c, 7), como se indica en la Figura 1.4.5. [38].

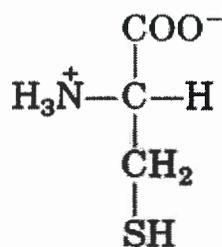


Figura 1.4.4. Estructura química del aminoácido cisteína.

PAT posee un centro quiral en la posición 4. La posición 7 también puede hacerse quiral, luego de la reacción de adición a dicho sitio, permitiendo la formación posterior de potenciales isómeros. Por otro lado, la cisteína es un compuesto trifuncional, por lo que el ataque del grupo tiol no es necesariamente la reacción inicial, aunque estudios cinéticos indicaron que los compuestos carbonílicos α,β -no saturados reaccionan preferentemente con los grupos sulfhidrilos.

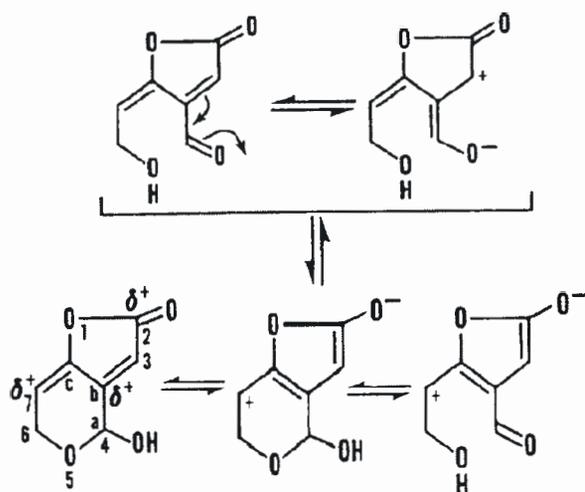


Figura 1.4.5. Posibles estructuras de resonancia de PAT.

Así, cuando PAT reacciona con compuestos que posean grupos tioles puede formar un gran número de productos, dependiendo de la posición en la que se produzca la adición nucleofílica. En total se obtiene una mezcla de 8 compuestos y sus isómeros, más las posibles estructuras heterocíclicas entre PAT y cisteína (Figura 1.4.6.) [38].

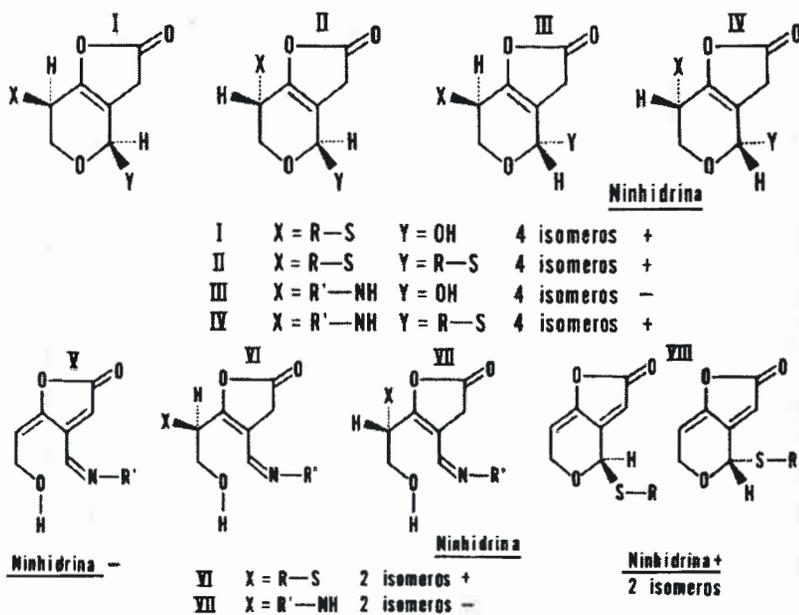


Figura 1.4.6. Los ocho compuestos químicos y sus isómeros, derivados de las reacciones de PAT con cisteína.

Por otro lado, si bien PAT es estable a altas temperaturas y en medio ácido, la presencia de sulfitos acelera su degradación térmica, debido a que favorece la apertura del grupo hemiacetálico formando aductos aldehído-sulfidriilo, previo a la retroaldolización e hidrólisis de la lactona [39].

Las reacciones químicas que tiene PAT con los tioles son importantes debido a que, los múltiples efectos a nivel celular causados por PAT, se cree que son causados por la formación de enlaces covalentes con aquellos componentes celulares que posean grupos tioles, como las proteínas, por lo que se puede esperar que PAT interactúe con las proteínas formando una gran diversidad de aductos y modificando así, sus estructuras terciarias o cuaternarias [40].

PAT, también es capaz de reaccionar con los grupos α -amino y las cadenas laterales de los residuos de lisina e histidina [15].

El comportamiento de PAT en cuanto a su reactividad química es importante, porque permite obtener métodos de detoxificación o para su eliminación de los alimentos. Dos de los métodos químicos más potentes para la detoxificación de PAT son la amoníación y la oxidación con permanganato de potasio. El tratamiento con amoníaco o la oxidación con permanganato de potasio reducen en un 99,9 % los niveles de PAT en el marco de laboratorio y, en jugos de manzana tratados con amoníaco, en un 99,8 %, pero el producto resultante ya no es apto para el consumo humano [15, 18].

Cabe destacar que, el procedimiento de limpieza del material de vidrio utilizado en el marco de esta tesis, se realiza con permanganato de potasio, lo cual elimina el contenido de PAT de dichos materiales y luego el permanganato es retirado por reacción con una mezcla 9:1 de peróxido de hidrogeno más ácido sulfúrico concentrado.

Por otro lado, varios estudios están de acuerdo en que PAT es inestable en presencia de dióxido de azufre, compuesto utilizado en la industria alimentaria, pero varían en el grado de efectividad. Este compuesto reacciona con PAT de dos formas. La primera, es una reacción reversible y ocurre a través de la adición del dióxido de azufre al anillo hemiacetálico de PAT, formando un carbonil hidroxisulfonato. La segunda reacción, irreversible, ocurre por apertura de la estructura en el anillo de la lactona en el doble enlace. La reversibilidad o irreversibilidad de la reacción dependen del pH del medio [15].

1.4.4. Transformaciones biológicas de patulina

La destrucción completa de PAT, ha sido observada durante la fermentación alcohólica de los jugos para producir sidra [41], lo cual hace que, en principio, este producto esté libre de PAT.

Cuando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fermenta los productos de la manzana, en presencia de la micotoxina, la mayor parte se convierte en productos no volátiles solubles en agua, principalmente el E-ascladiol. Aproximadamente, el 90 % de PAT, es eliminado durante la fermentación [18].

La degradación de PAT ocurre en condiciones donde es favorecido el metabolismo fermentativo, mientras que durante el crecimiento en condiciones de aerobiosis, no se observa la desaparición de PAT. La asociación de la degradación de PAT con las condiciones fermentativas sugiere que el proceso involucra la reducción de PAT y este proceso depende de la síntesis de proteínas por parte de las levaduras [37].

Bajo condiciones fermentativas, se encontró que los productos de degradación de PAT presentan una banda de adsorción, con un $\lambda_{\text{máx}}$ a 271 nm, indicando que el cromóforo de PAT permanecía intacto en ambos metabolitos. Por comparación con el producto obtenido a partir de la reacción de PAT con borohidruro de sodio, se determinó que el producto de degradación de PAT por las levaduras era E-ascladiol [37].

A su vez, el E-ascladiol es el último precursor en la ruta biosintética de PAT (Figura 1.4.7.) [15].

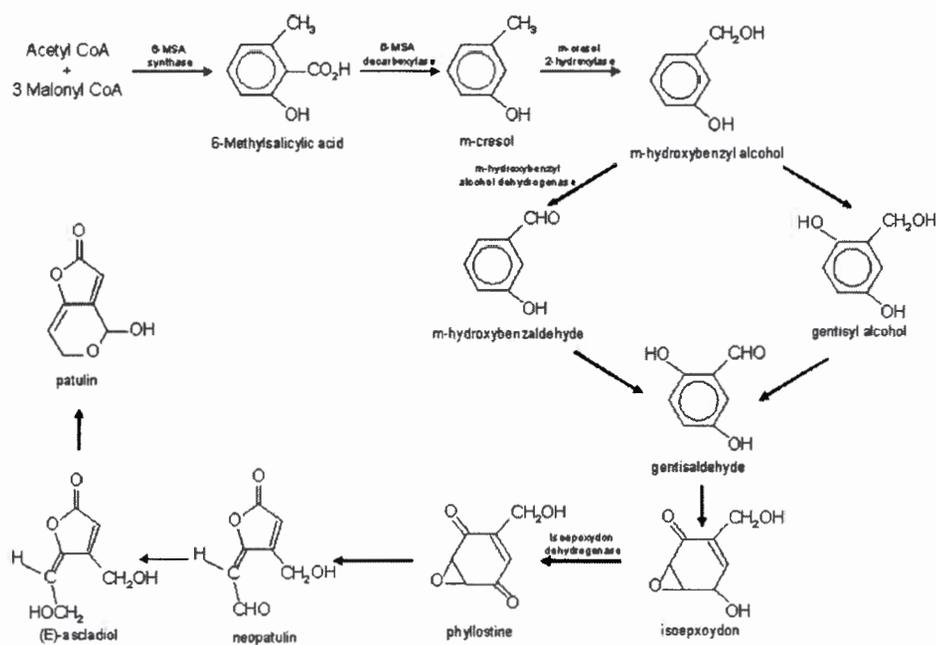


Figura 1.4.7. Ruta biosintética de PAT.

Por otro lado, el E-ascladiol puede ser transformado no enzimáticamente en su isómero Z-ascladiol, por compuestos con grupos sulfidrilos, tales como, homocisteína, cisteína y glutatión [37, 42].

Por otra parte, PAT también puede ser degradada por bacterias, tales como *Gluconobacter oxydans*, las cuales pueden ser aisladas de las partes putrefactas de las manzanas contaminadas con hongos productores de PAT. Los productos de degradación fueron, nuevamente, el E-ascladiol y el Z-ascladiol (en una relación de 3,5:1, respectivamente) [43]. La estructura química de estos compuestos, se muestra en la Figura 1.4.8.

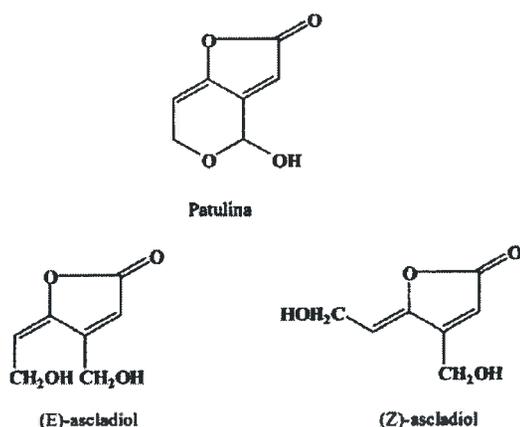


Figura 1.4.8. PAT y sus productos de degradación biológica.

1.4.5. Análisis cuantitativo de patulina por métodos cromatográficos

La técnica analítica más frecuente usada para determinar PAT en productos de manzana y sus derivados, es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés, “*High-Performance Liquid Chromatography*”), pero también se han desarrollado otras técnicas, como la cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés, *Thin-Layer Chromatography*), la cromatografía gaseosa (CG), con o sin derivatización de la muestra y acoplada a detectores de masa o captura electrónica.

El punto en común que tienen estos métodos es que todos ellos requieren una etapa de preparación de la muestra y de extracción de PAT, siendo la más frecuente la extracción líquido-líquido utilizando solventes orgánicos, pero también existen protocolos de extracción en fase sólida. Existen diferentes causas que explican la necesidad de estos procedimientos de extracción y purificación, por ejemplo, la distribución no homogénea de la micotoxina en la muestra y, a veces, los bajos niveles de contaminación de las muestras [17].

Estos métodos y sus procedimientos de extracción serán discutidos en las secciones siguientes, debido a que son el punto de partida para el desarrollo de nuestra metodología analítica, la cual se aplicará en el análisis de jugos de manzana.

1.4.5.1. Análisis de patulina mediante cromatografía de capa fina

La cromatografía líquida de capa fina (TLC) es una técnica tradicional para el análisis de micotoxinas. Su bajo costo y simplicidad son las principales ventajas de esta técnica analítica, además, la separación de las micotoxinas de aquellos compuestos no deseados, le confieren especificidad y sensibilidad. Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica es la baja reproducibilidad en la aplicación de las muestras a las placas y el revelado de las mismas, lo cual puede llegar a ser mejorado con la experiencia del analista [44].

La TLC fue uno de los primeros métodos desarrollados para el análisis de esta micotoxina y la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en inglés, *Association of Official Analytical Chemists*) ha aprobado esta metodología, método 974.18 [45]. Este método involucra la extracción de PAT con acetato de etilo y la limpieza de la muestra sobre columnas de sílica gel. La detección sobre placas de sílica gel se logra, rociando sobre las mismas, 3-metil-2-benzotiazolinona hidracina (MBTH). La técnica tiene un límite de detección de aproximadamente $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (20 ppb).

Martins y col. [46] utilizaron TLC para determinar PAT en las áreas putrefactas de diversas variedades de manzanas. Para la extracción, purificación, separación y cuantificación, utilizaron la metodología propuesta por Gimeno y Martins [47]. La técnica involucra la extracción de las micotoxinas a partir de 50 g de muestra, utilizando 200 mL de una mezcla de acetonitrilo-KCl acuoso al 4 % en una relación de 9:1. Luego, el extracto orgánico o una alícuota del mismo, es evaporado a sequedad y re-disuelto en 1 mL de cloroformo. Las placas de TLC son sembradas con 10 μL del extracto en cloroformo y desarrolladas con un sistema de solventes, que consta de tolueno-acetato de etilo-cloroformo (80:70:50) y reveladas con MBTH calentando las placas a 130 °C por 15 min. PAT aparece sobre las placas como un punto amarillo bajo luz visible o amarillo-anaranjado bajo luz UV (366 nm). Con esta técnica los autores alcanzan un límite de detección de $120\text{-}130 \mu\text{g L}^{-1}$ (120-130 ppb) y un porcentaje de recuperación del 92 %.

Otra variante de esta metodología, es la utilización de la diálisis difásica para la extracción de PAT, ya que se considera una alternativa simple para preparar la muestra y económica en mano de obra y solventes [48]. En este caso, una membrana de diálisis conteniendo el solvente de extracción orgánico, es colocada en una matriz acuosa con

agitación, de tal manera que los componentes de bajo peso molecular de interés, pasen a través de la membrana, mientras que las impurezas de alto peso molecular, quedan retenidas en la matriz acuosa. PAT presente en jugos de manzana fue extraída por esta técnica y analizada por TLC, sobre placas de sílica con MBTH, alcanzando un 65 % de porcentaje de extracción y un límite de detección de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (50 ppb) [45].

En un estudio realizado para optimizar y validar la técnica de TLC en el análisis de jugos de uva contaminados con PAT [44], se determinó que la mejor respuesta se obtenía al realizar 3 etapas de extracción con 100 mL de acetato de etilo en la primera y 50 mL en las dos restantes, a 50 mL de muestra. Luego, se utilizan 40 mL de carbonato de sodio al 1,5 % para limpiar el extracto y tras evaporar el solvente, el extracto es redisoluto en 100 μL de etanol. Las placas de sílica son sembradas con 10 μL del extracto, el solvente de corrida fue una mezcla de tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (6:3:1) y las placas son reveladas con MBTH al 0,5 % en ácido fórmico. Así, el método mostró valores de recuperación de alrededor del 65 % y un límite de detección de $16 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (16 ppb).

1.4.5.2. Análisis de patulina mediante cromatografía gaseosa

El análisis de PAT por cromatografía gaseosa (CG) involucra, generalmente, un procedimiento de derivatización, es decir, la formación del éter de PAT trimetilsilano (PAT-TMS) o acetilado, con el objetivo de obtener un analito menos polar, más volátil y que produzca iones más específicos, de mayor relación m/z . Los detectores acoplados a CG pueden ser por captura electrónica o espectrometría de masas (MS) [15, 45].

El empleo de métodos de GC-MS para la determinación de PAT no derivatizada, aislada de matrices complejas, resulta difícil y problemático. Esto se debe a que algunos componentes de la matriz son extraídos junto a PAT y originan fragmentos de masa que son comunes a PAT. Entonces, debido al alto ruido químico, alcanzar bajos límites de detección se hace casi imposible. Sin embargo, la reciente comercialización de isótopos de PAT, como estándar interno, incrementa la posibilidad de una exacta cuantificación de esta micotoxina en matrices complejas, previo a derivatizar la molécula [49].

En un estudio realizado por Moukas y col. [50], PAT-TMS fue determinada en jugos de manzana utilizando GC-MS en el modo de monitoreo iónico y realizando un procedimiento de extracción con acetato de etilo, posterior limpieza con carbonato de

sodio al 1,5 % y secado con Na_2SO_4 . Con esta técnica se alcanzó un límite de detección de $5,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (5,8 ppb), con un porcentaje de recuperación del 41 %.

En otro trabajo, realizado por Cunha y col. [49] en productos de manzana, PAT fue extraída de las muestras utilizando una mezcla de acetato de etilo-hexano (95:5 v/v). Luego, PAT fue derivatizada con *N,O*-bis-trimetil-sililtrifluoro-acetamida y cuantificada utilizando como estándar interno un isótopo comercial de PAT $^{13}\text{C}_{5-7}$, lo cual les permitió mejorar o suprimir los efectos causados por la matriz. Bajo estas condiciones, se obtuvo un límite de detección de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,4 ppb), con un porcentaje de recuperación del 71-89 %.

1.4.5.3. Análisis de patulina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia

En la mayoría de laboratorios del mundo, las determinaciones de rutina de PAT, en jugos de manzana, son realizadas por esta metodología. La cromatografía de alta eficiencia (HPLC), con detección ultravioleta (UV), es particularmente adecuada para la determinación de PAT, debido a que esta micotoxina es relativamente polar y exhibe una intensa absorción en el espectro UV y, aunque los trabajos originales involucraban cromatografía de fase normal, todas las publicaciones más recientes utilizan columnas de fase inversa y acetato de etilo como solvente de extracción [45]. Si bien estos métodos ofrecen buenos resultados para la separación y cuantificación de PAT y 5-hidroximetilfurfural (HMF), la presencia de picos interferentes hace difícil sus determinaciones, siendo necesarios, varios pasos de pre-tratamiento de las muestras, haciendo que el proceso sea lento y caro [17].

El método oficial adoptado por la AOAC, método 995.10, cuyo límite de detección es de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (5 ppb), incluye la extracción de PAT con acetato de etilo, purificación por partición con una solución de carbonato de sodio al 1,5 % y secado con sulfato de sodio anhidro. Luego de evaporar el acetato de etilo, el residuo seco se disuelve en agua acidificada (pH 4,0, por adición de ácido acético). El sistema recomendado incluye, una fase estacionaria con partículas de $5 \mu\text{m}$, una columna de C_{18} , con detector UV-visible fijo a 276 nm. Este sistema puede ser corrido isocráticamente, con una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} , usando de 3 a 10 % de acetonitrilo en agua acidificada (0,095 partes por volumen de ácido perclórico al 60 %). Las recuperaciones de PAT obtenidas están entre el 91-108 %, con una media de 96 % [51]. Este método

logra una buena separación de los picos de PAT y HMF, el cual es un compuesto que suele acompañar a PAT y que es extraído simultáneamente con ésta, siendo éste eluido en primer lugar [15].

Durante el procesado de las manzanas, para la manufactura del jugo, ciertas etapas son importantes, ya que afectan de manera notable la calidad del producto final. La etapa de clarificación, que incluye un tratamiento de despectinización enzimático y de filtrado, en el cual se remueven sustancias pécticas, proteínas y compuestos fenólicos, que perjudican la buena apariencia del producto final, mediante el tratamiento con materiales, tales como: gelatina, carbón activado, polivinilpirrolidona, etc. [52]. Luego de estos tratamientos, el producto final es el jugo de manzana clarificado (“clear apple juice”).

Cabe aclarar que, cuando se analizan jugos de manzana turbios (“cloudy apple juices”), es recomendable tratar la muestra con enzimas pectinasas comerciales y, luego, centrifugar para eliminar las partes sólidas, con el objetivo de evitar la formación de emulsiones durante el proceso de extracción de PAT de la muestra [51].

Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados, que constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de las células vegetales y, en presencia de agua, forman geles. La presencia de estos compuestos en los jugos de manzana afecta de manera notable los porcentajes de recuperación de PAT cuando se utiliza el método antes descrito.

MacDonald y col. [53] realizaron un estudio para validar el método oficialmente adoptado por la AOAC, analizando jugos de manzana clarificados, turbios y puré de manzana. En este trabajo se realizó el tratamiento enzimático con pectinasas, solamente a los jugos de manzana turbios y al puré de manzana. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron de 89 % para los jugos de manzana clarificados, 80 % para los jugos de manzana turbios y 92 % para el puré de manzana.

En otro estudio, cuando se comparó el porcentaje de recuperación de PAT de jugos de manzana clarificados y el de jugos de manzana turbios, se encontró que el porcentaje de recuperación era de 95 y 75 %, respectivamente. No obstante, los jugos de manzana turbios, fueron pre-tratados con pectinasas (toda la noche a temperatura ambiente) [25].

En la manufactura del jugo de manzana, las etapas de clarificación y filtración son las que reducen de manera más notable el porcentaje de PAT en el producto final [52], ya que remueven las partes sólidas del jugo de manzana, las cuales contienen un

alto porcentaje de proteínas y justamente, PAT es capaz de reaccionar con los grupos tioles y los grupos α -amino de los aminoácidos de las proteínas, formando enlaces covalentes [15, 40]. Posiblemente, las interacciones entre PAT y las proteínas se hacen más importantes en los jugos de manzana turbios que en los clarificados, debido a que los jugos de manzana turbios contienen un porcentaje de proteínas y aminoácidos libres más alto que los jugos de manzana clarificados [40].

Por otro lado, la extracción y/o purificación de PAT de los jugos de manzana también puede ser realizada en fase sólida. Rovira y col. [54] desarrollaron un método utilizando cartuchos comerciales de sílica para la purificación de los extractos de acetato de etilo, previo al análisis por HPLC de fase inversa. Con ello, obtuvieron porcentajes de recuperación del 80-87 % y un límite de detección de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (2 ppb).

1.4.6. Análisis cuantitativo de patulina mediante técnicas electroquímicas

Un análisis exhaustivo de la bibliografía publicada de las últimas décadas muestra sólo un trabajo referido a las propiedades electroquímicas de PAT. En este trabajo, Wasicki y col. [55], describen el comportamiento polarográfico de la micotoxina en medio acuoso, formado por soluciones reguladoras de fosfato y en medio acetonitrilo (ACN) + 0,1 M de perclorato de tetraetil amonio (PTEA). A los fines de obtener una mejor señal, previo al análisis de los jugos de manzana, el método requiere de la extracción de PAT con acetato de etilo, utilizando un método similar al descrito para el análisis por HPLC.

En medio acuoso (solución reguladora de fosfato de pH 4,7), el potencial de pico ($E_{p,c}$) de reducción de PAT se encontró en -1,21 V vs ECS. Por otra parte, no obtuvieron una buena separación entre los potenciales de los picos de reducción de PAT y de HMF, dado que ambos poseen propiedades polarográficas similares. También, propusieron un esquema de reacción (Esquema 1), basándose en el estudio de la dependencia del $E_{p,c}$ con el pH (en el intervalo de pH comprendidos entre 3,0 y 7,0). Un gráfico de $E_{p,c}$ vs pH dio una pendiente de 33,8 mV / década, a partir de la cual se puede inferir que en el proceso de electrodo participan 2 electrones y un protón.

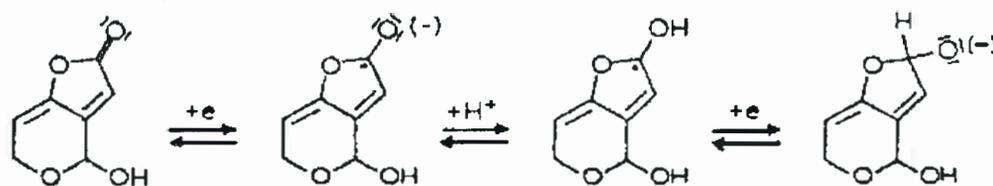


Figura 1.4.9. Esquema de reacción de PAT en solución reguladora de fosfato de pH 4,7.

Luego, cuando utilizaron ACN + 0,1 PTEA como medio de reacción, obtuvieron una buena separación entre los picos de PAT y HMF (0,160 V), un límite de detección de $1,3 \times 10^{-7}$ M (20 ppb) y un porcentaje de recuperación del 88 %.

1.4.7. Análisis cuantitativo de patulina mediante técnicas inmunoquímicas

El bajo peso molecular de esta micotoxina no ha permitido el desarrollo de metodologías rápidas que incluyan tecnologías inmunoquímicas, de manera que no hay disponibles en el mercado kits de inmuno-ensayos enzimáticos (ELISA), para el análisis de PAT en alimentos [15, 45]. Sin embargo, la producción de anticuerpos policlonales contra el derivado hemiglutarato de patulina (PAT-HG) ha sido descrita en la literatura y han sido probados en ensayos de ELISA indirectos [56]. Sin embargo, los autores no muestran resultados que confirmen la estructura del hapteno utilizado y la producción de los anticuerpos no ha sido demostrada claramente.

Sheu y col. [57] describieron la producción de anticuerpos policlonales contra derivados de PAT hemisuccinato (PAT-HS), conjugados a albúmina de suero bovino (BSA), para la inmunización de ratones. Determinaron títulos y especificidad de los anticuerpos obtenidos, utilizando un ensayo ELISA indirecto y, si bien no obtuvieron una buena respuesta contra PAT libre, demostraron el potencial de la técnica para el desarrollo de anticuerpos monoclonales.

En otro trabajo más reciente, Mhadhbi y col. [58], utilizando como inmunógenos PAT-HG-BSA en conejos, produjeron anticuerpos policlonales contra PAT. Luego de evaluar títulos y especificidad por medio de un ensayo ELISA indirecto, determinaron que sólo el 30 % de los anticuerpos eran específicos para PAT libre, lo cual no fue suficiente para desarrollar un inmunoensayo para el análisis de alimentos.

CAPITULO 2

2. Fundamentos teóricos

2.1. Reducción electroquímica de los grupos carbonilo

En la estructura química de PAT (Figura 1.4.1.) se distinguen dos grupos carbonilos que, en principio, son capaces de ser reducidos electroquímicamente, uno, es un grupo ceto ubicado en el carbono 1 de la molécula y se encuentra formando la lactona; el otro, es un aldehído ubicado en el carbono 4 de la molécula y, se encuentra formando el hemiacetal. Ambos, son grupos carbonilos α,β -no saturados.

A continuación se muestra un resumen de algunos aspectos importantes en la reducción electroquímica de los grupos carbonilos [59].

2.1.1. Aldehídos y cetonas no olefínicos

2.1.1.1. Mecanismo general

Todos los compuestos que posean un grupo carbonilo en su forma libre son electroreducibles. Sin embargo si el grupo carbonilo se encuentra “enmascarado”, por ejemplo, por hidratación o la formación de un acetal o hemiacetal, se hace no reducible. Así, la reducción (cinéticamente controlada), ocurrirá solo para la cantidad de carbonilo libre en equilibrio con la forma “protegida”. Esto es llamativamente ilustrado en la reducción de la glucosa, donde se establece un equilibrio entre las estructuras abierta y cerrada de la molécula.

Dependiendo del sistema electrolito-solvente y de los otros constituyentes del medio utilizado: prótico o aprótico, presencia o ausencia de potenciales donores de protones, la dureza del catión del electrolito soporte y de la velocidad de las reacciones que a continuación tenga el intermediario, la reducción de los compuestos carbonílicos puede involucrar:

- 1) dos etapas distintas de un electrón,
- 2) una etapa de dos electrones (aunque este caso es probabilísticamente casi imposible), o
- 3) una transferencia de un electrón.

Esta triada de posibilidades puede ser comprendida con mayor facilidad, si se considera a 2) y 3) como “perturbaciones” de 1).

En la Figura 2.1.1., se puede observar la reducción de un grupo carbonilo en un sistema modelo:

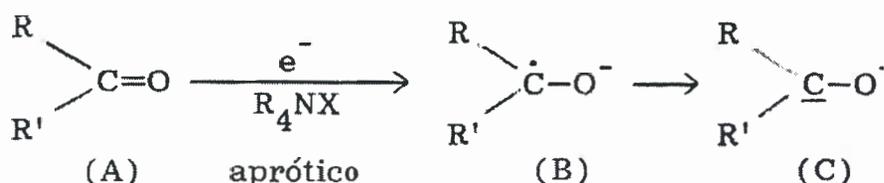


Figura 2.1.1. Reducción de un caso idealizado de un grupo carbonilo.

R= hidrocarbilo, R'= hidrocarbilo o H.

La reducción de (A), en un medio aprótico y con una sal de amonio cuaternaria, como electrolito soporte, produce la formación de un anión radical (B). La protonación de (B) o, cuando es generado en presencia de un catión “duro” tal como el Li^+ , da lugar a un radical libre transitorio (D), el cual es, usualmente, reducido más fácilmente que (A), como se muestra en la Figura 2.1.2. En estos casos un voltamperograma se ve ‘como si fuera’ un paso de 2 electrones, pero en realidad son 2 consecutivos de 1 electrón.

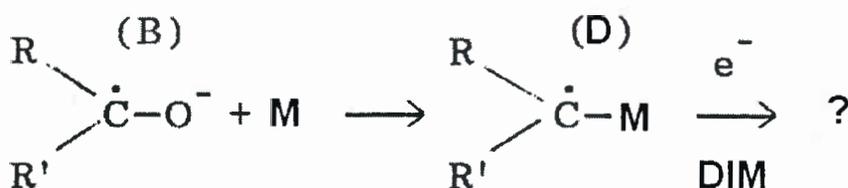


Figura 2.1.2. Reducción del grupo carbonilo, en presencia de protones

o de una sal de litio. M = H⁺ o Li⁺, DIM= dimerización.

El resultado es la categoría 2 (es decir, una reducción que involucra 2 electrones), a menos que la velocidad de dimerización de (D) sea más rápida tal que se produzca una situación de categoría 3 (o sea, una transferencia de un electrón).

En la categoría 1, la protonación, si ocurre es a consecuencia del o de los paso/s de transferencia/s de electrones. Podría haber, sin embargo, pre-protonación del compuesto carbonílico, en cuyo caso, se forma una especie catiónica, que tras su reducción, produce un radical (F). La especie (E), es reducida más fácilmente que (A). Un esquema de este caso se observa en la Figura 2.1.3.

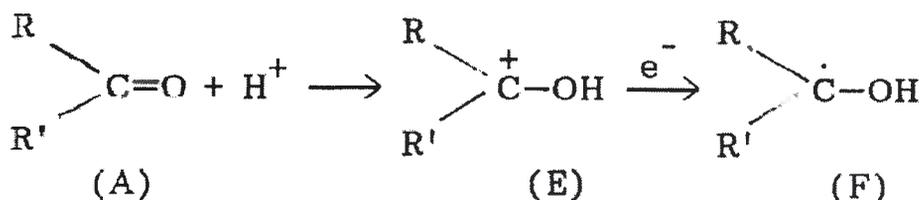


Figura 2.1.3. Preprotonación del grupo carbonílico.

Un ejemplo de este último caso, lo constituye la primer etapa de la reducción de acetona en un medio aprótico, la cual se produce a aproximadamente -2,5 V cuando se agrega un 80% de etanol (capaz de post-protonar), mientras que, en 1 N de ácido sulfúrico (capaz de pre-protonar) se produce a -1,2 V (ambos vs ECS), lo cual pone de manifiesto el corrimiento en el potencial de reducción a consecuencia de la protonación previa a transferencia de carga. También es el caso de PAT, ya que cuando se estudia la reducción electroquímica en medio formato por acetonitrilo + 0,1 M de perclorato de tetrabutil amonio + ácido trifluoroacético (ATFA), se produce un corrimiento de 0,200 V en la dirección anódica, respecto del potencial observado en ausencia del ATFA, cuando la concentración de ATFA es poco más que el doble de la concentración de PAT.

En la Figura 2.1.4., se resumen las distintas variedades de mecanismos de reducción para estos compuestos.

En general, el primer paso electroquímico es una transferencia reversible de un electrón, desde el electrodo al compuesto carbonílico (antes o después de la protonación). Luego, los radicales formados de compuestos aromáticos son relativamente estables y muchas de sus propiedades pueden ser investigadas por varios métodos, incluyendo algunos electroquímicos.

Los radicales formados de compuestos alifáticos son usualmente imposibles de detectar. Por ejemplo, la vida media del anión radical de acetona en 2-propanol acuoso, es de 72 μs , mientras que la del anión radical de acetofenona es de 1,5 ms, lo cual ilustra claramente, la diferencia entre la reducción de los compuestos alifáticos y aromáticos.

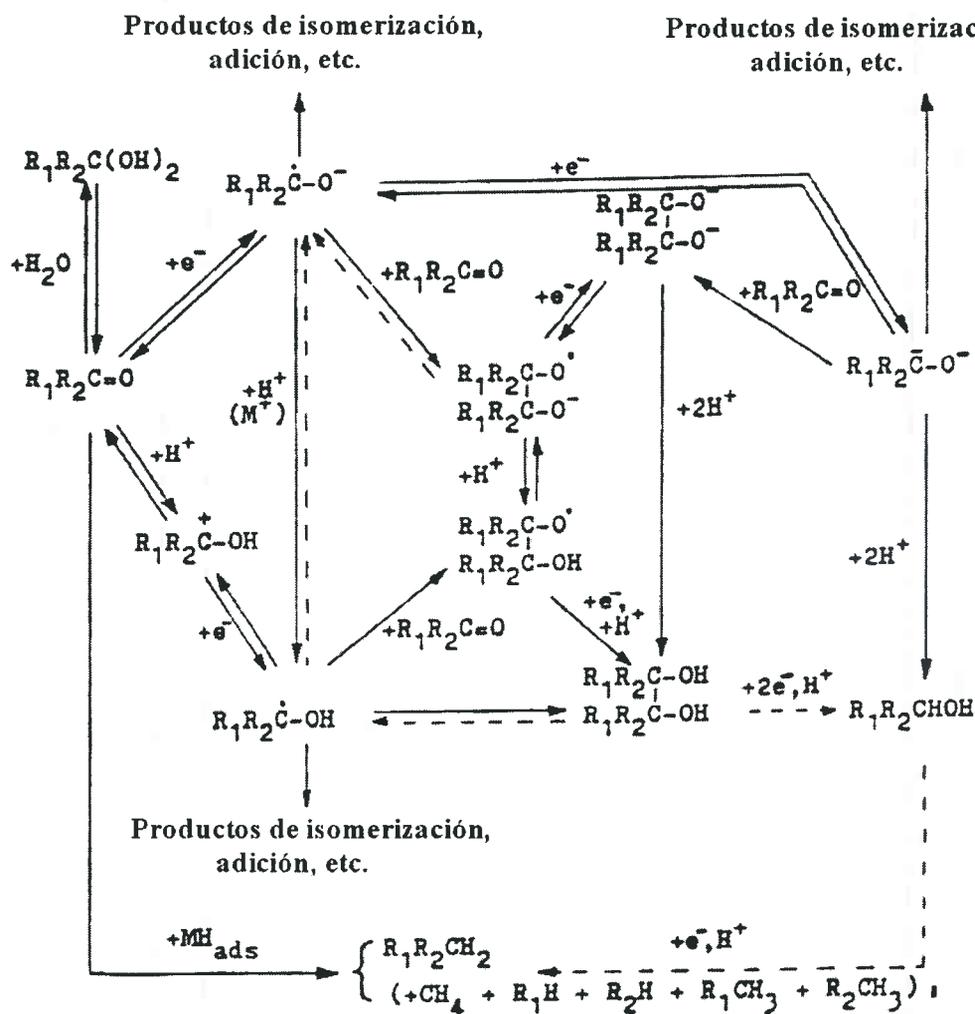


Figura 2.1.4. Mecanismos de reducción de los grupos carbonílicos.

2.1.1.2. Productos de reducción y guías para selectividad

Hay algunos principios generales, con excepciones, cuando más de un grupo químico se encuentra en la misma molécula.

En principio, las cetonas son reducidas a alcoholes secundarios, y los aldehídos, producen alcoholes primarios. La formación de alcoholes es favorecida, utilizando altos sobrepotenciales y medios alcalinos acuosos. El medio aprótico también es útil.

La dimerización de aldehídos a glicoles y de cetonas a pinacoles es favorecida por altos sobrepotenciales, condiciones ácidas, alta concentración del sustrato y el incremento en la cadena de los aldehídos alifáticos. Los compuestos carbonílicos aromáticos forman dímeros con mayor facilidad que sus análogos alifáticos.

En medio aprótico la presencia del ión Li^+ favorece la formación de dímeros.

El grupo ceto en compuestos polifuncionales, tales como ceto ésteres, puede ser reducido a metileno.

Los aldehídos sustituidos, (por ejemplo, aldol o gliceraldehído), forman los correspondientes alcoholes primarios, si los sustituyentes en sí mismos no son reducidos, si lo son, ellos pueden ser reducidos antes o simultáneamente.

Las cetonas aromáticas y alquil-aromáticas rápidamente forman pinacoles por electroreducción (por dimerización) pero, es bastante frecuente, que ellas puedan ser reducidas a alcoholes secundarios.

En la reducción de cetonas sustituidas, el sustituyente en sí mismo puede ser también reducido, dependiendo de su potencial de reducción, de manera que el producto finalmente obtenido puede ser el resultado de reacciones químicas intramoleculares.

Compuestos polihidroxicarbonílicos, derivados de biomasa (por ejemplo, glucosa o fructosa) son reducibles. De hecho, la fabricación de una mezcla de sorbitol y manitol fue un destacado éxito comercial.

Los aldehídos aromáticos son fácilmente electroreducidos a los correspondientes alcoholes, pero ellos son más propensos que los aldehídos alifáticos a producir glicoles, particularmente, a altos sobrepotenciales.

El grupo carbonilo de aldehídos heterocíclicos es fácilmente reducido a carbinol.

Los aldehídos heterocíclicos existen más en la forma hidrogenada no reducible “gem-diol” que en la forma de aldehído alifático o aromático y, por lo tanto, deben primero, ser convertidos en la forma no hidratada. En medio fuertemente alcalino los aldehídos son, en gran parte, reducidos a glicoles.

Las cetonas son reducidas a alcoholes secundarios, bajo condiciones análogas a aquellas utilizadas en la reducción de aldehídos.

2.1.2. Compuestos carbonílicos olefínicos

2.1.2.1. Mecanismo general

Esta sección concierne a compuestos carbonílicos α,β -no saturados y aquellos con dobles enlaces más remotos. La reducción puede involucrar:

- 1) solamente la función carbonilo,
- 2) sólo el doble enlace, ó
- 3) ambos, ó
- 4) una dimerización.

2.1.2.2. Compuestos carbonílicos α,β -no saturados

La reducción electroquímica de la estructura que se observa en la Figura 2.1.5., puede causar:

- 1) saturación de doble enlace 3,4,
- 2) reducción del carbonilo a alcohol,
- 3) ambos, 1) y 2),
- 4) la dimerización de dos moléculas a través de las posiciones C-4 ó C-2 o en C-4 de una molécula y C-2 de otra,
- 5) formación de oligómeros y polímeros por acoplamiento secuencial, y
- 6) la formación de compuestos organometálicos.

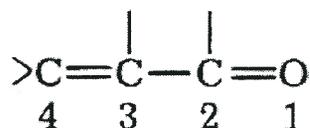


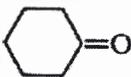
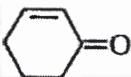
Figura 2.1.5. Estructura modelo de un compuesto α,β -no saturado.

El mecanismo de reducción de los compuestos carbonílicos α,β -no saturados, depende críticamente de las reacciones ácido-base precedentes, acompañando o siguientes a la transferencia electrónica, del material del cátodo, el catión del electrolito soporte y de la concentración del sustrato.

Se puede analizar el proceso de electroreducción de los compuestos carbonílicos no saturados usando el esquema de los carbonilos saturados pero, en el presente caso, las reacciones de isomerización, dimerización y otras transformaciones de los intermediarios son mucho más importantes. Además, la protonación del anión radical es posible tanto para el carbono como para el átomo de oxígeno.

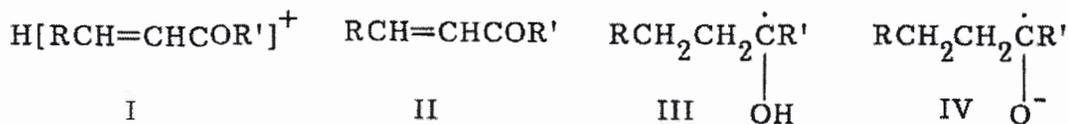
El principio general es que, cuando un grupo electroreducible está conjugado con un grupo olefínico, la molécula bajo condiciones comparables, se hace más fácil de reducir. Ejemplos de estos efectos se pueden observar en la Tabla 2.1.1.

Tabla 2.1.1. Comparación de los $E_{1/2}$ de compuestos carbonílicos α,β -no saturados, con aquellos correspondientes a los carbonilos saturados.

Compuestos	$-E_{1/2}^a$	Condiciones
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$	1,8	0,1 M LiCl
$\text{CH}_2=\text{CHCHO}$	1,5	pH 7-11
$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCHO}$	1,25	0,1 N NH_4Cl
$\text{CH}_3(\text{CH}=\text{CH})_x\text{CHO}$	1,05 to 0,7	pH 7; n = 2 to 5, resp.
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$	1,4	0,1 N NH_4Cl
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CHCHO}$	0,8	0,1 N NH_4Cl
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCH}_3$	2,25	0,025 N Me_4NI
$\text{CH}_2=\text{CHCOCH}_3$	1,42	0,1 N KCl
	2,45	0,05 N Et_4NI , 75% dioxano
	1,55	0,1 N NH_4Cl
a : primera onda de reducción vs ECS		

El enlace múltiple C-C es, generalmente, reducido antes que el grupo carbonilo.

Como, en el caso de los carbonilos saturados, la molécula pre-protonada (I) es reducida a potenciales más anódicos que su precursor (II); de la misma forma, después de la primera reducción, el radical neutro protonado (III) es reducido más fácilmente que el anión radical (IV):



El grupo carbonilo hidratado (por ejemplo, un aldehidol) no es electroreducible; la inversión a la forma hidratada es tanto catalizada por ácido como por base.

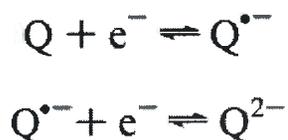
En sistemas apróticos, la transferencia de electrones está íntimamente unida con reacciones ácido-base. Un catión monovalente como Li^+ (también Mg^{+2}) puede, a veces, jugar un rol del protón en neutralizar un anión radical.

En medio aprótico, ya que no intervienen reacciones de H^+ entre los primeros dos pasos de $1e^-$, el anión radical y el intermediario dianión son, separadamente, discernibles. Ya que el material de partida está sujeto al ataque por radicales aniónicos o dianiónicos (y formar oligómeros y/o polímeros), las corrientes difusionales encontradas son más bajas que las esperadas en ausencia de estas complicaciones cinéticas.

2.2. Influencia del catión en la reducción de compuestos orgánicos

El electrolito soporte juega un rol importante en la reducción de los grupos carbonilos, sobre todo cuando se utilizan cationes de pequeño radio (como el Li^+), en el sentido de formar pares iónicos con los aniones o dianiones formados tras la transferencia electrónica. Así, el cambio en el electrolito soporte puede causar cambios drásticos en el comportamiento voltamperométrico de PAT.

La importancia de la identidad y la influencia del apareamiento iónico sobre la reducción voltamperométrica de quinonas ha sido el centro de mucha investigación, particularmente en solventes apróticos, donde la reducción, por lo general toma lugar, mediante dos pasos de un electrón:



Los cationes presentes en el electrolito soporte, interactúan con los aniones radicales y dianiones formados y, el nivel de la asociación, depende de la identidad de ambos iones y del solvente utilizado. En presencia de cationes de tetralquilamonio en solventes apróticos, por ejemplo, se asume que el grado de apareamiento iónico es muy pequeño o despreciable, de ahí que su uso como electrolitos soportes sea muy amplio.

Sin embargo, los cationes metálicos tienen una gran tendencia a formar complejos con los aniones orgánicos, lo cual puede tener un efecto drástico en el

comportamiento voltamperométrico y el corrimiento en los potenciales de pico de reducción hacia valores menos negativos, ya que los aniones son termodinámicamente estabilizados por la interacción de apareamiento iónico [60]. El alcance de este efecto se incrementa cuando el radio del catión disminuye, sugiriendo que el mayor efecto se obtiene cuando se utiliza Li^+ [61].

Por otro lado, es frecuente que las moléculas orgánicas, en medios apróticos, sufran reacciones de dimerización, tras la reducción electroquímica. Por ejemplo, en el caso de los aldehídos, la reactividad del ión radical en solventes apróticos, está influenciada por la formación de pares iónicos, con los cationes del electrolito soporte y la velocidad de la reacción de dimerización se incrementa con la disminución del radio del catión del electrolito soporte [62].

CAPITULO 3

3. Técnicas empleadas. Fundamentos teóricos

3.1. Introducción

La electroquímica es la rama de la química que estudia las interrelaciones entre los efectos eléctricos y químicos. Esta disciplina estudia los cambios químicos causados por el pasaje de una corriente eléctrica a una solución o la producción de una corriente eléctrica por reacciones químicas. Ahora bien, 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 del electrodo. Para asegurar el principio de la electroneutralidad del sistema, dos o más hemireacciones de transferencia de carga deben llevarse a cabo simultáneamente en direcciones opuestas. Para el caso de una 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) [63].

En contraste con muchas mediciones químicas que involucran soluciones homogéneas, el proceso electroquímico, toma lugar en la interfaz electrodo-solución.

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. La carga es transportada a través del electrodo por el movimiento de los electrones (y huecos) y, en la fase electrolítica, la carga es transportada por el movimiento de los iones.

