

DONACION

Don: tesis

Exp

Inv N: 71409

71409



IMP. N.º
Clasif:
T-798
Clasif:
IMP. N.º



71409



Universidad Nacional de Rio Cuarto



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

“Estudios del mecanismo de reacción electroquímica de flavonoides. Aplicación de técnicas electroanalíticas para su determinación en productos alimenticios. Sensores electroquímicos.”

Lic. Alvaro Yamil Tesio

**Directora: Dra. María Alicia Zon
Co-director: Dr. Héctor Fernández**

Marzo de 2013

21 de Marzo de 2013

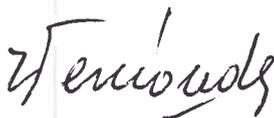
El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas.

Directora de tesis:



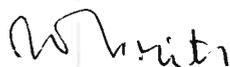
Dra. María Alicia Zon

Co-Director de tesis:



Dr. Héctor Fernández

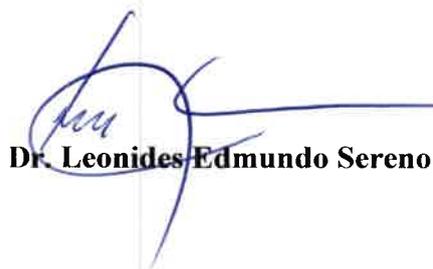
Aprobada por el Jurado:



Dra. María Inés Florit



Dr. Jorge Federico Magallanes



Dr. Leonides Edmundo Sereno

RESUMEN

En este trabajo de Tesis Doctoral se aporta información original acerca de las propiedades electroquímicas de los flavonoides morina, buteina y luteolina en medios acuosos, como así también el desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de luteolina en muestras reales, como son, las cáscaras de maní y un suplemento dietario.

Los estudios concernientes a la oxidación electroquímica de los flavonoides mencionados se realizaron sobre electrodos de carbono vítreo y, en el caso de luteolina, sobre electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple dispersos en polietilenimina. Para cada flavonoide se determinaron las condiciones óptimas de estudio (pH, tiempos de acumulación, potenciales de acumulación, etc.). Las técnicas electroquímicas empleadas fueron: cronoculometría de doble pulso de potencial, voltamperometrías cíclica, de convolución y de onda cuadrada; además, se utilizó la técnica de espectroscopía uv-visible para la determinación de las constantes de acidez aparentes y el poder antioxidante y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la determinación y cuantificación de luteolina.

En lo relacionado a la determinación electroanalítica de luteolina, tanto en el suplemento dietario, como en cáscaras de maní, los resultados obtenidos fueron comparados con las determinaciones equivalentes realizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia y con resultados previamente informados, disponibles en la bibliografía, obteniéndose valores similares, pero de una forma más rápida y menos costosa. Para implementar esta metodología, luteolina fue extraída mediante extracciones simples y filtrados, utilizando metanol.

Como herramienta analítica, complementaria a los estudios de cuantificación de luteolina mediante voltamperometría de onda cuadrada en el suplemento dietario, que presenta como interferente al flavonoide rutina y cuya señal voltamperométrica muestra solapamiento con la señal de luteolina, se utilizaron redes neuronales artificiales, lo que permitió realizar exitosamente la determinación de ambos flavonoides.

ABSTRACT

In this PhD Thesis original information was provided about the electrochemical properties of flavonoids morin, butein and luteolin in aqueous media, and the development of an electroanalytical methodology for the determination of luteolin in real samples, such as peanut shells and a dietary supplement.

Studies concerning the electrochemical oxidation of flavonoids mentioned previously were performed at glassy carbon electrodes and, in the case of luteolin, at modified glassy carbon electrodes with multi-walled carbon nanotubes dispersed in polyethyleneimine. Optimal experimental conditions were determined (pH, accumulation time, accumulation potential, etc.) for each flavonoid. Electrochemical techniques used were: double potential step chronocoulometry and cyclic, convolution and square wave voltammetries. In addition, uv-visible spectroscopy was used for the determination of the apparent acidity constants and antioxidant power. High performance liquid chromatography (HPLC) was used for the determination and quantification of luteolin.

Regarding electroanalytical determination of luteolin in the dietary supplement, and in peanut shells, results obtained were compared with equivalent determinations performed by high performance liquid chromatography and with previously reported results available in the literature, obtaining similar values, but in a faster and less expensive way. To implement this methodology, luteolin was extracted through simple extraction using methanol.

In addition, a complementary analytical tool, i.e. artificial neural networks on square wave voltammetry data, was used for the quantification of luteolin in the dietary supplement. This was based on the fact that dietary supplement contains rutin as an interference for the luteolin determination, considering that the voltamperometric signals of both flavonoids are overlapped. This analytical methodology allowed a successful determination of both flavonoids.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Estudiar los mecanismos de oxidación/reducción de flavonoides y desarrollar metodologías electroanalíticas para la determinación de estos compuestos en alimentos.

Objetivos Específicos

- Estudiar el mecanismo de reacción electroquímica de algunos flavonoides, particularmente, los de morina, luteolina y buteina, sobre electrodos de diferentes materiales.
- Implementar técnicas electroanalíticas, particularmente, las técnicas de pulso y la voltamperometría de redisolución (“stripping”) con acumulación adsortiva, para la determinación de flavonoides.
- Estudiar y desarrollar sensores electroquímicos destinados al análisis cuali y cuantitativo de flavonoides.

HIPÓTESIS

- En función de los datos conocidos de bibliografía se espera obtener propiedades electroquímicas más específicas y poderes antioxidantes aceptables para los flavonoides morina, buteina y luteolina.
- Teniendo en cuenta los grupos funcionales presentes en las fórmulas químicas de morina, buteina y luteolina, se espera que estas sustancias interactúen con la superficie de electrodos de carbón vítreo, dado que es bien conocido que la superficie de electrodos de esta naturaleza presentan grupos funcionales que contienen átomos de oxígeno, que pueden interaccionar mediante distintas fuerzas intermoleculares con grupos de la naturaleza presente en los flavonoides citados.
- De satisfacerse la hipótesis previa, se espera poder desarrollar técnicas electroanalíticas basadas en la acumulación adsorptiva, como una alternativa más simple y económica a las actuales en vigencia, para la determinación de los flavonoides citados en matrices reales.

Durante el transcurso de esta tesis doctoral, se obtuvieron los siguientes resultados:

a) Publicaciones en revistas con referato

1) A. Y. Tesio, A. M. Granero, H. Fernández, M. A. Zon.

“Characterization of the surface redox process of adsorbed morin at glassy carbon electrodes”

Electrochim. Acta, **56** (2011) 2321-2327.

2) A. Y. Tesio, S. N. Robledo, H. Fernández, M. A. Zon.

“Electrochemical oxidation of butein at glassy carbon electrodes”

Bioelectrochem., **91** (2013) 62-69.

3) J. M. Abad, A. Y. Tesio, F. Pariente, E. Lorenzo.

“Scaling down of Scanning Electrochemical Microscopy to the nanoscale level achieving Single-molecule imaging resolution.”

(2013), enviado.

4) S. N. Robledo, A. Y. Tesio, C. D. Ceballos, M. A. Zon, H. Fernández.

“Quantification of synthetic and natural antioxidants in edible vegetable oils using electrochemical ultra-microsensors.”

(2013), enviado.

5) A. Y. Tesio, A. M. Granero, N. Vettorazzi, N. F. Ferreyra, G. A. Rivas, H. Fernández, M. A. Zon.

“Development of an electrochemical sensor for the determination of the flavonoid luteolin in peanut samples using glassy carbon electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine”

(2013), en redacción.

6) A. Y. Tesio, S. N. Robledo, A. M. Granero, H. Fernández, M. A. Zon.

“Simultaneous electroanalytical determination of luteolin and rutin using artificial neural networks.”

(2013), en redacción.

b) Presentaciones a Congresos y/o Reuniones Científicas

II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica, Buenos Aires, 27 al 30 de Agosto de 2007

1) E. A. Ramírez, M. A. Granero, A. Y. Tesio, N. R. Vettorazzi, H. Fernández, M. A. Zon.

“Influencia del pre-tratamiento sobre electrodos de carbono vítreo en la obtención de datos electroanalíticos”

2) A. Y. Tesio, A. M. Granero, H. Fernández, M. A. Zon.

“Oxidación electroquímica de la morina. Su determinación mediante voltamperometría de onda cuadrada”

XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, Salta Argentina, 18 al 21 de Mayo de 2009.

3) A. Y. Tesio, H. Fernández, M. A. Zon.

“Nuevos aportes relacionados con la oxidación electroquímica de morina”

4) A. Y. Tesio, S. N. Robledo, A. M. Granero, H. Fernández, M. A. Zon.

“Determinación de las constantes de acidez de morina mediante un método de ajuste de cuadrados mínimos no-lineales”

V Congreso Argentino de Química Analítica, Bahía Blanca, Argentina, 2 al 6 de Noviembre de 2009.

5) A. Y. Tesio, H. Fernández, M. A. Zon.

“Adsorción de morina sobre electrodos de carbono vítreo”

XIX Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica (SIBAE) y XXXI Reunión de la Real Sociedad Española de Química, Alcalá de Henares, España, 27 de Junio al 2 de Julio de 2010.

6) A. Y. Tesio, H. Fernández, M. A. Zon.

“Oxidación electroquímica de buteina sobre electrodos de carbono vítreo”

XXVIII Congreso Argentino de Química 4to Workshop de química Medicinal. Lanús, 13 al 16 de septiembre de 2010.

7) S. N. Robledo, A. Y. Tesio, H. Fernández, M. A. Zón.

“Determinación de las constantes de acidez de antioxidantes polifenólicos mediante un método de ajuste de cuadrados mínimos no-lineales ”

XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. 3 al 6 de Mayo de 2011, Córdoba, Argentina.

8) A. Y. Tesio, H. Fernández, M. A. Zon.

“Comportamiento electroquímico del antioxidante luteolina sobre electrodos de carbono vítreo”

9) A. Y. Tesio, J. M. Abad, M. E. Lorenzo.

“Fabricación de nanoelectrodos metálicos para su utilización en el desarrollo y caracterización de plataformas nanoestructuradas enzimáticas mediante la microscopía de barrido electroquímico (SECM)”

5to. Congreso Iberoamericano de Química Analítica y 2do. Congreso Uruguayo de Química Analítica. 7 al 10 de octubre de 2012, Montevideo, Uruguay.

10) A. Y. Tesio, A. M. Granero, H. Fernández, N. F. Ferreyra, G. A. Rivas, M. A. Zon

“Desarrollo de un método electroquímico para la cuantificación del antioxidante luteolina.”

Agradecimientos...

- **A mi familia, por todo.**
- **A la persona que elegí para mi vida... y por suerte me eligió también.**
- **A mis amigos, por definición!**
- **A Mi Universidad.**
- **A mis compañeros de mucho, por el día a día.**
- **A mis colegas químicos, por estar, siempre!**
- **A muchos docentes-investigadores que admiro.**
- **A muchos buenos “no” docentes por compartir el saber cómo hacer más fácil la cosa.**
- **A mis camaradas políticos, por la otra visión, la importante.**
- **A la Universidad Autónoma de Madrid por recibirme en esa gran experiencia.**
- **A CONICET y Fundación Carolina por las Becas otorgadas.**

“Estudios del mecanismo de reacción electroquímica de flavonoides. Aplicación de técnicas electroanalíticas para su determinación en productos alimenticios. Sensores electroquímicos.”

Lic. Alvaro Yamil Tesio

“Desde el comienzo de la humanidad, en el mismo paraíso terrenal de Adán y Eva, allí ya estaban los flavonoides engalanando con sus colores ese idílico jardín celestial, y hasta en la jugosa manzana de color rojo con la que nuestra madre Eva sedujo a nuestro abuelo Adán, los flavonoides estaban participando de nuestro pecado original.

En todas partes de la historia de la humanidad los flavonoides han sido testigos y actores de muchas desgracias, momentos heroicos, alegrías, etc. Al leer a los antiguos filósofos, poetas y escritores, se pone de manifiesto que en el enamoramiento de la mujer siempre han participado las flores de agradable aroma y de hermosos colores, esto quiere decir sin más preámbulos que no ha existido mujer alguna sobre la tierra que no haya sucumbido ante la presencia de los flavonoides de unas bonitas rosas rojas, un ramo de violetas o un pensamiento. No hay nada que más agrade a una mujer que las flores, parece ser que ellas tienen una percepción cerebral más desarrollada que nosotros hacia este tipo de sustancias.

Las casas y palacios más bellos han sido no los que ostentan grandes desarrollos arquitectónicos, sino los que poseen los más variados, coloridos y exóticos jardines. En este sentido, los flavonoides han sido privilegiados al ocupar los sitios más importantes para un rey, un noble ó un plebeyo. Si se mira bien una flor es tan bella en un palacio como en un comedor humilde.

Los flavonoides han sido testigos indirectos de momentos como el 20 de Julio de 1810, cuando en la entonces ciudad de Santafé de Bogotá (Colombia), una riña entre un español y un criollo por un florero, sirvió de punto de partida para que se diese el grito de independencia. Aunque los flavonoides de las flores que iban a adornar este florero nunca lo llegaron a tocar, allí estaban listos para cambiar la historia de un país.

Los flavonoides siempre han estado de alguna manera en sitios privilegiados, y bien podrían ufanarse de ello. Para las plantas además del encantador adorno que dan a su ropaje, les sirven de cosmético. Las plantas como todo lo bello son vanidosas. Estas sustancias además de cambiar de colores y adornar las plantas durante toda su vida, son un maquillaje sutil para protegerse de los rayos solares dañinos. Sí, las plantas usan flavonoides para eliminar ciertas radiaciones indeseables y filtrar otras que junto con las clorofilas trabajan en llave en el proceso de la fotosíntesis. Los flavonoides han estado en todas las mesas y comedores desde los primeros hombres y animales en el planeta. En mesas de reyes y plebeyos. Quién no se ha quedado mirando algún momento una mesa revestida y adornada con uvas rojas y verdes, con fresas, con moras, con manzanas, con bananos, con jugosas sandías. Pero ellos no solo están en hermosas flores y agradables frutas, están en alimentos de pobres y ricos como las verduras. Aunque no los vemos con sus

festivos colores porque sus parientes más famosas como son las clorofilas con su manto verde las opacan, pero si nuestra visión lograra filtrar y eliminar el color verde que apreciamos cuando miramos una planta verde, sin duda podríamos reconocerlos. Sí amigo lector, esta es otra buena razón para preferir las comidas a base de vegetales, las espinacas además de hierro contienen vitaminas y flavonoides. Los jugos de frutas como moras, fresas, uvas negras o rojas,

cerezas, etc., todos contienen flavonoides, y los hemos consumido casi a diario, y más adelante trataré de mostrar lo bueno que es consumir flavonoides para mantener nuestra salud, y hasta donde he leído, para prevenir y tratar varias enfermedades, y espero convencerlo de que esas bebidas con colorantes y saborizantes artificiales no son tan saludables como las bebidas naturales con flavonoides.”

Alejandro Martínez M., Químico M. Sc., Doctor en Ciencias, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, Septiembre 2005.

Considero a cada hombre como un deudor de su profesión, y ya que de ella recibe sustento y provecho, así debe procurar mediante el estudio servirle de ayuda y ornato.

Francis Bacon

ÍNDICE

<u>GLOSARIO</u>	<u>7</u>
<u>CAPITULO 1.....</u>	<u>11</u>
<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>11</u>
1.1. GENERALIDADES	11
1.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	13
1.3. ESTRUCTURA	16
1.4. BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES	18
1.5. FLAVONOIDES ESTUDIADOS EN ESTA TESIS.....	19
1.5.1. MORINA	20
1.5.2. BUTEINA	20
1.5.3. LUTEOLINA	21
1.6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES	22
1.6.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	22
1.6.1.1. Condiciones cromatográficas	23
1.6.1.2. Detección	23
1.6.1.3. Preparación de la muestra	24
1.6.2. MÉTODOS NORMALMENTE MENOS UTILIZADOS.....	25
1.6.2.1. Cromatografía en capa fina	25
1.6.2.2. Cromatografía gaseosa	26
1.6.2.3. Electroforesis capilar.....	26
1.6.2.4. Espectrofotometría	28
1.6.3. DISCUSIÓN.....	28
1.6.4. EMPLEO DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN EL ESTUDIO DE FLAVONOIDES	30
1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
<u>CAPITULO 2.....</u>	<u>45</u>
<u>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</u>	<u>45</u>
2.1. ELECTROQUÍMICA	45
2.1.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS EN ELECTROQUÍMICA. MODELOS DE PROCESOS	45
2.1.1.1. Conceptos generales.....	45

2.1.1.2. Variables electroquímicas	45
2.1.1.3. Procesos de electrodo	46
2.1.1.3.1. Procesos faradaicos	47
2.1.1.3.2. Procesos no faradaicos	47
2.1.1.4. Reversibilidad en Electroquímica.....	49
2.1.1.4.1. Reversibilidad termodinámica.....	50
2.1.1.4.2. Reversibilidad química.....	50
2.1.1.4.3. Reversibilidad práctica.....	51
2.1.1.5. Fenómenos de transporte en una celda electroquímica	52
2.1.1.5.1. Transporte migratorio.....	54
2.1.1.5.2. Transporte convectivo	54
2.1.1.5.3. Transporte por difusión	55
2.1.1.6. Relación entre potencial y corriente	56
2.1.1.7. Técnicas electroquímicas	60
2.1.1.7.1. Cronoamperometría y cronoculometría.....	60
2.1.1.7.2. Voltamperometría cíclica	66
2.1.1.7.2.1. Sistemas controlados por difusión.....	66
2.1.1.7.2.2. Sistemas controlados por adsorción	70
2.1.1.7.2.3. Sistemas que presentan un control mixto: difusión/adsorción	73
2.1.1.7.3. Voltamperometría de convolución	73
2.1.1.7.4. Voltamperometría de onda cuadrada.....	75
2.1.1.7.4.1. Introducción.....	75
2.1.1.7.4.2. Teoría de la voltamperometría de onda cuadrada.....	78
2.1.1.7.4.2.1. Sistemas controlados por difusión.....	78
2.1.1.7.4.2.2. Sistemas controlados por adsorción	82
2.1.1.8. Adsorción en Electroquímica	87
2.1.1.8.1. Introducción.....	87
2.1.1.8.1.1. Aspectos especiales de la adsorción a partir de soluciones	87
2.1.1.8.1.2. Adsorción física y quimisorción.....	89
2.1.1.8.2. Ecuaciones de estado e isothermas.....	91
2.1.1.8.2.1. Definiciones.....	91
2.1.1.8.2.2. Conversión de una ecuación de estado a isothermas.....	93
2.1.1.8.3. Isothermas	94
2.1.1.8.3.1. Isotherma de Langmuir	94
2.1.1.8.3.2. Isotherma de Frumkin	94
2.1.1.8.3.3. Isotherma de Temkin.....	95
2.1.1.8.3.4. Otras isothermas de adsorción.....	96
2.2. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE Y PRINCIPIOS DE QUIMIOMETRÍA	96
2.2.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ APARENTES.....	96
2.2.2. RESOLUCIÓN MULTIVARIADA DE CURVAS. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE MÍNIMOS CUADRADOS ALTERNADOS (MCR-ALS).....	99
2.2.2.1. Determinación del número de componentes	100

2.2.2.2. Construcción de la estimación inicial.....	101
2.2.2.3. Parámetros de calidad del ajuste	103
2.3. REDES NEURONALES ARTIFICIALES (RNA).....	104
2.3.1. INTRODUCCIÓN.....	104
2.3.2. ENTRADAS Y PESOS	105
2.3.3. FUNCIÓN DE PROPAGACIÓN.....	106
2.3.4. FUNCIÓN DE ACTIVACIÓN O TRANSFERENCIA	106
2.3.5. ESCALAMIENTO Y LIMITACIÓN.....	107
2.3.6. FUNCIÓN DE SALIDA (COMPETITIVIDAD)	108
2.3.7. FUNCIÓN DE ERROR Y EL VALOR PROPAGADO HACIA ATRÁS.....	108
2.3.8. TASA DE APRENDIZAJE	108
2.3.9. ARQUITECTURAS DE REDES NEURONALES	109
2.3.10. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	110
2.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
<u>CAPITULO 3.....</u>	<u>117</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>117</u>
3.1. SOLVENTES.....	117
3.2. REACTIVOS	118
3.3. SOLUCIONES	118
3.3.1 EXTRACTOS Y SOLUCIONES DE LUTEOLINA	119
3.3.1.1. Preparación de extractos para cuantificación de luteolina en cáscaras de mani.....	119
3.3.1.2. Preparación de extractos para cuantificación de luteolina en suplemento dietario	119
3.4. CELDA ELECTROQUÍMICA.....	120
3.5. ELECTRODOS	121
3.5.1. ELECTRODOS DE TRABAJO DE CARBONO VÍTREO.....	121
3.5.1.1. Electrodo de carbono vítreo.....	122
3.5.1.2. Electrodo de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple dispersos en polietilenimina.....	122
3.5.2. ELECTRODOS DE REFERENCIA	123
3.5.3. CONTRA-ELECTRODO	125
3.6. EQUIPAMIENTO ELECTROQUÍMICO Y OTROS	125
3.7. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EMPLEADAS	127
3.8. DETERMINACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE. MÉTODO DEL RADICAL DPPH	127
3.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
<u>CAPITULO 4.....</u>	<u>131</u>
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	<u>131</u>

4.1. ESTUDIOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	131
4.1.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ APARENTES.....	131
4.1.1.1. Morina.....	131
4.1.1.2. Buteina.....	136
4.1.1.3. Luteolina.....	140
4.1.1.4. Conclusiones.....	144
4.1.2. DETERMINACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE A TRAVÉS DEL MÉTODO DEL DPPH.....	144
4.1.2.1. Relación EC_{50} para MOR.....	147
4.1.2.2. Relación EC_{50} para BUT.....	147
4.1.2.3. Relación EC_{50} para LUT.....	148
4.1.2.4. Conclusiones.....	149
4.2. ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS.....	149
4.2.1. MORINA.....	149
4.2.1.1. Pre-tratamiento del electrodo de trabajo.....	149
4.2.1.2. Cronoamperometría de doble pulso de potencial.....	151
4.2.1.3. Voltamperometría Cíclica.....	153
4.2.1.3.1. Estudios controlados principalmente por difusión.....	160
4.2.1.3.2. Estudios controlados principalmente por adsorción.....	165
4.2.1.3. Voltamperometría de onda cuadrada.....	169
4.2.1.3.1. Determinación cuantitativa de MOR.....	169
4.2.1.3.2. Estudio de la cupla redox superficial de MOR mediante VOC.....	171
4.2.2. BUTEINA.....	175
4.2.2.1. Voltamperometría Cíclica.....	175
4.2.2.2. Voltamperometría de onda cuadrada.....	181
4.3.1. LUTEOLINA.....	186
4.3.1.1. Voltamperometría cíclica.....	186
4.3.1.2. Voltamperometría de onda cuadrada.....	193
4.3.1.3. Electroquímica sobre electrodos modificados.....	195
4.3.1.3.1. Optimización de las condiciones experimentales.....	195
4.3.1.3.1.1. Potencial de acumulación.....	195
4.3.1.3.1.2. Tiempo de acumulación.....	196
4.3.1.3.1.3. Estudios de comparación de electrodos modificados.....	198
4.3.1.3.2. Curva de calibrado.....	199
4.3.1.3.3. Cálculo de parámetros cinéticos y termodinámicos.....	200
4.3.1.4. Determinación de luteolina y rutina mediante HPLC.....	202
4.3.1.4.1. Curva de calibración de luteolina y rutina mediante HPLC.....	202
4.3.1.5. Cuantificación de luteolina en muestras reales.....	205
4.3.1.5.1. Cuantificación de luteolina en cáscaras de maní.....	205
4.3.1.5.1.1. Estudios electroquímicos.....	205
4.3.1.5.1.2. Determinación de la presencia de luteolina extractos de cáscara de maní mediante HPLC.....	206
4.3.1.5.2. Cuantificación de luteolina en una formulación comercial.....	207

4.3.1.5.2.1. Estudios electroquímicos previos.....	207
4.3.1.5.2.2. Cromatografía en capa fina.....	210
4.3.1.5.2.3. Electroquímica en solución de los extractos.....	212
4.3.1.5.2.4. Determinación electroquímica del contenido de luteolina en los extractos etanólicos.....	216
4.3.1.5.2.5. Determinación del contenido de luteolina en LUTIMAX por HPLC.....	217
4.3.1.5.3. Determinación simultánea del contenido de luteolina y rutina en un suplemento dietario utilizando redes neuronales artificiales.....	218
4.3.1.5.3.1. Preparación de las muestras.....	219
4.3.1.5.3.2. Resultados.....	220
4.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	228
<u>CONCLUSIONES.....</u>	231
<u>ANEXO I.....</u>	235
<u>FABRICACIÓN DE NANO ELECTRODOS METÁLICOS PARA SU UTILIZACIÓN EN EL DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PLATAFORMAS NANOESTRUCTURADAS MEDIANTE MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTROQUÍMICO.....</u>	235
I.1. INTRODUCCIÓN.....	235
I.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	237
I.2.1. PREPARACIÓN DE NANO ELECTRODOS DE PT.....	237
I.2.1.1. Estiramiento del capilar.....	238
I.2.1.2. Inserción del Pt, Cu y contacto.....	238
I.2.1.3. Corte electroquímico.....	239
I.2.1.4. Reducción del área del electrodo.....	240
I.2.1.4.1. Polimerización asistida por temperatura.....	241
I.2.1.4.2. Electropolimerización de fenol.....	241
I.2.2. COMPORTAMIENTO DEL NANO ELECTRODO DE PLATINO COMO “PUNTA” DE UN MICROSCOPIO DE BARRIDO ELECTROQUÍMICO.....	247
I.2.2.1. Ensayos.....	248
I.2.2.2. Cálculos previos.....	250
I.2.2.2.1. Cálculo del área efectiva del electrodo de oro.....	250
I.2.2.2.2. Cálculo del recubrimiento superficial del electrodo de oro.....	251
I.2.2.3. Utilización del electrodo como punta del microscopio de barrido: mapeo de superficies.....	251
I.2.2.3.1. Sensado de plataformas nanoestructuradas.....	252
I.2.2.3.1.1. Modificación de la superficie con nanopartículas pequeñas.....	253
I.3. CONCLUSIONES.....	259
I.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	261

GLOSARIO

ALS: Mínimos cuadrados alternados.

BEF: Benceno:acetato de etilo:ácido acético, (70:25:5).

BUT: Buteina.

Catecol: Hidroxilos en posición orto.

CCDPP: Cronoculometría de doble pulso de potencial.

CE: Electroforesis capilar.

CECM: Cromatografía electrocinética micelar.

CV: Carbono vítreo.

D: Coeficiente de difusión.

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

E : Potencial aplicado al electrodo.

E° : Potencial estándar.

E_f° : Potencial formal.

$E_{1/2}$: Potencial de media onda polarográfico del sistema.

ECS: Electrodo de calomel saturado.

EDAX: Espectroscopia de dispersión de energía de rayos X.

$E_{p,1/2}$: Ancho de pico a la altura media (en voltamperometría cíclica).

$E_{p,a}$: Potencial de pico anódico.

$E_{p,c}$: Potencial de pico anódico.

$E_{p/2}$: Potencial al cual la corriente es la mitad de la corriente de pico.

E_p : Potencial de pico.

F: Constante de Faraday.

f: Frecuencia.

g' : Parámetro que caracteriza la interacción entre las especies adsorbidas.

GC: Cromatografía gaseosa.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

HSCCC: Cromatografía contracorriente de alta velocidad.

I_d : Corriente directa (voltamperometría de onda cuadrada).

I_L : Corriente límite.

I_n : Corriente neta (voltamperometría de onda cuadrada).

$I_{p,a}$: Corriente de pico anódica.

$I_{p,c}$: Corriente de pico catódica.

I_p : Corriente de pico.

I_r : Corriente reversa (voltamperometría de onda cuadrada).

$k_{s,ap}$: Constante de velocidad aparente de la reacción redox superficial.

k_s : Constante de velocidad heterogénea del proceso superficial global.

LC: Cromatografía líquida.

LUT: Luteolina.

MCR: Resolución multivariada de curvas.

MOR: Morina.

MS: Espectrometría de masas.

NMR: Resonancia magnética nuclear.

npAu: Nanopartículas de oro.

NTCPM: Nanotubos de carbono de pared múltiple.

PCA: Potencial de circuito abierto.

PEI: Polietilenimida.

Q: Carga.

Q_{dc} : carga de la doble capa eléctrica.

RNA: Redes neuronales artificiales.

SECM: Microscopía de barrido electroquímico.

SEM: Microscopio electrónico de barrido.

SFC: Cromatografía de fluidos supercríticos.

SVD: Descomposición en valores singulares.

TLC: Cromatografía en capa fina.

t_p : Tiempo de pulso.

UME: Ultramicroelectrodo.

UPLC: Cromatografía líquida de ultra eficiencia.

v : Velocidad de barrido.

VC: Voltamperometría cíclica.

VOC: Voltamperometría de onda cuadrada.

VPD: Voltamperometría de pulso diferencial.

ZEC: Electroforesis capilar de zona.

$(1-\alpha)$: Coeficiente de transferencia anódico.

β : Coeficiente de adsorción.

Γ : Concentración superficial.

ΔE_e : Salto de escalera en voltamperometría de onda cuadrada.

ΔE_{oc} : Amplitud de la onda (voltamperometría de onda cuadrada).

ΔE_p : Separación entre los potenciales de pico anódico y catódico (voltamperometría cíclica).

ϵ : Coeficiente de extinción molar.

Θ : Cubrimiento superficial.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Las plantas, mediante el proceso de la fotosíntesis, producen las sustancias necesarias para todos los ciclos vitales de la naturaleza. Mediante complejos, pero cada vez más conocidos, mecanismos bioquímicos se constituyen en verdaderas fábricas químicas de carbohidratos, proteínas, grasas y vitaminas. Además, mantienen la atmósfera rica en oxígeno y deficiente en dióxido de carbono, permitiéndonos respirar. Las plantas son la base de la cadena alimenticia que soporta todas las demás formas de vida en nuestro planeta. Pero, conjuntamente, producen las sustancias anteriormente mencionadas, las cuales son conocidas como METABOLITOS PRIMARIOS (Fig. 1.1). Dado que se encuentran en, prácticamente, todas las formas de vida y cumplen funciones básicas para la misma, existen otras sustancias que no se encuentran tan distribuidas y que se hallan restringidas sólo a ciertas especies, géneros o familias, como son los alcaloides, las saponinas esteroides, los aceites esenciales, los terpenoides, etc., a los cuales se los denomina METABOLITOS SECUNDARIOS (Fig. 1.1). Dentro de este último grupo, se encuentran los FLAVONOIDES, denominados así porque el primero que se logró aislar fue "citrina", de color amarillo (del latín *flavus*, "amarillo"), en 1930, por el premio Nobel Szent-György, quien lo aisló de la cáscara del limón. En un principio, a los flavonoides se los denominó como vitamina P, por permeabilidad, ya que en 1936, Rusznyak y Szent-Györgi (Rusznyak & Szent-Györgi, 1936), propusieron que los mismos eran un factor esencial de la dieta que contribuía al mantenimiento de la permeabilidad vascular. También se los denominó vitamina C₂, porque, por esas fechas, se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C. Finalmente, nunca se comprobó que pudieran ser vitaminas y, actualmente, no se cree que tengan alguna relación con la permeabilidad vascular. Es por ello que, en la década de 1950, se abandonaron ambas denominaciones (Singleton, 1981). Actualmente, se sabe que hay flavonoides de diversos colores, e incluso incoloros (Martínez, 2005a), también se sabe que se encuentran en todos los tejidos de las plantas superiores (White

& Xing, 1997) y que aproximadamente el 90% se encuentra como su derivado glucósido. La unión con los azúcares se realiza generalmente en la posición C3 y con menor frecuencia en el C7 del anillo A (Ioku y col., 1995).

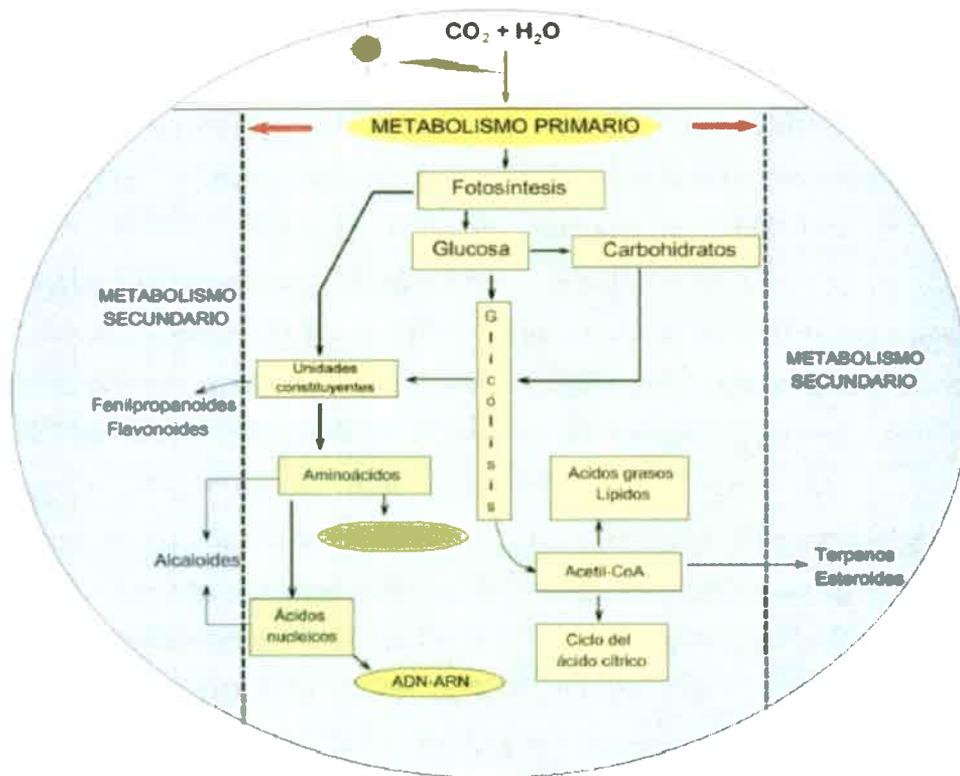


Figura 1.1. Esquema resumido de la síntesis de producción de metabolitos.

La principal función adjudicada a los flavonoides es la de antioxidante, es decir, la capacidad de proteger a los organismos de los daños producidos por diversos agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (Aherne & O'Brien, 2002). Además, poseen también, propiedades anti-alérgicas, anti-agregantes, anti-isquémicas, anti-inflamatorias, anti-bacterianas, anti-fúngicas y anti-tumorales (Chin & Nagaratnam, 1994; Butkovic y col., 2004).

Asimismo, presentan diversas funciones como, por ejemplo, la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, el impacto sobre la regulación

del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras (Stahl y col., 2002).

1.2. Actividad antioxidante

La importancia de los antioxidantes presentes en los alimentos radica en que son capaces de preservar a los alimentos que los contienen y en el aporte “*in vivo*” que hacen, de estos compuestos esenciales, al organismo. Existe un número creciente de datos experimentales, clínicos y epidemiológicos, que demuestran los efectos beneficiosos de los antioxidantes frente a las enfermedades degenerativas, inducidas por el estrés oxidativo y las enfermedades relacionadas con la edad (cáncer y envejecimiento), por lo que se ha generado un gran interés hacia el papel que ejercen los antioxidantes.

El sistema de defensa “*in vivo*” del organismo humano, está formado por cuatro líneas de defensa: la **primera línea** consiste en la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres a través del secuestro de iones metálicos, por reducción de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno y por captación de superóxido y oxígeno singlete. Los antioxidantes que adsorben radicales actúan en **segunda línea**. Dentro de este grupo, se ubican los compuestos polifenólicos, entre ellos, los flavonoides. La **tercera línea**, está constituida por los mecanismos de reparación “*de novo*” (desde el comienzo) y el aclaramiento de lípidos, proteínas y ADN alterados por la oxidación. La **cuarta línea** de defensa es conocida como de “adaptación”, aquí se incluyen los antioxidantes que se generan adecuadamente para cada ocasión y se transfieren al lugar correcto y en la concentración correcta.

El interés por los flavonoides ha aumentado en los últimos años, dada su extendida presencia como antioxidantes alimentarios. La principal fuente de flavonoides son las verduras, las frutas y las bebidas (te, café, vino, etc.).

Dada la importancia de las especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo, en el ambiente biológico y para la salud y las enfermedades humanas, históricamente se ha estudiado con profundidad la reactividad de los flavonoides hacia este tipo de radicales.

De acuerdo a sus efectos sobre la xantina-oxidasa y sobre los superóxidos, los flavonoides se clasifican en seis grupos diferentes: 1) captadores de aniones

superóxidos, sin actividad de inhibición sobre la xantina-oxidasa; **2)** inhibidores de la xantina-oxidasa, sin acción adicional de captación de aniones superóxidos; **3)** inhibidores de la xantina-oxidasa, con acción adicional como captadores de aniones superóxidos; **4)** inhibidores de la xantina-oxidasa con un efecto prooxidante adicional sobre la producción de aniones superóxidos; **5)** flavonoides con una actividad marginal sobre la xantina-oxidasa pero con un efecto prooxidante sobre la producción de aniones superóxidos, y **6)** flavonoides sin acción inhibidora sobre la xantina oxidasa, ni sobre los superóxidos (Pokorny y col., 2001).

La actividad antioxidante de los flavonoides “*in vitro*” depende de la distribución de los grupos funcionales en la estructura molecular. Los flavonoides presentes en la dieta difieren en la distribución de los grupos hidroxilos, metoxi y glicosídicos y en la conjugación entre los anillos. El efecto protector de los flavonoides en los sistemas biológicos es atribuido a su capacidad de donar hidrógeno, captar radicales y quelar metales (Pokorny y col., 2001; Butkovic y col., 2004).

La capacidad de los flavonoides de atrapar radicales libres (D^\bullet) es principalmente atribuida a la alta reactividad de los sustituyentes oxhidrilos que participan de la siguiente reacción, esquematizada en la ec. 1.1, donde F-OH representa un flavonoide.



Así, los grupos hidroxilos donan un electrón y un protón a los radicales, generando su estabilización y dando origen a un radical flavonoide relativamente estable (Bors y col., 1990). La velocidad de reacción de algunos flavonoides frente a radicales libres fue determinada mediante espectroscopía de absorción uv-visible (Butkovic y col., 2004). Estos estudios mostraron que las constantes de velocidad de estas reacciones correlacionan con los potenciales de reducción de los flavonoides.

Los flavonoides inhiben la producción de especies reactivas del oxígeno en las células. Ciertos flavonoides retardan el consumo de oxígeno (estallido respiratorio) de los neutrófilos humanos estimulados, inhibiendo la acción de la NADPH-oxidasa, la enzima responsable de la reducción de O_2 a anión superóxido. En consecuencia, la formación de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno disminuye significativamente cuando los neutrófilos son estimulados en presencia de flavonoides.



Algunos flavonoides son capaces de reducir significativamente la actividad de la mieloperoxidasa contenida en los neutrófilos. Esta enzima, secretada en el medio intra y extracelular, cataliza la oxidación de cloruro por el peróxido de hidrógeno para formar potentes oxidantes como el HOCl (Pokorny y col., 2001).

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos, representando una parte importante de los componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta. La ingestión de flavonoides puede variar entre 50 y 800 mg al día, aproximadamente, dependiendo de la dieta (consumo de verduras, frutas, vino tinto, el té, la cerveza sin filtrar, etc.). Otra fuente importante de la ingesta de flavonoides son las plantas medicinales y los fitomedicamentos (Pietta, 1998).

Hay dos alternativas que se suelen aplicar en la determinación de la actividad antioxidante, una directa y la otra, indirecta. Cuando se aplica una determinación indirecta, el estudio más frecuente es la determinación de la capacidad de un antioxidante para secuestrar algún radical libre, el cual no se asocia con una degradación oxidativa real. En este tipo de determinación se utiliza algún radical libre coloreado debido a su intensa absorbancia en la región del visible. En estos casos, se suele hablar de la actividad donante-H o de la reactividad de un antioxidante hacia un radical libre.

Los métodos indirectos proveen información sobre la capacidad de una sustancia para secuestrar radicales libres, como por ejemplo el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico) (ABTS) (Roginsky & Lissi, 2005).

En tanto que los métodos directos se basan en el estudio del efecto de la degradación oxidativa de un alimento conteniendo antioxidantes, a partir de diversos parámetros. En estos casos, como sustratos de oxidación, pueden ser utilizados lípidos individuales, mezclas de lípidos (aceites), proteínas, ADN, etc.

Mientras que los métodos directos relacionados básicamente con el estudio de la cadena de peroxidación poseen un marco teórico general, los métodos indirectos tienen características esenciales que no permiten su generalización. Frecuentemente, se usan más los métodos indirectos que los directos. La desventaja de los métodos directos radica en que su realización implica mayores tiempos y su aplicación requiere un conocimiento más profundo sobre la cinética química de cada reacción.

1.3. Estructura

Los flavonoides son derivados de la benzo- γ -pirona y poseen en su estructura molecular anillos fenólicos y piránicos. Tienen una estructura química muy definida, como se muestra en la Fig. 1.2. Puede observarse que, de manera general, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono (C, cuando forma un ciclo). Dado que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, se denominan simplemente como compuestos $C_6C_3C_6$. Los átomos de carbono en los anillos A y C se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Kühnau, 1976).

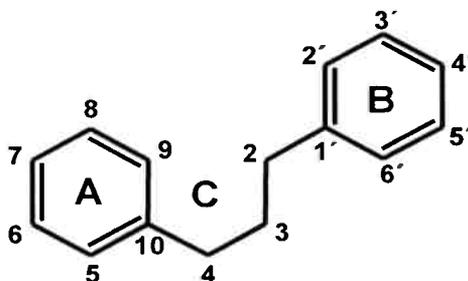


Figura 1.2. Estructura básica de los flavonoides.

Tres características estructurales son importantes para sus funciones de antioxidantes y/o atrapantes de radicales libres (Letan, 1966):

- Presencia en el anillo B de la estructuracatecol u o-dihidroxi;
- Presencia de un doble enlace en la posición 2,3;
- Presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5.

Actualmente, se conocen más de 6400 flavonoides naturales, los que se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C_3 (Fig. 1.3). Así, los flavonoides se clasifican en varios grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc. (Pokorny, 2001).

Muchos de los flavonoides poseen nombres triviales, con terminaciones en **ina** u **ol**. Estos nombres fueron asignados por los investigadores, a medida que los fueron descubriendo en la naturaleza. Los mismos, son de uso común, sin embargo, no son

muy útiles cuando se requiere información sistemática de estas sustancias. En este caso, se utilizan nombres que representen su estructura química (IUPAC, 2006). Así, por ejemplo, acetina corresponde a la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona; quercetina a 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol; naringenina a la 5,7,4'-trihidroxiflavanona, etc. A lo largo de esta tesis los flavonoides mencionados serán nombrados la primera vez con ambos nombres, y, a continuación sólo por su nombre trivial o una abreviación del mismo.

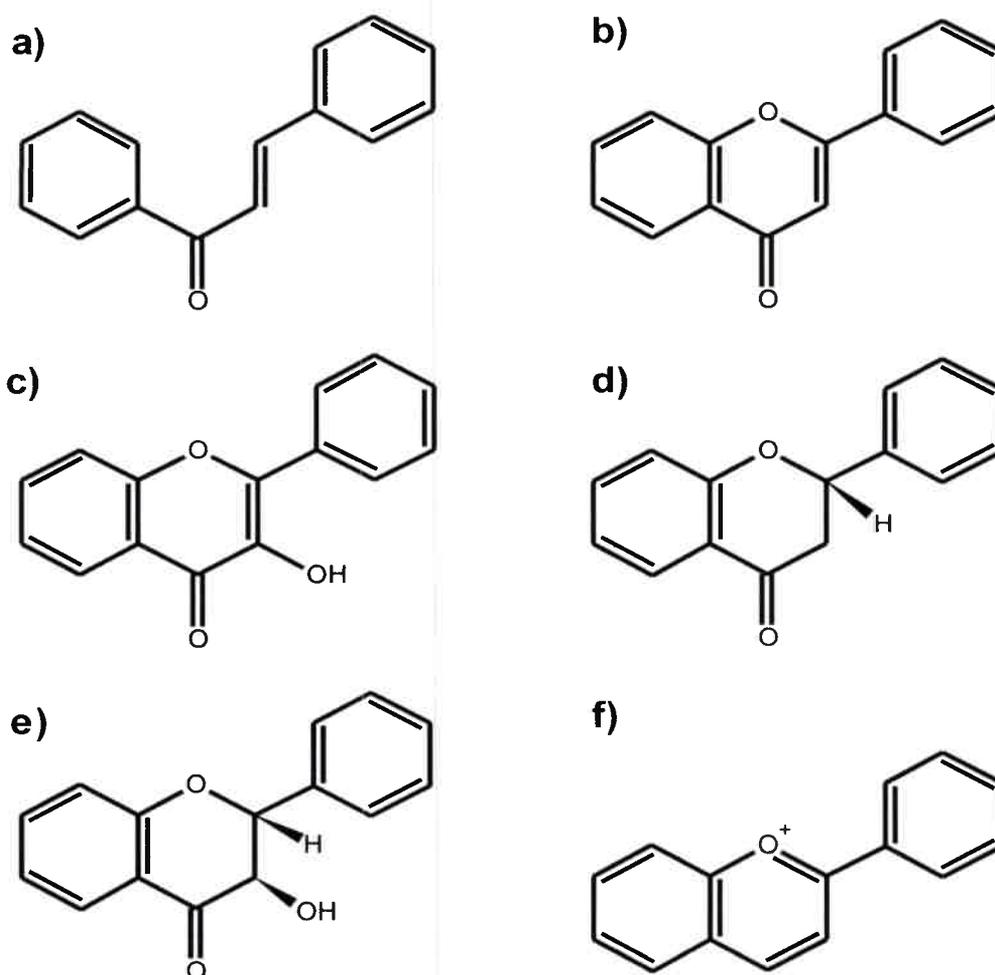


Figura 1.3. Estructuras básicas de algunas clases de flavonoides. *a) chalconas, b) flavonas, c) flavonoles, d) flavanonas, e) flavanonoles, f) antocianidinas.*

1.4. Biosíntesis de flavonoides

Los fenoles de las plantas son sintetizados por muchas vías distintas y, por lo tanto, son un grupo heterogéneo desde el punto de vista metabólico, pero dos vías básicas están involucradas: la vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico (Grotewold, 2006).

La ruta del ácido shikímico participa en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores. Utiliza, como sustratos, la eritrosa-4-fosfato (de la vía de las pentosas fosfato) y el ácido fosfoenolpirúvico (proveniente de la glucólisis). Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, de la que derivan la mayoría de los fenoles. La fenilalanina, un aminoácido esencial, que forma parte del metabolismo primario de las plantas y los animales, entra al metabolismo secundario cuando la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio, convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico (Grotewold, 2006).

La vía del ácido malónico es una importante fuente de fenoles en bacterias y hongos y, en las plantas superiores, existe aunque no es tan utilizada como en aquéllos. Su sustrato es la acetil-CoA. Consiste en la condensación de una molécula de p-cumaril-CoA con 3 moléculas de malonil-CoA. Esta reacción está catalizada por la chalcona sintasa y da lugar a naringerina chalcona, precursor de flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación de estilbenos implicados en los mecanismos de defensa de plantas frente a patógenos (Grotewold, 2006).

En la Fig. 1.4 se muestra un esquema resumido de la biosíntesis de flavonoides.

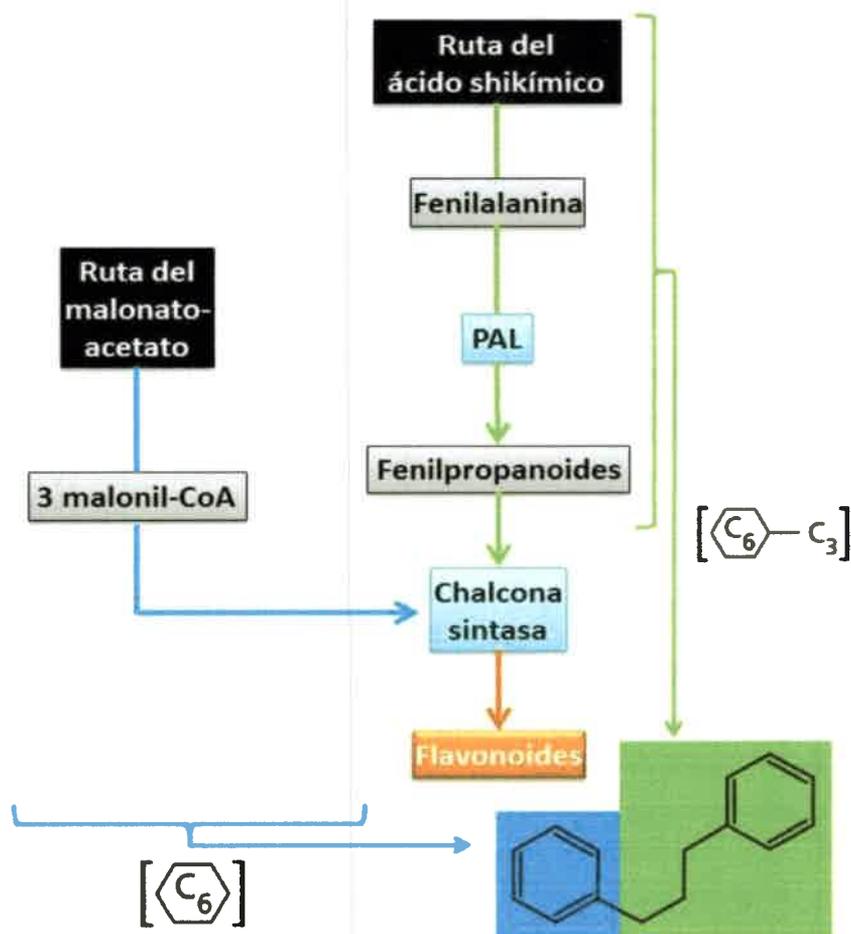


Figura 1.4. Esquema resumido de la síntesis de flavonoides. Remarcados con dos recuadros sobre la estructura general de los flavonoides, el origen de los carbonos que lo conforman. PAL: Fenilalanina amonio liasa.

1.5. Flavonoides estudiados en esta tesis

Durante la ejecución de esta tesis se estudiaron los siguientes flavonoides: morina (MOR), buteina (BUT) y luteolina (LUT). Estos flavonoides presentan algunas similitudes y diferencias en sus estructuras moleculares, las cuales son descritas a continuación.

1.5.1. Morina

Su nombre según IUPAQ es 2',3,4',5,7-pentahidroxi-flavona. Posee en su estructura molecular (Fig.1.5) dos anillos bencénicos (A y B), y un heterociclo (anillo C), el cual presenta en el C3 un hidroxilo, por lo tanto, pertenece a la familia de los flavonoles. Ambos anillos bencénicos (A y B) poseen dos hidroxilos en posición meta (resorcinol).

Se encuentra ampliamente distribuida en el té, café, granos de cereales y una amplia variedad de frutas y vegetales (Kuhnau, 1976). Es un compuesto de considerable interés debido a su amplia actividad farmacológica (Butkovic y col., 2004).

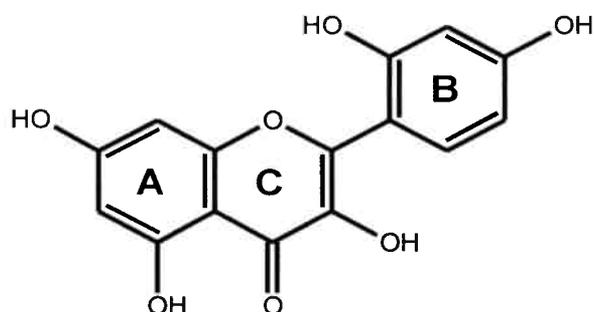


Figura 1.5. Estructura química de morina (MOR).

1.5.2. Buteina

Su nombre según IUPAQ es 2',4',3,4-tetrahidroxi-chalcona. Pertenece a la sub-clase de flavonoides conocida como chalconas. Se extrae principalmente del árbol "*Rhus verniciflua*", conocido por el nombre de "árbol de barniz" y de una planta medicinal llamada "*Butea monosperma*". Posee en su estructura molecular (Fig. 1.6) dos anillos bencénicos unidos a través de un grupo carbonilo β insaturado y un doble enlace. Uno de los anillos bencénicos (anillo A) posee dos hidroxilos en posición meta (resorcinol) y el otro (anillo B) posee dos hidroxilos en posición orto (catecol), los que son los responsables de la capacidad antioxidante de los flavonoides que presentan esta característica estructural (Wright y col., 2001). Entre sus efectos fisiológicos más conocidos se pueden mencionar: reducción de la presión arterial (Kang y col., 2003),

protector del hígado (Woo y col., 2003), inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama (Wang y col., 2005; Lee, 2003) y de colon (Yit & Das, 1994), como así también se encontró que inhibe la oxidación, catalizada por cobre, de la lipoproteína de baja densidad humana (LDL) (Pandey y col., 2007). Además, mostró ser un antioxidante aún más efectivo que el α -tocoferol (Chen y col., 2005).

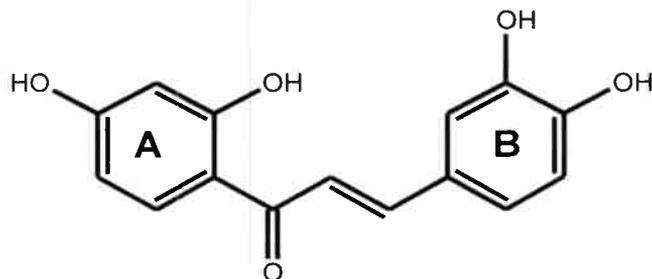


Figura 1.6. Estructura química de buteina (BUT).

1.5.3. Luteolina

Su nombre según IUPAQ es 3,4,5,7-tetrahidroxi-flavona. Pertenece a la sub-clase de flavonoides conocida como flavonas y es uno de los flavonoides más bio-activos. Se encuentra, principalmente, en perejil, cáscara de maní y tomillo. Posee en su estructura molecular (Fig. 1.7) dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un heterociclo (anillo C). Uno de los anillos bencénicos (anillo A) posee dos hidroxilos en posición meta (resorcinol) y el otro (anillo B) posee dos hidroxilos en posición orto (catecol).

Su estudio es importante dado que se han informado diversos posibles efectos beneficiosos sobre la salud humana, tales como, la protección cardiovascular, la actividad contra el cáncer, efectos anti-ulcerosos, actividad anti-alérgica y la prevención de cataratas (López-Lázaro, 2009). Luteolina, además, inhibe la agregación plaquetaria, con acción vasodilatadora (Sánchez de Rojas y col., 1996).

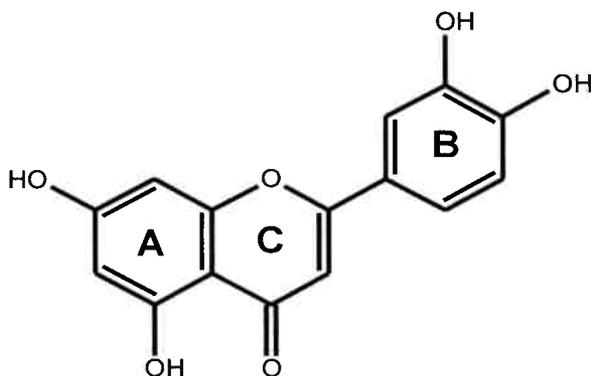


Figura 1.7. Estructura química de luteolina.

Como puede observarse, las tres moléculas pertenecen a diferentes subclases, o familias de flavonoides, pero presentan algunas similitudes estructurales. Todas poseen hidroxilos en posición meta (grupo resorcinol) en, al menos, uno de sus anillos. BUT y LUT comparten la característica de poseer hidroxilos en posición orto (grupo catecol) y MOR y LUT presentan ambas una estructura cerrada (anillos A, B y C). MOR se diferencia del resto por el hidroxilo en la posición 3 del anillo C y BUT lo hace por tener abierto el anillo central.

1.6. Métodos de determinación de flavonoides

En la siguiente sección se describen principalmente los métodos basados en cromatografía líquida (LC), ya que estos son los más utilizados en el análisis de flavonoides.

1.6.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se utilizó por primera vez para la determinación de flavonoides en 1976 por Fisher y Wheaton (Hasegawa y col., 1996). Daigle y Conkerton, años más tarde realizaron una revisión completa sobre esta temática, la cual fue publicada en 1983 (Daigle & Conkerton, 1983), y, en 1988

actualizaron su revisión (Daigle & Conkerton, 1988). Otra revisión relevante es la publicada por Robards y Antolovitch (1997).