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.

El uso de la electroquímica con propósitos analíticos, incluye un amplio intervalo de aplicaciones, como, el monitoreo medioambiental, control de calidad industrial y el análisis biomédico.

La distinción entre las técnicas electroanalíticas refleja el tipo de señal eléctrica utilizada para la cuantificación. Los dos principales tipos de mediciones electroanalíticas son las potenciométricas y las potenciostáticas. Ambos tipos, requieren de, al menos, dos electrodos y una solución electrolítica, los cuales constituyen la celda electroquímica. Uno de estos dos electrodos responde al/los analito/s en estudio y así, es llamado electrodo indicador o de trabajo. El segundo es llamado electrodo de referencia, cuyo potencial es constante (independientemente de las propiedades de la solución).

La potenciometría, la cual posee una gran importancia práctica, es una técnica de corriente nula, en la cual la información acerca de la composición de la muestra es obtenida midiendo el potencial que se establece a través de una membrana. Los diferentes tipos de materiales de membrana, con diferentes procesos de reconocimiento iónico, hacen que sea una técnica altamente selectiva. Se utiliza para el monitoreo directo de especies iónicas, tales como, protones, fluoruros, potasio, etc, en muestras complejas.

Las técnicas amperométricas, o de potencial controlado, por el contrario, están basadas en el/los cambios dinámicos (con paso de corriente) que ocurren en la interfaz electrodo-solución. Aquí, el potencial de electrodo es utilizado para producir una reacción de transferencia de electrones, lo cual origina un flujo de corriente, la que es registrada. El rol del potencial es análogo a la longitud de onda en los instrumentos ópticos, como el espectrofotómetro, en el sentido de que es un estímulo que provoca una respuesta, no obstante, la espectrofotometría analítica no tiene por objetivo producir una reacción química, lo que si sucede en las técnicas amperométricas. Así, el potencial, es utilizado para forzar a que una especie química pierda o gane electrones (oxidación o reducción, respectivamente). La corriente resultante, refleja la velocidad a la cual los electrones se mueven a través de la interfaz electrodo-solución. Las técnicas amperométricas pueden ser utilizadas para medir especies que sean electroactivas, en otras palabras, que sean factibles de ser reducidas u oxidadas electroquímicamente. El conocimiento de la reactividad de los grupos funcionales en un dado compuesto puede ser utilizado para predecir su electroactividad.

El objetivo de los experimentos electroanalíticos que utilizan técnicas amperométricas, es el de obtener una respuesta en corriente que se relaciona con la concentración del analito en estudio.

Las ventajas de las técnicas de potencial controlado incluyen, alta sensibilidad, selectividad hacia las especies electroactivas, amplio intervalo lineal, instrumentación portátil y de bajo costo y una amplia variedad de materiales de electrodo [64].

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 *faradaicos* y *no-faradaicos*. En todo proceso electroquímico que involucre la 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 la transferencia electrónica en la interfaz electrodo-solución, generando una corriente transitoria, llamada corriente no faradaica o corriente de cargado de la doble capa [65]. 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, es decir, el pasaje de electrones, ocurre a través de la interfaz electrodo-solución, procedente de una etapa de oxidación o de reducción, según sea la dirección en que fluyen los electrones, de una sustancia electroactiva en solución. Estos procesos son denominados faradaicos porque están gobernados 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), siendo n el número de electrones involucrados en la reacción en estudio, 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 [65]. La corriente faradaica es una indicación directa de la velocidad de la reacción.

Por lo general, los procesos faradaicos son los que tienen mayor interés en los 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 receptor. Para un electrodo metálico, importa el nivel de energía 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 la 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 [65]. La segunda fase, es un electrodo, en donde la carga es transportada por el movimiento de los electrones 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 (este último ya casi no se utiliza debido a su elevada toxicidad). 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 la reducción de la molécula en estudio. Sin embargo, no se puede estudiar una interfaz aislada, sino un conjunto de interfaces, las cuales constituyen la llamada celda electroquímica, la cual está compuesta por, al menos, dos electrodos, separados por la 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 el control de los potenciales de celda (la diferencia de potencial entre los electrodos en una celda) es uno de los aspectos más importantes de la electroquímica experimental [65].

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, la mayoría de las veces, uno está interesado en una de las hemireacciones. El electrodo donde ocurre esta hemireacción de interés, se denomina electrodo de trabajo. Dado que no es posible medir un potencial en una sola interfaz

aislada, los potenciales de las hemireacciones son referidas al potencial de un electrodo de referencia, cuyo potencial es constante y esto es equivalente a controlar la energía de los electrones del electrodo de trabajo.

El electrodo de referencia, 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 valor de potencial del electrodo de referencia es constante, no cero. Normalmente, se utilizan como electrodos de referencia, diferentes interfaces idealmente no polarizables, como el electrodo normal de hidrogeno (ENH), cuyo potencial absoluto ha sido definido, por convención, ya que no es el potencial absoluto como cero [64, 65]. Los más utilizados son el electrodo de plata/cloruro de plata y el electrodo de calomel saturado (ECS), este último está representado por:



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. Por el contrario, si la energía de los electrones es disminuida por imposición de un potencial más positivo en el electrodo de trabajo, 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. El potencial característico de estos procesos redox, tiene un valor determinado para cada cupla redox y es llamado potencial estándar (E°).

3.4. El experimento electroquímico y las variables en las celdas electroquímicas

Un estudio electroquímico de un sistema dado, consiste en conocer cómo se comportan ciertas variables del sistema, como 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.) y tipo de solvente.
- Variables externas: temperatura (T), presión (P) y tiempo (t).

Un sistema electroquímico experimental básico se observa en la Figura 3.4.1., 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 lo ajusta para mantener la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y referencia (el cual censa mediante un sistema de retroalimentación de alta impedancia), de acuerdo con el programa suministrado por el generador de funciones [65].

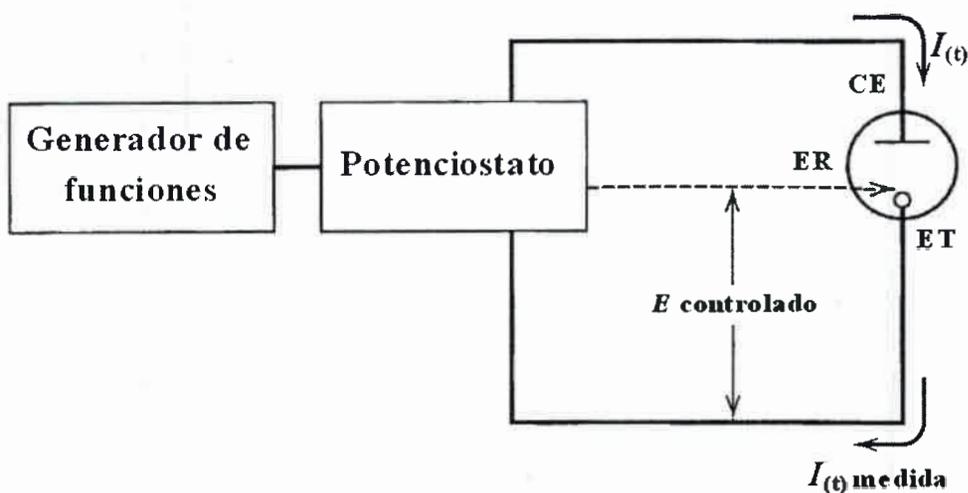


Figura 3.4.1. Esquema de un sistema experimental para experiencias de potencial controlado.

ER: electrodo de referencia, CE: contraelectrodo, ET: electrodo de trabajo.

Una forma de visualizar un experimento electroquímico, es en términos de la forma en la cual el sistema responde a una perturbación. La celda electroquímica es considerada como una “caja negra” en la cual una función de excitación (por ejemplo, un salto de potencial) es aplicado y, luego, una cierta función respuesta es medida (por ejemplo, la variación de la corriente con el tiempo), manteniendo todas las otras variables constantes. El objetivo de este experimento es obtener información (termodinámica, cinética, analítica, etc.) a partir de la observación de la función respuesta obtenida luego de aplicar la señal de excitación. Esta idea básica es la misma que se utiliza en otros tipos de investigaciones, tales como el análisis espectrofotométrico [65]. En la Figura 3.4.2., se muestra el concepto general y la comparación de un experimento espectrofotométrico y uno electroquímico.

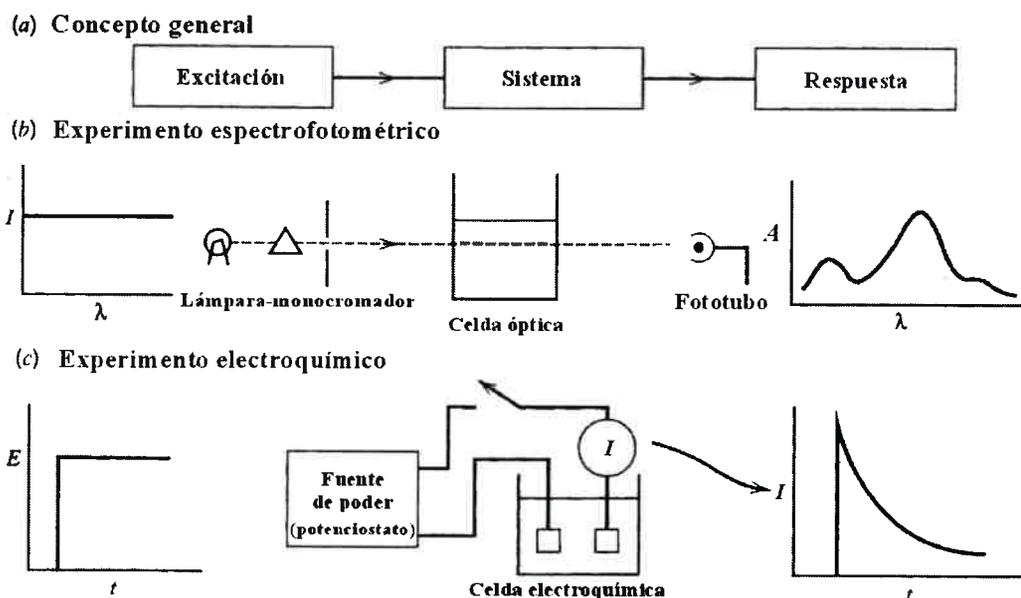


Figura 3.4.2. (a) Principio general utilizado. (b) En un experimento espectrofotométrico, la luz de diferentes longitudes de onda (λ) es la señal de excitación y la respuesta es la curva de la absorbancia (A) vs λ . (c) En un experimento electroquímico, la señal de excitación es el salto de potencial aplicado (E) y la respuesta observada es la curva corriente-tiempo ($I-t$).

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

Considerando la siguiente reacción 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, como se muestra en la Figura 3.5.1., La corriente (velocidad de reacción de electrodo), por lo general, se encuentra gobernada por la velocidad de los diferentes procesos llevados a cabo [65]. 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. Estas pueden ser homogéneas, tales como reacciones de dimerización o protonación, o heterogéneas como la descomposición catalítica sobre la superficie del electrodo.
- Otras reacciones de superficie, tales como la adsorción, desorción o cristalización (electrodeposición).

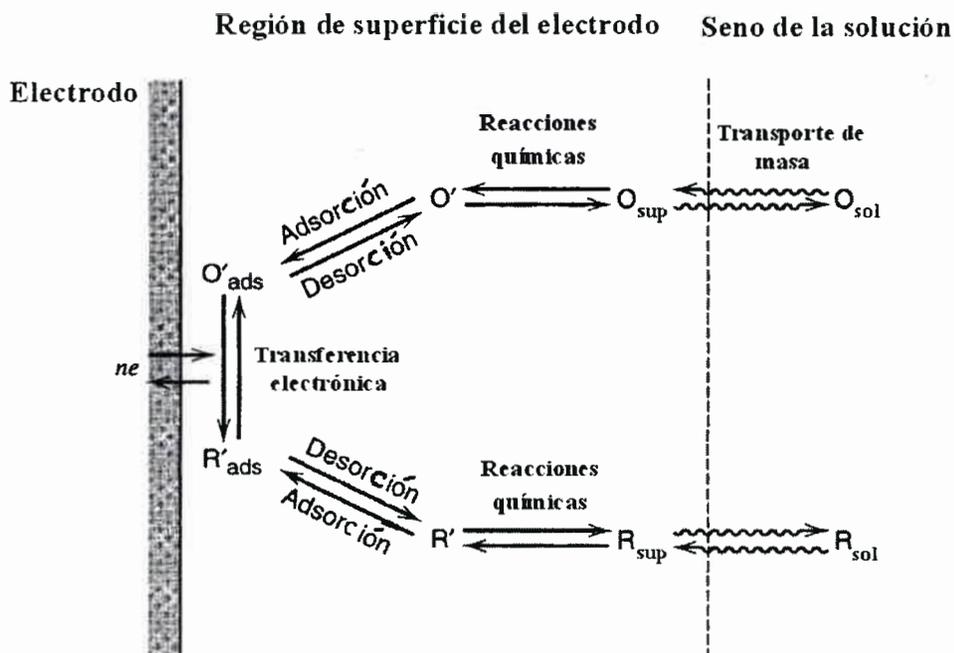


Figura 3.5.1. Reacción general de electrodo.

La reacción más simple, involucra únicamente el transporte de masa del reactivo (O) al electrodo, transferencia de electrones heterogénea involucrando especies no adsorbidas y el transporte de masa del producto (R) al seno de la solución.

Cuando se alcanza una corriente de estado estacionario, la velocidad de todas las etapas involucradas en la reacción son las mismas. La magnitud de esta corriente se encuentra limitada por el proceso más lento, 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 transporte de masa, y en ausencia de fenómenos de convección y de migración, 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. 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 [64, 65]:

➤ **Difusión:** es el movimiento espontáneo de los iones o moléculas neutras bajo la influencia de un gradiente de potencial químico, es decir, desde las regiones de alta concentración a las de más baja concentración.

➤ **Migración:** es el movimiento de las partículas cargadas a lo largo de un campo eléctrico. En una celda electroquímica, el transporte por migración es realizado por los iones del electrolito soporte de acuerdo a su número de transporte.

➤ **Convección:** Es el transporte por agitación o hidrodinámico. Generalmente, el flujo se produce por convección natural (causada por gradientes de densidad, térmicos, etc.) y la convección forzada (causada por la agitación mecánica de la solución).

Estos fenómenos de transporte son resumidos en la Figura 3.6.1. [64].

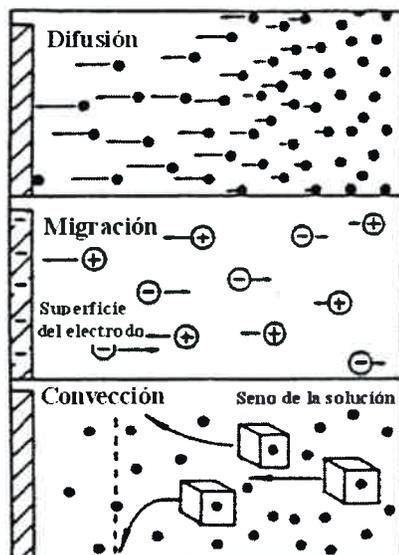


Figura 3.6.1. Los tres modos de transporte de masa.

El transporte de masa hacia la superficie del electrodo está gobernado por la ecuación de Nerst-Planck, que para un transporte de masa uni-dimensional a través del eje x se escribe como:

$$J_O(x) = -D_O \frac{\partial C_O(x)}{\partial x} - \frac{z_O F}{RT} D_O C_O \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_O v(x) \quad (3.6.1.)$$

donde $J_O(x)$ es el flujo de la especie O ($\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$) a una distancia x de la superficie del electrodo, D_O es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) de la especie O , $\partial C_O(x)/\partial x$ es el gradiente de concentración a una distancia x , $\partial \phi(x)/\partial x$ es el gradiente de potencial, z_O y C_O son la carga y la concentración (mol cm^{-3}) de la especie O respectivamente, F es la constante de Faraday y $v(x)$ es la velocidad (cm s^{-1}) 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 3.6.1., representan al transporte de masa en la solución, por difusión, migración y convección, respectivamente.

A fin de obtener una solución más simple de la ecuación diferencial de Nerst-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 es denominado, 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, tanto para solventes acuosos como para los no acuosos, y especialmente estos últimos, 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 3.6.1., solamente en función de la difusión.

El término difusivo se corresponde con 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 3.6.2.

$$J_o(x,t) = -D_o \frac{\partial C_o(x,t)}{\partial x} \quad (3.6.2.)$$

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:

$$\frac{\partial C_o(x,t)}{\partial t} = D_o \frac{\partial^2 C_o(x,t)}{\partial x^2} \quad (3.6.3.)$$

Esta ecuación refleja la velocidad de cambio con el tiempo para la concentración de O entre planos paralelos para la distancia x y $(x + \partial x)$. 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 [64, 65].

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 como varían las concentraciones con 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 ecuación 3.5.1., al aplicar un potencial adecuado al electrodo de trabajo, se produce una electrólisis 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):

$$I = -nFAJ_o(x,t) \quad (3.6.4.)$$

Donde n es el número de electrones intercambiados entre la especie O y la superficie del electrodo. Reemplazando la ecuación 3.6.2., en la ecuación 3.6.4., se obtiene la corriente en función del gradiente de concentración de O.

$$I = nFAD_o \frac{\partial C_o(x,t)}{\partial x} \quad (3.6.5.)$$

En la Figura 3.6.2., se muestra un perfil de concentración con el tiempo para una reacción de electrodo cuando se aplica un potencial sobre el electrodo de trabajo.

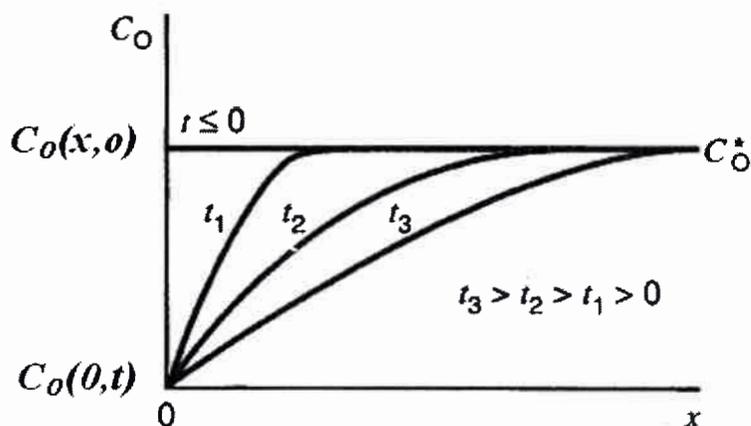


Figura 3.6.2. Variación de los perfiles de concentración de O con el tiempo, luego de aplicar un salto de potencial sobre el electrodo. $x = 0$ se corresponde a la superficie del electrodo.

3.7. Reversibilidad en procesos electroquímicos

En la práctica electroquímica 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 realizará una breve descripción de los conceptos de reversibilidad.

3.7.1. 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 opuesto al anterior ocurre, se tiene:



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

3.7.2. 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.

3.7.3. 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 derivada de ella [65]:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f(\gamma_o)}{g(\gamma_r)} \quad (3.7.4.)$$

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° 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.

$$E = E_f^o + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{c_O}{c_R} \right)_{x=0} \quad (3.7.5.)$$

donde E_f^o es el potencial formal de la cupla redox.

$$E_f^o = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_O}{\gamma_R} \quad (3.7.6.)$$

3.8. Reacciones de electrodo reversibles. Control difusional

Las reacciones de electrodo 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 3.7.5.) y las reacciones homogéneas pueden ser consideradas en equilibrio. Este tipo de reacciones son denominadas reversibles o nernstianas [65].

Considerando un proceso de electrodo como la ecuación 3.5.1., en ausencia de migración y convección, 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 como [64, 65]:

$$E = E_f^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_O(x=0)}{c_R(x=0)} \quad (3.8.1.)$$

donde $c_O(x=0)$ y $c_R(x=0)$ son las concentraciones de O y R en la superficie del electrodo ($x=0$).

Aplicando la hipótesis de la capa de difusión de Nernst, donde se plante 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:

$$\frac{I}{nFA} = m_O [c_O^* - c_O(x=0)] \quad (3.8.2.)$$

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 (en cm s^{-1}). El coeficiente de transferencia de masa se define como el cociente entre el coeficiente de difusión de la especie (D) y el espesor de la capa de difusión de Nernst (δ).

A medida que la especie O es consumida, en las cercanías de la superficie del electrodo aumenta la concentración de R:

$$\frac{I}{nFA} = m_R [c_R(x=0) - c_R^*] \quad (3.8.3.)$$

donde m_R es el coeficiente de transferencia de la especie 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 de 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):

$$I_l = nFAm_O c_O^* \quad (3.8.4.)$$

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

$$c_R(x=0) = \frac{I}{nFAm_R} \quad (3.8.5.)$$

A partir de la ecuación de Nernst, e introduciendo las ecuaciones 3.8.4., y 3.8.5., se obtiene una ecuación donde se observa la dependencia del potencial sobre la corriente:

$$E = E_f^o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{m_O}{m_R} + \frac{RT}{nF} \left(\frac{I_l - I}{I} \right) \quad (3.8.6.)$$

La ecuación 3.8.6., pone de manifiesto la dependencia de la corriente con el potencial, como se ve en la Figura 3.8.1. 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, aun cuando se desconozcan los valores reales de D_O y D_R .

$$E = E_{1/2} = E_f^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \frac{m_O}{m_R} \quad (3.8.7.)$$

Así,

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{I_l - I}{I} \right) \quad (3.8.8.)$$

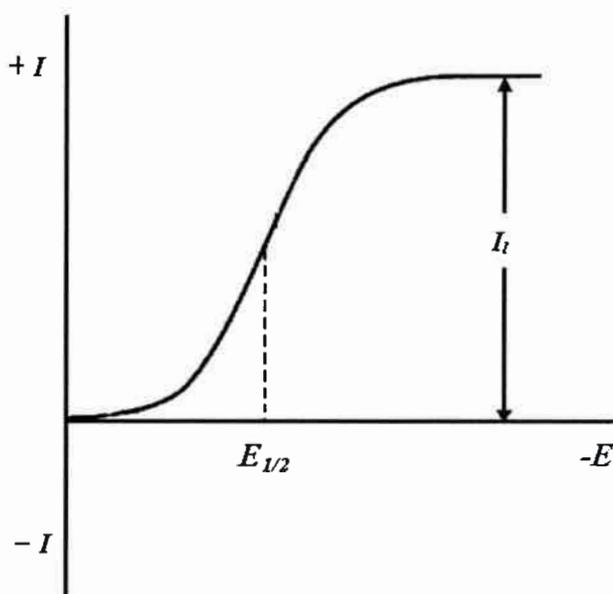


Figura 3.8.1. Representación esquemática para el comportamiento de I - E para una reacción Nernstiana.

Cuando $m_O \approx m_R$, $E_{1/2} \approx E_f^\circ$ [64, 65].

La ecuación 3.8.8., 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 [65]. De dicha pendiente es posible determinar también el número de electrones intercambiados en el proceso de electrodo.

3.9. Técnicas electroquímicas empleadas: descripción

En los estudios realizados en esta Tesis se han utilizado técnicas de potencial controlado (potenciostáticas) bajo condiciones de corriente distintas 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) [65]. 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.

3.9.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) 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 VC a fin de caracterizar la reacción de transferencia electrónica.

La VC 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 una respuesta típica obtenida en corriente se muestran en las Figuras 3.9.1. a) y 3.9.1. b) para la siguiente reacción de electrodo, con un potencial estándar, E° :

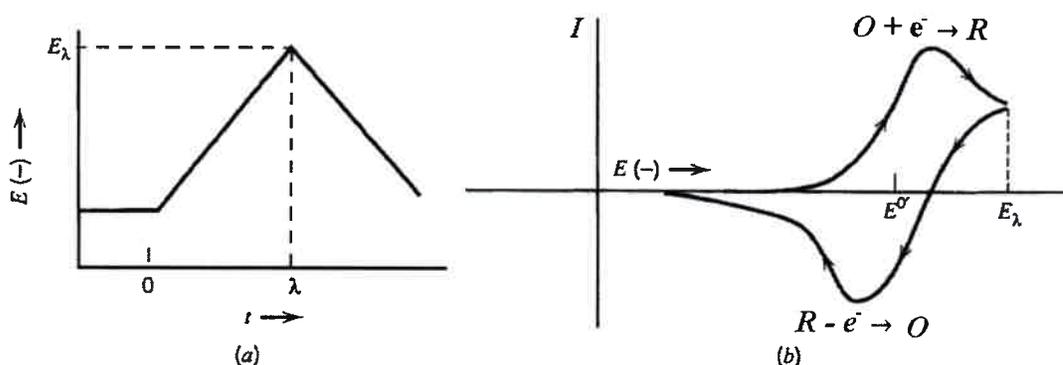


Figura 3.9.1. (a) Representación esquemática de la perturbación de potencial aplicado al electrodo de trabajo y (b) respuesta corriente-potencial obtenida (voltamperograma) para una cupla redox simple (ec. 3.9.1.).

La perturbación del potencial está dada en forma lineal y, varía con el tiempo a una velocidad de barrido (v) ($V s^{-1}$) expresado por medio de las siguientes ecuaciones [65]:

$$E = E_i - vt \quad \text{para } 0 < t \leq \lambda \quad (3.9.2.)$$

y

$$E = E_i - 2v\lambda + vt \quad \text{para } t > \lambda \quad (3.9.3.)$$

donde v es la velocidad a la cual se varía el potencial y λ es el valor del tiempo al cual se invierte la dirección del barrido de potencial (potencial de inversión, E_λ).

La forma característica de los picos de 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 3.9.1., cuando el potencial aplicado al electrodo es E_i , no hay reacción faradaica (Figura 3.9.2. 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° (Figura 3.9.2. 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 de la corriente como así también un aumento en el flujo de O desde el seno de la solución a la superficie del electrodo. Cuando el potencial es más negativo que E° , la corriente seguirá incrementando hasta alcanzar un valor máximo, debido al consumo total de O en la superficie del electrodo. El gradiente de concentración de O en este punto es máximo (Figura 3.9.2. c). Si el potencial se sigue incrementando, se produce un aumento en el espesor de la capa de difusión. La corriente cae como consecuencia de que la misma muestra una dependencia con $t^{-1/2}$, independientemente del potencial (llegada de O desde el seno de la solución debido al gradiente de concentración). Este comportamiento es el que ocasiona el pico característico en el voltamperograma, tanto lineal, como cíclico [64, 65].

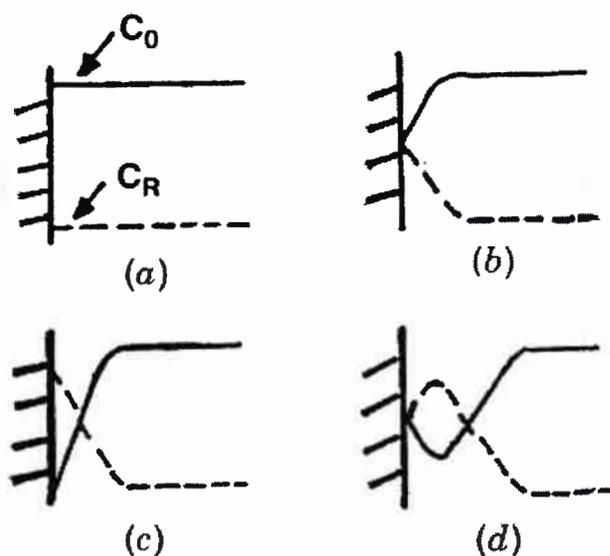


Figura 3.9.2. Perfiles de concentración obtenidos para una experiencia de voltamperometría cíclica para la reducción de O y la oxidación de R .

En VC, la existencia de la onda anódica (barrido inverso) se explica teniendo en cuenta que, al potencial en el cual la dirección del barrido de potencial se invierte (E_λ), existe un exceso de R en la interfaz electrodo-solución.

Para reacciones controladas por difusión, la solución implica el planteo de las dos Leyes de la Difusión de Fick y el balance del flujo de las especies electroactivas O y R sobre la superficie del electrodo ($x = 0$). Así, la corriente está determinada por el flujo de O hacia la superficie del electrodo, y si se considera que la velocidad de transferencia de carga es alta, se cumple la ecuación de Nernst a $x = 0$ [65].

La solución matemática del problema, en este caso, es más compleja que en otras técnicas electroquímicas, no pudiendo emplearse el método de la Transformada de Laplace para arribar a una solución analítica exacta. Este problema fue abordado primero por Randles [66] y Sevcik [67] y, posteriormente, por Nicholson y Shain [68].

Haciendo uso del teorema de la convolución, es posible arribar sólo a una solución numérica, donde la corriente puede ser expresada por:

$$I = nFAc_o^*(\pi D_o \sigma)^{1/2} \chi(\sigma, t) \quad (3.9.4)$$

donde $\sigma = (nFv/RT)$ y $\chi(\sigma, t)$ es una función corriente adimensional, D_o es el coeficiente de difusión de la especie O y c_o^* es la concentración de O en el seno de la solución, A es el área del electrodo y los demás términos tienen su significado usual. $\chi(\sigma, t)$ puede ser obtenida a través de la siguiente ecuación integral [65]:

$$\int_0^\sigma \frac{\chi(z)}{(\sigma - z)^{1/2}} dz = \frac{1}{1 + \xi \theta S(\sigma)} \quad (3.9.5)$$

$$\text{con: } \chi(z) = \frac{g(z)}{c_o^*(\pi D_o \sigma)^{1/2}} = \frac{i(\sigma)}{nFAc_o^*(\pi D_o \sigma)^{1/2}}; \quad \xi = \left(\frac{D_R}{D_o} \right)^{1/2};$$

$$\theta = \exp \left[\frac{nF}{RT} (E_i - E) \right]; \quad S(\sigma) = \exp(-\sigma) \quad y \quad \sigma = \left(\frac{nF}{RT} \right) v$$

Así, para cualquier valor de $S(\sigma t)$, la cual es función del potencial, se puede obtener la función $\chi(\sigma t)$ por solución de la ecuación 3.9.5. y, a partir de ella, se puede determinar la corriente para cada potencial. Nótese que la función $\chi(\sigma t)$ en cualquier punto dado es un número puro, de modo que la ecuación 3.9.4. da la relación funcional entre la corriente en cualquier punto y las variables experimentales. Específicamente, I es proporcional a c_0^* y a $v^{1/2}$.

El resultado general de la resolución de la ecuación 3.9.5., es un conjunto de valores de $\chi(\sigma, t)$, como se muestra en la Figura 3.9.3.

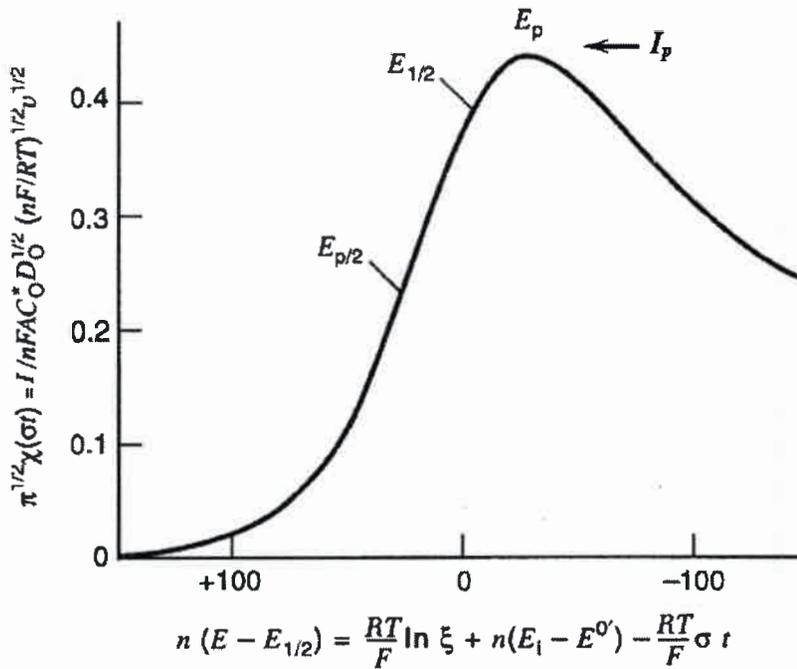


Figura 3.9.3. Voltamperograma de barrido lineal en términos de la función corriente adimensional. Los valores sobre el eje del potencial están dados a 25 °C.

3.9.1.1. Corriente de pico y potencial

Para un sistema reversible simple, como se ha definido al comienzo, la función $\pi^{1/2} \chi(\sigma, t)$ alcanza un valor máximo igual a 0,4463 (a 25 °C) cuando $n(E_p - E_{1/2}) = -28,50$

mV, siendo E_p el valor de potencial donde la corriente alcanza su valor máximo y $E_{1/2}$ el potencial de media onda del sistema. Así, la corriente de pico (I_p) está definida por [65, 68]:

$$I_p = 0,4463nFAc_o^* \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2} D_o^{1/2} \quad (3.9.6.)$$

ó, a 25 °C, con A expresada en cm^2 , D_o en $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$, c_o^* en moles cm^{-3} y v en V s^{-1} la corriente queda expresada por [65, 68]:

$$I_p = (2,95 \times 10^5) n^{3/2} A c_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (3.9.7.)$$

Por otro lado,

$$E_p - E_{1/2} = E_p - E^o + \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \xi = -1,109 \left(\frac{RT}{nF} \right) \quad (3.9.8.)$$

donde E^o es el potencial formal y $-1,109 (RT/nF) = -28,50 \text{ mV}$ a 25 °C. Para un sistema nernstiano el E_p es independiente de la velocidad de barrido v .

En algunos casos, es conveniente informar el valor de potencial al cual la corriente es $1/2$ de la corriente de pico ($E_{p/2}$):

$$E_{p/2} = E_{1/2} + 1,109 \left(\frac{RT}{nF} \right) = E_{1/2} + 28,0/n \text{ mV a } 25 \text{ °C} \quad (3.9.9.)$$

Así, el potencial de media onda polarográfico, $E_{1/2}$, está localizado aproximadamente en el punto medio entre el E_p y el $E_{p/2}$, de modo que un criterio de diagnóstico para una onda nernstiana es:

$$(E_p - E_{p/2}) = 56,5/n \text{ mV a } 25 \text{ °C} \quad (3.9.10.)$$

Nicholson [69] sugirió que la relación entre las corrientes de pico anódica ($I_{p,a}$) y la de pico catódica ($I_{p,c}$) puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} = \frac{(I_{p,a})_0}{I_{p,c}} + \frac{0,485(I_{sp})_0}{I_{p,c}} + 0,086 \quad (3.9.11.)$$

donde $(I_{p,a})_0$ es la corriente de pico anódica medida con respecto al cero de corriente, $(I_{sp})_0$ es la corriente al potencial E_λ medida también respecto del cero de corriente e $I_{p,c}$ es la corriente del pico catódico, medida también respecto del cero de corriente. La relación $I_{p,a}/I_{p,c}$ (ec. 3.9.11.) es igual a 1 para una cupla redox simple (ec. 3.9.1.). La desviación de esta relación del valor unitario es indicativa de complicaciones cinéticas o de otro tipo de complicaciones en el proceso de electrodo.

Por otro lado, la diferencia entre los potenciales de pico anódico ($E_{p,a}$) y de pico catódico ($E_{p,c}$), ΔE_p , es también otro criterio de diagnóstico útil para un proceso nernstiano. Así,

$$\Delta E_p = (E_{p,a} - E_{p,c}) = 2,303RT / nF = 59 / n \text{ mV a } 25^\circ \text{C} [65] \quad (3.9.12.)$$

Para sistemas totalmente irreversibles, la solución del sistema de ecuaciones diferenciales es similar y también requiere la solución numérica de una ecuación integral [68]. Así, la corriente está dada por:

$$I = nFAc_O^* D_O^{1/2} v^{1/2} \left(\frac{\alpha n_\alpha F}{RT} \right)^{1/2} \pi^{1/2} \chi(b,t) \quad (3.9.13.)$$

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:

$$E_p = E_f^o - \frac{RT}{\alpha n_\alpha F} \left[0,780 + \ln \left(\frac{D_o^{1/2}}{k^o} \right) + \ln \left(\frac{\alpha n_\alpha F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (3.9.14.)$$

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

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

$$I = nFAc_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} \Psi(E) v^{1/2} \quad (3.9.15.)$$

donde $\Psi(E)$ es una función del coeficiente de transferencia α y donde k^o es la constante de velocidad estándar de la cupla redox. Asimismo, si bien no se muestra la ecuación correspondiente, el E_p también es dependiente de dichos parámetros [65, 69].

En sistemas más complejos, por ejemplo, con reacciones químicas homogéneas acopladas al proceso de transferencia de carga, 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 y la I_p con respecto a la concentración en el seno de la solución o la velocidad de barrido, $I_{p,a} / I_{p,c}$, etc., que adoptan características propias según el mecanismo particular de que se trate [68, 69]

3.9.2. Voltamperometría de convolución

Un tratamiento matemático de las curvas $I-E$ obtenidas mediante 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 [65, 70].

$$I_{con} = \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{i(v)}{(t-v)^{1/2}} dv \quad (3.9.16.)$$

La técnica de convolución o técnica semi-integral ofrece ventajas en el tratamiento de los datos obtenidos mediante la VC. Para una reacción reversible (ec. 9.3.1.), en un experimento de VC, las curvas de la corriente convolucionada $I_{con}(t)$ vs E para los barridos directo e inverso se superponen, con la $I_{con}(t)$ retornando a cero a un E lo suficientemente positivo, donde la $c_R(0,t) = 0$, como se muestra en la Figura 3.9.4.

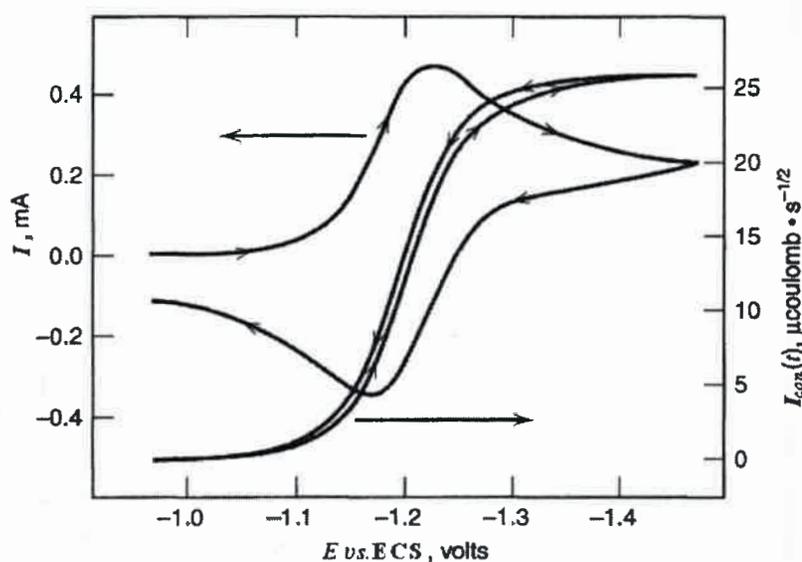


Figura 3.9.4. Voltamperogramas cíclicos experimentales y de convolución de 1,84 mM p-nitrotolueno en ACN + 0,2 M PTEA con un electrodo HMDE, $\nu = 50 \text{ V s}^{-1}$.

Para una reacción cuasi-reversible, sin embargo, las curvas de las corrientes convolucionadas directas e inversa no coinciden (Figura 3.9.5.). Este efecto se puede explicar como consecuencia de los corrimientos de los valores de los $E_{p,c}$ y $E_{p,a}$ de sus valores reversibles.

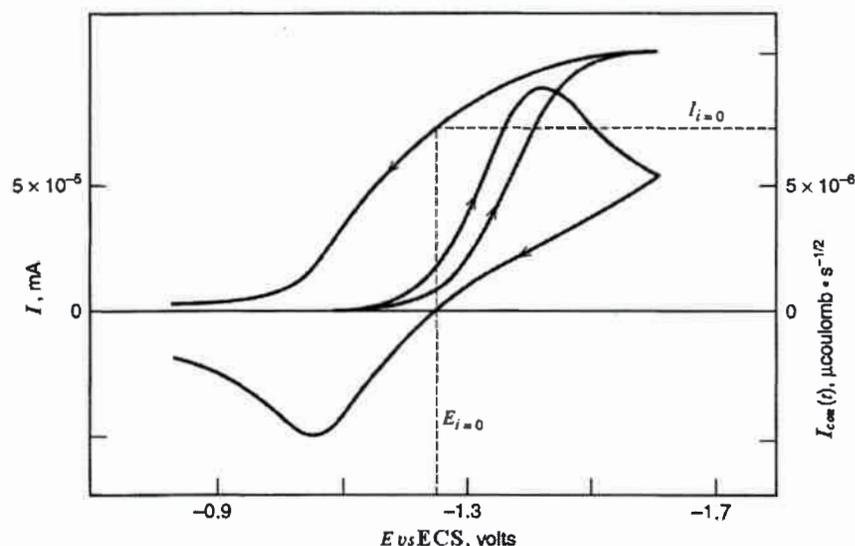


Figura 3.9.5. Voltamperogramas cíclicos experimentales y de convolución de 0,5 mM tert-nitrobutano en dimetil formamida (DMF) + 0,1 M TBAI, $v = 17,9 \text{ V s}^{-1}$.

El procedimiento matemático aplicado a los voltamperogramas permite un mayor y mejor aprovechamiento de los datos experimentales. La función $I_{con}(t)$ es evaluada por una técnica de integración numérica con la ayuda de una computadora. Diferentes algoritmos han sido propuestos para su evaluación. El conjunto de datos $I-t$ es usualmente dividido en N intervalos de tiempo, igualmente espaciados, entre $t = 0$ y $t = t_f$, indexados por j . Así, $I_{con}(t)$ se transforma en $I_{con}(k\Delta t)$ donde k varía entre 0 y N , representando, $t = 0$ y $t = t_f$, $\Delta t = t_f/N$.

Un algoritmo conveniente, el cual surge directamente de la definición de $I_{con}(t)$ es [65]:

$$I_{con}(t) = I_{con}(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{I(j\Delta t - \frac{1}{2}\Delta t)\Delta t}{\sqrt{k\Delta t - j\Delta t + \frac{1}{2}\Delta t}} \quad (3.9.17.)$$

Para sistemas redox cuasi-reversibles, la constante de velocidad dependiente del potencial ($k_f(E)$) del proceso directo puede ser expresada por [65]:

$$\ln k_f(E) = \ln D_O^{1/2} - \ln \left[\frac{I_{con,L} - I_{con}(t) + \xi \exp(nF/RT)(E - E^\circ)}{I(t)} \right] \quad (3.9.18.)$$

siendo: $I_{con,L}$ la corriente catódica convolucionada límite, $I_{con}(t)$ es la corriente convolucionada a un dado tiempo e $I(t)$ la correspondiente corriente del voltamperograma cíclico al mismo tiempo.

$I_{con,L}$ es definida como [65]:

$$I_{con,L} = nFAD_O^{1/2} c_O^* \quad (3.9.19.)$$

Si la transferencia electrónica es nernstiana, el potencial se puede expresar como [65]:

$$E = E_{1/2} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_{con,L} - I_{con}(t)}{I_{con}(t)} \quad (3.9.20.)$$

Nótese que la ecuación 3.9.20., es idéntica a la expresión que se deduce para una curva corriente – potencial de estado estacionario [65]. Así, un gráfico de E vs $\log [(I_{con,L} - I_{con}(t))/I_{con}(t)]$ será lineal, con una pendiente de $59,1/n$ mV a 25°C y, de la ordenada al origen es posible determinar el $E_{1/2}$ de la reacción.

Por medio de la técnica de convolución de los voltamperogramas cíclicos se han desarrollado criterios de diagnóstico para ayudar a 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 $f(I_{con}(t))$, teniendo en cuenta la $I_{con,L}$ y la $I(t)$ experimental. [70]. Por ejemplo, para un mecanismo ECE, donde E representa una transferencia monoelectrónica, la variación de E con $f(I_{con}(t))$ es descripta mediante la siguiente ecuación:

$$E = E^\circ + 2,303 \frac{RT}{2nF} \log \frac{k}{(1+K)^2} + 2,303 \frac{RT}{nF} \log \frac{I_{con,L} - I_{con}(t)}{I(t)} \quad (3.9.21.)$$

donde E° 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 la pendiente esperado es de $59,1/n$ mV/década a 25°C [70].

Cabe destacar que la ecuación que define la $I_{\text{con,L}}$, la ecuación 3.9.19., es utilizada para varios mecanismos de reacción, estos incluyen:

- Una reacción redox simple, donde una especie O se reduce para dar R , bajo condiciones de difusión lineal semi-infinita y con R inicialmente ausente.
- Cuando hay una reacción química de primer orden posterior a la transferencia de carga inicial, (EC).
- También cuando, la reacción química acoplada a la transferencia de carga inicial es una dimerización, de tipo DIM 1, es decir un acoplamiento radical-radical.

Ahora, cuando el sistema de trabajo, tiene un mecanismo del tipo de los que a continuación son nombrados:

- ECE, es decir una reacción química homogénea, entre las dos transferencias de carga sucesivas.
- También, los casos donde se produce una disproporción (DISP 1 o 2) a partir de un mecanismo ECEC.

La ecuación que se debe utilizar es [70]:

$$I_{\text{con,L}} = 2nFAFc_O^* D_O^{1/2} \quad (3.9.22.)$$

3.9.3. Cronoamperometría

Esta técnica consiste en aplicar un salto de potencial al electrodo de trabajo, como se muestra en la Figura 3.9.6. a), desde un valor E_1 , en el cual no ocurre una reacción faradaica, a un potencial E_2 , en el cual la concentración de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo sea efectivamente igual a cero, es decir a una región, suficientemente anódica o catódica con respecto al potencial formal de la cupla redox, tal que se esté, en la región limitada por la transferencia de masa. Como respuesta, se obtiene la variación de la corriente en función del tiempo, como se muestra en la Figura 3.9.6. b).

Bajo condiciones experimentales donde el transporte de masa esté controlado por difusión (presencia de un electrolito soporte a una concentración al menos 100

veces más alta que la del analito en estudio y usando soluciones no agitadas), la curva corriente vs tiempo reflejará los cambios en el gradiente de concentración en la vecindad de la superficie del electrodo. Esto implica una expansión gradual de la capa de difusión asociada con el consumo del reactivo, de ahí que disminuya la pendiente en los perfiles de concentración a medida que el tiempo progresa, tal como se muestra en la Figura 3.9.6. c).

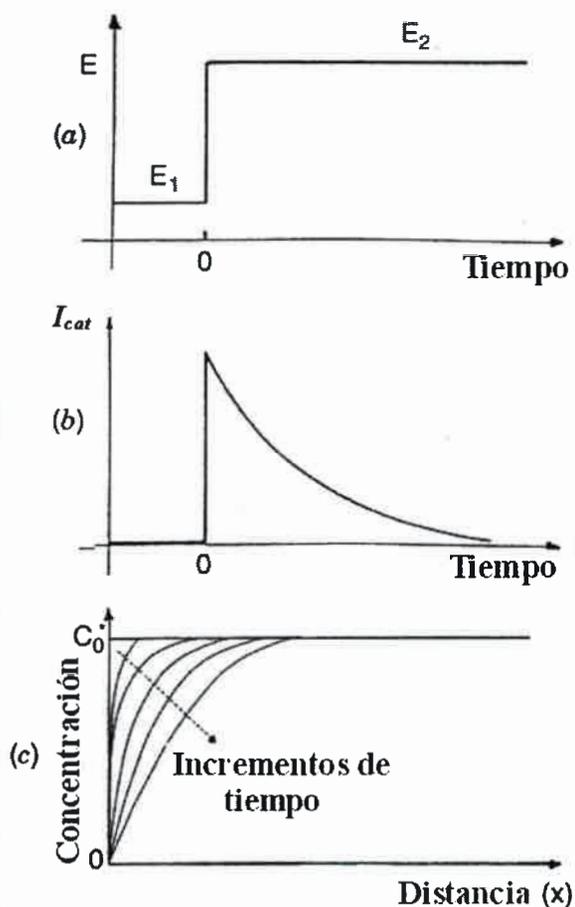


Figura 3.9.6. Experiencia cronoamperométrica: a) Programa de potencial aplicado al electrodo de trabajo, b) respuesta corriente-tiempo resultante y c) cambio en los perfiles de concentración con el tiempo.

Si se utiliza una cupla redox reversible (ec. 3.9.1.), es decir, con una cinética de electrodo rápida, tal que se cumpla la ecuación de Nernst, dadas las siguientes condiciones iniciales:

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

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:

$$\text{si } x > 0 \quad c_O(0,t) = 0$$

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

$$D_O \frac{\partial c_O(x,t)}{\partial x} = D_R \frac{\partial c_R(x,t)}{\partial x} \quad (3.9.23.)$$

$$I(t) = nFAD_O \left(\frac{\partial c_O(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (3.9.24.)$$

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

La ecuación 3.9.23., indica el balance de flujo de las especies O y R sobre la superficie del electrodo y la ecuación 3.9.24., establece que en un sistema controlado 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 de la 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 [65]. Se evalúa el flujo de material electroactivo a través de la ecuación 3.9.24., luego de reemplazar el gradiente de concentración por una expresión obtenida al aplicar la antitransformada de Laplace. El resultado obtenido es la expresión de la corriente en el espacio real. Para el caso de difusión lineal semi-infinita, se obtiene la ecuación de Cottrell [64, 65]:

$$I(t) = \frac{nFAc_O^*D_O^{1/2}}{(\pi t)^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad (3.9.25.)$$

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

electroquímica del electrodo y la concentración de O en el seno de la solución, o bien, utilizando un analito redox cuyo coeficiente de difusión haya sido informado en la literatura, determinar el área electroquímica del electrodo de trabajo.

Sin embargo, existen restricciones instrumentales y del sistema electroquímico que limitan la utilidad de esta técnica:

- Limitaciones potencioestáticas. La ecuación 3.9.25. predice una muy alta corriente a tiempos cortos, el máximo de corriente dependerá de las características del potencioestato.
- Limitaciones en el registrador. Durante la parte inicial del transitorio se produce la saturación del registrador, el cual, puede requerir un tiempo hasta que la medida realizada sea precisa.
- Limitaciones impuestas por la resistencia no compensada (R_u) y la capacitancia de la doble capa (C_d). Al aplicar un salto de potencial fluye una corriente no faradaica, la cual decae exponencialmente con una constante de tiempo de celda, $R_u C_d$. Por un período de 5 constantes de tiempo de celda, existe una contribución apreciable de la corriente de cargado de la doble capa a la medida total de la corriente, por ello $R_u C_d$, define la escala de tiempo más corta para llevar a cabo una experiencia de salto de potencial.
- Limitaciones debidas a la convección. Durante largos períodos de tiempo, el aumento gradual en los gradientes de densidad y las vibraciones causarán una disrupción convectiva de la capa de difusión, lo que resulta en corrientes más grandes que aquellas predichas por la ecuación de Cottrell. En agua y otros solventes, las medidas basadas en difusión por períodos de tiempo más largos que 300 s son difíciles y aún medidas de 20 s pueden mostrar algún efecto de convección.

3.9.4. Electrólisis a potencial controlado

La electrólisis a potencial controlado es una técnica electroquímica simple, que mide la carga eléctrica (Q , expresada en coulombios) consumida durante una reacción electroquímica. Esta es una técnica no estacionaria, en donde se produce una transformación masiva (exhaustiva) de la sustancia electroactiva. Esta técnica 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:

$$|Q| = nFN_i = nFVc_i \quad (3.9.26.)$$

donde n es el número de electrones transferidos en la reacción, N_i es el número de moles que reaccionan, V es el volumen de la solución y c_i la concentración molar de la especie i . Conociendo dicha concentración, por medio de una electrólisis se puede determinar el valor de n . Generalmente, dichas experiencias se llevan a cabo aplicando al electrodo de trabajo un potencial constante, el cual se mantiene a lo largo de la toda la experiencia. Además, a los fines de completar la reacción en tiempos pequeños, se trabaja en soluciones agitadas y bajo condiciones de relación A/V grandes, donde A y V son el área del electrodo y el volumen de la solución, respectivamente. La respuesta obtenida del sistema consiste en un decaimiento exponencial de la corriente con el tiempo hasta que la corriente alcance valores próximos al 1-3 % de su valor inicial.

Este método permite, en reacciones no complicadas por problemas de adsorción de reactivo y/o productos, determinar el rendimiento faradaico y detectar reacciones químicas lentas acopladas a la transferencia de carga inicial.

El área debajo de la curva $I-E$ 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 [71].

La corriente a cualquier tiempo, para una cupla redox simple, como la ecuación 3.9.1., con sólo O presente inicialmente en solución, está dada por:

$$I_1(t) = nFAm_0c_0^*(t) \quad (3.9.27.)$$

donde m_0 es el llamado coeficiente de transferencia de masa y tiene unidades de cm s^{-1} [65].

La corriente también indica la velocidad total a la que O es consumida, $\partial N_O / \partial t$ (moles s^{-1}), como consecuencia de la electrólisis (asumiendo una eficiencia de corriente del 100 %):

$$I_l(t) = -nF \left(\frac{\partial N_O(t)}{\partial t} \right) \quad (3.9.28.)$$

donde N_O es el número total de moles inicialmente presentes.

Si se asume que la solución es completamente homogénea (es decir, se desprecia el pequeño volumen de la capa de difusión $\delta_O A$, en la vecindad de la superficie del electrodo, donde c_O es más pequeña que c_O^*), luego:

$$c_O^*(t) = \frac{N_O(t)}{V} \quad (3.9.29.)$$

donde V es el volumen total de la solución. Las ecuaciones 3.9.28, y 3.9.29., producen [65]:

$$I_l(t) = -nFV \left[\frac{\partial c_O^*(t)}{\partial t} \right] \quad (3.9.30.)$$

Igualando las dos relaciones para la $I_l(t)$, se obtiene:

$$\frac{\partial c_O^*(t)}{\partial t} = - \left(\frac{m_O A}{V} \right) c_O^*(t) = -p c_O^*(t) \quad (3.9.31.)$$

Con la condición inicial de, $c_O^*(t) = c_O^*(0)$ a $t = 0$. La ecuación 3.9.31., es característica de una reacción química homogénea de primer orden, donde $p = m_O A / V$ es análogo a una constante de velocidad de primer orden. La solución a esta ecuación diferencial ordinaria es [65]:

$$c_O^*(t) = c_O^*(0) \exp(-pt) \quad (3.9.32.)$$

y utilizando la ecuación 3.9.27., se obtiene el comportamiento $I-t$:

$$I(t) = I(0) \exp(-pt) \quad (3.9.33.)$$

donde $I(0)$ es la corriente inicial. Así, la electrólisis a potencial controlado es parecida a una reacción de primer orden, con la concentración y la corriente decaen exponencialmente con el tiempo durante la electrólisis, como se puede observar en la Figura 3.9.7. a) y, eventualmente, alcanzando el valor de la corriente residual (no faradaica o capacitiva). La ecuación 3.9.33., se puede utilizar para calcular la duración de una electrólisis para una dada conversión:

$$\frac{-p}{2,3} t = \log \left[\frac{c_o^*(t)}{c_o^*(0)} \right] = \log \left[\frac{I(t)}{I(0)} \right] \quad (3.9.34.)$$

Para una conversión del 99 %, $c_o^*(t) / c_o^*(0) = 10^{-2}$, y $t = 4,6/p$; para 99,9 % de conversión, $t = 6,9/p$. Con un sistema con agitación efectivo, $m_o \approx 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$, entonces para $A \text{ (cm}^2) \approx V \text{ (cm}^3)$, $p \approx 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, y una electrólisis del 99,9 % de conversión, requiere $\sim 690 \text{ s}$ o $\sim 12 \text{ min}$ [65]. En realidad, las electrólisis a potencial controlado, son más lentas que ello, requiriendo entre 30 a 60 min, aunque, dependiendo del sistema de celda empleado y de la efectividad del mecanismo de agitación, los tiempos pueden disminuirse [65].

La carga total ($Q(t)$), es decir la cantidad total de electricidad consumida en la electrólisis está dada por el área bajo la curva $I-t$, como se muestra en la Figura 3.9.7. b):

$$Q(t) = \int_0^t i(t) dt \quad (3.9.35.)$$

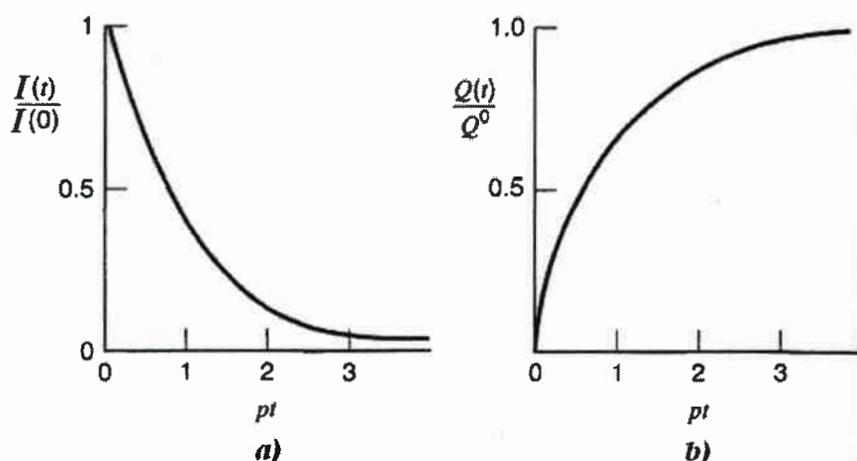


Figura 3.9.7. a) Curva corriente-tiempo durante una electrólisis a potencial controlado (en formas adimensionales), b) Q vs t .

La electrólisis a potencial controlado, es el método más eficiente para llevar a cabo una electrólisis total, debido a que la corriente se mantiene siempre al máximo valor. Es importante destacar que la electrólisis es independiente de $c_o^*(0)$, de manera que una electrólisis de una solución de $0,1$ M y una 10^{-6} M, requieren de la misma cantidad de tiempo, dados los mismos valores de E , A , V y m_o [65].

La expresión de la curva para el gráfico de Q - t , como se muestra en la Figura 3.9.7. b) se puede obtener de las ecuaciones 3.9.33. y 3.9.35. [65]:

$$Q(t) = \frac{I(0)}{p} (1 - e^{-pt}) = Q^0 (1 - e^{-pt}) \quad (3.9.36.)$$

donde Q^0 es la carga cuando $t \rightarrow \infty$ y está dada por:

$$Q^0 = nFN_o = nFVc_o^*(0) \quad (3.9.37.)$$

La ecuación 3.9.37., constituye la ley de Faraday, la cual es la base de cualquier método de análisis coulométrico.

Por otro lado, y considerando que, a valores pequeños de x , la función exponencial, e^x , puede ser aproximada como $1+x$, de modo que, para tiempos pequeños, la ecuación 3.9.36., puede ser transformada en:

$$Q(t) = Q^0(pt) \quad (3.9.38.)$$

Así, a tiempos cortos se cumple:

$$\ln Q(t) = \ln Q^0 + \ln p + \ln(t) \quad (3.9.39.)$$

De modo que, n puede ser calculado si primero se grafica $\ln I(t)$ vs t , de cuya pendiente se obtiene el p y, luego, se grafica $\ln Q(t)$ vs $\ln t$, lo que permite obtener Q^0 y luego se aplica la ecuación 3.9.37., para determinar n .

3.9.5. Voltamperometría de onda cuadrada

3.9.5.1. Introducción

El desarrollo de las técnicas de pulsos de potencial ha tenido como objetivo principal el reducir los efectos producidos por las corrientes capacitivas en las respuestas voltamperométricas.

Barker y col. [72] fueron los primeros en desarrollar las técnicas voltamperométricas que emplean cambios de potencial en saltos repetitivos. Ellos emplearon una onda cuadrada simétrica de 225 Hz superpuesta sobre un barrido lento de potencial. Este desarrollo fue precedido por Kalousek [73], quien utilizó una computadora para aplicar cambios repetitivos y discontinuos de potencial, a una frecuencia de 5 Hz. Sin embargo, la polarografía de onda cuadrada mecánica fue empleada por primera vez por Kemula [74]. Pero, fueron Fujinaga y col. [75] en la década de los cincuenta, quienes destacaron la importancia analítica que poseían los polarogramas diferenciales, lo que podía explicarse con la ventaja que se obtiene cuando se emplea la diferencia de la corriente obtenida durante dos hemi-ciclos consecutivos. El instrumento que ellos empleaban operaba a frecuencias mucho menores ($\cong 14$ Hz) que el de Barker y Jenkins [72], pero, en realidad, tenía muchas de

las mismas características mejoradas respecto de las otras técnicas en vigencia en esa época. Este desarrollo fue seguido inmediatamente por el tratamiento teórico de la voltamperometría de onda cuadrada para sistemas reversibles desarrollado por Kambara [76].

Fue Barker [77] quien primero propuso el empleo de una onda de escalera potencial-tiempo y muestrear la corriente al final de la onda, donde las corrientes capacitivas habían decaído a un valor prácticamente despreciable, a los efectos de evitar el inconveniente que las corrientes capacitivas producían en las voltamperometrías de barrido lineal y cíclica. Alentados por estos desarrollos, Ramley y Krause [78] propusieron que la onda cuadrada se aplicara sobre un barrido de escalera (“staircase”) más que sobre un barrido de potencial lento, lineal. Sus resultados fueron comparables a los obtenidos por Barker en el modo de estado estacionario.

Lo expuesto anteriormente sería la historia esencial de las ideas involucradas en el desarrollo de la voltamperometría de onda cuadrada (VOC).

Así, es importante diferenciar la VOC del tipo Barker (en la cual una modulación de onda cuadrada se aplica a un potencial dc constante o prácticamente constante y, en donde la corriente es muestreada al final de los hemi-ciclos sucesivos de la onda cuadrada) de la VOC tipo Osteryoung [79], que está basada en el trabajo original de Ramley y Krause [78] y es la que, actualmente, se aplica al estudio de distintos sistemas experimentales. El programa de potencial que se aplica en la VOC tipo Osteryoung (definida a continuación como VOC) se muestra en la Figura 3.9.8. La forma de onda consiste en una onda cuadrada de amplitud, ΔE_{OC} , superpuesta sobre un barrido de escalera (ΔE_e), donde un período completo de la OC ocurre para cada período, τ , del barrido de escalera. Así, el ancho de pulso o tiempo de pulso, igual a $\tau/2$ se designa como t_p y la frecuencia, igual a $1/\tau$, como f .

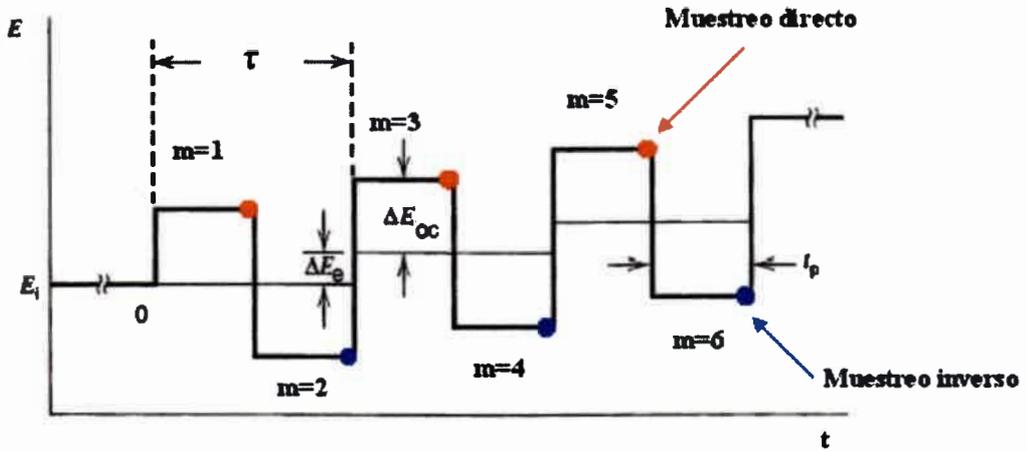


Figura 3.9.8. Programa de saltos de potencial aplicados al electrodo de trabajo en un experimento de VOC. ΔE_{oc} : amplitud de la onda cuadrada., ΔE_e : salto de la escalera, τ : período de la onda cuadrada, t_p : tiempo de pulso. (●) Puntos donde se realiza el muestreo de la corriente directa y (●) puntos donde se realiza el muestreo de la corriente inversa.

El diagrama completo de la forma de la onda se puede expresar como [79]:

$$E_m = E_i - \left[\frac{m+1}{2} \right] \Delta E_e - \Delta E_{oc} \left(1 + (-1)^{m+1} \right) \quad (3.9.40.)$$

de modo que todos los ciclos son idénticos. Otra forma de expresar la ecuación 3.9.40., es:

$$E_m = E_i - \left[\frac{m+1}{2} \right] \Delta E_e + (-1)^m \Delta E_{oc} \quad (3.9.41.)$$

La ecuación 3.9.41., define sólo los valores de E_m para $m > 1$, m es el número de ciclos aplicados.

La corriente es muestreada durante la última porción de cada hemi-ciclo. Las corrientes de los hemi-ciclos directos, con $m = 1, 3, 5, \dots$, se llama corriente directa

(I_d), aquellas de los hemi-ciclos inversos, $m = 2, 4, 6, \dots$, se llama corriente inversa (I_r) y, la corriente diferencial o neta (I_n) para cada ciclo se define como $I_n = I_d - I_r$.

La corriente es muestreada dos veces por ciclo, una vez al final del primer hemi-ciclo y otra vez, al final del segundo hemi-ciclo (pulso inverso) en los decaimientos exponenciales para el potencial aplicado (Figura 3.9.9. [79]). 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 durante el primer hemi-ciclo.

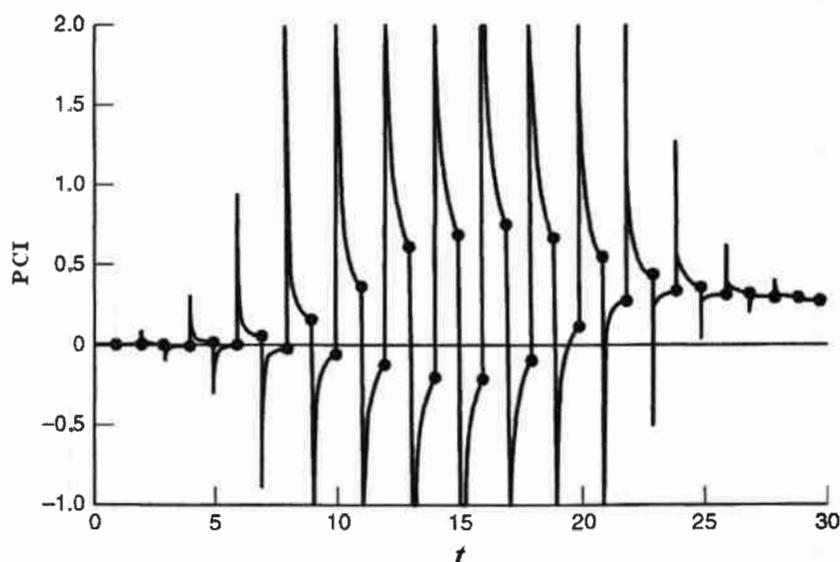


Figura 3.9.9. Respuesta en corrientes adimensionales en un experimento de VOC para una sistema reversible O/R con R inicialmente ausente y donde el barrido de potencial comienza más positivo que el E° . El eje del tiempo corresponde a los medio ciclos indexados por m y el E° para dicha cupla se alcanza cerca de $m = 15$. Los puntos corresponden a las corrientes muestreadas. $n\Delta E_{OC} = 50 \text{ mV}$ y $n\Delta E_e = 30 \text{ mV}$.

En la práctica, los valores característicos que se emplean en VOC son $n \Delta E_{OC} = 0,050 \text{ V}$ (donde n es el número de electrones transferidos) y $n \Delta E_e = 0,010 \text{ V}$. La frecuencia (f) se puede variar, para un electrodo de tamaño convencional, entre 10 y 200 Hz [79]. La velocidad de barrido está definida por, $v = \Delta E_e f$, de modo que si: $\Delta E_e = 0,010 \text{ V}$ y $f = 100 \text{ Hz}$, una $v = 1 \text{ V s}^{-1}$ puede ser fácilmente obtenida, lo que demuestra

que esta técnica es de barrido rápido y de gran amplitud, siendo estas dos características las principales diferencias con la VOC tipo Barker, la cual trabaja en estado estacionario, con pequeñas amplitudes y v tan bajas como $0,002 \text{ V s}^{-1}$.

La implementación experimental de la VOC requiere del empleo de una computadora y un software adecuado para su control. Como herramienta analítica rutinaria, la VOC se hizo popular con la aparición de los modernos equipos electrónicos.

3.9.5.2. Teoría de la voltamperometría de onda cuadrada

La solución de las ecuaciones de difusión para varios sistemas químicos por VOC es compleja, pero fue posible arribar a soluciones, al menos en algunos casos, debido al gran número de teorías generales disponibles para condiciones potencioestáticas. Para casos que involucran una reacción electroquímica reversible, se emplea la aproximación de Kambara [76], la cual usa el teorema de la superposición.

Para casos más complejos, la aproximación de Rifkin y Evans [80], la cual emplea una forma de onda de excitación arbitraria, puede ser generalizada usando la ecuación integral apropiada.

Para una cupla redox simple, como la representada en la ecuación 3.9.1., tanto Ramley y Krause [78] como Christie y col. [81] han presentado una solución analítica general bajo condiciones de difusión lineal semi-infinita. Para el caso en que, sólo la especie O , esté inicialmente presente en solución, la corriente (μA) en el j -ésimo hemisiclo, I_j , es medida al tiempo $t_i + j \tau/2 = t_i + j t_p$, donde t_i es el tiempo correspondiente al potencial E_i y, es convenientemente expresada por:

$$I_j = \frac{nFAD_o^{1/2}c_o^*}{\sqrt{\pi\omega_p}} \sum_{m=0}^j \frac{Q_m - 1 - Q_m}{\sqrt{j - m + 1}} \quad (3.9.42.)$$

donde Q_m está dado por:

$$Q_m = \frac{\varepsilon_m}{1 + \varepsilon_m}$$

y los demás términos de la ecuación 3.9.42., fueron definidos previamente. Además, ε_m viene dado por:

$$\varepsilon_m = \exp\left(\frac{nF}{RT}(E_m - E'_{1/2})\right) \quad (3.9.43.)$$

donde, el parámetro ε_m está dado por la ecuación 3.9.41., y $E'_{1/2}$ es el potencial de media onda reversible para la reacción. Las cantidades E_m , ε_m y Q_m están definidas solamente para $m \geq 1$. El formalismo es, además, simplificado, definiendo $Q_0 = Q_{-1} = \dots = Q_m = 1$, lo cual corresponde a elegir un $E_i \gg E'_{1/2}$ (para las reducciones). Luego, en cada ciclo, si se consideran los valores de j impares, la diferencia de las corrientes viene dada por:

$$I_j - I_{j+1} = \Delta I_j = \frac{nFA\sqrt{D_0 c_0^*}}{\sqrt{\pi t_p}} \sum_{m=0}^j \frac{Q_{m-1} - 2Q_m + Q_{m+1}}{\sqrt{j-m+1}} \quad (3.9.44.)$$

Así, ΔI_j es la diferencia de corriente al potencial $E_j = E_i - [j/2] \Delta E_c$.

Es también conveniente considerar las corrientes adimensionales (Ψ):

$$\Psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi t_p}}{nFA\sqrt{D_0 c_0^*}} \quad (3.9.45.)$$

y

$$\Delta \Psi_j = \Delta I_j = \frac{\sqrt{\pi t_p}}{nFA\sqrt{D_0 c_0^*}} \quad (3.9.46.)$$

Además, es posible definir Ψ_j (o $\Delta \Psi_j$) en términos de $\tau^{1/2}$ o $1/(t_p)^{1/2}$:

$$\Psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o c_o^*}} = \Psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o f c_o^*}} \quad (3.9.47.)$$

$$\Delta\Psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o c_o^*}} = \Delta\Psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o f c_o^*}} \quad (3.9.48.)$$

Ambas definiciones se encuentran en la bibliografía. Sin embargo, es preferible usar las ecuaciones 3.9.45., y 3.9.46., debido a que ellas proveen una comparación directa con un experimento cronoamperométrico de simple pulso. En otras palabras, el tiempo característico en un experimento de VOC es $t_p = \tau/2$.

La corriente normalizada, $\Delta\Psi_j$, alcanza su valor máximo cuando el j -ésimo término es igual a cero, o cuando $E_j = E_{1/2}^r$. Así, la ventaja de elegir un potencial indexado como $E_j = E_i - [j/2] \Delta E_s$ es que el voltamperograma de OC está centrado alrededor del $E_{1/2}^r$. También, el voltamperograma es simétrico, es decir, a $+ [E_m - E_{1/2}^r]$ es idéntica a aquella a $-[E_m - E_{1/2}^r]$. Estos hechos, de simetría y posición son, excepcionalmente, convenientes para una inspección rápida de los voltamperogramas.

En la Figura 3.9.10. se muestran las corrientes normalizadas directa (Ψ_d), inversa (Ψ_i) y neta (Ψ_n) calculadas para $n \Delta E_{OC} = 0,050$ V. Para amplitudes de la OC mucho menores que $n \Delta E_{OC} = 0,050$ V, para las cuales la corriente depende casi linealmente con el potencial, la corriente inversa muestra una forma sigmoidea y la corriente neta es menor que la corriente directa (Figura 3.9.11.). A medida que $n \Delta E_{OC} \rightarrow 0$ y $\Delta E_e \rightarrow 0$ a $\Delta E_e / \tau$ constante, la corriente inversa claramente se aproxima a la de la voltamperometría de barrido lineal, pero la respuesta diferencial mantiene las características de simetría y de posición como se describió previamente (ver Figura 3.9.12.). Para valores muy grandes de $n \Delta E_{OC}$, el potencial puede atravesar completamente la onda y, la respuesta de la corriente neta muestra una señal deformada (ver Figura 3.9.13.). Así, la Figura 3.9.10. es la que muestra el comportamiento deseable sobre un intervalo normal de elección de los parámetros característicos de la técnica.

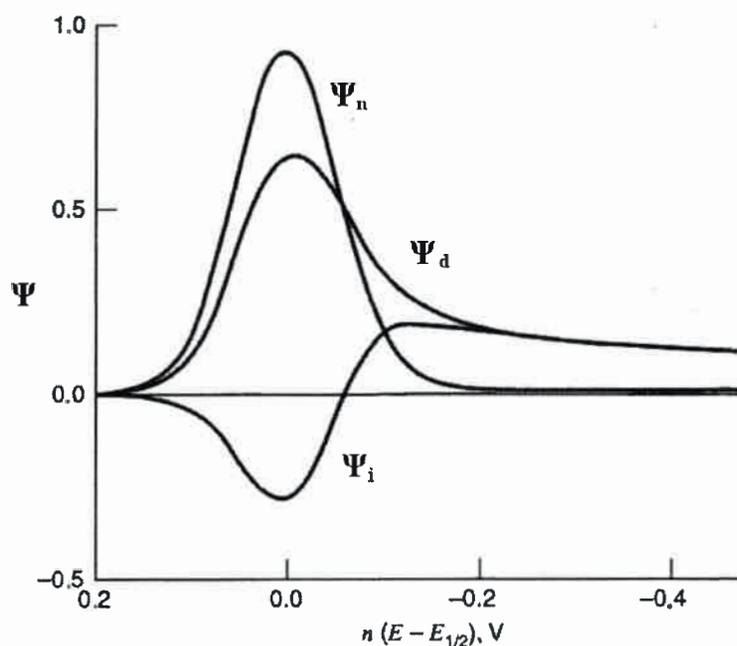


Figura 3.9.10. Corrientes normalizadas directa, inversa y neta de un voltamperograma de OC para una cupla redox simple (ecuación 3.9.1.) bajo control de difusión lineal semi infinita. $n \Delta E_{OC} = 0,050 \text{ V}$; $n \Delta E_e = 0,010 \text{ V}$.

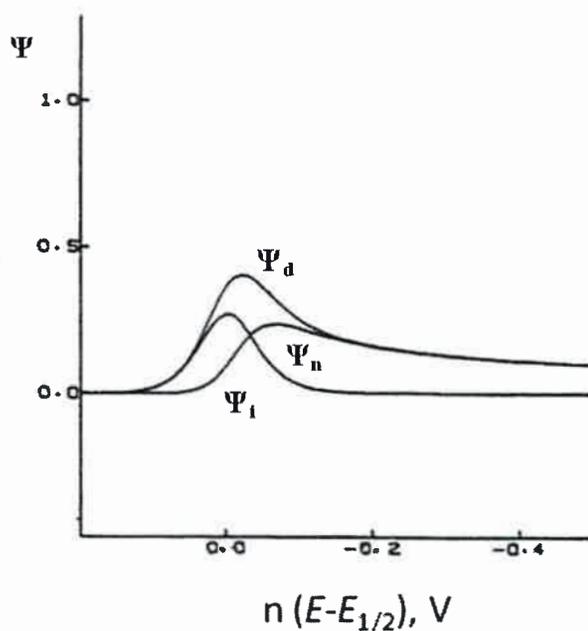


Figura 3.9.11. Igual que en Figura 3.9.10., pero $n \Delta E_{OC} = 0,010 \text{ V}$.

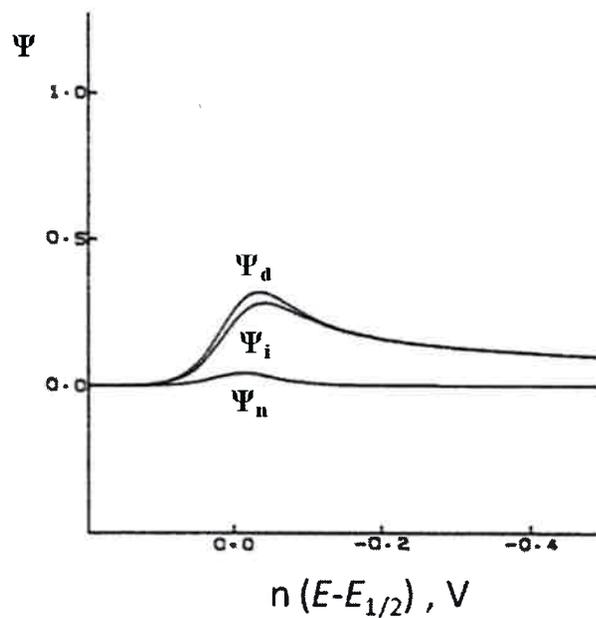


Figura 3.9.12. Igual que en Figura. 3.9.10., pero $n \Delta E_{OC} = 0 V$.

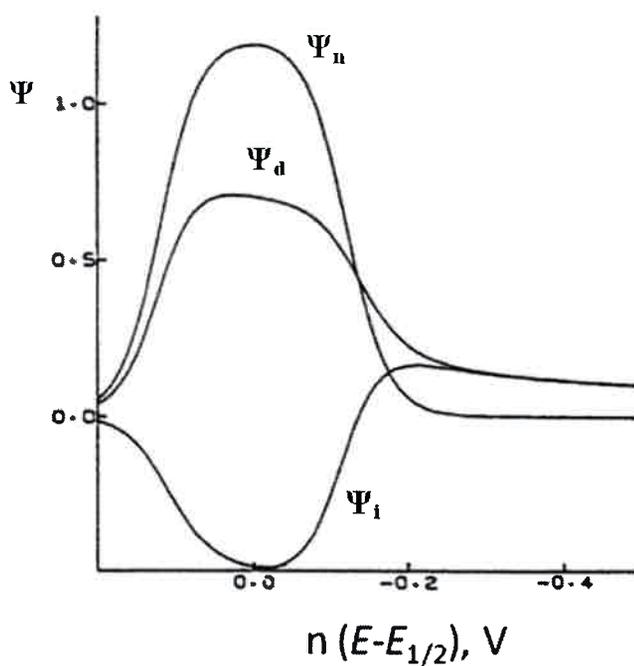


Figura 3.9.13. Igual que en Figura 3.9.10., pero $n \Delta E_{OC} = 0,120 V$.

Como ha sido informado por Ramley y Krause [78], el ancho del pico neto a la mitad de su altura, $W_{1/2}$, es $(0,0905/n)$ V para pequeños valores de la amplitud de la OC. El ancho del pico aumenta a medida que aumenta la amplitud y se aproxima a $2 \Delta E_{OC}$ para valores grandes de ΔE_{OC} . Sin embargo, para maximizar la respuesta de la corriente neta, es más razonable maximizar la relación entre la corriente de pico neta normalizada ($\Delta\Psi_{p,n}$) y $W_{1/2}$, ($\Delta\Psi_{p,n} / nW_{1/2}$), la cual en términos analíticos está relacionada con la mejor sensibilidad y resolución. Cálculos típicos de esta relación para tres valores ΔE_e se muestran en la Figura 3.9.14.

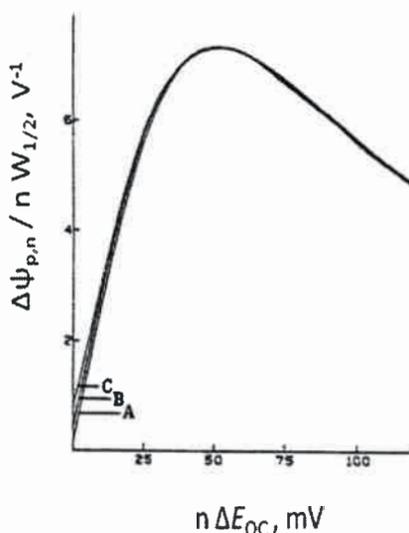


Figura 3.9.14. Relación entre la corriente de pico neta normalizada y el producto $nW_{1/2}$ para $\Delta E_e = A) 0,025$; B) $0,010$ y C) $0,025$ V.

Los resultados mostrados en la Figura 3.9.14. muestran que la relación $\Delta\Psi_{p,n} / nW_{1/2}$ es prácticamente independiente de ΔE_e en el intervalo estudiado y que el valor $n \Delta E_{OC} = 0,050$ V es el óptimo. El salto de escalera generalmente elegido es $n \Delta E_e = 0,010$ V.

El cualquier técnica voltamperométrica de pulso, la corriente se puede expresar en términos de una función corriente adimensional (Ψ). En VOC, la corriente de pico neta ($I_{p,n}$) puede expresarse en función de la corriente de pico neta adimensional ($\Psi_{p,n}$) por:

$$I_{p,n} = \frac{nFA\sqrt{D_0c_0^*}}{\sqrt{\pi t_p}} \Psi_{p,n} \quad (3.9.49.)$$

donde $\Psi_{p,n}$ es el valor máximo de la función y t_p es el tiempo de pulso característico del experimento. Así, las funciones corrientes proveen una buena medida de la sensibilidad relativa de las técnicas. Los valores $\Psi_{p,n}$ dependen de los valores $n \Delta E_{OC}$ y $n \Delta E_e$ y están tabulados en la Tabla 1 de la Referencia [78]. Para valores de $n \Delta E_{OC} = 0,050$ V y $n \Delta E_e = 0,010$ V, el valor de $\Psi_{p,n}$ es 0,93. Para la voltamperometría de pulso normal el valor de Ψ es 1 y en la voltamperometría de pulso diferencial (VPD), $\Psi = (\sigma-1)/(\sigma+1)$, siendo $\sigma = \exp(nF\Delta E/2RT)$. Este valor, que depende de n y de la amplitud del pulso (ΔE) aplicado es siempre menor que 1 [65]. Para $n \Delta E = 0,100$ V, el cual corresponde a $n \Delta E_{OC} = 0,050$ V, el valor de $(\sigma-1)/(\sigma+1)$ es 0,75, en comparación con el valor 0,93 para la VOC cuando $\Delta E_e = 0,010$ V. La mayor sensibilidad de la VOC respecto de la VPD surge del esquema de medida de la corriente y de la contribución de la corriente inversa a la corriente neta. Como se puede esperar, esta ventaja en la sensibilidad de la VOC respecto de las otras técnicas de pulso se pierde cuando la reversibilidad del sistema disminuye.

La teoría de VOC para otros sistemas redox más complejos, tales como aquellos que involucran una transferencia electrónica más lenta o aquellos que, involucrando transferencias electrónicas rápidas, poseen reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga inicial, tales como los sistemas: QE, EQ, reacciones catalíticas y EQE, donde Q indica la etapa química y E la transferencia electrónica han sido descritos en la bibliografía [79].

Otra ventaja que posee la VOC es que el valor de la corriente neta es insensible a:

- Geometría de electrodo compleja.
- Complicaciones cinéticas homogéneas acopladas a la transferencia de carga.
- Transporte de materia convectivo. Debido a esta última característica, la VOC se puede emplear como detector en cromatografía HPLC y/o en sistemas de flujo.

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.

4.2. Instrumentos de electroquímica

4.2.1. Electroodos de trabajo

Para las experiencias de VC y VOC se utilizó como electrodo de trabajo (ET) o indicador, un electrodo de disco de carbono vítreo (CV) marca BAS, de 3 mm de diámetro, con un área geométrica (A) de $0,071 \text{ cm}^2$. En todos los casos, el electrodo de CV fue sometido, previo a su uso, a un pre-tratamiento, que consistió en el pulido mecánico sobre un paño húmedo conteniendo, primero, alúmina (Fischer) de $0,3 \mu\text{m}$ y, luego, de $0,05 \mu\text{m}$. Posterior al pulido, el electrodo fue enjuagado con agua destilada y luego se lo colocó en un recipiente con agua destilada y se lo sometió a un baño de ultrasonido por 10 s, a los efectos de retirar los restos de alúmina. Por último, fue sonicado en ACN o en solución reguladora de fosfato, según el caso, durante otros 10 s a fin de asegurar que no quedasen restos de alúmina en el electrodo. El electrodo así tratado, fue inmediatamente colocado en la celda electroquímica a fin de evitar la oxidación de su superficie por el oxígeno atmosférico.

Si bien, la limpieza mecánica del electrodo fue el mejor método para realizar la mayoría de las experiencias, también se realizó una activación electroquímica en medio básico de acuerdo al método descrito por Anjo y col. [82], para lo cual se aplicó un salto de potencial de 1,2 V durante 600 s en 0,1 M de NaOH

El mismo electrodo de CV fue modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM), marca SIGMA (110-170 nm, longitud 5-9 μm). Las dispersiones de NTCPM se prepararon mezclando 1 mg de NTCPM con 1 mL de H_2O y 1% nafión

(SIGMA). Esta dispersión fue tratada en un baño de ultrasonido durante 15 min y, luego, 10 μL de esta dispersión se depositaron sobre la superficie del disco de CV (pulido con alúminas) y, posteriormente, se dejó secar bajo una lámpara de tungsteno antes de llevarlo a la celda electroquímica.

Además, se investigó un segundo proceso de modificación utilizando quitosano de bajo peso molecular, marca SIGMA. Para ello, se preparó una solución de quitosano al 1 % en ácido acético al 10 %. Previo a la modificación, los electrodos fueron pulidos con alúmina de 0,3 y 0,05 μm , sonicados en agua y tratados con el método de Anjo y col. [82]. Luego, una alícuota de 10 μL de la solución de quitosano fue depositada sobre la superficie del electrodo y, finalmente, se dejó secar por 45 min bajo una lámpara de tungsteno antes de llevarlo a la celda electroquímica.

El electrodo que se empleó en las experiencias de electrólisis a potencial controlado fue una barra cilíndrica de CV de gran área ($A = 2.83 \text{ cm}^2$) solidaria a un motor rotatorio sincrónico, de modo que las experiencias se hicieron con permanente agitación controlada. En esta técnica también se empleó un disco de CV (marca BAS), de diámetro interno de 3 mm, con una A de $0,071 \text{ cm}^2$, denominado electrodo de trabajo auxiliar (ETA), mediante el cual se realizaron muestreos por VC entre las electrólisis sucesivas.

4.2.2. Electrodo de referencia

El electrodo de referencia (ER) fue un electrodo de calomel saturado (ECS) acuoso, el cual se preparó en nuestro laboratorio y consistió de un tubo de 6 mm de diámetro, el cual posee dos ramas. Una de las ramas cerrada lleva en el mismo extremo un alambre de Pt, en contacto con Hg purificado. Sobre la superficie del Hg, se agrega la pasta de calomel (Hg_2Cl_2 disuelto en agua), luego se agrega una solución saturada de KCl y cristales del mismo. La otra rama, que realiza el contacto con la solución, está rellena con agar-agar + 3% KNO_3 y así constituida está en contacto con la solución de KCl que rellena la rama anterior, quedando un verdadero puente salino. Una vez preparado el electrodo, se compara su potencial frente a un ECS estándar, que se toma como referencia. La diferencia de potencial entre ellos no debe ser mayor que $\pm 0,001 \text{ V}$ a temperatura ambiente.

También se utilizó un alambre de plata puro, el cual actúa como un electrodo de pseudo-referencia, ya que su potencial no es fijo, pero para compensar esto, se utilizó una cupla redox reversible (ferroceno), así los potenciales son medidos en referencia a esta cupla redox.

4.2.3. Contraelectrodos

Para las experiencias de VC y VOC se utilizó como contraelectrodo (CE) un alambre de Pt espiralado o una chapa de Pt, los cuales tienen un área muy superior a la del electrodo de trabajo ($A \approx 2 \text{ cm}^2$).

Para las experiencias de electrólisis a potencial controlado se utilizó una chapa de acero inoxidable de gran área, que se encuentra en un compartimiento diferente.

4.2.4. Celdas electroquímicas

4.2.4.1. Celda para voltamperometrías cíclica y de onda cuadrada

La celda para las experiencias de VC y VOC, en medio no agitado, fue de vidrio y consta de dos cuerpos. Un cuerpo está separado del otro por medio de un fino capilar Luggin, con un área de sección transversal pequeña. En el compartimiento principal se colocan el contraelectrodo y el electrodo de trabajo, el cual se encuentra enfrentado y a la misma altura que el capilar Luggin, que se encuentra en un compartimiento lateral de la celda. Tanto el electrodo de trabajo como el contra-electrodo están sujetos por una tapa de teflón bien hermética. Esta tapa posee también un orificio, por donde ingresa un fino tubo de teflón transportando el gas argón y otro que sirve como salida del mismo.

En el compartimiento lateral se coloca el electrodo de referencia, el cual calza en un soporte esmerilado recubierto con una fina capa de grasa de vacío. Este segundo compartimiento posee un volumen considerable por debajo del Luggin, que conecta ambos cuerpos y que permite retener o impedir la contaminación de la solución de trabajo, debido a los componentes propios del electrodo de referencia. El volumen de la celda fue de 10 mL. En la Figura 4.2.1. se muestra un esquema de esta celda.

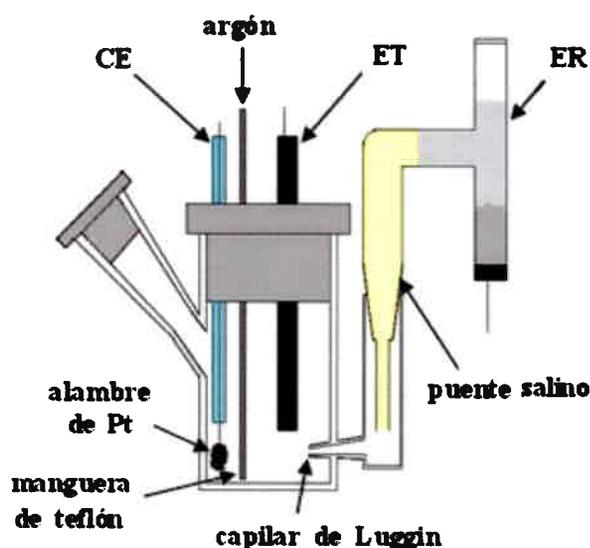


Figura 4.2.1. Esquema de la celda utilizada para las medidas en VC y VOC. CE: contraelectrodo, ET: electrodo de trabajo y ER: electrodo de referencia.