1.6.1.1. Condiciones cromatográficas

La cromatografía líquida de flavonoides se lleva a cabo habitualmente en columnas de fase inversa, que van desde 100 a 300 mm de longitud y, habitualmente, con un diámetro interno de 4,6 mm y están compuestas, principalmente, por cadenas alifáticas desde C8 hasta C18. Sin embargo, se utilizan también otras fases, tales como, sílice, Sephadex y poliamida. Los sistemas de elución generalmente son binarios, con una fase acuosa acidificada con un disolvente polar, tal como ácido acético acuoso, ácido perclórico, ácido fosfórico o ácido fórmico (disolvente A) y otra, con un disolvente orgánico polar tal como metanol o acetonitrilo, posiblemente acidificado (disolvente B). En algunos casos, se utilizan sistemas isocráticos o terciarios, e incluso sistemas cuaternarios (de Pascual-Teresa y col., 1998; Tamura y col., 1994). Las soluciones reguladoras de fosfato son menos utilizadas de lo que solían serlo años atrás, principalmente, a causa de la contaminación de iones que producen cuando se utiliza como detector un espectrómetro de masa. La LC se realiza, generalmente, a temperatura ambiente, pero temperaturas de hasta 40°C son recomendadas, algunas veces, con el objetivo de reducir el tiempo de análisis. Además, termostatar la columna, cuando se realiza la corrida, origina tiempos de elución más reproducibles. Tiempos de corrida de 30 a 60 min suelen ser suficientes para separar de cinco a diez compuestos de interés, si lo que se desea es determinar los principales flavonoides en una muestra (Fabre y col., 2001). Pero, si se necesita una separación más exhaustiva de los componentes, se puede requerir de tiempos de elución de hasta dos horas. En estas condiciones, se pueden llegar a separar e identificar, hasta 50 compuestos en una sola corrida (Vallejo y col., 2004). Las velocidades de flujo comúnmente son de 1,0 ó 1,5 mL/min y los volúmenes de inyección varían entre 1 a 100 µL.

1.6.1.2. Detección

Los fenoles absorben en la región ultravioleta del espectro, de modo que los flavonoides presentan dos bandas de absorción características. Una, conocida como

“Banda II”, con un máximo de absorción en el intervalo de 240-285 nm, la cuales adjudicada al anillo A y una “Banda I”, con un máximo en el intervalo de 300-550 nm, que presumiblemente, es adjudicada al anillo B (Robards & Antolovich, 1997).

Las antocianinas presentan la banda II y la banda I, con máximos de absorción en las regiones 265-275 y 465-560 nm, respectivamente (Robards & Antolovich, 1997). Debido a que hay poca conjugación entre los anillos A y B, los espectros uv-visible de flavanonas e isoflavonas generalmente tienen un pico de absorción intenso en la banda II, y un pequeño pico de absorción dentro de la banda I (Mabry y col., 1970). Esta falta de conjugación también produce picos pequeños en las bandas de las catequinas. Los espectros uv-visible de flavonas y flavonoles tienen un pico alrededor de 240-280 nm en la banda II y un pico alrededor de 300-380 nm en la banda I (Mabry y col., 1970).

La detección de flavonoides en el análisis de alimentos se realiza, generalmente, a través de técnicas de espectroscopia uv-visible, con detector de arreglo de diodos (DAD). Pero existen diversas variantes, algunas de ellas son:

La detección por fluorescencia (280 nm de excitación, 310 nm para la emisión) conectada en serie con un detector de uv-visible (270 nm) para catequinas (Arts & Hollman, 1998). La detección con reacción química, usando p-dimetilaminocinamaldehído, que produce aductos coloreados con catequinas (de Pascual-Teresa y col., 1998). La detección de quimioluminiscencia para una mayor sensibilidad en la detección de extractos de té verde a 280 nm (Ogawa y col., 1999).

La detección con arreglo de diodos y detección coulométrica fueron utilizados simultáneamente para la detección de isoflavonas en alimentos de soja (Franke y col., 1998).

1.6.1.3. Preparación de la muestra

En la vasta literatura existente sobre determinaciones de flavonoides por HPLC, se encuentran diversos procesos que se le realizan a una muestra, previo a la inyección en el cromatógrafo; las mismas van desde simples diluciones y filtraciones, hasta extracciones líquido-líquido y extracciones en fase sólida (Merken & Beecher, 2000).

1.6.2. Métodos normalmente menos utilizados

A continuación se describen otras técnicas de separación de flavonoides, que se consideran menos utilizadas que HPLC. Ellas son: cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis capilar (CE), cromatografía gaseosa (GC) y espectrofotometría. Existe una renovada atención por técnicas clásicas, tales como, GC y TLC, lo cual puede ser un llamado de atención, un tanto sorprendente. Por otro lado, CE es una técnica relativamente nueva, y sólo se ha utilizado para el análisis de flavonoides en los últimos 10 años. Cabe aclarar que existen otras técnicas, como lo son, la cromatografía contracorriente de alta velocidad (HSCCC) y la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), pero aún, su uso en el análisis de los flavonoides es muy limitado (Stalikas, 2007).

1.6.2.1. Cromatografía en capa fina

La TLC desde la década de 1960 es poco usada, pero sigue siendo un método utilizado en la determinación de flavonoides en productos naturales. Es muy útil para la detección rápida en extractos, antes del análisis detallado, debido a su bajo costo y rapidez.

En la mayoría de los casos, las placas están compuestas por una fase estacionaria de sílice, celulosa o poliamida. Las fases móviles utilizadas son diversas y pueden realizarse corridas sucesivas para lograr, así, cromatogramas bidimensionales. Como reveladores, si es necesario, se pueden usar el reactivo de Neu (también conocido como Naturtoffreagenz A (éster del ácido difenilbórico y tanolamina, al 1% en metanol)), $AlCl_3$, etc. La detección normalmente se lleva a cabo mediante luz uv a 350-365 ó 250-260 nm o con densitometría en el mismo intervalo de longitudes de onda (Stalikas, 2007). Otro método de detección de flavonoides utilizado es el de fluorescencia, debido a la fluorescencia que muchos de estos compuestos presentan (Stalikas, 2007).

Normalmente, la cuantificación no es el objetivo principal de este tipo de técnicas, sin embargo, la densitometría como detección, se ha utilizado en varios estudios, obteniéndose buenos resultados (Jamshidi y col., 2000).

1.6.2.2. Cromatografía gaseosa

Los compuestos volátiles son generalmente analizados por GC, la cual es una técnica insuperable en cuanto a la capacidad de separación de analitos, en particular, cuando se combina con espectrometría de masa, la cual ofrece alta sensibilidad y selectividad. Compuestos químicos, tales como los flavonoides, que poseen la capacidad de realizar uniones del tipo puente hidrógeno, tienen elevados puntos de fusión, por consiguiente, la dificultad de utilizar esta técnica radica en la baja volatilidad propia de estos compuestos.

La cromatografía de gases es una de las principales técnicas cromatográficas empleadas para el análisis de ácidos fenólicos en plantas. En esta técnica, la preparación de muestras suele incluir la eliminación de los lípidos del extracto. Los análisis en fase gaseosa suelen requerir una derivatización química, además de la extracción, aislamiento, y limpieza de la muestra (Stalikas, 2007).

Los primeros trabajos con polifenoles derivatizados se realizaron con detección por ionización de llama. La espectrometría de masas (MS) se comenzó a utilizar tiempo después. La mayoría de los trabajos en GC-MS se realizan en el modo de ionización por impacto de electrones, con la tensión de ionización, establecida como estándar, de 70 eV. Los espectros son tomados hasta una relación masa/carga (m/z) = 650 en el modo de exploración.

Hay una variedad de reactivos utilizados para modificar y generar derivados volátiles a través de la conversión de grupos hidroxilo a éteres o ésteres. En este proceso, los flavonoides son hidrolizados (Stalikas, 2007).

En GC convencional, es muy difícil el análisis de flavonoides glucósidos, incluso después de la derivatización (Stalikas, 2007).

Aunque la GC realizada en fenoles sin derivatizar es escasa, existen algunas investigaciones metodológicas que fueron publicadas (Christov & Bankova, 1992).

1.6.2.3. Electroforesis capilar

Los modos de electromigración principalmente utilizados son CE, electroforesis capilar de zona (ZCE) y la cromatografía electrocinética micelar (ECMC).

Estas técnicas, normalmente, son realizadas en soluciones reguladoras de fosfatos o boratos usando, pequeños volúmenes de capilares, voltajes de 10-30 kV, y volúmenes de inyecciones de 10-50 nL. La detección se realiza generalmente con un detector uv, aunque también se utilizan detectores electroquímicos y de espectroscopía de masa.

La mayoría de los estudios que utilizan métodos de CE para el análisis de compuestos fenólicos, pertenecen al campo de la física de investigación de productos, incluyendo el análisis de plantas, vegetales, hierbas y otras plantas o productos derivados de frutas (Herrero y col., 2005).

La CE, con detección electroquímica ha demostrado ser una técnica de gran alcance para los marcadores químicos y huellas digitales en el estudio de los productos naturales y se ha convertido en una alternativa, competitiva y complementaria a la técnica de HPLC (Stalikas, 2007).

Pocas publicaciones discuten el uso de CE unido a espectroscopía de masa (CE-MS) para la determinación de flavonoides (Huck y col., 2005). La escasez de aplicaciones puede evidenciar que la técnica no es considerada, por muchos investigadores, lo suficientemente robusta y fácil de usar.

La técnica CE-MS no se proyecta como una técnica que sustituirá a otros métodos, parece ser, más bien, una herramienta complementaria. Aunque, en general, se cree que ECMC posee una mayor eficiencia de separación que ZCE, la utilización de ECMC en la determinación de compuestos fenólicos es, aproximadamente, tres veces menos frecuente que la ZCE, por lo menos, en los últimos años (Jáč y col., 2006).

Tanto en la determinación de catequinas del té, como en la separación de flavonoides que difieren en sus azúcares, donde se utilizaron HPLC, CE y ECMC fue probado que la CE y ECMC han superado a la HPLC por su mayor sensibilidad, selectividad y velocidad (Bonoli y col., 2003; Morin y col., 1993).

La separación quiral de flavonoides diastereoméricos puede ser realizada utilizando CE con ciclodextrinas añadidas a la solución reguladora (Gel-Moreto y col., 2001).

1.6.2.4. Espectrofotometría

Aunque el desarrollo satisfactorio de un ensayo uv es complejo y depende en gran medida del material a analizar, las técnicas espectroscópicas uv-visible son utilizadas para la identificación de compuestos fenólicos aislados, en particular, los flavonoides.

El ensayo de **Folin-Denis** es el primer procedimiento descrito y más ampliamente utilizado para la cuantificación de fenoles totales en los materiales vegetales (Folin & Denis, 1912). El método se basa en la reducción de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin-Denis) a un complejo de color azul en solución alcalina. El complejo fenol-ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico absorbe a 760 nm.

El ensayo de **Folin-Ciocalteu** se utiliza también para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos en alimentos vegetales (Brune y col., 1991).

Ni los reactivos de Folin-Denis, ni los de Folin-Ciocalteu son muy específicos y no detectan todos los grupos fenólicos presentes en los extractos. Otra desventaja de este ensayo es la interferencia de componentes en los extractos de alimentos, tales como ácido ascórbico, que se comportan como agentes reductores.

El **método de la vainillina** es específico para flavan-3-oles, dihidrochalconas, y proantocianidinas, que tienen un enlace simple en la posición 2,3 y poseen grupos metahidroxilo libres en el anillo B (Goldstein & Swain, 1963).

Para la cuantificación de flavanonas y dihidroflavonoles, se suele utilizar el **método espectrofotométrico de Das Deutsche Arzneibuch 9**, modificado por Nagy y Grancai (Nagy & Grancai, 1996). Este método se basa en la interacción de estos compuestos con la 2,4-dinitrofenilhidrazina en medio ácido, para formar fenilhidrazonas, las cuales son coloreadas. La absorbancia se mide a 486 nm y la calibración se realiza usando pinocembrina como compuesto de referencia.

1.6.3. Discusión

Debido a la complejidad de las plantas naturales, las muestras biológicas y las matrices de muestras en general, la preparación de la muestra es un paso crítico de todo análisis. Muchas técnicas ofrecen la posibilidad real de la preparación de la muestra antes del análisis con suficiente especificidad. Sin embargo, todavía no existe un

procedimiento estandarizado, disponible para la preparación y extracción de muestras. La extracción líquida es, en muchos casos, el primer paso en la etapa de preparación.

La técnica de separación por cromatografía en capa fina de extractos de plantas se describe como un método de análisis en diferentes farmacopeas. Mediante esta técnica se puede obtener la "huella digital" cromatográfica de un extracto de planta, la cual es muy útil para fines de identificación.

Para el análisis de flavonoides, GC difícilmente pueda sustituir a la HPLC, la cual puede superar problemas específicos de separación, especialmente cuando están presentes agliconas y glucósidos de manera conjunta.

La posibilidad de acoplar HPLC a varios dispositivos de detección se ha convertido en una herramienta aún más valiosa e indispensable para la separación de polifenoles. Esto, sin embargo, no excluye la utilidad de la GC y sus capacidades de separación.

La detección uv es, actualmente, la herramienta preferida en LC y se analiza, aún hoy, con múltiples longitudes de onda ó uv/arreglo de diodos, siendo una buena herramienta en los estudios relacionados con detección, cuantificación y clasificación de subgrupos. El desarrollo de LC-MS ha ampliado el ámbito de aplicación de técnicas de acoplamiento para MS, permitiendo el análisis y la identificación de compuestos de productos naturales. Una ventaja particular de LC-MS es su capacidad para determinar ambas formas de flavonoides, libres y conjugados. Sin embargo, para una elucidación de la estructura más detallada de los conjugados, la información complementaria dada por la LC acoplada a resonancia magnética nuclear, es indispensable (LC-NMR). En esta área de aplicación, LC-NMR supera a la competencia para efectos de identificación, pero no en cuanto a la cuantificación. Para análisis de alto rendimiento, la aparición de técnicas como la cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) acoplada a espectroscopía de masa (MS) ha aparecido como una alternativa a la técnica tradicional de HPLC. Lo relevante de la tecnología UPLC es la capacidad de separar e identificar compuestos con ganancias significativas en la resolución y sensibilidad y, fundamentalmente, la marcada reducción del tiempo de análisis global. La electroforesis capilar (CE) acoplada a detección de espectrometría de masas (MS) puede proporcionar una información estructural selectiva de los analitos en sus matrices. Sin embargo, comparado con el análisis de fenoles por LC, la CE no muestra una diferencia

significativa en los tiempos y, el consumo limitado de muestra y disolventes no aparece para equilibrar la baja repetibilidad de los tiempos de retención/migración y sensibilidad restringido.

1.6.4. Empleo de técnicas electroquímicas en el estudio de flavonoides

El comportamiento electroquímico de quince flavonoides representativos y estructuralmente relacionados ha sido estudiado por voltamperometría cíclica (VC) sobre electrodos de carbono vítreo (CV) en soluciones acuosas, bajo condiciones próximas a las fisiológicas, a los efectos de entender mejor la relación entre el comportamiento redox y la actividad biológica de los flavonoides (Hodnick y col., 1988). Así, los voltamperogramas cíclicos se registraron en soluciones reguladoras de fosfato 0,1 M de pH 7,5, conteniendo una concentración final de 2,5% (v/v) de dimetilsulfóxido. Bajo estas condiciones experimentales, los voltamperogramas cíclicos de morina (MOR), registrados a una concentración del sustrato de 5×10^{-4} M, mostraron un único pico de oxidación irreversible en el intervalo de potenciales de 0 a 0,4 V (vs. ECS) a una velocidad de barrido (v) de $0,1 \text{ V s}^{-1}$, mientras que a una velocidad de barrido mayor ($v = 0,5 \text{ V s}^{-1}$) se observó también un pico de reducción cuando se invirtió la dirección del barrido de potencial. Un valor de 0,061 V se determinó para la separación entre los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p). Estos resultados sugirieron una transferencia de carga mono-electrónica reversible, seguida de una reacción química acoplada, relativamente lenta. Por otro lado, los voltamperogramas cíclicos de buteina mostraron un $\Delta E_p = 0,028 \text{ V}$, poniendo en evidencia que la oxidación de buteina sería un proceso bielectrónico cuasi-reversible. En el caso de luteolina, se obtuvo un valor de $\Delta E_p = 0,055 \text{ V}$, lo que sugeriría una transferencia de carga mono-electrónica cuasi-reversible. Sin embargo, la interpretación de los datos experimentales no fue sencilla, considerando que, cuando se realizaron barridos consecutivos de potencial, se observó que las corrientes disminuían, distorsionando la posición de los picos y dificultando el análisis de los mismos. Estos resultados pusieron en evidencia la formación de alguna lámina aislante, que envenenaría la superficie del electrodo.

Las propiedades electroquímicas de cuatro flavonoides estructuralmente relacionados (quercetina, queritrina, rutina y luteolina) fueron, posteriormente, estudiadas sobre electrodos de carbono vítreo por VC y voltamperometría de disco rotatorio (Hendrickson y col., 1994). Se demostró que los flavonoides que poseen una especie catecol en su estructura molecular muestran un comportamiento electroquímico reversible, mientras que aquellos que no poseen el grupo catecol muestran, en general, un comportamiento electroquímico irreversible. Así, todos los flavonoides que poseen un grupo 3',4'-dihidroxilo (grupo catecol) presentan un primer pico de oxidación que puede ser asignado a la electro-oxidación reversible de dicho grupo, involucrando la transferencia de $2 e^-$ y $2 H^+$. Así, un voltamperograma cíclico de luteolina exhibió dos ondas de oxidación. La primera onda corresponde a la oxidación reversible del sustituyente 3', 4'-dihidroxilo en el anillo B. La segunda onda corresponde a la oxidación irreversible del sustituyente 5,7-dihidroxilo en el anillo A. Este último comportamiento es típico de los dihidroxi-fenoles meta sustituidos (grupo resorcinol) o de grupos fenólicos simples, los cuales son más difíciles de oxidar y sufren una oxidación irreversible mono-electrónica y mono-protónica. Por otro lado, los flavonoides que presentan un sustituyente hidroxilo en la posición 3 del anillo C exhiben un comportamiento electroquímico único. La oxidación de este grupo $-OH$ ocurre a potenciales menos anódicos que los $-OH$ fenólicos o de estructura resorcinol y a potenciales más anódicos, con respecto a los $-OH$ de la estructura del catecol. El bajo potencial de oxidación del grupo $-OH$ en posición 3 se puede explicar considerando las propiedades dadoras de electrones del grupo $C=O$ (grupo ceto) en el carbono 4 y del átomo de oxígeno del heterociclo central (C 1) (Janeiro & Oliviera Brett, 2004).

La pre-concentración de nueve flavonoides (fisetina, galangina, morina, quercetina, ramnetina, rutina, hesperidina, hesperitina y naringina) sobre electrodos de pasta de carbono fue estudiada por voltamperometría de pulso diferencial (VPD) (Zoulis & Efstathiou, 1996). Se analizó la influencia de distintos parámetros, tales como: pH, potencial de acumulación, presencia de varios surfactantes, etc. sobre las respuestas voltamperométricas. Esta metodología electroanalítica permitió determinar concentraciones en el orden de 10^{-7} a 10^{-8} M después de un tiempo de pre-concentración de 1 a 4 min.

La determinación de morina, rutina y otros diez flavonoides por voltamperometría de redisolución (“stripping”) con acumulación adsortiva acoplada a un sistema de flujo ha sido estudiada (Volikakis & Efstathiou, 2000). Se compararon los resultados obtenidos cuando la pre-concentración de los sustratos se realizó empleando electrodos de pasta de carbono, los que se rellenaron, por un lado, con una pasta de nujol-grafito (EPC-NU-GRA) y, por otro lado, con una pasta de difenileter-grafito (EPC-DFE-GRA), encontrando una mayor selectividad y sensibilidad hacia la pre-concentración de los flavonoides sobre los electrodos de EPC-DFE-GRA que sobre los electrodos de EPC-NU-GRA. Dependiendo del tipo de flavonoide y de la naturaleza del electrodo empleado, el intervalo lineal y la desviación estándar relativa porcentual (DER%) estuvieron en el orden de 10^{-5} a 10^{-8} M y del 2,5 al 10%, respectivamente.

La oxidación electroquímica de quercetina se estudió por VC, VPD y voltamperometría de onda cuadrada (VOC) sobre electrodos de carbono vítreo (CV) a diferentes valores de pH (Oliviera Brett & Ghica, 2003). Se encontró que el mecanismo de oxidación depende del pH y que es un mecanismo en cascada, que involucra la oxidación del grupo catecol, del grupo $-OH$ en carbono 3 y de los otros dos grupos $-OH$ fenólicos presentes en su estructura molecular, asignando el primer pico voltamperométrico a la oxidación con pérdida de $2e^-$ y $2H^+$ del grupo catecol. Además, se observó que quercetina se adsorbe fuertemente sobre la superficie de los electrodos de carbono y que el producto final de oxidación es electro-inactivo y bloquea la superficie del electrodo, provocando la rápida disminución de los picos de oxidación cuando el barrido de potencial se realizó entre 0 y 1,4 V (vs. ECS).

La oxidación electroquímica de catequina se estudió también sobre electrodos de CV por VC, VPD y VOC bajo un amplio intervalo de condiciones (Janeiro & Oliviera Brett, 2004). Se observó también que el mecanismo de oxidación procede en etapas secuenciales, relacionadas con el grupo catecol, el grupo $-OH$ en C3 del anillo C y el grupo resorcinol y que las señales voltamperométricas mostraban dependencia con el pH. Se observó también que catequina se adsorbe fuertemente sobre la superficie de electrodos de carbono y que el producto final de oxidación es electro-inactivo y bloquea la superficie del electrodo.

Las propiedades electroquímicas de un electrodo de carbono vítreo químicamente modificado con el flavonoide fisetina se estudiaron por VC (Golabi &

Irannejad, 2005). Se encontró que las corrientes de pico anódicas de las respuestas del electrodo modificado eran ligeramente mayores a pH 4,5, mientras que las separaciones entre los potenciales de pico eran ligeramente menores a ese valor de pH, de modo que un valor de pH 4,5 fue considerado como el valor óptimo para determinar la constante de velocidad formal superficial (k_s) y el coeficiente de transferencia anódico ($1-\alpha$) de fisetina adsorbida sobre el electrodo de CV. Así, se determinaron valores de $k_s = 16,34 \text{ s}^{-1}$ y $(1-\alpha) = 0,54$. Este electrodo modificado se utilizó, luego, para estudiar la oxidación electrocatalítica del nucleótido NADH y de ácido ascórbico (AA) mediante VC y cronoamperometría. El límite de detección obtenido mediante medidas amperométricas fue de $2,4 \mu\text{M}$ para NADH y $1,8 \mu\text{M}$ para AA. Esta metodología electroanalítica se utilizó, posteriormente, para determinar AA en jugos de frutas frescos, mediante el método de la adición estándar, encontrándose una buena correlación entre el método electroanalítico y el método de referencia (colorimétrico).

La oxidación electroquímica de catequina se estudió por VC, complementada con cálculos semi-empíricos PM3 (Martínez y col., 2005b). A través de cálculos teóricos se demostró que el radical fenoxilo (ROHO^\bullet) formado en la primera etapa de oxidación es muy probable que sufra una segunda etapa de oxidación para formar la o-quinona catequina estable. Sin embargo, a valores de pH fisiológicos (pH 7,0), el camino de oxidación química y electroquímica de catequina está complicado por la presencia de reacciones de dimerización posteriores a la transferencia de carga. Por otro lado, en soluciones ácidas y bajas concentraciones de sustrato, las reacciones de dimerización están significativamente suprimidas y la o-quinona es el producto de oxidación más estable.

Más recientemente, la oxidación electroquímica de fisetina fue estudiada sobre electrodos de CV por VC, complementada con cálculos teóricos (Markovic y col., 2009). Estos autores también encontraron que sólo la primera onda de oxidación del flavonoide muestra un comportamiento reversible, la que fue atribuida a la oxidación del grupo catecol presente en la estructura química de fisetina. Además, para este pico de oxidación, un gráfico del potencial de pico de oxidación vs. pH, en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 7, fue lineal, con una pendiente de $0,052 \text{ V}$ por unidad de pH, poniendo de manifiesto que el mismo número de electrones y protones están

involucrados en el proceso de electrodo, siguiendo en este intervalo de pH un mecanismo del tipo eHHe, como fue establecido para las hidroquinonas.

Por otro lado, se estudió la interacción del flavonoide morina con el ADN empleando técnicas electroquímicas (Kang y col., 2006; Wang y col., 2007). Así, la técnica de VC se utilizó para estudiar la interacción morina-ADN sobre electrodos de CV y se determinaron la constante de afinidad de la interacción y los parámetros cinéticos (Kang y col., 2006). Como consecuencia de la interacción, el primer pico de oxidación de morina mostró un corrimiento a potenciales más positivos y una disminución en la intensidad de la corriente. Los resultados obtenidos demostraron que morina se puede enlazar al ADN en soluciones de ácido acético-acetato de sodio 0,1 M + 50 mM KCl (pH 3,4) y que es el anillo B de morina el que se intercala entre los pares de bases del ADN. Posteriormente, un electrodo de CV modificado con una capa de ácido poli(tetrafluoretileno) deoxiribonucleico se utilizó para estudiar la interacción de morina con el ADN (Wang y col., 2007). El electrodo modificado mostró un efecto catalítico hacia la oxidación de morina. La interacción de morina-ADN se estudió mediante voltamperometría de barrido lineal y cronoculometría y se determinó la estequiometría de la interacción y la constante de equilibrio de la asociación.

La acumulación adsortiva de rutina (RUT) sobre electrodos de carbono vítreo en 10% de etanol + 90% 1 M HClO₄ acuoso ha sido estudiada utilizando voltamperometría cíclica y de onda cuadrada (Aragão Catunda Jr. y col., 2011). La isoterma de adsorción de Frumkin fue la que mejor describió la interacción específica de rutina con estos electrodos. Con el ajuste de los datos experimentales se calcularon los valores de la energía libre de Gibbs y el parámetro de interacción de la adsorción, los cuales fueron -31,9 kJ mol⁻¹ y (0,54±0,02) respectivamente. Se utilizó voltamperometría de onda cuadrada, para calcular los valores promedio del potencial formal y el coeficiente de transferencia anódico, los cuales fueron (0,644±0,003) V y (0,44±0,02), respectivamente. La constante de velocidad formal del sistema obtenida en estas condiciones fue 6,1× 10² s⁻¹. Además, también se utilizó esta técnica para generar curvas de calibración. La concentración más baja de RUT medida experimentalmente, para una relación señal a ruido de 3:1 fue de 2 × 10⁻⁸ M (12 ppb).

La oxidación electroquímica de fisetina (FIS) fue estudiada sobre electrodos de carbono vítreo en 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) + 85% de soluciones reguladoras

de pH 4,00 y 7,00, por voltamperometría cíclica y de onda cuadrada (Maza y col., 2012). Cuando los estudios se realizaron en soluciones con presencia de FIS, el primer pico de oxidación mostró un control de electrodo mixto (adsorción/difusión). La adsorción de FIS sobre la superficie del electrodo se estudió a partir de voltamperogramas cíclicos registrados en soluciones del electrolito soporte, donde se definió una cupla redox cuasi-reversible a ambos valores de pH. Estos resultados muestran que tanto el reactivo como el producto del proceso de electrodo se adsorben sobre la superficie del mismo, estando, la cupla redox superficial, ligeramente mejor definida a pH 4,00 que a pH 7,00. La isoterma de adsorción de Frumkin fue utilizada para describir la interacción con la superficie del electrodo. Además, haciendo uso de la voltamperometría de onda cuadrada, se calcularon los valores del potencial formal de la cupla ($0,340 \pm 0,003$) V, la constante de velocidad formal (41 s^{-1}), y el coeficiente de transferencia anódico ($0,49 \pm 0,04$).

El comportamiento electroquímico de luteolina se estudió sobre electrodos de CV mediante VC y VPD en soluciones reguladoras de fosfato de pH 4,0 (Liu y col., 2008). Los resultados obtenidos demostraron que el primer pico de oxidación de luteolina es un pico cuasi-reversible, bien definido, que involucra $2e^-$ y $2H^+$ y que, además, el proceso está controlado por adsorción. Se determinó el coeficiente de transferencia de carga anódico a través del ancho de pico a su altura media (empleando el pico de VC obtenido a $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$) y se determinó un valor de $(1-\alpha) = 0,66$. La relación entre la corriente de pico y la concentración de luteolina en VPD fue lineal en el intervalo de 1×10^{-8} a 1×10^{-6} M. El límite de detección fue de 5×10^{-9} M. El método electroanalítico, basado en experimentos de VPD, se aplicó exitosamente en la determinación de luteolina en tabletas de formulaciones farmacéuticas.

Un método electroquímico simple y sensible se desarrolló para determinar luteolina a niveles de trazas, basado en el empleo de electrodos de CV modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple y VC y VPD como técnicas electroquímicas (Zhao y col., 2011). Se observó por VC una cupla redox cuasi-reversible superficial en la región de potenciales entre 0,2 y 0,8 V (vs. ECS). Los voltamperogramas cíclicos registrados con los electrodos modificados mostraron un incremento considerable en las intensidades de corriente cuando se comparaban con aquellas obtenidas sobre el electrodo de CV desnudo. Se optimizaron distintas variables experimentales, tales como

pH, potencial y tiempo de acumulación. El valor de pH óptimo fue de 4,5, el potencial de acumulación de 0,4 V y el tiempo de acumulación de 210 s. La determinación cuantitativa de luteolina se realizó por VPD, obteniendo una respuesta lineal entre la corriente de pico y la concentración del sustrato en el intervalo 2×10^{-10} a 3×10^{-9} M, con un límite de detección para una relación señal/ruido de 3 de 6×10^{-11} M. Esta metodología se aplicó luego a la determinación de luteolina en cáscaras de maní, obteniendo un valor de $3,26 \pm 0,04$ mg g⁻¹, que se compara razonablemente bien con el valor determinado por cromatografía HPLC ($3,50 \pm 0,06$ mg g⁻¹).

Finalmente, los microelectrodos de alambre metálicos, calentados eléctricamente, se implementaron en los comienzos de la década de 1990 (Gründler y col., 1993). Recientemente, un electrodo de disco de lápiz de plomo, calentado indirectamente con corriente directa ha sido fabricado (Wu y col., 2013). Estos autores, demostraron un fuerte efecto de la temperatura sobre la acumulación adsorptiva de LUT sobre dicho electrodo. Un límite de detección de $1,0 \times 10^{-9}$ M se obtuvo para una relación señal:ruido de 3:1 con un electrodo calentado a 44°C, el cual fue menor en más de un orden de magnitud que el límite de detección obtenido con el electrodo a temperatura ambiente. El electrodo se aplicó luego a la determinación de LUT en muestras de orina simuladas con buena precisión. Este electrodo mostró numerosas ventajas para aplicaciones analíticas, tales como: fabricación fácil, bajo costo, alta estabilidad térmica, alta sensibilidad y buena reproducibilidad.

La oxidación electroquímica de algunos flavonoides fue estudiada sobre electrodos de Pt en acetonitrilo + perclorato de tetrabutil amonio 0,1 M por VC y VPD (Masek y col., 2011). Flavona y xantona, dos flavonoides que no poseen grupos -OH como sustituyentes en los anillos A, B y C, mostraron dos y tres ondas de oxidación en el intervalo de potenciales entre 0 y 1 V (vs. el estándar interno ferrocino/ferroceno), mostrando en ambos casos el primer pico de oxidación una intensidad de corriente mucho mayor que las de los picos subsiguientes. Si bien los autores no dan una interpretación sobre la naturaleza de estos picos de oxidación, podría esperarse que el pico de oxidación principal se deba a la oxidación del anillo C y los picos de oxidación complementarios a la oxidación de productos electroactivos que se generen a través de reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga inicial. En el caso del resto de los flavonoides estudiados: morina, rutina, trihydroflavona y quercetina, estos autores

proponen que el primer pico de oxidación corresponde a los grupos -OH del anillo B y los picos subsiguientes a los -OH de los anillos A y C. En nuestra opinión esta interpretación es correcta para rutina, tryhidroflavona y quercetina, que poseen un grupo catecol en su estructura molecular, pero no para el caso de morina, que posee en el anillo B un grupo resorcinol. Consideramos que, en el caso de morina es más correcta la interpretación dada por Markovic y col. (2009), correspondiendo el primer pico voltamperométrico a la oxidación del grupo -OH en C3 del anillo C.

1.7. Referencias bibliográficas

- Aherne S. A., N. M. O'Brien, Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, **18** (2002) 75-81.
- Aragão Catunda Jr., F. E., M. F. de Araujo, A. M. Granero, F. J. Arévalo, M. G. de Carvalho, M. A. Zon, H. Fernández, The redox thermodynamics and kinetics of flavonoid rutin adsorbed at glassy carbon electrodes by stripping square wave voltammetry, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 9707-9713.
- Arts, I. C. W., P. C. H. Hollman, Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 5156-5162.
- Bonoli, M., M. Pelillo, T. G. Toshi, G. Lercker, Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE, *Food Chem.* **81** (2003) 631-638.
- Bors, W., W. Heller, C. Michel, M. Saran, Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods Enzymol.* **186** (1990) 343-355.
- Brune, M., L. Hallberg, A. B. Skanberg, Determination of Iron-Binding Phenolic Groups in foods, *J. Food Sci.* **56** (1991) 128-131.
- Butkovic V., L. Klasinc, W. Bors, Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 2816-2820.
- Chen, W. J., J. R. Song, P. Guo, Z. Y. Wen, Butein, a more effective antioxidant than α -tocopherol, *THEOCHEM* **763** (2006) 161-164.
- Chin C., P. Nagaratnam, Cytotoxic effect of butein on human colon adenocarcinoma cell proliferation, *Cancer Lett.* **82** (1994) 65-72.
- Christov, R., V. Bankova, Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector, *J. Chromatogr. A* **623** (1992) 182-185.
- Daigle, D. J., E. J. Conkerton, Analysis of flavonoids by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **6** (1983) 105-118.

- Daigle, D. J., E. J. Conkerton, Analysis of flavonoids by HPLC: an update. *J. Liq. Chromatogr.* **11** (1988) 309-325.
- de Pascual-Teresa, S., D. Treutter, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, Analysis of flavonols in beverages by highperformanceliquid chromatography with chemical reactiondetection. *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 4209-4213.
- Fabre, N., I. Rustan, E. de Hoffman, J. Quetin-Leclercq, Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12** (2001) 707-715.
- Folin, O., W. Denis, On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *J. Biol. Chem.* **12** (1912) 239-243.
- Franke, A. A., L. J. Custer, W. Wang, C. Y. Shi, HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217** (1998) 263-273.
- Gel-Moreto, N., R. Streich, R. Galensa, Chiral separation of six diastereomeric flavanone-7-O-glycosides by capillary electrophoresis and analysis of lemon juice, *J. Chromatogr. A.* **925** (2001) 279-289.
- Golabi, S. M., L. Irannejad, Preparation and electrochemical study of fisetin modified glassy carbon electrode. Application to the determination of NAHD and ascorbic acid, *Electroanalysis* **17** (2005) 985-996.
- Goldstein, J. L., T. Swain, Changes in tannins in ripening fruits, *Phytochemistry* **2** (1963) 371-383.
- Grotewold E. (Ed.), *The Science of Flavonoids*, Springer, New York, USA, 2006.
- Gründler, P., T. Zerihum, A. Moler, A. Kirbs, *J. Electroanal. Chem.* **360** (1993) 309-314.
- Hasegawa, S., M. A. Berhow, C. H. Fong, Analysis of bitter principles in Citrus. *Modern methods of plant analysis*; Springer: New York: **18** (1996) 59-80.

- Hendrickson, H. P., A. D. Kaufman, C. E. Lunte, Electrochemistry of catechol-containing flavonoids, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **12** (1994) 325-334.
- Herrero, M., E. Ibañez, A. Cifuentes, Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods, *J. Sep. Sci.* **28** (2005) 883-897.
- Hodnick, W. F., E. M. Milosavjevic, J. H. Nelson, R. S. Pardini, Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radical by flavonoids, *Biochem, Pharmacol.* **37** (1988) 2607-2611.
- Huck, C. W., G. Stecher, H. Scherz, G. Bonn, Analysis of drugs, natural and bioactive compounds containing phenolic groups by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry, *Electrophoresis* **26** (2005) 1319-1333.
- Ioku K, T. Tsushida, Y. Takei, N. Nakatani, J. Terao, Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayer, *Biochim. Biophys. Acta* **1234** (1995) 99-104.
- IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), Compiled by A. D. McNaught, A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, 1997. XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.).
- Jáč P., M. Polášek, M. Pospíšilová, Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 805-814.
- Jamshidi, A., M. Adjvadi, S. W. Husain, Determination of kaempferol and quercetin in the extract of Ginkgo Biloba leaves by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), *J. Planar Chromatogr.* **13** (2000) 57-59.
- Janeiro, P., A. M. Oliviera Brett, Catechin electrochemical oxidation mechanisms, *Anal. Chim. Acta* **518** (2004) 109-115.
- Kang, D. G., Y. C. Kim, E. J. Sohn, Y. M. Lee, A. S. Lee, M. H. Yin, H. S. Lee, Hypotensive effect of butein via the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Biol. Pharm. Bull.* **26** (2003) 1345-1347.

- Kang, J., Z. Li, X. Lu, Electrochemical study on the behavior of morin and its interaction with DNA, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **40** (2006) 1166-1171.
- Kühnau J., The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet* **24** (1976) 117-190.
- Lee S.H., The chalcone butein from *Rhus verniciflua* shows antifibrogenic activity. *Planta Med.* **69** (2003) 990-994.
- Letan, A., The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. *J. Food Sci.* **31** (1966) 518-523.
- Liu, A., S. Zhang, L. Huang, Y. Cao, H. Yao, W. Chen, X. Lin, Electrochemical oxidation of luteoline at glassy carbon electrodes and its application in pharmaceutical analysis, *Chem. Pharm. Bull.* **56** (2008) 745-748.
- López-Lázaro M., Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin, *Mini-Rev. Med. Chem.* **9** (2009) 31-59.
- Mabry, T. J., K. R. Markham, M. B. Thomas, The systematic identification of flavonoids; Springer, New York, U.S.A, 1970.
- Markovic, Z. S., S. V. Mentus, J. M. Dimitric Markovic, Electrochemical and density functional study on the reactivity of fisetin and its radicals: Implications on in vitro antioxidant activity, *J. Phys. Chem. A* **113** (2009) 14170-14179.
- Martínez A. "Flavonoides". Notas de docencia, Medellín, Colombia (2005a).
- Martínez, S., L. Valek, Z. Petrovic, M. Metikos-Hukovic, J. Piljac, Catechin oxidation action at various pH studied by cyclic voltammetry and PM3 semi-empirical calculations, *J. Electroanal. Chem.* **584** (2005b) 92-99.
- Masek, A., M. Zaborski, E. Chrzescijanska, Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode by cyclic voltammetry, *Food Chem.* **127** (2011) 699-704.
- Maza, E. M., M. B. Moressi, H. Fernández, M. A. Zon, Electrochemical oxidation of fisetin: studies related to its adsorption at glassy carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.* **675** (2012) 11-17.

- Merken, H. M., G. R. Beecher, Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A Review, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 577-599.
- Morin Ph., F. Villard, M. Dreux, Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis: II. Separation of flavonoid-3-O-glycosides differing in their sugar moiety, *J. Chromatogr. A* **628** (1993) 161-169.
- Nagy M., D. Grancai, Colorimetric determination of flavanones in propolis, *Pharmazie* **51** (1996) 100-101.
- Ogawa, A., H. Arai, H. Tanizawa, T. Miyahara, T. Toto'oka, On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta* **383** (1999) 221-230.
- Oliviera Brett, A. M., M. E. Ghica, Electrochemical oxidation of quercetin, *Electroanalysis* **15** (2003) 1745-1750.
- Pandey, M. K., S. K. Sandur, B. Sung, G. Sethi, A. B. Kunnumakkara, B. B. Aggarwal, Butein, a tetrahydrochalcone, inhibits nuclear factor (NF)-kappa B and NF-kB-regulated gene expression through direct inhibition of Ikb kinase beta on cysteine-179 residue., *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 17340-17350.
- Pietta, P. G., C. A. Rice-Evans, L. Packer (Eds), *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, U.S.A. 1998, pags. 61-110.
- Pokorny, J., N. Yanishlieva, M. Gordon. "Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas", Acribia S.A., Zaragoza, España, 2001.
- Robards, K., X. Li, M. Antolovich, S. Boyd, Characterization of citrus by chromatographic analysis of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.* **75** (1997) 87-101.
- Robards, K., M. Antolovich, Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst* **122** (1997) 11R-34R.
- Roginsky, V., E. A. Lissi, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry* **92** (2005) 235-254.
- Rusznayk, S., A. Szent-Györgi, Vitamin nature of flavones, *Nature* **138** (1936) 798-802.

- Sánchez de Rojas, V. R., B. Somoza, T. Ortega, A. M. Villar, Different mechanisms involved in the vasorelaxant effect of flavonoids isolated from *satureja obovata*, *Planta Med.* **62** (1996)554-556.
- Singleton V. L., Flavonoids. En: Childester CO, Mrak EM, Stewart Gf (eds.): *Advances in Food Research*. New York: Academic Press, 1981, pags 149-242.
- Stahl W., N. Ale-Agha, M. C. Polidori, Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol. Chem.* **383** (2002) 553-558.
- Stalikas, C. D., Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J. Sep. Sci.* **30** (2007) 3268-3295.
- Tamura, H.,Y. Hayashi, H. Sugisawa, T. Kondo, Structuredetermination of acylated anthocyanins in muscat bailey a grapes by homonuclear Hartmann-Hahn (HOHAHA) spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **5** (1994) 190-196.
- Vallejo F., F.A. Tomas-Barberan, F. Ferreres, Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1054** (2004) 181-193.
- Volikakis, G. J., C. E. Efstathiou, Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection/adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes, *Talanta* **51** (2000) 775-785.
- Wang Y, F.L. Chan, S. Chen, L. K. Leung, The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. *Life Sci.* **77**(2005) 39-51.
- Wang, F., Y. Xu, J. Zhao, S. Hu, Electrochemical oxidation of morin and interaction with DNA, *Bioelectrochem.* **70** (2007) 356-362.
- White P. J.,Y. Xing, Antioxidants from cereals and legumens, in natural antioxidants, chemistry, health effects, and applications. F. Shahidi, (Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, U.S.A., 1997, pags. 25-63.

- Woo S.W., S. H. Lee, H. C. Kang, E. J. Park, Y. Z. Zhao, Y. C. Kim, D. H. Sohn, Butein suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *J. Pharm Pharmacol.* **55** (2003) 347-352.
- Wright J. S., E. R. Johnson, G. A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 1173-1183.
- Wu, S-H., B-J. Zhu, Z-X. Huang, J-J. Sun, A heated pencil lead disk electrode with direct current and its preliminary application for highly sensitive detection of luteolin, *Electrochem. Comm.* **28** (2013) 47-50.
- Yit C.C., N.P. Das, Cytotoxic effect of butein on human colon adenocarcinoma cell proliferation, *Cancer Lett.* **82** (1994) 65-72.
- Zhao, D., X. Zhang, L. Feng, Q. Qi, S. Wang, Sensitive electrochemical determination of luteolin in peanut hulls using multi-walled carbon nanotubes modified electrodes, *Food Chem.* **127** (2011) 684-698.
- Zoulis, N. E., C. E. Efstathiou, Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids, *Anal. Chim. Acta* **320** (1996) 255-261.

CAPITULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Electroquímica

En este capítulo se discuten los fundamentos teóricos de los principios electroquímicos, considerando los fenómenos de transporte de materia que tienen lugar en la celda electroquímica, describiéndose como se afecta dicho transporte frente a un salto de potencial (técnicas de pulso) o un barrido de potencial, utilizando electrodos convencionales.

2.1.1. Fundamentos teóricos en electroquímica. Modelos de procesos

2.1.1.1. Conceptos generales

Las técnicas potenciostáticas (o de potencial controlado) trabajan en condiciones de corrientes distintas de cero. En estos casos, el potencial se usa para producir una reacción de transferencia de electrones en la superficie del electrodo, originando así una oxidación o reducción de la especie electroactiva (pérdida o ganancia de electrones) (Bard & Faulkner, 2001).

Las técnicas de potencial controlado tienen la ventaja de poseer mayor selectividad y sensibilidad a la especie de interés. En general, ofrecen también un amplio intervalo de linealidad para efectuar determinaciones electroanalíticas, sumado a la posibilidad de efectuar dichas determinaciones directamente empleando una matriz compleja. Son, además, de bajo costo (Wang, 2000; Bard & Faulkner, 2001).

2.1.1.2. Variables electroquímicas

Para estudiar el comportamiento electroquímico de un sistema en condiciones potenciostáticas, se perturban las condiciones iniciales del sistema a través de ciertas funciones eléctricas aplicadas a la celda electroquímica, que constituyen las variables controladas, mientras se registra la respuesta del sistema luego de aplicar los cambios

controlados de dichos parámetros. Como ejemplo, es posible aplicar un salto o pulso de potencial a un electrodo en una celda electrolítica, para luego registrar la variación de la corriente o la carga en función del tiempo (Bard & Faulkner, 2001).

La Fig. 2.1 muestra las variables que pueden ser controladas en un sistema electroquímico.

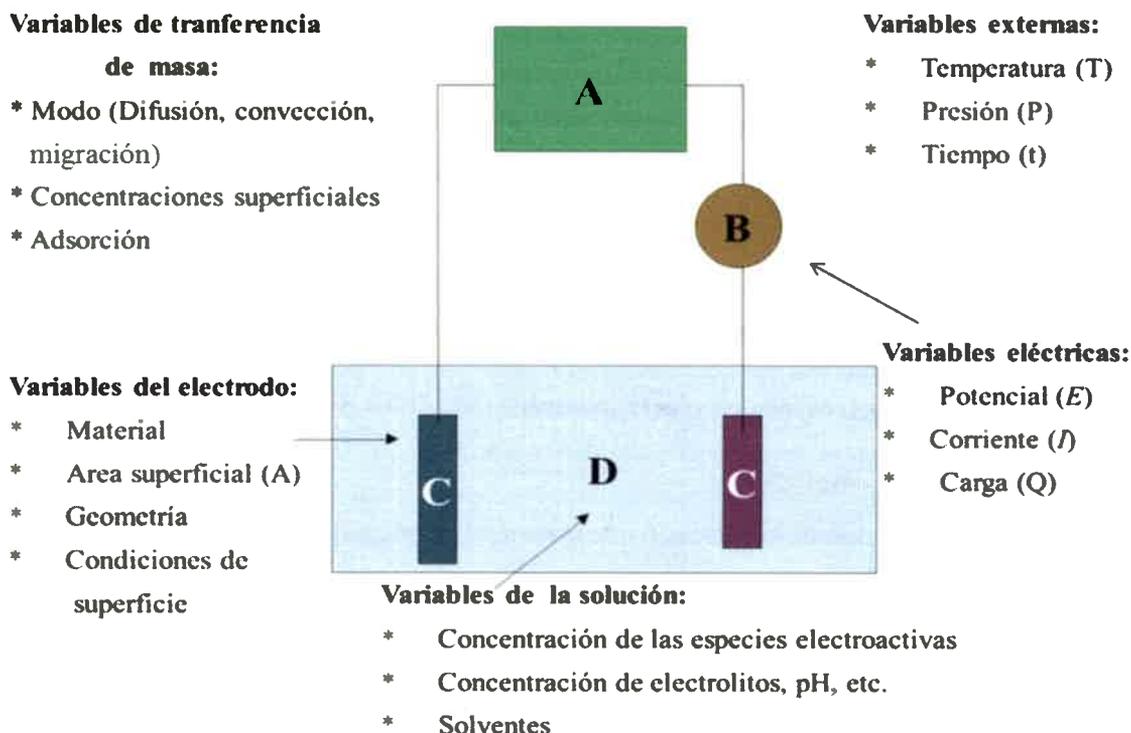


Figura 2.1. Variables que afectan la velocidad de una reacción de electrodo. **A)** Fuente de potencial; **B)** Microamperímetro; **C)** Electrodos; **D)** Solución electrolítica.

2.1.1.3. Procesos de electrodo

Cuando dos fases de naturaleza diferente se ponen en contacto, como es lo que ocurre cuando la superficie de un electrodo entra en contacto con la solución, entre ellas puede ocurrir una transferencia de carga que se clasifica como heterogénea, mientras que las transferencias de carga que ocurren en una misma fase se clasifican como homogéneas.

Para mantener la electroneutralidad del sistema heterogéneo, deben ocurrir, al menos, dos hemi-reacciones de transferencia de carga en direcciones opuestas. Si se

aplica una diferencia de potencial externa entre dos electrodos, sumergidos en una solución electrolítica, en uno de los electrodos se favorece, mediante la electrólisis, una dada reacción (oxidación o reducción) y en el otro electrodo ocurre el proceso inverso, mientras que en ambos electrodos las interfaces sólido (o líquido) – líquido experimentan una distribución de cargas diferente a la del seno de la solución.

La corriente (I) que circula por el circuito externo es la carga (Q) por unidad de tiempo que llega al electrodo de área A , la que es proporcional también al flujo de materia (j) que durante ese intervalo de tiempo llega a la superficie del electrodo.

$$\frac{I \left[\frac{C}{s} \right]}{n \left[\frac{equiv}{mol} \right] F \left[\frac{C}{equiv} \right] A [cm^2]} = j \left[\frac{mol}{scm^2} \right] \quad (2.1)$$

donde n es el número de electrones por molécula oxidada o reducida y F es la constante Faraday, que representa la carga por mol de electrones.

Dos fenómenos fisicoquímicos característicos pueden dar origen a la corriente registrada. Ellos son los procesos faradaicos y no faradaicos (Bard & Faulkner, 2001).

2.1.1.3.1. Procesos faradaicos

Son aquellos en los que la transferencia de electrones, procedente de una etapa de oxidación o de reducción de la sustancia de interés, atraviesa la interface electrodo-solución. Este proceso está gobernado por la ley de Faraday, que establece que la carga eléctrica vinculada a la reacción de la sustancia de interés involucra un cambio de $n[\text{mol}] \times 96487 [\text{coulombios (C)/mol}]$. La corriente faradaica da una medida directa de la velocidad de reacción.

2.1.1.3.2. Procesos no faradaicos

Son aquellos que ocurren sin transferencia de electrones a través de la interface electrodo-solución en un dado intervalo de potencial aplicado, debido a condiciones termodinámicas o cinéticas desfavorables, aunque pueden ocurrir fenómenos capaces de modificar la superficie del electrodo con el cambio de potencial aplicado, tales como la adsorción y/o desorción de especies, solventes, etc. Bajo estas circunstancias, aún

cuando no existan reacciones netas de transferencia de electrones, se pueden originar corrientes capacitivas transitorias, capaces de influenciar significativamente la respuesta electroquímica cuando se produzcan cambios en el área del electrodo, el potencial o la composición de la interface.

En todo proceso electroquímico que involucre una transferencia de electrones, los procesos faradaicos y no faradaicos se presentan simultáneamente en la interface electrodo-solución.

Si bien los procesos faradaicos son los que cobran mayor interés en el estudio de los procesos electroquímicos, debe considerarse también que la influencia de los procesos no faradaicos pueden afectar el análisis de los resultados obtenidos, tanto si el estudio se realiza con fines de obtener información correcta de la transferencia de carga de la sustancia de interés y, de los posibles mecanismos asociados con esta transferencia, como si se pretende correlacionar la respuesta faradaica obtenida con la concentración de la sustancia en estudio, a los fines de obtener una curva de calibración repetitiva y selectiva. En todos los casos, es necesario que la corriente no faradaica o corriente de blanco influya de la menor manera posible sobre la respuesta faradaica. Se entiende por **corriente de blanco** a la respuesta $I-E$, obtenida cuando se realiza la experiencia en iguales condiciones experimentales, pero sin presencia de la sustancia responsable de la señal electroquímica (sustancia electroactiva). La sustracción de la corriente de blanco de aquella lograda en la presencia de la sustancia electroactiva, si bien no es un procedimiento exacto, permite minimizar todos los componentes de corriente que no sean de interés analítico.

Los gráficos que representan en la ordenada la corriente (I) y en la abscisa el potencial aplicado al electrodo (E), obtenidos a partir de una solución de la sustancia de interés y, bajo condiciones de trabajo determinadas, reciben el nombre de **voltamperogramas**. La respuesta obtenida dependerá del proceso involucrado en la reacción de electrodo y de las condiciones de trabajo, donde la corriente total es la suma de los términos faradaicos de la sustancia en cuestión y de las corrientes no faradaicas generadas por el blanco.

En el caso de las reacciones electroquímicas más sencillas, que involucran la presencia de una especie en solución y, en ausencia de reacciones químicas homogéneas

o reacciones superficiales acopladas, la velocidad de la reacción de electrodo (o la corriente) está gobernada por la velocidad de los siguientes procesos:

- * el transporte de materia desde el seno de la solución hacia el electrodo.
- * la transferencia de carga a través de la interface sólido (o líquido)-líquido.
- * el posterior transporte de los productos desde el electrodo hacia el seno de la solución.

En otros modelos más complejos pueden existir reacciones de transferencia de carga con complicaciones cinéticas o superficiales que anteceden o suceden a la etapa de transferencia de carga de cada compuesto presente en solución.

Cuando la reacción total es controlada por la velocidad con que la especie llega o deja la superficie del electrodo, se la clasifica como reacción **“controlada por difusión”** (cuando éste es el principal modo de transporte de materia). Si la etapa determinante de la velocidad de la reacción global es la transferencia de carga, se clasifica a la reacción como de **“control activado”**. Dependiendo de la escala de tiempo en que se realice el experimento, es posible estudiar ambos procesos en forma independiente y determinar los parámetros de cada uno de ellos.

2.1.1.4. Reversibilidad en Electroquímica

En Electroquímica, con frecuencia se emplean los conceptos de “proceso reversible” y/o “proceso irreversible” para identificar, de algún modo, los procesos que tienen lugar en el electrodo de trabajo en un experimento electroquímico. El concepto de reversibilidad es importante al tratar los procesos reales termodinámicamente. Así, el concepto de equilibrio involucra la idea de que un proceso se puede mover en cualquiera de las dos direcciones opuestas a partir de la posición de equilibrio. Desafortunadamente, el término “reversible” opera sobre significados sesgadamente relacionados en la literatura electroquímica, tres de los cuales se distinguen a continuación.

2.1.1.4.1. Reversibilidad termodinámica

Si se considera un cambio reversible entre dos estados, se considera una serie infinita y continua de estados de equilibrio, que involucran un intervalo de tiempo infinito hasta llegar al estado final. Podemos asignar un comportamiento termodinámicamente reversible a un proceso de interés cuando un cambio infinitesimal en la fuerza directriz direcciona la evolución del proceso en igual sentido que dicha fuerza directriz.

2.1.1.4.2. Reversibilidad química

Si se considera un proceso de reducción en la superficie de un electrodo de trabajo, donde el electrodo actúa como dador de electrones (e^-), podemos representar el proceso como:



y si, posteriormente, al invertir la corriente, se invierte el flujo de electrones de manera tal que el electrodo ahora actúa como un aceptor de electrones, ocurre un proceso exactamente inverso al planteado anteriormente.



donde n es el número de electrones intercambiados en la reacción de electrodo.

Por lo tanto, podemos decir que el proceso de electrodo es **químicamente reversible**, ya que al variar el flujo de electrones aplicando condiciones opuestas de trabajo, el sistema transcurre también en forma opuesta. Si, al otorgar condiciones opuestas, el sistema responde de un modo diferente al planteado se dice que el sistema es **químicamente irreversible**.

2.1.1.4.3. Reversibilidad práctica

El término conocido como **reversibilidad práctica**, también conocido como **reversibilidad experimental**, no es un concepto absoluto. En verdad, conforma un ajuste entre teorías, operadores y experiencias. Como los procesos reales ocurren en tiempos finitos, no podemos describirlos como reversibles en un estricto sentido termodinámico. No obstante, experimentalmente es posible operar en condiciones tales que podamos aplicar las ecuaciones y leyes de la termodinámica con un mínimo de errores, de tal modo que bajo estas circunstancias sea posible considerar al proceso como reversible o irreversible.

En electroquímica la relación entre el potencial y las concentraciones de reactivos y productos se establece mediante la ecuación de Nernst o alguna otra forma derivada de ella, de tal manera que si un sistema cumple con la ecuación de Nernst se clasifica como reacción reversible o nernstiana.