4.2.4.2. Celda para voltamperometrías cíclica y de onda cuadrada de configuración alternativa

El esquema de celda antes mencionado es muy útil y práctico para la mayoría de las experiencias realizadas, pero debido a que el electrodo de referencia de calomel saturado, es un electrodo acuoso y el medio utilizado en la mayoría de las experiencias de esta Tesis es ACN, cuando se mantiene armado el sistema por varias horas, el mismo se vuelve proclive a contaminarse, debido a la difusión de los componentes del electrodo de referencia. Cuando esto sucede, ingresa a la celda agua y cloruro de potasio, lo cual ocasiona, por un lado, modificaciones en el comportamiento electroquímico de la molécula estudiada y también la precipitación del anión del electrolito soporte junto al potasio, esto último, debido a la poca solubilidad que tienen el perclorato de potasio o el hexafluorofosfato de potasio en ACN.

Para evitar estos inconvenientes y poder realizar experiencias durante largos periodos de tiempo (varias horas), sin el riesgo de contaminaciones en la celda, es que se implementó un esquema de celda alternativo, el cual consta de una vaina lateral donde va inmerso el electrodo de referencia, el cual asienta en un soporte esmerilado recubierto por una fina capa de grasa de vacío, la cual asienta en el cuerpo lateral de la

celda a través de otro soporte esmerilado cubierto con grasa de vacío. De esta manera, los componentes del electrodo de referencia tardan más tiempo en llegar a la celda, lo cual permite mantener el sistema armado durante varias horas. Este esquema alternativo se muestra en la Figura 4.2.2.

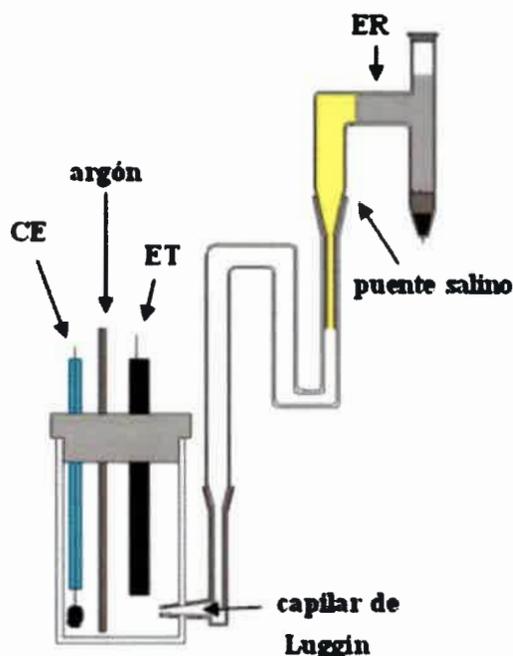


Figura 4.2.2. Esquema alternativo de la celda utilizada para las medidas en VC y VOC. CE: contraelectrodo, ET: electrodo de trabajo y ER: electrodo de referencia.

4.2.4.3. Celda para electrólisis a potencial controlado

La celda utilizada para esta técnica es un modelo convencional de vidrio, con una estructura de tres cuerpos, donde en cada cuerpo se ubican los distintos tipos de electrodos. El compartimiento principal es capaz de alojar un volumen máximo de 20 mL. El brazo lateral es el que aloja el contraelectrodo. El mismo se encuentra unido al cuerpo principal por bocas esmeriladas, recubiertas por una cinta de teflón, a fin de evitar pérdidas. La comunicación entre los compartimientos catódicos y anódicos se encuentra separada por un papel de fibra de vidrio, que permite el pasaje de solución, pero impide la difusión espontánea de las especies desde un compartimiento al otro.

La celda posee, además, un capilar Luggin, en el cual va colocado el electrodo de referencia, mediante una trampa que evita, en lo posible, la difusión de agua, KNO_3 o

material orgánico proveniente del ágar hacia el seno de la solución (cuerpo principal de la celda), componentes propios del electrodo referencia.

La tapa del cuerpo principal de la celda es un cabezal de teflón que se ajusta a presión sobre la boca esmerilada de la misma. Dicha tapa contiene 5 orificios, en los cuales van el electrodo a utilizar en la experiencia de electrólisis a potencial controlado, un electrodo de muestreo para las experiencias de VC, un burbujeador de teflón (tubo de pequeño diámetro), por donde se hace circular el argón, un orificio que sirve como salida del gas circulante y por último, una vaina de vidrio donde se coloca el electrodo de referencia. En la Figura 4.2.3., se muestra un esquema de dicha celda.

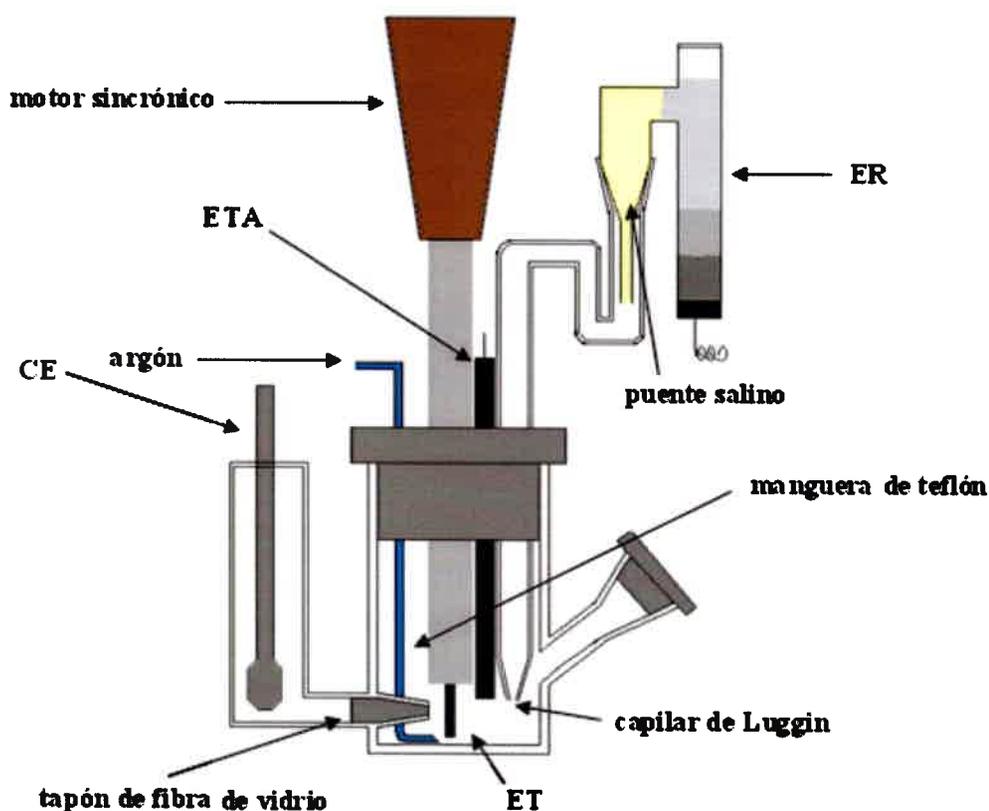


Figura 4.2.3. Esquema de la celda utilizada para las mediciones de electrólisis a potencial controlado. CE: contraelectrodo, ET: electrodo de trabajo, ER: electrodo de referencia y ETA: electrodo de trabajo auxiliar.

4.3. Reactivos y solventes

4.3.1. Reactivos

PAT fue adquirida de Sigma Chemical Company y se empleó sin tratamiento previo, al igual que el 5-hidroximetilfurfural (HMF). Ambos reactivos fueron mantenidos a una temperatura de 8 °C y protegidos de la luz. Con la finalidad de modificar la acidez del medio de reacción se realizaron agregados de ácido trifluoroacético (TFA), marca SIGMA, a partir de soluciones diluidas del mismo, preparadas en ACN + 0,1 M de PTBA.

4.3.2. Solventes

El solvente más utilizado fue ACN (Sintorgan, de calidad HPLC). Previo a su uso, se lo sometió a un proceso de secado por medio de tamices moleculares de 3 Å (Merck p.a.). Estos tamices, compuestos por aluminosilicatos de calcio y sodio, poseen un tamaño de poro definido y su utilidad reside en el hecho de que pueden adsorber en sus poros moléculas pequeñas. En el caso particular de los tamices de 3 Å, adsorben helio, neón, nitrógeno y agua. Son muy eficaces, de alta capacidad desecante, no contaminan con impurezas el solvente y pueden ser regenerados por calentamiento a 300 °C, aunque también poseen, como desventajas, que son más lentos y más caros que otros deshidratantes.

Antes de utilizarlos para secar el ACN, los tamices fueron lavados con agua y secados en estufa por 72 h a 120 °C. Luego, fueron activados en la mufla a 300 °C durante 48 a 72 h. Una vez retirados de la mufla, los tamices fueron enfriados en desecador con sílica gel anhidro e, inmediatamente, transferidos a un recipiente limpio, al cual se le agregó el ACN, que se dejó reposar durante 48 h. El solvente, así tratado, queda en condiciones para ser utilizado en las mediciones electroquímicas y espectroscópicas.

El H₂O, utilizada para preparar los distintos sistemas de soluciones reguladoras, fue Sintorgan, de calidad HPLC.

En las extracciones de la micotoxina a partir de muestras de jugos de manzana se empleó acetato de etilo, Sintorgan de calidad HPLC.

4.3.3. Soluciones

Se preparó una solución patrón de PAT, disolviendo 5 mg de PAT sólida (Sigma Chemical Company) en 10 ml de ACN, siendo su concentración $3,24 \times 10^{-3}$ M. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente tomando alícuotas adecuadas de la solución patrón. El intervalo de concentración analizado se varió desde $1,0 \times 10^{-7}$ M hasta $6,0 \times 10^{-4}$ M.

Las soluciones dentro de la celda electroquímica se saturaron con argón de alta pureza durante, al menos, 30 min, tanto para las medidas en ACN como en soluciones reguladoras de fosfato. Previamente, el gas se hizo pasar a través de una trampa que contenía ACN o solución reguladora de fosfato, según el caso, a los fines de saturar el gas con el solvente evitando así, la evaporación del sistema solvente/soporte en la celda. Además, durante las mediciones electroquímicas se mantuvo una atmósfera de argón constante sobre la solución en estudio, para evitar que el O_2 difundiese en el medio de reacción. Este pretratamiento fue muy importante, debido a la gran solubilidad que posee el O_2 , el cual presenta una cupla redox reversible a aproximadamente $-0,950$ V vs ECS, con un gran valor de corriente catódica que interfiere en la definición de la señal de reducción de PAT.

4.3.4. Electrolitos soportes

En la mayoría de las experiencias de VC y VOC se utilizaron como electrolitos soportes el perclorato de tetrabutil amonio (PTBA) y el hexafluorofosfato de tetrabutil amonio (HTBA), ambos Fluka, de grado electroquímico, a una concentración 0,1 M.

Ambos electrolitos fueron secados previos a su uso. Para ello se los llevó a una estufa de vacío a 25 °C por 24 h, a fin de retirar la mayor cantidad de agua ocluida y, luego, se elevó gradualmente la temperatura hasta alcanzar los 60 °C, y se mantuvo durante otras 24 h a esa temperatura. Ambos electrolitos secos fueron conservados en desecador con sílica gel anhidro en vacío permanente.

Por otro lado, para las experiencias de electrólisis a potencial controlado, se utilizó como electrolito soporte el $NaClO_4$ (Merck p.a.) a una concentración 0,1 M. Previo a su uso, $NaClO_4$ se recrystalizó tres veces en H_2O , se secó en estufa de vacío, primero a temperatura ambiente y, luego, ésta fue gradualmente aumentada, hasta llegar finalmente a 180 °C. Posteriormente, se mantuvo en un desecador en vacío permanente.

En aquellas experiencias realizadas utilizando como solvente el agua (calidad HPLC), se utilizaron como electrolitos soportes dos sistemas. Por un lado, se utilizó agua + 0,1 M de NaClO_4 y la acidez del medio fue modificada por el agregado de HClO_4 . Por otro lado, para poder tener un control más preciso del pH del medio, se prepararon soluciones reguladoras de fosfato a una concentración 0,1 M. Estas soluciones reguladoras se prepararon a partir de las sales K_2HPO_4 y NaH_2PO_4 (ambas Merck p. a.) a los siguientes valores de pH: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 y 7,5; donde el ajuste del valor de pH se realizó mediante el agregado de diferentes alícuotas de soluciones diluidas de NaOH o HClO_4 según correspondiera.

Por último, algunas experiencias de VC y VOC fueron realizadas utilizando perclorato de litio trihidrato ($\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$), 0,1 M y también LiClO_4 , libre de agua (previo a su uso, se mantuvo en estufa de vacío durante una semana a 60 °C).

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. Cronoamperometría (CA)
4. Electrólisis a potencial controlado (EPC)

Para las experiencias electroquímicas con las diferentes técnicas electroquímicas, se emplearon los potenciostatos AUTOLAB PGSTAT30 y AUTOLAB PGSTAT12, acoplados a una PC, con software electroquímico incorporado, GPES 4.9, ambos Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands.

4.5. Equipamiento espectrofotométrico

Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro UV-visible, marca Hewlett Parckard, modelo HP8453. Las celdas de cuarzo utilizadas tienen un camino óptico de 1 cm.

CAPITULO 5

5. Resultados y discusión

5.1. Introducción

En este capítulo se muestran los resultados experimentales obtenidos en los diferentes estudios electroquímicos realizados con la micotoxina patulina (PAT) sobre electrodos de carbono vítreo, en diferentes medios. También, se muestra su aplicación práctica en la determinación de la micotoxina sobre matrices reales.

5.2. Medidas espectrofotométricas

En la Figura 5.2.1., se muestran los espectros de absorción UV-Visible de PAT en ACN a distintas concentraciones de la micotoxina (c_{PAT}^*).

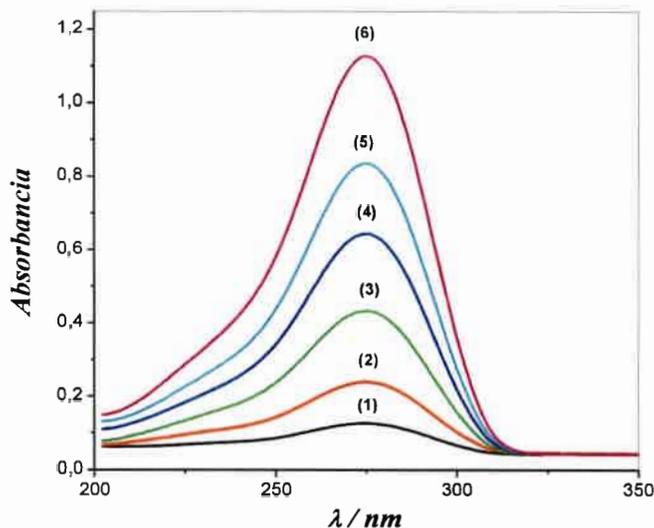


Figura 5.2.1. Espectros de absorción UV-visible de PAT en ACN. Camino óptico,

$b = 1 \text{ cm}$. $c_{PAT}^* = 1) 5,84 \times 10^{-6}$; 2) $1,30 \times 10^{-5}$; 3) $2,59 \times 10^{-5}$;

4) $3,89 \times 10^{-5}$; 5) $5,19 \times 10^{-5}$ y 6) $6,49 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Se observó que PAT presenta una banda de absorción, con un máximo a $\lambda = 275$ nm y que cumple con la Ley de Lambert-Beer (Figura 5.2.2.), siendo el coeficiente de extinción molar (ϵ) determinado a dicha longitud de onda de: $\epsilon^{275} = (1,65 \pm 0,02) \times 10^4$ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, con un coeficiente de correlación lineal (r) de 0,9999.

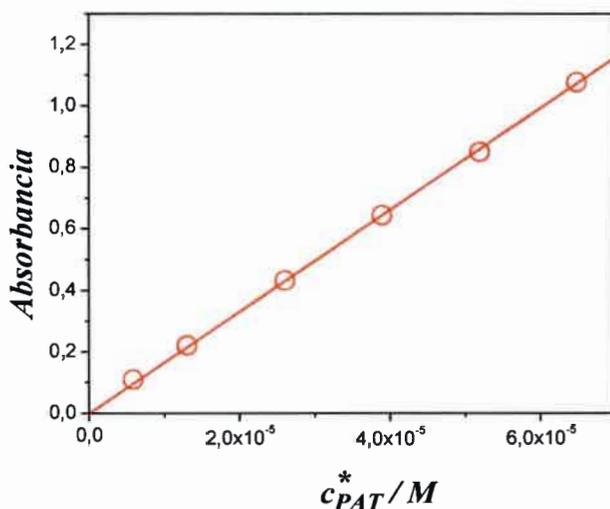


Figura 5.2.2. Gráfico de la Ley de Lambert y Beer para PAT a $\lambda = 275$ nm (Datos de concentración y absorbancia de la Figura 5.2.1.).

5.3. Medidas electroquímicas en acetonitrilo

5.3.1. Medio acetonitrilo / perclorato de tetrabutyl amonio

5.3.1.1. Voltamperometría cíclica

El estudio realizado para obtener las condiciones óptimas de trabajo determinó que la mejor respuesta se obtenía con un electrodo de CV con un tratamiento sólo mecánico, según se indicó en el Item 4.2.1.

Así, voltamperogramas cíclicos de PAT mostraron que la micotoxina presenta un pico de reducción irreversible a aproximadamente $-1,600$ V vs ECS (Figura 1.4.1.). Este pico corresponde a la generación, en la superficie del electrodo de CV, de un anión radical que se produce por la reducción del grupo carbonilo α - β no saturado presente en la estructura molecular de PAT. En la Figura 5.3.1., se muestran voltamperogramas

cíclicos de PAT a distintas velocidades de barrido de potencial. Esta respuesta es reproducible sólo si el barrido de potencial se inicia a +1,650 V, con un tiempo de espera de 30 s en dicho potencial, de modo que todos los experimentos, tanto en VC como en VOC, se realizaron bajo estas condiciones experimentales. Esta condición asegura que el estado de oxidación superficial del electrodo es el mismo en cada una de las experiencias realizadas.

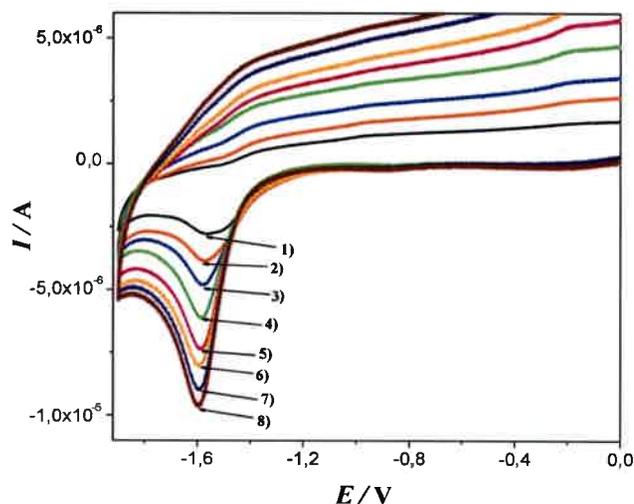


Figura 5.3.1. Voltamperogramas cíclicos para la reducción de PAT a distintas velocidades de barrido del potencial. Electrodo de trabajo: CV ($A = 0,071 \text{ cm}^2$). Medio de reacción: ACN + 0,1 M PTBA. $c_{PAT}^* = 2,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $v = 1$) 0,025; 2) 0,050; 3) 0,075; 4) 0,100; 5) 0,125; 6) 0,150; 7) 0,175; 8) 0,200 V s^{-1} .

Se encontró una relación lineal entre la corriente de pico catódica ($I_{p,c}$) vs $v^{1/2}$, en el intervalo de velocidades de barrido estudiado, para las distintas concentraciones de PAT, (Figura 5.3.2.), indicando que el proceso de electrodo estaría controlado por difusión [65].

Por otro lado, como se muestra en la Figura 5.3.1., no se observa el pico de oxidación complementario al invertir la dirección del barrido de potencial, poniendo en evidencia un mecanismo de reducción de PAT complejo, con reacción/es química/s y/o electroquímicas acoplada/s a la transferencia de carga inicial [65].

Por otra parte, un gráfico de $E_{p,c}$ vs $\log v$ fue lineal (Figura 5.3.3.), con una pendiente de $-(0,035 \pm 0,001) \text{ V/década}$ ($r = 0,9939$).

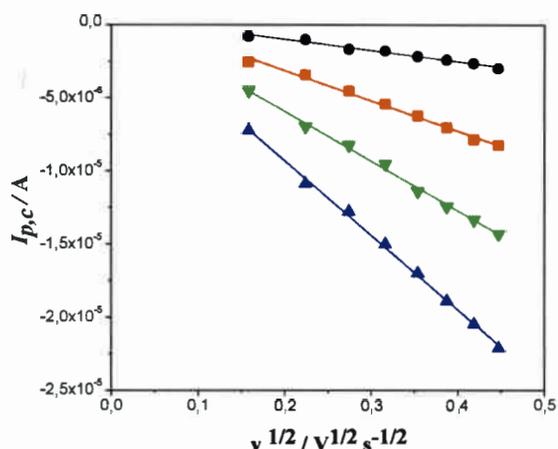


Figura 5.3.2. Dependencia de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$, c_{PAT}^* (●) = $1,25 \times 10^{-4} M$, (■) = $2,40 \times 10^{-4} M$, (▼) = $4,04 \times 10^{-4} M$, (▲) = $6,06 \times 10^{-4} M$.

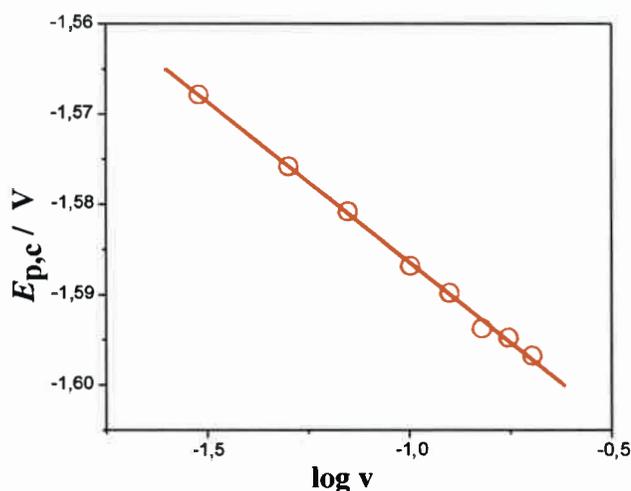


Figura 5.3.3. Gráfico del $E_{p,c}$ vs $\log v$, realizado a partir de los datos de la Figura 5.3.1.

La Figura 5.3.4., muestra un gráfico de $E_{p,c}$ vs $\log c_{PAT}^*$. Esta correlación también fue lineal con una pendiente de $-(0,028 \pm 0,002)$ y $r = 0,9961$. Cada punto en la Figura corresponde al promedio de tres medidas replicadas.

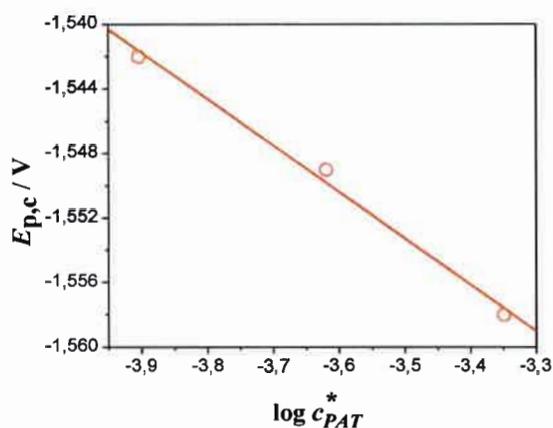


Figura 5.3.4. Gráficos del $E_{p,c}$ en función del $\log c_{PAT}^*$.

De acuerdo al comportamiento observado en estos gráficos, se puede inferir que el corrimiento de los $E_{p,c}$, en ambos casos, se corresponde con sistemas en donde existen reacción/es química/s y/o electroquímicas acoplada/s a la transferencia de carga inicial [65].

La Figura 5.3.5., muestra el comportamiento de las $I_{p,c}$ vs c_{PAT}^* . Como se puede observar, el comportamiento fue lineal en el ámbito de concentraciones estudiado con un $r = 0,9997$. A partir del valor de la pendiente, la sensibilidad de la técnica fue de: $-(0,0193 \pm 0,0002) A M^{-1}$, siendo la concentración más baja medida experimentalmente, para una relación señal/ruido de 3:1, de $1,0 \times 10^{-5} M$ (1,54 ppm).

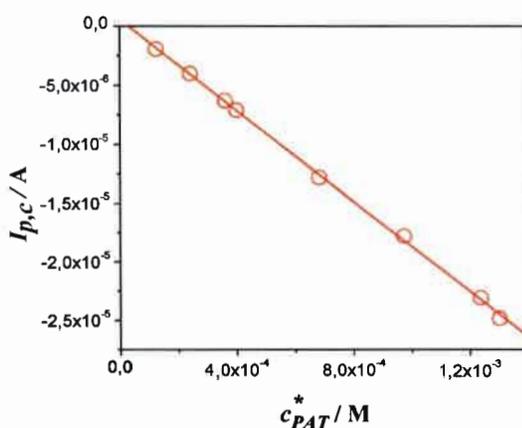


Figura 5.3.5. Gráfico de $I_{p,c}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0.1 M de PTBA. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Debido a la existencia de la/s complicación/es cinética/s mencionada/s, se realizó un estudio de la función corriente, Ψ , definida como: $I_{p,c} / v^{1/2} c_{PAT}^*$ ($A V^{-1/2} s^{1/2} M^{-1}$) en función de $v^{1/2}$ a distintas c_{PAT}^* . Para una reacción reversible, sin complicaciones cinéticas posteriores a la transferencia de carga inicial, la relación entre la Ψ con $v^{1/2}$, debería ser constante e independiente de c_{PAT}^* . Experimentalmente, se encontró que, Ψ disminuye a medida que v aumenta, como se muestra en la Figura 5.3.6., como asimismo, aumenta a medida que disminuye la concentración del sustrato. Este comportamiento estaría poniendo en evidencia que el mecanismo de la reacción/es química/s acoplada/s a la transferencia de carga inicial sería de segundo orden [65, 83, 84].

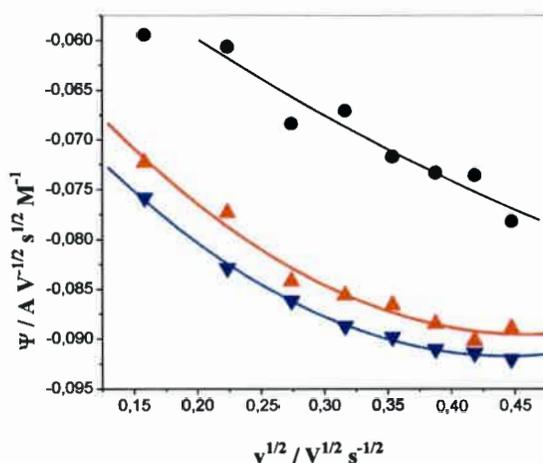
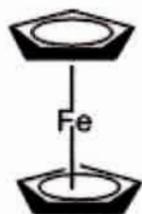


Figura 5.3.6. Gráfico de $\Psi (I_{p,c} / v^{1/2} c_{PAT}^*)$ vs $v^{1/2} \cdot c_{PAT}^*$ (●) = $1,25 \times 10^{-4} M$,
 (▲) = $2,40 \times 10^{-4} M$, (▼) = $5,4 \times 10^{-4} M$.

5.3.1.2. Cálculo del área del electrodo de trabajo

Con el objetivo de determinar el coeficiente de difusión de PAT a partir de los voltamperogramas cíclicos convolucionados y aplicando la ecuación 3.9.19., de la corriente límite convolucionada ($I_{con,L}$), se procedió a determinar el área electroquímica del electrodo de trabajo, el cual es un disco de carbono vítreo cuya área geométrica es de $0,071 \text{ cm}^2$ (3 mm de diámetro). Para ello, se utilizó un compuesto modelo, el ferroceno (Fc), cuya estructura química se muestra en la Figura 5.3.7.



Ferroceno

Figura 5.3.7. Estructura química de ferroceno.

Este compuesto, al ser oxidado, origina un catión estable, llamado ferrocinio (Fc^+), el cual puede ser reducido y regenerar el sustrato de partida, en un proceso que involucra el intercambio de un electrón. El proceso de electrodo está controlado por difusión y su coeficiente de difusión ha sido informado en la literatura, $D_{\text{Fc}} = 2,26 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, en ACN + 0,1 M de perclorato de tetraetil amonio (PTEA), a una $T = 293 \text{ °K}$ y a una $c_{\text{Fc}}^* = 1,1 \times 10^{-3} \text{ M}$ [85].

En la Figura 5.3.8., se observa un voltamperograma cíclico de Fc. Presenta un potencial de pico anódico ($E_{\text{p,a}}$) a 0,415 V. Por ello, el potencial aplicado (E_{apl}) en las experiencias de cronoamperometría fue de 0,6 V, asegurando así que la experiencia fuese realizada en la región limitada por la transferencia de masa, bajo condiciones de difusión lineal semi-infinita.

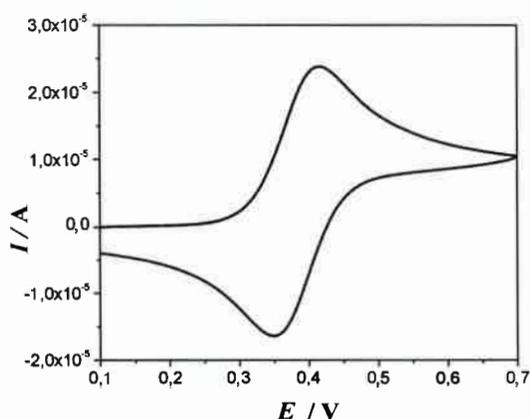


Figura 5.3.8. Voltamperograma cíclico de ferroceno en ACN + 0,1 M de PTBA.

$$c_{\text{Fc}}^* = 1,11 \times 10^{-3} \text{ M}, \nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}.$$

En la Figura 5.3.9., se muestra un transitorio $I-t$, luego de aplicar un salto de potencial desde 0 V, con un tiempo de espera de 10 s, hasta 0,6 V, durante 10 s. Cabe destacar que todas las medidas fueron realizadas aplicando una compensación por caída óhmica (compensación $I-R$) de 100 Ω , la cual fue calculada aplicando el sistema de retroalimentación positiva (“feedback positivo”) que posee el potencióstato AUTOLAB PGSTAT12.

Teniendo en cuenta la ecuación de Cottrell (ec. 3.9.25.), se realizaron gráficos de I vs $t^{1/2}$ y, de los valores de la pendiente, se obtuvo la medida del área del electrodo de trabajo.

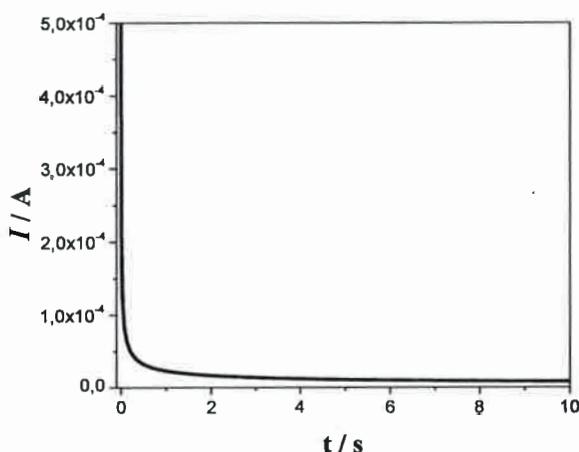


Figura 5.3.9. Transitorio $I-t$ para ferroceno en ACN + 0,1 M PTBA.

$$E_{apl} = 0,6 \text{ V}, c_{Fc}^* = 1,11 \times 10^{-3} \text{ M}.$$

En la Figura 5.3.10., se observa un gráfico de I vs $t^{1/2}$, que corresponde al transitorio de la Figura 5.3.9. Los primeros puntos del gráfico fueron eliminados en el análisis, ya que contienen la corriente de cargado de la doble capa y, los últimos puntos poseen una posible contribución convectiva. La corriente fue graficada en el intervalo entre 0,1 y 1 s. Se obtuvo una pendiente promedio, para una serie de 5 medidas consecutivas de: $(2,3591 \pm 0,0002) \times 10^{-5} \text{ A s}^{-1/2}$.

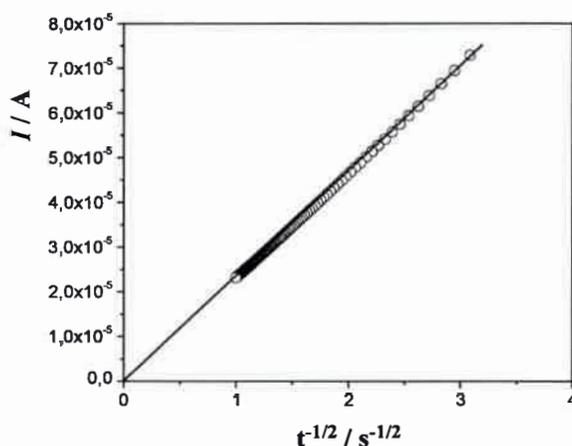


Figura 5.3.10. Análisis del transitorio de la Figura 5.3.9., mediante la ecuación de Cottrell, en el intervalo de 0,1 a 1 s.

Así, se obtuvo que el área del electrodo de trabajo era de: $(0,082 \pm 0,001) \text{ cm}^2$.

5.3.1.3. Voltamperometría de convolución

Una vez realizado el cálculo del área del electrodo de trabajo, se realizaron medidas por voltamperometría cíclica, a una solución conteniendo una $c_{PAT}^* = 2,95 \times 10^{-4} \text{ M}$ en ACN + 0,1 M PTBA, para luego poder aplicar la teoría de la convolución y, así, determinar el D_{PAT} . En la Figura 5.3.11., se muestra un voltamperograma cíclico de PAT, al cual previamente se le restó el blanco, conjuntamente con el correspondiente voltamperograma convolucionado. Se observa que la corriente convolucionada del barrido anódico no retorna a cero, lo que también pone claramente en evidencia la existencia de reacción/es química/s acopladas a la transferencia de carga inicial [65].

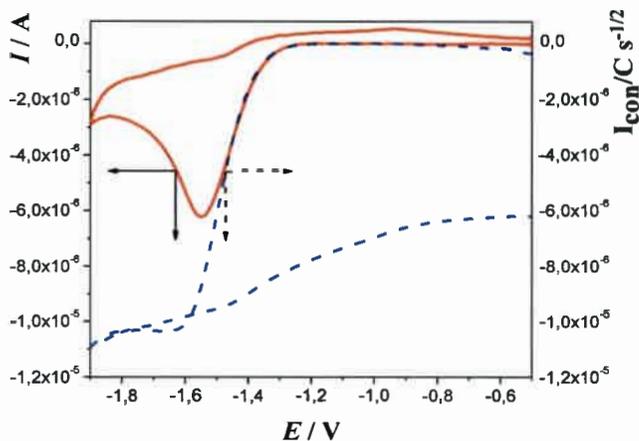


Figura 5.311. Voltamperogramas cíclico (línea continua) y convolucionado (línea punteada) de PAT. $c_{PAT}^* = 2,95 \times 10^{-4} M$ en ACN + 0,1 M PTBA. $v = 0,075 V s^{-1}$.

Gráficos E vs $\log [(I_{con,L} - I_{con})/I]$. La pendiente promedio de dichos gráficos para las velocidades de barrido comprendidas entre $0,025$ y $0,200 V s^{-1}$, fue de $(0,062 \pm 0,001) V/década$, ($r = 0,9998$), muy próximo al valor de $0,0592 V/década$ esperado teóricamente para una reacción redox que involucra el intercambio de un electrón por mol de sustancia electrolizada [65, 70].

Para el cálculo de la corriente límite convolucionada ($I_{con,L}$), se realizó un estudio con v entre $0,025 V s^{-1}$ y $0,2 V s^{-1}$. Con ello se determinó que el valor promedio de $I_{con,L}$ fue de $-(1,032 \pm 0,002) \times 10^{-5} C s^{-1/2}$.

Para el cálculo del D_{PAT} se utiliza la siguiente ecuación [70]:

$$I_{L,c} = nFAD_{PAT}^{1/2} c_{PAT}^* \tag{3.9.19.}$$

Dónde: n es el número de electrones involucrados en la reacción redox, que en este caso se asume por ser un $n = 1$ y F , es la constante de Faraday ($96485 C mol$).

Así, $D_{PAT} = (1,95 \pm 0,01) \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$

5.3.1.4. Electrólisis a potencial controlado

En la Figura 5.3.12., se muestran un voltamperograma cíclico de PAT y su correspondiente blanco, antes de realizar la electrólisis a potencial controlado, utilizando el electrodo de CV auxiliar (disco de CV, $A = 0,071 \text{ cm}^2$). La electrólisis se realizó en una solución agitada, tanto por el giro del electrodo, como por el burbujeo constante de argón, que se realiza a los fines de impedir la entrada de oxígeno al medio de reacción ya que su potencial de descarga está próximo a los $-0,9 \text{ V}$. Dado que su potencial de descarga es mucho más anódico que el utilizado para las electrólisis, la presencia de oxígeno generaría una cantidad de corriente extra, que haría que los resultados no fuesen correctos.

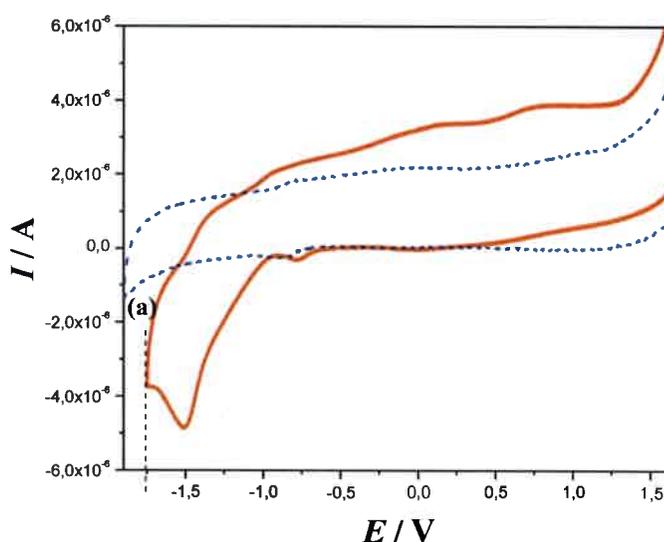


Figura 5.3.12. Voltamperogramas cíclicos de PAT (—), en ACN + 0,1 M de PTBA, $c_{PAT}^* = 3,47 \times 10^{-4} \text{ M}$ y su correspondiente blanco (---) antes de realizar la electrólisis. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

El potencial aplicado para realizar las electrólisis fue de $-1,79 \text{ V}$ (indicado como (a) en la Figura 5.3.12.). La experiencia se realizó en tres intervalos de 15 min. (Figura 5.3.13.), a fin de tomar voltamperogramas para monitorear la disminución del pico de reducción de PAT y la probable aparición de su/s producto/s de reducción, como se observa en la Figura 5.3.14.

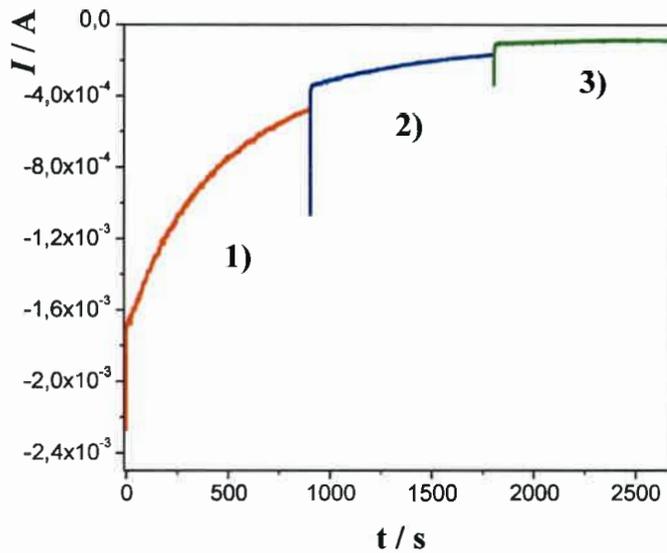


Figura 5.3.13. Transitorios I/t obtenidos durante las electrólisis realizadas a intervalos de 15 min., en medio agitado y bajo las condiciones de la Figura 5.3.12., 1) electrólisis 1: carga: 0,807 C, 2) electrólisis 2: carga: 0,159 C, 3) electrólisis 3: carga: 0,083 C.

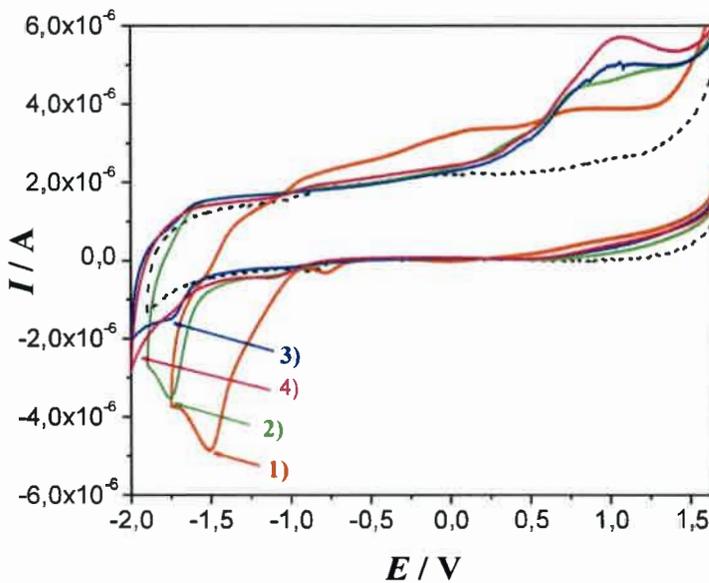


Figura 5.3.14. Voltamperogramas cíclicos registrados antes (1) y luego de cada una de las tres electrólisis (2, 3 y 4) que se corresponden con la Figura 5.3.13., en ACN + 0,1 M de PTBA,

$$c_{PAT}^* = 3,47 \times 10^{-4} \text{ M y su correspondiente}$$

blanco (---) antes de realizar la electrólisis. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

Como se puede observar en la Figura 5.3.14., luego de las 3 electrólisis, desaparece el pico correspondiente a la reducción de PAT y aparece un nuevo pico, debido a él/los productos de reducción de PAT, centrado en aproximadamente 1 V.

A partir de las electrólisis realizadas, fue posible calcular, el número de electrones intercambiados en la reducción de PAT. Si se considera que la carga total, $Q = 1,05$ C, es la carga producida por la suma de las tres electrólisis, y utilizando la ecuación 3.9.26., (Ítem 3.9.4.), se obtiene un $n = 1,1$.

El número de electrones, también puede obtenerse analizando la electrólisis a tiempos cortos, como se indica en el Ítem 3.9.4.

En la Figura 5.3.15., se muestra un gráfico de $\ln I$ vs t (tomando logaritmo natural a ambos miembros de la ecuación 3.9.33.), de cuya pendiente se determinó el valor de $p = -(1,73 \pm 0,05) \times 10^{-3}$.

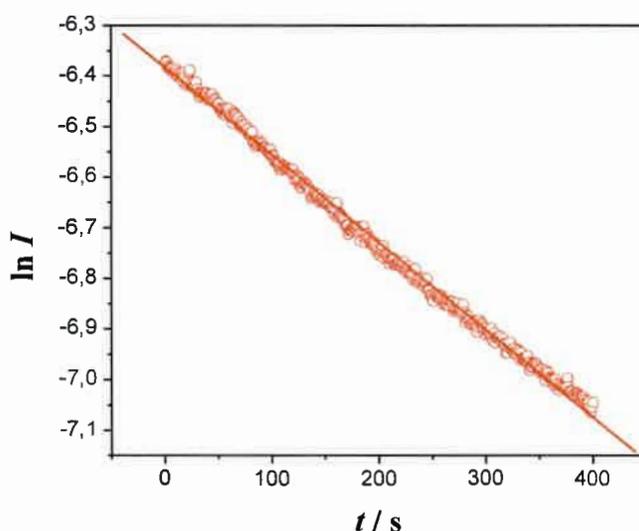


Figura 5.3.15. Gráfico de $\ln I$ vs t , pendiente = $-(1,73 \pm 0,05) \times 10^{-3}$; $r = 0,9981$.

En la Figura 5.3.16 se muestra un gráfico de $\ln Q$ vs $\ln t$ a tiempos cortos (ecuación 3.9.39.).

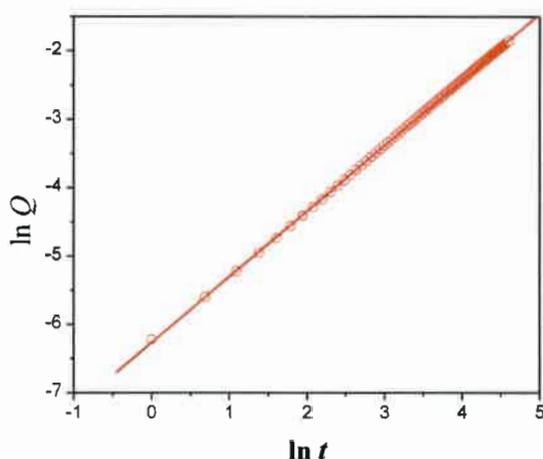


Figura 5.3.16. Gráfico de $\ln Q$ vs $\ln t$. Ordenada = $-(6,265 \pm 0,003)$; pendiente = $-(0,961 \pm 0,009)$; $r = 0,9999$.

Con el valor de p obtenido del gráfico de $\ln I(t)$ vs t (Figura 5.3.15.) y el valor de la ordenada del gráfico, $\ln Q$ vs $\ln t$ (Figura 5.3.16.), a tiempos cortos, fue posible determinar $Q(0)$, el cual está definido como, $Q(0) = n F N_{PAT}$, donde n es el número de electrones intercambiados y N_{PAT} es el número de moles de PAT que inicialmente se electroizaron ($9,73 \times 10^{-6}$ moles). El valor experimental de $Q(0)$ fue de 1,01 C, de donde se obtuvo un valor de $n = 1,07$, el cual coincide con el valor calculado a partir del proceso completo. Este resultado está en buen acuerdo con lo determinado a partir de los voltamperogramas convolucionados, donde el n determinado también fue de 1.

5.3.1.5. Voltamperometría de onda cuadrada

A partir de esta técnica, no sólo se pudo bajar el límite de detección en la cuantificación de PAT y aumentar la sensibilidad, sino también, obtener resultados que coinciden con los obtenidos por VC, ya que a través de estudios variando la frecuencia, se determinó que el proceso de electrodo está controlado por difusión y, que luego de la transferencia de carga, existen reacción/es química/s y/o electroquímicas acopladas.

En la Figura 5.3.17., se muestran los registros de las corrientes directa (I_d), inversa (I_i) y neta (I_n) de un voltamperograma de OC obtenido para PAT sobre un electrodo de CV. Estos registros ponen también en evidencia un mecanismo de reacción complejo [79].

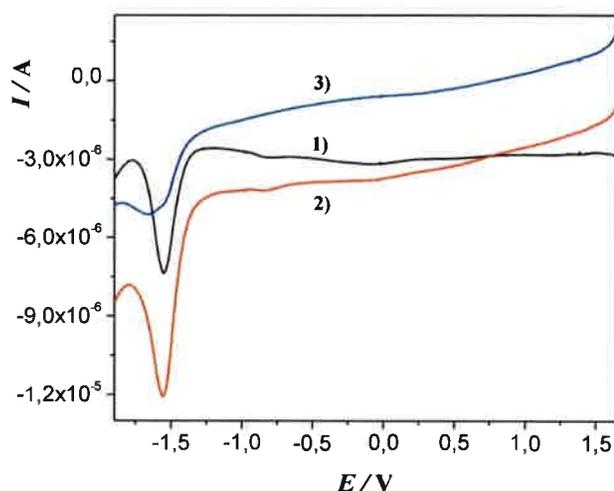


Figura 5.3.17. Voltamperograma de OC de PAT en ACN + 0,1 M PTBA. $c_{PAT}^* = 3,09 \times 10^{-4} M$.

1) I_m 2) I_d 3) I_i . $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$.

En la Figura 5.3.18., se muestran voltamperogramas de OC de PAT a distintas f . Al igual que en VC, las respuestas voltamperométricas fueron reproducibles si se iniciaba el barrido del potencial a +1,650 V vs ECS, con un tiempo de espera en dicho potencial de 30 s, de modo que todos los experimentos, se realizaron bajo estas condiciones experimentales.

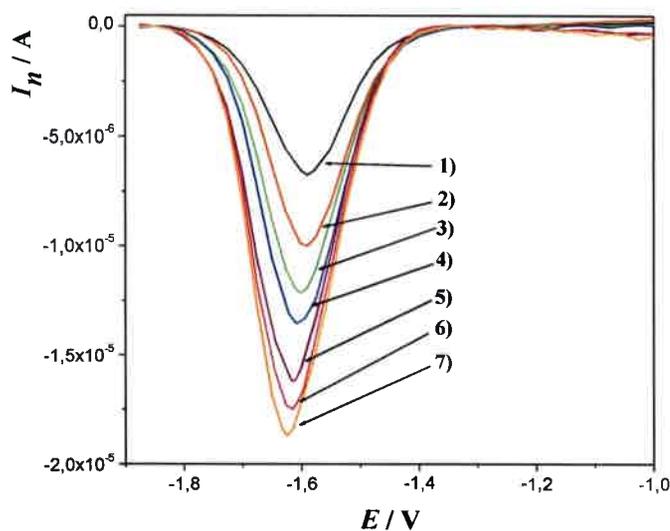


Figura 5.3.18. Voltamperogramas de OC de PAT a distintas $f = 1) 10, 2) 20, 3) 30, 4) 40, 5)$

$60, 6) 70, 7) 80 Hz$. $c_{PAT}^* = 6,06 \times 10^{-4} M$.

Como se puede ver en la Figura 5.3.19., gráficos de $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$ fueron lineales, para las concentraciones analizadas y en el intervalo de f entre 10 y 100 Hz, mostrando nuevamente que el proceso de electrodo está controlado por difusión, lo cual coincide con lo determinado previamente por VC.

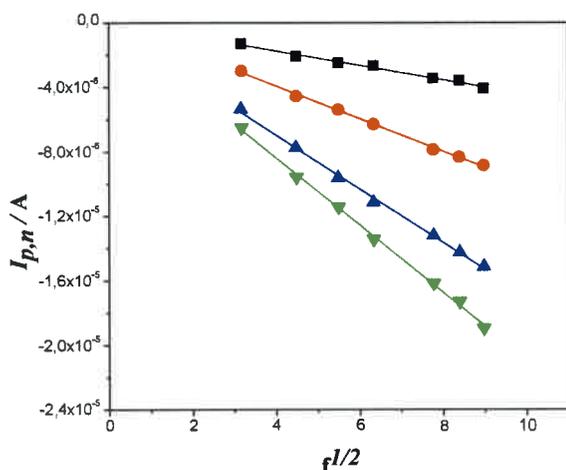


Figura 5.3.19 Dependencia de $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$, c_{PAT}^* : (■)= $1,25 \times 10^{-4}$ M, (●)= $2,40 \times 10^{-4}$ M, (▲)= $4,04 \times 10^{-4}$ M, (▼)= $6,06 \times 10^{-4}$ M.

Gráficos de la corriente de pico neta ($I_{p,n}$) vs c_{PAT}^* fueron lineales (Figura 5.3.20.), con una pendiente de $-(0,0346 \pm 0,0005)$ A M^{-1} y $r = 0,9982$, en el intervalo de c_{PAT}^* entre 6×10^{-7} a $2,15 \times 10^{-5}$ M. Así, la sensibilidad de la VOC fue, aproximadamente, 1,8 veces mayor que la obtenida mediante VC (Item 5.3.1.1.), lo que concuerda con lo esperado teóricamente [79], teniendo en cuenta el sistema de muestreo de corriente que se aplica en la VOC y, esto, a pesar de que la descarga de PAT es irreversible y que la corriente inversa (I_i), contribuye de manera negativa a la corriente neta (I_n) (Figura 5.3.17.).

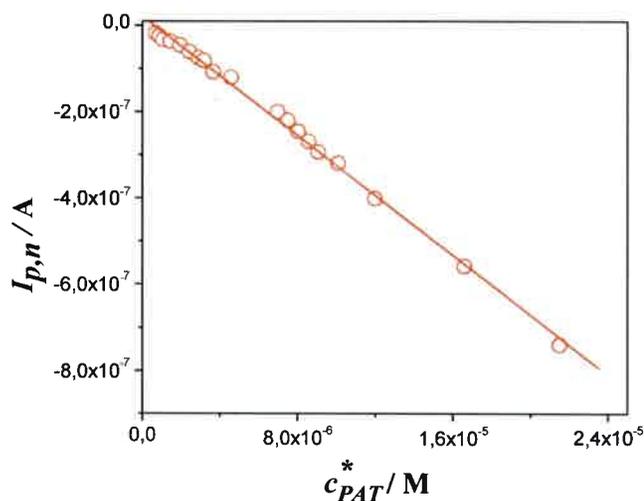


Figura 5.3.20. Gráfico de la $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0.1 M de PTBA.

$$\Delta E_{OC} = 0,025 V, \Delta E_e = 0,005 V \text{ y } f = 10 \text{ Hz.}$$

La concentración más baja medida experimentalmente por esta técnica, para una relación señal/ruido de 3:1 fue, $7 \times 10^{-7} M$ (107 ppb), tres órdenes de magnitud menor que la determinada previamente por VC. Sin embargo, este valor está por encima de los niveles permitidos para su presencia en alimentos [34, 35].

Debido a esto, en lo que sigue de esta Tesis, se mostraran resultados que permiten bajar este límite de detección de PAT, de manera que esta técnica pueda ser aplicada para el análisis de muestras reales, dentro de los márgenes de concentraciones establecido por las organizaciones internacionales y, de esta manera, poder utilizar las técnicas electroanalíticas, como alternativas a las cromatográficas en la determinación de esta micotoxina.

5.3.2. Medidas utilizando perclorato de litio como electrolito soporte

Tal como se indicó en la introducción, la utilización de un electrolito soporte que posea un ión como el Li^+ , causa importantes cambios en el comportamiento voltamperométrico de una molécula orgánica, debido a la formación de pares iónicos entre el anión radical, que se forma luego de la transferencia de carga, y el Li^+ . La reactividad del anión radical en solventes apróticos, está influenciada por la formación de pares iónicos con el catión del electrolito soporte y la velocidad de la reacción de

dimerización se incrementa con la disminución del radio del catión del electrolito soporte [62].

Con el objetivo de obtener un acercamiento al mecanismo de reducción de PAT y a la vez aprovechar el efecto electro-catalítico o el aumento en la corriente de reducción desde un punto de vista analítico, es que se realizaron experiencias con este electrolito soporte.

Como se puede observar en la Figura 5.3.21., la utilización de $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$, como electrolito soporte, produce varios efectos en la descarga de PAT, cuando se la compara con su descarga en un electrolito soporte como el PTBA. Se observa que el $E_{p,c}$ se desplaza hacia valores anódicos, se produce un aumento de la I_p , se produce una variación en el ancho del pico y se genera un nuevo pico durante el barrido anódico, debido a él/los producto/s de reducción generado/s durante el barrido catódico.

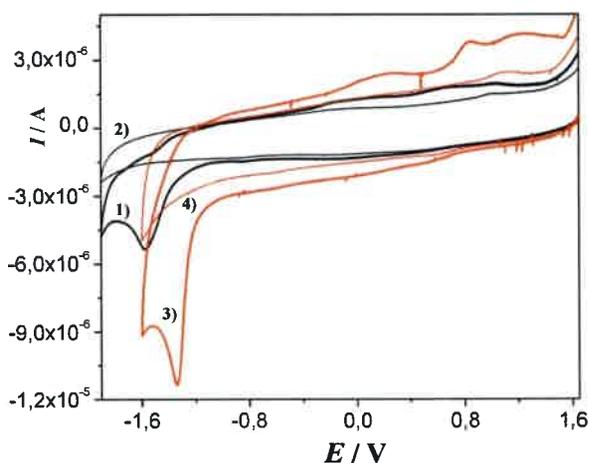


Figura 5.3.21. Voltamperogramas cíclicos de PAT tanto en $\text{ACN} + 0,1 \text{ M PTBA}$, $c_{PAT}^* = 2,402 \times 10^{-4} \text{ M}$ (1) y su respectivo blanco (2); como en $\text{ACN} + 0,1 \text{ M de LiClO}_4 (\text{H}_2\text{O})_3$, $c_{PAT}^* = 2,49 \times 10^{-4} \text{ M}$ (3) y su respectivo blanco (4) a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Tabla 5.3.1. se resumen las características principales de los picos de reducción de PAT en los medios de reacción indicados en la Figura 5.3.21.

Tabla 5.3.1. Características de los picos de reducción de PAT que se corresponden con la Figura 5.3.21.

Medio de reacción	$E_{p,c}$ (V)	I_p (μ A)	Área (C)	$E_{p,c}-E_{p,c/2}$ (V)
ACN + 0,1 M PTBA	-1,569	-3,603	$2,74 \times 10^{-5}$	-0,130
ACN + 0,1 M $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$	-1,341	-7,42	$3,57 \times 10^{-5}$	-0,060

Estos valores, reflejan claramente que cuando se utiliza el ión Li^+ en el electrolito soporte, se produce un cambio en el mecanismo de reducción de PAT, debido a que este ión produce la estabilización del anión radical luego de la transferencia de carga, dando lugar así a un producto posiblemente diferente del formado en ACN + 0,1 M de PTBA. No obstante, la descarga de PAT en 0,1 M de $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$ es también irreversible, debido a la/s reacción/es química/s homogénea/s acopladas a la transferencia de carga inicial.

De la misma manera que lo que sucede en ACN + 0,1 M de PTBA, los barridos deben iniciarse, luego de, al menos 30 s de espera en 1,65 V, cuando se utiliza 0,1 M de $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$, debido a que si esto no se realiza se produce la pasivación o envenenamiento de la superficie del electrodo de trabajo, lo que causa una disminución en la altura de la señal, como así también un corrimiento en el $E_{p,c}$, en dirección catódica, tal como se muestra en la Figura 5.3.22.

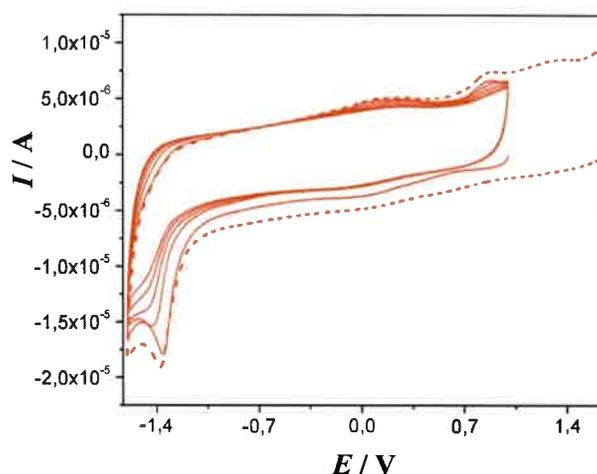


Figura 5.3.22. Voltamperogramas cíclicos de PAT, en ACN + 0,1 M $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$, a una $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, en línea continua, 5 ciclos sucesivos desde 1 V hasta -1,6 V y en línea punteada desde 1,65 V (con 60 s de espera en ese potencial), hasta -1,6 V. $c_{PAT}^* = 2,41 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Al igual que en ACN + 0,1 M PTBA, el proceso de electrodo, en principio, estaría controlado por difusión cuando se utiliza 0,1 M $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$, ya que gráficos de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$ son lineales, tal como se muestra en la Figura 5.3.23. Además, si se compara este gráfico con el de la Figura 5.3.2., se puede observar que, para la misma concentración de PAT ($c_{PAT}^* = 2,41 \times 10^{-4}$ M), la pendiente del gráfico de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$ es más pronunciada, siendo de $-(3,96 \pm 0,02) \times 10^{-5}$ A $\text{V}^{-1/2} \text{s}^{1/2}$ para el medio de ACN + 0,1 M $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$, mientras que para ACN + 0,1 M PTBA es de $-(2,07 \pm 0,02) \times 10^{-5}$ A $\text{V}^{-1/2} \text{s}^{1/2}$, lo cual es un reflejo del aumento en la corriente de pico para las distintas velocidades de barrido estudiadas.

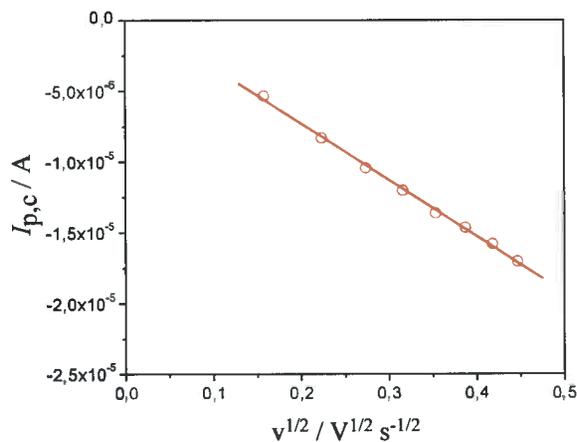


Figura 5.3.23. Gráfico de I_p vs $v^{1/2}$ en ACN + 0,1 M de $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$, en el intervalo de v entre 0,025 y 0,2 V s^{-1} , $c_{PAT}^* = 2,41 \times 10^{-4}$ M.

Debido a la estructura cristalina que posee el LiClO_4 , se trata de una sal altamente higroscópica. Así, el utilizado en las experiencias que se indicaron anteriormente, se encontraba tri-hidratado. Para poder comparar, con la influencia que tiene el agua residual en la reducción de PAT, se sometió a esta sal a un secado en estufa de vacío, a 60 °C, durante una semana y en vacío permanente. Los resultados, muestran, que cuando se utiliza el electrolito soporte seco, se produce la pasivación del electrodo de trabajo, aún, si se mantiene 60 s de espera en 1,65 V antes de iniciar los barridos, como se muestra en la Figura 5.3.24.

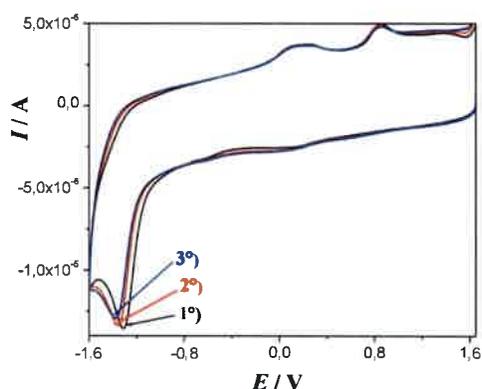


Figura 5.3.24. Voltamperogramas cíclicos sucesivos de PAT, 1°, 2° y 3° barrido respectivamente, en ACN + 0,1 M de LiClO_4 a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, desde 1,65 V (con 60 s de espera en ese potencial) hasta -1,6 V. $c_{\text{PAT}}^* = 3,67 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Por otro lado, utilizando 0,1 M de $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$ y al aumentar la c_{PAT}^* , respecto de la experiencia anterior, en este mismo electrolito, se pone de manifiesto, nuevamente, la pasivación del electrodo de trabajo, tal como se muestra en la Figura 5.3.25.

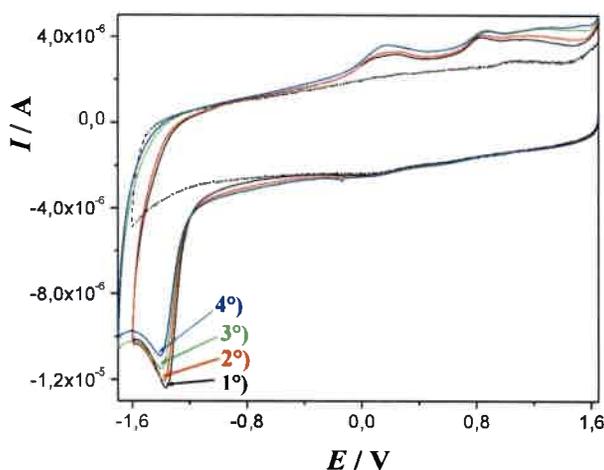


Figura 5.3.25. Voltamperogramas cíclicos sucesivos de PAT, 1°, 2°, 3° y 4° barrido respectivamente, en ACN + 0,1 M $\text{LiClO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$ a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, desde 1,65 V (con 60 s de espera en ese potencial) hasta -1,6 V, y su respectivo blanco (---). $c_{\text{PAT}}^* = 3,67 \times 10^{-4} \text{ M}$.

La pasivación del electrodo de trabajo, podría ser debido, a que los complejos entre los pares iónicos (anión radical- Li^+), se adsorben o precipitan sobre la superficie

del electrodo de trabajo, pero luego, gran parte de este precipitado puede ser re-disuelto durante el barrido anódico. La formación de sales de litio insolubles, en la reducción de quinonas en ACN, ha sido informada en la literatura [60].

De modo que, para poder utilizar las propiedades de este electrolito en forma analítica, o para la determinación del mecanismo de reducción de PAT, habría que elaborar una estrategia para prevenir la pasivación del electrodo de trabajo. Esto podría ser logrado, cambiando la polaridad del medio, es decir, cambiar de solvente, quizás a un solvente más polar que ACN, de tal manera que el complejo permanezca en solución.

De las experiencias con este electrolito soporte, se puede llegar a la conclusión de que la utilización de las sales de amonio cuaternario (perclorato de tetrabutil amonio o hexafluorofosfato de tetrabutil amonio) son las más apropiadas para la determinación de PAT en ACN, debido a que su carácter inerte, hace que no se formen pares iónicos y de esta manera, no se pasive el electrodo de trabajo.

5.3.3. Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple

5.3.3.1. Cálculo de área del electrodo de trabajo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple

Para determinar el área del electrodo de trabajo (un disco de CV de 0,071 cm² de área), el cual fue modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) como se indicó en el inciso 4.2.1., se utilizó el mismo sistema que para determinar el área del electrodo desnudo (la cupla redox ferroceno/ferrocinio), como se indicó en el inciso 5.3.1.2. Se registraron transitorios $I-t$, aplicando un salto de potencial desde 0 V, con un tiempo de espera de 10 s, hasta 0,6 V, durante 10 s, y teniendo en cuenta la ecuación de Cottrell (ec. 3.9.25.), se realizaron gráficos de I vs $t^{1/2}$ y con los valores de la pendiente se obtuvo la medida del área del electrodo de trabajo.

La pendiente promedio obtenida de los gráficos de I vs $t^{1/2}$ fue de $(3,455 \pm 0,002) \times 10^{-5} \text{ A s}^{-1/2}$, lo que produce un área para el electrodo de trabajo, de: $0,12 \pm 0,01 \text{ cm}^2$. Esto representa un aumento del área efectiva del electrodo de trabajo de aproximadamente un 46 %. Este resultado, indicaría, dado que la superficie geométrica no fue alterada por el sistema de modificación, que la rugosidad de la superficie del electrodo se incrementó.

5.3.3.2. Voltamperometría cíclica con el electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple

En la Figura 5.3.26., se muestran voltamperogramas cíclicos de PAT, y sus correspondientes blancos, en una solución de ACN + 0,1 M PTBA, obtenidos con el electrodo de CV desnudo y modificado con los NTCPM a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, donde se observa un incremento en la corriente de reducción en el electrodo modificado respecto del no modificado, como consecuencia del aumento en el área efectiva del electrodo.

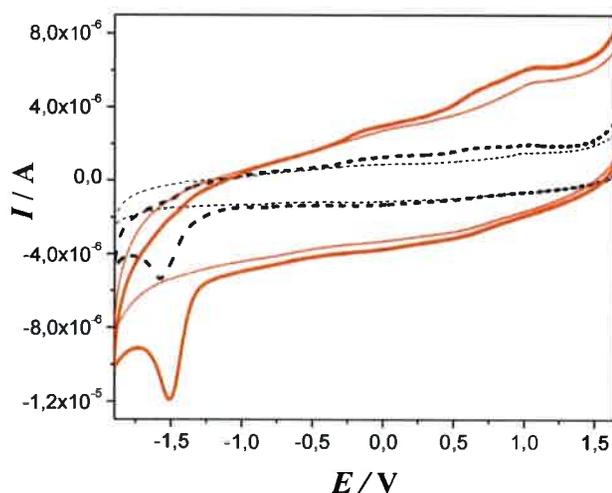


Figura 5.3.26. Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M PTBA, $c_{PAT}^* = 2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Electrodo de CV desnudo (línea punteada) y electrodo de CV modificado con NTCPM (línea continua), con sus respectivos blancos.

Como se puede observar a partir de los voltamperogramas, el aumento en el área efectiva que producen los NTCPM, produce un aumento en la corriente de pico (I_p) y también un ligero corrimiento en el potencial de pico ($E_{p,c}$). En el caso del electrodo desnudo, se tiene que el $E_{p,c} = -1,57 \text{ V}$ y para el electrodo modificado es $E_{p,c} = -1,50 \text{ V}$, (en ambos casos vs ECS), esto muestra un corrimiento en dirección anódica del $E_{p,c}$ de 0,07 V. La I_p para la descarga de PAT en el electrodo desnudo fue de $-3,83 \mu\text{A}$, mientras que con el electrodo modificado la I_p fue de $-6,12 \mu\text{A}$, es decir se produce un aumento en la I_p del orden del 60 %.

Al igual que como sucede con el electrodo de CV sin modificar, con el electrodo modificado, el proceso de electrodo estaría controlado por difusión, como se puede

observar en la Figura 5.3.27., donde gráficos de I_p vs $v^{1/2}$ son lineales en el intervalo de velocidades desde 0,025 hasta 0,200 $V s^{-1/2}$.

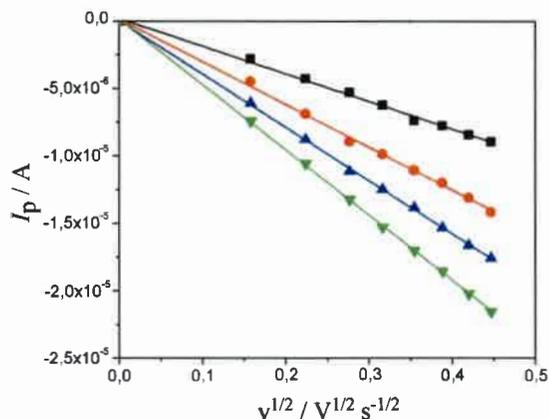


Figura 5.3.27. Dependencia de I_p vs $v^{1/2}$ en ACN + 0,1 M PTBA, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM a distintas concentraciones de PAT. c_{PAT}^* : (\blacksquare) = $1,27 \times 10^{-4}$ M, (\bullet) = $2,49 \times 10^{-4}$ M, (\blacktriangle) = $3,08 \times 10^{-4}$ M, (\blacktriangledown) = $3,47 \times 10^{-4}$ M.

Por otra parte, un gráfico de $E_{p,c}$ vs $\log v$ fue lineal (Figura 5.3.28.), con una pendiente de $-(0,0367 \pm 0,0009)$ V/década ($r = 0,9982$), cuyo valor es muy similar al encontrado para el electrodo desnudo.

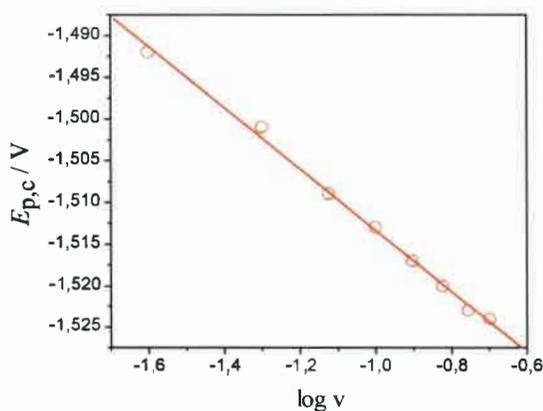


Figura 5.3.28. Dependencia del $E_{p,c}$ vs $\log v$, $c_{PAT}^* = 2,49 \times 10^{-4}$ M, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM.

La Figura 5.3.29., muestra el comportamiento de las $I_{p,c}$ vs c_{PAT}^* , utilizando un electrodo modificado con NTCPM y a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Como se puede observar el comportamiento fue lineal en el ámbito de concentraciones estudiado con un $r = 0,9995$. A partir del valor de la pendiente, la sensibilidad de la técnica fue de: $-(0,0229 \pm 0,0004) \text{ A M}^{-1}$.

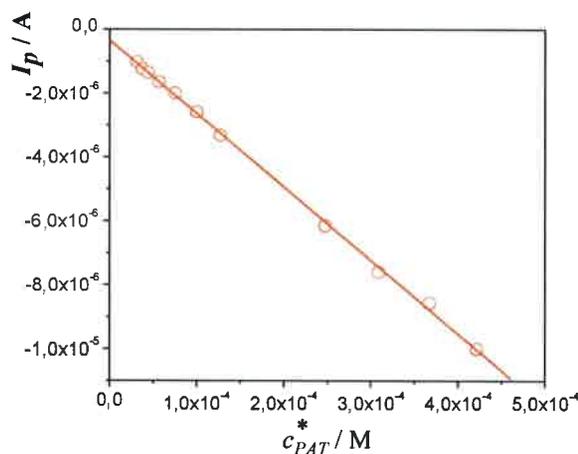


Figura 5.3.29. Dependencia del I_p vs c_{PAT}^* utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

5.3.3.3. Voltamperometría de onda cuadrada con el electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple

En la Figura 5.3.30., se muestran los registros de las corrientes directa (I_d), inversa (I_i) y neta (I_n) de un voltamperograma de OC obtenido para PAT sobre un electrodo de CV modificado con NTCPM. Estos registros son muy similares a los obtenidos con el electrodo desnudo.

En la Figura 5.3.31. se muestran voltamperogramas de OC de PAT, en una solución de ACN + 0,1 M PTBA, donde se comparan los registros obtenidos con el electrodo de CV desnudo y modificado con los NTCPM, utilizando, para ambas medidas, los mismos parámetros de OC, $\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$ y $f = 10 \text{ Hz}$, a una $c_{PAT}^* = 3,08 \times 10^{-4} \text{ M}$, donde se observa un incremento en la corriente de reducción,

en el electrodo modificado respecto del no modificado, como consecuencia del aumento en el área efectiva del electrodo.

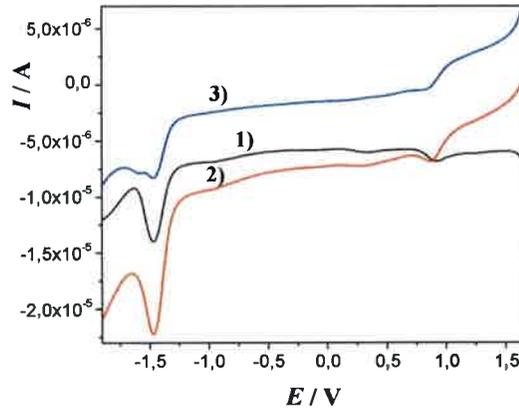


Figura 5.3.30. Voltamperograma de OC de PAT en ACN + 0,1 M PTBA. 1) I_p , 2) I_d y 3) I_i . $c_{PAT}^* = 3,08 \times 10^{-4} M$. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM.

En el caso del electrodo desnudo, se tiene que el $E_{p,c} = -1,543 V$ y para el electrodo modificado es de $E_{p,c} = -1,460 V$, (en ambos casos vs ECS), esto muestra un corrimiento en la dirección anódica del $E_{p,c}$ de $0,083 V$. La $I_{p,n}$ para la descarga de PAT en el electrodo desnudo, fue de $-4,51 \mu A$, mientras que con el electrodo modificado, $I_{p,n} = -5,59 \mu A$, es decir se produce un aumento en la $I_{p,n}$ del orden del 24 %.

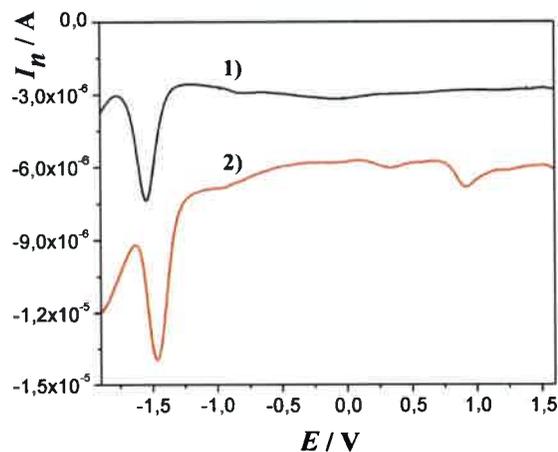


Figura 5.3.31. Voltamperogramas de OC de PAT en ACN + 0,1 M PTBA. $c_{PAT}^* = 3,08 \times 10^{-4} M$. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$, utilizando un electrodos de CV desnudo (1) y uno modificado con NTCPM (2).

Gráficos de la corriente de pico neta ($I_{p,n}$) vs c_{PAT}^* fueron lineales (Figura 5.3.32.), utilizando los parámetros de $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz. Se obtuvo una pendiente de $-(0,0175 \pm 0,0002)$ A M⁻¹ y $r = 0,9994$. El límite de detección calculado bajo estas condiciones, fue de $1,0 \times 10^{-6}$ M (154 ppb).

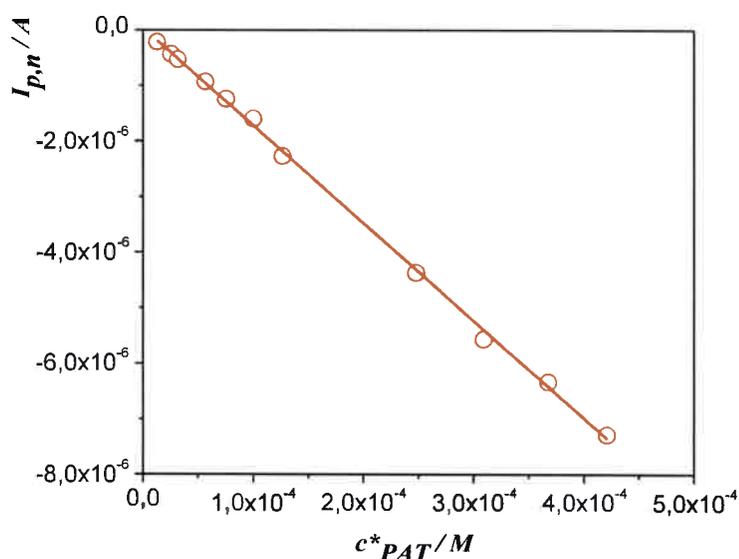


Figura 5.3.32. Gráfico del $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0,1 M PTBA, utilizando un electrodo de CV modificado con NTCPM.

Contrariamente a lo que se esperaba y, a pesar de las ventajas que, en principio, mostraron los electrodos modificados con NTCPM, se llegó a la conclusión de que a concentraciones bajas el electrodo de CV modificado con NTCPM no ofrece las mismas características que a altas concentraciones del analito.

Como ha quedado de manifiesto tras los estudios por VOC, a bajas concentraciones de analito, se puede observar que, por un lado se tiene una menor sensibilidad y, por otro lado, el límite de detección es más alto que cuando se utiliza un electrodo desnudo. Así, para este sistema en estudio, se puede decir que la modificación de la superficie del electrodo de trabajo con NTCPM no muestra una mejora respecto de los resultados obtenidos con el electrodo de CV desnudo.

5.3.4. Medio acetonitrilo / perclorato de tetrabutil amonio / ácido trifluoracético

5.3.4.1. Voltamperometría cíclica

De acuerdo al mecanismo de reducción propuesto por Wasicki y col. [55], la reducción polarográfica de PAT involucra la participación de H^+ . Por ello y con la finalidad de profundizar los estudios relacionados con este mecanismo, se estudió el efecto producido, sobre la respuesta voltamperométrica, del agregado de un ácido al medio de reacción.

Para ello se realizaron experiencias con agregados de diferentes alícuotas de ácido trifluoracético (ATFA), a partir se soluciones patrones y utilizando las mismas condiciones experimentales que las mencionadas durante las experiencias en medio neutro (ACN + 0,1 M PTBA). Se observó que, en presencia del ATFA, se producen marcados cambios sobre la respuesta voltamperométrica de PAT. En la Figura 5.3.33., se muestran voltamperogramas cíclicos de PAT a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ y con una $c_{PAT}^* = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$, tanto en ausencia, como en presencia de ATFA.

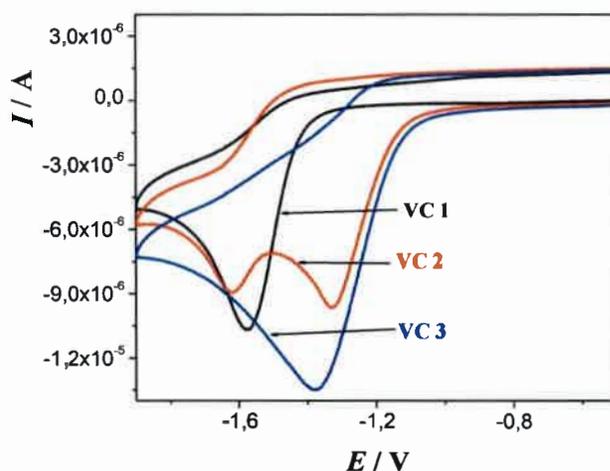


Figura 5.3.33. Voltamperogramas cíclicos de PAT, en ausencia de ATFA (VC 1) y en presencia del mismo (VC 2 y VC 3). $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, $c_{ATFA}^* = \text{VC 1: } 0 \text{ M, VC 2: } 3,90 \times 10^{-4} \text{ M, VC 3: } 7,8 \times 10^{-4} \text{ M. } v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 5.3.33., se puede observar cómo, el voltamperograma cíclico de PAT, en presencia de ATFA, comienza a desdoblarse en dos picos (VC 2) por el

agregado del ácido, hasta que, finalmente, cuando la concentración del ácido es aproximadamente el doble de la concentración de la micotoxina, se define nuevamente un único pico, que podría ser asignado a la descarga de PAT protonada (PATH^+) (VC 3), con un potencial de pico de reducción igual a $-1,385 \text{ V}$, es decir, aproximadamente $0,200 \text{ V}$ menos catódico que la descarga de PAT en ausencia del ácido. Por otra parte se puede observar un incremento en la señal de la corriente, lo que de hecho es beneficioso desde el punto de vista analítico, en el sentido, de permitir aumentar la sensibilidad y disminuir así el límite de detección.

En la Figura 5.3.34., se muestra la variación de $I_{p,c}$ de los voltamperogramas cíclicos de PAT y PATH^+ con el agregado de sucesivas alícuotas de ATFA. Claramente, se observa que, mientras la $I_{p,c}$ de PAT (●) disminuye hasta desaparecer, la $I_{p,c}$ de PATH^+ (■), aumenta hasta alcanzar un valor prácticamente constante cuando $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* \geq 2$.

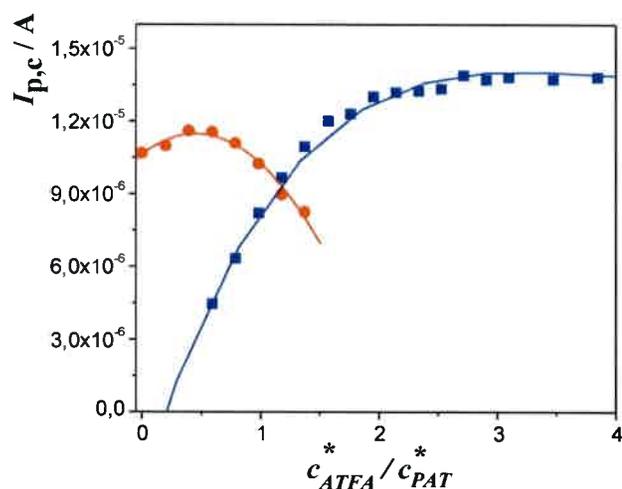


Figura 5.3.34. Variación de las $I_{p,c}$ en función de las distintas relaciones de las concentraciones de ATFA respecto a PAT. (●) PAT y (■) PATH^+ . $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 5.3.35., se muestran voltamperogramas cíclicos de PATH^+ a distintas velocidades de barrido de potencial, para una $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $c_{ATFA}^* = 1,08 \times 10^{-3} \text{ M}$ (proporción de concentraciones, $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$).

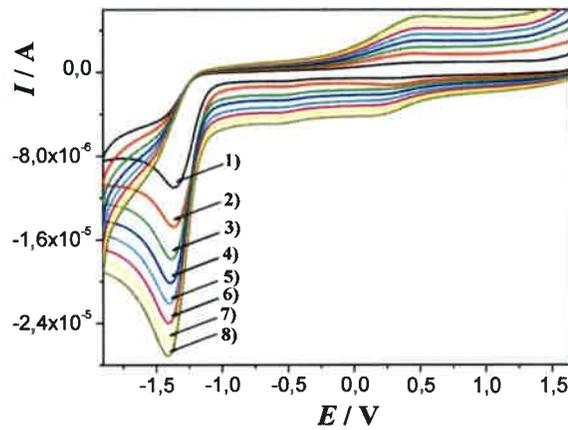


Figura 5.3.35. Voltamperogramas cíclicos para la reducción de $PATH^+$ a distintas velocidades de barrido del potencial, $v = 1) 0,025; 2) 0,050; 3) 0,075; 4) 0,100; 5) 0,125; 6) 0,150; 7) 0,175$ y $8) 0,200 V s^{-1}$.

Gráficos de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$ de $PATH^+$ fueron lineales, mostrando un control difusional para el proceso de electrodo, al igual que para PAT en el medio neutro (ACN + 0,1 M PTBA). En la Figura 5.3.36., se observan gráficas de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$ a distintas c_{PAT}^* y a una proporción de $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$, donde el pico de reducción de $PATH^+$ se encuentra bien definido.

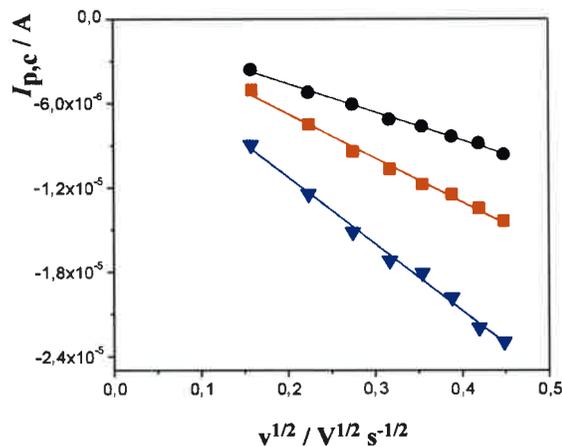


Figura 5.3.36. Dependencia de $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$, entre $v = 0,025$ a $0,200 V s^{-1}$, a tres concentraciones de PAT, c_{PAT}^* : (●) = $1,24 \times 10^{-4} M$; (■) = $2,40 \times 10^{-4} M$ y (▼) = $4,00 \times 10^{-4} M$. En todos los casos se utilizó la relación $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$.

5.3.4.2. Voltamperometría de onda cuadrada

En la Figura 5.3.37., se observan voltamperogramas de OC, donde se muestra el efecto de la acidez del medio sobre la descarga de PAT. En ausencia de ATFA se observa un único pico de reducción (VOC 1) centrado en $-1,560$ V, el cual comienza a desdoblarse cuando se agrega ATFA al medio de reacción (VOC 2) para, finalmente, colapsar en un único pico cuando la $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* \geq 2$ (VOC 3), con un $E_{p,n}$ de $-1,330$ V, es decir, $0,230$ V menos catódico respecto del pico de reducción en ausencia del ácido. A su vez, este corrimiento en el $E_{p,n}$, fue acompañado de un aumento en la $I_{p,n}$ para $PATH^+$.

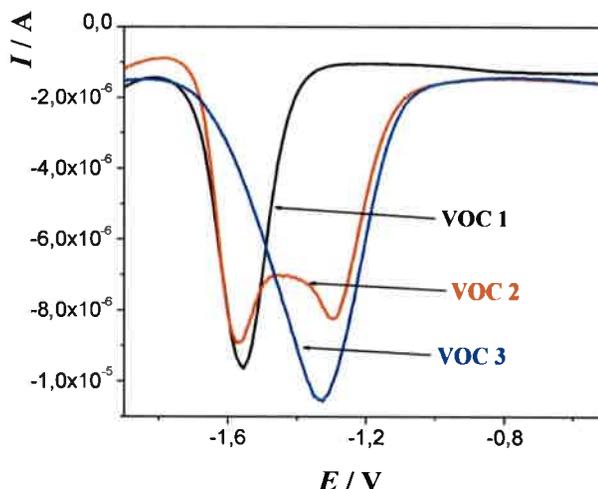


Figura 5.3.37. Voltamperogramas de OC de PAT, en ausencia de ATFA (VOC 1) y en presencia del mismo (VOC 2 y VOC 3), $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4}$ M, $c_{ATFA}^* = VC 1: 0$ M, VC 2: $3,90 \times 10^{-4}$ M, VC 3: $7,80 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

En la Figura 5.3.38., se puede observar como varían las $I_{p,n}$ para PAT y $PATH^+$ en función de la proporción de las concentraciones de ambos reactivos. Como se puede observar, mientras que la $I_{p,n}$ de PAT disminuye hasta desaparecer (●), la $I_{p,n}$ de $PATH^+$ se incrementa (■), permaneciendo prácticamente constante, cuando la proporción de las concentraciones de los reactivos es de $\geq 2,5$.

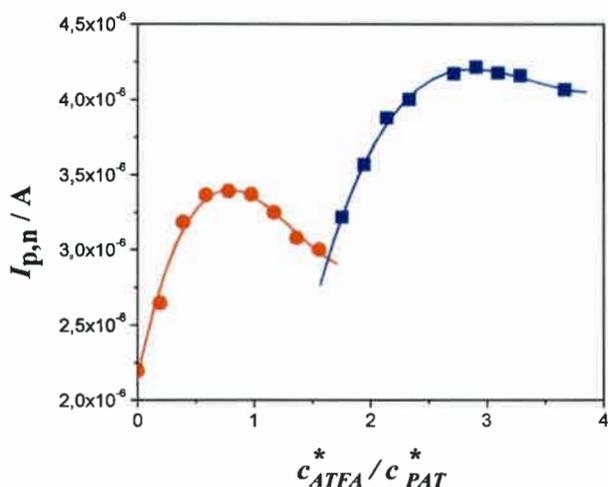


Figura 5.3.38. Variación de la $I_{p,n}$ en función de la relación de las concentraciones de ATFA y PAT. $c_{PAT}^* = 1,24 \times 10^{-4} \text{ M}$. (●) PAT y (■) $PATH^+$. $\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$ y $f = 10 \text{ Hz}$.

Al igual que en VC, los estudios realizados variando la frecuencia, indicaron un comportamiento lineal de $I_{p,n}$ con $f^{1/2}$, lo cual nuevamente indica que el proceso de electrodo está controlado por difusión. En la Figura 5.3.39., se muestran voltamperogramas de OC para una $c_{PAT}^* = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ a diferentes frecuencias en presencia del ATFA.

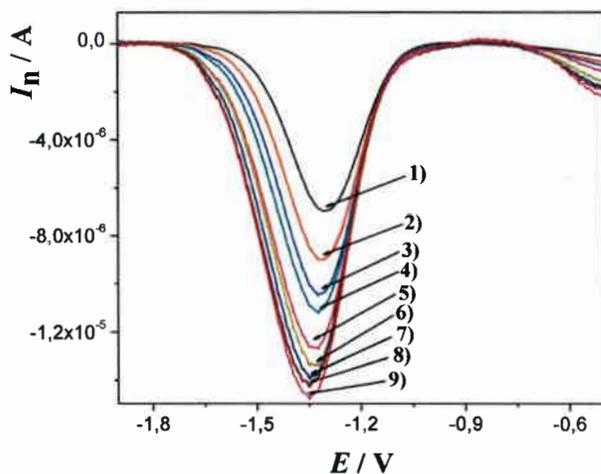


Figura 5.3.39. Voltamperogramas de OC de $PATH^+$ a distintas f : 1) 10; 2) 20; 3) 30; 4) 40; 5) 60; 6) 70; 7) 80; 8) 90; 9) 100 Hz. $c_{PAT}^* = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$. $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$.
 $\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}$ y $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$.