Así, dada la reacción redox: $O + ne^- = R$, la expresión de la ecuación de Nernst es:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_O [O]}{\gamma_R [R]} \quad (2.2)$$

donde E° es el potencial estándar de la cupla $O + ne^- = R$, γ son los coeficientes de actividad de O y R y [O] y [R] son las concentraciones en equilibrio de las especies O y R, respectivamente, sobre la superficie del electrodo si la corriente que circula por la celda es distinta de cero.

Trabajar con actividades para evaluar los potenciales de las hemi-reacciones resulta complicado, debido a que los coeficientes de actividad son casi siempre desconocidos. A los fines de evitar este inconveniente, es posible trabajar con el potencial formal, E_f° , que se define como el potencial de la hemi-reacción vs. el electrodo normal de hidrógeno (ENH), cuando la relación entre las concentraciones de las especies O y R es igual a la unidad. De tal manera, el potencial formal incorpora el potencial estándar E° y los coeficientes de actividad γ (Wang, 2000; Bard & Faulkner, 2001). Así,

$$E = E_f^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]}{[R]} \quad (2.3)$$

dónde: $E_f^o = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{Y_o}{Y_R}$

2.1.1.5. Fenómenos de transporte en una celda electroquímica

Si se aplica al electrodo de trabajo un potencial externo, suficientemente distinto del potencial de equilibrio, ocurre, bajo condiciones adecuadas, la electrólisis de la sustancia de interés. Para todas las técnicas voltamperométricas que posteriormente se mencionarán, la condición de trabajo es de **microelectrólisis**, es decir, que existe un consumo mínimo de material electroactivo sobre la superficie del electrodo, el cual no modificará significativamente la concentración inicial del reactivo en el seno de la solución.

Consecuentemente, un sistema electroquímico puede ser considerado como de difusión forzada, ya que las especies en solución son direccionadas por fuerzas externas desequilibrantes de manera tal que, como resultado de estas fuerzas, las especies son aceleradas de forma diferente una de otra, dando lugar a una separación de las mismas (Bard & Faulkner, 2001).

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

El primero en postular una relación empírica para caracterizar el flujo de materia fue A. Fick. En su honor, la expresión que caracteriza la difusión de un componente particular en un sistema isobárico e isotérmico es conocida como **“Primera Ley de Fick”** y se detalla, en coordenadas lineales, a continuación (Bard & Faulkner, 2001):

$$j_o(x, t) = -D_o \frac{\partial c_o(x, t)}{\partial x} \quad (2.4)$$

donde $j_O(x, t)$ es el flujo de la especie O en la dirección x , medido con respecto a la velocidad media y D_O es el coeficiente de difusión de O, expresado en unidades de *longitud*²*tiempo*⁻¹.

En su forma más general, el flujo puede representarse en función del gradiente de concentración (el que puede ser característico, dependiendo del sistema de coordenadas de trabajo elegido) según:

$$j_A = -D_A \nabla C_A \quad (2.5)$$

donde ∇C_A representa el gradiente de concentración de una especie genérica A y j_A es el vector flujo. El signo menos indica que el vector flujo es opuesto a la dirección de incremento de concentración de la especie A.

La ecuación diferencial que permite describir el vector flujo de materia desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo, respecto a un sistema de coordenadas fijo, en la forma más completa, se conoce como ecuación de Nernst-Planck, cuya expresión general en forma vectorial, para una partícula cargada, es la siguiente:

$$j_i = -D_i \nabla c_i - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \nabla \phi + c_i v \quad (2.6)$$

donde, el primer término de la derecha, corresponde al transporte por difusión dado por el gradiente de concentraciones (∇c_i) derivado de la Ley de Fick, el segundo término corresponde al transporte por migración debido al gradiente de campo eléctrico ($\nabla \phi$) dentro de la celda electroquímica y, el último término contempla el transporte de materia por convección, donde v representa al vector velocidad de la masa de fluido respecto a un sistema de coordenadas fijo. Esto permite resumir que el transporte de materia desde el seno de la solución a la interface electrodo-solución, puede ser producto de tres mecanismos básicos: difusión, migración y convección.

2.1.1.5.1. Transporte migratorio

La migración involucra el movimiento de iones debido a gradientes del campo eléctrico, donde los iones se acercan al electrodo de carga opuesta (Bard & Faulkner, 2001).

En voltamperometría, con el fin de minimizar los efectos migratorios, a la solución de trabajo se le agrega un electrolito soporte, el cual debe ser electroquímicamente inerte y estar presente a una concentración mayor que la especie de interés. De este modo, se minimiza la fracción de corriente migratoria transportada por la sustancia electroactiva y, por ende, la migración como un mecanismo de transporte de ésta.

2.1.1.5.2. Transporte convectivo

Los fenómenos de transporte convectivo pueden clasificarse en:

- (1) **Convección forzada:** cuando el movimiento del fluido se favorece mecánicamente, por ejemplo, mediante agitación.
- (2) **Convección libre:** cuando el movimiento del fluido ocurre por una diferencia de densidades, que pueden resultar de una diferencia de concentraciones o de temperaturas.

La convección forzada incrementa el transporte de masa, reduciendo y estabilizando el espesor de la capa de difusión de Nernst (δ), dentro de la cual la difusión es la forma significativa del transporte de masa y, fuera de ella, la convección natural o forzada es lo suficientemente fuerte como para mantener las concentraciones de las especies como en el seno de la solución. En la Fig. 2.2 se muestra un esquema de la capa de difusión.

Una disminución en el espesor de la capa de difusión resulta en un incremento de la corriente límite, por lo que sólo el control efectivo de la agitación permitirá obtener corrientes límites constantes y reproducibles.

En general, a tiempos menores que 100 s, sin agitación y a temperatura constante, se puede lograr que la convección térmica y el gradiente de concentración no influyan en los resultados experimentales (Bard & Faulkner, 2001).



Figura 2.2. *Capa de difusión de Nernst en las proximidades de un electrodo sumergido en una solución donde la concentración de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo es nula ($c_O(x=0) = 0$). Se puede observar también el efecto de la convección como transporte de materia hacia la capa de difusión.*

2.1.1.5.3. Transporte por difusión

Las reacciones de electrodo más simples son aquellas en las cuales la cinética de todas las transferencias electrónicas y reacciones químicas asociadas con ellas son muy rápidas si se las compara con la velocidad de los procesos de transferencia de masa. Bajo estas condiciones, el sistema puede ser tratado en forma medianamente simple, ya que:

- 1) Las reacciones homogéneas pueden ser consideradas en equilibrio, y
- 2) Las concentraciones superficiales de las especies involucradas en los procesos faradaicos están relacionadas al potencial de electrodo por la ecuación de Nernst.

El transporte de materia se realiza por un gradiente de concentración dado que, durante la electrólisis, las concentraciones de algunas especies disminuyen dentro de la capa de difusión mientras que la de otras aumenta. Estas variaciones causan la difusión de las moléculas hacia o desde la superficie del electrodo.

Como consecuencia de lo anteriormente mencionado, el espesor de la capa de difusión se incrementa con el tiempo, tendiendo a un valor límite al aproximarse el sistema a un estado estacionario y con una concentración de reactivo (especie que difunde) igual a cero sobre la superficie del electrodo. La rapidez con que se puede

alcanzar este valor límite depende de la geometría del electrodo o de la técnica electroquímica empleada.

Bajo otras condiciones de transferencia de materia, por ejemplo, con una convección forzada controlada, constante y reproducible, el espesor de la capa de difusión alcanza un valor límite pequeño y reproducible (Bard & Faulkner, 2001).

2.1.1.6. Relación entre potencial y corriente

Cada ión o molécula tiene una velocidad de difusión característica, que depende tanto de sus propiedades como de la viscosidad del medio (Bard & Faulkner, 2001; Wang, 2000).

A partir de la Primera Ley de la Difusión de Fick (ec. 2.4) y, de considerar que la corriente es proporcional al flujo de materia, es posible obtener la siguiente expresión para un electrodo plano de área A en la superficie del electrodo ($x = 0$):

$$I = nFAD_O \left[\frac{\partial c_O(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (2.7)$$

La teoría de Nernst considera que la variación de la concentración con la distancia desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo es lineal, como se muestra en la Fig. 2.3, siendo δ el espesor de la capa de difusión de Nernst.

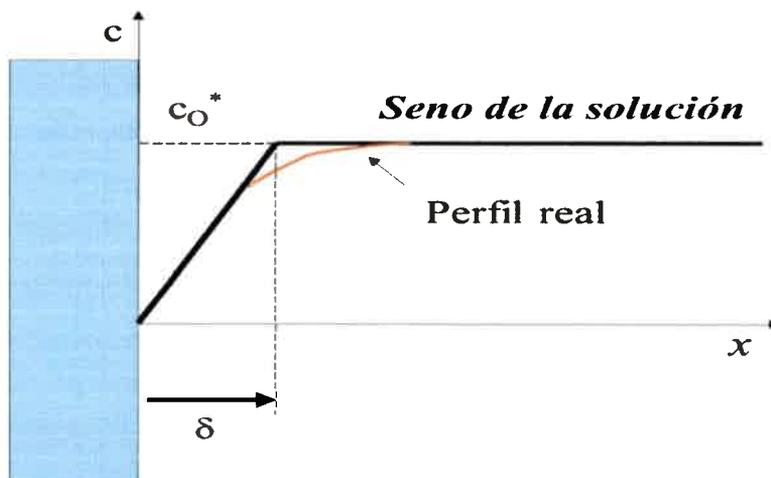


Figura 2.3. Esquema representativo de la capa de difusión considerando lineal el gradiente de concentraciones dentro de la misma.

Cuando las condiciones son tales que la concentración de la especie O en la superficie del electrodo es igual a cero, $c_{O(x=0)} = 0$, se está en condiciones de flujo máximo, por lo que es posible establecer que la corriente límite (I_L) que se registra durante la electrólisis se relaciona con el coeficiente de difusión de la especie O, D_O y la concentración de O en el seno de la solución, c_O^* mediante la ec. 2.8 (Oldham & Myland, 1994; Wang, 2000; Bard & Faulkner, 2001).

$$I_L = \frac{nFAD_O^{1/2}c_O^*}{(\pi)^{1/2}} \quad (2.8)$$

la que es conocida como ecuación de Cottrell.

Si la concentración de la sustancia O sobre la superficie del electrodo no es cero, sino que está comprendida entre cero y c_O^* , la corriente queda determinada por la relación entre las concentraciones de las formas oxidada y reducida de la sustancia electroactiva sobre la superficie del electrodo que establece la Ley de Nernst.

Dado que, en la superficie del electrodo, $x = 0$, los flujos de O y R son iguales y de signo contrario, se puede escribir:

$$D_O \left[\frac{\partial c_O(x, t)}{\partial x} \right]_{x=0} + D_R \left[\frac{\partial c_R(x, t)}{\partial x} \right]_{x=0} = 0 \quad (2.9)$$

Reordenando la ecuación de Nernst (ec. 2.3) y aplicándola a las concentraciones de O y R en la superficie del electrodo, se llega a:

$$\frac{c_O(x=0)}{c_R(x=0)} = e^{\frac{nF(E-E_f^0)}{RT}} = \theta \quad (2.10)$$

donde E_f^0 es el potencial formal de la cupla redox O/R, como fue definido previamente.

Por lo tanto, es posible escribir la expresión de la corriente en función de la corriente límite según:

$$I(t) = \frac{nFD_O c_O^* A}{(\pi t)^{1/2} (1 + \xi \theta)} = \frac{I_L}{(1 + \xi \theta)} \quad (2.11)$$

Se puede observar que esta ecuación difiere de la ecuación de Cottrell sólo por el término $(1 + \xi \theta)$, donde:

$$\xi = (D_O/D_R)^{1/2} \quad (2.12)$$

Aplicando logaritmos naturales a la ecuación 2.11 se llega a:

$$E = E_f^o + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_R}{D_O} \right)^{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(I_L - I(t))}{I(t)} \quad (2.13)$$

que se aplica en el caso de que sólo O esté inicialmente presente en solución.

Por otro lado, la expresión general de la curva corriente-potencial para el caso en que ambos componentes de la cupla redox, O y R, estén inicialmente presentes en solución es (Rieger, 1994):

$$E = E_f^o + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_R}{D_O} \right)^{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{I_{L,C} - I(t)}{I(t) - I_{L,A}} \right) \quad (2.14)$$

donde $I_{L,C}$ e $I_{L,A}$ son las corrientes límites de reducción (catódicas) y de oxidación (anódicas), respectivamente.

La ecs. (2.13) y (2.14) permiten aplicar un criterio utilizado para evaluar la reversibilidad del proceso de electrodo. Así, para un sistema reversible, gráficos de E vs. $\log [(I_L - I(t))/I(t)]$ o E vs. $\log [(I_{L,C} - I(t))/(I(t) - I_{L,A})]$ serán lineales, con pendientes de $2,303 RT/nF$ (ó $59,1/n$ mV a 25°C) (Bard & Faulkner, 2001). Así, de dichas pendientes es posible inferir el número de electrones intercambiados en el proceso de electrodo.

El potencial de media onda, $E_{1/2}$, es aquel valor de potencial para el cual el valor de la corriente es la mitad de su valor límite ($I(t) = I_L/2$ cuando sólo O está presente en solución o $(I_{L,C} + I_{L,A})/2$ cuando tanto O como R están presentes en solución) y se lo define mediante la siguiente ecuación (Bard & Faulkner, 2001):

$$E_{1/2} = E_f^o + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_R}{D_O} \right)^{1/2} \quad (2.15)$$

El $E_{1/2}$ se obtiene de la ordenada al origen de gráficos E vs. $\log [(I_L - I(t))/I(t)]$ o E vs. $\log [(I_{L,C} - I(t))/(I(t) - I_{L,A})]$ y provee información termodinámica semi-cuantitativa, aún cuando se desconozcan los valores reales de D_O y D_R .

El $E_{1/2}$ constituye una propiedad muy útil, característica de la especie electroactiva que difunde. Un ejemplo de su determinación se muestra en la Fig. 2.4a, para el caso en que sólo O esté inicialmente presente en solución. Bajo condiciones de transferencia electrónica de cinética rápida y asumiendo que los coeficientes de difusión de O y R son iguales, $E_{1/2}$ es prácticamente igual al E_f^o .

La no compensación de la resistencia interna u óhmica de la celda conduce a una deformación de la onda sigmoidea, con el consecuente corrimiento del potencial de media onda. Este voltaje adicional requerido se lo conoce con el nombre de sobrepotencial óhmico (η_Ω) y queda representado en la Fig. 2.4b (Kissinger & Heineman, 1984; Bard & Faulkner, 2001).

Cuando se realiza la compensación óhmica se minimiza la deformación de la onda. Para ello, es importante considerar la ubicación de los electrodos de trabajo y referencia en la celda electroquímica, los solventes utilizados y el diseño de la celda empleada (Kissinger & Heineman, 1984, Oldham & Myland, 1994; Bard & Faulkner, 2001).

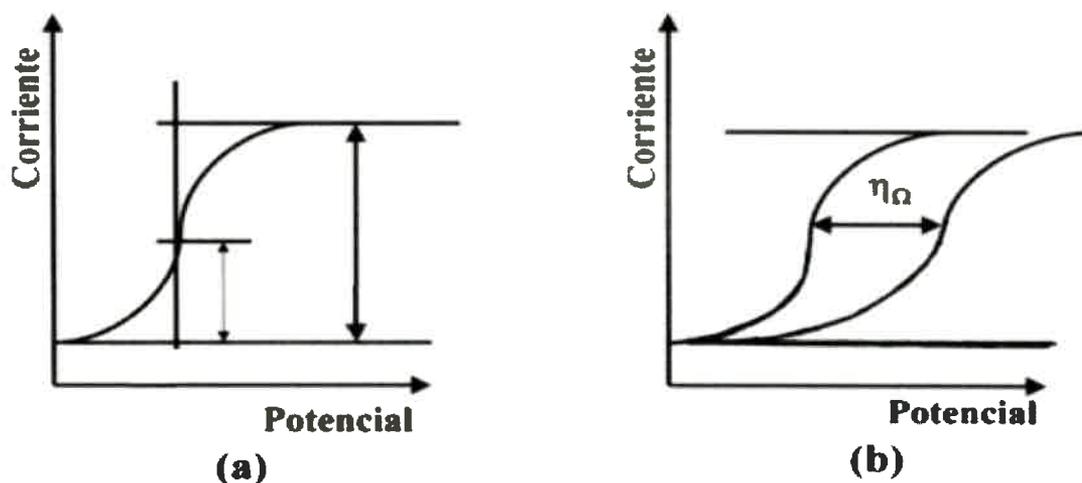


Figura 2.4. (a) Representación del potencial de media onda en un voltamperograma. (b) Representación del sobrepotencial óhmico y su efecto sobre el voltamperograma.

2.1.1.7. Técnicas electroquímicas

2.1.1.7.1. Cronoamperometría y cronoculometría

En un experimento de cronoamperometría, el electrodo de trabajo inicialmente está en una condición donde no existe flujo de corriente. Este estado es perturbado por la imposición de un cambio instantáneo del potencial, conocido como pulso de potencial (Wang, 2000; Bard & Faulkner, 2001).

Así, la técnica consiste en cambiar, “instantáneamente”, el potencial del electrodo de trabajo desde un valor E_0 (potencial inicial), en el cual no ocurren procesos faradaicos, hasta un valor, E_{final} , donde la concentración de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo es cero, siendo así máximo el gradiente de concentración que se genera.

En la Fig. 2.5a se muestra el tipo de perturbación impuesta al electrodo de trabajo y en la Fig. 2.5b el transitorio corriente-tiempo obtenido como respuesta a la perturbación aplicada al electrodo de trabajo.

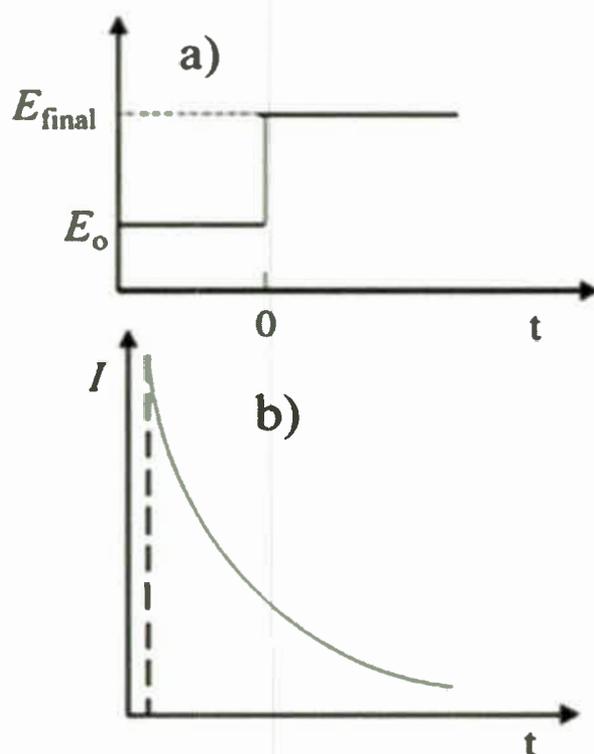


Figura 2.5. *Cronoamperometría. a) Programa de potencial aplicado al electrodo de trabajo. b) Variación de la corriente con el tiempo.*

Se asume que la perturbación se aplica a una solución no agitada, empleando un electrodo plano y considerando una cupla redox simple (ec. 2.16) bajo las condiciones de potenciales inicial y final indicadas previamente.



En los sistemas controlados por difusión, la corriente registrada está determinada por el balance de los flujos de las especies O y R sobre la superficie del electrodo, cumpliendo con la ecuación de Nernst.

La concentración instantánea de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo y la dependencia funcional de la concentración con la distancia desde el

electrodo y el tiempo de electrólisis, se obtienen mediante la resolución de las ecuaciones de difusión de Fick, bajo determinadas condiciones iniciales y de contorno que impone la técnica en particular y aplicando el método de la Transformada de Laplace. Esto permite convertir la ecuación diferencial de segundo orden en una ecuación diferencial simple, que se resuelve en el Espacio de Laplace. Luego de obtener el flujo de material electroactivo en el espacio de Laplace, aplicando la función anti-transformada de Laplace se obtiene el flujo de la especie en el espacio real y de allí la expresión de la corriente.

La solución a la que se arriba se conoce como *ecuación de Cottrell, ec. (2.8)* (Kissinger & Heineman, 1984; Bard & Faulkner, 2001).

La validez de la ecuación de Cottrell ha sido ampliamente verificada. Esta ecuación predice que un gráfico de $I(t)$ vs. $t^{-1/2}$ debería ser una línea recta sin ordenada al origen, de cuya pendiente es posible determinar el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, conociendo el número de electrones, n , intercambiados en el proceso de electrodo, el área del electrodo, A , y la concentración de O en el seno de la solución (c_0^*). En estos gráficos, las desviaciones de la linealidad pueden indicar, entre otras cosas, la existencia de reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga inicial.

En la Fig. 2.6 se muestran los perfiles de concentración registrados a diferentes tiempos, luego de aplicar al electrodo de trabajo un salto de potencial de magnitud tal que la concentración de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo sea cero a cualquier tiempo.

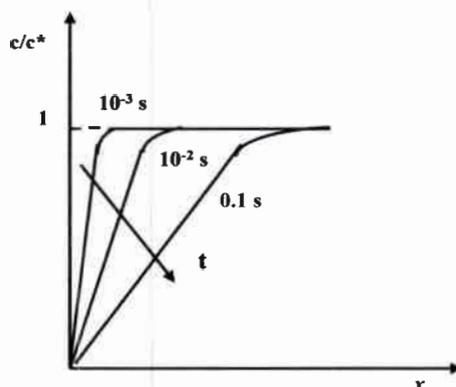


Figura 2.6. Perfiles de concentración registrados a diferentes tiempos. $D_0 = 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $n = 1$ y $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Bard & Faulkner, 2001).

La ecuación de Cottrell (ec. 2.8) da la respuesta cronoamperométrica del sistema y su integral desde $t = 0$ da la carga acumulada que está involucrada en la reducción de la especie O (ec. 2.16), obteniendo así la respuesta cronoculométrica

$$Q = \frac{2nFAc_0^*D_0^{1/2}t^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (2.17)$$

de modo que un gráfico de Q vs. $t^{1/2}$ es lineal, siendo la pendiente de este gráfico también útil para calcular D_0 si se conocen A y c_0^* .

La ec. 2.17 predice que el componente difusional de la carga sería cero a $t = 0$. Sin embargo, un gráfico de Q vs. $t^{1/2}$ generalmente no pasa por el origen debido a que, al menos en los casos más simples, la carga tiene un componente adicional, que es el cargado de la doble capa eléctrica (Q_{dc}), de modo que:

$$Q = \frac{2nFAc_0^*D_0^{1/2}t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{dc} \quad (2.18)$$

Por otro lado, en el caso de que exista adsorción sobre la superficie del electrodo, a la integral de la ecuación de Cottrell se le incluye un nuevo término, $nFA\Gamma$, en donde a "T" se lo conoce como "concentración superficial" de la especie adsorbida, y sus

unidades son moles/cm². Cuando ocurre adsorción no se puede conocer la carga de la doble capa, Q_{dc} , en una simple experiencia realizada con el blanco, ya que ésta difiere de la que se obtiene en presencia de la sustancia adsorbida. Debido a ello, para poder calcular el valor de Q_{dc} es necesario realizar una cronoculometría de doble pulso de potencial (CCDPP), ya que ésta elimina el cargado neto de la doble capa, volviendo el potencial de electrodo al valor inicial (Fig. 2.7a), aplicando un doble pulso de potencial. En las Figs. 2.7b y 2.7c se muestran los correspondientes transitorios I vs. t y Q vs. t obtenidos en un experimento de doble pulso de potencial.

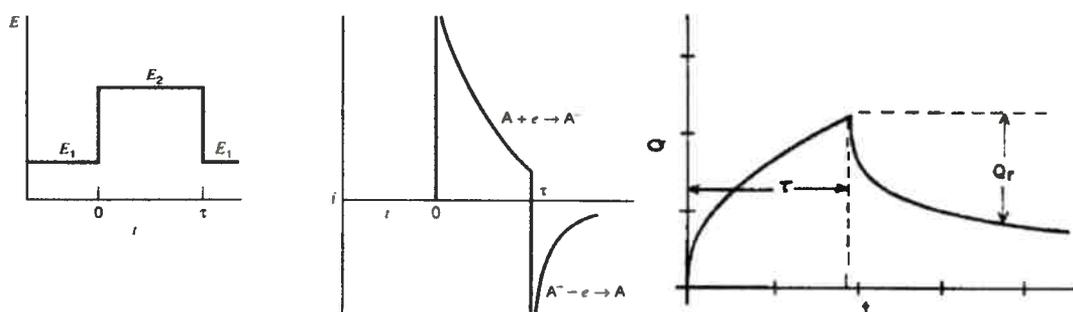


Figura 2.7. Esquema general de la técnica de CCDPP: **a)** Programa de pulso de potencial aplicado; **b)** Respuesta en corriente obtenida; **c)** Integración en el tiempo de la corriente obtenida (Bard & Faulkner, 2001).

De modo que:

$$\text{de } E_1 \text{ a } E_2 \quad Q = \frac{2nFAc_o^*D_o^{1/2}t^{1/2}}{\pi^{1/2}} + Q_{dc} + nFA\Gamma \quad (2.19)$$

$$\text{y de } E_2 \text{ a } E_1 \quad Q = \frac{2nFAc_o^{1/2}D_o^{1/2}}{\pi^{1/2}} (\sqrt{t} - \sqrt{t-\tau}) \quad (2.20)$$

donde τ es el tiempo de pulso. La carga inversa (Fig. 2.7c) se define como:

$$Q_i = Q_\tau - Q_{(t>\tau)} \quad (2.21)$$

$$Q_i = \frac{2nFAc_o^{1/2}D_o^{1/2}}{\pi^{1/2}} (\sqrt{\tau} + \sqrt{t-\tau} - \sqrt{t}) + Q_{dc} \quad (2.22)$$

ó

$$Q_i = \frac{2nFAc_o^{1/2}D_o^{1/2}}{\pi^{1/2}} \theta + Q_{dc} \quad (2.23)$$

donde $\theta = (\sqrt{\tau} + \sqrt{t-\tau} - \sqrt{t})$.

En la Fig. 2.8 se muestra un gráfico de Q vs. $t^{1/2}$ y Q_i vs. θ . A partir de la diferencia en las ordenadas al origen de ambos gráficos es posible determinar $nFA\Gamma$ (ecs. 2.19 y 2.22).

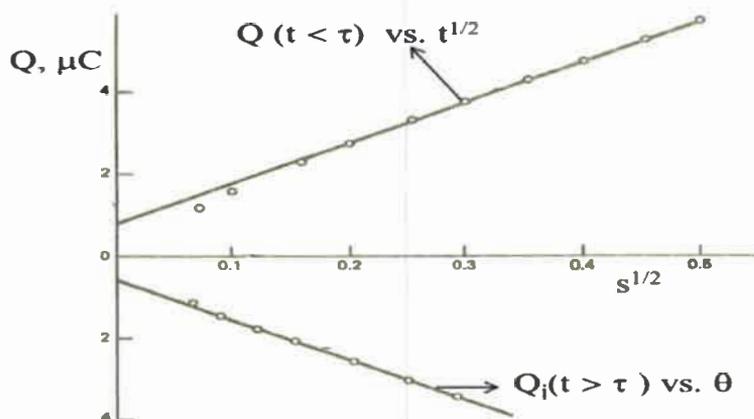


Figura 2.8. Cronoculometría de doble pulso de potencial. Dependencia de Q vs. $t^{1/2}$ (para $t < \tau$) y Q_i vs. θ (para $t > \tau$).

Christie y col. (1967) propusieron la siguiente ecuación para determinar $nFA\Gamma$ para cuplas redox simples (ec. 2.16), donde sólo O está adsorbido sobre la superficie del electrodo.

$$nFA\Gamma = \frac{{}^oQ - {}^oQ_i}{1 - a_0} \quad (2.24)$$

donde oQ y oQ_i son las ordenadas al origen de los gráficos Q vs. $t^{1/2}$ y Q_i vs. θ , respectivamente y $a_0 = -0,0688$. Un chequeo del valor obtenido para $nFA\Gamma$, a partir de la ec. 2.24, se puede realizar a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{S_i}{S} = 1 + a_1 \frac{nFA\Gamma}{Q_c} \quad (2.25)$$

donde S_i y S son las pendientes de los gráficos Q_i vs. θ y Q vs. $t^{1/2}$, respectivamente, $a_1 = 0,970$ y $Q_c = Q(t = \tau) - {}^oQ$. Así, la carga de la doble capa eléctrica está dada por (Christie y col., 1967):

$$Q_{dc} = \frac{{}^oQ_i - a_0 {}^oQ}{1 - a_0} \quad (2.26)$$

Por otro lado, en el caso de que ambas especies de la cupla redox (ec. 2.16) estén adsorbidas, pero R esté adsorbida en una menor extensión que O, se dedujo la siguiente expresión (Christie y col., 1967):

$$\frac{o_{Q^-} - o_{Qi}}{1 - a_o} = nFA (\Gamma_O - \Gamma_R) \quad (2.27)$$

donde Γ_O y Γ_R son las concentraciones superficiales de O y R, respectivamente. En este caso, se podrá determinar sólo un valor aparente para la carga de la doble capa eléctrica:

$$\frac{o_{Qi} - a_o o_Q}{1 - a_o} = Q_{dc} + nFA\Gamma_R \quad (2.28)$$

el cual será mayor que el verdadero valor por el término $nFA\Gamma_R$.

Por otro lado, en el caso de que la reacción de transferencia de carga esté complicada por una reacción química posterior de (pseudo) primer orden (mecanismo EQ, donde E representa la reacción de transferencia de carga y Q la reacción química acoplada) para generar un producto el cual es no electroactivo en la región de potenciales donde se descarga O, la ec. 2.26 se puede utilizar también para determinar la carga de la doble capa eléctrica bajo las siguientes condiciones: i) en el límite del caso cinético a tiempos cortos ($\tau \rightarrow 0$) y ii) en estudios de reacciones químicas posteriores, donde la remoción de un reactivo sea factible (Ridgway y col., 1972).

2.1.1.7.2. Voltamperometría cíclica

2.1.1.7.2.1. Sistemas controlados por difusión

En la Fig. 2.9a se muestra el programa de potencial que se aplica al electrodo de trabajo en un experimento de voltamperometría cíclica (VC). Así, se aplica un barrido lineal de potencial (ec. 2.29), desde un potencial inicial donde no ocurre reacción faradaica, hasta un cierto tiempo $t = \lambda$, donde se invierte la dirección del barrido de potencial. Así, el programa de potencial para el barrido inverso está expresado por la ec. 2.30 (Bard & Faulkner, 2001; Wang, 2000).

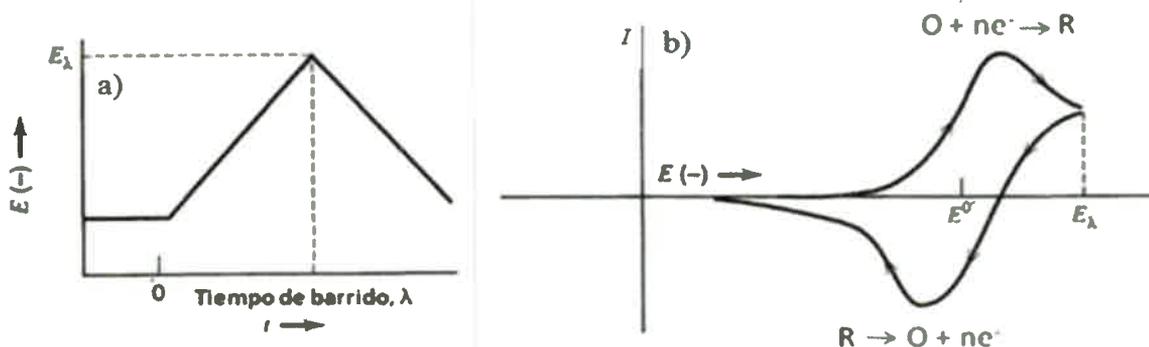


Figura 2.9. Voltamperometría cíclica. **a)** Programa de potencial aplicado al electrodo de trabajo; **b)** respuesta corriente-potencial obtenida para una cupla redox simple (ec. 2.15).

$$E = E_i - v t \quad \text{para } 0 < t \leq \lambda \quad (2.29)$$

y

$$E = E_i - 2v \lambda + v t \quad \text{para } t > \lambda \quad (2.30)$$

donde v es la velocidad a la cual se varía el potencial.

Considerando una cupla redox simple (ec. 2.16), controlada por difusión, a medida que el potencial del electrodo de trabajo se hace más negativo respecto del E_i , la concentración de la especie electroactiva O en la interface comienza a disminuir, incrementándose el flujo de ésta hacia la superficie del electrodo y, consecuentemente, también aumenta la corriente. En VC, la existencia de la onda anódica (barrido inverso) se explica si se tiene en cuenta que, al potencial en el cual la dirección del barrido del mismo se invierte (E_λ), existe un exceso de R en la interface electrodo-solución (Fig. 2.9b).

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 $x = 0$ (Bard & Faulkner, 2001).

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 (1948) y Sevcik (1948) y, posteriormente, por Nicholson y Shain (1964). Haciendo uso del teorema de la convolución, fue posible arribar sólo a una solución numérica, donde la corriente puede ser expresada por:

$$I = nFAc_o^*(\pi D_o \sigma)^{1/2} \chi(\sigma, t) \quad (2.31)$$

donde $\sigma = (nFv/RT)$ y $\chi(\sigma, t)$ es la función corriente, 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 el área del electrodo y los demás términos tienen su significado usual. $\chi(\sigma, t)$ puede ser obtenida a través de la siguiente ecuación (Bard & Faulkner, 2001):

$$\int_0^{\sigma t} \frac{\chi(z)}{(\sigma t - z)^{1/2}} dz = \frac{1}{1 + \xi \theta S(\sigma t)} \quad (2.32)$$

con:

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

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

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 ec. 2.32 y, a partir de ella, se puede determinar la corriente (ec. 2.31). Nótese que la función $\chi(\sigma t)$ en cualquier punto dado es un número, de modo que la ec. 2.31 da la relación funcional entre la corriente en cualquier punto y las variables experimentales. Específicamente, para sistemas controlados por difusión, la I es proporcional a c_o^* y a $v^{1/2}$.

Para un sistema reversible simple (ec. 2.16), la función corriente ($\chi(\sigma, t)$) alcanza un valor máximo igual a 0,4463 (a 25 °C) a $E_p = \frac{-28,50 \text{ mV}}{n} + E_{1/2}$, siendo E_p el valor de potencial donde la corriente alcanza su valor máximo y $E_{1/2}$ el potencial de media onda polarográfico del sistema.

Así, la corriente de pico (I_p) está definida por:

$$I_p = 0,4463 n F A c_o^* D_o^{1/2} \left[\frac{nF}{RT} \right]^{1/2} v^{1/2} \quad (2.33)$$

ó, a 25 °C:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (2.34)$$

donde A es expresada en cm², D_o en cm² s⁻¹, c_o^{*} en moles cm⁻³ y v en V s⁻¹. Así, la corriente queda expresada en amperios (Bard & Faulkner, 2001).

Por otro lado:

$$E_p - E_{1/2} = E_p - E_f^o + \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \xi = -1,109 \left(\frac{RT}{nF} \right) \quad (2.35)$$

donde E_f^o es el potencial formal y $-1,109 (RT/nF) = -28,50 \text{ mV}$ a 25 °C. En algunos casos, es conveniente informar el valor de potencial al cual la corriente es la mitad de la corriente de pico ($E_{p/2}$):

$$E_{p/2} = E_{1/2} + 1,109 \left(\frac{RT}{nF} \right) = E_{1/2} + 28,0/n \text{ mV a } 25 \text{ °C} \quad (2.36)$$

Así, el $E_{1/2}$ polarográfico 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:

$$[E_p - E_{p/2}] = 56,5/n \text{ mV a } 25 \text{ °C} \quad (2.37)$$

Nicholson (1965) 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:

$$\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} = \frac{(I_{p,a})_0}{I_{p,c}} + \frac{0,485(I_{s,p})_0}{I_{p,c}} + 0,086 \quad (2.38)$$

donde $(I_{p,a})_0$ es la corriente de pico anódica medida con respecto al cero de corriente, $(I_{s,p})_0$ es la corriente al potencial E_λ medida también respecto del cero de corriente e $I_{p,c}$ es la corriente de pico catódico, medida también respecto del cero de corriente. La relación $\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}}$ (ec. 2.38) es igual a 1 para una cupla redox simple (ec. 2.15). 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, $\Delta E_p = (E_{p,a} - E_{p,c}) = 2,3RT/nF$ (ó 59/n mV) a 25 °C (Bard & Faulkner, 2001).

2.1.1.7.2.2. Sistemas controlados por adsorción

Es, en algunos casos, común encontrar que una o ambas especies de una cupla redox estén adsorbidas sobre la superficie del electrodo. La adsorción, a menudo, puede ser reducida o eliminada cambiando el solvente o el material del electrodo. Los efectos de la adsorción en VC son pronunciados y usualmente fáciles de reconocer (Rieger, 1994; Bard & Faulkner, 2001).

Si suponemos una cupla redox simple (del tipo de la representada por la ec. 2.16), pero donde ambos O y R están adsorbidos sobre la superficie del electrodo, con concentraciones superficiales Γ_O y Γ_R , respectivamente y, que el proceso de electrodo consiste en la reducción completa de O a R durante el barrido directo y la oxidación completa de R a O durante el barrido inverso. En este caso, la corriente no es controlada por difusión, sino que está limitada por la cantidad de material adsorbido.

Si el proceso de transferencia de carga es reversible, las concentraciones superficiales están relacionadas por la ecuación de Nernst:

$$\frac{\Gamma_O(t)}{\Gamma_R(t)} = \exp \frac{nF[E(t) - E_s^0]}{RT} = \theta(t) \quad (2.39)$$

donde E_s^o es el potencial formal de la cupla redox O/R adsorbida y $E(t) = E_i - vt$. Si la concentración superficial es constante, se cumple:

$$\Gamma_O(t) + \Gamma_R(t) = \Gamma^* \quad (2.40)$$

Las concentraciones superficiales individuales son dependientes del tiempo y del potencial. Así:

$$\Gamma_O(t) = \frac{\theta(t)\Gamma^*}{1 + \theta(t)} \quad (2.41)$$

y

$$\Gamma_R(t) = \frac{\Gamma^*}{1 + \theta(t)} \quad (2.42)$$

La velocidad de conversión de O a R está relacionada a la corriente por:

$$\frac{I}{nFA} = -\frac{\partial \Gamma_O(t)}{\partial t} = \frac{\partial \Gamma_R(t)}{\partial t} \quad (2.43)$$

Así, la corriente está dada por (Rieger, 1994; Bard & Faulkner, 2001):

$$I = \frac{n^2 F^2 A \Gamma^* v}{RT} \frac{\theta}{(1+\theta)^2} \quad (2.44)$$

La ec. 2.44 predice una corriente de pico a $E = E_s^o$ ($\theta = 1$), con la que es proporcional al número de moles de O y R adsorbidos ($A\Gamma^*$) y a la velocidad de barrido del potencial. El pico es simétrico sobre el eje de potencial, como se muestra en la Fig. 2.10.

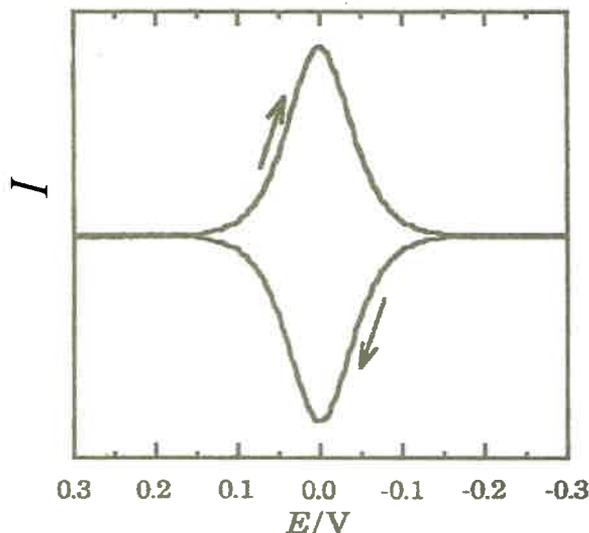


Figura 2.10. Voltamperograma cíclico para una cupla redox mono-electrónica reversible O/R, donde ambos O y R están adsorbidos sobre la superficie del electrodo. Las flechas indican la dirección del barrido del potencial.

Cuando se invierte el barrido de potencial, v cambia de signo y la corriente se invierte, de modo que la señal del barrido inverso es la imagen especular de aquella obtenida durante el barrido directo.

En estos casos extremos, los picos de adsorción son fácilmente distinguidos de aquellos controlados por difusión, teniendo en cuenta la forma simétrica de los picos y la dependencia con v . La situación es más complicada cuando las especies en solución también participan del proceso de electrodo y/o cuando sólo una de las especies de la cupla redox está adsorbida. En estos casos, los picos de adsorción pueden ser vistos juntos con los picos normales controlados por difusión. Cuando sólo la especie O está adsorbida, el pico de adsorción sigue al pico controlado por difusión (un post-pico); cuando sólo la especie R está adsorbida, el pico de adsorción precede al pico controlado por difusión (un pre-pico).

2.1.1.7.2.3. Sistemas que presentan un control mixto: difusión/adsorción

La corriente de pico para un proceso superficial es proporcional a la velocidad de barrido (ec. 2.44); mientras que para un proceso controlado por difusión, la corriente de pico es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (ec. 2.34). Sin embargo, algunos sistemas pueden presentar un control mixto: difusión/adsorción. La forma más simple de resolver esta situación es asumiendo que la corriente de pico es la suma de las corrientes de pico del proceso superficial y del proceso controlado por difusión (Conway & Kannangara, 1987). Así:

$$I_p = k_1 v + k_2 v^{1/2} \quad (2.45)$$

donde las k 's son constantes de proporcionalidad que tienen las dimensiones apropiadas.

La ec. 2.45 puede ser re-escrita como:

$$I_p v^{-1/2} = k_1 v^{1/2} + k_2 \quad (2.46)$$

Así, un gráfico de $I_p v^{-1/2}$ vs. $v^{1/2}$ permite separar los componentes de la corriente generados por la especie adsorbida de aquellos producidos por la especie que llega a la superficie del electrodo por difusión y, determinar los parámetros característicos tales como el D_0 y Γ .

2.1.1.7.3. Voltamperometría de convolución

La técnica de convolución o técnica semi-integral ofrece ventajas en el tratamiento de datos obtenidos mediante la VC para sistemas controlados por difusión. Para una cupla redox reversible (ec. 2.16), en un experimento de VC, las curvas de la corriente convolucionada, $I(t)$, vs. E para los barridos directo e inverso se superponen, retornando a cero a un E lo suficientemente positivo del potencial formal de la cupla redox O/R, donde la $c_R(0, t) = 0$, como se muestra en la Fig. 2.11.

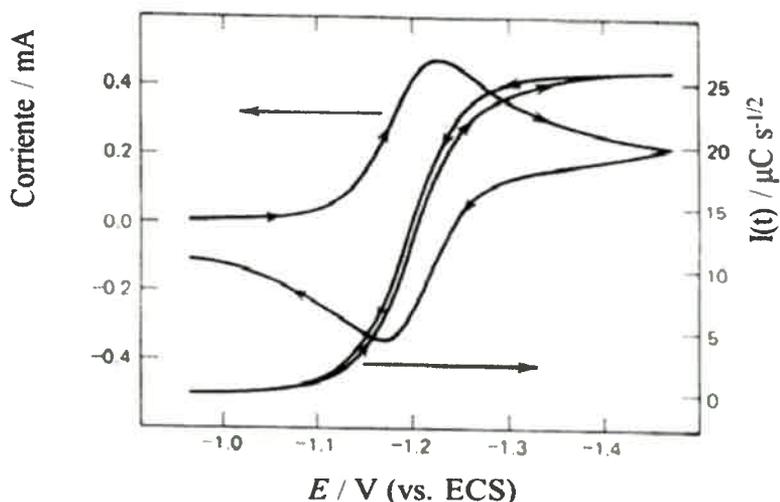


Figura 2.11. Voltamperogramas experimentales cíclicos y convolucionados de una solución 1,84 mM *p*-nitrotolueno en acetonitrilo + 0,2 M perclorato de tetraetil amonio sobre un electrodo de mercurio de gota pendiente, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ (Bard & Faulkner, 2001).

Mediante un tratamiento adecuado de los datos de barrido de potencial, la curva corriente - potencial en VC es transformada en otra semejante a las curvas de estado estacionario, lo cual es conveniente debido al mayor y mejor aprovechamiento de los datos experimentales. La función $I(t)$ es evaluada mediante una técnica de integración numérica. 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, $I(t)$ se transforma en $I(k\Delta t)$ donde k varía entre 0 y N , representando, $t = 0$ y $t = t_f$; $\Delta t = \frac{t_f}{N}$.

Un algoritmo conveniente, el cual surge directamente de la definición de $I(t)$ es:

$$I(t) = I(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{I(j\Delta t - \frac{1}{2}\Delta t)\Delta t}{\sqrt{k\Delta t - j\Delta t + \frac{1}{2}\Delta t}} \quad (2.47)$$

el cual se obtiene usando $t = k\Delta t$ y $u = j\Delta t$ y la corriente I se mide al punto medio de cada intervalo. La ec. 2.47 puede ser simplificada a:

$$I(k\Delta t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \sum_{j=1}^{j=k} \frac{I(j\Delta t - \frac{1}{2}\Delta t)\Delta t^{1/2}}{\sqrt{k-j+\frac{1}{2}}} \quad (2.48)$$

Para sistemas redox cuasi-reversibles, la constante de velocidad dependiente del potencial, $k_f(E)$, del proceso directo puede ser expresada por (Bard & Faulkner, 2001):

$$\ln k_f(E) = \ln D_O^{1/2} - \ln \left\{ \frac{I_{L,c} - I(t) + \xi e^{(nF/RT)(E-E^\circ)}}{I(t)} \right\} \quad (2.49)$$

siendo: $I_{L,c}$ la corriente catódica convolucionada límite, $I(t)$ es la corriente convolucionada a un dado tiempo e $I(t)$ la correspondiente corriente del voltamperograma cíclico al mismo tiempo. $I_{L,c}$ es definida como (Bard & Faulkner, 2001):

$$I_{L,c} = nFAD_O^{1/2} c_O^* \quad (2.50)$$

Si la transferencia electrónica es nernstiana, el potencial se puede expresar como (Bard & Faulkner, 2001):

$$E = E_{1/2} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_{L,c} - I(t)}{I(t)} \quad (2.51)$$

donde $E_{1/2} = E_r^\circ + \left(\frac{RT}{2nF} \right) \ln \left(\frac{D_R}{D_O} \right)$. Nótese que la ec. 2.51 es idéntica a la expresión que se deduce para una curva corriente – potencial de estado estacionario (Bard & Faulkner, 2001). Así, un gráfico de E vs. $\log [(I_{L,c}-I(t))/I(t)]$ será lineal para un sistema redox cuasi-reversible, con una pendiente de $59,1/n$ mV a 25°C y de la ordenada al origen es posible determinar $E_{1/2}$.

2.1.1.7.4. Voltamperometría de onda cuadrada

2.1.1.7.4.1. 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 & Jenkins (1952) fueron los primeros en desarrollar las técnicas voltamperométricas que emplean cambios de potencial en saltos repetitivos. Ellos usaron una onda cuadrada simétrica de 225 Hz superpuesta sobre un barrido de potencial muy lento. Este desarrollo fue precedido por otro llevado a cabo por Kalousek (1948), 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 utilizada por primera vez por Kemula (1930). Posteriormente, Ishibashi & Fujinaga (1950, 1952a, 1952b), en la década de los cincuenta, 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 utilizaron operaba a frecuencias mucho menores ($\cong 14$ Hz) que el de Barker & Jenkins, pero, en realidad, tenía muchas de las mismas características mejoradas respecto de las otras técnicas de pulso 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 (1954).

Fue Baker (1960) quien primero propuso el uso de una onda de escalera potencial-tiempo y muestrear la corriente al final de la onda, donde las corrientes capacitivas habían caído a un valor prácticamente despreciable, a los efectos de evitar el inconveniente que dichas corrientes producían en las voltamperometrías de barrido lineal y cíclica. Alentados por estos desarrollos, Ramaley & Krause (1969) propusieron que la onda cuadrada se aplicara sobre un barrido de escalera ("staircase") más que sobre un barrido de potencial lineal lento. Sus resultados fueron comparables a los obtenidos por Baker en el modo de estado estacionario.

Lo expuesto anteriormente pretende ser la historia esencial de las ideas involucradas en el desarrollo de la voltamperometría de onda cuadrada (VOC). Es así importante diferenciar la VOC del tipo Baker (en la cual una modulación de onda cuadrada se aplica a un potencial de 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 (Osteryoung & O'Dea, 1987), que está basada en el trabajo original de Ramley y Krause 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 Fig. 2.12. 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 .

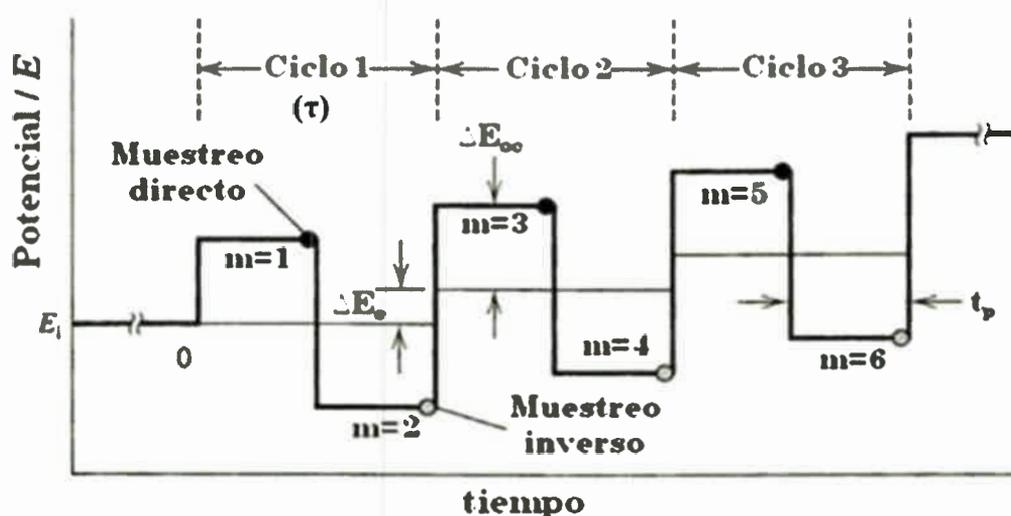


Figura 2.12. Programa de saltos de potencial aplicados al electrodo de trabajo en un experimento de VOC. ΔE_{OC} : amplitud de la onda cuadrada., ΔE_e : salto de escalera, τ : período de la onda cuadrada, t_p : tiempo de pulso (Osteryoung & O’Dea, 1987).

El diagrama completo de la forma de la onda se puede expresar como (Osteryoung & O’Dea, 1987):

$$E_m = E_i - \left[\frac{m+1}{2} \right] \Delta E_e - \Delta E_{OC} (1 + (-1)^{m+1}) \quad (2.52)$$

de modo que todos los ciclos son idénticos. Otra forma de expresar la ec. 2.52 es:

$$E_m = E_i - \left[\frac{m+1}{2} \right] \Delta E_e + (-1)^m \Delta E_{OC} \quad (2.53)$$

en donde la cantidad $[(m+1)/2]$ es la parte entera de $(m+1)/2$. La ec. 2.53 define sólo los valores de E_m para $m > 1$.

La corriente se muestrea 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_i) y, la corriente diferencial o neta (I_n) para cada ciclo se define como $I_n = I_d - I_i$.

En la práctica, los valores característicos que se emplean en VOC son $n \Delta E_{OC} = 0,050$ V (donde n es el número de electrones transferidos) y $n \Delta E_e = 0,010$ V. La f se puede variar, para un electrodo de tamaño convencional, entre 10 y 200 Hz (Osteryoung & O'Dea, 1987). La velocidad de barrido está definida por, $v = \Delta E_e f$, de modo que si: $\Delta E_e = 0,010$ V y $f = 100$ Hz, una $v = 1$ 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 Baker, la cual trabaja en estado estacionario, con pequeñas amplitudes y velocidades de barrido tan bajas como 0,002 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.

2.1.1.7.4.2. Teoría de la voltamperometría de onda cuadrada

2.1.1.7.4.2.1. Sistemas controlados por difusión

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 (1954), la cual usa el teorema de la superposición. Para casos más complejos, se usa la aproximación de Rifkin y Evans (1976), la cual utiliza una forma de onda de excitación arbitraria, que puede ser generalizada usando la ecuación integral apropiada.

Para una cupla redox simple, como la representada en la ec. 2.16, tanto Ramaley y Krause (1969) como Christie y col. (1977) han presentado una solución analítica general bajo condiciones de difusión lineal semi infinita. Las corrientes adimensionales (Ψ) se definen (Osteryoung & O'Dea, 1987):

$$\psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi} p}{nFA\sqrt{D_o} c_o^*} \quad (2.54)$$

y

$$\Delta\psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi} p}{nFA\sqrt{D_o} c_o^*} \quad (2.55)$$

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

$$\psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi\tau}}{nFA\sqrt{D_o} c_o^*} = \psi_j = I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o f} c_o^*} \quad (2.56)$$

$$\Delta\psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi\tau}}{nFA\sqrt{D_o} c_o^*} = \Delta\psi_j = \Delta I_j \frac{\sqrt{\pi}}{nFA\sqrt{D_o f} c_o^*} \quad (2.57)$$

Ambas definiciones se encuentran en la bibliografía. Sin embargo, es preferible usar las ecs. 2.54 y 2.55, 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 $E_j = E_{1/2}^r$, siendo $E_{1/2}^r$ el potencial de media onda reversible. 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, la corriente muestreada a $+ [E_m - E_{1/2}^r]$ es

idéntica a aquella muestreada 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 Fig. 2.13 se muestran las corrientes normalizadas directa (Ψ_d), inversa (Ψ_i) y neta (Ψ_n) calculadas para $n \Delta E_{OC} = 0,050 \text{ V}$ y $n \Delta E_e = 0,010 \text{ V}$ para un voltamperograma de OC para una cupla redox reversible controlada por difusión.

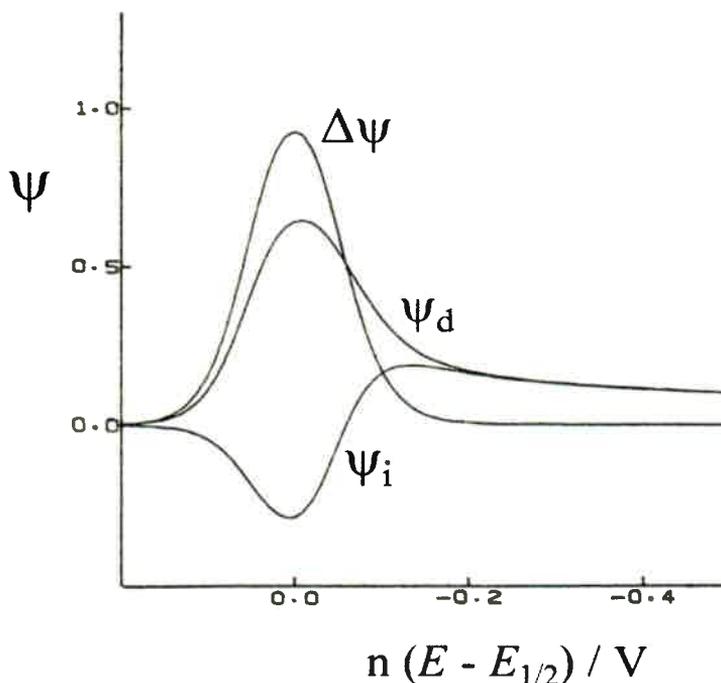


Figura 2.13. Corrientes normalizadas directa, inversa y neta de un voltamperograma de OC para una cupla redox simple (ec. 2.16) bajo control de difusión lineal semi-infinita. $n \Delta E_{OC} = 0,050 \text{ mV}$; $n \Delta E_e = 0,010 \text{ mV}$.

Como ha sido informado por Ramaley y Krause (1969), el ancho del pico neto a la mitad de su altura, $W_{1/2}$, es $(90,5/n) \text{ mV}$ 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 una mejor sensibilidad y resolución. Cálculos típicos de esta relación para tres valores ΔE_e se muestran en la Fig. 2.14.