En la Figura 5.3.40., se muestra la variación de la $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$, a partir de los datos de la Figura 5.3.39.

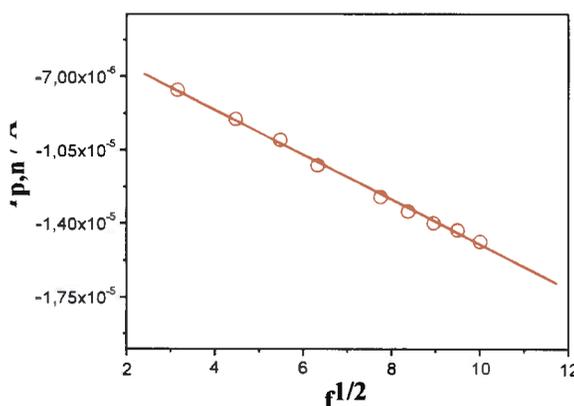


Figura 5.3.40. Variación de la $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$, $c_{PAT}^* = 4 \times 10^{-4} M$. $c_{ATFA}^* / c_{PAT}^* = 2,7$.

Con el objetivo de comprobar la utilidad analítica del agregado de un ácido al medio de reacción, se construyó una curva de calibración con una cantidad fija de ATFA, de modo que siempre existiera una cantidad de ácido en exceso para cada agregado de PAT y así se obtuvo una notable mejora en la determinación electroanalítica de PAT.

En la Figura 5.3.41., se puede observar la curva de calibración con una $c_{ATFA}^* = 1,5 \times 10^{-5} M$. Se encontró que la $I_{p,n}$ fue lineal con c_{PAT}^* , en el intervalo de concentraciones analizado (entre 1×10^{-7} a $3 \times 10^{-6} M$), con un $r = 0,9954$ y una sensibilidad de $-(0,041 \pm 0,001) A M^{-1}$, la cual fue 1,2 veces mayor que la obtenida en ausencia de ATFA. A $c_{PAT}^* < 8 \times 10^{-7} M$, la curva de calibración se aparta de la linealidad, pero no obstante permite la determinación de PAT.

Aunque la sensibilidad no fue mucho mayor que aquella en ausencia de ácido, el límite de detección determinado bajo estas condiciones experimentales para una relación señal/ruido de 3:1 fue de $2,98 \times 10^{-7} M$ (45,3 ppb). De modo que, con el agregado de ATFA al medio de reacción, se pudo obtener una mejora en el límite de detección de la técnica, siendo aproximadamente un 40 % más pequeño que el obtenido bajo las mismas condiciones experimentales en ausencia del ATFA.

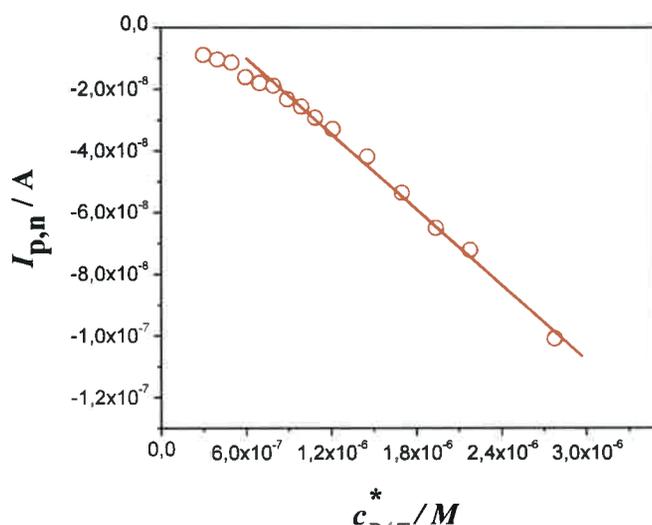


Figura 5.3.41. Gráfico del $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en medio ACN + 0.1 M PTBA + $1,5 \times 10^{-5}$ M de ATFA.

$$\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}, \Delta E_e = 0,005 \text{ V}, f = 10 \text{ Hz}.$$

5.4. Estudios sobre el electrodo de referencia

En el ítem 4.2.2., se mencionó que cuando se realizan medidas durante períodos de tiempo largos, es conveniente reemplazar la celda de tres cuerpos que se venía utilizando de manera habitual, por otra, en cuya configuración el electrodo de referencia es colocado en un compartimiento aparte, un tubo de vidrio en forma de U, que retiene por más tiempo aquellos componentes del calomel que pudiesen contaminar la celda, luego de transcurrido algún tiempo. Dentro de estos componentes, se encuentran el KNO_3 (la sal que realiza la conducción en el puente salino de agar-agar), el KCl y el agua, estos últimos forman la solución de KCl saturada del electrodo de calomel saturado. El K^+ de las sales mencionadas, forma productos insolubles cuando se combina con los aniones del electrolito soporte de la celda, ya sea con el perclorato o en menor medida, con el hexafluorofosfato, pero la presencia de estas sales, visibles a la vista en la punta del puente salino, no causan mayores inconvenientes. En cambio, el agua si lo hace, ya que podría tener implicancias en el mecanismo de reducción de PAT.

Para estudiar el efecto del agua en la reducción de PAT en medio neutro, se realizaron experiencias agregando alícuotas de agua de calidad HPLC, a la solución de ACN + 0,1 M PTBA, utilizando el electrodo de CV desnudo y pulido con alúminas.

En la Figura 5.4.1., se muestra, que el agregado de 400 μL de agua a una solución de 8 mL de ACN + 0,1 M PTBA no causa cambios apreciables en la forma de los voltamperogramas cíclicos.

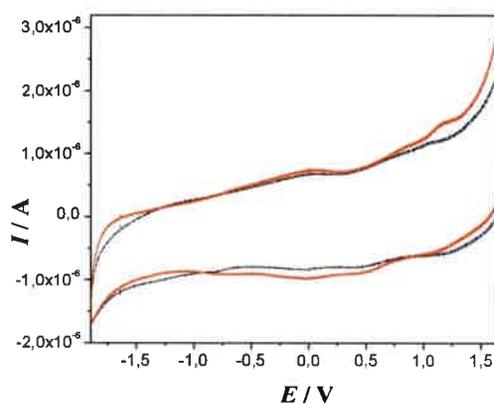


Figura 5.4.1. Voltamperogramas cíclicos de una solución de ACN + 0,1 M PTBA (—) y otra idéntica + 400 μL de agua (----). $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 5.4.2., se observa el efecto de los agregados de agua a una solución de 8 mL de ACN + 0,1 M PTBA + $1,24 \times 10^{-4}$ M PAT. Como se puede observar, con sólo 80 μL de agua (el 1 % del volumen del electrolito soporte en la celda), el pico de reducción de PAT se desdobra y se corre 0,050 V hacia potenciales más catódicos.

Los agregados posteriores de agua muestran efectos más marcados en la forma de los voltamperogramas y ponen de manifiesto que para obtener medidas confiables de los $E_{p,c}$ de PAT se debe evitar la contaminación de la celda con agua.

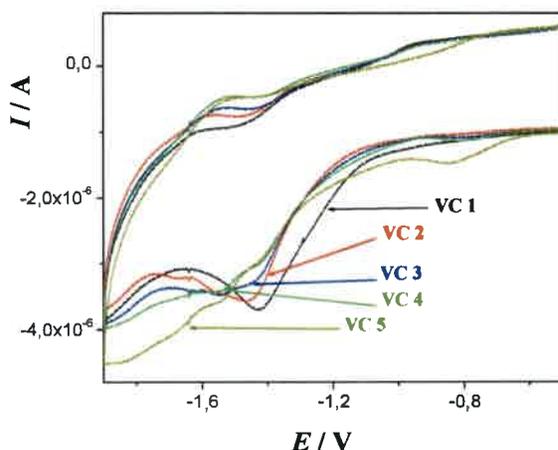


Figura 5.4.2. Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M PTBA (VC 1) donde se muestra la influencia de los agregados de agua en la reducción de PAT en este medio.

$$c_{PAT}^* = 1,24 \times 10^{-4} \text{ M. VC 2 = con } 80 \mu\text{l; VC 3= con } 100 \mu\text{l, VC 4= con } 300 \mu\text{l, VC 5= con } 400 \mu\text{l de agua. } v = 0,050 \text{ V s}^{-1}.$$

Teniendo estos hechos en consideración, se realizaron pruebas cambiando el electrodo de referencia de calomel saturado, por un electrodo de pseudo-referencia de plata, para de esta forma evitar el tener que utilizar la configuración de celda alternativa, ya que al colocar el electrodo de referencia más lejos del capilar de Luggin, se produce una caída óhmica adicional, debido al aumento de la resistencia de la celda. Cabe aclarar que, en última instancia, éste no es un inconveniente, ya que los potenciostatos utilizados en esta Tesis, cuentan con sistemas de realimentación positivos que permiten determinar la resistencia de la celda y realizar la corrección por la caída óhmica apropiada.

La utilización de un electrodo de pseudo-referencia, requiere de la utilización de una cupla redox que tenga un comportamiento estable y reproducible, debido a que las medidas de potencial del analito en estudio (PAT), se realizan tomando como referencia el potencial de aquella cupla redox elegida. En este caso, como el medio es ACN, se utiliza la cupla redox ferroceno/ferrocenio (Fc/Fc^+), debido a que este compuesto, aparte de ser soluble en ACN, posee un mecanismo redox bien documentado en la literatura. Ferroceno, al ser oxidado, origina un catión estable, llamado ferrocenio (Fc^+), el cual puede ser reducido y regenerar el sustrato de partida, en un proceso que involucra el intercambio de un electrón y su proceso de electrodo está controlado por difusión (con un $D_{\text{Fc}} = 2,26 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, en ACN + 0,1 M PTEA a una $T = 293 \text{ K}$) [85].

En la Figura 5.4.3., se muestran voltamperogramas cíclicos utilizando un electrodo de pseudo-referencia de plata. Se observa la cupla redox Fc/Fc^+ ($c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4} M$) a alrededor de 0,50 V y la descarga de PAT ($c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4} M$) a alrededor de -1,30 V, $v = 0,050 V s^{-1}$.

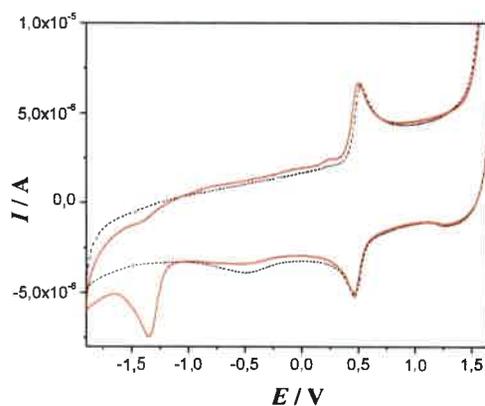


Figura 5.4.3. Voltamperogramas cíclicos utilizando un electrodo de pseudo-referencia de plata

en ACN + 0,1 M HTBA de Fc (---) y Fc + PAT (—). $c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4} M$ y

$$c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4} M. v = 0,050 V s^{-1}.$$

En la Figura 5.4.4., se muestran 4 voltamperogramas cíclicos (VC) consecutivos, $c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4} M$, $c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4} M$ a una $v = 0,050 V s^{-1}$, todos ellos comenzando en 1,65 V, con 60 s de espera en dicho potencial. Como se puede ver, no se producen cambios en la cupla Fc/Fc^+ pero si en el pico de reducción de PAT, ya que su potencial, tras los ciclos sucesivos se corre paulatinamente hacia potenciales más catódicos.

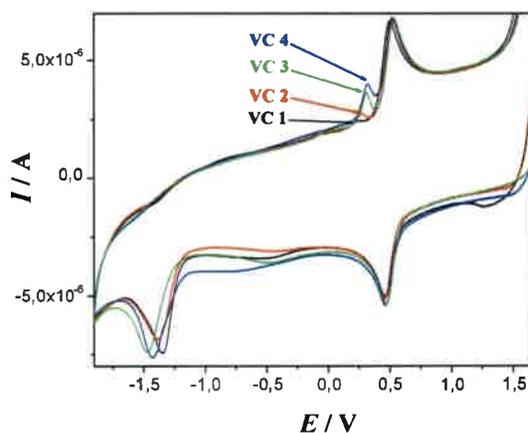


Figura 5.4.4. Voltamperogramas cíclicos consecutivos en ACN + 0,1 M HTBA, $c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4}$ M y $c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4}$ M. VC 1: primer barrido, VC 2: segundo barrido, VC 3: tercer barrido, 4) cuarto barrido de potencial. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

Además, es interesante destacar la aparición de un pre-pico previo a la oxidación de ferroceno, el cual se debería a la reacción de los productos de reducción de PAT con, presumiblemente, el ferroceno. Si los voltamperogramas cíclicos se realizan comenzando desde -0,50 V, con 10 s de espera en ese potencial, de allí a 1,50 V, luego hasta -2,00 V y de vuelta a 1,50 V, se puede observar claramente la asociación que hay entre la aparición de ese pre-pico, previo a la oxidación de ferroceno, con la descarga de PAT.

En la Figura 5.4.5., se muestran voltamperogramas cíclicos, a distintas v utilizando el procedimiento antes descrito. Como se puede observar, en la primera porción del barrido anódico, no aparece el pre-pico previo a la oxidación de ferroceno, pero luego de la descarga de PAT si lo hace, y su forma concuerda con los picos de una especie adsorbida sobre la superficie del electrodo [65].

Con estos resultados, queda claro que la utilización de un electrodo de pseudo-referencia y, al menos, con ferroceno como cupla redox interna, no es posible en nuestro sistema, ya que los productos de reducción de PAT reaccionan con el ferroceno y que el compuesto formado se adsorbería sobre la superficie del electrodo, posiblemente causando cambios en sus propiedades electrocatalíticas y llevando a que el $E_{p,c}$ de reducción de PAT se corra paulatinamente hacia valores más catódicos.

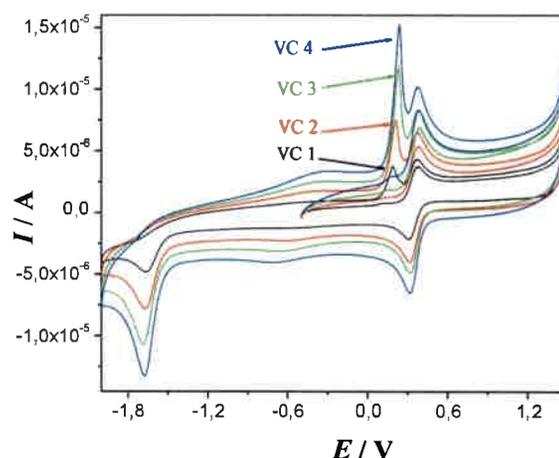


Figura 5.4.5. Voltamperogramas cíclicos a distintas v en $ACN + 0,1 M HTBA$, $c_{Fc}^* = 1,75 \times 10^{-4} M$ y $c_{PAT}^* = 2,06 \times 10^{-4} M$. $v = VC 1: 0,025$; $VC 2: 0,050$; $VC 3: 0,075$; $VC 4: 0,100 V s^{-1}$.

5.5. Análisis de los productos de reducción de patulina

El análisis espectrofotométrico de los productos de reducción de PAT, fue realizado tomando espectros anteriores y posteriores a las electrólisis a potencial controlado la cual fue realizada utilizando una $c_{PAT}^* = 3,47 \times 10^{-4} M$ (el volumen de solución en la celda fue de 28 ml). En la Figura 5.5.1., se pueden observar espectros UV-vis de PAT tomados antes y después de realizar las experiencias de electrólisis a potencial controlado. Para ello se tomaron 500 μl de solución de la celda electroquímica y se diluyeron hasta 5 ml en un matraz de vidrio. Como se puede ver, el/los producto/s de reducción, poseen una máximo de absorbancia en 277 nm, mientras que el de PAT es en 275 nm, es decir que la estructura del cromóforo de PAT, no se altera apreciablemente durante la reducción electroquímica de esta molécula.

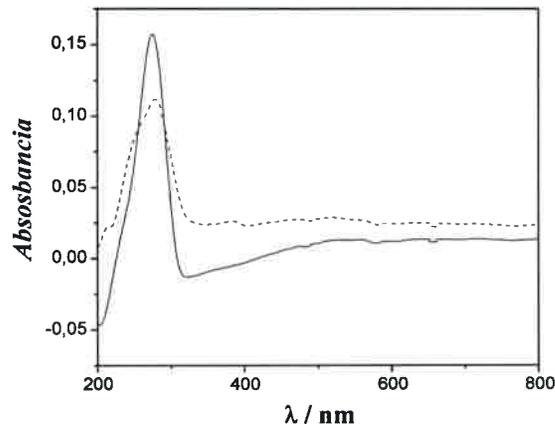


Figura 5.5.1. Espectros de absorción UV-vis, previo (—) y posterior (----) a las electrólisis a potencial controlado. $c_{PAT}^* = 3,47 \times 10^{-5} M$.

También, se realizaron espectros infrarrojos (IR) a los productos de reducción luego de las EPC. En las Figuras 5.5.2., y 5.5.3., se pueden observar las zonas de interés en los espectros IR, previo y posterior a las electrólisis a potencial controlado. En la Figura 5.5.2., se observa la zona del espectro IR, correspondiente a la absorción de los grupos carbonilo, el cual se corresponde con el ubicado en el anillo de la lactona y se puede ver que permanece, en principio, sin alterarse luego de realizada la electrólisis a potencial controlado.

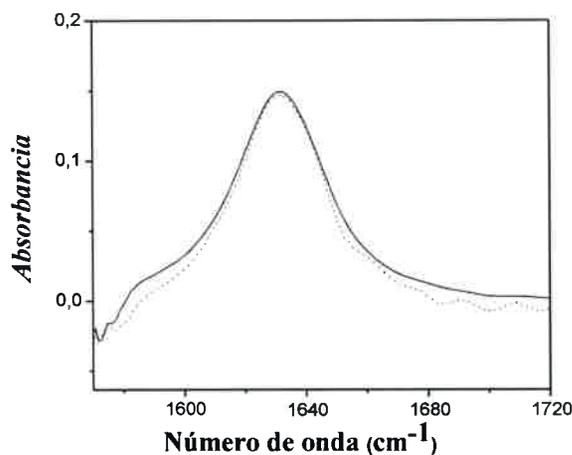


Figura 5.5.2. Espectros IR, previo (—) y posterior a la electrólisis a potencial controlado (----) en la zona de absorción de los grupos carbonilo.

Por otro lado, cuando se analiza el espectro IR, en la zona que corresponde a la absorción de los grupos hidroxilo, como se puede observar en la Figura 5.5.3., no se observa ningún cambio, luego de finalizada la electrólisis a potencial controlado.

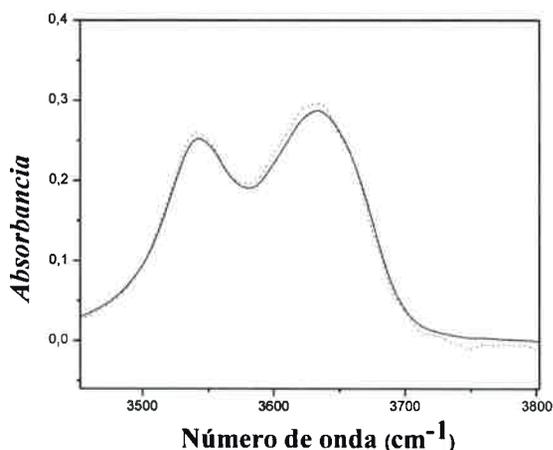


Figura 5.5.3. Espectros IR, previo (—) y posterior (---) a la electrólisis a potencial controlado en la zona de absorción de los grupos hidroxilo.

5.6. Estudios electroquímicos de 5-hidroximetilfurfural

Con el objetivo de poder implementar una metodología electroanalítica para la detección de PAT en productos derivados de manzanas, es que se comenzó a estudiar también el comportamiento electroquímico de uno de sus principales interferentes en las matrices reales, como lo es el 5-hidroximetilfurfural (HMF). Este compuesto es considerado un importante indicador del deterioro en diversos alimentos, el cual, se forma por deshidratación de pentosas, en medios de bajos valores de pH o a altas temperaturas [86]. Se forma a través de la reacción de Maillard, la cual puede ocurrir durante el procesamiento (particularmente a altas temperaturas) y/o el almacenamiento de los jugos de manzana, ya que estos son ricos en carbohidratos y aminoácidos [23, 87] y generalmente, su concentración suele ser mayor que la de PAT [17].

Este compuesto, es extraído de las matrices reales junto con PAT, y se encuentra en los extractos de acetato de etilo, que es el solvente utilizado en la extracción. En la bibliografía se lo cita como un interferente habitual en HPLC [23, 86, 88] y también ha sido informado en un estudio previo sobre el comportamiento polarográfico de PAT [55].

Un análisis exhaustivo de la bibliografía publicada en las últimas décadas muestra un solo trabajo referido a la reducción electroquímica de HMF y su aplicación en el análisis de muestras de miel [89].

La estructura química de HMF se muestra en la Figura 79.

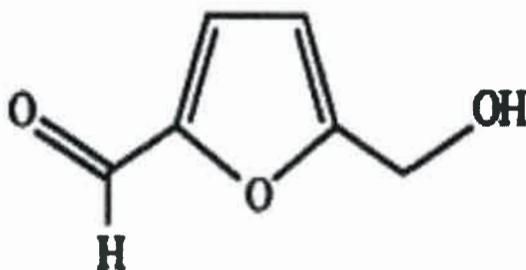


Figura 5.6.1. Estructura química de 5-hidroximetilfurfural.

Cabe destacar, que el contenido de HMF en algunos alimentos como la miel, se encuentra legislado en muchos países. Su contenido es nulo en la miel fresca, pero tiende a elevarse conforme el producto envejece alcanzando niveles de algunos decimos de mg Kg^{-1} , en función de los bajos valores de pH, el origen botánico, el contenido de humedad y del estrés térmico y/o fotoquímico [90]. Por ejemplo, en el *Codex Alimentarius*, de la Organización Mundial de la Salud [91] y en la Unión Europea [92] se ha establecido un nivel máximo de HMF en miel de 40 mg L^{-1} (40 ppm), como un indicador de deterioro y de tratamiento térmico. Por otro lado, HMF es reconocido como un indicador de deterioro en muchos alimentos [93], entre ellos, los jugos de manzana y sus productos derivados [23]. La Federación Internacional de Procesadores de Jugos de Fruta (IFFJP) recomienda una concentración máxima de entre $5 \text{ y } 10 \text{ mg L}^{-1}$ (5 y 10 ppm) de HMF en jugos de fruta y de 25 mg L^{-1} (25 ppm) en jugos de fruta concentrados [94].

Debido a lo mencionado se procedió a estudiar algunas propiedades de HMF en los mismos medios de reacción utilizados en la determinación de PAT, ya que en lo sucesivo de esta Tesis, se pretende probar la determinación de PAT en matrices reales, es decir aquellas derivadas de las extracciones de jugos de manzana con acetato de etilo.

5.6.1. Voltamperometría cíclica del 5-hidroximetilfurfural

El HMF se analizó empleando las mismas condiciones experimentales con las que, oportunamente, se estudió el comportamiento electroquímico de PAT. Se pudo observar que se reduce de manera irreversible con un $E_{p,c}$ de $-1,875$ V vs ECS, cuando el barrido de potencial se inicia desde $1,650$ V hasta $-2,250$ V. Los voltamperogramas cíclicos fueron reproducibles cuando se aplicó un tiempo de espera de 30 s en $1,650$ V, previo a iniciar el barrido de potencial. En la Figura 5.6.2., se muestran voltamperogramas cíclicos de HMF realizados a una $v = 0,050$ V s^{-1} y a distintas concentraciones del mismo.

Como se muestra en dicha Figura, no se observa el pico de oxidación complementario al invertir la dirección del barrido de potencial, poniendo en evidencia un mecanismo de reducción de HMF complejo, con reacción/es química/s y/o electroquímicas acoplada/s a la transferencia de carga inicial, semejante a lo observado para PAT.

Estudios realizados a distintas v muestran una dependencia lineal de las $I_{p,c}$ con $v^{1/2}$, indicando que el proceso de electrodo estaría controlado por difusión.

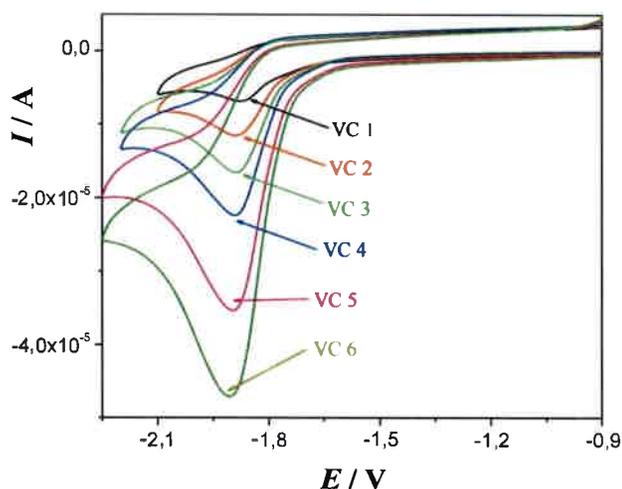


Figura 5.6.2. Voltamperogramas cíclicos para la reducción de HMF en ACN + 0,1 M PTBA a distintas concentraciones. c_{HMF}^* : VC 1 = 3,40; VC 2 = 6,77; VC 3 = 10,10; VC 4 = 13,40; VC 5 = 20,00; VC 6 = $23,20 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s^{-1} .

Se encontró una correlación lineal entre la $I_{p,c}$ vs c_{HMF}^* , en el intervalo estudiado ($3,4 \times 10^{-4}$ M a $2,3 \times 10^{-3}$ M), tal como se puede ver en la Figura 5.6.3. A partir del valor de la pendiente, la sensibilidad de la técnica fue de: $-(0,0186 \pm 0,0009)$ A M⁻¹, con un $r = 0,9954$.

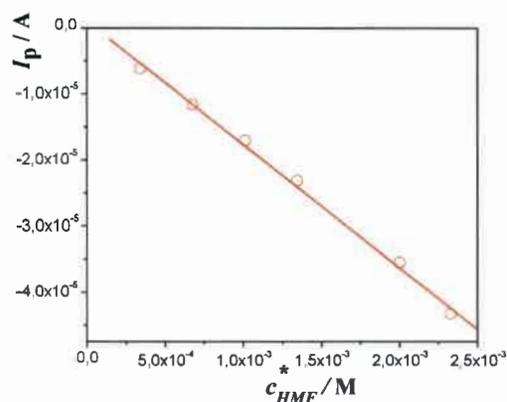


Figura 5.6.3. Gráfico de la $I_{p,c}$ vs c_{HMF}^* en medio ACN + 0.1 M de PTBA. $v = 0,050$ V s⁻¹.

Posteriormente, se realizaron experiencias en medios que contenían una cantidad fija de PAT y con agregados de distintas alícuotas de HMF al medio. Se pudo comprobar que el agregado del HMF no interfiere en la determinación de la micotoxina obteniéndose una buena separación entre los picos ($\approx 0,325$ V), tal como se puede observar en la Figura 5.6.4., en la cual la concentración de HMF es de 2,4 veces mayor que la de PAT.

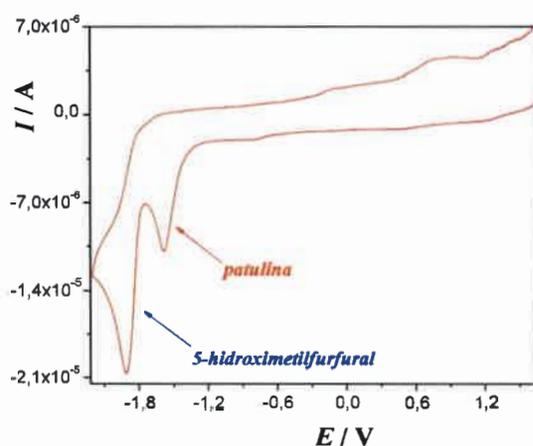


Figura 5.6.4. Voltamperograma cíclico de una mezcla de PAT + HMF, en medio ACN + 0,1 M PTBA, $c_{HMF}^* = 9,81 \times 10^{-4}$ M, $c_{PAT}^* = 4,03 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹.

5.6.2. Voltamperometría de onda cuadrada de 5-hidroximetilfurfural

En la Figura 5.6.5., se muestran los registros de las corrientes directa (I_d), inversa (I_i) y neta (I_n) de un voltamperograma de OC obtenido para HMF sobre un electrodo de CV, donde se observa que el HMF se reduce con un $E_{p,c}$ de -1,850 V, siendo los voltamperogramas reproducibles, si el barrido de potencial se inicia en 1,650 V, con un tiempo de espera de 30 s en dicho potencial. Estos registros ponen también en evidencia un mecanismo de reacción complicado por reacción/es química/s y/o electroquímicas acopladas a la transferencia de carga inicial.

Estudios con la f mostraron un comportamiento lineal de $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$, indicando nuevamente, que el proceso de electrodo estaría controlado por difusión.

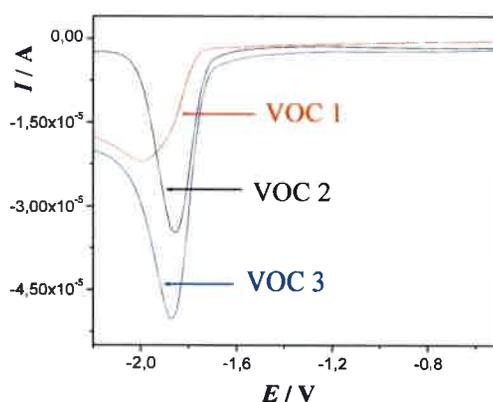


Figura 5.6.5. Voltamperograma de OC de HMF en ACN + 0,1 M PTBA. $c_{HMF}^* = 2,3 \times 10^{-3}$ M.

VOC 1: I_n , VOC 2: I_i , VOC 3: I_d . $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

Con el objetivo de comprobar que los picos de ambos compuestos se resuelven correctamente, se realizaron agregados de alícuotas de HMF al medio de reacción conteniendo una cantidad fija de PAT. Se puede observar en la Figura 5.6.6., que la separación de los picos es muy buena, de $\approx 0,325$ V, siendo la concentración de HMF de 2,4 veces mayor que la de PAT (indicadas en el inserto de la Figura), lo cual resulta de interés para una posible identificación simultánea, en el futuro, de estas dos moléculas en matrices reales.

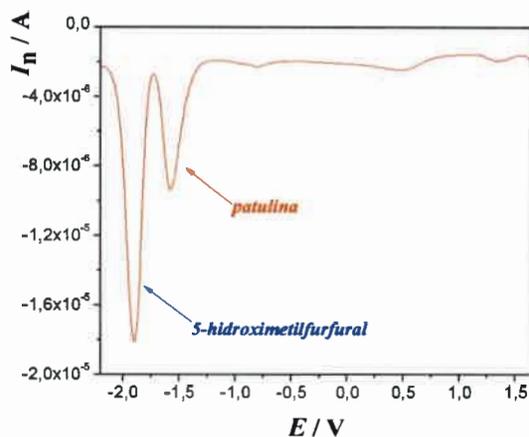


Figura 5.6.6. Voltamperograma de OC de PAT y HMF, en medio ACN + 0.1 M de PTBA.

$$c_{HMF}^* = 9,81 \times 10^{-4} \text{ M}, c_{PAT}^* = 4,03 \times 10^{-4} \text{ M}. \Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}, \Delta E_e = 0,005 \text{ V y } f = 10 \text{ Hz}.$$

5.7. Medidas en soluciones acuosas

A fin de obtener mejoras en cuanto a la determinación analítica de PAT y también para conocer más acerca del mecanismo de reducción electroquímica de esta micotoxina, se realizaron medidas utilizando como solvente el agua.

5.7.1. Medidas en agua / perclorato de sodio

A partir de las medidas realizadas en ACN quedó claramente demostrada la importancia que tiene, en la descarga de PAT, la incorporación de un ácido al medio de reacción. En dichas medidas, el ácido utilizado fue el ácido trifluoracético (ATFA), debido a que este compuesto es compatible con el medio utilizado. En los experimentos que se describen a continuación, se comenzó el estudio utilizando, primero, agua de calidad HPLC + 0,1 M NaClO₄ como electrolito soporte y para acidificar este medio, se realizaron agregados de ácido perclórico (HClO₄).

Por otro lado, el electrodo de trabajo fue tratado previamente en NaOH 0,1 M, a partir del método descrito por Anjo y col. [82]. En la Figura 5.7.1., se muestra una respuesta típica de este procedimiento de activación, en la cual se realiza una oxidación durante 600 s a un potencial de 1,2 V. Durante este tratamiento, básicamente, se producen sobre la superficie del electrodo, dos efectos, uno es la limpieza del mismo y el otro es la formación de una capa de óxido de grafito que contiene diferentes grupos

fenólicos, carbonilos y carboxilos [95]. Este procedimiento permite obtener una superficie de electrodo reproducible durante las medidas en medio acuoso.

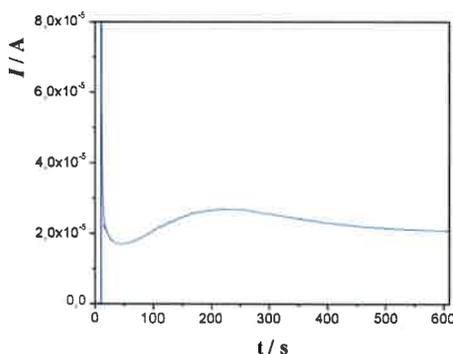


Figura 5.7.1. Activación del electrodo de CV, por oxidación en medio básico.

$$E_{aplc.} = 1,2 \text{ V durante } 600 \text{ s.}$$

En la Figura 5.7.2., se pueden observar dos voltamperogramas cíclicos, donde se comparan el obtenido en una solución blanco (solución acuosa de $0,1 \text{ M NaClO}_4$) y, aquel obtenido luego de incorporar a la celda una alícuota de PAT, tal que la c_{PAT}^* es de $2,43 \times 10^{-4} \text{ M}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. La ventana de potenciales utilizadas en estos estudios es más pequeña que cuando se utiliza ACN, debido a la descarga del solvente, es decir, hacia potenciales catódicos, el agua es reducida llevando al desprendimiento de hidrógeno y, a potenciales anódicos, el agua es oxidada produciendo el desprendimiento de oxígeno. Los voltamperogramas cíclicos y de onda cuadrada son iniciados en $1,4 \text{ V}$, con un tiempo de espera de 60 s en dicho potencial. Al igual que en ACN, las soluciones de trabajo son desgasadas, para impedir la reducción del oxígeno, pero en medio acuoso, el desgasado puede ser realizado con argón o bien con nitrógeno, siendo que en ACN, sino se utilizaba argón no se conseguía eliminar por completo el oxígeno de la celda.

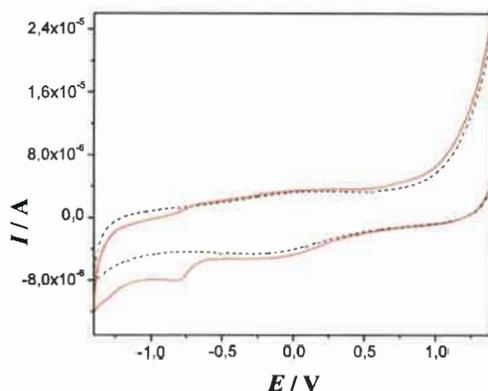


Figura 5.7.2. Voltamperogramas cíclicos de PAT en agua + 0,1 M NaClO₄ (—), $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$ y su respectivo blanco (----). $v = 0,050 V s^{-1}$.

En la Figura 5.7.2., se puede observar que, bajo estas condiciones, la descarga de PAT se desdobra en dos picos, uno ubicado en -0,81 V y el otro en -1,28 V vs ECS, los cuales presumiblemente corresponderían, a dos especies de PAT, determinadas por el grupo hemiacetálico en su estructura química.

Este fenómeno se puede observar mejor cuando se registran voltamperogramas de OC, tal como se muestra en la Figura 5.7.3., utilizando los parámetros de $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$, donde se comparan el obtenido en la solución blanco y aquel obtenido tras el agregado de PAT. Con esta técnica se puede ver que la descarga de PAT, al igual que en VC, presenta dos picos, uno a -0,78 V y el otro a -1,3 V vs ECS.

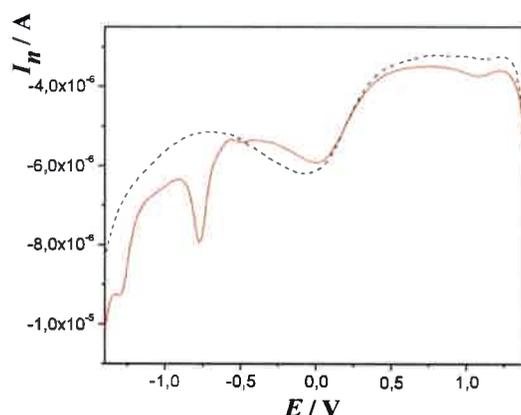


Figura 5.7.3. Voltamperogramas de OC de PAT en agua + 0,1 M NaClO₄ (—), $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M y su respectivo blanco (---).
Parámetros de OC: $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

Luego, para observar el efecto que tiene el aumento de la acidez del medio en la descarga de PAT, se realizaron agregados de ácido perclórico. En la Figura 5.7.4., se puede observar que cuando comienza a aumentar la acidez del medio, el pico más anódico de PAT desaparece y se define un único pico a un potencial de alrededor de -1,21 V.

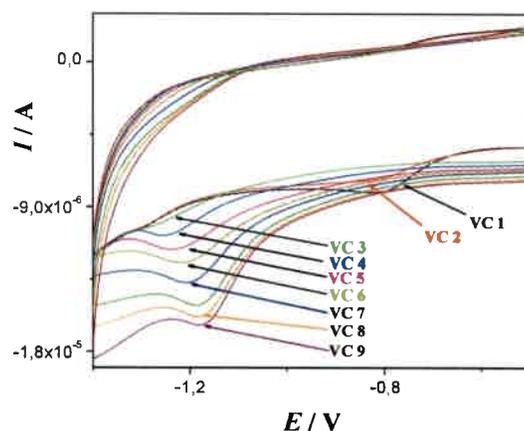


Figura 5.7.4. Voltamperogramas cíclicos de PAT en agua + 0,1 M NaClO₄ + agregados de HClO₄. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $c_{HClO_4}^*$: VC 1 = 0, VC 2 = 0,21; VC 3 = 0,68; VC 4 = 1,35; VC 5 = 1,91; VC 6 = 2,46; VC 7 = 3,11; VC 8 = 4,18; VC 9 = 4,82; VC 10 = $5,86 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹.

En la Figura 5.7.5., puede verse el efecto producido por el aumento en la acidez del medio utilizando VOC.

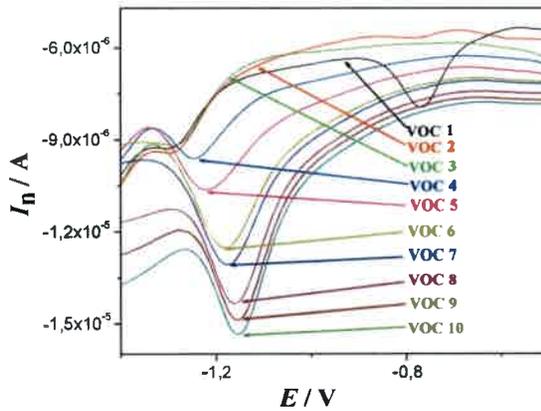


Figura 5.7.5 Voltamperogramas de OC de PAT en agua + 0,1 M NaClO₄ + agregados de

HClO₄. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $c_{HClO_4}^*$: VOC 1 = 0, VOC 2 = 0,21; VOC 3 = 0,68;

VOC 4 = 1,35; VOC 5 = 1,91; VOC 6 = 2,46; VOC 7 = 3,11; VOC 8 = 4,18;

VOC 9 = 4,82; VOC 10 = $5,86 \times 10^{-4}$ M.

Parámetros de OC, $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

Una hipótesis que explicaría este comportamiento, está basada en el equilibrio que existe en solución entre las formas neutras (PAT) y protonadas (PATH⁺) de la molécula.

5.7.2. Medidas en soluciones reguladoras de fosfato

Continuando los estudios en soluciones acuosas, se decidió utilizar soluciones reguladoras, con el objetivo de tener un control más preciso del pH del medio. El sistema elegido fue soluciones reguladoras de fosfato (0,1 M), por la simpleza de su preparación y porque el intervalo de pH en que pueden ser preparadas resulta de utilidad para nuestro sistema en estudio.

Dentro del intervalo de pH en el que se quiere estudiar la reducción de PAT, se debe tener en cuenta que esta micotoxina es inestable en soluciones alcalinas, esto significa, que en soluciones ácidas, retiene su actividad antibiótica o mantiene su integridad estructural, mientras que en soluciones alcalinas, las pierde. Por ejemplo,

PAT es estable durante varias semanas, reteniendo su actividad antibiótica, en el intervalo de pH de 3,3 a 6,3, pero pierde lentamente esa actividad a pH 6,8 [96].

Brackett y Marth [97] estudiaron la estabilidad de PAT utilizando soluciones reguladoras de fosfato entre los valores de pH de 6,0 a 8,0 a 25 °C. Cuando el porcentaje de PAT remanente fue graficado versus el tiempo de reacción, se obtuvo que la velocidad de la reacción para la desaparición de PAT era de primer orden. Las constantes de velocidad para la desaparición de PAT están en el intervalo de $5,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 6,0 y $1,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ a pH 8,0. Los valores de vida media obtenidos fueron de 1310 h a pH 6,0 y 64 h a pH 8,0. Por otro lado, en un estudio más reciente, Drusch y col. [98], investigaron la estabilidad de PAT a diferentes valores de pH, en solución reguladora de McIlvaine (ácido cítrico + Na_2HPO_4), en el intervalo de 2,5 a 7,0. Como se puede observar en la Figura 5.7.6., en el intervalo de pH de 2,5 a 5,5, luego de 30 días, todavía se encuentra presente en las muestras, entre el 69 y el 73 % de la concentración inicial de PAT, mientras que a pH neutro, la disminución en la concentración inicial de PAT es más pronunciada, quedando un 36 % al final de período.

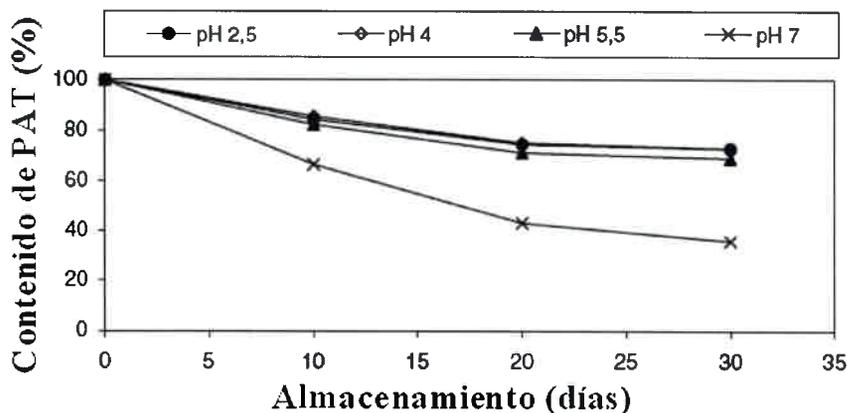


Figura 5.7.6. Influencia de los valores de pH, en la estabilidad de PAT, en solución buffer McIlvaine.

Teniendo en cuenta la bibliografía mencionada, PAT fue analizada entre los valores de pH comprendidos entre 4,0 y 7,5 ya que a valores más altos se corre el riesgo de que PAT sea destruida y a valores más bajos la descarga del solvente por desprendimiento de hidrógeno disminuye la ventana de potenciales de trabajo.

Las soluciones reguladoras estudiadas fueron, 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 y 7,5 a una concentración de 0,1 M, obtenidos por combinación de las sales de K_2HPO_4 y NaH_2PO_4 y ajustados a sus respectivos valores de pH por el agregado de soluciones diluidas de NaOH o $HClO_4$, según el caso. Las experiencias fueron realizadas en medios libres de oxígeno y, los barridos de potencial fueron realizados entre 1,4 y -1,4 V, con 30 s de espera en 1,4 V antes de iniciar los barridos de potencial, ya sea por VC o VOC.

5.7.2.1. Efecto de la activación del electrodo de trabajo en medio básico

Un ejemplo de las diferencias entre el electrodo activado en medio básico y el electrodo sin tratar se muestra en la Figura 5.7.7., en la cual se observan dos voltamperogramas cíclicos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6,0 a una v de $0,050 V s^{-1}$.

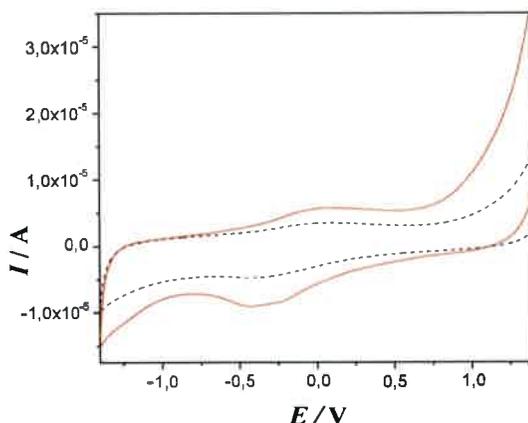


Figura 5.7.7. Voltamperogramas cíclicos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6, de los electrodos de CV activado (—) y sin activar (----) en medio básico. $v = 0,05 V s^{-1}$.

Como se puede observar en los voltamperogramas cíclicos de la Figura 5.7.7., se producen varios efectos luego del tratamiento por este método. Primero, se produce un aumento de la corriente capacitiva, dado que la formación del film de óxido de grafito produce un ligero aumento en el área electroquímica del electrodo. Segundo, se produce un efecto electrocatalítico que lleva a que el solvente se descargue antes, tanto a potenciales catódicos como anódicos y, por último, se acentúa la descarga del sistema de quinonas generadas sobre la superficie del electrodo de CV.