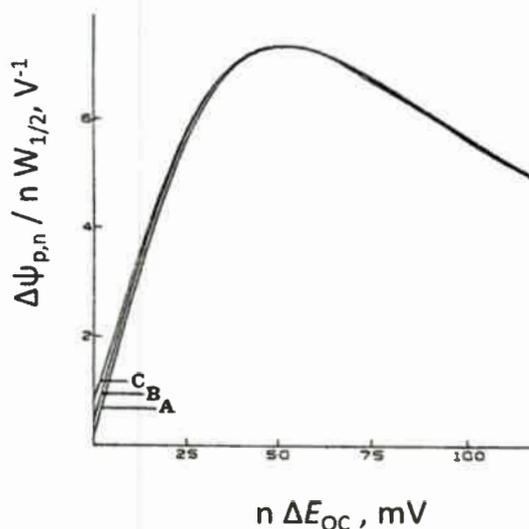


Figura 2.14. Relación entre la corriente de pico neta normalizada y el producto $nW_{1/2}$ para $\Delta E_e = A) 0,0025$; **B) 0,010** y **C) 0,025** V.

Los resultados mostrados en la Fig. 2.14 ponen de manifiesto 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.

En 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:

$$I_{p,n} = \frac{nFA\sqrt{D_O c_O^*}}{\sqrt{\pi t_p}} \psi_{p,n} \quad (2.58)$$

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 del capítulo de libro de Osteryoung y O'Dea (1987). Para valores de $\Delta E_{OC} = 0,050$ 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, $\psi = (\sigma-1)/(\sigma+1)$, 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 (Bard & Faulkner, 2001). Para $n \Delta E = 0,100$ V, el cual correspondería 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 voltamperometría de pulso diferencial surge del esquema de medida de la corriente y de la contribución de la corriente inversa a la corriente neta. Como es de 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 reacción/es química/s acoplada/s a la transferencia de carga inicial, tales como los sistemas: QE, EQ, reacciones catalíticas y EQE, donde Q indica una etapa química y E una etapa de transferencia electrónica ha sido descrita en la bibliografía (Osteryoung & O'Dea, 1987).

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

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

2.1.1.7.4.2.2. Sistemas controlados por adsorción

El tratamiento teórico de VOC para reacciones redox en las cuales el reactivo y el producto se encuentran adsorbidos sobre la superficie del electrodos está descrito en diversos trabajos en la bibliografía (Lovric & Komorski-Lovric, 1988; Komorski-Lovric & Lovric, 1989; Komorski-Lovric & Lovric, 1995a). En la Fig. 2.15 se muestran los registros de las corrientes directa (I_d), inversa (I_i) y neta (I_n) obtenidos para una cupla

redox simple (del tipo de la representada por la ec. 2.16), donde ambos componentes de la cupla están adsorbidos sobre la superficie del electrodo.

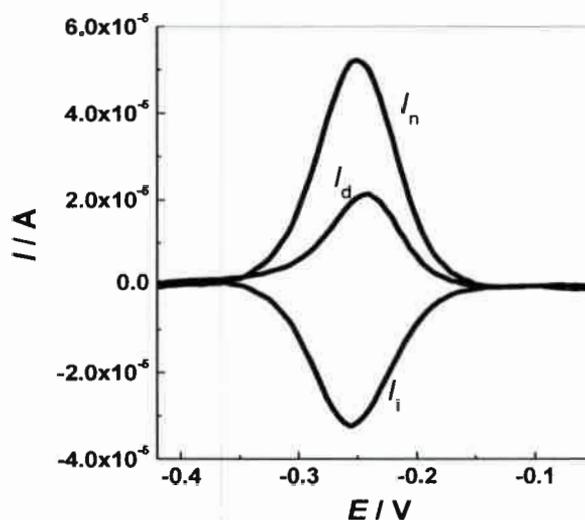


Figura 2.15. Registros de las corrientes directa, inversa y neta obtenidos para una cupla redox simple (del tipo de la ec. 2.16), donde ambos componentes de la cupla están adsorbidos sobre la superficie del electrodo (Mirceski y col., 2007).

Las respuestas voltamperométricas de esta clase de reacciones están caracterizadas por el llamado “máximo cuasi-reversible” (Lovric & Komorski-Lovric, 1988; O’Dea & Osteryoung, 1993; Komorski-Lovric & Lovric, 1995b), es decir, las reacciones redox cuasi reversible dan respuestas más grandes que las reversibles. Esta es una consecuencia del procedimiento utilizado en el muestreo de la corriente en VOC.

La aparente reversibilidad de las reacciones redox superficiales depende del parámetro cinético (ω), definido como la relación entre la constante de velocidad estándar (formal) (k_s) y la frecuencia ($\omega = k_s/f$). La corriente de pico neta en VOC es lineal con la frecuencia, pero el factor de proporcionalidad es una función de la reversibilidad de la reacción. Si, en una cupla redox cuasi reversible superficial, la adsorción de reactivos y productos es igualmente fuerte, un gráfico de $I_{p,n}/f$ vs. f o $1/f$ presenta un máximo, que aparece a una frecuencia la cual es, aproximadamente, igual a la k_s de la reacción redox (Komorski-Lovric & Lovric, 1989; Komorski-Lovric & Lovric, 1995a).

Se ha encontrado que, en la región del máximo, la curva se puede aproximar por una parábola:

$$(I_p/f) - (I_p/f_{\max}) = -a k_s^2 (f^1 - \omega_{\max}/k_s)^2 \quad (2.59)$$

ó

$$(I_p/f) - (I_p/f_{\max}) = -a (\omega_{\max}/f)^2 (f - k_s/\omega_{\max})^2 \quad (2.60)$$

Donde $a = 3nFAc^*D^{1/2}$, siendo n el número de electrones intercambiado por molécula del compuesto electrolizado, F la constante de Faraday, A el área del electrodo, c^* la concentración en el seno de la solución y D el coeficiente de difusión del reactivo. El factor “ a ” en las ecs. (2.59) y (2.60) es expresado en unidades de concentración, lo cual hace que k_s tenga unidades de $s^{1/2}$ (Komorski-Lovric & Lovric, 1995a).

De las ecs. (2.59) y (2.60), se puede deducir que si $(I_p/f) = (I_p/f)_{\max}$, entonces o bien $f^1 = \omega_{\max}/k_s$ ó $f_{\max} = k_s/\omega_{\max}$. Así, en ambos casos:

$$k_s = \omega_{\max} f_{\max} \quad (2.61)$$

siendo la ec. 2.61 una manera conveniente para calcular k_s .

También se predice teóricamente que el máximo cuasi-reversible aparece sólo si $-1,5 < \log \beta < 1,5$ (Komorski-Lovric & Lovric, 1995a), siendo β la relación entre las constantes de adsorción de las formas oxidadas y reducidas de la cupla redox superficial.

El parámetro cinético calculado teóricamente, ω_{\max} , depende del coeficiente de transferencia $(1-\alpha)$, y del producto de la amplitud de onda cuadrada por el número de electrones, $n\Delta E_{OC}$, pero es independiente de la escalera de potencial, $n\Delta E_e$, y de la cantidad de reactivo inicialmente adsorbido (Komorski-Lovric & Lovric, 1995a).

Por otro lado, la teoría predice que la corriente del pico neto en VOC se desdobra en dos y la altura del pico se aproxima a cero a medida que la velocidad de la reacción se hace más rápida (O’Dea & Osteryoung, 1993). Así, el desdoblamiento del pico neto ocurre cuando se aumenta el parámetro cinético, ω , y la amplitud de la modulación del potencial. La Fig. 2.16 muestra la variación de la forma de las

respuestas bajo la influencia del parámetro cinético. Para valores bajos de ω se observa la respuesta característica de una cupla redox superficial cuasi-reversible (Fig. 2.16a). La separación de los potenciales de pico de los componentes directo e inverso aumenta en proporción a ω , lo cual produce un aumento del ancho del pico neto (Fig. 2.16b), finalizando con un desdoblamiento del pico neto (Fig. 2.16c). Experimentalmente, este comportamiento puede ser observado ya sea disminuyendo la frecuencia de la OC o aumentando la amplitud de la misma (O'Dea & Osteryoung, 1993; Mirceski y col., 2007).

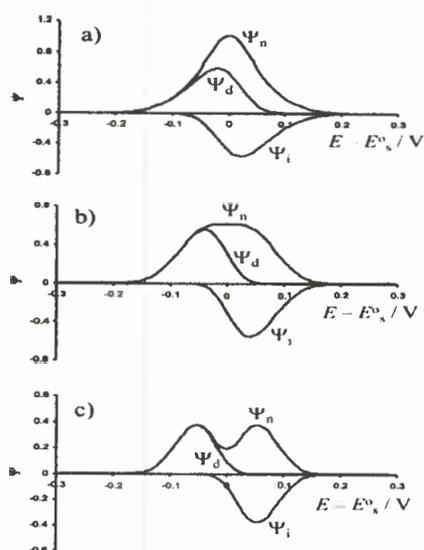


Figura 2.16. Voltamperogramas de OC teóricos simulados para $\omega =$ **a)** 0,5; **b)** 1,2 y **c)** 2. Las otras condiciones de la simulación fueron: $(1-\alpha) = 0,5$; $n\Delta E_{OC} = 0,080$ V y $n\Delta E_e = 0,005$ V (Mirceski y col., 2007).

Por otro lado, la forma de la respuesta de OC neta de cuplas redox superficiales reversibles está fuertemente influenciada por el coeficiente de transferencia. Para $(1-\alpha) > 0,2$, la relación entre las corrientes de picos directa e inversa puede ser aproximada por una curva exponencial simple (Mirceski & Lovric, 1997).

$$I_{p,a}/I_{p,c} = 5,6414 \exp [-3.4606 (1 - \alpha)] \quad (2.62)$$

la cual se aplica para $\omega > 4$.

Por otra parte, aunque el tratamiento teórico de la VOC aplicada a cuplas redox superficiales se ha desarrollado para aquellas cuplas adsorbidas sobre electrodos de mercurio, se ha demostrado que esta metodología es también adecuada para estudiar las reacciones redox en las que la adsorción de reactivos y productos se lleva a cabo en la superficie de electrodos de carbono (Molina y col., 2000; Marchiando y col., 2003; Aragón Catunda y col., 2011; Maza y col., 2012). Es conocido que los grupos quinonas, ya sea en el estado reducido u oxidado (del tipo hidroquinona), pueden estar presentes en la superficie de electrodos de carbono (McCreery, 1991), los cuales favorecerían, en algunos casos, la adsorción de sustancias sobre sus superficies a partir de soluciones.

La teoría descrita previamente para la VOC de cuplas redox superficiales reversibles fue desarrollada asumiendo de que no existen interacciones entre las especies adsorbidas, es decir, la interacción específica de las especies con la superficie del electrodo puede ser descrita por la isoterma de Langmuir (Bard & Faulkner, 2001). Sin embargo, para varios sistemas experimentales, este pre-requisito no se cumple. Así, es de interés analizar también el caso de reacciones superficiales que involucran interacciones laterales entra las moléculas adsorbidas (Mirceski y col., 2001).

El parámetro intrínseco que caracteriza este tipo de interacción es el parámetro de interacción de Frumkin a (en la nomenclatura seguida por Lovric y col., por ejemplo, ver: Mirceski y col., 2007), el cual es positivo para fuerzas atractivas y negativo para fuerzas repulsivas. En presencia de interacciones laterales, la respuesta está controlada, además del parámetro cinético ω y el coeficiente de transferencia de carga, por el producto de interacción $a\theta$. Así, el parámetro cinético y el producto de interacción pueden ser unificados dentro de un parámetro cinético complejo, definido como:

$$\omega_{int} = \frac{k_s}{f} e^{-2a\theta} \quad (2.63)$$

En presencia de interacciones laterales, ω_{int} puede ser afectado tanto por la frecuencia como por el cubrimiento superficial del electrodo. Esta es la diferencia más

importante entre una reacción superficial simple y una que involucra interacciones entre las especies adsorbidas. En estos casos, la posición del “máximo cuasi-reversible” está asociada con un cierto valor crítico del producto de interacción $(a\theta)_{max}$, el cual depende del valor de la relación k_s/f .

Para alcanzar el “máximo cuasi-reversible”, se debe satisfacer la siguiente condición:

$$\frac{k_s}{f} e^{-2(a\theta)_{max}} = (\omega_{int})_{max} \quad (2.64)$$

Los valores de $(\omega_{int})_{max}$ son idénticos a los valores ω_{max} para una reacción superficial simple (sin interacciones entre las especies adsorbidas) tabulados en la Tabla 2.3 de la Ref. Mirceski y col., 2007. La relación entre la frecuencia crítica (f_{max}) y el producto de interacción está dada por (Mirceski y col., 2001; Mirceski y col., 2007):

$$\ln(f_{max}) = \ln \left[\frac{k_s}{(\omega_{int})_{max}} \right] - 2a\theta \quad (2.65)$$

La ec. 2.65 es importante, ya que permite calcular tanto el parámetro de interacción como la constante de velocidad formal, k_s , asumiendo que se conoce θ . Así, el “máximo cuasi-reversible” se determina variando la frecuencia para varios valores del cubrimiento superficial. Un gráfico de $\ln(f_{max})$ vs. θ (ec. 2.65) será lineal, con pendiente y ordenada igual a $-2a$ y $\ln \left[\frac{k_s}{(\omega_{int})_{max}} \right]$, respectivamente.

2.1.1.8. Adsorción en Electroquímica

2.1.1.8.1. Introducción

2.1.1.8.1.1. Aspectos especiales de la adsorción a partir de soluciones

En la electro-sorción, es decir la adsorción de moléculas sobre electrodos que están en contacto con una solución electrolítica, es necesario considerar los aspectos

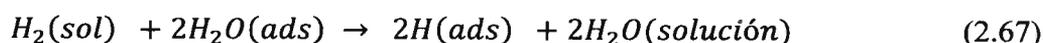
especiales de tales procesos y cómo se diferencian de la adsorción a partir de una fase gaseosa (Gileadi, 1967).

La primera y más importante diferencia entre la adsorción a partir de una fase gaseosa y la adsorción a partir de soluciones es que la superficie del sustrato (o adsorbente) está desnuda en un caso y solvatada en el otro. El proceso de adsorción a partir de una fase gaseosa puede ser representado por una simple formación de un enlace con uno o más sitios (por ejemplo, átomos metálicos) sobre la superficie, con la posible disociación de la molécula adsorbente (el adsorbato). Así:



El intermediario $H_2(ads)$ representa una molécula físicamente adsorbida. En varios casos este intermediario puede no ser estable y puede pasar, sin esencialmente ninguna energía de activación, al estado final quimi-adsorbido y disociado.

A los efectos de comparación, la adsorción de hidrógeno disuelto en agua sobre la superficie de un electrodo puede ser representada como:



En general, el estado físicamente adsorbido reemplazando una o dos moléculas de agua podría ocurrir, pero en el caso del hidrógeno, éste no es energéticamente favorable. Así, la adsorción sobre una superficie solvatada es una reacción de reemplazo y la energía libre estándar de adsorción efectiva, ΔG_{ads}^0 , está dada por la diferencia en la energía libre de adsorción del soluto y del solvente. Así, para la ec. 2.67 se tiene:

$$\begin{aligned} \Delta G_{ads}^0 &= (2\mu_{H(ads)}^0 - \mu_{H(solución)}^0) - 2(\mu_{H_2O(ads)}^0 - \mu_{H_2O(solución)}^0) = \\ &= \Delta G_{H_2}^0 - 2 \Delta G_{H_2O}^0 \end{aligned} \quad (2.68)$$

donde los μ_i^0 son los correspondientes potenciales electroquímicos estándares (Bard & Faulkner, 2001). De este modo, las moléculas tenderán a adsorberse sobre la superficie del electrodo de manera que el menor número de moléculas de agua sea reemplazado (Gileadi, 1967).

La extensión de la adsorción depende también fuertemente de la solubilidad del adsorbato. Cuanto menor es la solubilidad, mayor es la adsorbabilidad.

Una diferencia importante entre la adsorción sobre electrodos y la adsorción en fase gaseosa es que, en el primer caso, la diferencia de potencial en la interface puede ser controlada y variada independientemente. De esta manera, existe un grado de libertad adicional y la constante de equilibrio para la adsorción puede ser cambiada a temperatura y concentración constantes (Gileadi, 1967; Bard & Faulkner, 2001).

2.1.1.8.1.2. Adsorción física y quimisorción

Dependiendo de la naturaleza de la adsorción, ésta se puede clasificar como adsorción física o como quimisorción, no existiendo una línea divisoria clara entre los dos tipos de adsorción, pudiendo distinguírseles sólo en situaciones extremas (Arvía & Giordano, 1982).

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

La quimisorción posee una mayor especificidad química y una energía de adsorción suficientemente grande como para compararla con la energía de formación de un enlace químico. La quimisorción se limita a una monocapa (Arvía & Giordano, 1982). En este caso, el proceso de desorción puede estar acompañado por cambios químicos.

Otra característica que distingue ambas formas de adsorción es la velocidad con que se lleva a cabo cada uno de los procesos. La adsorción física es un proceso que, por

lo general, ocurre rápidamente y, en la mayoría de los casos, a altas temperaturas no ocurre.

La quimisorción puede ser un proceso lento (la velocidad da una idea de la magnitud de la energía de activación), disminuyendo su velocidad a medida que la temperatura se hace más pequeña (Arvía & Giordano, 1982). Por lo general, a temperaturas bajas, la quimisorción puede ser tan lenta que sólo se observa adsorción física, mientras que a temperaturas altas, la adsorción física es muy pequeña y sólo ocurre quimisorción.

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

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

Al modificar el potencial de electrodo (apartarlo de la situación de circuito abierto), el agua (solvente) y los iones presentes en solución (positivos o negativos, según sea el potencial) resultan más fuertemente adsorbidos y la adsorción de las moléculas neutras se hace cada vez más difícil. Cuando se trata de moléculas dipolares, con sitios diferenciados de naturaleza hidrofílica o hidrofóbica, las orientaciones de las moléculas adsorbidas están determinadas por la polarización del electrodo (Arvía & Giordano, 1982).

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

Por otra parte, la dependencia del calor de adsorción con el grado de recubrimiento es función de las posibles interacciones entre las moléculas adsorbidas.

En procesos de adsorción física, el efecto aparece como interacciones laterales atractivas atribuidas a fuerzas de interacción del tipo Van der Waals de moléculas vecinas. Las interacciones laterales atractivas tienden a reforzar la estabilidad de la “película” adsorbida.

En la adsorción en fase líquida, donde la especie que se adsorbe se encuentra en solución, se produce una competencia entre el adsorbato y el solvente por los sitios de adsorción, produciendo un cambio en la entropía de adsorción, debido a que se produce, en general, un intercambio de varias moléculas de solvente por molécula de adsorbato.

2.1.1.8.2. Ecuaciones de estado e isothermas

2.1.1.8.2.1. Definiciones

De todas las variables intensivas de un sistema (por ejemplo, presión, temperatura, densidad, volumen molar, etc.) solamente unas pocas son independientes. Para una fase pura, si se fijan los valores de dos variables intensivas, se determina inequívocamente el estado del sistema. Una ecuación que relaciona cualquiera de tres variables intensivas se conoce como **ecuación de estado**. Usualmente, las variables elegidas son la temperatura, presión, volumen molar o concentración, pero otras variables podrían, en principio, también ser usadas, tales como, la densidad, el índice de refracción, la constante dieléctrica, etc.

La ecuación de estado más simple es la Ley de los Gases Ideales:

$$P V = n R T \quad (2.69)$$

donde la correspondiente ecuación de estado para un gas ideal bidimensional es:

$$\Pi A = n R T \quad (2.70)$$

donde Π es la presión superficial y A es el área de la superficie. La ec. 2.70 es usualmente escrita como:

$$\Pi = \Gamma R T \quad (2.71)$$

donde $\Gamma = n/A$ es el número de moles por unidad de área superficial (Gileadi, 1967; Bard & Faulkner, 2001). La presión superficial está relacionada a la tensión superficial, γ , por la siguiente ecuación:

$$\Pi = -(\gamma - \gamma_{\Gamma=0}) \quad (2.72)$$

ó

$$d\Pi = -d\gamma \quad (2.73)$$

donde $\gamma_{\Gamma=0}$ es la tensión superficial a algún estado de referencia, elegido por conveniencia como aquel correspondiente a la de concentración superficial cero. Por otro lado, el trabajo reversible, W , de aumentar el área superficial a Π constante es:

$$W = \Pi dA \quad (2.74)$$

mientras que el correspondiente cambio de energía libre es:

$$\Delta G = \gamma dA \quad (2.75)$$

Dado que, por definición

$$\Delta G = -W \quad (2.76)$$

se tiene:

$$\Pi dA = -\gamma dA \quad (2.77)$$

la cual es esencialmente igual a la ec. 2.72.

Por otra parte, una isoterma de adsorción establece la relación entre la concentración superficial y el potencial químico o electroquímico, generalmente expresado como una función de la concentración en el seno de la solución o el potencial a través de la interface. Así:

$$\theta = \beta f(c) \quad \text{ó} \quad \theta = \beta f(E) \quad (2.78)$$

donde $\theta = \Gamma/\Gamma_{\max}$, siendo Γ_{\max} la concentración superficial de saturación. Las propiedades de la interface pueden ser descritas igualmente bien por una ecuación de estado bidimensional apropiada o por una isoterma.

2.1.1.8.2.2. Conversión de una ecuación de estado a isotermas

La conversión de una ecuación de estado, dando γ o Π como una función de la concentración superficial Γ , a la correspondiente isoterma, donde Γ está dada como una función de la actividad, a , en el seno de la solución, es posible haciendo uso de la isoterma de Gibbs, la que puede ser escrita, a temperatura y presión constantes, como:

$$d\gamma = - \sum \Gamma_i d\mu_i \quad (2.79)$$

La relación entre las isotermas y las ecuaciones de estado pueden ser mejor ilustradas con ejemplos específicos. Así, la ecuación de estado correspondiente a la isoterma de adsorción de Langmuir será derivada. Comenzando de la ecuación:

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \beta a \quad (2.80)$$

se tiene

$$d \ln a = d \left(\frac{\theta}{1-\theta} \right) = \frac{1}{\theta(1-\theta)} d\theta \quad (2.81)$$

Una pequeña imprecisión está involucrada en los cálculos anteriores. La cantidad Γ usada en las ecuaciones de estado ($\Gamma = n/A$) y en las isotermas ($\Gamma = \Gamma_{\max} \theta$) es la concentración superficial del material adsorbido, mientras que el mismo símbolo en la ecuación de Gibbs representa el exceso superficial. El error introducido por esta aproximación es, sin embargo, pequeño en todos los casos de importancia práctica (Gileadi, 1967).

2.1.1.8.3. Isotermas

2.1.1.8.3.1. Isotherma de Langmuir

La forma más simple de derivar una isoterma es mediante la aproximación cinética. Considerando que la velocidad de adsorción es proporcional a la fracción de la superficie no ocupada $(1-\theta)$ y a la actividad (o concentración, c) en el seno de la solución, y la velocidad de desorción es proporcional a θ , en el equilibrio se tiene que:

$$k_1 (1-\theta) c = k_{-1} \theta \quad (2.82)$$

donde k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad de adsorción y desorción, respectivamente.

Así,

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \beta c \quad (2.83)$$

donde

$$\beta = \frac{k_1}{k_{-1}} = \exp(-\Delta G_{ads}^{\circ} / RT) \quad (2.84)$$

donde ΔG_{ads}° es la energía libre estándar de adsorción efectiva y está dada por la diferencia en las energías libres de adsorción del soluto y el solvente.

La isoterma de Langmuir se deduce considerando la ausencia de interacciones laterales entre las moléculas adsorbidas, con lo que el ΔG_{ads}° se considera independiente del recubrimiento del electrodo.

2.1.1.8.3.2. Isotherma de Frumkin

La isoterma de Frumkin se deriva considerando la existencia de interacciones laterales de corto alcance entre las moléculas adsorbidas y, como consecuencia, se considera que la energía libre de adsorción varía linealmente con el grado de recubrimiento, es decir:

$$\Delta G_{ads}^o = (\Delta G_{ads}^o)_{\theta=0} - 2 g' \theta \quad (2.85)$$

donde $g' = 2 g \Gamma_{\max}/RT$. El parámetro g tiene unidades de J/mol por mol/cm², y expresa la manera en la cual el cubrimiento superficial cambia la energía de adsorción. Si g es positivo, las interacciones entre las especies en la superficie del electrodo son atractivas y, si g es negativo, las interacciones son repulsivas (Bard & Faulkner, 2001). El parámetro g' está generalmente comprendido en el intervalo $2 \leq g' \leq -2$ (Sastre de Vicente & López Fonseca, 1993; Bard & Faulkner, 2001). La isoterma puede ser escrita en la siguiente forma, incluyendo los coeficientes de actividad en el término β :

$$\beta c = \frac{\theta}{1-\theta} \exp(-g' \theta) \quad (2.86)$$

que es válida para $0,2 < \theta < 0,8$.

El solvente puede también tener un gran efecto sobre la entropía de adsorción. Así, la entropía usualmente disminuye durante la adsorción a partir de una fase gaseosa, debido a la pérdida de dos o tres grados de libertad traslacionales. Sin embargo, durante la adsorción a partir de soluciones, varias moléculas de solvente pueden ser liberadas de la superficie por cada molécula adsorbida y se puede esperar un aumento en la entropía. Este comportamiento ha sido observado experimentalmente para la electrosorción de etileno sobre electrodos de platino recubiertos con oro a partir de soluciones H₂SO₄ 1 N (Gileadi y col., 1965) y para la electrosorción sobre los mismos electrodos de benceno a partir de soluciones H₂SO₄ 1 N y H₃PO₄ 1 N (Heiland y col., 1966).

2.1.1.8.3.3. Isoterma de Temkin

Esta isoterma también tiene en cuenta las interacciones laterales de corto alcance entre las moléculas adsorbidas. Su expresión es:

$$\theta = \frac{RT}{2g} \ln(\beta c) \quad (2.87)$$

que es válida también para $0,2 < \theta < 0,8$.

2.1.1.8.3.4. Otras isotermas de adsorción

Se describen a continuación las expresiones de otras isotermas de adsorción (Damaskin y col., 1971):

a) Isoterma de Henry

$$\beta c = \theta \quad (2.88)$$

b) Isoterma de Volmer

$$\beta c = \frac{\theta}{1-\theta} \exp\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) \quad (2.89)$$

c) Isoterma de Freundlich

$$\beta c^n = \theta \quad (2.90)$$

donde $0 < n < 1$.

d) Isoterma de Amagat

$$\beta c^n = \frac{\theta}{1-\theta} \exp\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) \quad (2.91)$$

e) Isoterma de Helfand-Frisch-Lebowitz

$$\beta c = \frac{\theta}{1-\theta} \exp\left[\frac{2-\theta}{(1-\theta)^2}\right] \quad (2.92)$$

f) Isoterma de Hill-de Boer

$$\beta c = \frac{\theta}{1-\theta} \exp\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) \exp(-2g'\theta) \quad (2.93)$$

g) Isoterma de Parsons

$$\beta c = \frac{\theta}{1-\theta} \exp\left[\frac{2-\theta}{(1-\theta)^2}\right] \exp(2g'\theta) \quad (2.94)$$

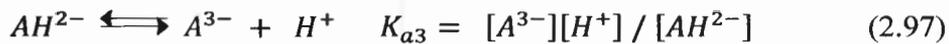
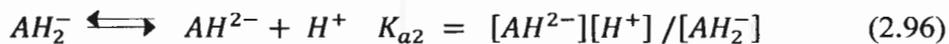
2.2. Espectroscopía uv-visible y principios de quimiometría

2.2.1. Determinación de las constantes de acidez aparentes

Para la determinación de las constantes de acidez aparentes de un dado compuesto se pueden registrar los espectros de absorción uv-visible a diferentes valores de pH.

Los parámetros desconocidos del sistema (coeficientes de extinción molar de las distintas especies presentes en solución, ϵ y las correspondientes constantes de acidez

aparentes) se pueden estimar ajustando la variación experimental de la absorbancia, A , en función del pH, a la λ donde presenta menor error el ajuste no lineal, con la ecuación teórica exacta que describe cada sistema. Por ejemplo, si se considera un ácido triprótico, donde cuatro especies existen en equilibrio en solución, se tiene:



donde K_{a1} , K_{a2} y K_{a3} son la primera, la segunda y la tercera constantes de disociación ácidas aparentes del correspondiente compuesto. Los corchetes representan las concentraciones molares en equilibrio de las correspondientes especies, las que están relacionadas a la concentración analítica, AH_3^* , a través de la siguiente ecuación:

$$AH_3^* = [AH_3] + [AH_2^-] + [AH^{2-}] + [A^{3-}] \quad (2.98)$$

Por otro lado, asumiendo que se cumple la Ley de Lambert-Beer, la absorbancia a una dada λ , A^λ , puede ser expresada por:

$$A^\lambda = \varepsilon_{AH_3}^\lambda b[AH_3] + \varepsilon_{AH_2^-}^\lambda b[AH_2^-] + \varepsilon_{AH^{2-}}^\lambda b[AH^{2-}] + \varepsilon_{A^{3-}}^\lambda b[A^{3-}] \quad (2.99)$$

donde b es el camino óptico.

La solución analítica exacta de la ec. 2.99 se obtiene expresando la concentración de cada especie en equilibrio como una función de las constantes de disociación ácidas aparentes y de la AH_3^* . La forma reordenada de la ec. 2.99 es:

$$A^\lambda = AH_3^* b \{ [A (10^{-x})^3 + B (10^{-x})^2 + C 10^{-x} + D] / [(10^{-x})^3 + E (10^{-x})^2 + F 10^{-x} + G] \} \quad (2.100)$$

Donde $x = \text{pH}$; $A = \varepsilon_{AH_3}^\lambda$; $B = \varepsilon_{AH_2}^\lambda K_{a1}$; $C = \varepsilon_{AH_2}^\lambda - K_{a1}K_{a2}$; $D = \varepsilon_{A_3}^\lambda - K_{a1}K_{a2}K_{a3}$; $E = K_{a1}$; $F = K_{a1}K_{a2}$ y $G = K_{a1}K_{a2}K_{a3}$.

Una mejora en la metodología empleada para el cálculo de dichas constantes, respecto a otra previamente informada en la literatura (Molina y col., 1998), consiste en tener en cuenta un mayor número de datos experimentales, mediante el mejor ajuste no lineal de los mismos con las ecuaciones teóricas que describen el sistema, calculando los valores de las constantes de acidez aparentes, los ε de las distintas especies y sus correspondientes diagramas de distribución.

Así, para la determinación de las constantes de acidez aparentes de los compuestos que se estudian en esta tesis se utilizó el siguiente diagrama de bloques, que representa el algoritmo escrito en el programa MATLAB:

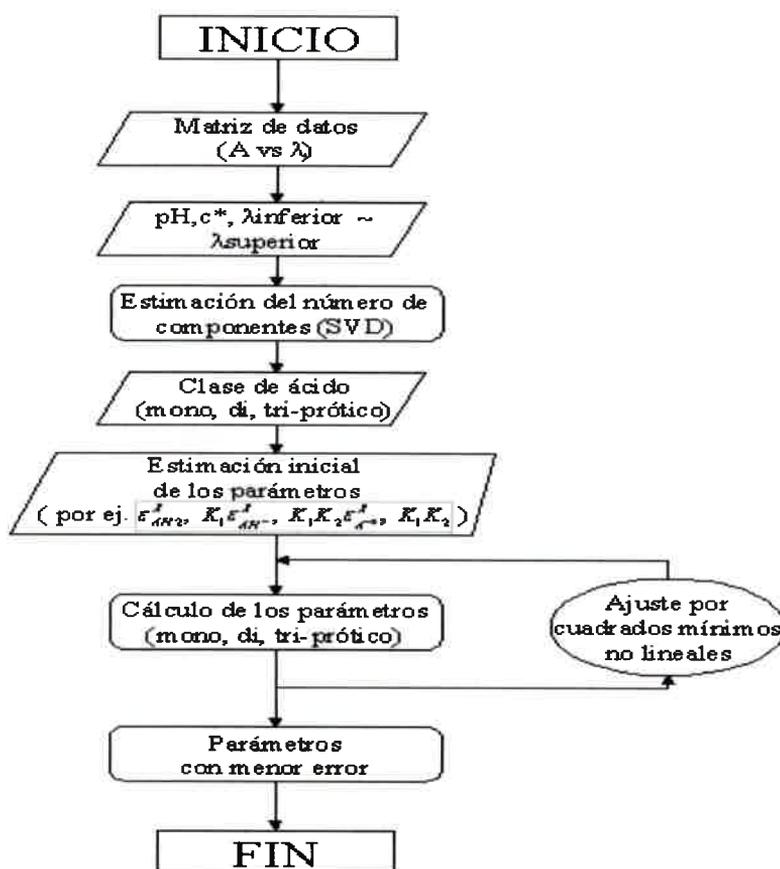


Figura 2.17. Diagrama de bloques, que representa el algoritmo escrito en el programa MATLAB.

El proceso consiste en cargar los datos experimentales en el programa MATLAB (A vs. λ , para cada valor de pH y a una dada AH_3^*). Previo a realizar al ajuste no lineal de los datos experimentales, se analiza el número de componentes principales, a través de la descomposición en valores singulares de la matriz de los valores de absorbancia. Con este procedimiento se tiene un indicio de si la molécula es efectivamente un ácido mono, di o tri-prótico, como se deduce de su fórmula molecular. Luego, implementando el algoritmo **MCR-ALS** (Tauler y col., 1995) se recuperan los perfiles, tanto de concentración como de los espectros de absorción uv-visible, los cuales generan información para introducir como estimaciones iniciales de los parámetros de interés en el proceso iterativo del ajuste, a los efectos de garantizar la convergencia. Por último, se ejecuta el algoritmo que contiene las ecuaciones exactas y, a partir del mismo, se determina a que longitud de onda existe el menor error del ajuste para determinar los parámetros finales.

2.2.2. Resolución multivariada de curvas. Optimización mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS)

La resolución multivariada de curvas (MCR) tiene como finalidad aislar, resolver y cuantificar las fuentes de variabilidad presentes en un determinado conjunto de datos. A diferencia de los métodos univariados, que analizan una respuesta puntual del sistema en estudio para una única variable (por ejemplo, la respuesta para una sola longitud de onda, cuando se trata de datos espectroscópicos), los métodos multivariados analizan la respuesta para múltiples variables (por ejemplo, todo el espectro de absorción uv-visible). La resolución multivariada de curvas puede utilizarse para resolver componentes presentes en muestras de naturaleza y composición desconocida (Borgen & Kowalski, 1985; Tauler y col., 1995; Izquierdo-Ridorsa y col., 1997; Saurina y col., 1997), tanto de los sustratos de interés como eventuales interferentes.

La condición habitual, cuando se utiliza MCR, es que los datos sigan un modelo lineal (Tauler, 1995), por ejemplo: la ley de Lambert-Beer para datos espectroscópicos, lo cual puede expresarse como:

$$\mathbf{D} = \mathbf{cS}^T + \mathbf{E} \quad (2.101)$$

donde \mathbf{D} es la matriz de datos adquiridos a diferentes valores de cierta variable (λ , pH, concentración, potencial, etc.), \mathbf{c} y \mathbf{S}^T están relacionadas con las concentraciones y los perfiles de respuesta puros de las variables presentes en el sistema, respectivamente, y \mathbf{E} es la matriz de los residuales, que contiene información no explicada por el producto \mathbf{cS}^T . Las dimensiones de las cuatro matrices son \mathbf{D} ($I \times J$), \mathbf{c} ($I \times N$), \mathbf{S} ($J \times N$) y \mathbf{E} ($I \times J$), donde I es el número de mediciones realizadas (por ejemplo, número de espectros), J es el número de variables registradas para cada medición (por ejemplo, λ) y N es el número de especies químicas presentes.

Para conseguir la descomposición descrita en la ec. 2.101, se implementan distintas técnicas de análisis multivariado, ensambladas en un solo método que consta de diferentes partes (Antunes y col., 2002).

2.2.2.1. Determinación del número de componentes

En primer lugar, se determina el número de componentes que contribuyen significativamente a la respuesta del sistema. Si las especies químicas presentes poseen una contribución a la varianza de los datos mayor que el ruido, el número de componentes o factores puede estimarse directamente evaluando los respectivos valores singulares. En este trabajo de tesis, el número de factores fue estimado mediante la descomposición en valores singulares (*Singular Value Decomposition*, SVD).

Este algoritmo se basa en el teorema del álgebra matricial, que establece que una matriz \mathbf{D} de dimensiones $I \times J$ puede descomponerse en el producto de tres matrices \mathbf{U} ($I \times K$), \mathbf{W} ($K \times K$) y \mathbf{V}^T ($K \times J$), siendo K igual al menor valor entre I y J .

$$\mathbf{R} = \mathbf{U}\mathbf{W}\mathbf{V}^T \quad (2.102)$$

Los elementos de la diagonal de \mathbf{W} están definidos como valores positivos, mientras que los valores fuera de la diagonal son cero. Los vectores (columnas) de las matrices \mathbf{U} y \mathbf{V} son ortonormales, lo que implica que los productos $\mathbf{U}^T\mathbf{U}$ y $\mathbf{V}^T\mathbf{V}$ son iguales a la matriz identidad (Vandeginste y col., 1998).

La matriz \mathbf{U} posee información acerca de las filas de la matriz \mathbf{D} , por lo que expresa las relaciones entre los objetos o muestras, mientras que la matriz \mathbf{V}^T contiene información referida a las columnas de la matriz \mathbf{D} y, por lo tanto, refleja la relación existente entre las variables. Los valores de la diagonal de la matriz \mathbf{W} son llamados “*valores singulares*” y están ordenados de mayor a menor. Cuando los valores singulares se representan frente al número de componentes, es posible extraer información acerca del número de factores o componentes del sistema en estudio. Aquellos factores que tengan asociados valores singulares bajos, generalmente, recogen información sobre el ruido asociado a las medidas experimentales.

La determinación del número de componentes o factores significativos es importante puesto que se asume que corresponde al número de especies químicas que ocasionan la variabilidad en la matriz de respuestas (matriz \mathbf{D}), en ausencia de ruido.

2.2.2.2. Construcción de la estimación inicial

Las matrices \mathbf{c} y \mathbf{S}^T (ec. 2.101) se determinan mediante la aplicación de un algoritmo de optimización (*Mínimos Cuadrados Alternados, ALS*) que requiere establecer una estimación inicial para \mathbf{c} o \mathbf{S}^T como punto de partida. Dichas estimaciones pueden obtenerse a partir de técnicas basadas en la detección de variables puras o en el análisis de componentes principales, entre otras. En esta tesis se utilizó el algoritmo SIMPLISMA (de la expresión inglesa SIMPLe-to-use Interactive Self-modelling Mixture Análisis (Winding & Guilment, 1991)), que permite hallar variables puras en un conjunto de datos experimentales sin la necesidad de realizar el análisis de los componentes principales. El procedimiento se basa en la evaluación de la desviación estándar relativa de las columnas de la matriz de datos:

$$p_i = \frac{S_i}{m_i} \quad (2.103)$$

siendo p la desviación estándar relativa, S la desviación estándar y m la media para una columna i . Una desviación estándar relativa grande indica una alta pureza para esa columna. Con el fin de evitar la sobrevaloración de columnas con un valor medio

pequeño (generalmente, correspondientes al ruido) se introduce un factor de corrección f (normalmente 0,1 ó 1 según el nivel de ruido aceptado).

$$p_i = \frac{S_i}{m_i + f} \quad (2.104)$$

El procedimiento consiste, en primer lugar, en hallar la columna con la mayor desviación estándar relativa. Seguidamente, se procede a la normalización de dicha columna. La segunda variable de mayor pureza, además de poseer la mayor desviación estándar, deberá presentar la mínima correlación con la primera variable pura encontrada. Por lo tanto, se calcula un factor de ponderación, w , que tendrá un valor más alto en la medida que las variables no estén correlacionadas, mientras que para variables correlacionadas dará un valor cercano a cero (Winding & Guilment, 1991).

Así, para las siguientes variables a analizar, se aplica el factor de ponderación de forma que la expresión de la ec. 2.104 cambia ligeramente:

$$p_i = w_i \left(\frac{S_i}{m_i + f} \right) \quad (2.105)$$

El algoritmo seleccionará el máximo p_i , que corresponderá a la siguiente variable de mayor pureza y así, sucesivamente, hasta hallar la totalidad de las variables puras.

Las estimaciones iniciales para \mathbf{c} o \mathbf{S}^T se optimizan resolviendo la ec. 2.101 iterativamente mediante el *método de mínimos cuadrados alternados*. En cada iteración del proceso de optimización, se obtienen nuevas estimaciones de las matrices \mathbf{c} o \mathbf{S}^T :

$$\mathbf{c}^+ \mathbf{D} = \mathbf{c}^+ \mathbf{C} \mathbf{S}^T = \mathbf{S}^T \quad (2.106)$$

y

$$\mathbf{D} (\mathbf{S}^T)^+ = \mathbf{c} (\mathbf{S}^T)^+ (\mathbf{S}^T)^+ = \mathbf{c} \quad (2.107)$$

donde la matriz \mathbf{D} es la matriz de los datos experimentales, \mathbf{c}^+ es la pseudo-inversa (Mason y col., 2001) de la matriz \mathbf{c} y $(\mathbf{S}^T)^+$ es la pseudo-inversa matriz \mathbf{S}^T .

Desafortunadamente, cuando se trabaja con datos bilineales, no existen soluciones únicas para la descomposición planteada en la ec. 2.101. En ausencia de otra información, \mathbf{c} y \mathbf{S}^T no se pueden distinguir de otras matrices \mathbf{c} y \mathbf{S}^T que permiten obtener la misma matriz de residuales \mathbf{E} , puesto que todas las soluciones para la descomposición de \mathbf{D} son combinaciones lineales unas de otras (de Juan, 1997; Tauler, 2001). Mediante la utilización de información adicional en forma de restricciones, basadas en el conocimiento físico-químico del sistema bajo estudio, es posible reducir considerablemente el número de soluciones posibles e, incluso, obtener una solución única al problema. Una restricción puede ser definida como cualquier propiedad matemática o química que es sistemáticamente satisfecha por el sistema completo o por algunas de sus contribuciones puras (Danzer & Currie, 1998). Básicamente, el algoritmo ALS permite obtener soluciones con significado químico, a partir de estimaciones iniciales que, bajo determinadas restricciones, se van optimizando a cada paso del proceso de iteración. Las restricciones aplicadas pueden proceder de la naturaleza misma del sistema químico (en nuestro caso, se aplicó la restricción *No-negatividad*, que obliga a que todos los valores de un perfil de concentración o respuesta, sean mayores o iguales a cero).

Cuando, mediante ALS, se analizan simultáneamente distintos conjuntos de datos correspondientes a un mismo problema en estudio, se pueden aplicar restricciones adicionales, con el fin de establecer correspondencias entre las mismas especies presentes en los diferentes conjuntos de datos, o que especies comunes en las distintas matrices de datos tengan el mismo perfil de respuesta. Este tipo de restricción también ha sido utilizada en este trabajo de tesis.

2.2.2.3. Parámetros de calidad del ajuste

Existen diferentes parámetros a partir de los cuales se puede obtener información acerca de la bondad del ajuste realizado mediante MCR-ALS. Uno de ellos se denomina *falta de ajuste* (*lof*, del inglés “*lack of fit*”) y está definido por la siguiente ecuación:

$$lof = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_j (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2}} \quad (2.108)$$

donde d_{ij} representa a cada uno de los elementos de la matriz experimental D y \hat{d}_{ij} representa los elementos calculados por el modelo para el producto cS^T .

Otro parámetro, que ofrece una información similar al anterior, es el porcentaje de varianza explicada por el producto cS^T :

$$R^2 = \frac{\sum_i \sum_j \hat{d}_{ij}^2}{\sum_i \sum_j d_{ij}^2} \quad (2.109)$$

Ambos parámetros se tuvieron en cuenta en este trabajo de tesis para la selección del modelo adecuado al objetivo planteado.

2.3. Redes neuronales artificiales (RNA)

2.3.1. Introducción

El hecho de estudiar el uso de redes neuronales, conjunto de elementos simples conectados entre sí y entre los que se envían información a través de las conexiones, reside en dos aspectos de mucha importancia. La red neuronal artificial, al simular una red neuronal biológica, se considera una nueva arquitectura de computación y una nueva arquitectura de algoritmización relativas a la computación convencional. Permite, usando operaciones computacionales simples (adiciones, multiplicaciones y elementos lógicos fundamentales), resolver problemas complejos, no lineales, etc. Por otro lado, un algoritmo convencional utilizará un complejo conjunto de ecuaciones, y se aplicará a sólo un problema dado. Mientras que, una RNA será computacional y algorítmicamente muy simple y tendrá características de auto organización que le permitirá ser aplicada a un amplio rango de problemas.

El desarrollo de las redes tiene dos etapas, la fase de entrenamiento donde se usan los datos experimentales para hacer que la red se ajuste a imitar al fenómeno físico y la fase de prueba donde se comparan valores críticos de la realidad con la aproximación de la red.

El entrenamiento es posible gracias a la capacidad de aprendizaje de las RNA. El aprendizaje de una red es un proceso por el cual los parámetros libres de una RNA son ajustados a través de un proceso continuo de estimulación por parte del entorno donde se sitúa el sistema. Para una misma topología de RNA se puede trabajar con diferentes formas de aprendizaje, esto permite aumentar el área de trabajo de las mismas (Müller & Reinhardt, 1990).

A continuación se describirá la mayor parte de componentes de los que está compuesta una neurona artificial (Fig. 2.18). Estos componentes son válidos aun cuando la neurona sea usada en la entrada, salida, o capa oculta.

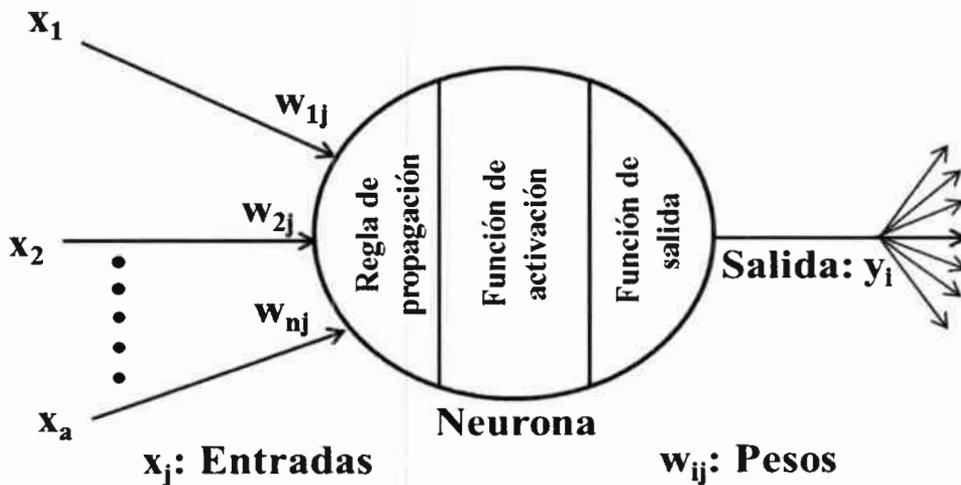


Figura 2.18. Elementos básicos de una neurona artificial.

2.3.2. Entradas y pesos

Normalmente, una neurona recibe muchas y múltiples entradas (x_j) simultáneas. Cada entrada tiene su propio peso relativo, el cual proporciona la importancia de la

entrada dentro de la función de agregación de la neurona. Estos pesos realizan la misma función que realizan las fuerzas sinápticas de las neuronas biológicas. En ambos casos, algunas entradas son más importantes que otras, de manera que tienen mayor efecto sobre el procesamiento de la neurona al combinarse para producir la respuesta neuronal.

Los pesos son coeficientes que pueden adaptarse dentro de la red que determinan la intensidad de la señal de entrada registrada por la neurona artificial. Ellos son la medida de la fuerza de una conexión de entrada. Estas fuerzas pueden ser modificadas en respuesta de los ejemplos de entrenamiento, de acuerdo a la topología específica o debido a las reglas de entrenamiento.

2.3.3. Función de propagación

Esta regla permite obtener, a partir de las entradas y los pesos el valor del potencial pos sináptico h_i de la neurona:

$$h_i(t) = \sigma_i(w_{ij}, x_j) \quad (2.110)$$

La función más habitual es la suma ponderada de todas las entradas. Se pueden agrupar las entradas y pesos en dos vectores (x_1, x_2, \dots, x_n) y $(w_{1j}, w_{2j}, \dots, w_{nj})$ y calcular la suma realizando el producto escalar sobre estos dos vectores.

$$h_i(t) = \sum_j w_{ij} x_j \quad (2.111)$$

La función de propagación puede ser más compleja que simplemente una suma de productos. Las entradas y los pesos pueden ser combinados de diferentes maneras antes de pasarse el valor a la función de activación. Por ejemplo, podemos usar como función de propagación, el mínimo, máximo, o diversos algoritmos de normalización. El algoritmo específico para la propagación de las entradas neuronales está determinado por la elección de la arquitectura.

2.3.4. Función de activación o transferencia

El resultado de la función de propagación, en la mayoría de los casos, es una suma ponderada, es transformada en la salida real de la neurona mediante un proceso algorítmico conocido como función de activación.

$$a_i(t) = f_i(t - 1, h_i(t)) \quad (2.112)$$

En este caso la función de activación depende del potencial pos sináptico $h_i(t)$ y del propio estado de activación anterior. Sin embargo, en muchos modelos de RNA se considera que el estado actual de la neurona no depende de su estado anterior $a_i(t-1)$, sino únicamente del actual.

$$a_i(t) = f_i(h_i(t)) \quad (2.113)$$

En la función de activación el valor de la salida de combinación puede ser comparada con algún valor umbral para determinar la salida de la neurona. Sólo, si la suma es mayor que el valor umbral, la neurona generará una señal.

Normalmente el valor umbral es no lineal. El uso de funciones lineales es limitado ya que el valor de la salida es proporcional al de la entrada. La función de activación puede ser algo tan simple como dependiente del resultado de la función de combinación.

Antes de aplicar la función de activación, se puede añadir ruido a las entradas. La fuente y la cantidad de este ruido están determinadas por el modo de entrenamiento de una red particular. Este ruido normalmente es conocido como **temperatura** de la neurona. De hecho, al añadir diferentes niveles de ruido al resultado de la combinación lleva a crearse un modelo más parecido al cerebro. El uso del ruido por temperatura está aún en fase de investigación y no es utilizado habitualmente en las aplicaciones.

2.3.5. Escalamiento y limitación

El valor de salida de la función de activación puede ser procesado de manera adicional mediante un escalamiento y un mecanismo de limitación. El escalamiento simplemente multiplica el valor de la función de transferencia por un factor de escala y después se le suma un desplazamiento.

El mecanismo de limitación es el que asegura que el resultado del escalamiento no exceda una cota superior o inferior. Esta limitación se realiza de manera adicional a los límites que puede imponer la función de transferencia original.

2.3.6. Función de salida (Competitividad)

Cada elemento de procesamiento tiene permitido una única salida, $y_i(t)$, que puede estar asociada con un número elevado de otras neuronas. Normalmente, la salida es directamente equivalente al valor resultante de la función de activación.

$$y_i(t) = F_i(a_i(t)) = a_i(t) \quad (2.114)$$

2.3.7. Función de error y el valor propagado hacia atrás

En la mayoría de algoritmos de entrenamiento de redes neuronales se necesita calcular la diferencia entre la salida actual y la esperada. Esta diferencia es transformada por la función de error correspondiente a la arquitectura particular.

El error de la neurona se propaga normalmente dentro del algoritmo de aprendizaje de otra neurona, denominándose **error actual**. El error actual normalmente es propagado hacia atrás a la capa anterior, siendo este valor o bien el valor actual de error de esa capa obtenido al escalarlo de alguna manera (lo habitual es usando la derivada de la función de transferencia) o bien es tomado como la salida esperada (esto sucede en algunas topologías). Normalmente, el valor que propagamos hacia atrás, una vez escalado por la función de aprendizaje, se multiplica por los pesos de la neurona para modificarlas antes de pasar al ciclo siguiente.

2.3.8. Tasa de aprendizaje

La tasa de aprendizaje de la RNA depende de distintos factores controlables que hay que tener en cuenta. Obviamente, un valor bajo de tasa de entrenamiento equivale a que necesitamos gastar mucho tiempo para llevar a cabo el entrenamiento para producir una RNA bien entrenada. Por el contrario con valores de entrenamiento mayores, la red puede no ser capaz de discriminar de manera tan adecuada, como un sistema que aprende más despacio.

Generalmente, factores adicionales a parte del tiempo tienen que ser considerados cuando se discute el entrenamiento *off-line*:

- Complejidad de la red: tamaño, paradigma, arquitectura

- Tipo de algoritmo de aprendizaje empleado.
- El error admitido de la red final.

Si cambiamos alguno de estos factores podemos aumentar el tiempo de entrenamiento a un valor elevado u obtener un error inaceptable.

La mayoría de algoritmos de aprendizaje requieren que se les pase una tasa de aprendizaje, o un término constante de aprendizaje. Normalmente este término es un valor positivo entre 0 y 1. Si la tasa de aprendizaje es mayor que 1, es fácil para el algoritmo de aprendizaje provocar que se creen pesos incorrectos y la red oscilará. Pequeños valores de tasa de aprendizaje no corregirán el error actual de manera rápida.

2.3.9. Arquitecturas de Redes Neuronales

Se denomina arquitectura a la topología, estructura o patrón de conexión de una red neuronal. En una RNA los nodos se conectan por medio de **sinapsis**, esta estructura de conexiones sinápticas determina el comportamiento de la red. En general, las neuronas se suelen agrupar en unidades estructurales que se denominan **capas**. Finalmente, el conjunto de una o más capas constituye la **red neuronal**.

Se distinguen tres tipos de capas:

- **De entrada:** compuesta por neuronas que reciben datos o señales procedentes del entorno.
- **Ocultas:** es aquella que no tiene conexión directa con el contorno, es decir, que no se conecta directamente ni a órganos sensores ni a efectores.
- **De salida:** es aquella cuyas neuronas proporcionan la respuesta de la red neuronal.

Las conexiones entre las neuronas pueden ser excitatorias o inhibitorias: un peso sináptico negativo define una **conexión inhibitoria**, mientras que uno positivo determina una **conexión excitatoria**.

Las **conexiones intra-capa**, también denominadas **laterales**, tienen lugar entre las neuronas pertenecientes a una misma capa, mientras que las **conexiones inter-capa** se producen entre las neuronas de las diferentes capas. Existen además **conexiones**

realimentadas, que tienen un sentido contrario al de entrada-salida. En algunos casos puede existir realimentación incluso de una neurona consigo misma.

Atendiendo a todos estos conceptos, se puede establecer distintos tipos de arquitecturas neuronales:

- **Redes monocapa:** son aquellas compuestas por una única capa de neuronas.
- **Redes multicapa (*layered networks*):** son aquellas cuyas neuronas se organizan en varias capas.

Atendiendo al flujo de datos en la red neuronal, podemos hablar de:

- **Redes unidireccionales (*feedforward*):** la información circula en un único sentido desde las neuronas de entrada a las de salida.
- **Redes recurrentes o realimentadas (*feedback*):** la información puede circular entre las capas en cualquier sentido.

2.3.10. Validación de los resultados

Para la evaluación del comportamiento de las redes durante los entrenamientos se utilizó el error cuadrático medio normalizado (en inglés: mean squared normalized error, mse).

Por otro lado, para evaluar la calidad de los resultados alcanzados por las distintas redes neuronales se utilizaron distintos criterios, como el error cuadrático medio (en inglés: root mean square error, RMSE), entre las concentraciones nominales y las predichas para cada analito, y los errores relativos, ecs. (2.115) y (2.116), respectivamente (Olivieri & Goicoechea, 2007).

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum (c_{real} - c_{calculada})^2}{n}} \quad (2.115)$$

$$RE(\%) = \frac{\sum (c_{real} - c_{calculada})}{N} * 100 \quad (2.116)$$

2.4. Referencias bibliográficas

- Antunes, M. C., J. E. J. Simão, A. C. Duarte, R. Tauler, Multivariate curve resolution of overlapping voltammetric peaks: quantitative analysis of binary and quaternary metal mixtures, *Analyst* **127** (2002) 809-817.
- Aragão Catunda, Jr, F.E., M. F. de Araujo, A. M. Granero, F. J. Arévalo, M. G. de Carvalho, M. A. Zón, H. Fernández, Electrochemical oxidation of rutin antioxidant in a highly acidic reaction medium, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 9707-9713.
- Arvía, A. J., M. C. Giordano, *Electrocatalisis. Aspectos básicos y sus aplicaciones*, Coop. Gral. Belgrano, Buenos Aires, Argentina, 1982.
- Baker, G. C., I. J. Jenkins, *Analyst* **77** (1952) 685-696
- Bard, A. J., L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, USA, 2001.
- Barker, G. C., *Advances in Polarography*, I. S. Longmuir (Ed.), Pergamon Press, New York, USA, 1960, pág. 144.
- Borgen, O. S., B. R. Kowalski, An extension of the multivariate component-resolution method to three components, *Anal. Chim. Acta* **174** (1985) 1-26.
- Christie, J. H., J. A. Turner, R. A. Osteryoung, Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: Theory, *Anal. Chem.* **49** (1977) 1899-1903.
- Christie, J. H., R. A. Osteryoung, F. C. Anson, Application of double potential-step chronocoulometry to the study of reactant adsorption. Theory, *J. Electroanal. Chem.* **13** (1967) 236-244.
- Conway, B. E., D. C. W. Kannangara, Zinc oxidation and redeposition processes in aqueous alkali and carbonate solutions, *J. Electrochem. Soc.* **134** (1987) 906-918.
- Damaskin, B. B., O. A. Petrii, V. V. Batrakov, *Adsorption of organic compounds on electrodes*, Plenum Press, New York, USA, 1971.
- Danzer, K., L. A. Currie, Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations, 1998), *Pure Appl. Chem.*, **70** (1998) 993-1014.

- de Juan, A., Y. Vander Hieden, R. Tauler, D. L. Massart, assessment of new constraints applied to the alternating least squares method, *Anal. Chim. Acta* **346** (1997) 307-318.
- Gileadi, E. (Ed.), *Electrosorption*, Plenum Press, New York, USA, 1967.
- Gileadi, E., B. R. Rubin, O'M. Bockris, Electrosorption of ethylene on platinum as a function of potential, concentration, and temperature, *J. Phys. Chem.* **69** (1965) 3335-3345.
- Heiland, W., E. Gileadi, O'M. Bockris, Kinetic and thermodynamic aspects of the electrosorption of benzene on platinum electrodes, *J. Phys. Chem.* **70** (1966) 1207-1216.
- Ishibashi, M., T. Fujinaga, New Differential Polarography with One Dropping Electrode. The Use of Rotating Current Alternator, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **23** (1950) 261-272.
- Ishibashi, M., T. Fujinaga, Studies on the Polarographic Analysis. XII. New Differential Polarography with One Dropping Electrode (2), *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **25** (1952) 238-242.
- Ishibashi, M., T. Fujinaga, Studies on the Polarographic Analysis. XI. New Differential Polarography with One Dropping Electrode, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **25** (1952) 68-71.
- Izquierdo-Ridorsa, A., J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, Second-order multivariate curve resolution applied to Rank-deficient data obtained from acid-base spectrophotometric titrations of mixtures of nucleic acids, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **38** (1997) 183-196.
- Kalousek, M., *Collect. Czech. Chem. Comm.* **13** (1948) 105-115.
- Kambara, T., Polarographic Diffusion Current Observed with Square Wave Voltage. II. Basic Theory for a Reversible Electrode, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **27** (1954) 527-529.
- Kemula, W., *Collect. Czech. Chem. Comm.* **2** (1930) 502.

- Kissinger, P. T., W. R. Heineman, Laboratory techniques in Electroanalytical Chemistry, Marcell Dekker, Inc., New York, USA, 1984.
- Komorsky-Lovric, S., M. Lovric, Measurements of redox kinetics of adsorbed azobenzene by “a quasireversible maximum” in square wave voltammetry, *Electrochim. Acta* **40** (1995a) 1781-1784.
- Komorsky-Lovric, S., M. Lovric, Square wave voltammetry of quasi-reversible surface redox reactions, *J. Electroanal. Chem.* **384** (1995b) 115-122.
- Komorsky-Lovric, S., M. Lovric, Theory of square wave stripping voltammetry with adsorptive accumulation, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **335** (1989) 289-294.
- Lovric, M., S. Komorsky-Lovric, Square wave voltammetry of an adsorbed reactant, *J. Electroanal. Chem.* **248** (1988) 239-253.
- Marchiando, N. C., M. A. Zon, H. Fernández, Characterization of the surface redox process of adsorbed cercosporin (CER) at carbon electrodes by anodic stripping square-wave voltammetry, *Electroanalysis*, **15** (2003) 1-9.
- Mason, C., M. Maeder, A. Whitson, Resolving factor analysis, *Anal. Chem.* **73** (2001) 1587-1594.
- Maza, E. M., M. B. Moressi, H. Fernández, M. A. Zon, Electrochemical oxidation of fisetin: studies related to its adsorption at glassy carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.* **675** (2012) 11-17.
- Mirceski, V., M. Lovric, R. Gulaboski, Theoretical and experimental study of the surface redox reaction involving interactions between the adsorbed particles under conditions of square-wave voltammetry, *J. Electroanal. Chem.* **515** (2001) 91-100.
- Mirceski, V., M. Lovric, Split square wave voltammograms of surface redox reactions, *Electroanalysis* **9** (1997) 1283-1287.
- Mirceski, V., S. Komorski-Lovric, M. Lovric, Square wave voltammetry. Theory and Application, F. Scholz (Ed.), *Monographs in Electrochemistry*, Springer, Leipzig, Germany, 2007.

- Molina P. G., M. A. Zon, H. Fernandez, The redox kinetics of adsorbed ATX-I at carbon electrodes by anodic stripping square-wave voltammetry, *Electroanalysis* **12** (2000) 791-798.
- Molina, P. G., M. A. Zon, H. Fernández, Determination of the acid dissociation constants for some mycotoxins of the *Alternaria alternanta* genus, *Can. J. Chem.* **76** (1998) 576-582.
- Müller, B., J. Reinhardt, "Neural Networks. An Introduction". Springer, 1st Ed. Berlin, Germany, 1990.
- Nicholson, R. S., I. Shain, Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible and kinetic systems, *Anal. Chem.* **36** (1964) 706-723.
- Nicholson, R. S., Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics, *Anal. Chem.* **37** (1965) 1351-1355.
- O'Dea, J. J., J. G. Osteryoung, Characterization of quasi-reversible surfaces processes by square wave voltammetry, *Anal. Chem.* **65** (1993) 3090-3097.
- Oldham, K. B., J. C. Myland, *Fundamentals of Electrochemical Science*, Academic Press, New York, USA, 1994.
- Olivieri, A., H. Goicoechea, *La calibración en química analítica*, UNL, Santa Fe, Argentina, 2007.
- Osteryoung, J., J. J. O'Dea, *Square Wave Voltammetry*, A. J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, USA. Vol 14, 1987, págs. 209-308.
- Ramaley, L., M. S. Krause, Jr., Theory of square wave voltammetry, *Anal. Chem.* **41** (1969) 1362-1365.
- Randles, J. E. B., A cathode ray polarograph. Part II. The current-voltage curves, *Trans. Faraday Soc.* **44** (1948) 327-338.
- Ridgway, T. H., R. P. Van Duyne, C. N. Reilley, Double potential step chronocoulometry. Part 1. A reexamination of EC kinetic theory including the

- effects of electrode reactant and product adsorption, *J. Electroanal. Chem.* **34** (1972) 267-282.
- Rieger, P. H., *Electrochemistry*, Chapman & Hall, 2nd Ed., New York-Londres, 1994.
- Rifkin, S. C., D. H. Evans, General equation for voltammetry with step-functional potential changes applied to differential pulse voltammetry, *Anal. Chem.* **48** (1976) 1616-1618.
- Sastre de Vicente, M. E., López Fonseca, J. M., *Métodos Voltamétricos. Aplicación al estudio de reacciones electródicas complejas*, Universidade da Coruña, La Coruña, España, 1993.
- Saurina, J., S. Hernández-Cassou, R. Tauler, Multivariate curve resolution and trilinear decomposition methods in the analysis of stopped-flow kinetic data for binary amino acid mixtures, *Anal. Chem.* **69** (1997) 2329-2336.
- Sevick, A., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **13** (1948) 349-377.
- Tauler, R., A. Izquierdo-Ridorsa, E. Casassas, Simultaneous analysis of several spectroscopic titrations with self-modelling curve, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **18** (1993) 293-300.
- Tauler, R., Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution, *J. Chemom.* **15** (2001) 627-646.
- Tauler, R., Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **30** (1995) 133-146.
- Vandeginste, B. G. M., D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handling en "Science and Technology 20A: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics", Part B, Elsevier, 1998.
- Wang, J., *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH, 2nd Ed., New York, USA, 2000.
- Winding, W., J. Guilment, Interactive self-modeling mixture analysis, *Anal. Chem.* **63** (1991) 1425-1432.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Solventes

Para las experiencias electroquímicas se emplearon diversos solvente. En los estudios en que se eligió utilizar un medio fuertemente ácido, se utilizó una solución acuosa 1M HClO₄. En otros casos, en los que se hizo uso de un amplio intervalo de valores de pH, los solventes utilizados fueron soluciones reguladoras de fosfato 0,2 M (preparadas con 0,1 M Na₂HPO₄ (Merck p.a.) + 0,1 M NaH₂PO₄ (Merck p.a.)) a las cuales se les ajustó el pH variando las proporciones de la mezcla de sales, y, soluciones reguladoras de citrato comercial (pH 4,00 ácido cítrico/NaOH/HCl, Merck p.a), a las cuales se les ajustó el pH con pequeñas porciones de soluciones concentradas de HClO₄ o NaOH. Estos solventes, a su vez cumplieron la función de electrolito soporte en cada experiencia. Sin embargo, en algunas experiencias, se emplearon soluciones acuosas 1×10^{-4} M HClO₄, en cuyo caso se adicionó al medio de reacción 0,1 M NaClO₄, a los efectos de mantener la fuerza iónica constante. El agua utilizada en la preparación de las soluciones reguladoras y en los demás casos fue Sintorgan, calidad HPLC.

Para la determinación de las constantes de acidez aparentes de los flavonoides se registraron los espectros de absorción uv-visible de los mismos a diferentes valores de pH, los que se variaron entre 0,88 y 13,51. Las soluciones se prepararon a partir de soluciones reguladoras de fosfato, empleando las siguientes sales: 0,1 M de Na₂HPO₄ y 0,1 M de NaH₂PO₄, a las cuales se les agregó 0,1 M de HCl ó 0,1 M de NaOH para ajustar los distintos valores de pH, según correspondió. Para los valores extremos de pH (fuertemente ácidos y alcalinos) se emplearon soluciones de HCl ó NaOH, a diferentes concentraciones.

En el caso de las experiencias cromatográficas se utilizaron diversos solventes para formar las mezclas utilizadas en las corridas cromatográficas. Los solventes fueron: benceno, acetato de etilo, ácido acético, todos Sintorgan, calidad HPLC. Las

cromatografías en capa fina fueron corridas en fracciones de placas de aluminio, con depósitos de silica gel, "AL TLC 20 x 20 cm. Silica gel 60 F₂₅₄" (Merck p.a.).

En cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) como fase móvil se usó una mezcla binaria, la cual estuvo compuesta por el solvente A, formado por: agua: ácido acético (99:1) y el solvente B, cuyos componentes fueron: metanol:acetonitrilo:ácido acético (89:10:1).

3.2. Reactivos

Morina (MOR), buteina (BUT), luteolina (LUT), rutina (RUT), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y polietilenimina (PEI, $PM \approx 600 \text{ g mol}^{-1}$) fueron adquiridas de Sigma Chemical Company y empleadas como se recibieron. Se mantuvieron a una temperatura de 8 °C y protegidas de la luz.

Los nanotubos de carbono empleados fueron de pared múltiple (NTCPM), de diámetro (30±15) nm y longitud 1-5 µm obtenidos de Nano-Lab (Estados Unidos).

3.3. Soluciones

Se prepararon soluciones patrones de las especies electroactivas en etanol absoluto (Merck p.a.), de concentración $1,00 \times 10^{-2} \text{ M}$ para MOR, $1,84 \times 10^{-3} \text{ M}$ para BUT, $3,50 \times 10^{-3} \text{ M}$ para LUT, y $8,70 \times 10^{-4} \text{ M}$ para RUT. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente tomando alícuotas de la solución patrón, y diluyéndolas en las correspondientes soluciones de trabajo.

Las soluciones dentro de la celda electroquímica se burbujearon con nitrógeno de alta pureza, durante, al menos, 20 min antes de registrar las medidas electroquímicas. Previamente, el gas se hizo pasar a través de una trampa, que contenía H₂O + % adecuado de etanol absoluto. Durante las mediciones electroquímicas se mantuvo siempre una atmósfera de nitrógeno sobre la solución de estudio.

La solución del radical DPPH fue $1,48 \times 10^{-4} \text{ M}$ en etanol absoluto (Merck p.a.).

La dispersión de NTCPM en PEI (NTCPM+PEI), se obtuvo mezclando 1,0 mg de NTCPM con 1,0 mL de solución de PEI ($c_{\text{PEI}} = 5 \text{ mg/mL}$), preparada en una mezcla de agua:etanol (50:50 v/v) (ambos, Merck p.a.). Finalmente, se sumergió la dispersión por 45 min en un baño de ultrasonido.

3.3.1 Extractos y soluciones de luteolina

3.3.1.1. Preparación de extractos para cuantificación de luteolina en cáscaras de mani

Para extraer LUT de cáscaras de mani, se molieron finamente éstas en un molinillo analítico y, luego, 2,5 gr de este fino polvo fue colocado en un erlenmeyer con 50 mL de metanol (Merck p.a.), el cual se dejó, con agitación constante y a temperatura ambiente por 24 hs. Finalmente, la solución fue filtrada con papel de filtro Whatman, Grado 1 (Pin-Der y col., 1992).

3.3.1.2. Preparación de extractos para cuantificación de luteolina en suplemento dietario

Se conoce que LUT es soluble en etanol y prácticamente insoluble en agua (Peng & Yan, 2010). Así, se probó, en primera instancia, extraerla desde el suplemento dietario directamente con etanol. Luego, como segunda opción, se disolvió la pastilla de LUTIMAX en agua donde, se observó la presencia de un precipitado, el cual, posteriormente, se re-disolvió en etanol a los efectos de extraer LUT.

Las soluciones preparadas se detallan a continuación:

LUTIMAX en etanol: Se disolvió una pastilla de LUTIMAX en 25 mL de etanol absoluto (Merck p.a.).

LUTIMAX en agua: Se disolvió una pastilla de LUTIMAX en 25 mL de agua calidad HPLC (Merck p.a.), donde se observó la presencia de un precipitado. La solución se filtró con papel de filtro “Whatman Grado 1”. El precipitado se reservó para generar la solución siguiente.

LUTIMAX en agua/etanol: El precipitado que se separó de la solución anterior se disolvió luego, con ayuda de un equipo sonicador, en 25 mL de etanol absoluto (Merck p.a.).

3.4. Celda electroquímica

La celda para las experiencias electroquímicas, en medio no agitado, fue de vidrio y de dos cuerpos (Fig. 3.1). 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 contra-electrodo y el electrodo de trabajo, el cual se posiciona en frente y a la misma altura que el capilar Luggin, que se encuentra en un compartimiento lateral de la celda, en donde se coloca el electrodo de referencia. 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.

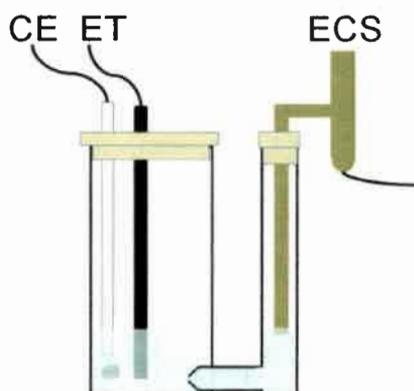


Figura 3.1. Representación esquemática de una celda de dos cuerpos con los tres electrodos. CE: Contra-electrodo, ET: Electrodo de trabajo y ECS: Electrodo de calomel saturado (Electrodo de referencia).

Para el caso de medios agitados, se utilizó una celda de vidrio, de un solo cuerpo, en forma de cono invertido, en donde se introdujeron los tres electrodos (Fig 3.2).

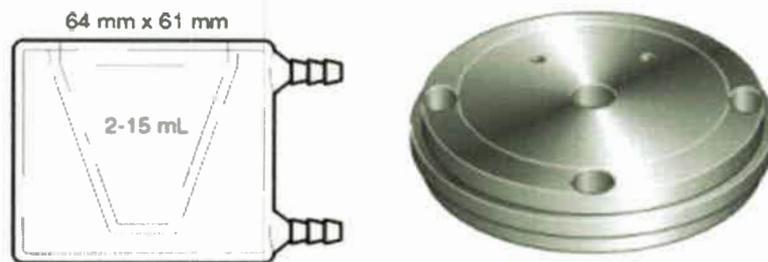


Figura 3.2. Representación esquemática de una celda de un solo cuerpo y su tapa.

En ambos tipos de celdas, tanto el electrodo de trabajo, como el contraelectrodo, están sujetos por una tapa de teflón hermética (en el caso de la celda de un solo cuerpo, también está sujeto el electrodo de referencia). Además, esta tapa, posee también un orificio, por donde ingresa un fino tubo de teflón transportando el gas nitrógeno y otro que sirve como salida del mismo. El volumen de celda fue de 10 mL en los dos casos.

3.5. Electroodos

3.5.1. Electroodos de trabajo de carbono vítreo

Estos electroodos son muy conocidos ya que poseen excelentes propiedades mecánicas y eléctricas, amplias ventanas de potencial, resistencia a disolventes, y métodos de fabricación altamente reproducibles.

Su preparación involucra un cuidadoso programa de calentamiento controlado de una resina polimérica premoldeada (fenolformaldehido) en atmósfera inerte (Adams, 1969). El proceso de carbonización se realiza muy lentamente, de 300 a 1200 °C para asegurar la eliminación de oxígeno, nitrógeno e hidrógeno.

La estructura del carbono vítreo incluye cintas delgadas, y reticulados de grafito.

Debido a la alta densidad y al pequeño tamaño de poro, no se requieren procedimientos de impregnación posterior. Sin embargo, se suele tratar el electrodo, previo a su uso para activar su superficie y, así, lograr resultados reproducibles y mejorar su rendimiento analítico (Engstrom, 1984).

El pre-tratamiento consiste, normalmente, en un pulido mecánico, hasta la apariencia de un espejo brillante, con partículas de alúmina de tamaños sucesivamente más pequeños (hasta $0,05\mu\text{m}$). Normalmente, el electrodo se enjuaga con agua desionizada luego del pulido y antes de su uso. Otros métodos para activar la superficie que se suelen utilizar son: electroquímicos, químicos, con tratamientos de calor o láser (McCreery, 1991).

La mejora en la capacidad de transferencia de electrones, producida por estas activaciones, ha sido atribuida a diversos factores, los cuales incluyen, la eliminación de contaminantes de la superficie, la exposición de los bordes de carbono “fresco” y el aumento de la densidad de grupos superficiales que contienen oxígeno.

En las experiencias aquí presentadas, se utilizaron electrodos de disco de carbono vítreo (CV, marca BAS), de 3 mm de diámetro, con un área geométrica, $A = 0,071\text{ cm}^2$. En todas las experiencias, presentadas en este trabajo, los electrodos de CV fueron sometidos, 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 $0,05\mu\text{m}$. Entre los pulidos, y al finalizar los mismos, los electrodos se colocaron en un recipiente con agua y se sometieron a un baño de ultrasonido por 2 min, a los efectos de retirar los restos de alúmina.

3.5.1.1. Electrodo de carbono vítreo

Cuando los electrodos de CV se utilizaron sin modificación alguna, (como electrodos de CV desnudo), posteriormente a los pulidos, los electrodos fueron sometidos a un proceso de activación electroquímica, el cual consistió en cinco ciclos de barrido de potencial entre $-0,500$ y $1,000\text{ V}$ a una velocidad de barrido de $0,050\text{ Vs}^{-1}$ en la solución del blanco.

3.5.1.2. Electrodo de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple dispersos en polietilenimina.

Cuando a los electrodos de CV se los utilizó modificados, posteriormente al pulido de los mismos, se realizó el siguiente procedimiento:

Preparación del electrodo de CV/NTCPM+PEI: El electrodo de CV fue modificado con la dispersión de NTCPM+PEI a través del agregado de 20 μL de esta dispersión sobre la superficie del electrodo y se dejó secar por 90 min, a temperatura ambiente.

En la Fig. 3.3 se muestra una fotografía de un electrodo de CV modificado con NTCPM+PEI.

Pretratamiento del electrodo de CV/NTCPM+PEI: Antes de adsorber sobre la superficie del electrodo el analito deseado, el electrodo fue ciclado 10 veces entre 0,000 y 0,900 V a una velocidad de barrido de $0,050 \text{ Vs}^{-1}$, en una solución de HClO_4 1M.

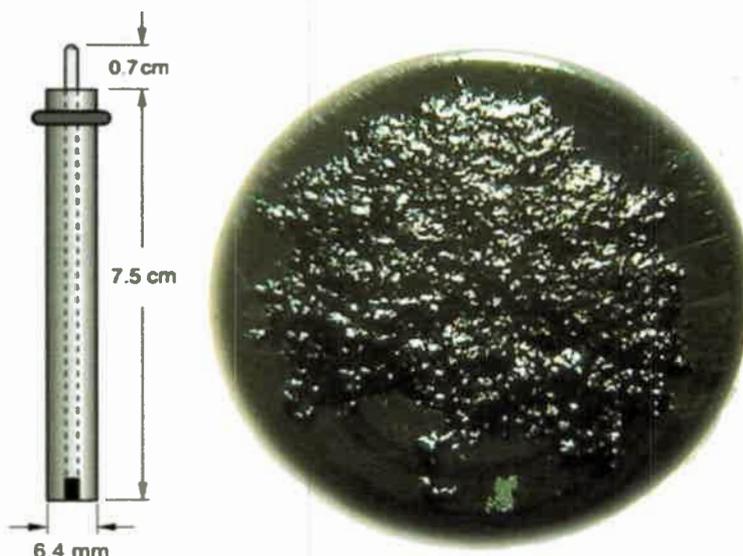


Figura 3.3. Representación esquemática y vista superior (con aumento de 40X) de un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple, dispersos en polietilenimina.

3.5.2. Electrodo de referencia

Se usaron dos tipos de electrodos de referencia:

Por un lado, se usó como electrodo de referencia 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. En una de las ramas, se suelda un alambre de Pt y, luego, se coloca Hg purificado cubriendo toda la superficie del Pt. Por

encima de la gota de Hg, se deposita la pasta de calomel (Hg_2Cl_2 , KCl (saturado)). La otra rama, que realiza el contacto con la solución, se rellena con agar- KNO_3 3%. Esto actúa como puente salino. Finalmente, el electrodo se rellena con una solución saturada de KCl. En la Fig. 3.4a se muestra un esquema del ECS. Es importante que no exista flujo de materia hacia el compartimiento de trabajo. Una vez preparado el electrodo, se compara su potencial frente a otro ECS estándar y se verifica, una vez alcanzado el equilibrio, que la diferencia no sea mayor que ± 1 mV a temperatura ambiente.

Por otro lado, se usó también, en algunas experiencias, como electrodo de referencia, un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), el cual consiste en un alambre de plata que se oxida para formar una capa de cloruro de plata. Para armarlo, se introduce este alambre en una solución de KCl (en este caso fue 3 M) saturada con cloruro de plata, y se conecta, a través de un puente salino, con la solución electrolítica (Fig. 3.4b).

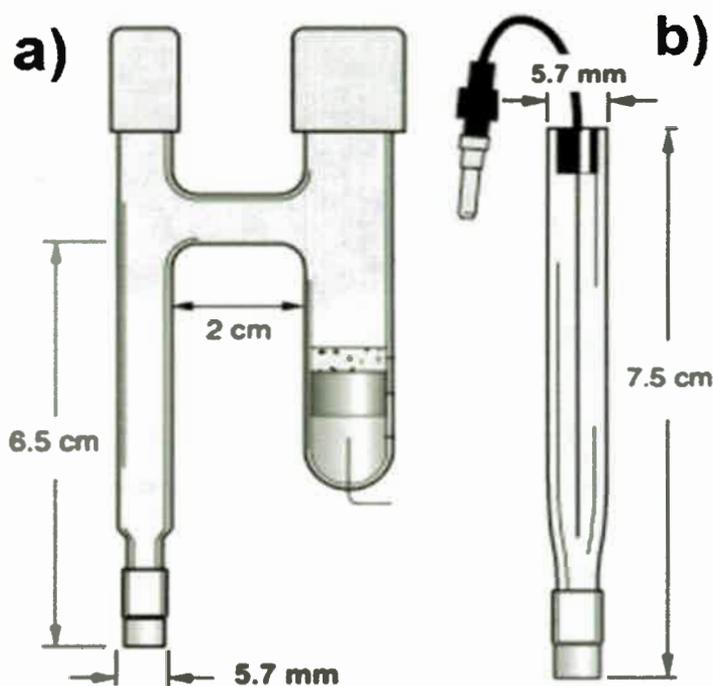


Figura 3.4. Representación esquemática de **a)** un electrodo de calomel saturado y **b)** de un electrodo de Ag/AgCl.

3.5.3. Contra-electrodo

Se utilizó como contra-electrodo un alambre de Pt enroscado en forma de espiral (Fig. 3.5), el cual tiene un área muy superior a la del electrodo de trabajo ($A \approx 2 \text{ cm}^2$). El mismo fue colocado paralelo al electrodo de trabajo; de esta manera se logra disminuir la caída óhmica, haciendo que el campo eléctrico generado entre ellos sea lineal y homogéneo.

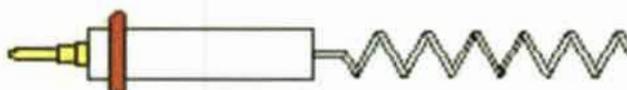


Figura 3.5. Representación esquemática de un contra-electrodo de Pt en forma de espiral.

3.6. Equipamiento electroquímico y otros

Para las medidas electroquímicas se utilizaron analizadores voltamperométricos acoplados a una PC, AUTOLAB modelos PGSTAT12 (Fig 3.6) y PGSTAT30, con softwares electroquímico incorporado, GPES 4,9, ambos Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands y BAS, modelo EPSILON (Fig. 3.7), también, con software electroquímico incorporado.

Las medidas espectrofotométricas para la determinación de las constantes de acidez aparentes y el poder antioxidante se realizaron empleando un espectrofotómetro uv-visible, marca Hewlett Parckard, modelo HP 8453. Las celdas de cuarzo tuvieron un camino óptico de 1 cm. Todas las medidas espectrofotométricas se realizaron a $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$.

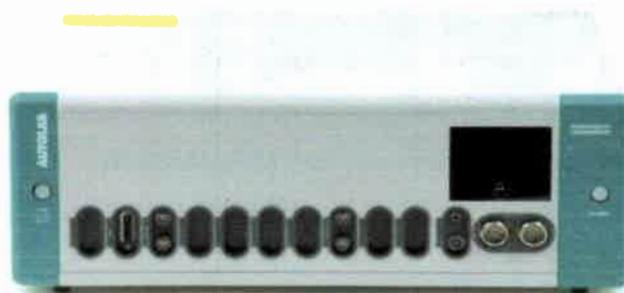


Figura 3.6. Potenciostato/galvanostato AUTOLAB, Modelo PGSTSAT12.



Figura 3.7. Potenciostato/galvanostato BAS, Modelo EPSILON con su módulo de agitación, ambos con control desde la computadora.

Para las medidas de HPLC se utilizó un equipo Waters 2998, con detector de arreglo de diodos y cuatro bombas Waters e2695. El volumen de inyección usado fue de $15\mu\text{L}$. La columna de separación fue de fase reversa, Luna C-18(2) 100A (100 x 4,60 mm de diámetro). El flujo se mantuvo constante a $0,2\text{ mL min}^{-1}$ y se utilizó un gradiente de elución comenzando con 60% del solvente A y 40% del solvente B (ver ítem 3.1), y se varió linealmente, hasta alcanzar los valores de 0% del solvente A y 100% del solvente B, en 30 min.

Las medidas de pH fueron realizadas con un pH-metro, HANNA, modelo pH211 (Rumanía).

Las dispersiones de nanotubos, previo a su utilización, en la modificación de electrodos, fueron agitadas en un agitador mecánico, Vortemixer Speed Knob (China).

Para termostatar las soluciones se usó un equipo Cole-Parmer 12108-15 (Estados Unidos). En la mayoría de las experiencias electroquímicas, la temperatura fue de 25°C, sin embargo, en algunos experimentos, la misma se varió entre 5 y 40°C

3.7. Técnicas electroquímicas empleadas

Las técnicas electroquímicas empleadas fueron: cronoculometría de doble pulso de potencial (CCDPP), voltamperometría cíclica (VC) y de onda cuadrada (VOC). La velocidad de barrido (v) del potencial en VC se varió entre 0,005 y 1 V s⁻¹. Los parámetros característicos de la VOC utilizados fueron: amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{oc}) = 0,025 V; salto de escalera (ΔE_e) = 0,005 V y frecuencia (f), la cual se varió entre 10 y 500 Hz. Sin embargo, en otros experimentos, estos parámetros se modificaron, según se indica en el Capítulo 4: Resultados y Discusión.

3.8. Determinación del poder antioxidante. Método del radical DPPH

Para determinar el poder antioxidante de cada uno de los flavonoides estudiados, se siguió la metodología publicada por Molyneux (2004), la cual es simplemente una revisión, con consideraciones prácticas, de la metodología propuesta por Blois (1958).

Esta metodología se basa en que, cuando se mezcla una solución del radical DPPH con una solución que contenga alguna especie capaz de donar un átomo de hidrógeno, ambas reaccionan, y el resultado es la reducción del radical DPPH. Cuando este último, pierde la gran conjugación electrónica que posee, se puede observar una notoria modificación de su espectro de absorción uv-visible (Fig. 3.8).

En las experiencias realizadas, se mezclaron soluciones del radical DPPH con soluciones del flavonoide a estudiar (ambas en etanol absoluto, Merck p.a.) en diferentes relaciones de concentraciones y se midió la absorbancia a $\lambda = 515$ nm. Finalmente, se graficó la absorbancia de cada mezcla, en función de la relación de concentraciones (c_{AOx}^* / c_{DPPH}^*) y se expresaron los resultados convenientemente en cada caso.

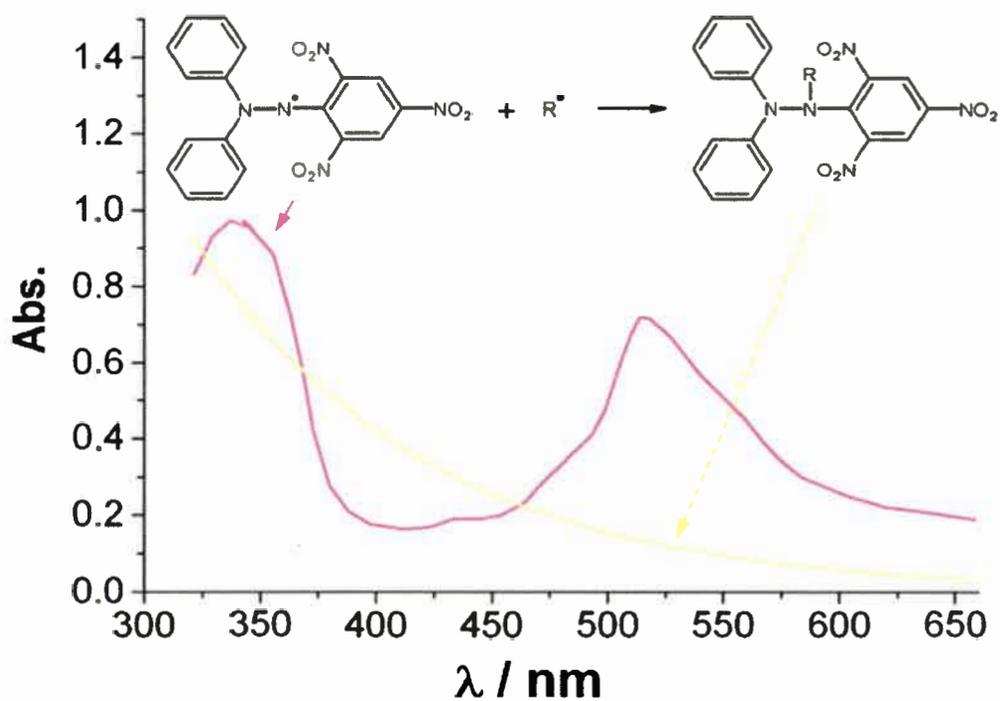


Figura 3.8. Espectros de absorción. (—) solución de radical DPPH en etanol, (—) solución de radical DPPH reducido. En el inserto del gráfico se puede observar la reacción de reducción del radical DPPH y la consecuente pérdida de su gran conjugación electrónica.

3.9. Referencias bibliográficas

- Adams, R. N., *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker, New York, U.S.A. 1969.
- Blois, M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181** (1958) 1199-1200.
- Engstrom, R. C., Spatial resolution of electrode heterogeneity using iontophoresis, *Anal. Chem.* **56** (1984) 890-894.
- McCreery, R. L., "Carbon electrodes: Structural effects on electron transfer kinetics," en A. J. Bard (ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, U.S.A. 1991, Vol. 18.
- Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **26** (2004) 211-219.
- Peng, B., W. Yan, Solubility of luteolin in ethanol + water mixed solvents at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* **55** (2010) 583-585.
- Pin-Der, D., Y. Dong-Bor, Y. Gow-Chin, Extraction and identification of an antioxidative component from peanut hulls, *JAOCS* **69** (1992) 814-818.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudios espectrofotométricos

4.1.1. Determinación de las constantes de acidez aparentes

4.1.1.1. Morina

En la Fig. 4.1 se muestra un espectro de absorción uv-visible de MOR, el que muestra un máximo de absorción a $\lambda = 353$ nm. Como se observa en la Fig. 1.5, MOR es un ácido poliprótico.

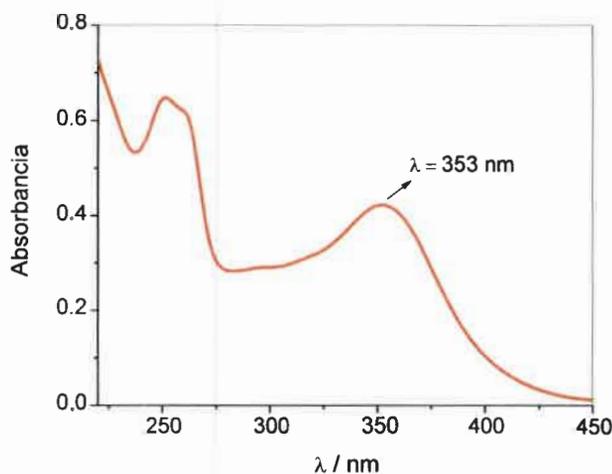


Figura 4.1. Espectro de absorción uv-visible de MOR. $c_{MOR}^* = 4,54 \times 10^{-5}$ M; Solvente: solución Reguladora de fosfato (pH 4,00). Celda de cuarzo, camino óptico, $b = 1$ cm.

Se encontró que MOR cumple con la ley de Lambert-Beer. El coeficiente de extinción molar (ϵ) determinado a la λ del máximo de absorción fue:

$$\epsilon^{353} = (1,10 \pm 0,02) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (r = 0,9994)$$

En la Fig. 4.2 se muestran los espectros de absorción de MOR a distintos valores de pH.

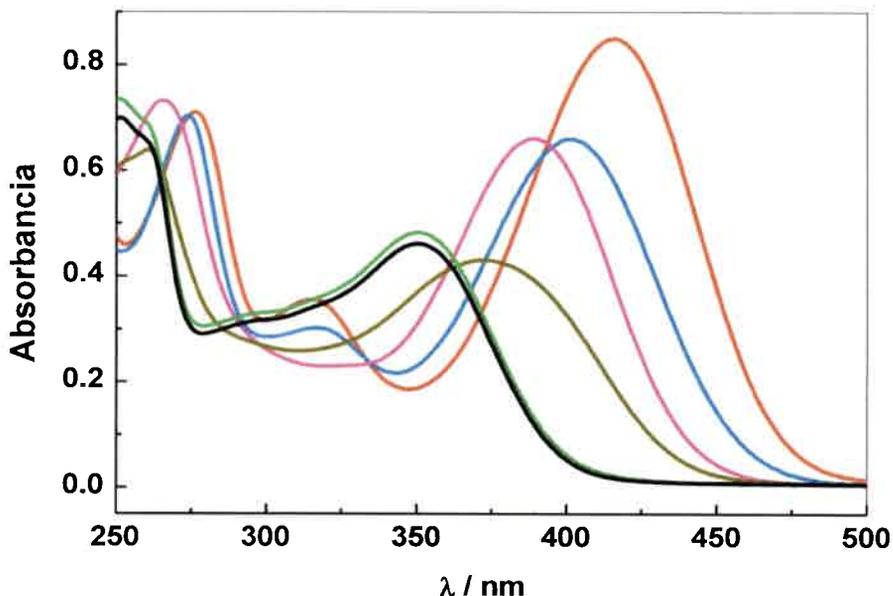


Figura 4.2. Espectros de absorción uv-visible de MOR obtenidos a distintos valores de pH: (—) 0,84, (—) 2,96, (—) 4,97, (—) 7,00, (—) 9,10, (—) 11,00, $c_{MOR}^* = 5 \times 10^{-5} M$. Celda de cuarzo, camino óptico, $b = 1 cm$.

En la Fig. 4.3 se muestra la descomposición en valores singulares (SVD) de la matriz de datos experimentales constituida por los espectros de absorción de MOR a 14 valores de pHs diferentes. En la misma se observa que el número es igual a cuatro, lo cual corresponde al número de especies en solución que presentan una contribución relevante, a partir de analizar el cambio que se observa en los espectros de absorción uv-visible con la variación del pH, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que MOR es un ácido poliprótico.

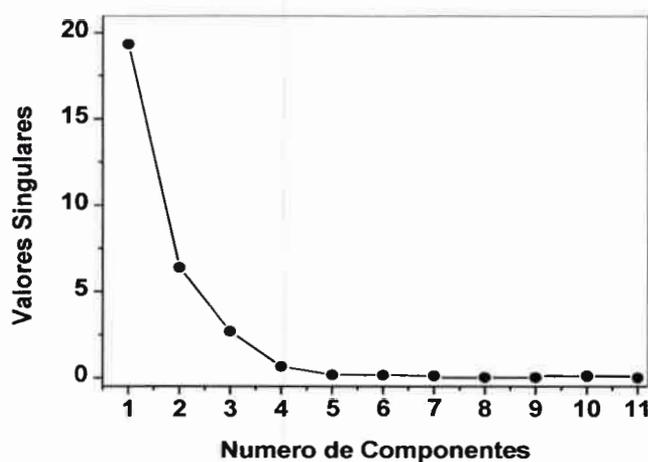


Figura 4.3. *Descomposición en valores singulares (SVD) de la matriz de datos experimentales.*

En la Fig. 4.4 se muestra un gráfico que contiene los errores de los correspondientes ajustes obtenidos a cada longitud de onda, en un intervalo acotado (λ entre 290 y 300 nm). Se puede observar que el mínimo error se encuentra a $\lambda = 295$ nm.

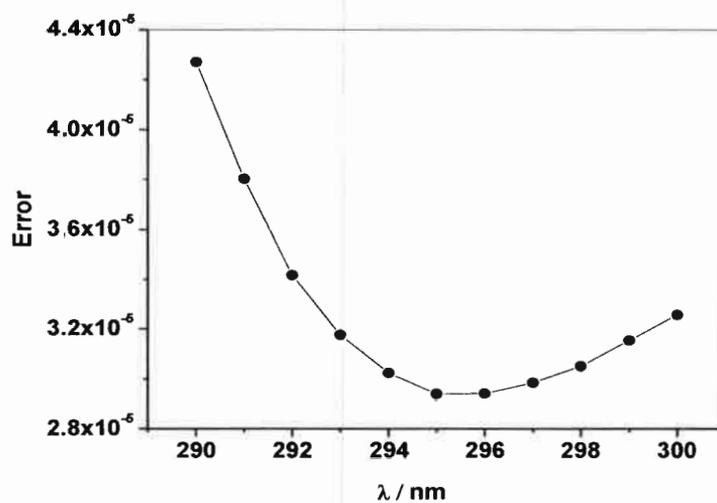


Figura 4.4. *Errores de los ajustes experimentales correspondientes a cada longitud de onda en el intervalo entre 290 y 300 nm.*

En la Fig. 4.5 se muestra el ajuste de los datos experimentales a la λ que presenta el mínimo error. Se encontró un acuerdo razonable entre la variación experimental de la A vs. pH y la curva generada con los resultados del mejor ajuste.

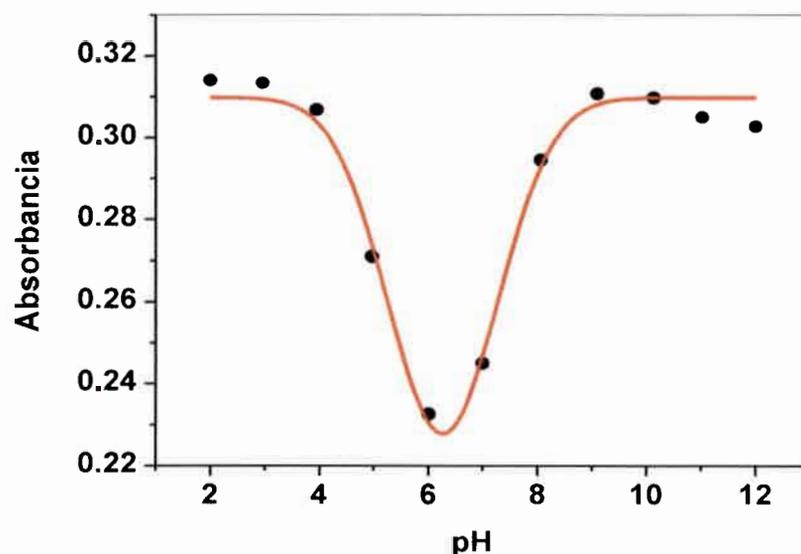


Figura 4.5. Variación de la absorbancia con el pH a $\lambda = 295 \text{ nm}$. (●) Datos obtenidos experimentalmente. (—) Curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste.

En la Tabla 4.1 se muestran los valores obtenidos para las constantes de disociación ácidas aparentes de MOR, como así también los valores de los dos ϵ de las distintas especies presentes en solución a la λ indicada, obtenidas a través del proceso del mejor ajuste entre la variación experimental de la A vs. pH y las ecuaciones teóricas que describen el sistema.

Tabla 4.1. Resultados finales del proceso de ajuste. Valores de los ϵ de las diferentes especies a la longitud de onda indicada, como así también de las constantes de disociación ácidas aparentes de MOR.

Parámetros	$\lambda = 295 \text{ nm}$
$\epsilon^\lambda AH_5 / M^{-1}cm^{-1}$	$(6,92 \pm 0,01) \times 10^3$
$\epsilon^\lambda AH_4^- / M^{-1}cm^{-1}$	$(4,88 \pm 0,02) \times 10^3$
$\epsilon^\lambda AH_3^{-2} / M^{-1}cm^{-1}$	$(6,73 \pm 0,01) \times 10^3$
$\epsilon^\lambda AH_2^{-3} / M^{-1}cm^{-1}$	$(7,48 \pm 0,01) \times 10^3$
norma del error, $\ e \ $	$2,93 \times 10^{-5}$
K_{a1}	$(9,29 \pm 0,01) \times 10^{-6}$
K_{a2}	$(3,43 \pm 0,01) \times 10^{-8}$
K_{a3}	$(3,66 \pm 0,01) \times 10^{-11}$

Finalmente, en la Fig. 4.6 se muestra el diagrama de distribución de especies de MOR en función del pH, construido a partir del valor de las constantes de disociación ácidas aparentes (K_{a1} , K_{a2} y K_{a3}) obtenidas del mejor ajuste (ver Tabla 4.1).

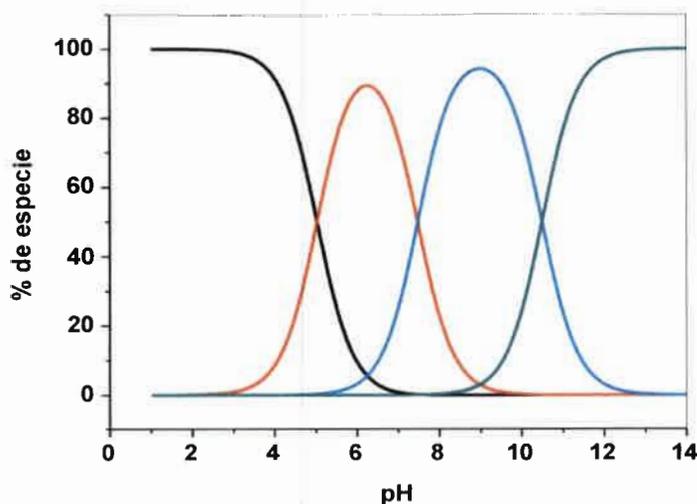


Figura 4.6. Diagrama de distribución de especies del MOR en función del pH;
 (—) AH_5 , (—) AH_4^- , (—) AH_3^{-2} , (—) AH_2^{-3} .

4.1.1.2. Buteína

En la Fig. 4.7 se muestran los espectros de absorción uv-visibles de BUT a diferentes c_{BUT}^* , los cuales muestran un máximo de absorción a $\lambda = 387 \text{ nm}$. Como puede observarse en la Fig. 1.6, BUT es también un ácido poliprótico.

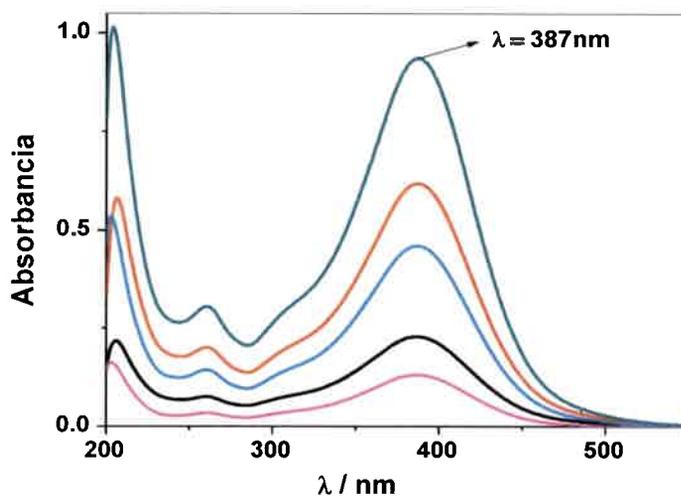


Figura 4.7. Espectros de absorción uv-visible de BUT. c_{BUT}^* : (-) $3,67 \times 10^{-6} \text{ M}$; (-) $7,30 \times 10^{-6} \text{ M}$; (-) $1,48 \times 10^{-5} \text{ M}$; (-) $2,13 \times 10^{-5} \text{ M}$; (-) $2,94 \times 10^{-5} \text{ M}$; Solvente: solución reguladora de fosfato (pH 4,00). Celda de cuarzo, camino óptico, $b = 1 \text{ cm}$.

Se encontró que BUT cumple con la ley de Lambert-Beer. El coeficiente de extinción molar (ϵ) determinado a la λ del máximo de absorción fue:

$$\epsilon^{387} = (3,1 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (r = 0,9941)$$

En la Fig. 4.8 se muestran los espectros de absorción de BUT a distintos valores de pH.

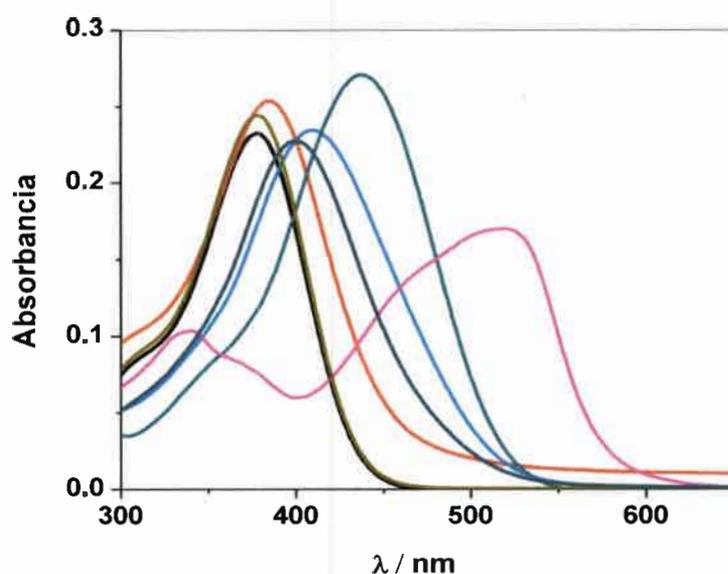


Figura 4.8. Espectros de absorción uv-visible de BUT obtenidos a distintos valores de pH: (—) 0,72, (—) 2,32, (—) 6,83, (—) 7,72, (—) 8,12, (—) 9,43, (—) 12,57, $c_{BUT}^* = 1,00 \times 10^{-5} M$.

En la descomposición en valores singulares (SVD) de la matriz de datos experimentales se observó que el número de componentes es igual a cuatro, lo cual corresponde al número de especies en solución que presentan una contribución relevante, a partir de analizar el cambio que se observa en los espectros de absorción uv-visible con la variación del pH, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que el BUT es también un ácido poliprótico (Fig. 1.6).

Se determinó que, en un intervalo de longitudes de onda acotado, entre λ 360 y 450 nm el ajuste, a cada longitud de onda, con el mínimo error se encuentra a $\lambda = 387$ nm (Fig. 4.9).

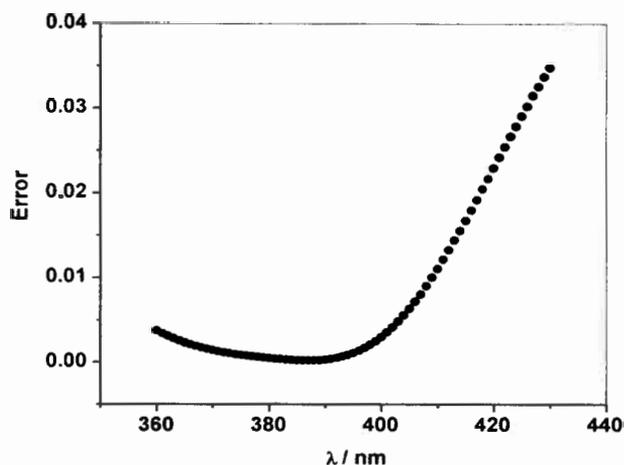


Figura 4.9. Errores de los ajustes experimentales correspondientes a cada longitud de onda en el intervalo entre 360 y 450 nm.

En la Fig. 4.10 se muestra el ajuste de los datos experimentales a la λ que presenta el mínimo error. Se encontró un acuerdo razonable entre la variación experimental de la A vs. pH y la curva generada con los resultados del mejor ajuste.

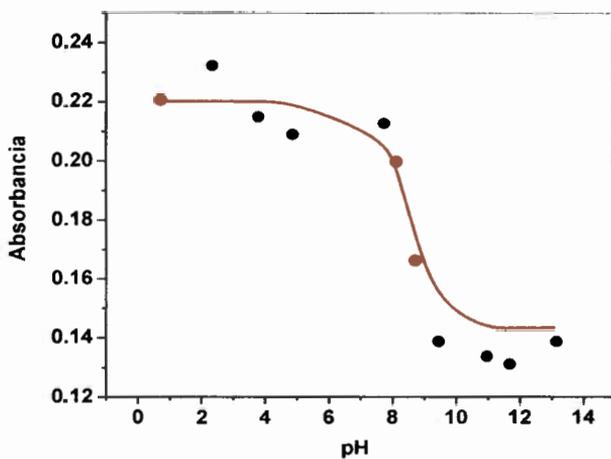


Figura 4.10. Variación de la absorbancia con el pH a $\lambda = 387$ nm. La línea continua representa la curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste. Los círculos representan los datos obtenidos experimentalmente.

En la Tabla 4.2 se muestran los valores obtenidos para las constantes de disociación ácidas aparentes de BUT, como así también los valores de los ϵ de las distintas especies presentes en solución a la λ indicada, obtenidas a través del proceso del mejor ajuste entre la variación experimental de la A vs. pH y las ecuaciones teóricas que describen el sistema.

Tabla 4.2. Resultados finales del proceso de ajuste. Valores de los ϵ de las diferentes especies a la longitud de onda indicada, como así también de las constantes de disociación ácidas aparentes de BUT.

Parámetros	$\lambda = 387 \text{ nm}$
$\epsilon^\lambda AH_4 / M^{-1}cm^{-1}$	$(3,00 \pm 0,01) \times 10^4$
$\epsilon^\lambda AH_3^- / M^{-1}cm^{-1}$	$(2,93 \pm 0,01) \times 10^4$
$\epsilon^\lambda AH_2^{2-} / M^{-1}cm^{-1}$	$(1,13 \pm 0,01) \times 10^4$
$\epsilon^\lambda AH^{-3} / M^{-1}cm^{-1}$	$(1,00 \pm 0,01) \times 10^4$
norma del error, $\ e \ $	$9,40 \times 10^{-5}$
K_{a1}	$(1,50 \pm 0,09) \times 10^{-7}$
K_{a2}	$(4,33 \pm 0,02) \times 10^{-9}$
K_{a3}	$(7,16 \pm 0,01) \times 10^{-12}$

En la Fig. 4.11 se muestra el diagrama de distribución de especies de BUT en función del pH, construido a partir del valor de las constantes de disociación ácidas aparentes (K_{a1} , K_{a2} y K_{a3}) obtenida del mejor ajuste (ver Tabla 4.2).

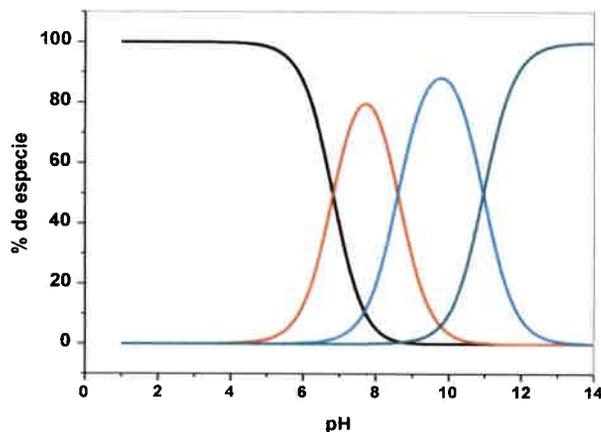


Figura 4.11. Diagrama de distribución de especies de BUT en función del pH; (—) AH_4 , (—) AH_3^- , (—) AH_2^{2-} , (—) AH^- .

4.1.1.3. Luteolina

En la Fig. 4.12 se muestran los espectros de absorción uv-visibles de LUT a diferentes c_{LUT}^* , los cuales muestran un máximo de absorción a $\lambda = 347$ nm. Como se observa en la Fig. 1.7, LUT es un ácido poliprótico.

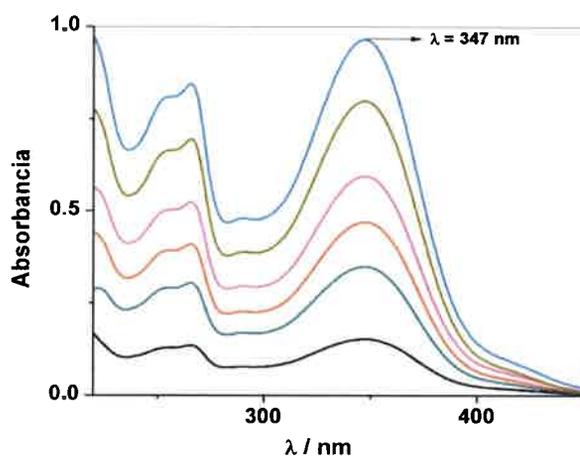


Figura 4.12. Espectros de absorción uv-visible de LUT. c_{LUT}^* : (—) $1,4 \times 10^{-5}$ M; (—) $2,1 \times 10^{-5}$ M; (—) $2,8 \times 10^{-5}$ M; (—) $3,5 \times 10^{-5}$ M; (—) $4,9 \times 10^{-5}$ M; (—) $5,6 \times 10^{-5}$ M; Solvente: solución reguladora de fosfato (pH 4,00). Celda de cuarzo, camino óptico, $b = 1$ cm.

Se encontró que LUT cumple con la ley de Lambert-Beer. El coeficiente de extinción molar (ϵ) determinado a la λ del máximo de absorción fue:

$$\epsilon^{347} = (1,8 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (r = 0,9863)$$

En la Fig. 4.13 se muestran los espectros de absorción de LUT a distintos valores de pH.