En la descarga de PAT también se encontraron diferencias, esto puede observarse en la Figura 5.7.8., en donde se muestran, a modo de ejemplo, los voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6,0 y sus respectivos blancos a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

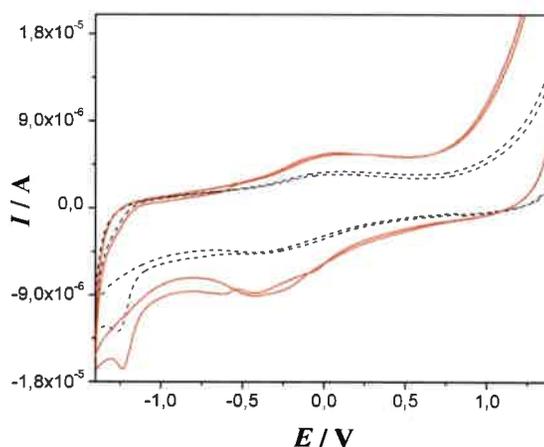


Figura 5.7.8. Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 6, de los electrodos de CV activado (—) y sin activar (----), con sus respectivos blancos.

$$c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} \text{ M. } v = 0,05 \text{ V s}^{-1}.$$

Por otro lado, resulta interesante destacar que el efecto del desdoblamiento de la descarga de PAT observada en agua + 0,1 M de NaClO_4 , nuevamente se pone de manifiesto utilizando la solución reguladora de fosfato. Este fenómeno, que se trataría de un proceso de adsorción débil de PAT sobre el electrodo, ya que si el mismo es retirado de la celda y enjuagado suavemente con solución reguladora y luego, es transferido a otra celda con solución blanco, no se observan signos de que PAT pudiese estar adsorbida sobre el electrodo. Este proceso no sólo dependería del pH del medio, sino también, del proceso de activación del electrodo, ya que a valores de pH por debajo de 6, no se observa la interacción de PAT con el electrodo y tampoco se observa, si el electrodo no es activado en medio básico. En la Figura 5.7.9., se muestran voltamperogramas cíclicos de PAT y sus respectivos blancos, a dos velocidades de barrido, 0,010 y 0,050 V s^{-1} , con el electrodo activado en medio básico (Figura 5.7.9. a) y con el electrodo sin activar (Figura 5.7.9. b), en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7.

Como destacan las zonas enmarcadas con el círculo, en medio neutro, PAT se adsorbe débilmente sobre el electrodo activado, lo cual resulta todavía más evidente, a velocidades de barrido bajas.

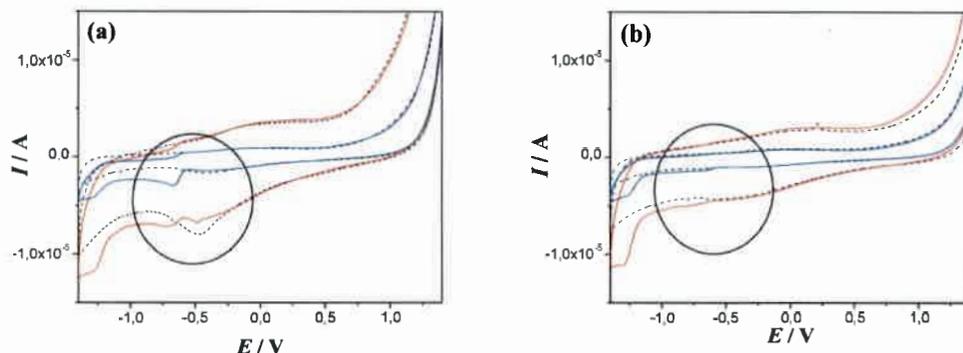


Figura 5.7.9. Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7 (voltamperogramas cíclicos en línea continua) y sus respectivos blancos (voltamperogramas cíclicos en líneas punteadas).

$C_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. (a): electrodo activado, (b): electrodo sin activar.

Se muestran dos velocidades de barrido, 0,010 (—) y 0,050 (—) $V s^{-1}$.

5.7.2.2. Voltamperometría cíclica en soluciones reguladoras de fosfato

En la Figura 5.7.10., se muestran voltamperogramas cíclicos obtenidos con el electrodo de CV activado en medio básico, utilizando medios de distintos valores de pH, se muestran dos velocidades de barrido $v = 0,010 V s^{-1}$ (5.7.10. a) y $v = 0,050 V s^{-1}$ (5.7.10. b).

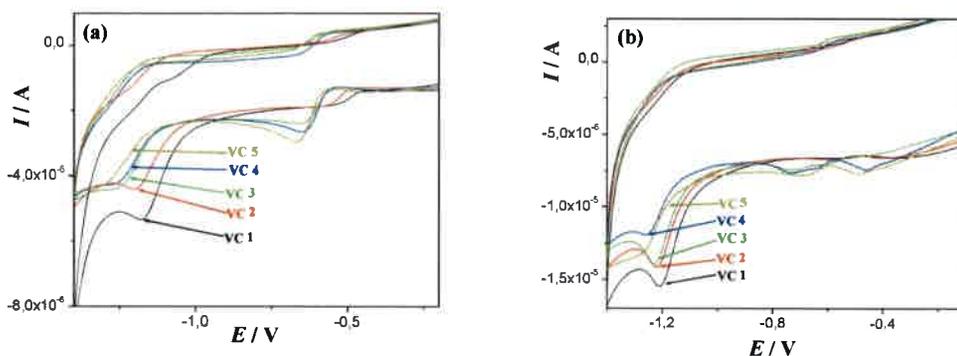


Figura 5.7.10. Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M, a distintos valores de pH: VC 1= 4; VC 2 = 5; VC 3 = 6; VC 4 = 7 y VC 5 = 7,5.

$$c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} \text{ M. (a): } \nu = 0,010 \text{ V s}^{-1}, \text{ (b): } \nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}.$$

Gráficos de I_p vs $\nu^{1/2}$, del pico de PAT más catódico, fueron lineales en todos los valores de pH analizados, en el intervalo de ν entre 0,010 a 0,200 V s^{-1} , mostrando con ello que el proceso de electrodo estaría controlado por difusión, de la misma manera que en medio ACN. En la Figura 5.7.11., se muestran los gráficos de I_p vs $\nu^{1/2}$, para los distintos valores de pH, a una $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} \text{ M}$, en donde se observa claramente que al aumentar la acidez del medio y dado que aumenta la I_p de reducción de PAT, las pendientes son más pronunciadas.

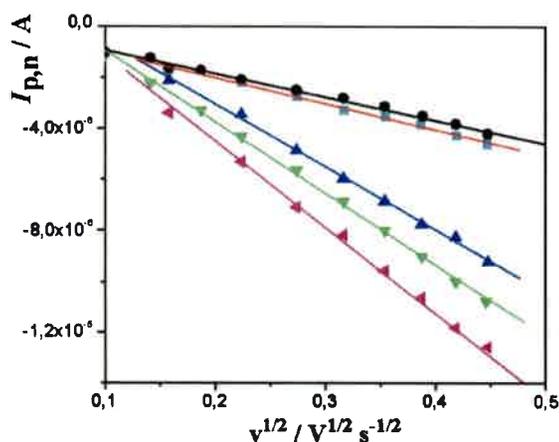


Figura 5.7.11. Gráficos de $I_{p,n}$ vs $\nu^{1/2}$ de PAT en soluciones reguladoras de fosfato a distintos valores de pH: (●) = 7,5; (■) = 7,0; (▲) = 6,0; (▼) = 5,0; (◄) = 4,0. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Gráficos de $E_{p,c}$ vs $\log v$ fueron lineales, como se muestra en la Figura 5.7.12., en el intervalo de velocidades de barrido entre 0,010 a 0,200 $V s^{-1}$, a una $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$, pero las pendientes son diferentes de acuerdo al valor de pH analizado. Para los valores de pH de 4,0; 5,0 y 6,0, la pendiente promedio, es $-(0,050 \pm 0,001) V/década$ y para los valores de pH de 7,0 y 7,5 es $-(0,028 \pm 0,001) V/década$.

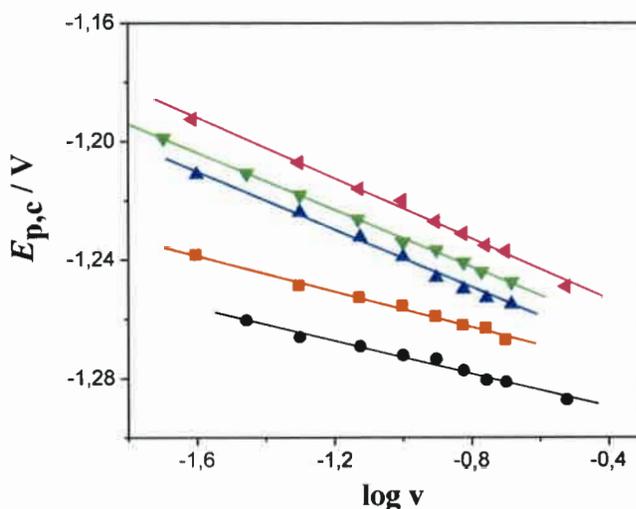


Figura 5.7.12. Gráficos de $E_{p,c}$ vs $\log v$ de PAT en soluciones reguladoras de fosfato a distintos valores de pH: (●) = 7,5; (■) = 7,0; (▲) = 6,0; (▼) = 5,0; (◄) = 4,0. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$.

Gráficos de $E_{p,c}$ vs pH, del pico de PAT más catódico, muestran una tendencia lineal, como se puede observar en la Figura 5.7.13., donde se muestran los resultados obtenidos a todas velocidades de barrido estudiadas. La pendiente promedio de las gráficas fue $-(0,020 \pm 0,001) V / década$.

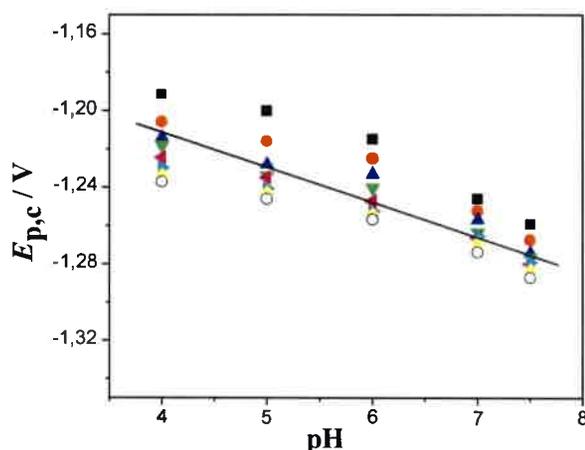


Figura 5.7.13. Gráficos de $E_{p,c}$ vs pH de PAT en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M, a distintas velocidades de barrido, v : (■) = 0,025; (●) = 0,050; (▲) = 0,075; (▼) = 0,100; (◀) = 0,125; (▶) = 0,150; (☆) = 0,175; (○) = 0,200 $V s^{-1}$. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$.

5.7.2.3. Voltamperometría de onda cuadrada en soluciones reguladoras de fosfato

Utilizando esta técnica electroquímica pudo observarse nuevamente la presencia del pre-pico de reducción de PAT mencionado con anterioridad. Como se muestra en la Figura 5.7.14., donde se grafican las corrientes neta (I_n), directa (I_d) e inversa (I_i), en la solución reguladora de fosfato de pH 4 no se observa el pre-pico (Figura 5.7.14 a), mientras que si se observa el pre-pico en la solución reguladora de fosfato de pH 7 (5.7.14. b).

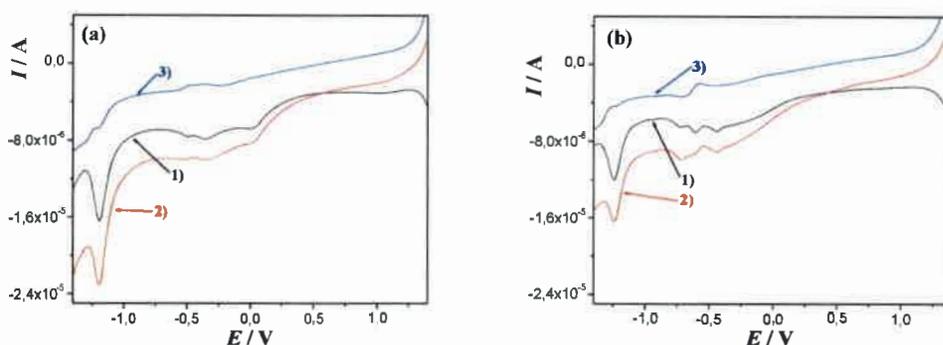


Figura 5.7.14. Voltamperogramas de onda cuadrada de PAT en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M de pH 4 (a) y de pH 7 (b). $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. En las gráficas se muestran las 3 corrientes: 1) I_n , 2) I_d y 3) I_i . Parámetros de OC, $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$.

Contrariamente a lo esperado, graficas de $I_{p,n}$ no fueron lineales con $f^{1/2}$, tal como se muestra en la Figura 5.7.15. Este criterio de diagnóstico es útil para corroborar un comportamiento difusional del proceso de electrodo. En este caso, no es lineal, no porque el mismo no sea difusional, sino porque, a frecuencias más altas, se hace más importante la componente de I_i , y si bien la I_d aumenta proporcionalmente a $f^{1/2}$, al restarle la I_i se produce la disminución de la corriente neta I_n , lo que ocasiona que la gráfica se curve. Un ejemplo de esto se puede observar en la Figura 5.7.16., donde se grafican las 3 corrientes en función de $f^{1/2}$, en una solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 4.

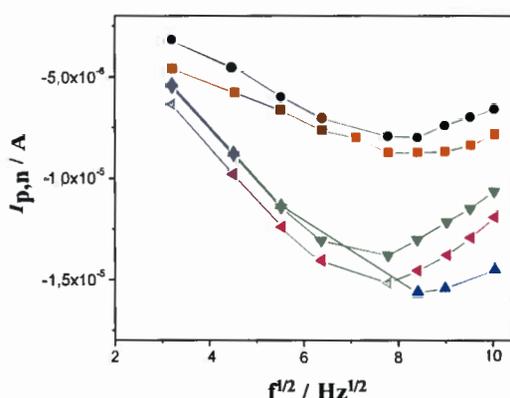


Figura 5.7.15. Graficas de $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$ de PAT en soluciones reguladoras de fosfato a distintos valores de pH: (●) = 7,5; (■) = 7,0; (▲) = 6,0; (▼) = 5,0; (◄) = 4,0. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$.

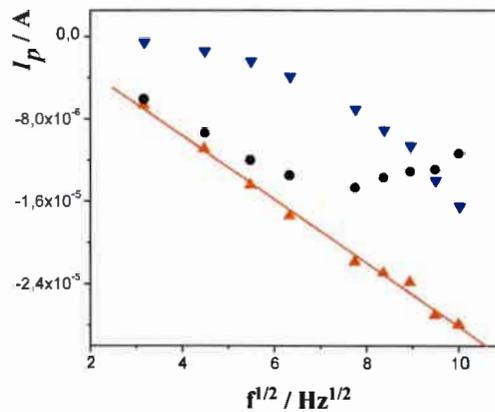


Figura 5.7.16. Graficas de I_p vs $f^{1/2}$ de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 4.

(●): $I_{p,m}$ (▲): $I_{p,d}$ y (▼): $I_{p,t}$ $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$.

En la Figura 5.7.17., se observan voltamperogramas de OC de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 4, a distintas frecuencias, Figuras 5.7.17. a): 10, b): 30, c): 70 y d): 100 Hz. Nótese como, a frecuencias más altas se define mejor el pico de reducción de PAT en la componente inversa de la corriente, lo cual causa la disminución de la I_n .

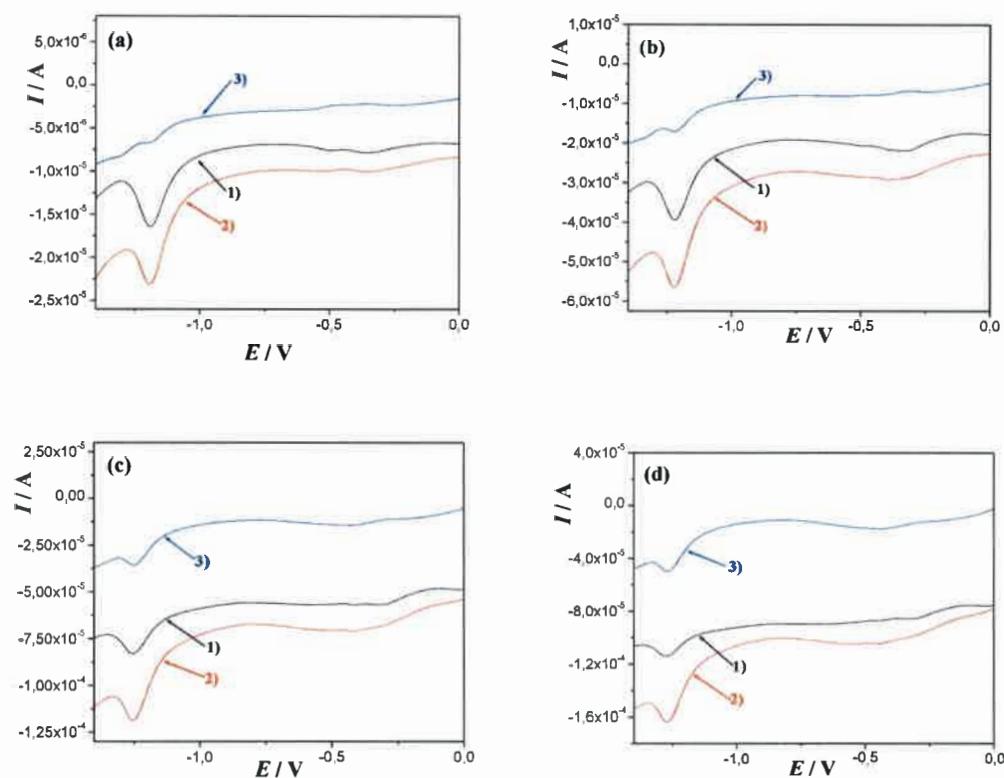


Figura 5.7.17. Voltamperogramas de OC de PAT en solución reguladora de fosfato de pH 4, mostrando las tres corrientes, 1): I_b , 2): I_d y 3): I_r . $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$, $f = (a) 10; (b) 30; (c) 70; y (d) 100 Hz$.

Con el objetivo de comprobar si el comportamiento electroquímico de PAT, que en nuestro caso es realizado sobre electrodos de carbono vítreo, es similar al encontrado por Wasicki y col. [55] utilizando un electrodo de mercurio, es que se realizaron voltamperogramas de pulso diferencial (VPD) a los distintos valores de pH analizados, utilizando como parámetros de la técnica los siguientes: altura del pulso $\Delta E_{pulso} = 0,025 V$ y un incremento de, $\Delta E_{incr} = 0,005 V$. Como se muestra en la Figura 5.7.18, se encontró una correlación lineal, entre en $E_{p,c}$ vs pH, con una pendiente de $-(0,0297 \pm 0,0008) V / década$, con un valor de la ordenada de $-1,020 V$ y $r = 0,9984$, lo cual está en buen acuerdo con los resultados informados por los autores mencionados, quienes encontraron una pendiente de $0,0338 V / década$.

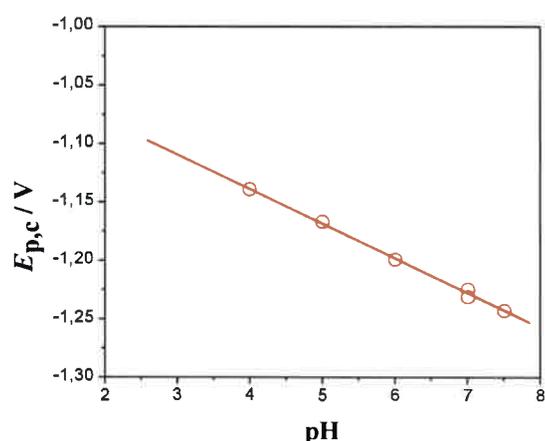


Figura 5.7.18. Gráficas de $E_{p,c}$ vs pH de PAT en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M, utilizando VPD. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{pulso} = 0,025$ V, $\Delta E_{incr.} = 0,005$ V.

Las experiencias realizadas en estas soluciones acuosas permitieron comprobar que, en principio, la descarga de PAT en electrodos de carbono vítreo, es similar a aquella descrita por Wasicki y col. [55] utilizando electrodos de mercurio, quienes proponen un mecanismo del tipo EQE. No obstante, a partir de los experimentos realizados en esta Tesis, tanto en ACN, como en medios acuosos, se puede inferir que el mecanismo de reducción de PAT es más complicado que el descrito por Wasicki y col. [55] y, en nuestra experiencia, los ajustes con programas de simulación no han sido realizados con éxito, debido al potencial tan negativo de la descarga de PAT y las dificultades en el restado de los blancos que esto acarrea.

Por otro lado, la importancia de las medidas realizadas en soluciones reguladoras de fosfato, radica en el hecho, de que fueron el punto de partida para probar el efecto de la modificación del electrodo de trabajo con el polímero quitosano, lo cual se muestra en la próxima sección. Este polímero es soluble en medios acuosos de pH ácido, dado que posee un pKa cercano a 6,5, a valores de pH neutro o alcalinos se hace insoluble. El objetivo fue probar si con este polímero, trabajando en soluciones acuosas de pH neutro o ligeramente alcalino, se podía realizar la adsorción de PAT y así, mejorar la determinación electroanalítica de la micotoxina.

5.7.2.4. Electrodo de carbono vítreo modificado con quitosano

La hipótesis de trabajo fue la de comprobar si entre el polímero inmovilizado sobre la superficie del electrodo y PAT, se generaban interacciones electrostáticas o de otra índole, que pudiesen llevar a que PAT se adsorbiese en la película depositada y así poder pre-concentrarla y desarrollar una técnica voltamperométrica de redisolución.

La quitina, al igual que la celulosa o el almidón, es uno de los polisacáridos más abundantes encontrados en la naturaleza. Se la encuentra formando las paredes celulares de diversos tipos de hongos y, también, en el exoesqueleto de muchas clases de artrópodos. Está compuesta de unidades repetidas de $\beta(1-4)$ -D-glucosamina, con un grado variable de N-acetilación. La distribución de los grupos N-acetilo a lo largo del esqueleto polimérico controlan su solubilidad en un dado solvente. La quitina, con un grado de N-acetilación cercano a la unidad, es insoluble en agua, pero cuando el promedio del grado de N-acetilación es más bajo que 0,5, los polímeros son llamados quitosanos y son solubles en agua en presencia de ácidos, como el ácido acético [99].

En la Figura 5.7.19., se muestra la estructura química del quitosano. En Química Analítica es utilizado para enriquecer y separar cantidades de trazas de metales, tales como Ni(II), Cu(II), Cd(II), Fe(II) y Pb(II) y es utilizado como reactivo para preparar electrodos químicamente modificados [100].

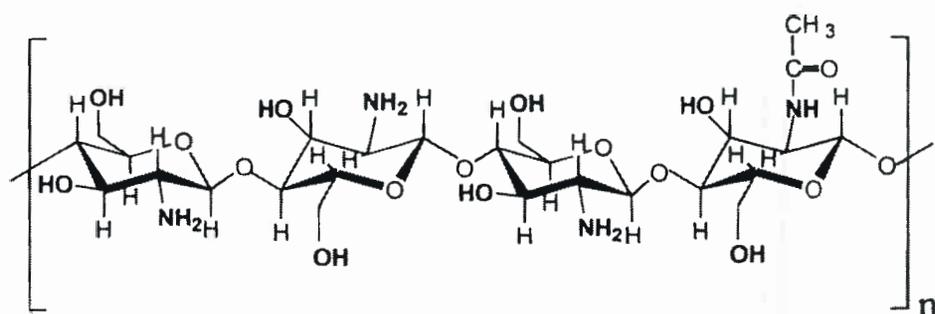


Figura 5.7.19. Estructura química del polímero quitosano.

Este polisacárido es un muy apropiado para modificar electrodos, debido a sus excelentes propiedades de adhesión, su alta resistencia mecánica y estabilidad. Además, debido a su estructura molecular, sus propiedades físicas y químicas pueden ser cambiadas uniendo covalentemente diversas moléculas en los grupos amino u oxidrilos.

Por otro lado, muestra una buena permeabilidad hacia los aniones y un relativamente rápido transporte iónico [101].

Las películas de quitosano electro-depositadas sobre los electrodos son permeables, tanto a las cuplas redox catiónicas $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+3/+2}]$ como aniónicas $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}]$, sin que se produzcan variaciones en los coeficientes de difusión, respecto de los cálculos realizados con un electrodo desnudo, es decir, la película de quitosano no inhibe la difusión de estas moléculas hacia la superficie del electrodo, pero los complejos aniónicos son retenidos en el film de quitosano, debido a las interacciones electrostáticas entre el anión y los grupos amino del polímero [102].

El objetivo de utilizar quitosano para modificar los electrodos de CV, es probar si existen interacciones entre este polímero y PAT, y ver si dichas interacciones pueden mejorar la determinación electroanalítica de la micotoxina.

El electrodo de trabajo fue modificado como se describe en el ítem 4.2.1. Así, el quitosano forma sobre la superficie del electrodo una capa, que cuando el electrodo está seco, es fina y transparente y cuando se sumerge en una solución acuosa, toma la consistencia de un hidrogel, el cual es visible a simple vista, tal como se muestra, a modo de ejemplo, en la Figura 5.7.20., la cual fue tomada sobre un electrodo de oro [102]. Cabe destacar que se realizaron ensayos con electrodos modificados con quitosano en medio ACN + 0,1 M PTBA, pudiéndose comprobar que, en este medio, la capa de quitosano forma sobre la superficie del electrodo una película aislante que no permite la descarga de PAT.

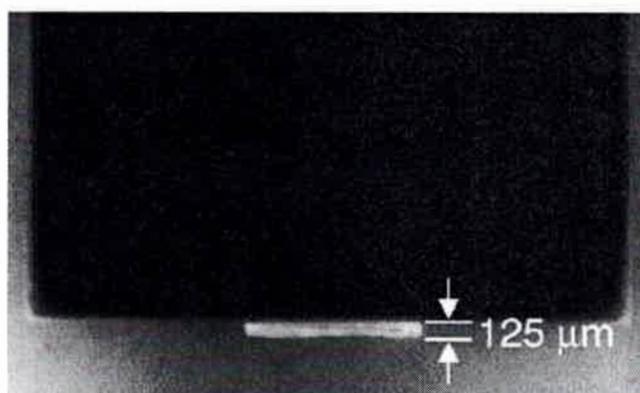


Figura 5.7.20. Vista lateral de una película de quitosano representativa, sobre un electrodo de oro, sumergida en aceite mineral para contraste óptico.

En la Figura 5.7.21., se comparan voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados y sin modificar, en solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 7. Como se puede observar en la Figura 5.7.21., la película de quitosano no es electroactiva en la región de potenciales analizada y produce una leve disminución de la corriente capacitiva. Por otro lado, es permeable a PAT y no se producen cambios apreciables en la I_p , pero si un ligero desplazamiento en el $E_{p,c}$ hacia potenciales catódicos.

Varios aspectos resultaron interesantes en el trabajo con este polímero. Uno de ellos, fue la posibilidad de preparar combinaciones de quitosano junto a otros componentes como, nanotubos de carbono o nano-partículas de oro, aunque no arrojaron los resultados esperados, ya que no tuvieron un efecto marcado sobre la descarga directa de PAT, (por ello no se muestran estos resultados), pero si demostraron la utilidad de este material para modificar electrodos cuando se mide en soluciones acuosas, lo cual resultó prometedor, pensando en trabajos a futuro.

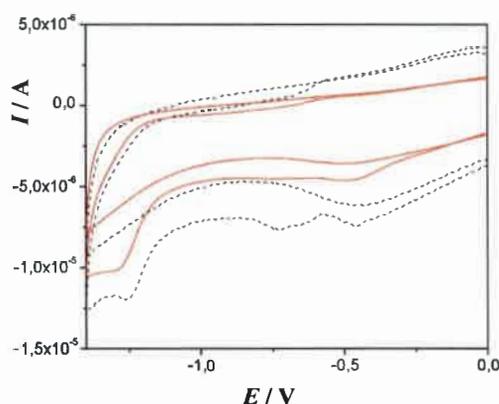


Figura 5.7.21. Voltamperogramas cíclicos de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano (—) y otro sin modificar (----), con sus respectivos blancos. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Luego, se pudo observar un comportamiento diferente en las soluciones reguladoras analizadas. En la Figura 5.7.22., se muestran voltamperogramas del electrodo modificado con quitosano, en solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 5. Como se puede ver, en este medio, luego de repetidos ciclos, no se producen cambios en la descarga de PAT, si en la línea de base, posiblemente debido, a la solubilización del quitosano en el medio de trabajo.

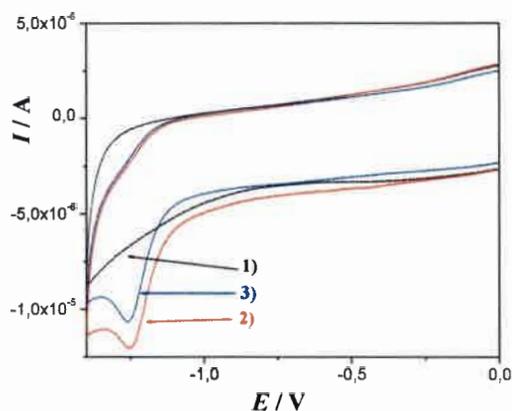


Figura 5.7.22. Voltamperogramas cíclicos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 5, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. 1) voltamperograma del blanco, 2): primer ciclo, 3) décimo ciclo en presencia de PAT. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

En cambio, como se puede observar en la Figura 5.7.23., en solución reguladora de fosfato de pH 7, como consecuencia de los sucesivos ciclados en este medio, se produce un aumento en la I_p , mientras que el $E_{p,c}$, permanece en el mismo valor.

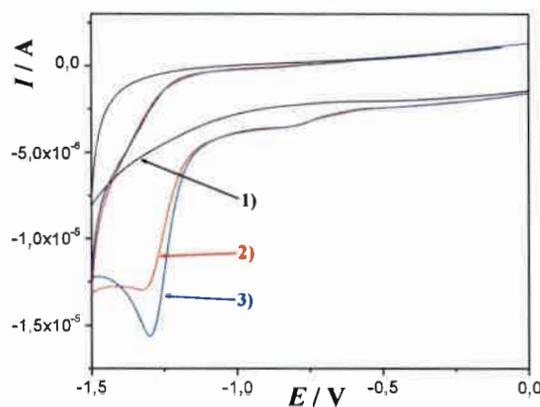


Figura 5.7.23. Voltamperogramas cíclicos en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. 1) voltamperograma del blanco, 2): primer ciclo, 3) quinto ciclo en presencia de PAT. $c_{PAT}^* = 2,43 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Con estos resultados se decidió desarrollar una metodología para concentrar PAT en la película de quitosano utilizando, para ello, una solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7.

Se trabajó en concentraciones bajas de PAT y si bien, no se pudo definir un potencial al cual realizar el proceso de pre-concentración, si se observó, que los ciclados sucesivos entre los potenciales de 1,4 y -1 V, mostraban un aumento en la corriente de reducción, en la zona de potenciales donde se reduce PAT y que, luego de realizar un segundo barrido posterior al ciclado, dicha señal disminuía, dando la impresión de que PAT se había pre-concentrado en la película, tras los sucesivos ciclados.

En la Figura 5.7.24., se muestra un ejemplo de este proceso. El primer voltamperograma de OC (VOC 1) previo al ciclado, muestra un pico propio de la descarga de PAT, luego, se realizan 10 voltamperogramas cíclicos entre 1,4 y -1 V a una v de $0,100 \text{ V s}^{-1}$ y al registrar el siguiente voltamperograma de OC (VOC 2) se vio que poseía una señal mucho más grande que el anterior y al registrar el siguiente voltamperograma de OC (VOC 3), se ve que la corriente decae a la misma altura que la del VOC 1.

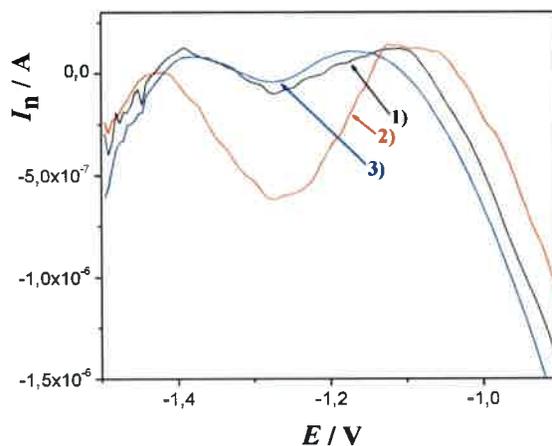


Figura 5.7.24. Voltamperogramas de OC de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. $c_{PAT}^* = 1,30 \times 10^{-6} \text{ M}$. 1): VOC 1 previo a los ciclados, 2): VOC 2 primer barrido posterior a los ciclados y 3): segundo barrido posterior los ciclados. $\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$ y $f = 25 \text{ Hz}$.

Este proceso resultó reproducible en diferentes concentraciones y con diferentes electrodos, por lo que se construyó una curva de calibración. En la Figura 5.7.25., se pueden observar voltamperogramas de OC de PAT, a diferentes concentraciones de la micotoxina, utilizando el método antes descrito. Cabe destacar, que la utilización de una $f = 25 \text{ Hz}$, es simplemente a los fines de realizar más rápidos los barridos de potencial.

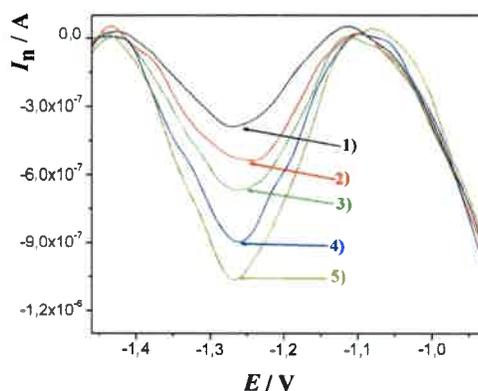


Figura 5.7.25. Voltamperogramas de OC de PAT en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. c_{PAT}^* : 1) = 0,32, 2) = 0,65, 3) = 1,30, 4) = 2,27, 5) = $3,25 \times 10^{-6}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 25$ Hz.

En la Figura 5.7.26., se puede observar un gráfico de $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* , cuyos datos corresponden a los de la Figura 5.7.25., la sensibilidad obtenida por esta técnica fue de $-(0,219 \pm 0,001)$ A M⁻¹, con $r = 0,9966$ y un límite de detección de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (ppb).

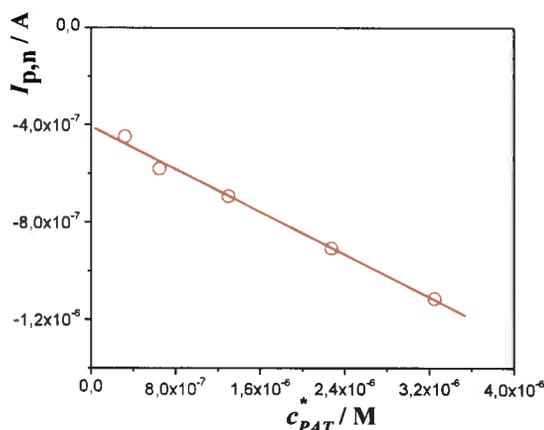


Figura 5.7.26. Gráfico de $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, utilizando un electrodo de CV modificado con quitosano. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 25$ Hz.

Como se puede observar en la Figura 5.7.26., el gráfico posee una ordenada al origen de $4,08 \times 10^{-7}$ A. Esto se debe a que, en la zona de potenciales donde se reduce PAT, existen componentes en la película de quitosano que también se reducen en la misma zona de potenciales. Esta es, justamente, la limitación que posee este

procedimiento, puesto que cuando se realizó esta metodología en una solución de blanco, formada solamente por solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, con el electrodo modificado con quitosano, se encontró que existe un pico de reducción ubicado alrededor de -1,24 V y con una $I_{p,n}$ de entre 2,0 y 5,0 x 10⁻⁷ A, utilizando los mismos parámetros de OC con que se construyó la curva de calibración. De acuerdo a la bibliografía consultada, este hecho se debería a la reducción de metales que se encuentran formando complejos con el grupo amino del quitosano, estos metales estarían presentes como impurezas en el quitosano comercial o en el propio sistema regulador utilizado, especies que incluyen, cobre, zinc, hierro, magnesio y calcio [102]. Esto crearía una cierta ambigüedad en la medición de la corriente de reducción de PAT, sobre todo pensando en el análisis de PAT en muestras reales.

5.8. Resumen de las metodologías desarrolladas

En la Tabla 5.8.1. se muestra un resumen de las distintas metodologías electroanalíticas desarrolladas en medios comerciales para la determinación de PAT.

Observando este resumen se puede destacar que:

- La incorporación de ATFA al medio ACN + 0,1 M de PTBA mejora la sensibilidad de la VOC y disminuye el límite de detección de PAT.
- El electrodo modificado con NTCPM no mostró una mejora respecto del electrodo desnudo.
- Utilizando un electrodo modificado con quitosano y aplicando VOC en solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7, se obtuvo la mejor sensibilidad y el menor límite de detección. No obstante esta metodología necesita más estudios antes de trasladarla al análisis de las matrices reales.

Tabla 5.8.1. Resumen de las distintas metodologías electro-analíticas para la determinación de PAT.

Técnica	Electrodo	Medio	Sensibilidad ($A M^{-1}$)	Límite de detección ($\mu g L^{-1}$)
Voltamperometría cíclica ($v = 0,050 V s^{-1}$)	CV desnudo	ACN + 0,1 M PTBA	$-(0,0193 \pm 0,0002)$	1540
Voltamperometría de onda cuadrada ($\Delta E_{oc} = 0,025 V, \Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$)	CV desnudo	ACN + 0,1 M PTBA	$-(0,0346 \pm 0,0005)$	107
Voltamperometría de onda cuadrada ($\Delta E_{oc} = 0,025 V, \Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$)	CV desnudo	ACN + 0,1 M PTBA + 1×10^{-5} M ATFA	$-(0,041 \pm 0,001)$	45,3
Voltamperometría de onda cuadrada ($\Delta E_{oc} = 0,025 V, \Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$)	CV Modificado con NTCPM	ACN + 0,1 M PTBA	$-(0,0175 \pm 0,0002)$	154
Voltamperometría de onda cuadrada ($\Delta E_{oc} = 0,025 V, \Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 25 Hz$)	CV Modificado con quitosano	Solución reguladora de fosfato 0,1 M pH 7	$-(0,219 \pm 0,001)$	5

5.9. Análisis de patulina en muestras reales

Con el objetivo de aplicar una metodología electroanalítica en la determinación cuantitativa de PAT en muestras reales, se realizaron procedimientos de extracción de esta micotoxina en jugos de manzana.

El procedimiento electroquímico que será aplicado después de las extracciones, incluye el electrodo de carbono vítreo solamente pulido de manera mecánica, con alúminas de 0,3 y 0,05 μm . El medio empleado, será ACN + 0,1 M hexafluorofosfato de tetrabutil amonio (HFTBA), en la configuración de celda alternativa, para poder trabajar sin la interferencia de los componentes del electrodo de calomel saturado, el cual, es el electrodo de referencia, siendo el contraelectrodo un alambre de platino. Todos los voltamperogramas serán iniciados en 1,65 V, con 60 s de tiempo de espera a ese potencial, y las soluciones serán previamente desgasadas con argón de alta pureza.

Se analizaron dos tipos de jugos de manzana, turbios y clarificados.

Los jugos de manzana turbios (“cloudy apple juice”), fueron preparados a partir del triturado de manzanas frescas, sin signos de putrefacción por hongos y, al que solamente se le practicó un filtrado, utilizando un papel de fibra de vidrio, a fin de

eliminar los trozos más grandes de pulpa. El jugo obtenido bajo estas condiciones se encuadra dentro de la definición de jugo de manzana turbio, ya que no se le realizan las etapas de despectinización ni filtración.

Posteriormente, se realizó el análisis de jugos de manzana comerciales, o jugos de manzana clarificados (“clear apple juice”).

El procedimiento de extracción, es el mismo que se aplica para el análisis de muestras de PAT por HPLC, el método oficial adoptado por la AOAC, método 995.10 [15, 45, 51]. Así, a muestras de 5 mL de jugo de manzana se les realizaron 3 extracciones con 10 mL de acetato de etilo, la fase orgánica fue recogida en una ampolla de decantación y, posteriormente, fue purificada con 2 mL de carbonato de sodio al 1,5 % P/V. Luego, se realizó una extracción con 5 mL de acetato de etilo a la fracción de 2 mL de carbonato de sodio. Los 35 mL del extracto de acetato de etilo fueron secados con 1 g de sulfato de sodio anhidro. El sulfato de sodio anhidro fue filtrado, utilizando un papel de fibra de vidrio y enjuagado con 5 mL de acetato de etilo. Por último, el solvente fue evaporado, en rota vapor y el extracto fue resuspendido en 5 mL de ACN + 0,1 M HFTBA para su análisis.

5.9.1. Análisis de patulina en muestras de jugos de manzana turbios

A partir del jugo obtenido del triturado de manzanas, se realizaron dos tipos de extracciones. La primera fue realizada al jugo sin el agregado de PAT, con el objetivo de determinar si después de las extracciones, se obtenían compuestos que pudiesen tener un potencial de descarga similar al de PAT y, la segunda, al jugo de manzana contaminado “ex-profeso” con una cantidad conocida de PAT.

En ambos casos, las extracciones fueron realizadas a 5 mL de jugo de manzana y, el jugo contaminado, contenía $1,29 \times 10^{-5}$ M de PAT (2 ppm). El porcentaje de recuperación fue determinado a través del método de la adición estándar, utilizando como técnica analítica la VOC, cuyos parámetros fueron $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

En la Figura 5.9.1., se pueden observar dos voltamperogramas cíclicos, donde se comparan aquel obtenido en una solución blanco (ACN + 0,1 M HFTBA) y aquel obtenido luego de realizar el procedimiento de extracción al jugo de manzana, en ACN + 0,1 M HFTBA. Como se puede observar a partir de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 5.9.1., en la ventana de potenciales analizada, no se extraen durante el proceso

de extracción compuestos que tengan un potencial de descarga en la zona catódica donde se reduce PAT.

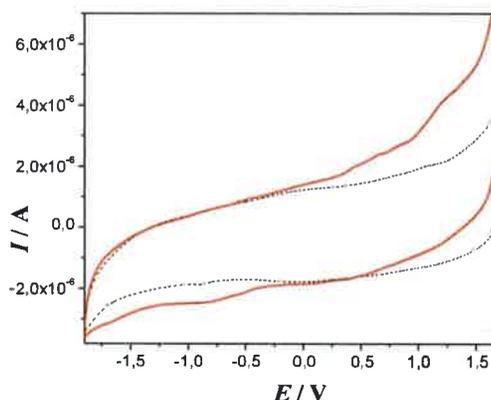


Figura 5.9.1. Voltamperogramas cíclicos de una solución de ACN + 0,1 M HFTBA (----) y del mismo medio con el agregado del extracto de jugo de manzana (—). $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 5.9.2., se muestran los voltamperogramas cíclicos, obtenidos a partir del jugo de manzana sin contaminar y contaminado “ex-profeso” con PAT, donde claramente se observa el pico de reducción de PAT, obtenido después del procedimiento de extracción.

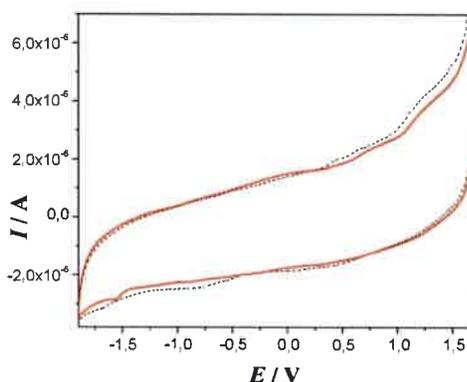


Figura 5.9.2. Voltamperogramas cíclicos de ACN + 0,1 M HFTBA + extractos de jugo de manzana, sin contaminar (----) y contaminado con PAT (—).

$$c_{PAT}^{\bullet} = 1,29 \times 10^{-5} \text{ M. } v = 0,050 \text{ V s}^{-1}.$$

En la Figura 5.9.3., se muestran los voltamperogramas cíclicos, obtenidos después de realizar las 6 adiciones estándares, cada una de las cuales se obtuvo

agregando a la solución de trabajo 5 μL de una solución patrón de PAT en ACN de $c_{PAT}^* = 6,49 \times 10^{-3} \text{ M}$.

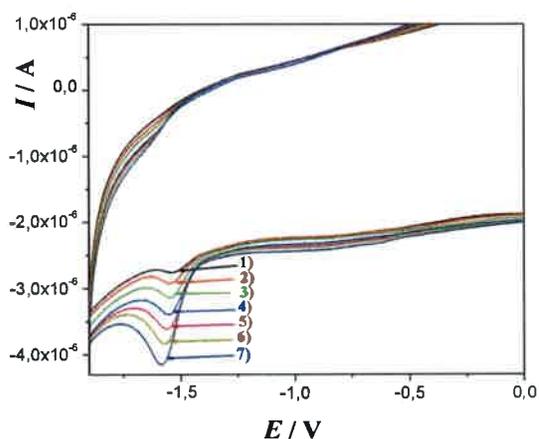


Figura 5.9.3. Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar. Concentraciones de los estándares, c_{est}^* = 2): 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 5.9.4., se muestran los voltamperogramas de OC de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándares.