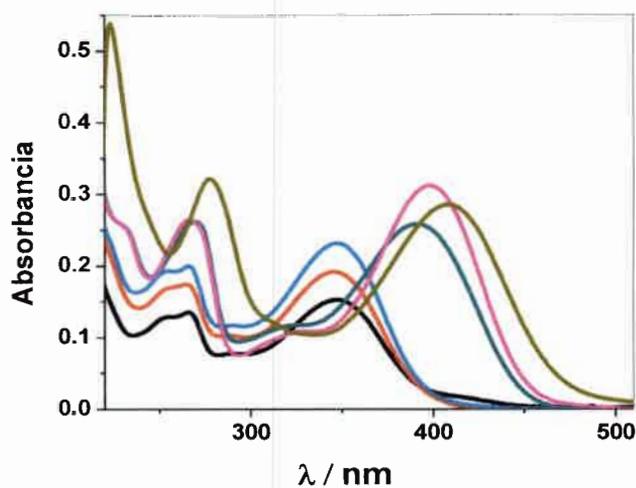


Figura 4.13. Espectros de absorción uv-visible de LUT obtenidos a distintos valores de pH: (—) 1 M HClO₄, (—) 3,09, (—) 6,09, (—) 8,97, (—) 10,92, (—) 1 M KOH, $c_{LUT}^* = 1,40 \times 10^{-5} \text{ M}$.

En la descomposición en valores singulares (SVD) de la matriz de datos experimentales se observó que el número de componentes es igual a tres, lo cual corresponde al número de especies en solución que presentan una contribución relevante, a partir de analizar el cambio que se observa en los espectros de absorción uv-visible con la variación del pH, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que el LUT es también un ácido poliprótico (Fig. 1.7).

Se determinó que en un intervalo de longitudes de onda acotado, entre $\lambda = 410$ y 470 nm el ajuste con el mínimo error se encuentra a $\lambda = 440 \text{ nm}$ (Fig. 4.14).

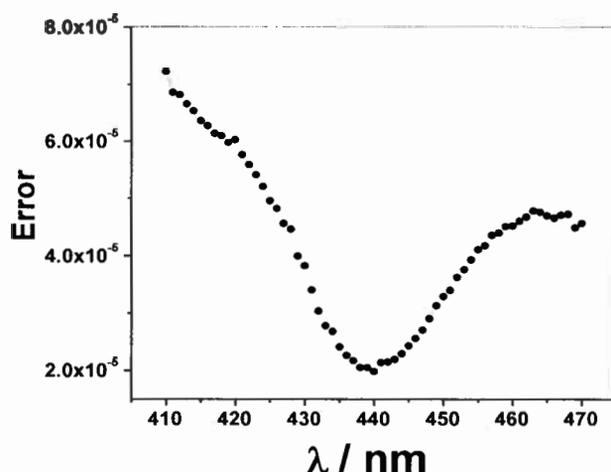


Figura 4.14. Errores de los ajustes experimentales correspondientes a cada longitud de onda en el intervalo entre 410 y 470 nm.

En la Fig. 4.15 se muestra el ajuste de los datos experimentales a la λ que presenta el mínimo error. Se encontró un acuerdo razonable entre la variación experimental de la A vs. pH y la curva generada con los resultados del mejor ajuste.

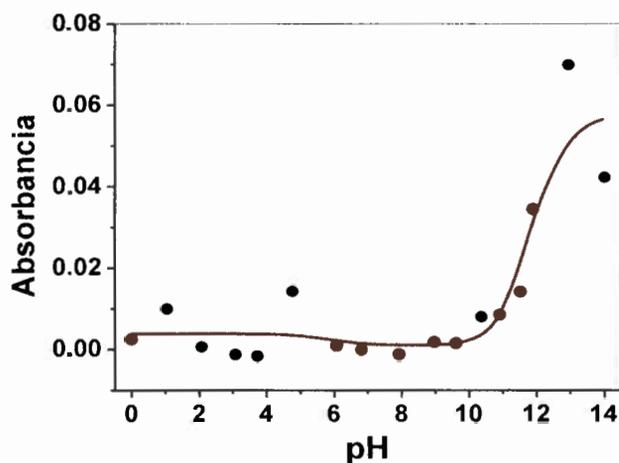


Figura 4.15. Variación de la absorbancia con el pH a $\lambda = 440$ nm. La línea continua representa la curva teórica obtenida mediante el proceso de ajuste. Los círculos representan los datos obtenidos experimentalmente.

En la Tabla 4.3 se muestran los valores obtenidos para las constantes de disociación ácidas aparentes de LUT, como así también los valores de los ϵ de las distintas especies presentes a la λ indicada, obtenidas a través del proceso del mejor

ajuste entre la variación experimental de la A vs. pH y las ecuaciones teóricas que describen el sistema.

Tabla 4.3. Resultados finales del proceso de ajuste. Valores de los ϵ de las diferentes especies a la longitud de onda indicada, como así también de la constantes de disociación ácidas aparentes de LUT.

Parámetros	$\lambda = 440 \text{ nm}$
$\epsilon^\lambda AH_4 / M^{-1}cm^{-1}$	$(1,24 \pm 0,01) \times 10^4$
$\epsilon^\lambda AH_3^- / M^{-1}cm^{-1}$	$(5,70 \pm 0,01) \times 10^3$
$\epsilon^\lambda AH_2^{-2} / M^{-1}cm^{-1}$	$(2,98 \pm 0,01) \times 10^2$
norma del error, $\ e\ $	$1,98 \times 10^{-3}$
K_{a1}	$(1,99 \pm 0,07) \times 10^{-9}$
K_{a2}	$(6,85 \pm 0,05) \times 10^{-13}$

En la Fig. 4.16 se muestra el diagrama de distribución de especies de LUT en función del pH, construido a partir del valor de las constantes de disociación ácidas aparentes (K_{a1} y K_{a2}) obtenidas del mejor ajuste (ver Tabla 4.3).

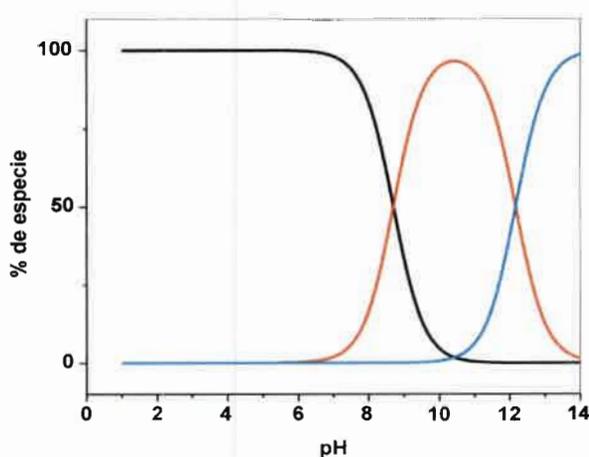


Figura 4.16. Diagrama de distribución de especies de LUT en función del pH; (—) AH_4 , (—) AH_3^- , (—) AH_2^{-2} .

4.1.1.4. Conclusiones

La determinación de las constantes de disociación ácidas aparentes de estos antioxidantes es importante a los efectos de tener conocimiento acerca de las distintas especies presentes en solución a distintos valores de pH.

Si bien las medidas de absorción uv-visible no permiten determinar cuál es el grupo más ácido en cada una de las moléculas, se podría inferir, que el -OH en C3 de MOR (Fig. 1.5) fuese el más ácido, teniendo en cuenta que los dos átomos de O próximos a ese -OH en su estructura molecular estabilizarían por resonancia el correspondiente anión generado, siendo su $K_{a1} = (9,29 \pm 0,01) \times 10^{-6}$, valor que es aproximadamente 8×10^4 veces mayor que la constante de disociación del fenol ($K_{a1} = (1,1 \times 10^{-10})$) (Morrison & Boyd, 1998).

Tanto en el caso de BUT, como el de LUT, la primera constante de disociación ácida aparente podría asignarse a uno de los -OH de la especie resorcinol presente en su estructura molecular (Fig. 1.6), considerando que la constante de acidez del resorcinol ($K_a \approx 3 \times 10^{-10}$) es aproximadamente tres veces más grande que la del catecol ($K_a \approx 1 \times 10^{-10}$) (Morrison & Boyd, 1998).

De todas formas, una asignación, más precisa de la acidez relativa de cada grupo ácido en los tres flavonoides, podría hacerse a través de estudios de espectroscopía NMR a diferentes valores de pH.

4.1.2. Determinación del poder antioxidante a través del método del DPPH

En la Figura 4.17 se muestra un espectro de absorción uv-visible obtenido para una solución del radical DPPH en etanol. Se observa que en la región del visible aparece un máximo de absorbancia a 515 nm. Así, se eligió esa longitud de onda para realizar las medidas espectrofotométricas para determinar la relación EC_{50} "concentración eficiente de antioxidante (AOx) a DPPH" necesaria para causar la pérdida del 50 % de la actividad del radical (Brand-Williams y col., 1995). Mientras menor es el parámetro EC_{50} mayor es la capacidad antioxidante del sustrato estudiado.

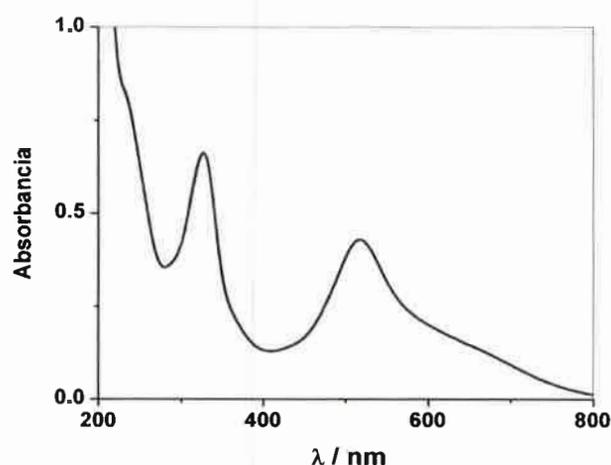


Figura 4.17. Espectros de absorción uv-visible del radical DPPH en etanol, $c_{DPPH}^* = 1,48 \times 10^{-4} M$.

En la Fig. 4.18 se muestra la variación de la absorbancia del radical DPPH en función de su concentración. La misma fue lineal, cumpliendo así con la ley de Lambert-Beer.

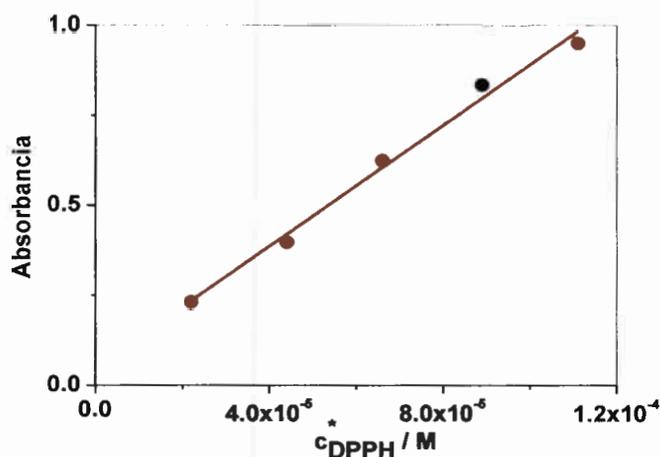


Figura 4.18. Curva de calibración del radical DPPH en etanol a $\lambda = 515 \text{ nm}$. (●) Puntos experimentales, (—) regresión lineal que mejor ajustó los puntos experimentales. c_{DPPH}^* : 1) $2,4 \times 10^{-5} M$, 2) $4,2 \times 10^{-5} M$, 3) $6,6 \times 10^{-5} M$, 4) $9,0 \times 10^{-5} M$ y 5) $1,1 \times 10^{-4} M$.

La ecuación de la recta que mejor ajustó los puntos experimentales fue:

$$A = (8,8 \pm 0,2) \times 10^3 c_{\text{DPPH}}^* \quad (r = 0,9995)$$

De esta manera, el coeficiente de extinción molar (ϵ) determinado a la λ del máximo de absorción fue:

$$\epsilon^{515} = (8,8 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Previo a la determinación de la relación EC_{50} , fue necesario conocer a qué tiempo se debía medir el valor de la absorbancia. Para ello, se realizaron los experimentos correspondientes con el fin de determinar la cinética de reacción de cada flavonoide, partiendo de una relación de concentraciones de AOx a DPPH igual a uno. En la Fig. 4.19 se muestra la cinética de reacción de flavonoide LUT con el radical DPPH. Resultados similares se encontraron para MOR y BUT. Se eligió como tiempo para las medidas de absorbancia uno donde el cambio de absorbancia fuese prácticamente nulo.

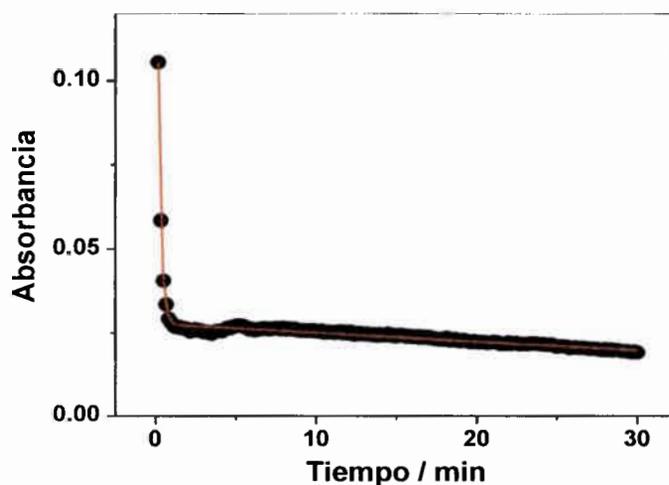


Figura 4.19. Curva de Absorbancia vs tiempo de LUT para una relación $EC_{50} = 1$. (●) Puntos experimentales, (—) regresión no lineal que mejor ajustó los puntos experimentales.

Así, el tiempo de reacción necesarios para efectuar las distintas medidas de absorbancia para cada relación de EC_{50} , en los tres flavonoides, fue de 5 min.

4.1.2.1. Relación EC_{50} para MOR

A partir de una concentración del radical DPPH de a $3,17 \times 10^{-5}$ M, se prepararon soluciones con distintas relaciones de concentraciones de MOR a DPPH. Luego, a estas soluciones se les determinó el valor de absorbancia a 515 nm después de 5 min de reacción.

Como se muestra en la Figura 4.20, la relación de concentraciones necesaria para que la actividad del radical disminuya un 50 % es igual a 0,25 y su inversa, $1/EC_{50} = 4$.

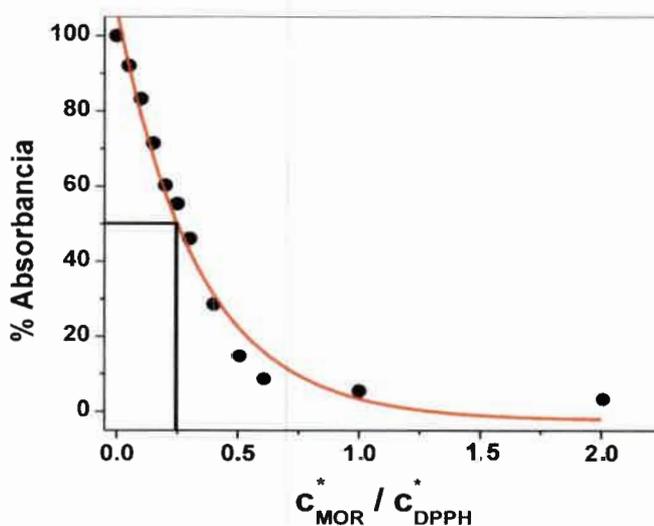


Figura 4.20. Curva de porcentaje de absorbancia vs. la relación de concentraciones MOR/DPPH, determinada a un tiempo de 5 min, $c_{DPPH}^* = 3,17 \times 10^{-5}$ M.

4.1.2.2. Relación EC_{50} para BUT

A partir de una concentración del radical DPPH de $3,17 \times 10^{-5}$ M, se prepararon soluciones con distintas relaciones de concentraciones de BUT a DPPH. Luego, a estas

soluciones se les determinó el valor de absorbancia a 515 nm después de dejarlas reaccionar durante 5 min.

Como se muestra en la Figura 4.21, la relación de concentraciones necesaria para que la actividad del radical disminuya un 50 % es igual a 0,48 y su inversa, $1/EC_{50} = 2,1$.

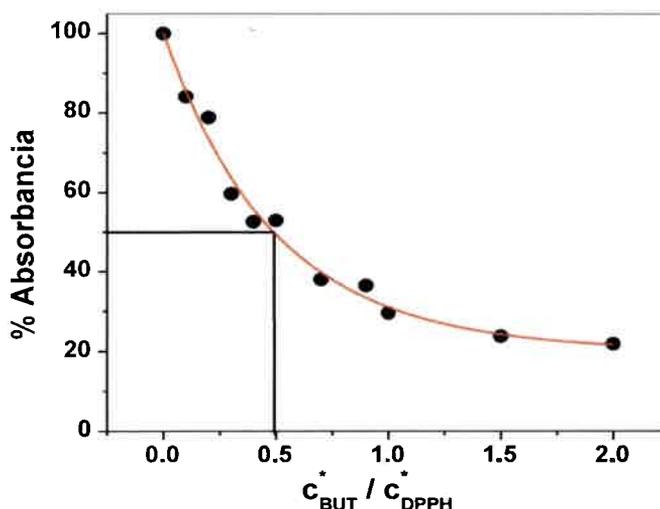


Figura 4.21. Curva de porcentaje de absorbancia vs. la relación de concentraciones BUT/DPPH, determinada a un tiempo en 5 min, $c_{DPPH}^* = 3,17 \times 10^{-5} M$.

4.1.2.3. Relación EC_{50} para LUT

A partir de una concentración del radical DPPH igual a $3,17 \times 10^{-5} M$, se prepararon soluciones con distintas relaciones de concentraciones de LUT a DPPH. Luego, a estas soluciones se les determinó el valor de absorbancia a 515 nm después de 5 min de reacción.

Como se muestra en la Figura 4.22, la relación de concentraciones necesaria para que la actividad del radical en disminuya un 50 % es igual a 0,22 y su inversa, $1/EC_{50} = 4,5$.

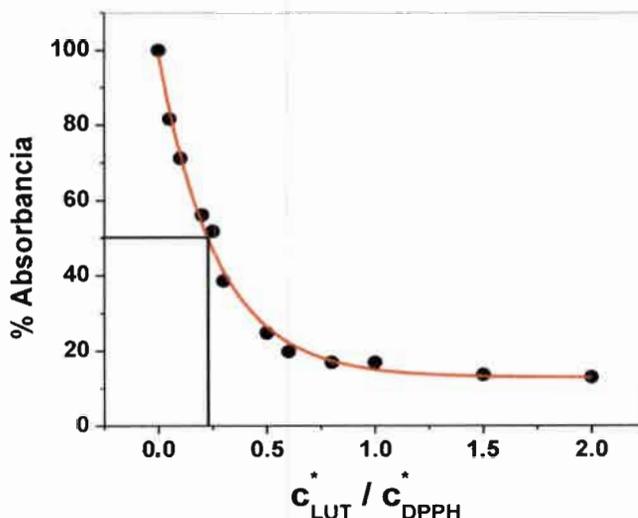


Figura 4.22. Curvas de porcentaje de absorción vs relación de concentraciones LUT/DPPH, determinada a un tiempo = 5 min, $C_{DPPH}^* = 3,17 \times 10^{-5} M$.

4.1.2.4. Conclusiones

A partir de estos estudios se puede concluir que la capacidad antioxidante de los tres compuestos estudiados, calculada a través del método del radical DPPH, tiene el siguiente orden: LUT>MOR> BUT, siendo sus valores de EC50 de 0,22; 0,25 y 0,48, respectivamente.

4.2. Estudios electroquímicos

4.2.1. Morina

4.2.1.1. Pre-tratamiento del electrodo de trabajo

El electrodo de trabajo, previo a su uso se sometió a distintos pre-tratamientos:

- 1) Se pulió, sobre un paño, sucesivamente con polvo de alúmina de 0,3 y 0,05 μm (Fischer), luego se enjuagó copiosamente con agua (SINTORGAN, calidad HPLC) y se le aplicó ultrasonido en un baño de agua de la misma calidad durante 2 min.

- 2) Inmediatamente después de aplicar el procedimiento descrito en (1), se lo activó electroquímicamente según un método descrito en la literatura (Anjo y col., 1989) y luego, se enjuagó con agua, calidad HPLC.
- 3) Después de aplicar el procedimiento (1) se lo sumergió en una solución de blanco y se cicló 5 veces entre -0,5 y 1,0 V mediante voltamperometría cíclica (VC).

En las Figs. 4.22 a, b, c y d se muestran las variaciones de $I_{p,a}$ y $E_{p,a}$ obtenidas para la oxidación anódica de MOR, según el pre-tratamiento aplicado al electrodo de trabajo, previo a cada experiencia.

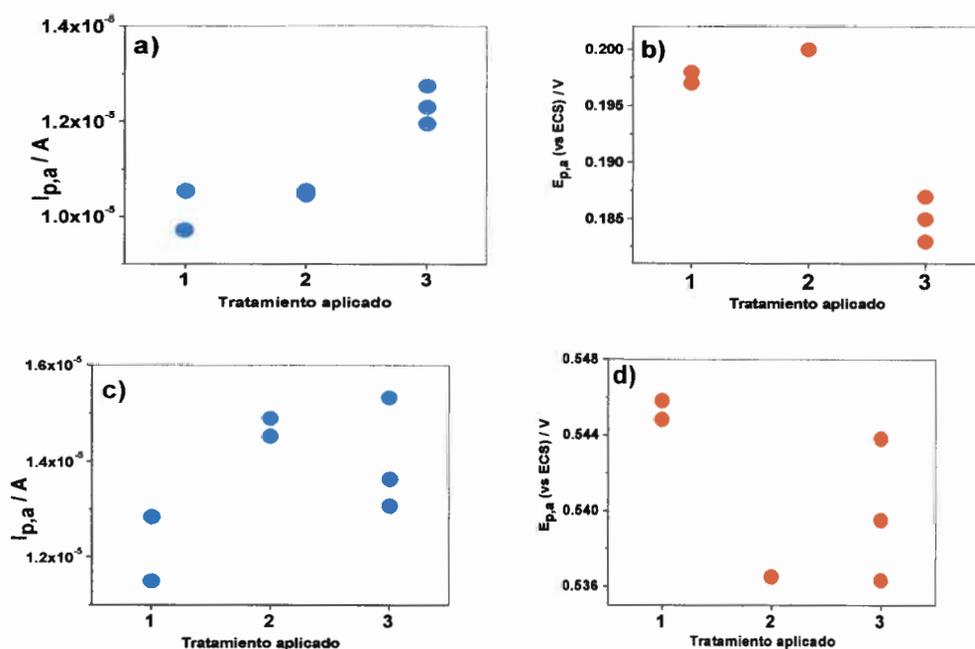


Figura 4.22. $I_{p,a}$ y $E_{p,a}$ obtenidos para la oxidación electroquímica de MOR vs. el pre-tratamiento aplicado al electrodo de trabajo. Medio de reacción: **a** y **b**: solución reguladora de fosfatos 0,2 M (pH 7,00). **c** y **d**: 1M HClO₄ acuoso. $c_{MOR}^* = 8,30 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹.

Tanto en el medio de reacción formado por la solución reguladora de fosfatos 0,2 M (pH 7,00) como en el medio de reacción formado por 1 M HClO₄ acuoso, el tratamiento que genera una superficie de electrodo más electrocatalítica fue, en principio, el método 3, donde se observa una mayor corriente y un menor sobre

potencial, a pesar de que es el método que muestra la mayor dispersión. Así, el método 3 es el que se aplicó al electrodo de trabajo en los experimentos electroquímicos que se describen a continuación.

4.2.1.2. Cronoamperometría de doble pulso de potencial

Con la finalidad de calcular el valor del coeficiente de difusión de MOR (D_{MOR}), se realizaron experimentos de cronoamperometría de doble pulso de potencial (CCDPP) en soluciones de MOR a altas concentraciones, se utilizó como potencial inicial $E_i = -0,43$ V y como potencial final (o de inversión) $E_f = 0,45$ V. Estos potenciales fueron elegidos en base a voltamperogramas cíclicos realizados previamente. Haciendo uso de la expresión de la carga total, (ec. 4.1, Bard & Faulkner, 2001), se pudo determinar dicho valor y, además, como propiedad exclusiva de esta técnica, se determinó también el valor del coeficiente de difusión de la especie reducida (D_{RED})

$$Q_T = 2nFAcD^{1/2}\pi^{-1/2}t^{1/2} + Q_{dc} + Q_{ads} \quad (4.1)$$

Donde Q_{dc} es la carga de la doble capa y Q_{ads} es la carga faradaica asociada a la oxidación de MOR adsorbida sobre la superficie del electrodo ($nF\Gamma$).

Los valores experimentales obtenidos para los correspondientes coeficientes de difusión, considerando $n = 1$ fueron:

$$D_{MOR} = (1,66 \pm 0,01) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$D_{RED} = (1,54 \pm 0,01) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

La técnica de CCDPP se empleó además para calcular el recubrimiento superficial (Γ) y el cargado de la doble capa eléctrica (Q_{dc}) en presencia del proceso adsorptivo. En este caso, las experiencias se realizaron utilizando, un tiempo de pulso (τ) del experimento muy corto y una concentración de MOR baja, para lograr minimizar la cinética homogénea acoplada a la transferencia de carga inicial. Las siguientes ecuaciones se utilizaron para calcular dichos parámetros (Christie y col., 1967).

$$nF\Gamma = (Q - Q_r) / (1 - a_0) \quad (4.2)$$

$$Q_{dc} = (Q_r - a_0 Q) / (1 - a_0) \quad (4.3)$$

donde $^{\circ}Q$ es la ordenada al origen de gráficos de Q_d (carga directa) vs. $t^{1/2}$ y $^{\circ}Q_r$ es la ordenada al origen de gráficos de Q_r (carga inversa) vs. θ ($\theta = [\sqrt{t - \tau} + \sqrt{\tau} - \sqrt{t}]$) y $a_0 = -0,0688$ (Christie y col., 1967).

Para una $c_{MOR}^* = 5,0 \times 10^{-6}$ M, a partir de tres medidas experimentales, se obtuvieron los siguientes resultados:

$$\text{para } \tau = 20 \text{ ms } ^{\circ}Q = (0,91 \pm 0,02) \times 10^{-6} \text{ C y}$$

$$^{\circ}Q_r = (5,23 \pm 0,03) \times 10^{-7} \text{ C}$$

$$\text{para } \tau = 50 \text{ ms } ^{\circ}Q = (1,03 \pm 0,02) \times 10^{-6} \text{ C y}$$

$$^{\circ}Q_r = (7,74 \pm 0,02) \times 10^{-7} \text{ C}$$

de donde se determinaron los siguientes valores promedios para Γ y para Q_{dc} por unidad de área:

$$\Gamma = (1,6 \pm 0,4) \times 10^{-12} \text{ moles cm}^{-2}$$

$$Q_{dc} = (9,9) \mu\text{C cm}^{-2}$$

Estos valores estarían indicando que estamos en presencia de una sub-monocapa de reactivo adsorbido. El valor de Q_{dc} concuerda razonablemente bien con valores los informados en la literatura para este tipo de electrodos (Bard & Faulkner, 2001).

Finalmente, a través de esta técnica y haciendo uso de un gráfico de Q_r/Q_d vs. $\log(\tau^{1/2})$ (Fig. 4.23) se logra ver claramente que el proceso de electrodo es sumamente complejo, el cual involucra (Christie y col., 1967):

- a) **Una reacción Química acoplada a la transferencia de carga**, ya que disminuye la Q_r a medida que el tiempo de pulso es mayor.
- b) **Adsorción del reactivo**, lo cual se puede inferir, a partir de las desviaciones positivas observadas en los tiempos de pulso más pequeños, antes de que la reacción química acoplada a la transferencia de carga inicial se ponga de manifiesto.

Un sistema difusional, y sin cinética acoplada a la transferencia de carga, generaría un gráfico de Q_r/Q_d vs. $\log(\tau^{1/2})$ constante con $Q_r/Q_d = 0,5858$ (Christie y col., 1967).

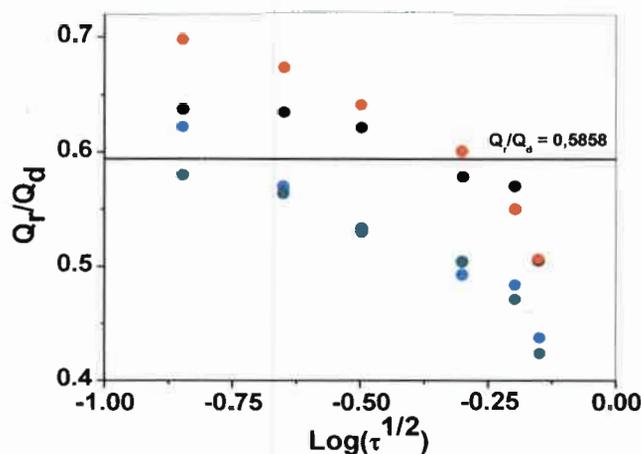


Figura 4.23. Gráficos de Q_r/Q_d vs. $\log(\tau^{1/2})$ a distintas concentraciones de MOR. c_{MOR}^* (●) $5,00 \times 10^{-6}$ M, (●) $1,00 \times 10^{-5}$ M, (●) $5,00 \times 10^{-5}$ M, (●) $1,00 \times 10^{-4}$ M.

4.2.1.3. Voltamperometría Cíclica

En la Fig. 4.24 se muestra un voltamperograma cíclico de MOR sobre el electrodo de CV a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ en una ventana de potencial de -1,20 a 1,20 V (vs. ECS). Dicho voltamperograma pone en evidencia que MOR es factible de ser oxidada electroquímicamente, presentando dos picos de oxidación, uno bien definido centrado en 0,24 V y otro, pobremente definido, centrado aproximadamente en 0,80 V, en solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7,00.

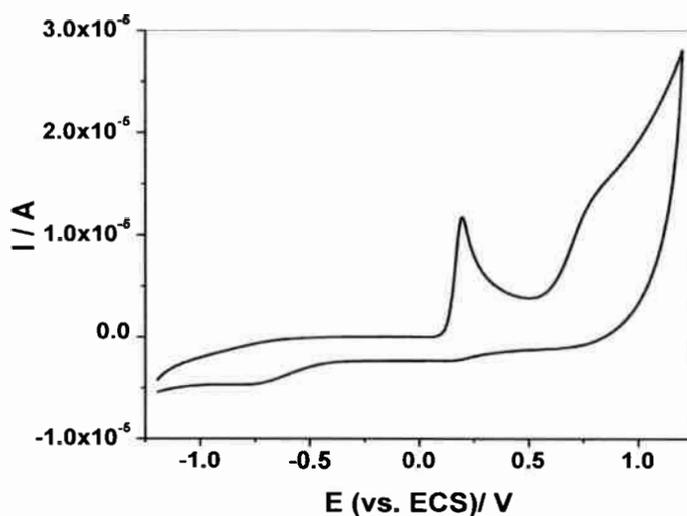


Figura 4.24. Voltamperograma cíclico obtenido para la oxidación de MOR en solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7,00. $c_{MOR}^* = 8,30 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹. $T = 25^\circ\text{C}$.

En la Fig. 4.25 se muestran voltamperogramas cíclicos realizados uno a continuación del otro, en donde se puede observar cómo se pierden por completo, en los barridos sucesivos, las señales electroquímicas que aparecen durante el primer ciclo.

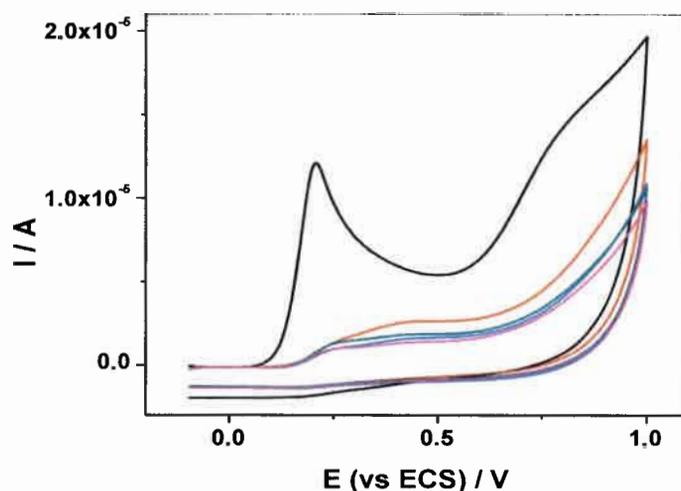


Figura 4.25. Voltamperogramas cíclicos para la oxidación de MOR registrados uno a continuación del otro, en las mismas condiciones experimentales que en la Fig. 4.24 pero en un intervalo de potenciales entre -0,100 y 1,000 V (vs. ECS).

Es bien conocido que la oxidación de los compuestos fenólicos pueden, en algunos casos generar polímeros no conductores que envenenan o pasivan la superficie del electrodo (Baizer & Lund, 1991). Así, la disminución en la intensidad de la corriente en los barridos sucesivos podría deberse a la formación de dichos polímeros, lo que impide la transferencia electrónica desde la especie electroactiva hacia el electrodo. En la Fig. 4.26 se muestra el mecanismo de reacción comúnmente aceptado para la oxidación de los compuestos fenólicos (Baizer & Lund, 1991), donde los compuestos III y/o IV son los responsables de generar los polímeros mencionados previamente.

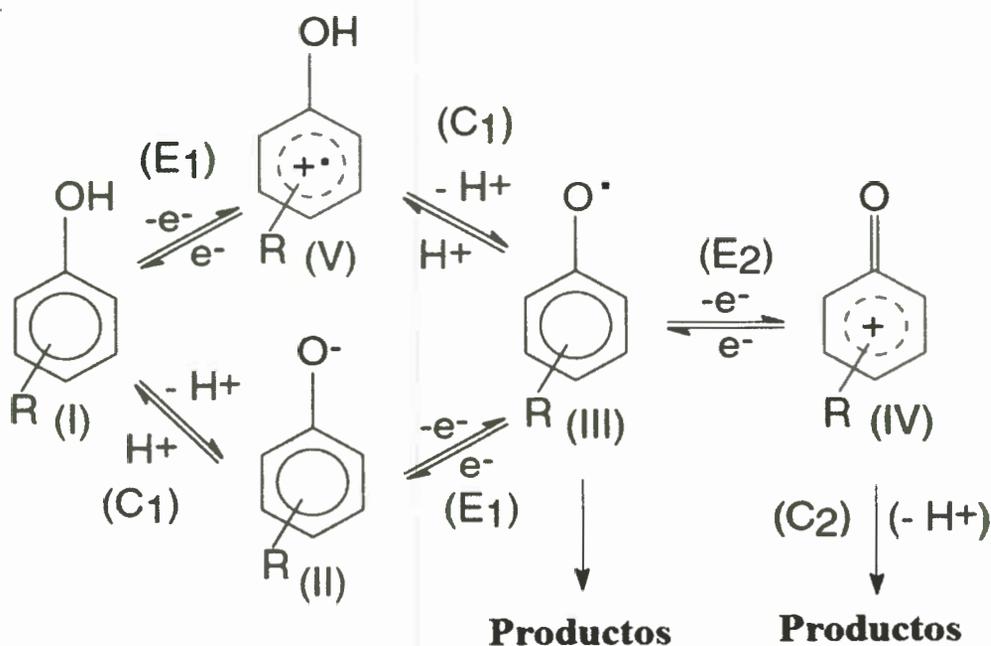


Figura 4.26. Mecanismo de oxidación anódica de fenoles simples sustituidos.

Considerando el comportamiento electroquímico de MOR observado en la ventana amplia de potencial, se decidió realizar su estudio, en un intervalo de potenciales acotado, desde -0,1 a 0,5 V, con el objetivo de que la pasivación de la superficie del electrodo fuese la menor posible (Fig. 4.27).

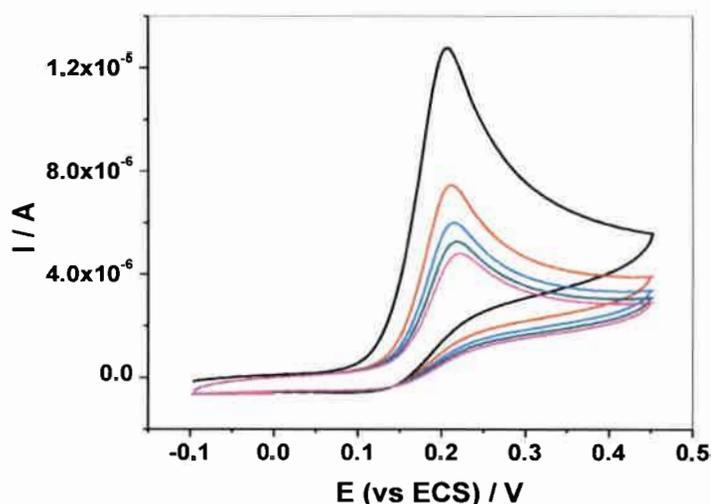


Figura 4.27. Voltamperogramas cíclicos para la oxidación de MOR registrados uno a continuación del otro, en las mismas condiciones que en la Fig. 4.24, pero en una ventana de potencial menor, de -0,100 a 0,500 V.

En las Figs. 4.28 a y b se puede observar la variación del $E_{p,a}$ y de la $I_{p,a}$ con el incremento del número de barridos realizados. En el primer caso, se observa una tendencia lineal, con un cambio de 0,008 V por cada nuevo barrido realizado. En el segundo caso, puede notarse, como la $I_{p,a}$ experimenta un decaimiento exponencial, disminuyendo a la mitad de su valor inicial aproximadamente en el quinto barrido. Es por ello que, para todos los estudios posteriores, se utilizó sólo el primer ciclo.

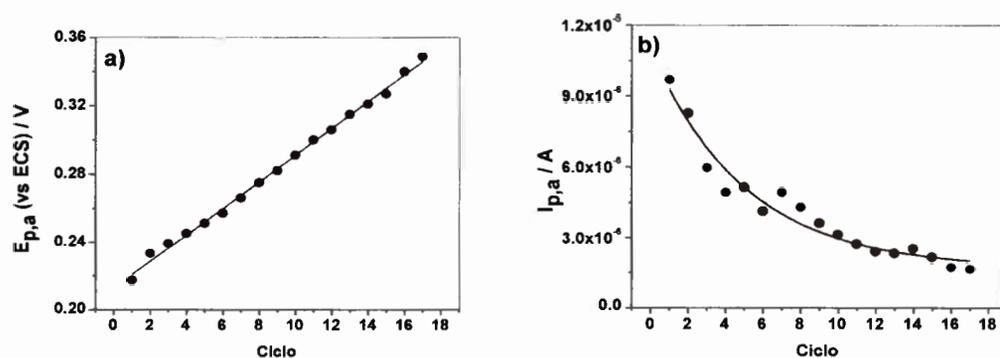


Figura 4.28. Variaciones de a) $E_{p,a}$ y b) $I_{p,a}$ con el incremento del número de barridos. Solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7,00. $c_{MOR}^* = 8,30 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹. $T = 25^\circ\text{C}$.

Se realizaron estudios de voltamperometría cíclica, en donde se varió la velocidad de barrido (Fig. 4.29), con los cuales se construyeron gráficos de $I_{p,a}$ vs. $v^{1/2}$, los cuales pudieron ser ajustados con una regresión lineal, con $r = 0,9885$ y una pendiente de $(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$. Lo mismo pudo hacerse, para gráficos de $I_{p,a}$ vs. v , en donde los valores del ajuste lineal fueron: $r = 0,9950$ y pendiente de $(8,2 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1} \text{ s}$. Ambas correlaciones estarían indicando que estamos ante la presencia de un proceso de electrodo sujeto a un control mixto: difusional y adsorptivo, tal como se discute más adelante

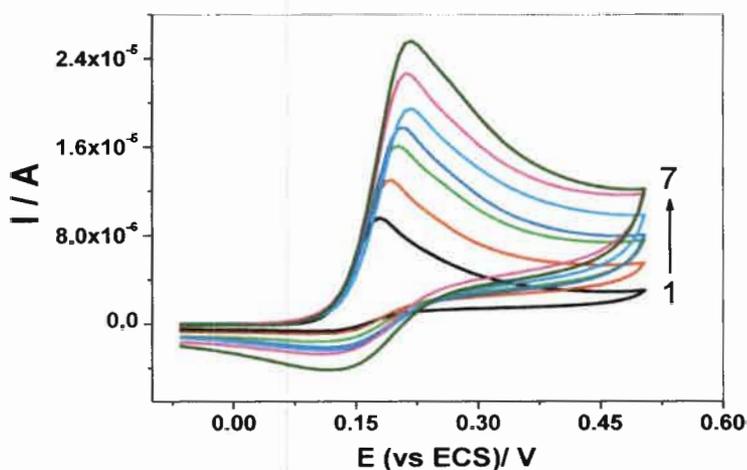


Figura 4.29. Respuestas corriente-potencial obtenidas a diferentes v (en V s^{-1}) 1) 0,025; 2) 0,050; 3) 0,075; 4) 0,100; 5) 0,125; 6) 0,150; 7) 0,200. Solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7,00. $c_{\text{MOR}}^* = 8,30 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Al aumentar la concentración de MOR ($c_{\text{MOR}}^* = 2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$) se observó un cambio en el comportamiento electroquímico. Como se puede ver en la Fig. 4.30a, en un gráfico de $I_{p,a}$ vs. $v^{1/2}$ los puntos experimentales pudieron ser ajustados con una regresión lineal con $r = 0,9885$ y pendiente de $(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$. A su vez, los valores experimentales, en un gráfico de $I_{p,a}$ vs. v no pudieron ser ajustado con la ecuación de una recta (Fig. 4.30b).

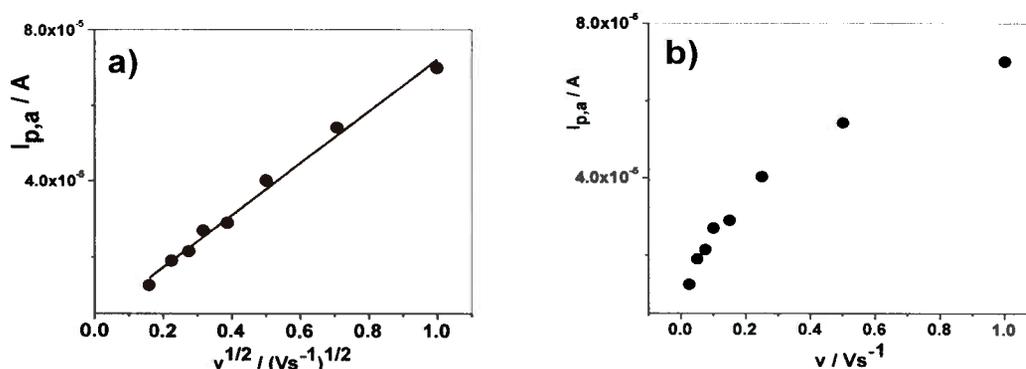


Figura 4.30. Gráficos de a) $I_{p,a}$ vs. $v^{1/2}$ y b) $I_{p,a}$ vs. v . Solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7,00. $c_{MOR}^* = 2,00 \times 10^{-3}$ M.

Considerando, que el proceso de electrodo muestra un control mixto, difusión/adsorción, se analizaron los datos obtenidos en las experiencias de voltamperometría cíclica, observando la dependencia de la $I_{p,a}$ con v , con el fin de poder separar las contribuciones a la señal electroquímica, tanto por el sustrato adsorbido sobre la superficie del electrodo, como por el que llega a la superficie del electrodo desde el seno de la solución por difusión (Conway & Kannangara, 1987). La diferenciación de estas contribuciones, se puede expresar matemáticamente como:

$$I_{p,a} = k_1 v + k_2 v^{1/2} \quad (4.4)$$

en donde:

$$k_1 = \frac{n^2 F^2}{4RT} \Gamma A \quad \text{y} \quad k_2 = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} D^{1/2} c^* A$$

reordenando la ec. (4.4)

$$\frac{I_{(p,a)}}{v^{1/2} A} = k_1 v^{1/2} + k_2 \quad (4.5)$$

Así, a partir de gráficos de $I_{p,a}v^{-1/2}A^{-1}$ vs. $v^{1/2}$ se pudieron obtener los valores, tanto de k_1 como de k_2 y, con ellos, los valores de la concentración superficial del sustrato (Γ) y del coeficiente de difusión (D), respectivamente.

Este estudio se realizó para tres concentraciones de MOR y a una temperatura de 25 °C. En la Fig. 4.31 se puede observar el gráfico correspondiente y en la Tabla 4.4 el resumen de los datos obtenidos del mismo.

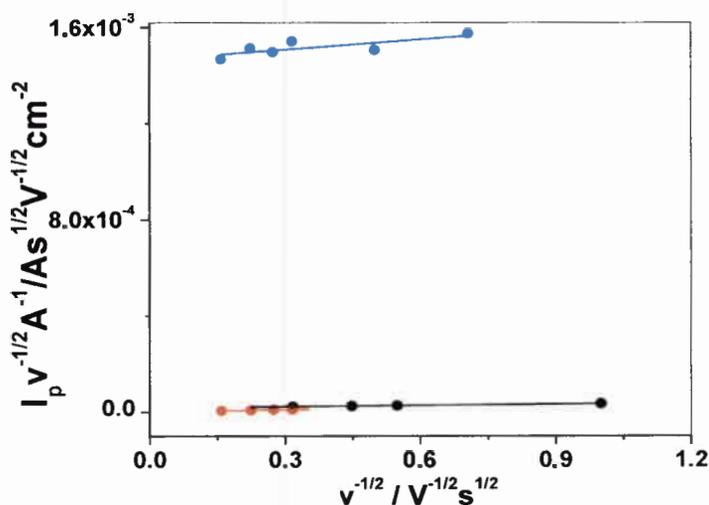


Figura 4.31. Gráficos de $I_{p,a}v^{-1/2}A^{-1}$ vs. $v^{1/2}$ para diferentes c_{MOR}^* : (●) $2,0 \times 10^{-3} M$, (●) $2,0 \times 10^{-6} M$ y (●) $1,0 \times 10^{-6} M$.

Tabla 4.4. Valores de k_1 , k_2 , Γ y D para diferentes concentraciones de morina (c_{MOR}^*).

$c_{MOR}^*(M)$	$k_1 (As V^{-1} cm^{-2})$	$k_2 (A s^{1/2} V^{-1/2} cm^{-2})$	$\Gamma (mol cm^{-2})$	$D (cm^2 s^{-1})$
$1,0 \times 10^{-6}$	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(3,1 \pm 0,8) \times 10^{-7}$	$3,5 \times 10^{-12}$	$4,5 \times 10^{-4}$
$2,0 \times 10^{-5}$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-12}$	$1,1 \times 10^{-5}$
$2,0 \times 10^{-3}$	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$(14,6 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-10}$	$7,3 \times 10^{-6}$

En concentraciones bajas, se encontraron valores de Γ correspondientes a los valores típicos de una sub-monocapa. A la concentración más alta se obtuvo un valor similar a los informados para concentraciones superficiales de monocapas de moléculas con estructuras afines a MOR (Bard & Faulkner, 2001).

En cuanto a la determinación de D , se encontraron valores concordantes con los informados para moléculas de estructura química similares a éstas, sólo a altas concentraciones del sustrato en estudio, lo cual tiene sentido físico, ya que como se mencionó anteriormente, el proceso de electrodo posee un control mixto: difusional y adsorptivo. De ambas contribuciones, el aporte difusional se pone de manifiesto en mayor extensión a altas concentraciones, mientras que el aporte adsorptivo a bajas concentraciones del sustrato (Bard & Faulkner, 2001). Se encontró también que los valores de D obtenidos mediante esta nueva metodología son similares a los obtenidos previamente por otras técnicas electroquímicas, como cronoamperometría ($D_{\text{MOR}} = (1,66 \pm 0,01) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) y voltamperometría de convolución ($D_{\text{MOR}} = (6,4 \pm 0,4) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), como se describe más adelante.

4.2.1.3.1. Estudios controlados principalmente por difusión

A efectos de estudiar el comportamiento electroquímico de MOR en condiciones controladas, fundamentalmente, por difusión, se realizó luego de cada voltamperograma cíclico registrado en la solución de MOR, otro bajo las mismas condiciones experimentales, pero en la solución del blanco, a fin de poder restarlos y eliminar así la contribución de la adsorción. En la Fig. 4.32a se pueden observar los tres voltamperogramas cíclicos registrados para cada experiencia. En la Fig. 4.32b se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados a distintas v , siguiendo el procedimiento descrito previamente. Los valores experimentales, representados en un gráfico de $I_{p,a}$ vs. $v^{1/2}$ pudieron ser ajustados con una regresión lineal ($r = 0,9962$).

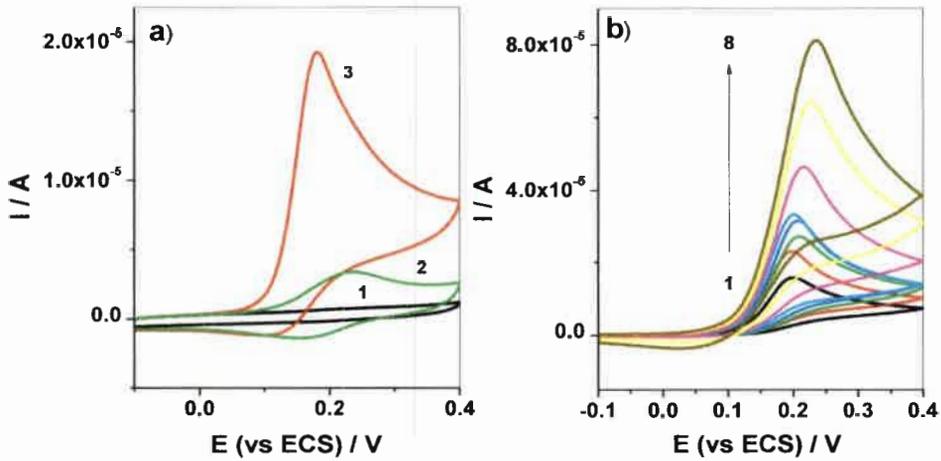


Figura 4.32. Respuestas corriente-potencial **a)** en solución del blanco (1), en solución del blanco posterior a la adsorción de MOR (2), en solución de MOR (3). $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. $c_{MOR}^* = 8,30 \times 10^{-4} \text{ M}$. **b)** Obtenidas con el procedimiento descrito previamente, a diferentes v (en V s^{-1}), 1) 0,025; 2) 0,050; 3) 0,075; 4) 0,100; 5) 0,150; 6) 0,250; 7) 0,500 8) 1,000. Solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7,00. $c_{MOR}^* = 2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Una vez obtenidos los voltamperogramas cíclicos controlados, fundamentalmente, por difusión, éstos se convolucionaron (Fig. 4.33).

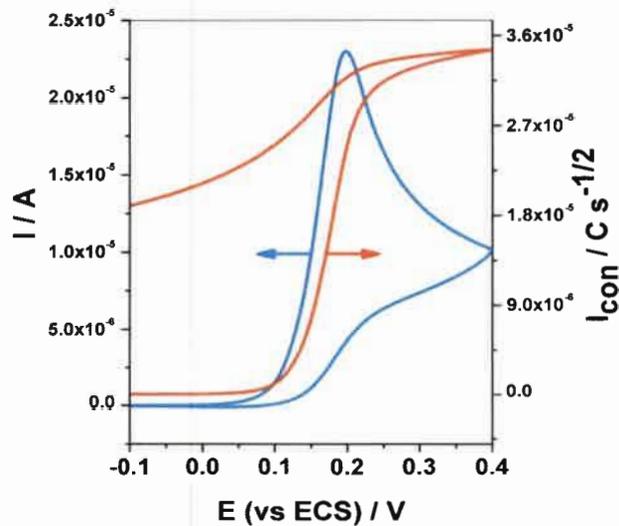


Figura 4.33. (-) Voltamperograma cíclico de MOR. $c_{MOR}^* = 2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. (-) Correspondiente voltamperograma cíclico convolucionado.

A partir de la expresión de la corriente límite convolucionada. (Bard & Faulkner, 2001) se obtuvo, en el intervalo de velocidades de barrido entre 0,025 y 0,100 $V s^{-1}$, el siguiente valor promedio para el coeficiente de difusión de MOR:

$$\bar{D}_{MOR} = (6.4 \pm 0.4) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \quad (\text{considerando } n = 1)$$

Este valor concuerda razonablemente bien con el determinado previamente por CCDPP y de gráficos de $I_{p,a} v^{-1/2} A^{-1}$ vs. $v^{1/2}$. En la Fig. 4.34 se muestra un gráfico de E vs. $\log((I_L - I)/I)$. Tal como se predice teóricamente para un sistema EQ (electroquímico-químico) (Imbeaux & Saveant, 1973) la pendiente de dicho gráfico permite inferir el número de electrones intercambiados en el proceso de electrodo, (pendiente teórica = $59/n$ mV/década a $25^\circ C$) (Imbeaux & Saveant, 1973). Los resultados obtenidos experimentalmente de la regresión lineal fueron, ordenada = $(0,1733 \pm 0,0001)$; pendiente = $-(0,0572 \pm 0,0002)$; $r = (0,9999 \pm 0,0001)$. Así del valor de la pendiente se puede inferir que el número de electrones intercambiados sería igual a uno.

En la Fig. 4.34b se muestra un voltamperograma cíclico de MOR a una velocidad mayor ($v = 0,500 V s^{-1}$), donde claramente se puede observar la definición del pico catódico complementario del pico de oxidación principal.

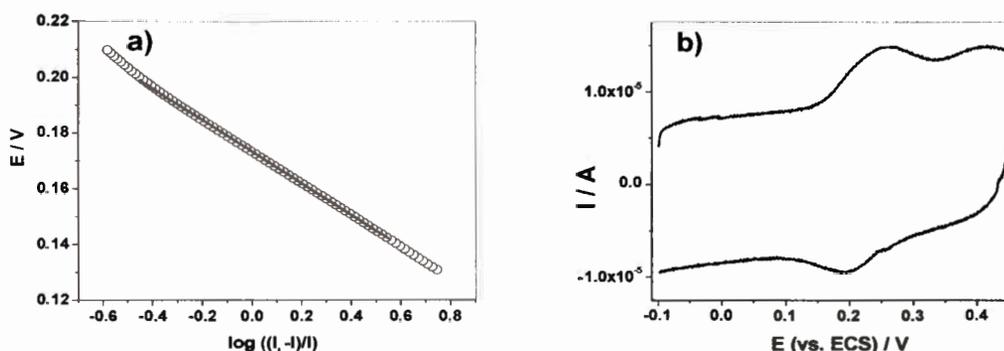


Figura 4.34. a) Gráfico de E vs. $\log((I_L - I)/I)$. (\circ) Valores experimentales (-) Regresión lineal que ajusta los puntos experimentales. $c_{MOR}^* = 2,00 \times 10^{-3} M$, $v = 0,050 V s^{-1}$, $T = 25^\circ C$. **b)** Voltamperograma cíclico en solución de MOR a alta velocidad de barrido ($v = 0,500 V s^{-1}$). $c_{MOR}^* = 2,00 \times 10^{-5} M$.

Además, de la expresión de la función corriente (Bard & Faulkner, 2001):

$$\Psi = \frac{i}{C A F n^{3/2}} \quad (4.6)$$

se obtuvo un valor promedio de Ψ , en el intervalo de velocidades de barrido entre 0,025 y 0,100 $V s^{-1}$ de $(0,71 \pm 0,01)$, lo cual se corresponde con un proceso monoelectrónico. Además, se obtuvieron valores de $\partial E_{p,a} / \partial \log v = (0,022 \pm 0,004) V$ y $\partial E_{p,a} / \partial \log (c_{MOR}^*) = (0,024 \pm 0,002) V$ (Figs 4.35a y b).

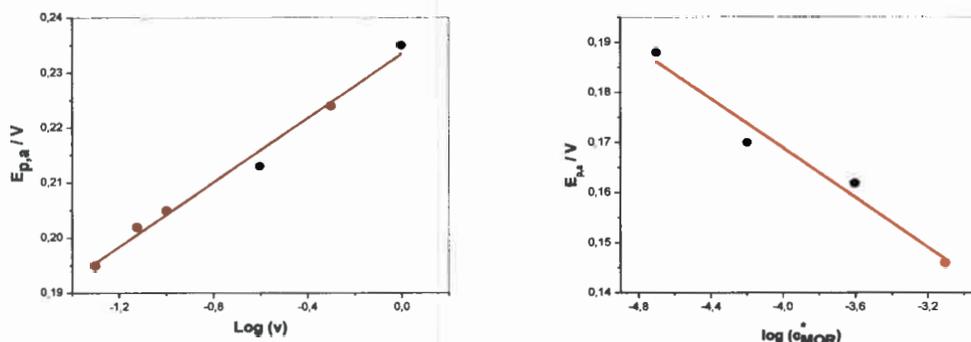


Figura 4.35. $E_{p,a}$ vs. $\log(v)$ y $E_{p,a}$ vs. $\log(c_{MOR}^*)$ (●) valores experimentales, (-) ajuste lineal de los puntos experimentales. $c_{MOR}^* = 2,00 \times 10^{-3} M$, $v = 0,050 V s^{-1}$.

En base a los resultados anteriores se propone que la especie responsable del primer pico de oxidación de MOR es el $-OH$ de C3 (Fig. 1.5), mientras que el segundo pico correspondería a la oxidación de las especies resorcinol (Baizer & Lund, 1991).

La reacción química acoplada a la transferencia de carga inicial es lenta, ya que a relativamente bajas velocidades de barrido y a bajas c_{MOR}^* , la cupla redox muestra un comportamiento cuasi-reversible.

Por otro lado, se estudió la respuesta electroquímica de MOR a diferentes valores de pH. En la Fig. 4.36 se puede observar la variación de los voltamperogramas cíclicos que se obtienen al variar el pH. En la Figs. 4.37 a y b se observa la dependencia de la $I_{p,a}$ y de $E_{p,a}$ con respecto al pH. De las Figs. 4.36 y 4.37a se desprende que la corriente obtenida pasa por un máximo cuando el pH de la solución reguladora es aproximadamente 7,00, el cual fue el valor de pH elegido para realizar los estudios posteriores.

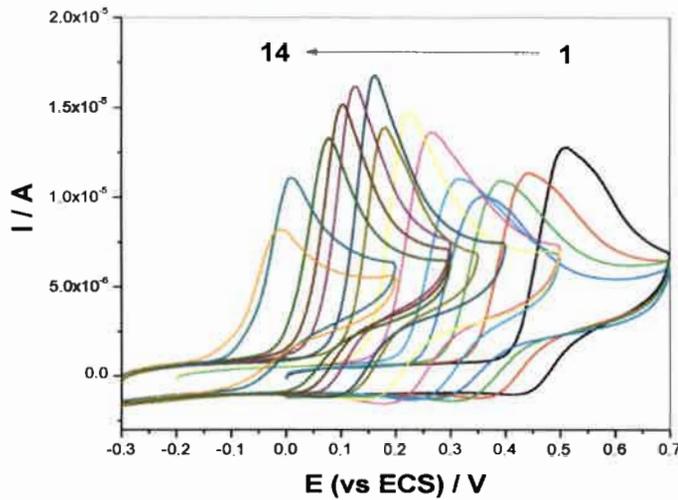


Figura 4.36. Respuestas corriente-potencial en soluciones reguladoras de fosfatos a diferentes valores de pH 1) 1.26, 2) 2.33, 3) 3.35, 4) 4.00, 5) 4.91, 6) 5.80, 7) 6.51, 8) 7.00, 9) 7.52, 10) 8.27, 11) 9.12, 12) 10.07, 13) 11.00, 14) 11.90. $v = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$. $c_{\text{MOR}}^* = 8,30 \times 10^{-4} \text{ M}$.

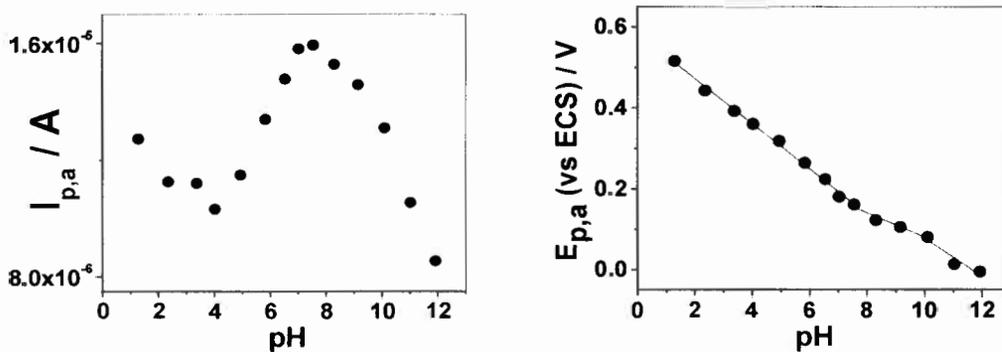


Figura 4.37. Variaciones de a) $I_{p,a}$ y b) $E_{p,a}$ con el pH $v = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$.

$$c_{\text{MOR}}^* = 8,30 \times 10^{-4} \text{ M}$$

En la Fig. 4.37b se observa que $E_{p,a}$ varía con el pH y que esta relación se puede ajustar a través de tres rectas, la primera, en el intervalo de pH de 0 a 7, con una pendiente de $(-0,054 \pm 0,002) \text{ V/unidad de pH}$, la segunda, en el intervalo de pH de 7 a 10, con una pendiente de $(-0,030 \pm 0,005) \text{ V/unidad de pH}$ y la tercera, en el intervalo de

pH de 10 a 12, con una pendiente de $(-0,049 \pm 0,015)$ V/unidad de pH). De las intersecciones de estas rectas, se puede estimar los valores de los dos últimos pK_a de MOR, los cuales son 7,5 y 10, y concuerdan razonablemente bien con los calculados previamente con el método espectroscópico (Capítulo 4 - Sección 4.1.1.). Durante la oxidación y/o reducción de compuestos orgánicos en solventes próticos, como el agua, la transferencia electrónica suele estar frecuentemente acompañada de transferencias protónicas. Como se espera, el potencial de media onda dependerá del pH del medio y, a partir de un gráfico de $E_{1/2}$ (o $E_{p,a}$) vs. pH se pueden determinar los valores de pK_a 's del sistema, si dichos valores están dentro del intervalo de pH estudiado. Así, cuando el pH del medio iguala a un valor de pK_a , la pendiente del gráfico $E_{1/2}$ (o $E_{p,a}$) vs. pH cambia (Heyrovský & Vavříčka, 1972).

4.2.1.2.2. Estudios controlados principalmente por adsorción

Cuando se disminuyó la concentración de MOR, se observó un cambio en la respuesta electroquímica del sistema. Este pasó de un control, fundamentalmente, difusional a uno, predominantemente, adsorptivo. Además, como se puede observar en la Fig. 4.38, el sistema mostró una mayor reversibilidad.

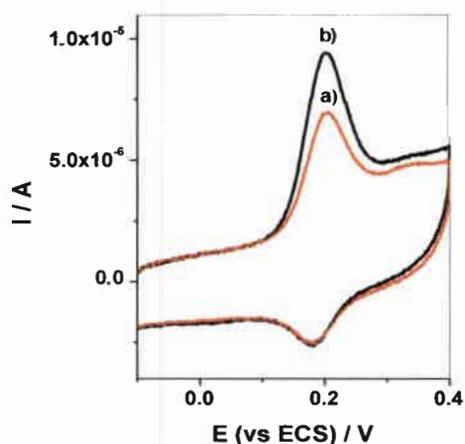


Figura 4.38. Respuesta corriente-potencial *a)* en solución del blanco después de registrar el voltamperograma en solución de MOR y *b)* en solución de MOR $v = 0,500$ $V s^{-1}$. $c_{MOR}^* = 2,00 \times 10^{-5} M$.

Como se puede observar en la Fig. 4.38, el perfil corriente-potencial tanto en presencia de MOR como en la solución del blanco se corresponde con aquel esperado teóricamente para una cupla redox superficial cuasi-reversible (Bard & Faulkner, 2001).

En la Fig. 4.39a se muestra como varía el área debajo del pico voltamperométrico de oxidación en función del potencial aplicado (E_{ac}) al electrodo de trabajo para estudiar la pre-concentración de MOR sobre electrodos de CV. Se observa que la mayor área se obtiene con un $E_{ac} = -0,43$ V, el cual, en las medidas posteriores es remplazado por $E_{ac} = -0,1$ V, ya que la diferencia entre estos potenciales no es significativa y además, este último potencial coincide con el potencial inicial del barrido voltamperométrico.

En la Fig. 4.39b se puede observar la variación de la $I_{p,a}$ con respecto al t_{ac} a diferentes temperaturas, con lo cual se puede afirmar que el proceso de adsorción de MOR sobre el electrodo de CV es un proceso endotérmico.

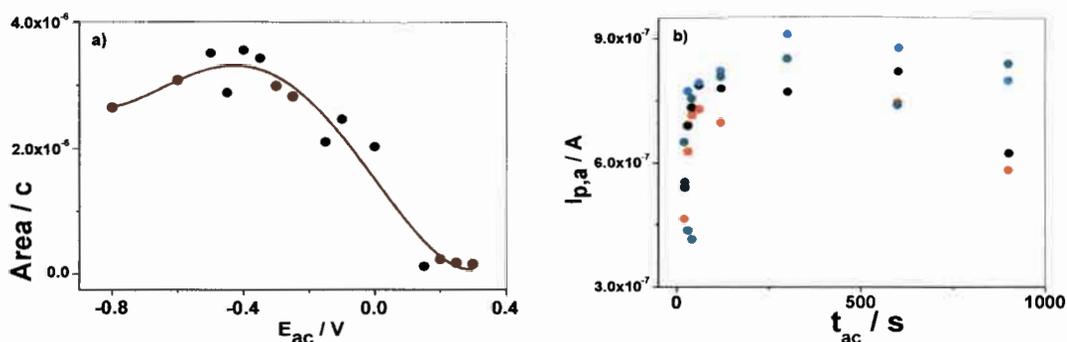


Figura 4.39. a) Área de los voltamperogramas cíclicos vs. potencial de acumulación, (-) polinomio de grado 4 que mejor ajustó los puntos experimentales. $t_{ac} = 180$ s **b)** $I_{p,a}$ vs. t_{ac} (●) $T = 5^{\circ}\text{C}$, (●) $T = 15^{\circ}\text{C}$, (●) $T = 35^{\circ}\text{C}$, (●) $T = 40^{\circ}\text{C}$. $v = 0,050$ V s^{-1} . $c_{MOR}^* = 8,30 \times 10^{-4}$ M, $E_{ac} = -0,43$ V.

A continuación se estudió la variación de la respuesta voltamperométrica con el tiempo de acumulación (t_{ac}) a diferentes concentraciones del antioxidante, tal como se muestra en la Fig. 4.40. Se observa que, a un tiempo de acumulación de aproximadamente 180 s, se alcanzan condiciones estacionarias.

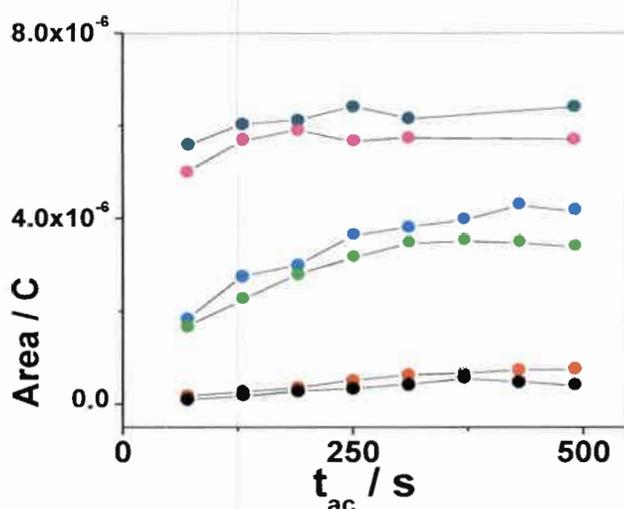


Figura 4.40. Área de los voltamperogramas cíclicos vs. t_{ac} . c_{MOR}^* : (●) $5 \times 10^{-7} M$; (●) $1 \times 10^{-6} M$; (●) $1 \times 10^{-5} M$; (●) $1 \times 10^{-4} M$; (●) $8.3 \times 10^{-4} M$ y (●) $4 \times 10^{-3} M$. $T = 25^\circ C$. $v = 0,050 V s^{-1}$. $E_{ac} = -0.1V$.

Los anchos de pico a la altura media ($E_{p,1/2}$) promedios fueron de $(0,061 \pm 0,005)$ V, algo menor que el esperado teóricamente para una cupla redox superficial monoelectrónica, $90,6/n$ mV a $25^\circ C$ (Bard & Faulkner, 2001). Gráficos de $I_{p,a}$ vs. v fueron lineales, como se espera teóricamente para una cupla redox superficial (Bard & Faulkner, 2001). El recubrimiento superficial promedio, $\Gamma = (7 \pm 3) \times 10^{-12}$ moles cm^{-2} , se obtuvo mediante la integración de los picos voltamperométricos en el intervalo de v comprendido entre $0,025$ y $0,0100 V s^{-1}$.

Con todas las variables optimizadas, se estudió la variación del área de los voltamperogramas cíclicos con la concentración, manteniendo constantes el tiempo y el potencial de acumulación, con el fin de llegar a determinar qué modelo de isoterma de adsorción se ajustaba mejor con los datos experimentales (Fig. 4.41). Como se puede observar en la Fig. 4.42, la isoterma de adsorción se derivó de la dependencia entre c_{MOR}^* y la fracción del recubrimiento superficial del electrodo (θ), siendo $\theta = \text{área}(i)/\text{área}(\text{max.})$ donde las áreas (i) son calculadas a partir de los voltamperogramas cíclicos a un dado tiempo de acumulación a diferentes concentraciones de MOR y el

área(max.) es el máximo valor de área, obtenida de los voltamperogramas cíclicos al mismo tiempo de acumulación a la concentración de MOR más alta estudiada.

Como se puede observar en la Fig. 4.41, la saturación de la superficie del electrodo se alcanzó a $c_{MOR}^* \geq 5 \times 10^{-5}$ M para un $t_{ac} = 180$ s.

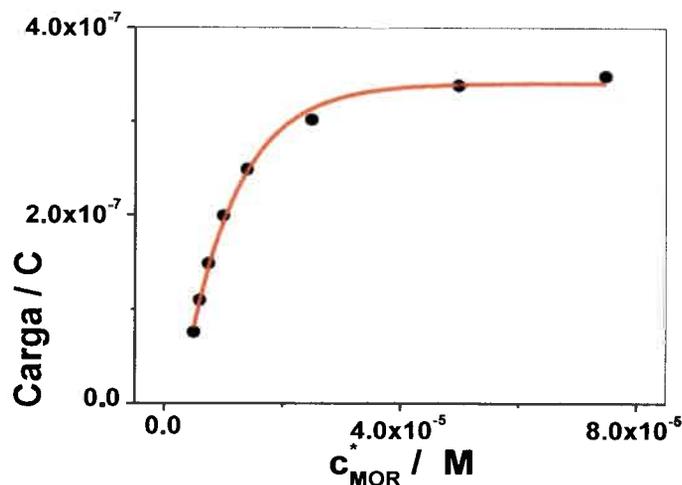


Figura 4.41. Dependencia de la carga con la c_{MOR}^* . $t_{ac} = 180$ s. $v = 0,050$ V s⁻¹,

$$E_{ac} = -0,1V. T = 25^{\circ}C.$$

Los resultados experimentales fueron ajustados con los modelos teóricos de diferentes isothermas de adsorción (Langmuir, Frumkin, Temkin, Freunlich, etc.) con el objetivo de poder describir de manera adecuada la interacción específica de MOR con la superficie del electrodo de CV (Fig. 4.42). Se encontró que el modelo que mejor ajustó los puntos experimentales fue el de la isoterma de adsorción de Frumkin, la cual puede ser expresada de la siguiente manera (Bard & Faulkner, 2001):

$$\beta c_{MO}^* = \frac{\theta}{1-\theta} e^{g'\theta} \quad (4.7)$$

Del ajuste de los puntos experimentales con la ec. (4.7), se obtuvieron los valores de β y g' a una temperatura de 25°C, siendo el primero el coeficiente de adsorción y el segundo, el parámetro que caracteriza la interacción entre las especies adsorbidas. Para el mejor ajuste, los parámetros fueron $\beta = (3,7 \pm 0,2) \times 10^4$, $g' =$

(1.90 ± 0.08) y $\chi^2 = (9,7 \times 10^{-14})$, donde χ^2 es el parámetro estadístico chi-cuadrado, que da una medida de la calidad del ajuste, además, un valor de $\Delta G_{ads} = -26.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ fue obtenido para la energía libre de adsorción, lo cual indica que la adsorción de MOR sobre el electrodo de CV es un proceso energéticamente favorable. Por otro lado, un valor de g' positivo indica que las interacciones entre las moléculas adsorbidas son atractivas (Bard & Faulkner, 2001).

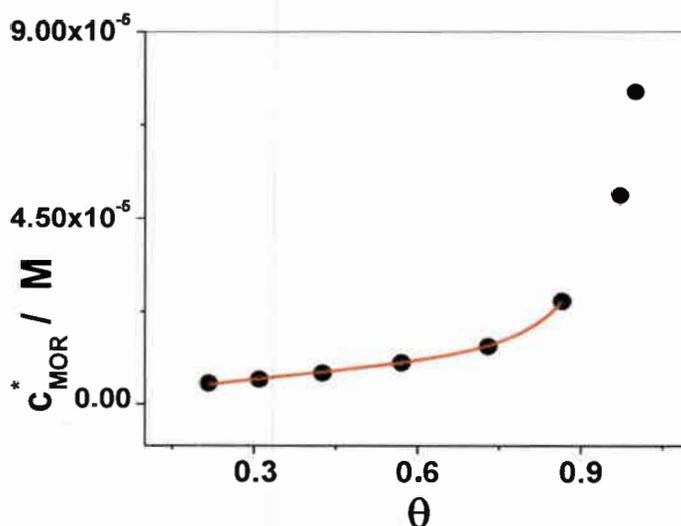


Figura 4.42. c_{MOR}^* vs. θ . (●) Valores experimentales, (-) Isoterma de adsorción de Frumkin que mejor ajustó los puntos experimentales (ec. 2.86). $t_{ac} = 180 \text{ s}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, $E_{ac} = -0,1V$. $T = 25^\circ\text{C}$.

4.2.1.3. Voltamperometría de onda cuadrada

4.2.1.3.1. Determinación cuantitativa de MOR

En la Fig. 4.43 se muestran voltamperogramas de onda cuadrada de MOR obtenidos a diferentes frecuencias (f). Los valores experimentales de corriente de pico neta ($I_{p,n}$) graficados en función de $f^{1/2}$ y f pudieron ser ajustados con regresiones lineales, en el intervalo de f entre 10 y 100 Hz, con $r = 0,9994$ y $r = 0,9968$, respectivamente. Estos resultados pondrían también en evidencia un control mixto para el proceso de electrodo: difusional y adsorptivo.

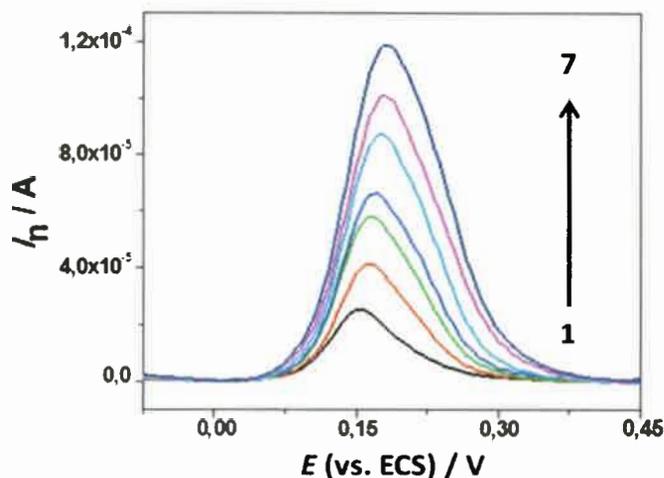


Figura 4.43. Voltamperogramas de onda cuadrada a diferentes frecuencias, $f = 1)$ 10, 2) 20, 3) 30, 4) 40, 5) 60, 6) 80 y 7) 100 Hz. $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V, $c_{MOR}^* = 8,30 \times 10^{-4}$ M.

Se realizó una curva de calibración (Fig. 4.44), la cual fué lineal en el intervalo de concentraciones entre $1,25 \times 10^{-7}$ y $2,50 \times 10^{-5}$ M. La concentración más baja medida para una relación señal:ruido de 3:1 fue de $1,25 \times 10^{-8}$ M (3 ppb).

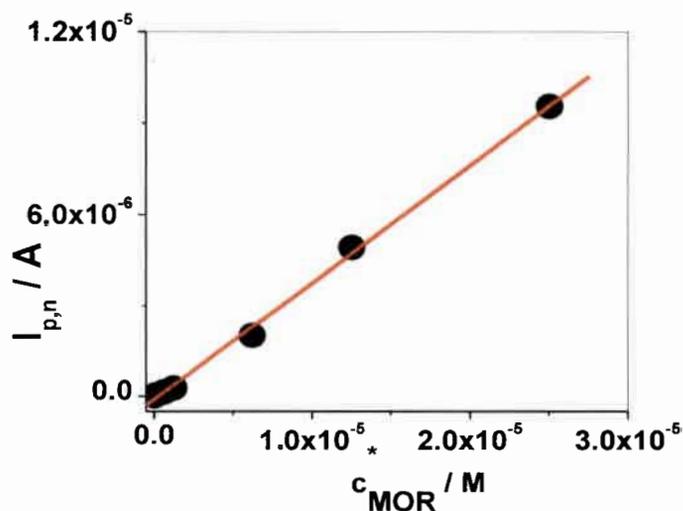


Figura 4.44. $I_{p,n}$ vs. c_{MOR}^* . $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V, $f = 20$ Hz.

4.2.1.3.2. Estudio de la cupla redox superficial de MOR mediante VOC

En la Fig. 4.45 se muestran voltamperogramas de onda cuadrada a diferentes ΔE_{oc} . Como se observa en la Fig. 4.45a la definición de los tres registros de corriente evidencian la presencia de una cupla redox superficial cuasi-reversible (Komorsky-Lovric & Lovric, 1995). El pico neto comienza a desdoblarse a medida que $n\Delta E_{oc}$ aumenta a una dada f (Figs. 4.45 b-d). Si bien, los picos no se separaron por completo, se pudo calcular el $E_{1/2}$ ($\approx E_f^o$) global promedio de la cupla redox superficial, a partir de la siguiente ecuación $E_{1/2} = \frac{1}{2} (E_{p,d} + E_{p,i})$ donde $E_{p,d}$ y $E_{p,i}$ son los potenciales de pico de las corrientes directa e inversa, respectivamente. Se obtuvo un valor promedio de: $E_{1/2} = (0,27 \pm 0,02) \text{ V}$

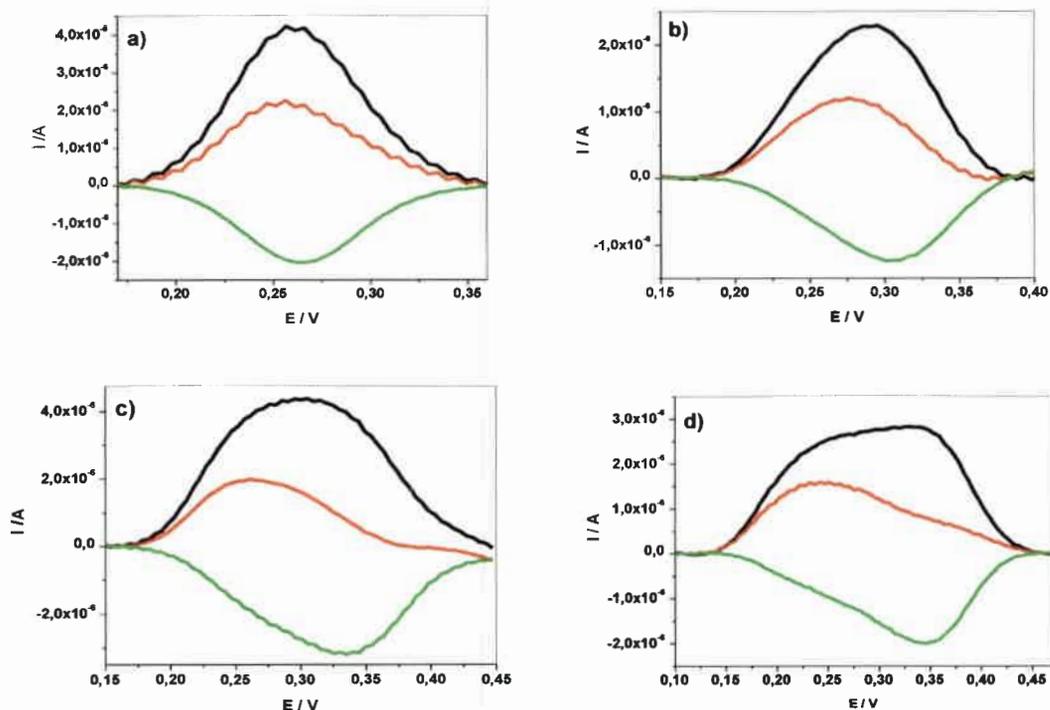


Figura 4.45. Voltamperogramas de onda cuadrada a diferentes amplitudes de la onda cuadrada: **a)** 0,025 **b)** 0,050 **c)** 0,075 y **d)** 0,100 V. $\Delta E_c = 0,005 \text{ V}$, $f = 100 \text{ Hz}$. (—) Corriente directa (—) Corriente inversa (-) Corriente neta. $c_{MOR}^* = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Tal como se espera teóricamente para este tipo de cuplas redox, un gráfico de $I_{p,n}/f$ vs. f muestra un máximo (máximo cuasi-reversible), que puede ser aproximado por

una función parabólica que depende del parámetro cinético ω , el cual a su vez, depende de $n\Delta E_{oc}$ y de $(1-\alpha)$ y es independiente de $n\Delta E_e$.

Así, mediante la ecuación:

$$k_s = \omega_{\max} f_{\max} \quad (4.8)$$

puede calcularse k_s (Mirceski y col., 2001), f_{\max} es la frecuencia del máximo del gráfico $I_{p,n}/f$ vs. f y ω_{\max} está tabulado para distintos valores de $(1-\alpha)$ y $n\Delta E_{oc}$ (ver tabla 2.3 en Mirceski y col., 2007).

La teoría acerca del “máximo cuasi-reversible” fue inicialmente desarrollada asumiendo que las especies adsorbidas no interaccionaban entre sí (Mirceski y col., 2007). Sin embargo, este pre-requisito generalmente no se satisface en la mayoría de los sistemas. Es por ello que la teoría ha sido ampliada luego para tener en cuenta estas interacciones laterales (Mirceski y col., 2001; Mirceski y col., 2007). Así, en presencia de interacciones laterales uniformes entre las especies adsorbidas, el producto de la constante de velocidad formal, k_s , y el término exponencial $\exp(-2g'\theta)$ definen una nueva constante de velocidad aparente de la reacción redox superficial, $k_{s,ap}$:

$$k_{s,ap} = k_s \exp(-2g'\theta) \quad (4.9)$$

donde $g'\theta$ es el producto de interacción. El grado de la interacción depende tanto del cubrimiento relativo superficial del electrodo, θ , como del parámetro de interacción de Frumkin g' (Mirceski y col., 2001; Mirceski y col., 2007). La posición del máximo está asociada con un cierto valor crítico del producto de interacción $(g'\theta)_{\max}$, el cual depende del valor de la relación k_s/f . Así, para calcular el valor del máximo cuasi-reversible, la siguiente situación debe satisfacerse:

$$k_s \exp^{-2(g'\theta)} f^{-1}_{\max} = (\omega_{int})_{\max} \quad (4.10)$$

donde el valor de $(\omega_{int})_{\max}$ es idéntico a ω_{\max} para una reacción redox superficial simple, sin interacciones entre las especies adsorbidas. Como $k_{s,ap} = k_s \exp(-2g'\theta)$, es

posible inferir que cuando las fuerzas de interacción son atractivas ($g' > 0$), la constante de velocidad formal para la cupla redox disminuye.

Gráficos de $I_{p,n}/f$ vs. f , construidos a partir de los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos para MOR a distintas concentraciones y tiempos de acumulación, se muestran en la Fig. 4.46. Como se puede observar, la f_{max} disminuye tanto con el t_{ac} como con la c_{MOR}^* , lo cual concuerda con el resultado esperado teóricamente para un sistema con interacciones atractivas entre las moléculas de sustrato adsorbidas sobre la superficie del electrodo.

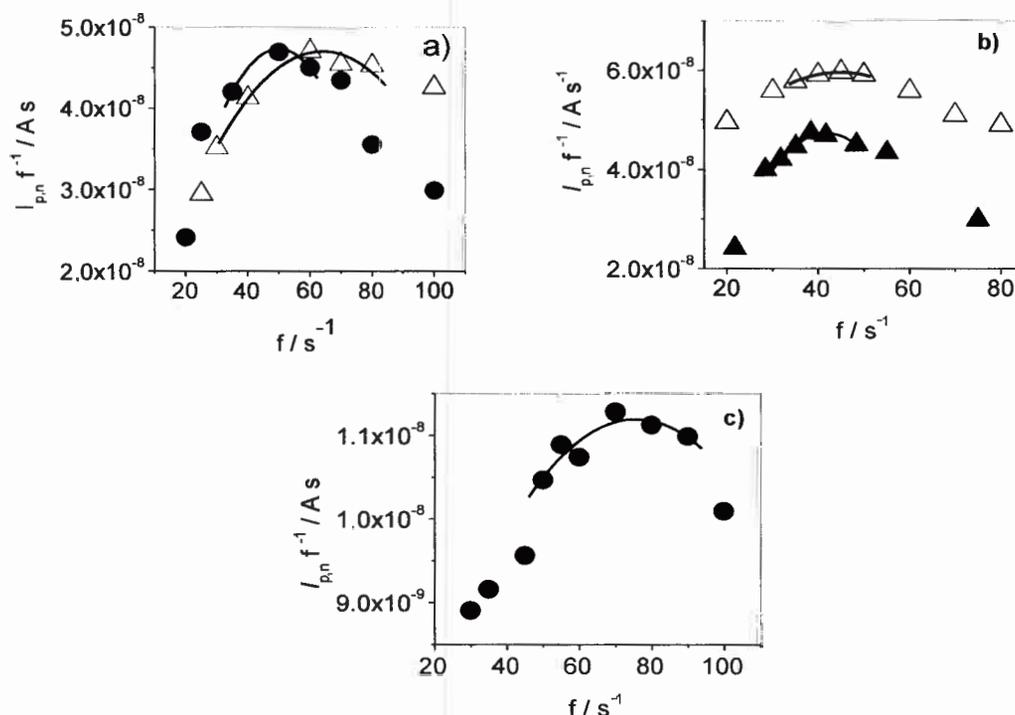


Figura 4.46. Dependencia de $I_{p,n}/f$ vs. f . **a)** t_{ac} : Δ 120 s, \bullet = 180 s ($c_{MOR}^* = 5,00 \times 10^{-6}$ M), **b)** \blacktriangle $c_{MOR}^* = 7,50 \times 10^{-6}$ M y Δ $c_{MOR}^* = 10 \times 10^{-6}$ M ($t_{ac} = 180$ s); **c)** \bullet $c_{MOR}^* = 1,00 \times 10^{-6}$ M ($t_{ac} = 180$ s). f_{max} fue calculada de la primera derivada de la expresión matemática de la parábola resultante que mejor aproximó a los puntos experimentales. $\Delta E_{oc} = 0,025$ V y $\Delta E_e = 0,005$ V.

Con estos datos, se calcularon valores de $k_{s,ap}$ usando los valores de ω_{max} obtenidos de la Tabla 2.3 de Mirceski y col., 2007, (el error en la estimación de $k_{s,ap}$ usando estos valores de ω_{max} es aproximadamente del 10%).

Un gráfico de $\ln k_{s,ap}$ vs. θ fue lineal en el intervalo $0,080 < \theta < 0,217$ (4 puntos fueron incluidos en la regresión, $r = 0,9975$). De la ordenada al origen y de la pendiente de este gráfico se calcularon los valores del g' y k_s , los cuales fueron $(1,51 \pm 0,07)$ y 87 s^{-1} respectivamente (Tesio y col., 2011). El valor de g' fue muy cercano al calculado previamente mediante medidas de voltamperometría cíclica.

Además, para valores de $(1-\alpha) > 0,2$, se ha demostrado teóricamente que la relación entre la corriente de pico directa (anódica) e inversa (catódica) ($I_{p,a}/I_{p,c}$) puede ser aproximada por la siguiente ecuación exponencial simple (Mirceski & Lovric, 1997):

$$\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} = 5,6414 \exp[-3,4606 (1-\alpha)] \quad (4.11)$$

Por lo tanto, a partir de la ecuación (4.11), se calculó el valor de $(1-\alpha)$. Un valor promedio para el coeficiente de transferencia anódica de $(0,59 \pm 0,09)$ se obtuvo para la cupla redox superficial de MOR en solución reguladora de fosfato 0,2 M de pH 7,00.

En la tabla 4.5 se muestran los valores experimentales obtenidos para: $E_{p,a}$, $I_{p,a}$, $E_{p,c}$, $-I_{p,c}$, $-(I_{p,a}/I_{p,c})$, $(1-\alpha)$ y $E_{1/2}$ para una solución de MOR, $c_{MOR}^* = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$, a una frecuencia de 100 Hz.

Tabla 4.5. Datos obtenidos a partir del desdoblamiento de pico neto, $f = 100 \text{ Hz}$.

ΔE_{oc} (V)	$E_{p,a}$ (V)	$I_{p,a}$ (μA)	$E_{p,c}$ (V)	$-I_{p,c}$ (μA)	$I_{p,a}/(-I_{p,c})$	$(1-\alpha)$	$E_{1/2}$ (V)
0,025	0,256	2,265	0,261	2,033	1,114	0,46	0,258
0,050	0,276	1,265	0,300	1,240	0,972	0,51	0,288
0,075	0,261	1,991	0,335	3,201	0,630	0,63	0,298
0,100	0,252	1,593	0,344	1,998	0,797	0,56	0,298
0,125	0,164	2,262	0,345	4,492	0,504	0,70	0,254
0,150	0,169	2,272	0,344	4,056	0,560	0,66	0,256

Valores promedios: $E_{1/2} = (0,27 \pm 0,02) \text{ V}$; $(1-\alpha) = (0,59 \pm 0,09)$

4.2.2. Buteína

4.2.2.1. Voltamperometría Cíclica

En la Fig. 4.47 se muestra un voltamperograma cíclico de BUT sobre el electrodo de CV a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, en una ventana de potencial de 0 a 0,9 V. Dicho voltamperograma pone en evidencia que BUT es factible de ser oxidada electroquímicamente, presentando un pico bien definido centrado en 0,59 V en solución 1 M HClO_4 acuoso.

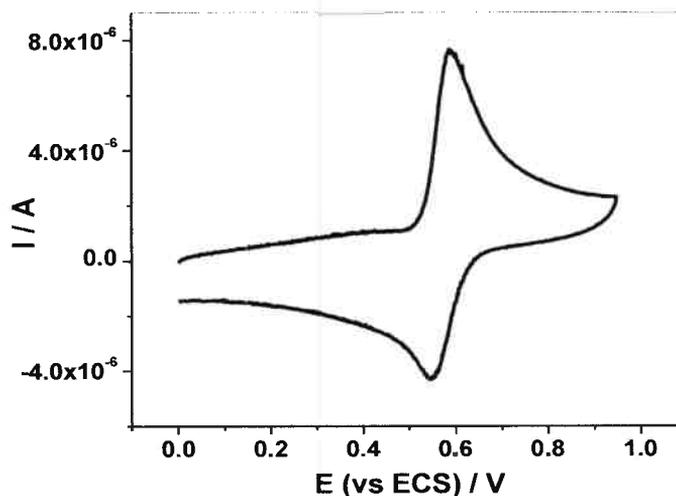


Figura 4.47. Voltamperograma cíclico obtenido para la oxidación de BUT en solución 1 M HClO_4 . $c_{\text{BUT}}^* = 1,47 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. $T = 25^\circ\text{C}$.

A diferencia del comportamiento electroquímico de MOR, BUT, una vez que se adsorbe por completo sobre el electrodo, la señal se mantiene en el tiempo y el electrodo no se pasiva.

En las Figs. 4.48 y 4.49 se muestran voltamperogramas cíclicos de BUT obtenidos a diferentes valores de pH, a altas y bajas concentraciones de BUT. En ambos casos, se observan picos de oxidación cuasi-reversibles en la región de potenciales entre 0 y 0,9 V, cuya posición en la escala de potencial y su reversibilidad dependen del pH del medio. El pico se desplaza hacia potenciales menos positivos con el aumento del pH siendo, además, mayor su reversibilidad a pH bajos, en el caso de las soluciones reguladoras de fosfatos y de citrato. A partir de las características voltamperométricas es

posible inferir un mecanismo de reacción complejo, con un control mixto: difusional/adsortivo. Por otro lado, la dependencia de la señal voltamperométrica con el pH indica la participación de protones en el proceso de electrodo. Además, un gráfico de $E_{p,a}$ vs. pH mostró una pendiente de $-(0,052 \pm 0,002)$ V ($r = 0,9978$), comportamiento que indica que el mismo número de electrones y protones participan del proceso de electrodo. Por otro lado, es bien conocido que dos electrones están involucrados en la oxidación del grupo catecol (Hodnick y col., 1987; Markovic y col., 2009). Así, esta señal puede ser asignada a la oxidación del tipo $2e^-$, $2H^+$ del grupo catecol presente en la estructura molecular de BUT (Fig. 1.6)

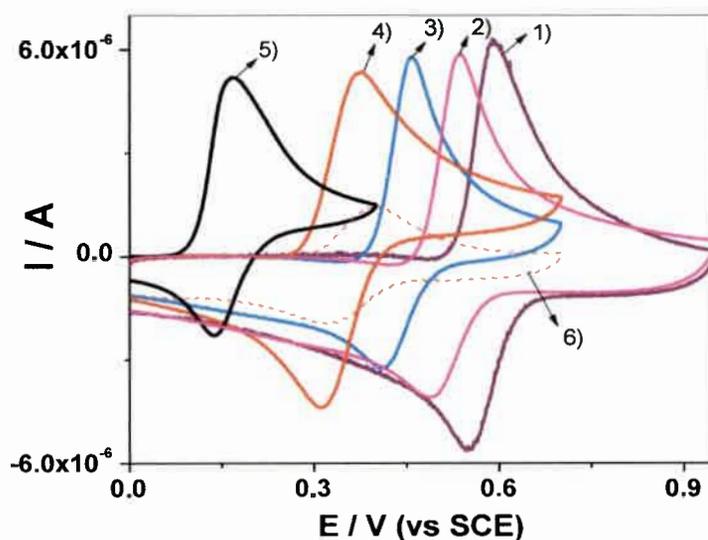


Figura 4.48. Voltamperogramas cíclicos de BUT en solución 1M $HClO_4$ acuoso (1) y en soluciones reguladoras de fosfato de diferentes pH: (2) 0,92; (3) 2,26; (4) 4,12 y (5) 7,00. $c_{BUT}^* = 1,47 \times 10^{-4}$ M, $t_{ac} = 1$ min, $v = 0,050$ V s^{-1} . (6) VC en solución del blanco posterior a los VC registrados en presencia de BUT a pH 4,12.

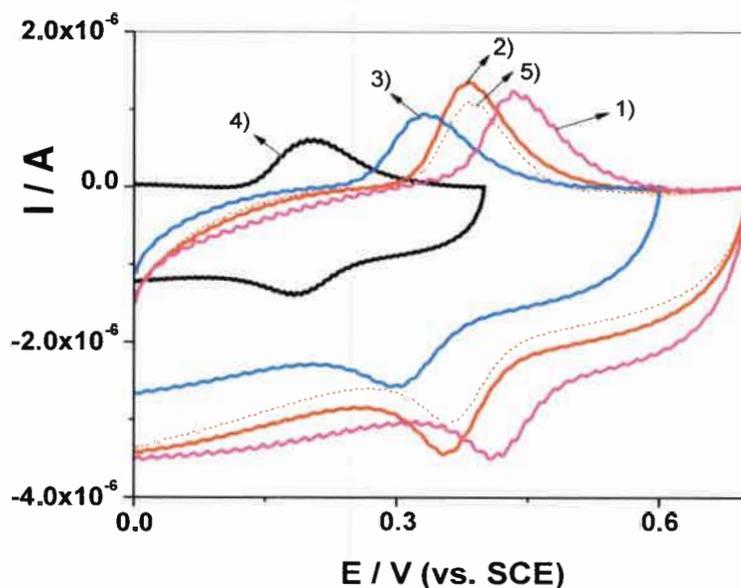


Figura 4.49. Voltamperogramas cíclicos de BUT en soluciones reguladoras de citrato de diferentes valores de pH: (1) 3,00; (2) 4,00; (3) 5,00 y (4) 7,00. $c_{\text{BUT}}^* = 2,00 \times 10^{-6} \text{ M}$, $t_{\text{ac}} = 60 \text{ min}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. (5) VC en solución del blanco posterior a los VC registrados en presencia de BUT a pH 4,00.

Considerando que, fundamentalmente a bajas concentraciones de BUT, las señales voltamperométricas estuvieron mejor definidas en las soluciones reguladoras de citrato que en las de fosfato y, considerando que, a pH 4,00 se observó una ligera mejora en la definición de la señal, los resultados que se discuten a continuación se realizaron en soluciones reguladoras de citrato de pH 4,00.

Haciendo uso de la ec. 4.5, se pudo separar las contribuciones a la corriente de pico provenientes de la difusión y de la adsorción. Así, a partir de gráficos de $I_{p,a}v^{-1/2} \text{ A}^{-1}$ vs. $v^{1/2}$ se pudieron obtener los valores, tanto de k_1 como de k_2 de la ec. 4.5. y, con ellos, los valores de la concentración superficial del sustrato (Γ) y del coeficiente de difusión (D), respectivamente. El estudio previamente mencionado se realizó para cinco concentraciones de BUT y a una temperatura de 25 °C. En la Fig. 4.50 se pueden observar los gráficos correspondientes y en la Tabla 4.6 el resumen de los datos obtenidos.

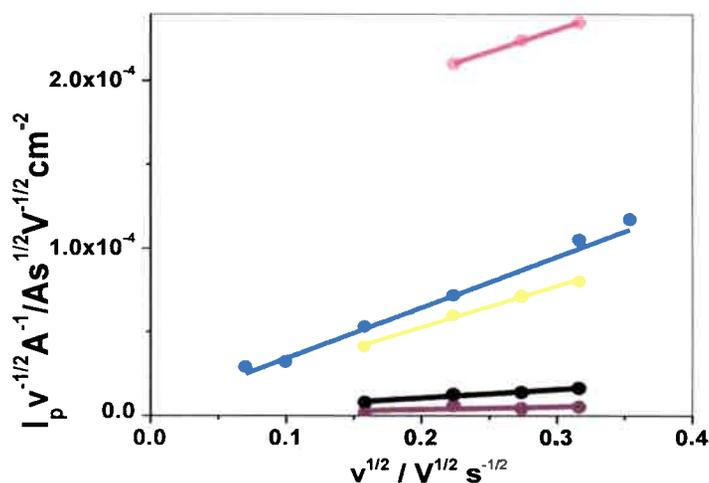


Figura 4.50. Gráficos de $I_p v^{-1/2} A^{-1}$ vs. $v^{1/2}$ para diferentes c_{BUT}^* : (●) $2,0 \times 10^{-3} M$, (●) $2,0 \times 10^{-6} M$, (●) $8,0 \times 10^{-7} M$, (●) $8,0 \times 10^{-8} M$, y (●) $8,0 \times 10^{-9} M$.

Tabla 4.6. Valores de k_1 , k_2 , Γ y D para diferentes concentraciones de buteina (c_{BUT}^*).

$c_{BUT}^*(M)$	$k_1(AsV^{-1}cm^{-2})$	$k_2(A s^{1/2}V^{-1/2}cm^{-2})$	Γ (moles cm^{-2})	D ($cm^2 s^{-1}$)
$8,0 \times 10^{-9}$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$(4,7 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$4,4 \times 10^{-12}$	$6,1 \times 10^{-3}$
$8,0 \times 10^{-8}$	$(5,0 \pm 0,7) \times 10^{-5}$	$(6,1 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-11}$	$1,0 \times 10^{-4}$
$8,0 \times 10^{-7}$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(3 \pm 3) \times 10^{-6}$	$6,6 \times 10^{-11}$	$2,0 \times 10^{-5}$
$2,0 \times 10^{-6}$	$(3,0 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(3 \pm 3) \times 10^{-6}$	$8,1 \times 10^{-11}$	$4,6 \times 10^{-6}$
$1,5 \times 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$7,1 \times 10^{-11}$	$1,8 \times 10^{-6}$

Se observa la tendencia en el aumento de Γ , a medida que aumenta la concentración y, se puede notar que el valor de Γ tiende a estabilizarse (Fig. 4.51a), lo cual indicaría que se llega a un recubrimiento completo de la superficie del electrodo (posiblemente, una monocapa).

En cuanto a la determinación de D , se encontró una estabilización similar a la mencionada anteriormente (Fig. 4.51b), además, a altas concentraciones, se obtuvieron valores de D , concordantes con los informados para moléculas de estructura química similares a ésta (Bard & Faulkner, 2001).

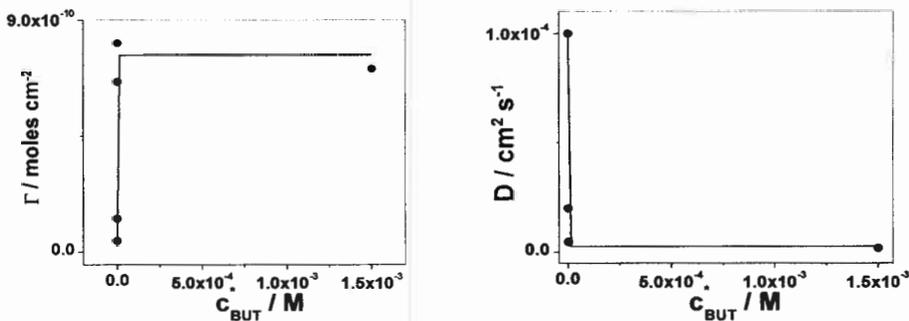


Figura 4.51. Dependencia de los valores de Γ y D con la concentración de BUT. **a)** Γ vs. c_{BUT}^* y **b)** D vs. c_{BUT}^* .

Por otro lado, a concentraciones bajas, donde el proceso está controlado fundamentalmente por adsorción, se encontró una relación lineal entre $I_{p,a}$ y v , como se espera teóricamente para un proceso redox superficial (Bard & Faulkner, 2001). Además, el ancho promedio de pico a la altura media ($E_{p,1/2}$) fue de $(0,085 \pm 0,002)$ V, siendo este valor mayor que el esperado teóricamente para una cupla redox superficial bielectrónica, $E_{p/2} = 90,6/n$ mV a 25°C (Bard & Faulkner, 2001). Se determinó que el potencial y el tiempo de acumulación óptimos fueron $0,0$ V y 3000 s, respectivamente (Fig. 4.52). Como se observa en la Fig. 4.52a, la corriente de pico anódica aumenta a medida que aumenta el potencial de acumulación, para luego decaer bruscamente. La mayor $E_{p,a}$ se obtuvo para un $E_{ac} = 0,300$ V. Sin embargo, se eligió un valor de $E_{ac} = 0$ V, dado que la diferencia entre los valores de corriente a 0 y $0,300$ V no fue significativa y, además, los barridos voltamperométricos se inician a 0 V.

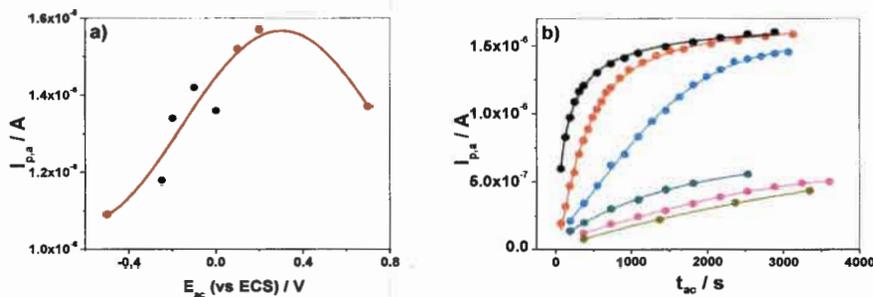


Figura 4.52. Determinación de **a)** E_{ac} óptimo. (●) Valores experimentales, (—) Ajuste no lineal de los puntos experimentales. $c_{BUT}^* = 1,47 \times 10^{-4}$. $t_{ac} = 60$ s. **b)** t_{ac} óptimo. c_{BUT}^* : ●) $5,00 \times 10^{-6}$, ●) $1,00 \times 10^{-6}$, ●) $5,00 \times 10^{-7}$, ●) $4,00 \times 10^{-7}$, ●) $2,00 \times 10^{-7}$, ●) $1,00 \times 10^{-7}$, $E_{ac} = 0$ V. En ambos casos, $v = 0,050$ V s^{-1} .

En la Fig. 4.53 se muestra la dependencia del porcentaje de la relación entre la $I_{p,a}$ de los voltamperogramas obtenidos en soluciones de blanco (posterior a la absorción de BUT) y la $I_{p,a}$ de aquellos obtenidos bajo las mismas condiciones experimentales en presencia de BUT (% adsorción), donde claramente se puede observar que, a concentraciones bajas la diferencia entre las corrientes registradas en la solución blanco, posterior a la adsorción de BUT y en la solución en presencia del sustrato es prácticamente despreciable.

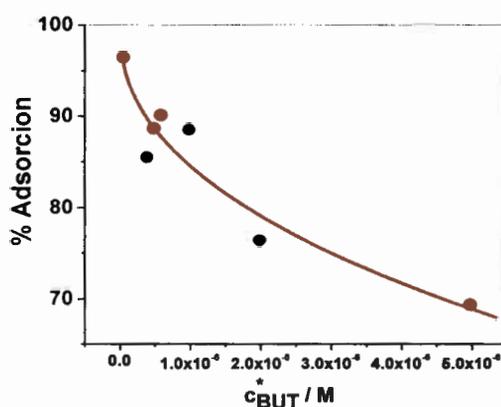


Figura 4.53. Dependencia del porcentaje de adsorción en función de la concentración de BUT. Solución reguladora de citrato de pH 4,00. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

En la Fig. 4.54a se muestra un gráfico de la carga (Q) en función de la c_{BUT}^* .

Se observa que la carga máxima (Q_{max}) se obtiene a $c_{BUT}^* \geq 2 \times 10^{-6} \text{ M}$. El recubrimiento superficial máximo (Γ_{max}) a pH 4,00 obtenido a partir de las cargas de los picos voltamperométricos en la región de v entre 0,025 y 0,100 V s^{-1} fue de $(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-10} \text{ moles cm}^{-2}$, que concuerda razonablemente bien con el valor obtenido a partir de un gráfico de $I_{p,a}$ vs. v ($\Gamma_{max} = 1,9 \times 10^{-10} \text{ moles cm}^{-2}$) y se corresponde con el valor esperado para la formación de una monocapa de sustrato (Bard & Faulkner, 2001). La isoterma de adsorción se derivó de la dependencia entre c_{BUT}^* y el cubrimiento fraccional de la superficie del electrodo, $\theta = Q/Q_{max}$, donde Q es la carga obtenida a una dada concentración de BUT y Q_{max} es la carga obtenida para concentraciones de BUT $\geq 2 \times 10^{-6} \text{ M}$. El mejor ajuste se obtuvo cuando la isoterma de adsorción de Frumkin (ec. 2.86) se eligió para realizar el mismo (Fig. 4.54b).

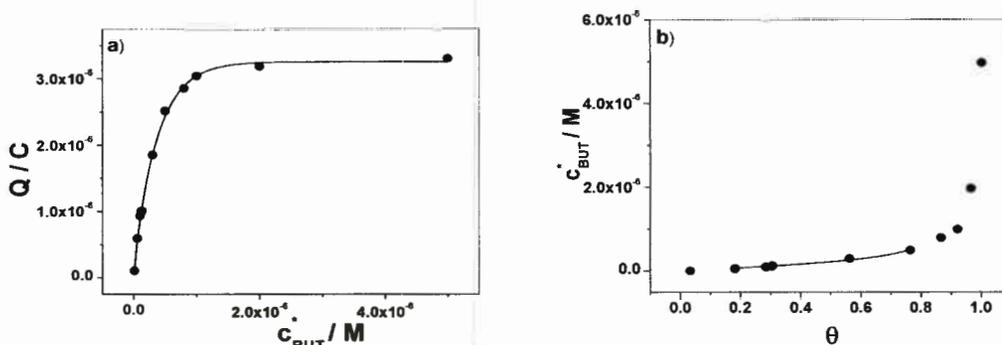


Figura 4.54. a) Dependencia de Q con c_{BUT}^* ; **b)** Gráfico de c_{BUT}^* vs. θ . Los puntos (●) representan los valores experimentales y la línea sólida (—) representa el mejor ajuste obtenido con la isoterma de adsorción de Frumkin.

Del mejor ajuste, se obtuvieron los siguientes valores: $\beta = (5,3 \pm 0,2) \times 10^6$, $g' = (1,6 \pm 0,02)$ y $\chi^2 = 7,6 \times 10^{-15}$. Un valor de $\Delta G_{ads} = -38,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ se obtuvo para la energía libre estándar de adsorción, lo que indica que el proceso de adsorción es energéticamente favorable. Un valor positivo de g' indica que las interacciones entre las moléculas vecinas adsorbidas son atractivas.

4.2.2.2. Voltamperometría de onda cuadrada

En la Fig. 4.55 se muestran las corrientes directa, inversa y neta, obtenidas a partir de los voltamperogramas de onda cuadrada registrados para BUT en una solución reguladora de citrato de pH 4,00.

La forma de las tres respuestas obtenidas, para $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$ son características del comportamiento de una cupla redox superficial cuasi-reversible (Fig. 4.55a) (Mirceski y col., 2001; Mirceski y col., 2007). Además, ningún cambio se observó en la señal de los picos voltamperométricos de onda cuadrada (por ejemplo: desdoblamiento de los pico o corrimientos) con el cubrimiento superficial, siendo esto una evidencia de la formación de una monocapa (Giannakopoulos & Deligiannakis, 2007).

Nuevamente se observa un desdoblamiento de los picos voltamperométricos a medida que se incrementa ΔE_{oc} (Figs. 4.55b y 4.55c).

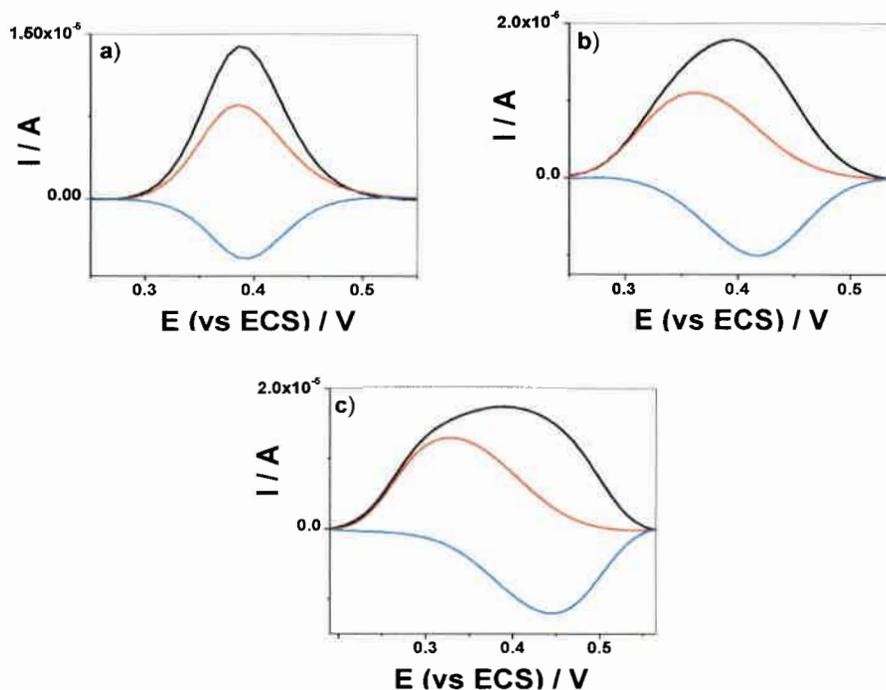


Figura 4.55. Voltamperogramas de onda cuadrada en solución reguladora de citrato de $pH = 4,00$ a diferentes amplitudes de onda **a)** 0,025 **b)** 0,100 y **c)** 0,125 V. $\Delta E_e = 0,005$ V, $f = 100$ Hz. (-) Corriente anódica (-) Corriente catódica (-) Corriente neta. $c_{MOR}^* = 5.00 \times 10^{-7}$ M; $f = 20$ Hz; $t_{acc} = 3000$ s.

En la Fig. 4.56 se muestran gráficos de $I_{p,a}f^{-1}$ vs. f para tres c_{BUT}^* . La frecuencia crítica, $f_{m\acute{a}x}$, disminuye a medida que aumenta la concentración superficial, tal cual se espera teóricamente por una cupla redox con interacciones atractivas entre las moléculas adsorbidas sobre la superficie del electrodo (Mirceski y col., 2001; Mirceski y col., 2007).