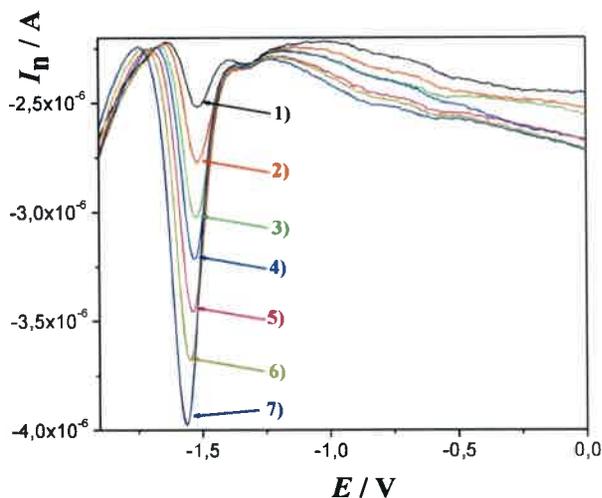


Figura 5.9.4. Voltamperogramas de OC de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar. Concentraciones de los estándares, c_{est}^* = 2): 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5} \text{ M}$.

$$\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}, \Delta E_e = 0,005 \text{ V y } f = 10 \text{ Hz.}$$

Luego se construyó una curva donde se grafica la $I_{p,n}$ vs la concentración del estándar, mostrado en la Figura 5.9.5. y, a partir de los datos de la ordenada al origen y de la pendiente, se determinó la concentración de PAT recuperada después de la extracción.

Los datos graficados en la Figura 5.9.5, se corresponden con las curvas de la Figura 5.9.4. Así, se obtuvo una pendiente de $-(0,036 \pm 0,001) \text{ A M}^{-1}$ y una ordenada al origen de $-(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-7} \text{ A}$, $r = 0,9981$. La concentración determinada de PAT fue de $8,45 \times 10^{-6} \text{ M}$, lo cual se corresponde con un porcentaje de recuperación del 65 %.

Este porcentaje de recuperación se encontraría dentro de los valores normales para el producto analizado, debido a que PAT reacciona con algunos componentes del jugo de manzana, por ejemplo, las proteínas y los aminoácidos [15, 25, 40], formando aductos covalentes que luego no serían extraídos con el acetato de etilo. Además, dado que ésta es una primera aproximación al análisis de PAT en muestras reales, el jugo de manzana producido en nuestro laboratorio no fue tratado con enzimas pectinasas, como sugieren para la determinación de PAT en este tipo de productos [51, 53].

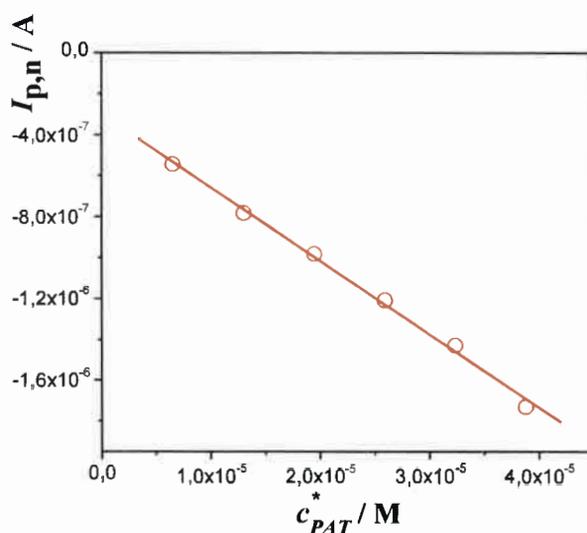


Figura 5.9.5. Gráfico de $I_{p,n}$ vs la concentración de las adiciones estándares (c_{est}^*).

$$\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}, \Delta E_e = 0,005 \text{ V y } f = 10 \text{ Hz.}$$

Luego, con el objetivo de determinar el potencial de descarga de 5-hidroximetilfurfural (HMF), se realizaron agregados del mismo a la solución de extracto de jugo de manzana turbio.

Como se muestra en los voltamperogramas cíclicos de la Figura 5.9.6., HMF tiene un potencial de reducción que es $\approx 0,315$ V más catódico que el potencial de reducción de PAT.

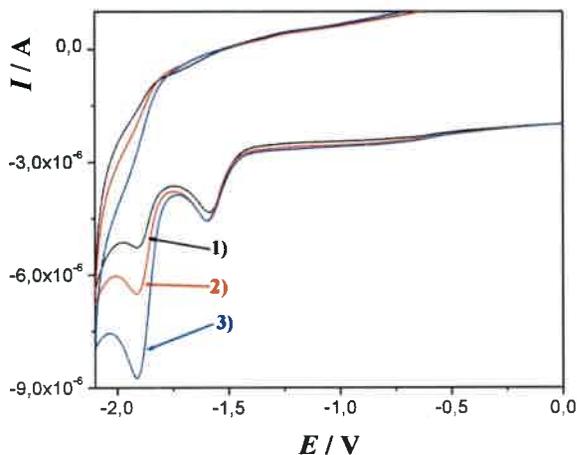


Figura 5.9.6. Voltamperogramas cíclicos del extracto de jugo de manzana contaminado con PAT en ACN + 0,1 M HFTBA + agregados de HMF. $c_{PAT}^* = 5,1 \times 10^{-5}$ M. $c_{HMF}^* = 1) 0,51; 2) = 1,0; 3) = 2,1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹.

En la Figura 5.9.7., se muestran voltamperogramas de OC de PAT y HMF, que se corresponden con las concentraciones de la Figura 5.9.6., donde claramente se observa la buena resolución de los picos de ambos compuestos, los cuales están separados en esta técnica por $\approx 0,315$ V.

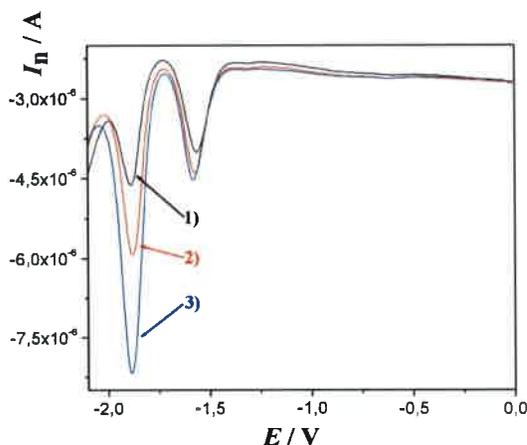


Figura 5.9.7. Voltamperogramas de OC del extracto de jugo de manzana contaminado con PAT en ACN + 0,1 M HFTBA + agregados de HMF. $c_{PAT}^* = 5,1 \times 10^{-5}$ M. $c_{HMF}^* = 1) 0,51; 2) = 1,0; 3) = 2,1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

Estos resultados indican que, en el análisis de jugos de manzana comerciales, la presencia de HMF no interferiría con la descarga de PAT y, por lo tanto, en su cuantificación. De hecho, sería posible la determinación simultánea de ambos compuestos, ya que HMF es un importante marcador del grado de frescura y calidad de algunos alimentos [23].

5.9.2. Análisis de patulina en muestras de jugos de manzana clarificados

En esta sección se muestran los resultados del análisis de un jugo de manzana comercial, el cual corresponde a los jugos de manzana clarificados ("clear apple juice"). El jugo analizado posee como ingredientes: agua, 50 % de jugo de manzana concentrado, jarabe de maíz de alta fructosa, azúcar, ácido cítrico, ácido ascórbico y aromatizante.

El jugo fue analizado por el mismo método descrito en la sección anterior, pero los barridos de potencial, son realizados entre 1,65 y -2,00 V, para poder observar el pico de reducción de HMF.

Se realizaron dos tipos de extracciones. La primera fue realizada al jugo sin el agregado de PAT, con el objetivo de determinar si después de las extracciones, se obtenían compuestos que pudiesen tener un potencial de descarga similar al de PAT y, la segunda, al jugo de manzana contaminado "ex-profeso" con una cantidad conocida de PAT. En ambos casos, las extracciones fueron realizadas a partir de 5 mL de jugo de manzana comercial y el jugo contaminado "ex-profeso" contenía $1,29 \times 10^{-5}$ M de PAT (2 ppm). El porcentaje de recuperación fue determinado a través del método de la adición estándar, utilizando como técnica analítica la VOC, cuyos parámetros fueron $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

En la Figura 5.9.8., se muestran los voltamperogramas cíclicos, obtenidos a partir del jugo de manzana comercial sin contaminar y contaminado "ex-profeso" con PAT, donde claramente se observa el pico de reducción de PAT ($E_{p,c} = -1,51$ V). Además, se observa el pico de reducción de HMF ($E_{p,c} = -1,85$ V), el cual fue extraído junto con PAT y que formaba parte de los componentes del jugo comercial, ya que se forma a través de la reacción de Maillard, la cual puede ocurrir durante el procesamiento (particularmente, a altas temperaturas) y/o el almacenamiento de los jugos de manzana, ya que éstos son ricos en carbohidratos y aminoácidos [23, 87].

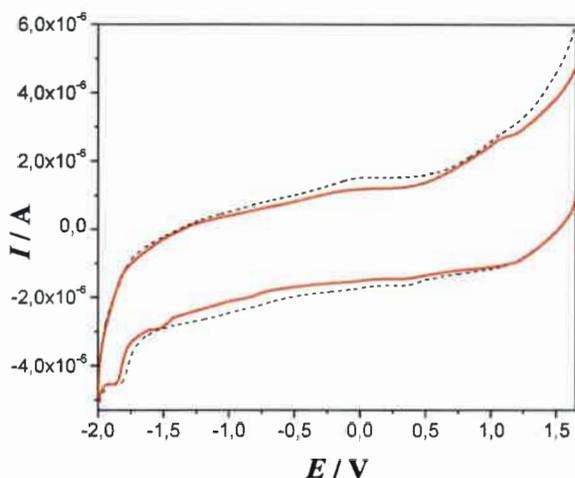


Figura 5.9.8. Voltamperogramas cíclicos de ACN + 0,1 M HFTBA + extractos de jugo de manzana comercial, sin contaminar (----) y contaminado con PAT (—).

$$c_{PAT}^* = 1,29 \times 10^{-5} M, v = 0,050 V s^{-1}.$$

En la Figura 5.9.9., se muestran los voltamperogramas de OC obtenidos a partir del jugo de manzana comercial sin contaminar y contaminado “ex-profeso” con PAT. En principio, este jugo comercial no poseería PAT, o bien su nivel estaría por debajo del límite de detección de nuestra técnica electroanalítica, ya que, en la zona de potenciales donde se descarga PAT, no se observa la presencia de ningún pico.

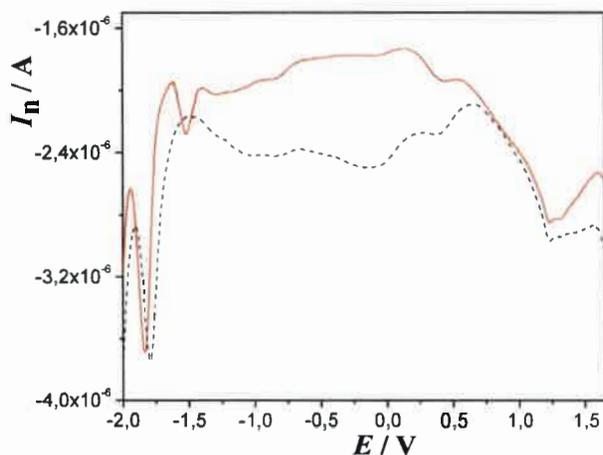


Figura 5.9.9. Voltamperogramas de OC de ACN + 0,1 M HFTBA + extractos de jugo de manzana comercial, sin contaminar (----) y contaminado con PAT (—).

$$c_{PAT}^* = 1,29 \times 10^{-5} M, \Delta E_{OC} = 0,025 V, \Delta E_e = 0,005 V \text{ y } f = 10 \text{ Hz}.$$

En la Figura 5.9.10., se muestran los voltamperogramas cíclicos, obtenidos después de realizar las 6 adiciones estándares, cada una de las cuales fue obtenido agregando a la solución de trabajo 5 μL de una solución patrón de PAT en ACN de una $c_{PAT}^* = 6,49 \times 10^{-3} \text{ M}$.

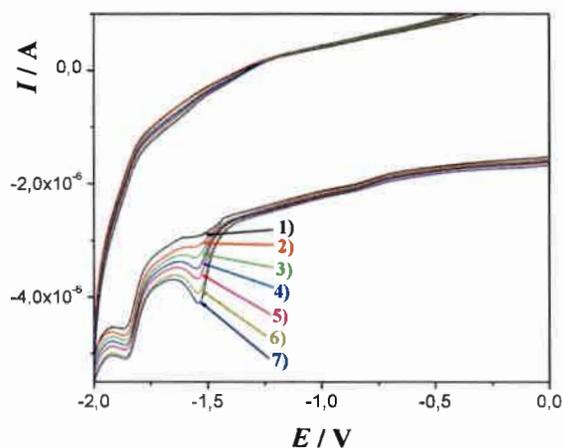


Figura 5.9.10. Voltamperogramas cíclicos de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana comercial contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar.

Concentraciones de los estándares, c_{est}^* = 2): 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5} \text{ M}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura 5.9.11., se muestran los voltamperogramas de OC, obtenidos tras realizar las 6 adiciones estándar, los parámetros utilizados fueron $\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_c = 0,005 \text{ V}$ y $f = 10 \text{ Hz}$.

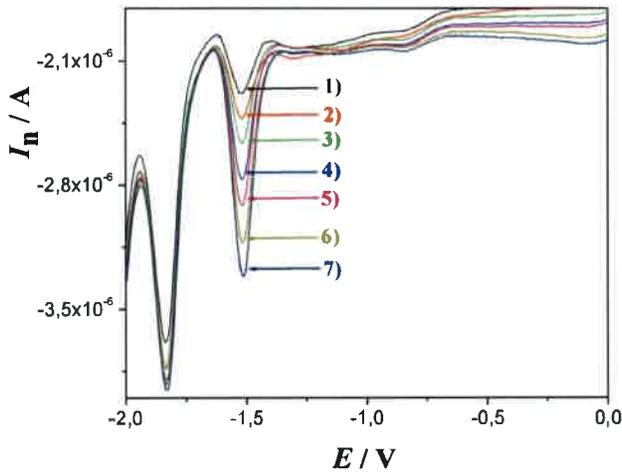


Figura 5.9.11. Voltamperogramas de OC de PAT en ACN + 0,1 M de HFTBA + extracto de jugo de manzana comercial contaminado con PAT (1) y las 6 adiciones estándar. Concentraciones de los estándares, c_{est}^* = 2): 0,648; 3): 1,29; 4): 1,94; 5): 3,22 y 7): $3,87 \times 10^{-5}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

Luego se construyó una curva donde se grafica la $I_{p,n}$ vs la concentración del estándar de PAT, mostrado en la Figura 5.9.12. y, a partir de los datos de la ordenada al origen y de la pendiente se determinó la concentración de PAT recuperada tras la extracción. Los datos graficados en la Figura 5.9.12., se corresponden con las curvas de la Figura 5.9.11. Se obtuvo una pendiente de $-(0,0286 \pm 0,0002)$ A M⁻¹ y una ordenada al origen de $-(3,08 \pm 0,05) \times 10^{-7}$ A, $r = 0,9998$. Así, la concentración determinada de PAT fue de $1,08 \times 10^{-5}$ M, lo que corresponde a un porcentaje de recuperación del 83,4 %.

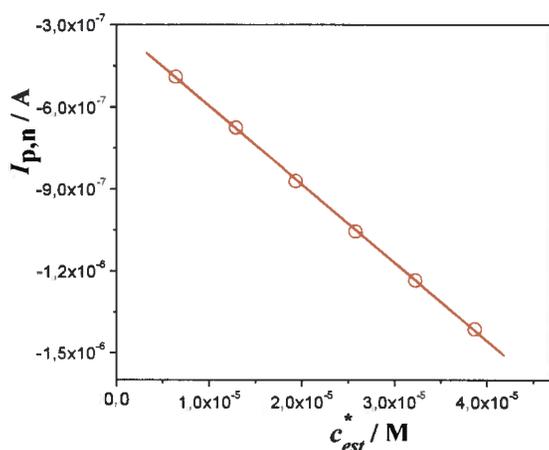


Figura 5.9.12. Gráfico de $I_{p,n}$ vs la concentración de las adiciones estándares en jugo de manzana comercial (c_{est}^*). $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$.

A continuación, se procedió a determinar la concentración de HMF presente en el jugo comercial, para lo cual se realizaron 6 adiciones estándares a partir de una solución patrón de HMF en ACN, cuya concentración era de $c_{HMF}^* = 2,93 \times 10^{-3} M$. La primera adición estándar a la celda (conteniendo un volumen de 5,03 mL) fue de 10 μL y las 5 restantes de 50 μL . En la Figura 5.9.13., se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados después de las adiciones estándares.

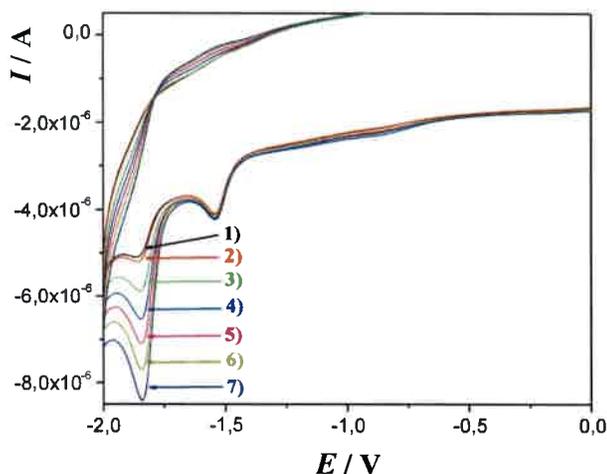


Figura 5.9.13. Voltamperogramas cíclicos del extracto de jugo de manzana comercial luego de la determinación de PAT (1) + 6 adiciones estándares de HMF. $c_{HMF}^* = 2): 0,05; 3): 0,34; 4): 0,62; 5): 0,90; 6): 1,17; 7): 1,44 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

En la Figura 5.9.14., se muestran los voltamperogramas de OC registrados luego de las adiciones estándar para la determinación de HMF.

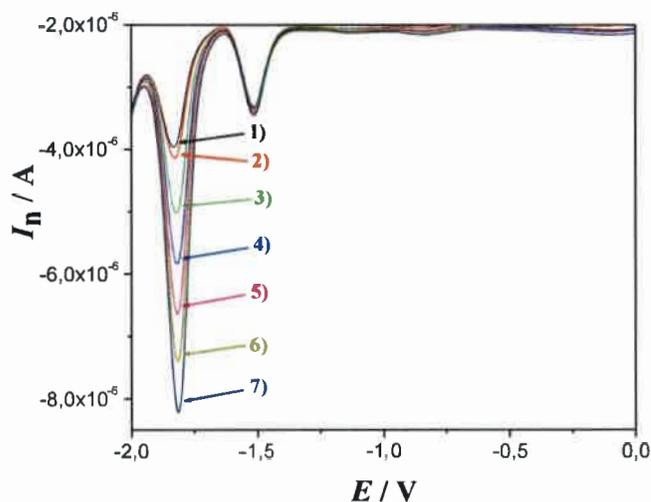


Figura 5.9.14. Voltamperogramas de OC del extracto de jugo de manzana comercial luego de la determinación de PAT (1) + 6 adiciones estándares de HMF. $c_{HMF}^* = 2)$: 0,05; 3): 0,34; 4): 0,62; 5): 0,90; 6): 1,17; 7): $1,44 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

Luego, se construyó una curva donde se grafica la $I_{p,n}$ vs la concentración del estándar de HMF, mostrado en la Figura 5.9.15. y, a partir de los datos de la ordenada al origen y de la pendiente, se determinó la concentración de HMF presente en el jugo de manzana comercial.

Los datos graficados en la Figura 5.9.15., se corresponden con las curvas de la Figura 5.9.14. Se obtuvo una pendiente de $-(0,0277 \pm 0,0002)$ A M⁻¹ y una ordenada al origen de $-(1,57 \pm 0,02) \times 10^{-6}$ A, $r = 0,9998$. Así, la concentración determinada de HMF fue de $5,68 \times 10^{-5}$ M (6,5 ppm), considerando un porcentaje de recuperación del 100 %, pero dado que, por lo general, el porcentaje de recuperación de HMF es muy similar al de PAT, su concentración sería ligeramente más alta. No obstante, estaría dentro de los límites permitidos. Así, como se mencionó previamente, la Federación Internacional de Procesadores de Jugos de Fruta (IFFJP) recomienda una concentración máxima de entre 5 y 10 mg L⁻¹ de HMF en jugos de fruta y de 25 mg L⁻¹ en concentrados [103].

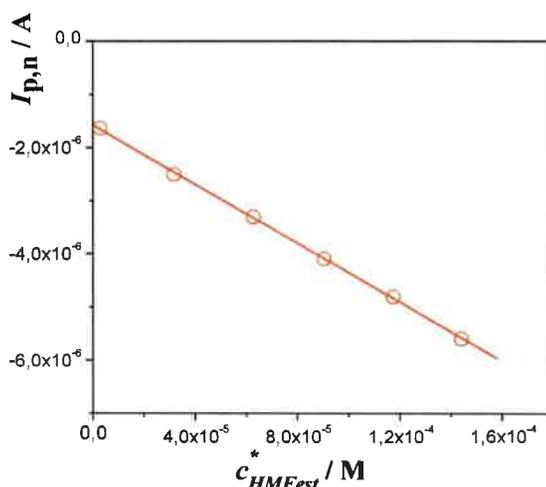


Figura 5.9.15. Gráfico de $I_{p,n}$ vs las concentraciones de las adiciones estándares de HMF (c_{HMFest}^*) en jugo de manzana comercial. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$.

Estos resultados confirman que, en el análisis de jugos de manzana comerciales, es posible la determinación simultánea de PAT y HMF.

Un análisis exhaustivo de la bibliografía publicada en las últimas décadas muestra un sólo trabajo referido a la reducción electroquímica de HMF y su aplicación en el análisis de muestras de miel [89] y un sólo trabajo donde se lo menciona en la determinación polarográfica de PAT en muestras de jugos de manzana [55]. Así, este trabajo sería el primero en considerar la determinación electroquímica simultánea de PAT y HMF en muestras de jugos de manzana utilizando electrodos sólidos.

5.8.3. Curva de trabajo

A los fines de demostrar la utilidad de la metodología desarrollada en el análisis de los jugos de manzana comerciales, desde un punto de vista electroanalítico, se construyó una curva de trabajo, utilizando bajas concentraciones de PAT, cercanas a la permitida por las legislaciones internacionales.

Trabajando con concentraciones altas, como las que se utilizaron en los incisos anteriores (5.9.1. y 5.9.2.), no se detectaron problemas de pasivación del electrodo de trabajo. Sin embargo, al utilizar bajas concentraciones de PAT, este fenómeno se puso de manifiesto, presumiblemente, debido a la oxidación de los compuestos polifenólicos que se encuentran en los extractos de acetato de etilo. A 5 ml de jugo de manzana

comercial se le realizó la extracción con acetato de etilo, obteniendo así la matriz sobre la que se realizó la curva de trabajo. A este extracto se le realizaron agregados de una solución estándar de PAT. En la Figura 5.9.16., se muestran los voltamperogramas de OC de PAT obtenidos después de los distintos agregados.

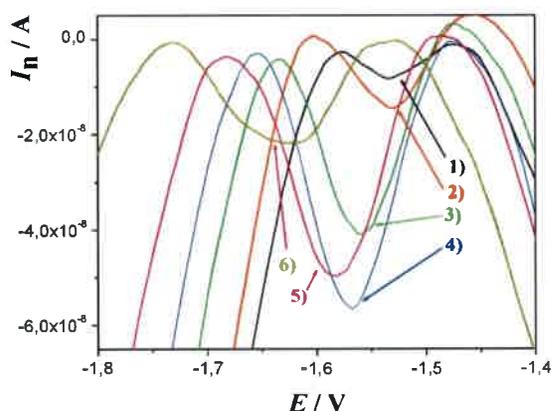


Figura 5.9.16. Voltamperogramas de OC de PAT en un extracto de jugo de manzana comercial. $c_{PAT}^* = 1)$: 0,46; 2): 0,68; 3): 0,90; 4): 1,12; 5): 1,33; 6): 1,74 x 10⁻⁶ M.
 $\Delta E_{OC} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V y $f = 10$ Hz.

Como se puede observar en la Figura 5.9.16., al aumentar la concentración de PAT, la señal baja. Esto se debería a que, a bajas concentraciones de PAT, la superficie del electrodo se vuelve más sensible a los fenómenos de pasivación, lo cual se puede observar con mayor claridad en Figura 5.9.17., donde se grafica la $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* que se corresponde con la Figura 5.9.16.

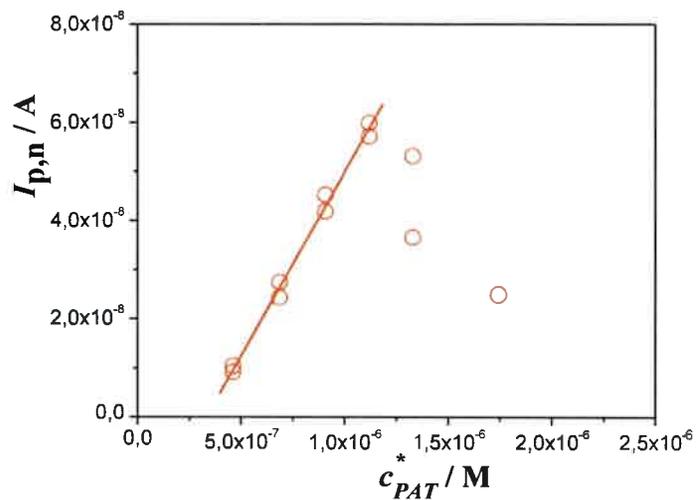


Figura 5.9.17. Gráfico de $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en jugo de manzana comercial, de acuerdo a la Figura 5.8.16. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$.

Para solucionar este inconveniente, simplemente se decidió pulir el electrodo de trabajo (como se indica en el inciso 4.2.1.) previo a cada determinación. En la Figura 5.9.18., se observan los voltamperogramas de OC obtenidos.

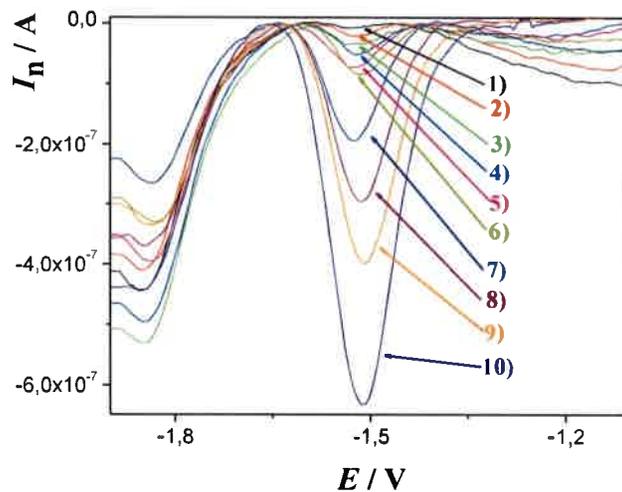


Figura 5.9.18. Voltamperogramas de OC de PAT en un extracto de jugo de manzana comercial, donde entre cada voltamperograma el electrodo de trabajo fue pulido.

$c_{PAT}^* = 1): 4,62; 2): 6,86; 3): 9,06 \times 10^{-7} M; 4): 1,33; 5): 1,74; 6): 2,14; 7): 4,36; 8): 6,53; 9): 8,54$ y $10): 12,8 \times 10^{-6} M$. $\Delta E_{OC} = 0,025 V$, $\Delta E_e = 0,005 V$ y $f = 10 Hz$.

En la Figura 5.9.19., se muestra la gráfica de la $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* que se corresponde con la Figura 5.8.18. Se obtuvo una pendiente de $-(0,0496 \pm 0,0007) \text{ A M}^{-1}$ y un $r = 0,9954$. La concentración más baja medida experimentalmente por esta técnica, para una relación señal/ruido de 3:1 fue, $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ (46 ppb).

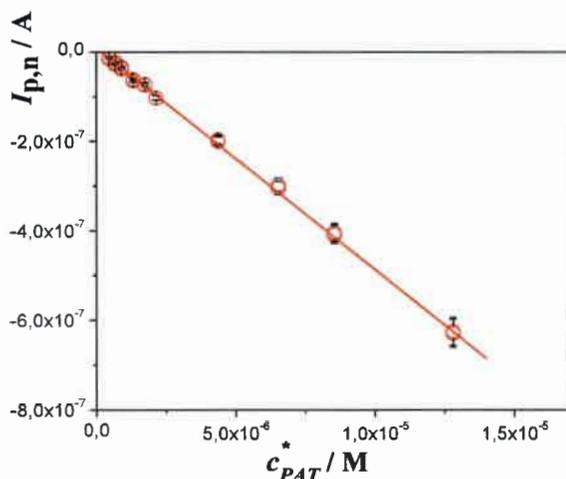


Figura 5.9.19. Gráfico de $I_{p,n}$ vs c_{PAT}^* en jugo de manzana comercial, de acuerdo a la Figura 5.8.17., $\Delta E_{OC} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$ y $f = 10 \text{ Hz}$.

Este resultado es similar al obtenido en el medio simulado (ACN, 0,1 M de PTBA y $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ de ATFA, inciso 5.3.4.), tanto por la sensibilidad como por el límite de detección. Esto se debe a que, en los extractos de acetato de etilo, se extraen ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido ascórbico, etc.), presentes de manera natural en el jugo, los cuales le confieren a la matriz un carácter ácido, cuyo efecto en la reducción de PAT es el mismo que el que produce el ácido trifluoracético. En este sentido, cabe destacar, que si al extracto de acetato de etilo se le agrega ácido trifluoracético no se observan cambios en el comportamiento voltamperométrico de PAT.

Por otro lado, dado que la concentración más baja medida experimentalmente en la matriz real, es de $46 \mu\text{g L}^{-1}$ (ppb), si se realizan extracciones utilizando volúmenes más grandes de jugos, sería posible disminuir el límite de detección de la técnica, aunque también aumentaría la cantidad de compuestos polifenólicos en dicha matriz, haciendo que el electrodo sea más proclive al fenómeno de pasivación.

CAPITULO 6

6. Conclusiones

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se aportó información original sobre el mecanismo de reducción electroquímica de la micotoxina patulina sobre electrodos de carbono vítreo, tanto en medio no acuoso neutro (acetonitrilo + 0,1 M perclorato de tetrabutil amonio) como en medio no acuoso ácido (acetonitrilo + 0,1 M perclorato de tetrabutil amonio + distintas alícuotas del ácido trifluor acético). En ambos medios, el proceso de electrodo es controlado por difusión, con reacción/s química/s acopladas al proceso de transferencia de carga. Se determinó que el número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica en medio no acuoso neutro es uno.

Se observó que el pico de reducción se desplaza a potenciales menos negativos en la medida que la concentración de ácido aumenta, alcanzando una diferencia de potencial de aproximadamente 0,230 V para una concentración de ácido del doble que la de patulina, con un aumento en corriente de aproximadamente 1,2 veces.

Se realizó la determinación cuantitativa de PAT en ambos medios de reacción (neutro y ácido), obteniendo como límites de detección 107 y 45,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) (definido como la señal mínima medida para una relación señal/ruido de 3:1) para el medio neutro y el ácido, respectivamente. Así, y considerando el menor de estos valores, 45,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb), el límite de detección es ligeramente menor que el límite máximo permitido por las legislaciones de Estados Unidos [34] y Europa [35] para jugos de frutas.

Por otro lado, se estudió la reducción del 5-hidroximetilfurfural, que habitualmente se encuentra presente en las matrices reales junto con patulina y es, además, extraído conjuntamente con ella cuando se utiliza como solvente de extracción el acetato de etilo. Se demostró, que tanto en el medio neutro como en medio ácido, se obtiene una buena separación entre los picos de patulina y 5-hifroximetilfurfural (\cong 0,320 V).

Con estos resultados se analizaron jugos de manzana, considerados como ejemplos típicos de matrices reales. Dado que se trata de una matriz sumamente compleja, previo a la determinación electroanalítica, patulina necesita ser extraída de los jugos utilizando acetato de etilo como solvente de extracción. Luego de evaporar dicho solvente, la

matriz fue redisuelta en acetonitrilo + 0,1 M de hexafluorofosfato de tetrabutil amonio y determinada mediante voltamperometría de onda cuadrada. Con la metodología propuesta se realizaron ensayos de recuperación de patulina en la matriz contaminada.

Por último, se demostró la factibilidad de la determinación cuantitativa de patulina y 5-hidroximetilfurfural sobre electrodos de carbono vítreo, para ser aplicada como método de screening en el análisis de jugos de manzana.



CAPITULO 7

7. Referencias

-
- [1] L. A. Goldblatt, *Clin. Toxicol.*, **5** (1972) 453.
- [2] J. W. Dorner, *Chromatographic Analysis of Mycotoxins*. En: T. Shibamoto (Ed.), *Analysis of Environmental and Food Toxicants*, Marcel Dekker, N. Y., (1998) 113-168.
- [3] J. W. Bennett, M. Klich., *Clin. Microbiol. Rev.*, **16** (2003) 497.
- [4] M. O. Moss, *The Environmental Factors Controlling Mycotoxin Formation*, en: J. E. Smith, R. S. Henderson (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press. Boca Raton, (1991) 37-56.
- [5] A. Cameán, M. Repetto, *Estado Actual de la Toxicología Alimentaria*, en: M. Reppeto (Ed.), *Toxicología Avanzada*, Díaz de Santos, Madrid, (1997) 205-292.
- [6] E. M. Faustman, G. S. Omenn, *Evaluación del Riesgo* en: Casarett y Doull. (Eds.) *Fundamentos de toxicología*. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, (2005) 50-61.
- [7] R. M. Martínez-Larrañaga, A. Anadón, A, *Micotoxinas*, en: A. M. Cameán, M.Repetto (Eds.), *"Toxicología Alimentaria"*, Díaz de Santos, Madrid, (2006) 289-309.
- [8] T. Kuipper-Goodman, *Approaches to the Risk Analysis of Mycotoxins in the Food Supply*, FNA/ANA, **23** (1999) 10-16.
- [9] Internacional Agency for Research on Cancer (IARC), 2006. Disponible en: <http://www.iarc.fr>.
- [10] T. B. Whitaker, J. W. Dieckens, R. J. Monroe, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49** (1974) 590.
- [11] NOM-188-SSA1, 2000.
- [12] W. Horwitz, *Anal. Chem. A*, **54** (1982) 67.
- [13] R. A. Falleiros de Pádua, M. M. Junior., *Ciencias Agrárias*, **26** (2005) 535.
- [14] E. Bonerba, R. Conte, E. Ceci, G. Tantillo, *J. of Food Sci.*, **75** (2010) 123.
- [15] M. M. Moake, O. L. Padilla-Zakour, R. W. Worobo, *Compr. Rev. in Food Sci. and F.*, **1** (2005) 8.
- [16] S. Bräse, A. Encinas, J. Keck, C. Nising, *Chem. Rev.*, **109** (2009) 3903.

- [17] S. J. Nunes da Silva, P. Z. Schuch, C. R. Bernardi, M. Henning Vainstein, A. Jablonski, R. J. Bender, *Rev Bras. Frutic., Jaboticabal*, **29** (2007) 406.
- [18] J. M. Soriano del Castillo y col. *Capítulo 12: Patulina*. En: *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos, (2007) 239-254.
- [19] N. Delage, A. D'Harlingue, B. Colonna Ceccaldi, G. Bompeix, *Food Control*, **14** (2003) 225.
- [20] M. Appel, M. A. Dombrink-Kurtzman, D. F. Kendra, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **894** (2009) 23.
- [21] L. L. Wallen, A. J. Lyons, T. G. Pridham, *The Journal of Antibiotics*, **33** (1980) 767.
- [22] C. R. Hubbard, A. D. Mighell, *Acta Cryst. B*, **33** (1977) 928.
- [23] E. M. S. M. Gaspar, A. F. F. Lucena, *Food Chem.*, **114** (2009) 1576.
- [24] H. Morales, V. Sanchis, J. Coromines, A. J. Ramos, S. Marín, *Food Microbiol.*, **25** (2008) 378.
- [25] K. Baert, B. D. Meulenaer, Ch. Kasase, A. Huyghebaert, W. Ooghe, F. Devlieghere, *Food Chem.*, **100** (2007) 1278.
- [26] S. Marín, H. Morales, H. Hasan, A. J. Ramos, V. Sanchis, *Food Addit. and Contam.*, **23** (2006) 1316.
- [27] R. Mahfoud, M. Maresca, N. Garmy, J. Fantini, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **181** (2002) 209.
- [28] J. Hopkins, *Food and Chem. Toxicol.*, **31** (1993) 455.
- [29] G. Wichmann, O. Herbarth, I. Lehmann, *Env. Toxicol.*, **17** (2002) 211.
- [30] G. Selmanoglu, *Food and Chem. Toxicol.*, **44** (2006) 2019.
- [31] W. Arafat, M. Musa, *Res. Communic. in Mol. Pathol. and Pharmacol.*, **87** (1995) 177.
- [32] A. Sant'Ana, A. Rosenthal, P. Rodríguez de Massaguer, *Food Res. Int.*, **41** (2008) 441.
- [33] D. P. Morgavi, H. Boudra, J. P. Jouany, D. Graviou, *J. Agric. Food Chem.*, **51** (2003) 6906.
- [34] FDA - United States Food and Drug Administration. "*Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products*". (2001). Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/patubck2.html>.

- [35] Comisión Regulation (EC) N° 1881/2006, “*setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*”, Diciembre de 2006.
- [36] G. J. Funes, S. L. Resnik, *Food Control*, **20** (2009) 277.
- [37] M. O. Moss, M. T. Long, *Food Addit. and Contam. A*, **19** (2002) 387.
- [38] A. Ciegler. *Patulin*. En: United Status-Japan natural resources program mycotoxins in human and animal health. Pack forest South, IL. Patotox Publishers, (1977) 609.
- [39] S. Collin, E. Bodart, C. Badot, A. Bouseta, S. Nizet, *Journal of The Institute of Brewing*, **114** (2008) 167.
- [40] R. Fliege, M. Metzler, *Chem. Res. Toxicol.*, **13** (2000) 363.
- [41] E. E. Stinson, S. F. Osman, C. N. Huhtanen, D. D. Bills, *Applied and Enviornmental Microbiology*, **36** (1978) 620.
- [42] J. Sekiguchi, T. Shimamoto, Y. Yamada, G. M. Gaucher, *Applied and Enviornmental Microbiology*, **45** (1983) 1939.
- [43] A. Ricelli, F. Baruzzi, M. Solfrizzo, M. Morea, F. P. Fanizzi, *Applied and Enviornmental Microbiology*, **73** (2007) 785.
- [44] R. Cabrera de Oliveira, E. Bando, M. Machinski, *Braz. J. of Microbiol.*, **38** (2007) 304.
- [45] G. S. Sheppard, N. L. Leggott, *J. Chromatogr. A*, **882** (2000) 17.
- [46] M. L. Martins, A. Gimeno, H. M. Martins, F. Bernardo, *Food Addit. Contam.*, **19** (2002) 568.
- [47] A. Gimeno and M. Martins, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66** (1983) 85.
- [48] J. E. Welke, M. Hoeltz, H. A. Dottori and I. B. Noll, *Ciencia Rural*, Santa Maria, **39** (2009) 300.
- [49] S. C. Cunha, M. A. Faria, J. O. Fernandes, *Food Chem.*, **115** (2009) 352.
- [50] A. Moukas, V. Panagiotopoulou and P. Markaki, *Food Chem.*, **109** (2008) 860.
- [51] A. R. Brause, M. W. Trucksess, F. S. Thomas, S. W. Page, *J. of AOAC Int.*, **79** (1996) 451.
- [52] A. de Souza Sant`Ana, A. Rosenthal, P. Rodriguez de Massaguer., *Food Res. Int.*, **41** (2008) 441.
- [53] S. MacDonald, M. Long, J. Gilbert, *J. AOAC Int.*, **83** (2000) 1387.
- [54] R. R. Rovira, F. Rivera, V. Sanchis, R. Canela, *J. Agric. Food Chem.*, **41** (1993) 214.

- [55] P. Wasicki, F. Scholz, K. D. Schleinitz, *Pharmazie*, **41** (1986) 843.
- [56] L. J. McElroy, C. M. Weiss, *Can. J. Microbiol.*, **39** (1993) 861.
- [57] F. Sheu, O. Lee, Y. T. Shyu, *J. Food and Drug Anal.*, **7** (1999) 65.
- [58] H. Mhadhbi, S. Benrejeb, A. Martel, *Food Addit. and Contam.*, **22** (2005) 1243.
- [59] *Organic Electrochemistry, an introduction and guide*, Edited by H. Lund and M. M. Baizer. 3^o Edicion MARCEL DEKKER, INC, 1991.
- [60] A. J. Wain, G. G. Wildgoose, CH. G. R. Heald, L- Jiang, T. G. J. Jones, R. Compton, *J. Phys. Chem. B*, **109** (2005) 3971.
- [61] K. Izutsu, en: *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*, Wiley-VCH, Verlag Gmbh & Co. KGaA, 2002.
- [62] A. Lasia, A Rami, *Can. J. Chem.*, **65** (1987) 744.
- [63] C. M. Brett, A. M. Oliveira Brett, "Electrochemistry principles, Methods and Applications" Oxford Science Publications, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [64] J. Wang, en: *Analytical Electrochemistry*, 3er. Ed., Hoboken, New Jersey, USA, 2006.
- [65] A. J. Bard, L. R. Faulkner, en: "*Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*", 2nd, J. Wiley, New York, 2001.
- [66] J. E. B. Randles, *Trans. Faraday Soc.*, **44** (1948) 327.
- [67] A. Sevcik, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **13** (1948) 349.
- [68] R. S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.*, **36** (1964) 706.
- [69] R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, **37** (1965) 1351.
- [70] J. C. Imbeaux, J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **44** (1973) 169.
- [71] A. J. Bard, K. S. V. Santhanam, *J. Electroanal. Chem.*, **4** (1970) 215.
- [72] G. C. Barker, I. L. Jenkins, *Analyst.*, **77** (1952) 685.
- [73] M. Kalousek, *Czech. Chem. Comm.*, **13** (1948) 105.
- [74] W. Kemula, *Collect. Czech. Chem. Comm.*, **2** (1930) 502.
- [75] a) M. Ishibashi, T. Fujinaga, *Bull, Chem. Soc. Jpn.*, **23** (1950) 261; b) M. Ishibashi, T. Fujinaga, *Bull, Chem. Soc. Jpn.*, **25** (1952) 68; c) M. Ishibashi, T. Fujinaga, *Bull, Chem. Soc. Jpn.*, **25** (1952) 233.
- [76] T. Kambara, *Chem. Soc. Jpn.*, **27** (1954) 527.

- [77] G. C. Barker, en: *Advances in Polarography*, I. S. Longmuir (Ed.), Pergamon Press, New York, (1960) 144.
- [78] L. Ramaley, M. S. Krause, Jr., *Anal. Chem.*, **41** (1969) 1362.
- [79] J. Osteryoung, J. J. O'Dea, en: *Square Wave Voltammetry*, en: A. J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York. Vol 14, 1987.
- [80] S. C. Rifkin, D. H. Evans, *Anal. Chem.*, **48** (1976) 1616.
- [81] J. H. Christie, J. A. Turner, R. A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **49** (1977) 1899.
- [82] D. M. Anjo, M. Kahr, M. M. Khodabakhsh, S. Nowinski and M. Wanger, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2603.
- [83] C. P. Andrieux, L. Nadjo, J. M. Saveant, *J. Electroanal. Chem.*, **26** (1970) 147.
- [84] C. P. Andrieux, L. Nadjo, J. M. Saveant, *J. Electroanal. Chem.*, **42** (1973) 223.
- [85] M. A. Zon, M. B. Moressi, L. E. Sereno, H. Fernández, *Bol. Soc. Chil. Quím.*, **39** (1994) 139.
- [86] V. Gokmen, H. Z. Senyuva, *J. Agric. Food Chem.*, **54** (2006) 2845.
- [87] E. Teixido, O. Nuñez, F. J. Santos, M. T. Galceran, *Food Chem.*, **126** (2011) 1902.
- [88] G. Boonzaaijer, I. Bobeldijk, W. A. Van Osenbruggen, *Food Control*, **16** (2005) 587.
- [89] E. O. Reyes-Salas, J. A. Manzanilla-Cano, M. H. Barceló-Quintal, D. Juárez-Mendoza, M. Reyes-Salas, *Anal. Lett.*, **39** (2006) 161.
- [90] N. Spano, L. Casula, A. Panzanelli, M. I. Pilo, P. C. Piu, R. Scanu, A. Tapparo, G. Sanna, *Talanta*, **68** (2006) 1390.
- [91] Alinorm 01/25 (2001). *Codex Alimentarius*.
- [92] Directiva 2001/110/EC del 20 de diciembre de 2001 (2001). *Official Journal of the European Communities*.
- [93] V. Gokmen, H. Senyuva, *J. Agric. Food Chem.*, **54** (2006) 2845.
- [94] V. Gokmen, J. Acar, *J. Chromatogr. A*, **847** (1999) 69.
- [95] A. Dekasky, J. Stevanovic, R. Stevanovic, B. Z. Nikolic, V. M. Jovanovic. *Carbon*, **39** (2001) 1195.
- [96] P. M. Scout, E. Somers, *J. Agr. Food Chem.*, **16** (1968) 483.
- [97] R. E. Brackett, E. H. Marth, *Z. Lebensm Unters Forsch*, **169** (1979) 92.
- [98] S. Drusch, S. Kopka, J. Kaeding, *Food Chem.*, **100** (2007) 192.

- [99] V. I. Pedroni, P. C. Schulz, M. E. Gschaider, N. Andreucetti, *Colloid Polym. Sci.*, **282** (2003) 100.
- [100] X. Ye, Q. Yang, Y. Wang, N. Li, *Talanta*, **47** (1998) 1099.
- [101] J. Cruz, M. Kawasaki, W. Gorski, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 680.
- [102] R. A. Zangmeister, J. J. Park, G. W. Rubloff, M. J. Tarlov, *Electrochim. Acta*, **51** (2006) 5324.
- [103] V. Gokmen, J. Acar, *J. Chromatogr. A*, **847** (1999) 69.



U N R C
Biblioteca Central



71174

71174