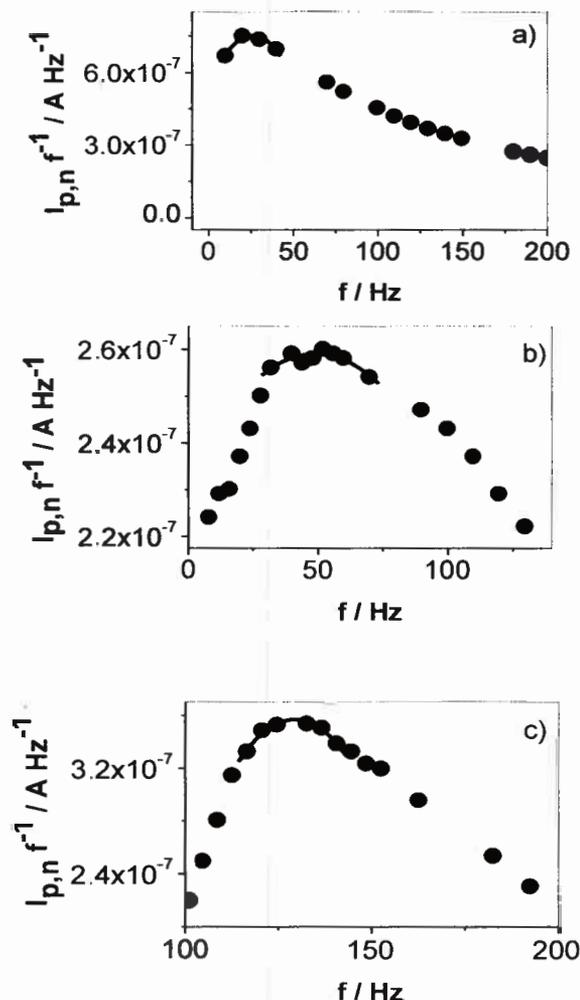


Figura 4.56. Variación de la relación de la corriente de pico neta con la frecuencia ($I_{p,n}f^{-1}$) vs. la frecuencia. En solución reguladora de citrato pH = 4,00 a diferentes C_{BUT}^* = **a)** $2.02 \times 10^{-6} M$ ($\theta = 0.84$), $f_{max} = 24$ Hz; **b)** $1.00 \times 10^{-6} M$ ($\theta = 0.56$), $f_{max} = 51$ Hz; **c)** $1.00 \times 10^{-7} M$ ($\theta = 0.29$), $f_{max} = 130$ Hz. $\Delta E_{oc} = 0.025$ V. $\Delta E_e = 0.005$ V. Las frecuencias de los máximos fueron calculadas a partir la derivada de la expresión matemática de la parábola resultante que mejor ajustó los puntos experimentales.

Como se mencionó anteriormente en el estudio de MOR, haciendo uso del método del “desdoblamiento del pico de corriente neta en los voltamperogramas de onda cuadrada” (O’Dea & Osteryoung, 1993; Mirceski y col., 2007) se pudo calcular un valor medio para el potencial de media onda de la cupla redox superficial de BUT en solución reguladora de citrato de pH 4,00.

A partir de la ecuación (4.11), se calculó el valor de $(1-\alpha)$. Un valor medio para el coeficiente de transferencia anódica, $(1-\alpha) = (0,46 \pm 0,04)$, se obtuvo para la cupla redox superficial de BUT en solución reguladora de citrato de pH 4,00.

En la tabla 4.7 se muestran los valores experimentales obtenidos para: $E_{p,a}$, $I_{p,a}$, $E_{p,c}$, $-I_{p,c}$, $-(I_{p,a}/I_{p,c})$, $(1-\alpha)$ y $E_{1/2}$ para una solución de BUT, $c_{BUT}^* = 2.02 \times 10^{-6}$ M, a dos frecuencias.

Tabla 4.7. Datos obtenidos a partir del desdoblamiento de pico neto, $af = 20$ Hz y 40 Hz.

f (Hz)	ΔE_{oc} (V)	$E_{p,a}$ (V)	$I_{p,a}$ (μA)	$E_{p,c}$ (V)	$-I_{p,c}$ (μA)	$E_{1/2}$ (V)	$(1-\alpha)$
20	0,025	0,378	9,1	0,387	6,0	0,382	0,38
	0,050	0,372	14,4	0,401	12,1	0,386	0,45
	0,075	0,360	17,3	0,412	16,0	0,386	0,48
	0,100	0,345	18,6	0,425	17,9	0,385	0,49
	0,125	0,328	19,9	0,441	18,9	0,384	0,48
	0,150	0,305	20,9	0,459	19,5	0,382	0,48
40	0,025	0,387	16,2	0,391	9,9	0,389	0,36
	0,050	0,381	26,0	0,399	20,7	0,390	0,43
	0,075	0,372	33,3	0,407	29,2	0,389	0,46
	0,100	0,361	37,5	0,418	36,0	0,389	0,49
	0,125	0,348	41,1	0,428	40,6	0,388	0,50
	0,150	0,334	43,5	0,440	42,8	0,387	0,49

Valores promedios: $E_{1/2} = (0,386 \pm 0,003)$ V; $(1-\alpha) = (0,46 \pm 0,04)$

Los valores de $k_{s,ap}$ se calcularon a partir ec. (4.9) para diferentes valores de θ , utilizando un valor de $\omega_{max} = 0,885$. (ver Tabla 2.3 para $n\Delta E_{oc} = 0,050$ V y $(1-\alpha) = 0,46$ en Mirceski y col., 2007).

Un gráfico de $k_{s,ap}$ vs. θ fue lineal, en el intervalo de $\theta = 0,29$ a $\theta = 0,84$ (cuatro puntos se tomaron en cuenta para el ajuste, $r = 0,9870$), con una ordenada al origen de $(5,6 \pm 0,2)$ y una pendiente de $-(3,1 \pm 0,4)$. Con el valor de la ordenada al origen, se calculó un valor de $k_s = 2,7 \times 10^2$ s⁻¹, y de la pendiente se determinó un valor de $g' =$

1,55. Este valor de parámetro de interacción concuerda con el valor obtenido del mejor ajuste de la isoterma de adsorción ($g' = 1,60$).

Estudios similares a los descritos anteriormente fueron realizados en diferentes medios de reacción, tales como: 1 M HClO₄, y soluciones reguladoradas de citrato de pH 3,00, 5,00 y 7,00. Los valores promedio de $E_{1/2}$ y $(1-\alpha)$ y los valores de k_s obtenidos se resumen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Datos obtenidos a partir del desdoblamiento de pico neto.

Medio de Reacción	$\overline{E}_{1/2} / V$	$(1 - \alpha)$	$10^{-2} \times k_s / s^{-1}$
1 M HClO ₄	0,570±0,04	0,45±0,03	4,6
SRC pH 3,00	0,439±0,005	0,45±0,04	3,7
SRC pH 4,00	0,386±0,003	0,46±0,04	2,7
SRC pH 5,00	0,335±0,05	0,44±0,05	2,2
SRC pH 7,00	0,213±0,06	0,47±0,03	2,1

Como se puede observar en la Tabla 4.8, los valores de $(1-\alpha)$ son prácticamente independiente del pH y el $E_{1/2}$ aumenta a medida que lo hace la acidez del medio (Fig. 4.57), siendo la $\partial E_{1/2} / \partial pH = (0,058 \pm 0,001) V/década$, valor esperado para un proceso que intercambia el mismo número de electrones y protones (Bard & Faulkner, 2001).

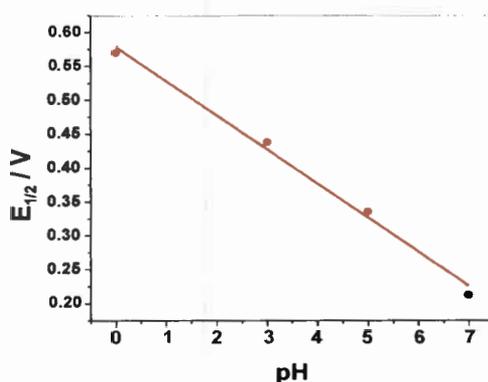


Figura 4.57. Dependencia de $E_{1/2}$ con el pH para la oxidación del flavonoide buteina.

El valor de k_s obtenido para la cupla redox superficial de BUT sobre electrodos de CV en 1 M HClO₄ ($k_s = 4,6 \times 10^2 s^{-1}$, Tabla 4.8) se compara razonablemente bien

con el valor de k_s obtenido para la cupla redox superficial de rutina sobre electrodos de CV ($k_s = 6,1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$) en 10% de etanol + 90% solución acuosa 1 M HClO_4 (Aragão Catunda y col., 2011).

La variación de k_s en función del pH se muestra en la Fig. 4.58.

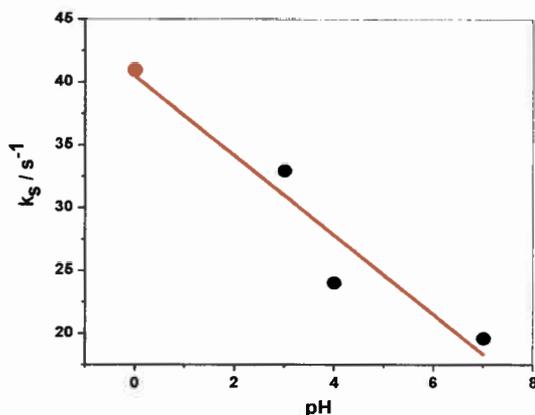


Figura 4.58. Dependencia de la constante de velocidad formal del proceso redox superficial global con el pH.

Los estudios de la oxidación electroquímica de BUT dieron origen a un trabajo que ha sido, recientemente aceptado para su publicación (Tesio y col., 2013).

4.3.1. Luteolina

4.3.1.1. Voltamperometría cíclica

En la Fig. 4.59 se muestran voltamperogramas cíclicos de LUT sobre el electrodo de CV a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ en una ventana de potencial de 0 a 1,300 V. Dichos voltamperogramas ponen en evidencia que LUT es factible de ser oxidada electroquímicamente, presentando un pico de oxidación cuasi-reversible, bien definido, centrado en 0,660 V, y otro irreversible y menos definido, centrado en 1,28 V, en 1 M HClO_4 acuoso.

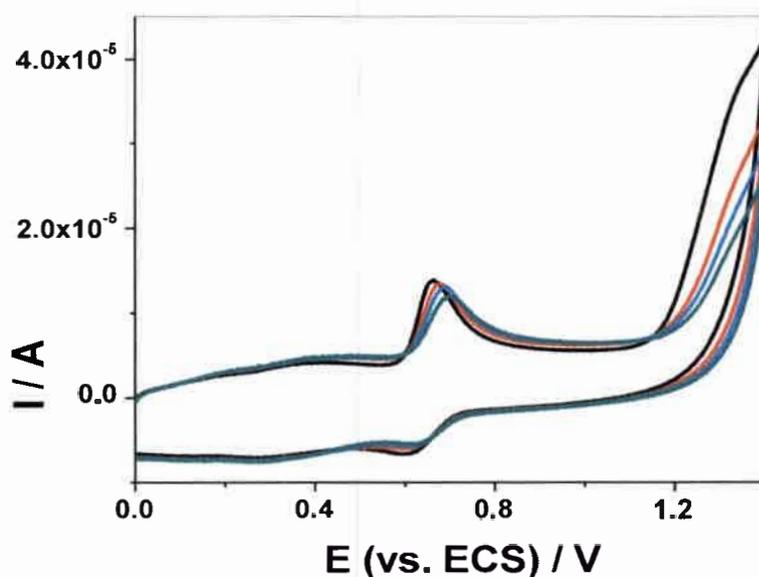


Figura 4.59. Voltamperogramas cíclicos de LUT, uno a continuación del otro en 1 M HClO_4 acuoso, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, $c_{\text{LUT}}^* = 3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Cuando la ventana de potencial de trabajo sobrepasa el segundo pico, la superficie del electrodo comienza a pasivarse y el primer pico se ve afectado, su corriente disminuye y se desplaza hacia potenciales más positivos. Es por ello que, para estudiar electroquímicamente este flavonoide, se eligió acotar la ventana de potencial sólo al primer pico de oxidación. Esta señal es asignada a una oxidación del tipo $2e^-$, 2H^+ del grupo catecol presente en la estructura molecular de LUT (ver Fig. 1.7). Utilizando una ventana de potencial en donde sólo se observa la descarga del primer pico, éste se mantiene estable en barridos sucesivos, lo cual hace que su estudio sea más sencillo (Fig. 4.60).

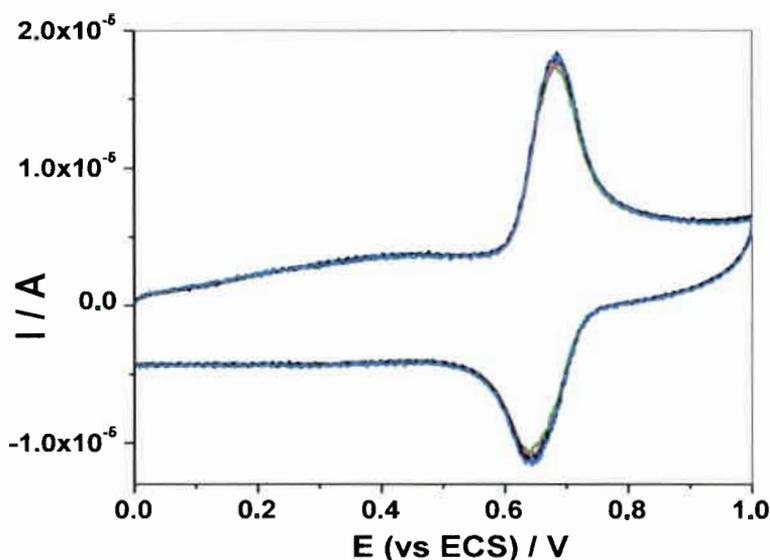


Figura 4.60. Cuatro voltamperogramas cíclicos de LUT, uno a continuación del otro en 1 M HClO_4 acuoso, $\nu = 0,050\text{ V s}^{-1}$, $c_{\text{LUT}}^* = 3,50 \times 10^{-5}\text{ M}$.

Si bien se observó que los voltamperogramas cíclicos tienen la forma característica de un proceso de electrodo controlado, fundamentalmente, por adsorción, se realizó el análisis, utilizado anteriormente para MOR y BUT, a los efectos de separar las contribuciones a la corriente, aportadas tanto por la difusión del analito, como por la adsorción del mismo sobre la superficie del electrodo.

En la Fig. 4.61 se pueden observar los gráficos correspondientes al mencionado estudio y en la Tabla 4.9 el resumen de los datos obtenidos.

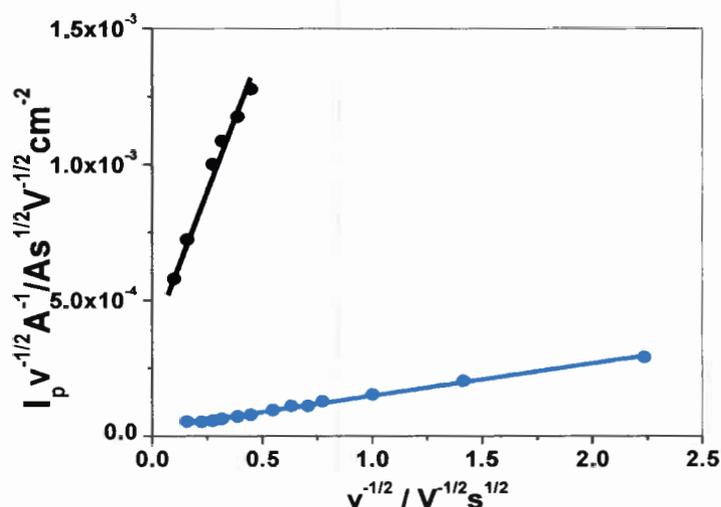


Figura 4.61. Gráficos de $I_{p,a} v^{-1/2} A^{-1}$ vs. $v^{1/2}$ para diferentes c_{LUT}^* . (●) $3,5 \times 10^{-4} M$ y (●) $1,0 \times 10^{-6} M$.

Tabla 4.9. Valores de k_1 , k_2 , Γ y D para diferentes concentraciones de luteolina (c_{LUT}^*).

$c_{LUT}^*(M)$	$k_1(AsV^{-1}cm^{-2})$	$k_2(As^{1/2}V^{-1/2}cm^{-2})$	Γ (moles cm^{-2})	D ($cm^2 s^{-1}$)
1×10^{-6}	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-11}$	$1,3 \times 10^{-3}$
$3,5 \times 10^{-4}$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	$(3,7 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-10}$	$1,9 \times 10^{-6}$

En la Fig. 4.62 se muestran los voltamperogramas cíclicos de LUT correspondientes al primer pico de oxidación, donde se observa que el proceso de electrodo está controlado, fundamentalmente, por adsorción. Existe, además, una fuerte dependencia del comportamiento electroquímico del sistema con la variación del pH del medio. Tal como se observa en la Fig. 4.62, tanto el E_p , como la I_p y la reversibilidad del sistema varían con el pH. En un medio fuertemente ácido, se observa un incremento en las corrientes, un corrimiento a potenciales mayores y una mayor reversibilidad (menor ΔE_p).

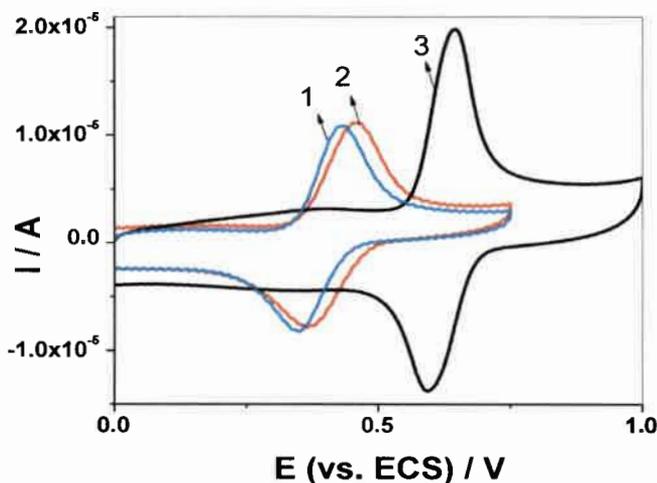


Figura 4.62. Voltamperogramas cíclicos de LUT a diferentes valores de pH. Soluciones reguladoras de fosfato 0,2 M (1) pH 7; (2) pH 4; (3) solución acuosa 1 M HClO₄. $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, $c_{\text{LUT}}^* = 3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$, $t_{\text{ac}} = 120 \text{ min}$. $E_{\text{ac}} = 0 \text{ V}$.

Se realizaron estudios de voltamperometría cíclica, en donde se varió la velocidad de barrido (Fig. 4.63 a y b) con los que se construyeron gráficos de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ vs. ν , los cuales pudieron ser ajustados con una regresión lineal, para ν relativamente pequeñas, con $r = 0,9963$ y $r = 0,9973$ y pendientes de $(2,29 \pm 0,07) \times 10^{-4}$ y $(-1,67 \pm 0,04) \text{ A V}^{-1} \text{ s}$, respectivamente.

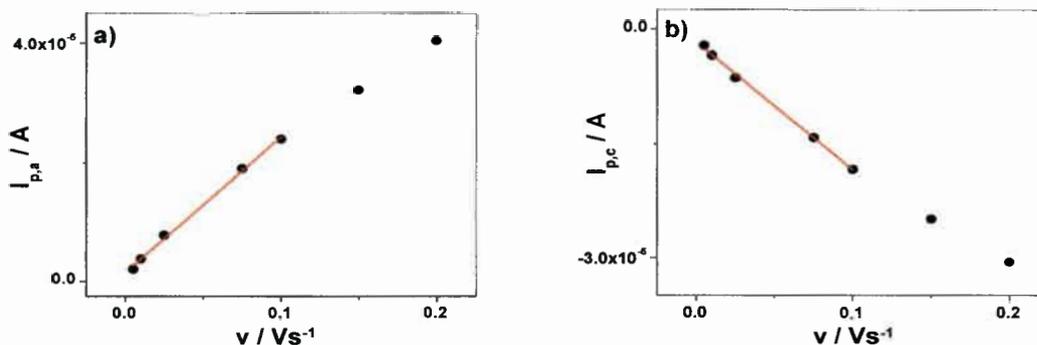


Figura 4.63. Gráfico de: a) $I_{p,a}$ vs. ν y b) $I_{p,c}$ vs. ν . Voltamperogramas cíclicos registrados en 1 M HClO₄ acuoso, $c_{\text{LUT}}^* = 3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$

A partir de estos resultados se puede inferir que el proceso de electrodo muestra un control adsorptivo (Bard & Faulkner, 2001).

A continuación se muestra la variación de la respuesta voltamperométrica con el tiempo de acumulación. Tal como se observa en las Figs. 4.64 a y b, a un tiempo de acumulación de, aproximadamente, 120 min, se alcanzan condiciones estacionarias.

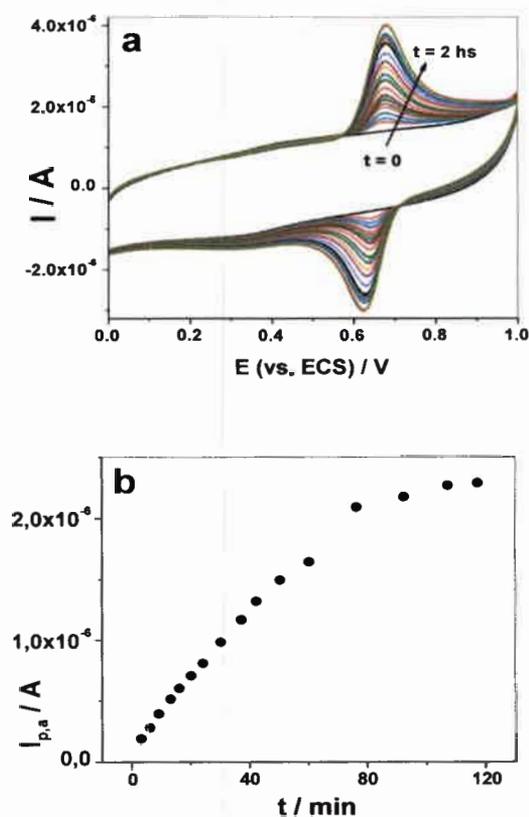


Figura 4.64. a) Voltamperogramas cíclicos de LUT uno a continuación del otro. **b)** $I_{p,a}$ de los voltamperogramas cíclicos correspondientes en función del tiempo de acumulación. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, 1 M HClO_4 acuoso, $c_{\text{LUT}}^* = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Con el fin de optimizar las variables experimentales para favorecer la adsorción de LUT, se estudió la variación de $I_{p,a}$ en función del potencial aplicado al electrodo de trabajo (E_{ac}), aplicando un $t_{ac} = 120 \text{ min}$. Como se muestra en la Fig. 4.65 se encontró que entre $-0,100$ y $0,200 \text{ V}$ los valores de corriente no varían demasiado y luego, a mayores potenciales de acumulación éstos disminuyen progresivamente. Se eligió 0 V como el potencial de acumulación para las siguientes experiencias.

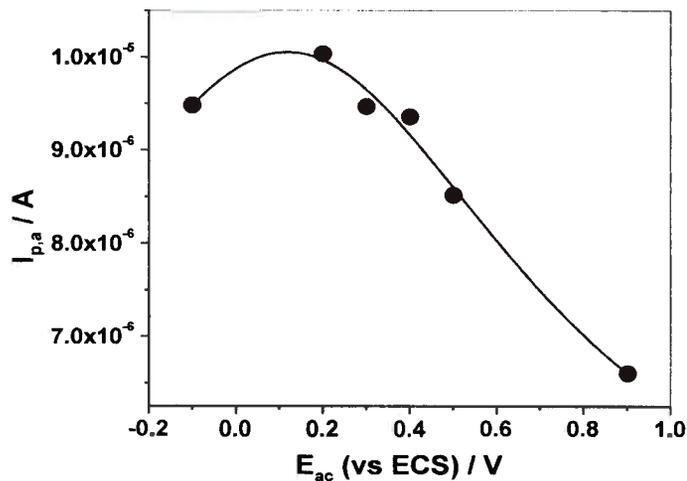


Figura 4.65. Gráfico de $I_{p,a}$ vs. E_{ac} . (●) valores experimentales, (—) ajuste no lineal de los valores experimentales. $v = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$, 1 M HClO_4 acuoso, $c_{LUT}^* = 3,50 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Usando estos parámetros optimizados, $E_{ac} = 0 \text{ V}$ y $t_{ac} = 120 \text{ min}$, se estudió la dependencia de $I_{p,a}$ y de Γ con la concentración de LUT. En las Figs. 4.66 y 4.67 se resumen los resultados a través de los correspondientes gráficos.

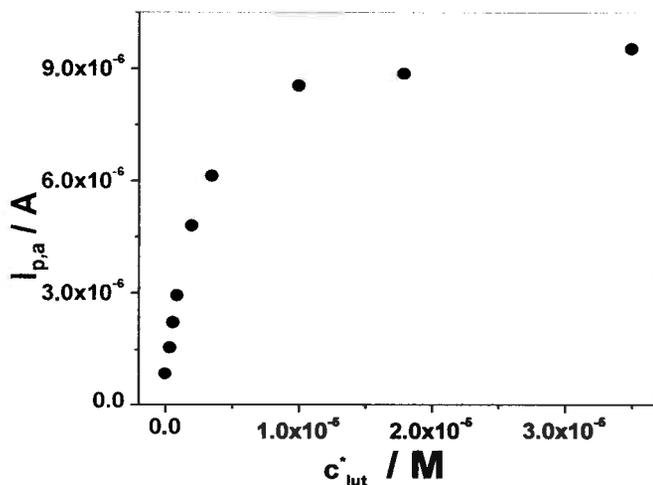


Figura 4.66. Gráfico de $I_{p,a}$ vs. c_{LUT}^* . $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, 1 M HClO_4 acuoso. $E_{ac} = 0 \text{ V}$, $t_{ac} = 120 \text{ min}$.

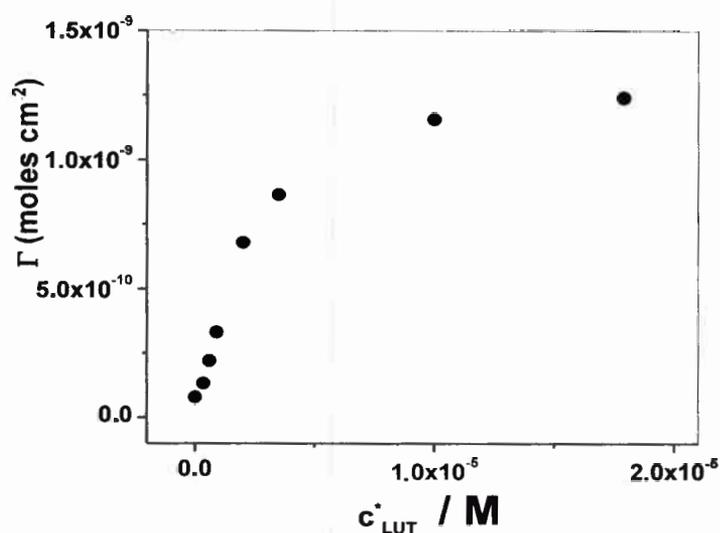


Figura 4.67. Gráfico de Γ vs. c_{LUT}^* . $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$, 1 M HClO_4 acuoso, $E_{ac} = 0 \text{ V}$, $t_{ac} = 120 \text{ min}$.

Como se observa en la Fig. 4.66 a partir de una concentración de aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ se alcanza un recubrimiento completo de la superficie del electrodo, ya que a mayores concentraciones se alcanzan valores de $I_{p,a}$ estacionarios.

El recubrimiento superficial máximo (Γ_{max}) en 1 M HClO_4 acuoso, obtenido a partir de las cargas de los picos voltamperométricos en la región de velocidades de barrido entre $0,025$ y $0,100 \text{ V s}^{-1}$ fue de $(1,3 \pm 0,4) \times 10^{-9} \text{ moles cm}^{-2}$, que concuerda razonablemente bien con el valor obtenido a partir de un gráfico de $I_{p,a}$ vs. v ($\Gamma_{max} = 2,01 \times 10^{-9} \text{ moles cm}^{-2}$). Ambos valores se diferencian del valor de Γ obtenido por el método de separación de las componentes de la corriente ($5,7 \times 10^{-10} \text{ moles cm}^{-2}$, Tabla 4.9), lo cual podría estar indicando que éste método, conlleva un mayor error, debido a las condiciones intrínsecas del mismo.

4.3.1.2. Voltamperometría de onda cuadrada

En la Fig. 4.68 se muestra un voltamperograma de onda cuadrada de LUT en una solución 1 M HClO_4 acuoso. En ella se pueden observar los tres registros de

corriente, los que evidencian la presencia de una cupla redox superficial cuasi-reversible (Mirceski y col., 2001; Tesio y col., 2011).

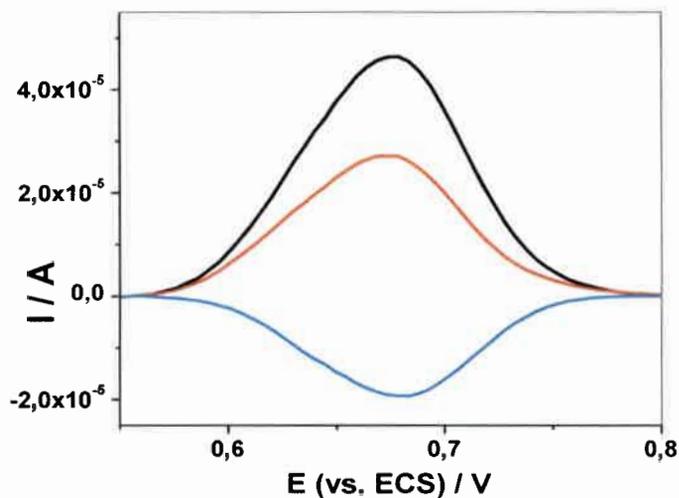


Figura 4.68. Voltamperometría de onda cuadrada. $f = 10 \text{ Hz}$. $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$. 1 M HClO_4 acuoso. $E_{ac} = 0 \text{ V}$. $t_{ac} = 120 \text{ m}$. $c_{LUT}^* = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$. (-) $I_{p,n}$; (-) $I_{p,d}$; (-) $I_{p,i}$.

A medida que ΔE_{OC} aumenta, a una dada f , el pico neto comienza a desdoblarse (Figs. 4.69 a-d). Esto permitió calcular el potencial de media onda global del sistema ($E_{1/2}$) y el coeficiente de transferencia de carga anódico ($1-\alpha$) de la cupla redox superficial, tal como se mencionó en incisos anteriores, para los casos de MOR y BUT, siendo sus valores: $E_{1/2} = (0,660 \pm 0,003)$ y $(1-\alpha) = (0,48 \pm 0,05)$.

Por otro lado, se esperaba, tal cual se predice teóricamente para este tipo de cuplas redox, que un gráfico de $I_{p,n} f^1$ vs. f mostrara un máximo cuasi-reversible (Mirceski y col., 2001). Sin embargo, esto no pudo ser observado debido, probablemente, a la superposición de la descarga electroquímica de LUT con la descarga propia del electrodo de carbono vítreo en un medio fuertemente ácido.

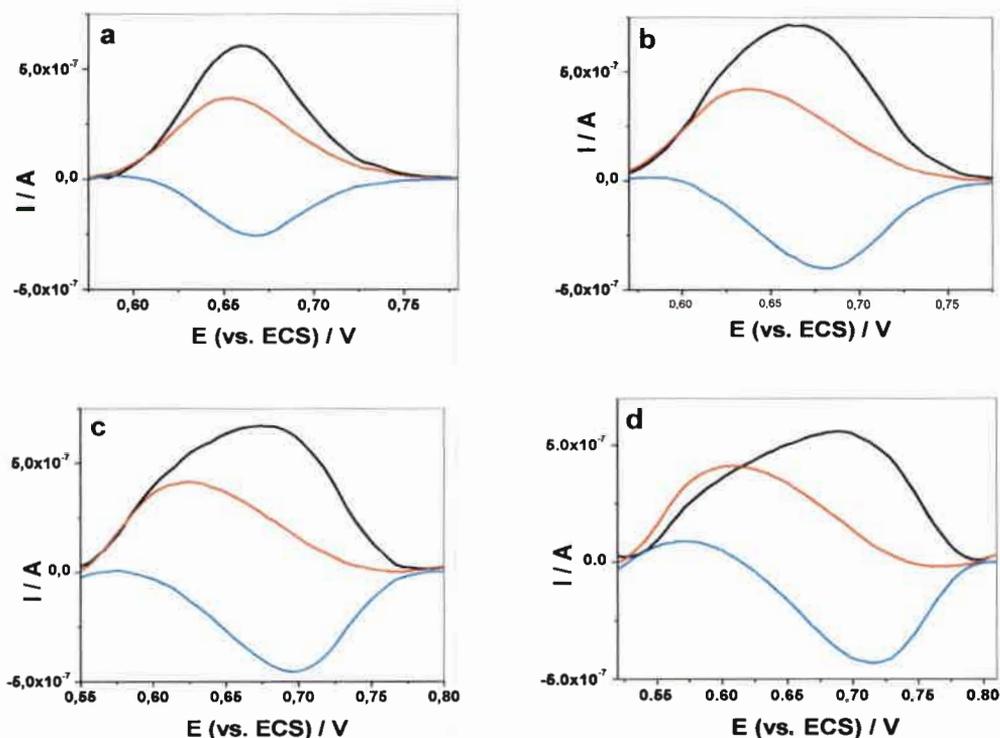


Figura 4.69. Desdoblamiento del pico de onda cuadrada en 1 M HClO_4 acuoso. $\Delta E_{oc} =$
a) 0,025V, **b)** 0,050, **c)** 0,075, **d)** 0,100, V. $\Delta E_e = 0,005$ V. $f = 10$ Hz. $E_{ac} = 0$ V. $t_{ac} =$
 120 m. $c_{LUT}^* = 1,00 \times 10^{-7}$ M. (—) $I_{p,n}$. (—) $I_{p,d}$. (—) $I_{p,i}$.

4.3.1.3. Electroquímica sobre electrodos modificados

Con el fin de mejorar las respuestas de las técnicas electroquímicas utilizadas en las experiencias con LUT, se modificaron los electrodos de carbono vítreo, tal como se describió en el capítulo “Materiales y métodos”. Bajo estas nuevas condiciones se calcularon parámetros cinéticos y termodinámicos y se optimizaron las condiciones experimentales, para poder utilizar estos electrodos con fines analíticos. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

4.3.1.3.1. Optimización de las condiciones experimentales

4.3.1.3.1.1. Potencial de acumulación

Se estudió la dependencia de la corriente de pico neta de las experiencias de voltamperometría de onda cuadrada con la variación del potencial de acumulación, en

1M HClO₄ acuoso, manteniendo fijas tanto la concentración de LUT, como el tiempo de acumulación (t_{ac}) y los parámetros de la voltamperometría de onda cuadrada.

El intervalo de potenciales de acumulación que se estudió fue desde -0,300 a 0,800 V, teniendo en cuenta además, el potencial de circuito abierto (PCA) del sistema, el cual, no fue constante en el tiempo, ya que mientras LUT se absorbe sobre la superficie del electrodo de CV modificado, dicho potencial varió desde 0,530 a 0,490 V (aproximadamente), para un tiempo de acumulación de 20 min.

En la Fig. 4.70 se muestran los puntos experimentales de este estudio. Cabe aclarar que, para agregar al gráfico de $I_{p,n}$ vs. E_{ac} el punto de PCA se eligió, como valor de potencial, aquel que el sistema alcanzó al finalizar el tiempo de acumulación (0,490 V). En base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar como $E_{ac} = 0,550$ V.

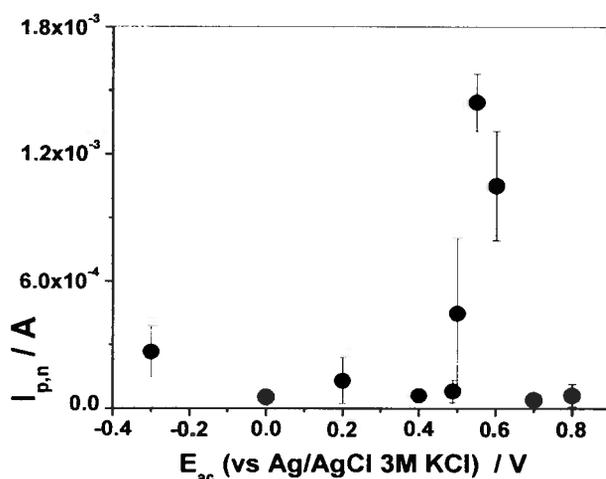


Figura 4.70. Gráfico de la variación de la corriente de pico neta de los voltamperogramas de onda cuadrada, en función del potencial de acumulación, en 1 M HClO₄ acuoso. $c_{LUT}^* = 1,75 \times 10^{-6}$ M. $t_{ac} = 1200$ s.

4.3.1.3.1.2. Tiempo de acumulación

Una vez determinado el potencial de acumulación óptimo, se determinó el tiempo de acumulación más adecuado para llevar a cabo las experiencias. Para ello, se fijó el potencial de acumulación, y se estudió la dependencia de la corriente de pico neta de los voltamperogramas de onda cuadrada, con respecto al tiempo de acumulación. Como se puede observar en la Fig. 4.71, este estudio se realizó en soluciones de

diferentes concentraciones de LUT. Se encontró que aún en concentraciones altas, se alcanza un estado estacionario de corriente en tiempos de acumulación muy prolongados. Por este motivo, se decidió utilizar un t_{ac} de 20 min, teniendo en cuenta una situación de compromiso entre la intensidad de la señal electroquímica y el tiempo que se requiere para la realización de las experiencias.

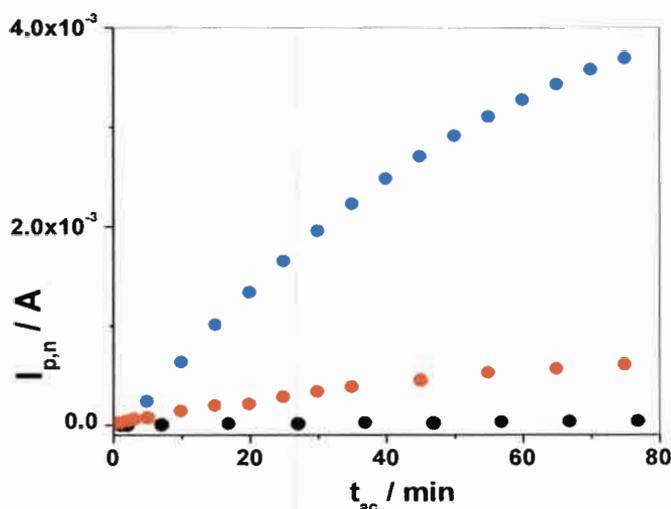


Figura 4.71. Gráficos de la corriente de pico neta de los voltamperogramas de onda cuadrada en función del tiempo de acumulación, en 1 M HClO₄ acuoso. c_{LUT}^* (\bullet) = $1,75 \times 10^{-6}$ M, (\bullet) $1,75 \times 10^{-7}$ M y (\bullet) $1,00 \times 10^{-9}$ M. $E_{ac} = 0,550$ V.

Cuando el tiempo de acumulación fue muy prolongado, aproximadamente 15 h, se encontró que la señal electroquímica presentó cambios, tal como la aparición de un pre-pico en los voltamperogramas cíclicos (Fig. 4.72a) y la modificación de las corrientes de pico anódica y catódica en los voltamperogramas de onda cuadrada (Fig. 4.72b), haciendo que el pico neto pierda definición.

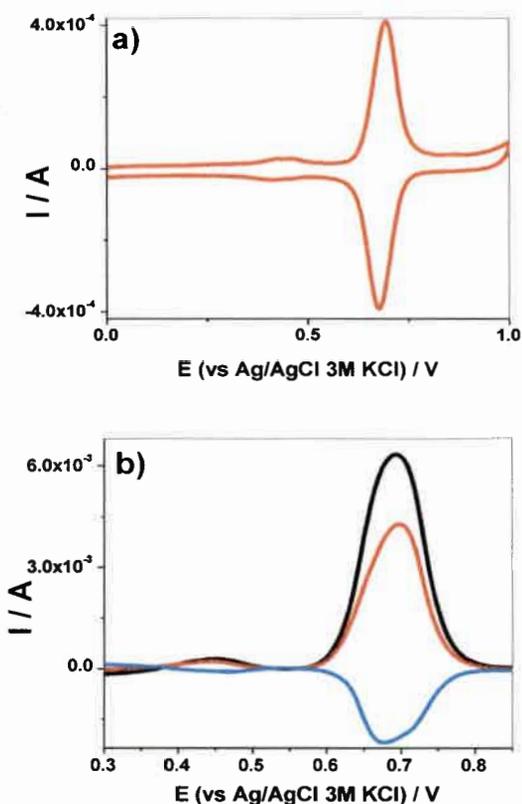


Figura 4.72. Voltamperogramas **a)** cíclico y **b)** de onda cuadrada, sobre electrodo de CV-NTC+PEI en solución de LUT en 1 M HClO₄ acuoso. $c_{LUT}^* = 1,75 \times 10^{-6}$ M, $t_{ac} = 15$ h, $E_{ac} = PCA$.

4.3.1.3.1.3. Estudios de comparación de electrodos modificados

Con el t_{ac} y el E_{ac} optimizados, se realizaron estudios de comparación de los electrodos. Para ello, se modificaron 5 electrodos de CV diferentes con NTC+PEI y se registraron voltamperogramas de onda cuadrada en la misma solución de LUT, manteniendo todas las demás condiciones experimentales constantes. Para una concentración de LUT $1,75 \times 10^{-7}$ M, se obtuvo una $I_{p,n}$ de 37 μ A, con una desviación estándar de 6 μ A. En la Fig. 4.73 se muestra el gráfico que resume los resultados de estas experiencias. En base a ellos, puede decirse que se logra obtener señales voltamperométricas muy similares entre los diferentes electrodos con muy buena reproducibilidad.

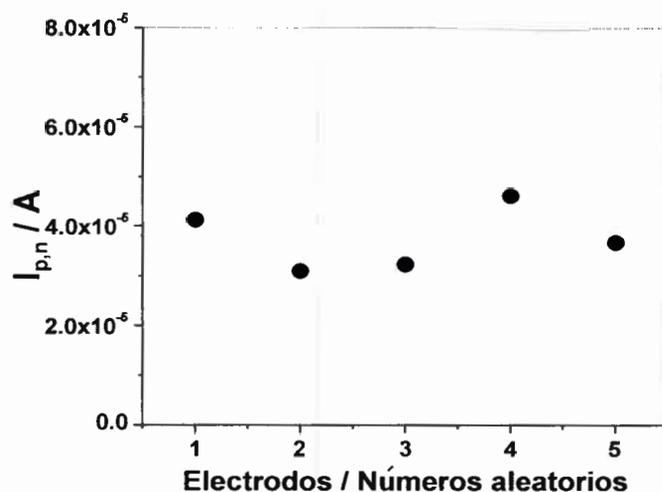


Figura 4.73. Estudio de comparación entre cinco electrodos modificados. $c_{LUT}^* = 1,75 \times 10^{-7} M$. $t_{ac} = 1200 s$. $E_{ac} = 0,550 V$.

4.3.1.3.2. Curva de calibrado

Una vez determinados todos los parámetros óptimos para la determinación electroquímica de LUT y, conociendo que las medidas realizadas con estos parámetros optimizados con cinco electrodos modificados diferentes fueron comparables, se realizó una curva de calibrado de LUT empleando el reactivo comercial (Fig. 4.74). La misma mostró muy buenos parámetros analíticos, con un intervalo lineal entre $1,0 \times 10^{-9}$ y $1,75 \times 10^{-6} M$, pendiente = $(124 \pm 5) A M^{-1}$, ordenada al origen = $-(2 \pm 1) \times 10^{-6} A$ y coeficiente de correlación lineal $r = 0,9950$. En la Tabla 4.10 se resumen los parámetros analíticos del sensor utilizado en la cuantificación de LUT.

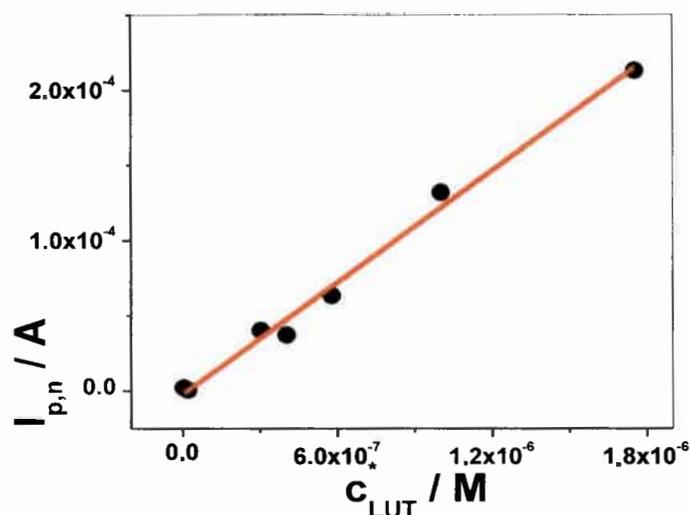


Figura 4.74. Curva de calibración de LUT obtenida en 1 M HClO₄ acuoso, empleando el reactivo comercial. (●) puntos Experimentales. (–) Recta que mejor ajustó los puntos experimentales. $t_{ac} = 1200$ s, $E_{ac} = 0,550$ V.

Tabla 4.10. Parámetros analíticos del electrodo utilizado en la determinación analítica de LUT.

Intervalo lineal (μM)	LOD (μM) ^{a)} Señal/Ruido 3:1	LOQ (μM) ^{b)} Señal/Ruido 10:1	Sensibilidad ($A M^{-1}$)
0,001-1,75	0,0005	0,0015	124

^{a)} Límite de detección y ^{b)} límite de cuantificación.

4.3.1.3.3. Cálculo de parámetros cinéticos y termodinámicos

Cuando se modificó el electrodo de carbono vítreo, se observó, tal como se muestra en la Fig. 4.75, que el desdoblamiento del pico neto en los voltamperogramas de onda cuadrada a una dada frecuencia se definió mejor. Así, se determinaron valores de $E_{1/2} = (0,658 \pm 0,005)$ y de $(1-\alpha) = (0,51 \pm 0,03)$ para la cupla redox superficial de LUT, sobre estos electrodos modificados.

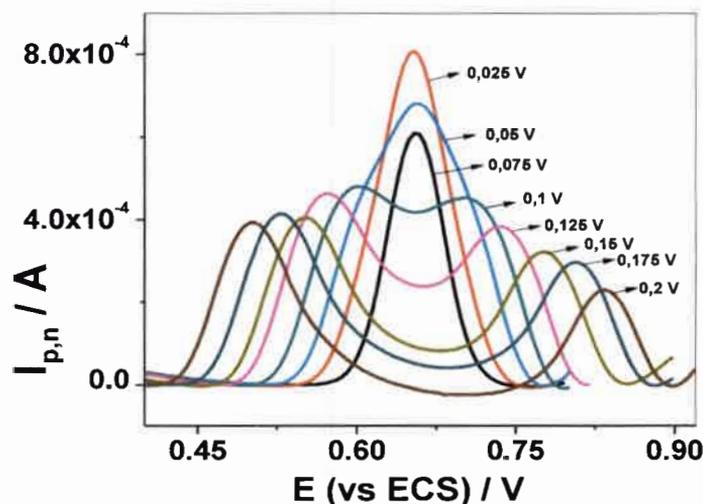


Figura 4.75. Voltamperogramas de onda cuadrada en solución de LUT, a distintas amplitudes la de onda cuadrada. $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$, $E_{ac} = \text{P.C.A.}$ $t_{ac} \approx 15 \text{ h}$. $c_{\text{LUT}}^* = 3,50 \times 10^{-8} \text{ M}$. Los valores de ΔE_{oc} se indican en el interior de la figura.

Además, a pesar de estar en un medio fuertemente ácido, se consiguió realizar un gráfico de $I_{p,n} f^{-1}$ vs. f en donde se encontró un máximo cuasi-reversible (Fig. 4.76), que pudo ser aproximado por una función parabólica y, como se mencionó anteriormente, se calculó un valor de f_{max} promedio obtenida experimentalmente, el cual fue de $(30 \pm 2) \text{ Hz}$. La constante de velocidad heterogénea global (k_s) se determinó utilizando un valor de $\omega_{\text{max}} = 0,89$, el cual se obtuvo de la Tabla 2.3 de la Ref. Mirceski y col., 2007, para $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$ y $(1-\alpha) = 0,51$. Su valor fue, $k_s = (31 \pm 2) \text{ s}^{-1}$.

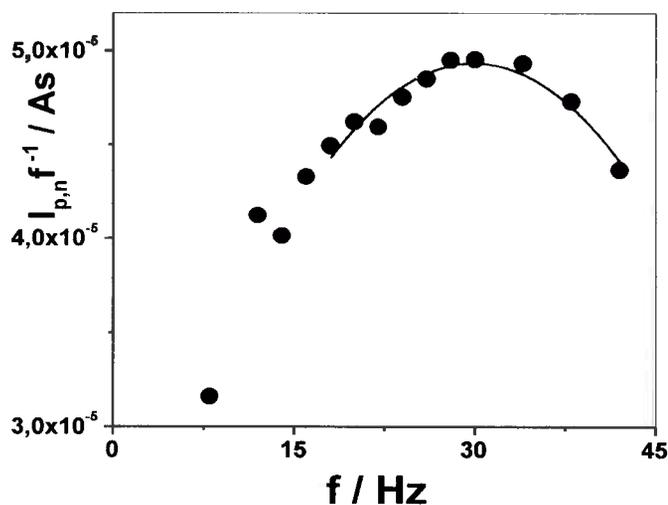


Figura 4.76. Gráfico de $I_{p,n} f^{-1}$ vs. f . $\Delta E_e = 0,005V$. $\Delta E_{oc} = 0,025V$. $E_{ac} = PCA$. $t_{ac} \approx 15$ h. $c_{LUT}^* = 3,50 \times 10^{-8} M$.

4.3.1.4. Determinación de luteolina y rutina mediante HPLC

Con el objetivo de poder corroborar los resultados experimentales, obtenidos electroquímicamente, se decidió, realizar las mismas determinaciones de LUT pero con un método alternativo, en este caso, se optó por utilizar la cromatografía HPLC, ya que éste es el método más utilizado en la determinación de flavonoides.

4.3.1.4.1. Curva de calibración de luteolina y rutina mediante HPLC

Para poder tener una herramienta para realizar la mencionada comparación, se generaron curvas de calibración, para cada uno de los compuestos a cuantificar. Para ello, se prepararon soluciones de distintas concentraciones, tanto en LUT como en rutina (RUT) y se realizaron las corridas cromatográficas en un equipo HPLC. Se cuantificó RUT dado que la misma se presenta como interferente en el suplemento dietario utilizado en la cuantificación de LUT (ver inciso 4.3.1.5.2. Cuantificación de luteolina en una formulación comercial).

En los cromatogramas realizados bajo las condiciones experimentales que se describen en el Capítulo 3, LUT presentó un pico, a un tiempo de retención de

aproximadamente 28,5 min, siendo el mismo muy agudo y bien definido. RUT mostró un pico, a un tiempo de retención de aproximadamente 18,9 min, la señal del mismo fue menos intensa que la del pico de LUT (Fig. 4.77).

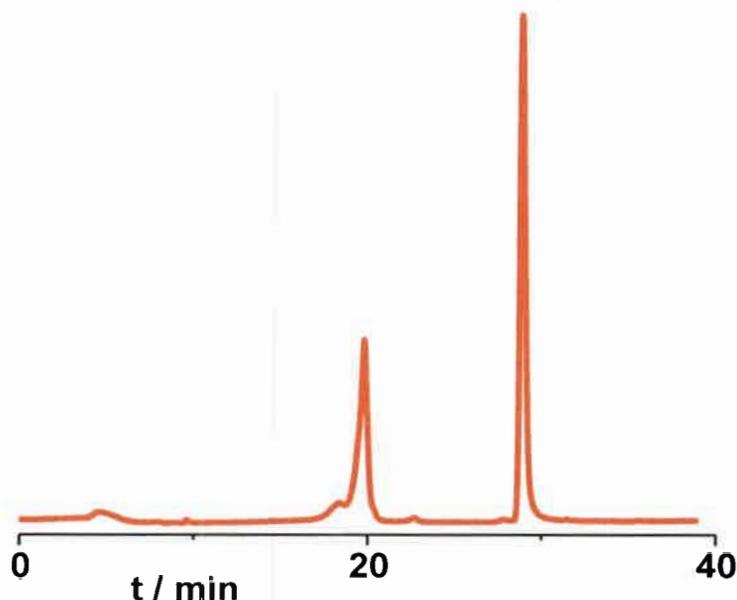


Figura 4.77. *Cromatograma de HPLC de una mezcla de soluciones de LUT y RUT en donde se observa diferencia en los tiempos de elución de ambos flavonoides.*

Una vez registrados los cromatogramas y, haciendo uso de los valores de las áreas de los picos de LUT y RUT previamente mencionados, se generaron las correspondientes curvas de calibración.

En el caso de la curva de calibración de LUT (Fig. 4.78), las áreas de los picos fueron analizadas a $\lambda = 349$ nm, ya que éste es el valor del máximo de adsorción de LUT en metanol. Los valores de la recta que mejor ajustó los puntos experimentales fueron: ordenada al origen = $-(2 \pm 1) \times 10^5$, pendiente = $(6,3 \pm 0,3) \times 10^{10}$, $r = 0,9948$ (Tesio y col., en redacción (a)).

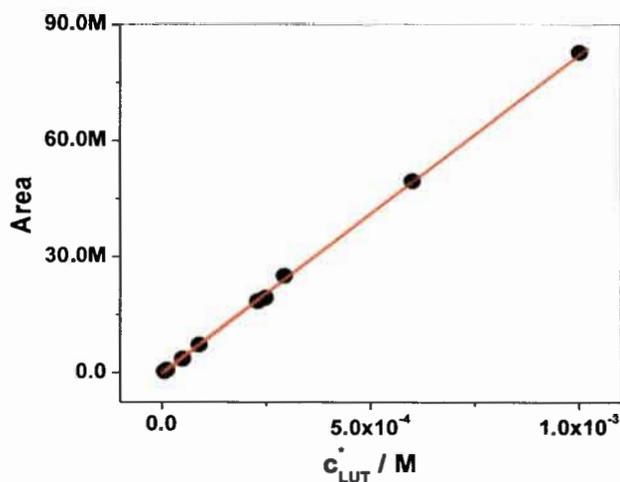


Figura 4.78. Curva de calibración de LUT mediante HPLC. (●) puntos experimentales, (—) regresión lineal que mejor ajustó los puntos experimentales.

En el caso de la curva de calibración de RUT (Figs. 4.79), las áreas de los picos cromatográficos fueron analizadas a $\lambda = 356 \text{ nm}$, ya que éste es el valor del máximo de adsorción de RUT en metanol. Los valores de la recta que mejor ajustó los puntos experimentales fueron: ordenada al origen = $-(4 \pm 3) \times 10^5$, pendiente = $(8,3 \pm 0,2) \times 10^{10}$, $r = 0,9981$ (Tesio y col., en redacción (a)).

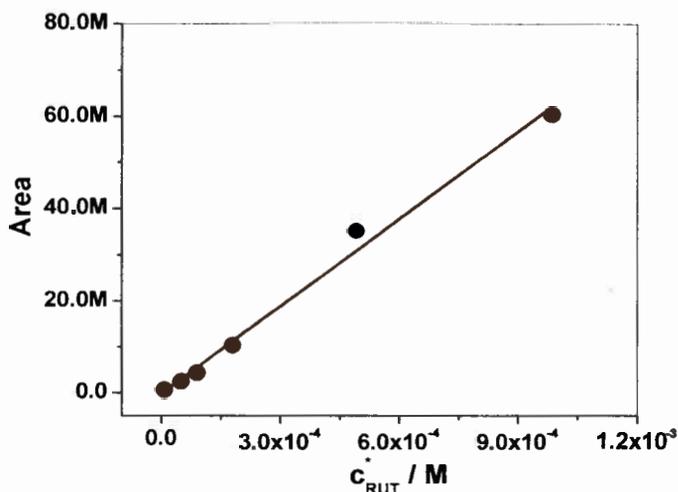


Figura 4.79. Curva de calibración de RUT mediante HPLC. (●) puntos experimentales, (—) regresión lineal que mejor ajustó los puntos experimentales.

4.3.1.5. Cuantificación de luteolina en muestras reales

4.3.1.5.1. Cuantificación de luteolina en cáscaras de maní

4.3.1.5.1.1. Estudios electroquímicos

Luego de seguir el protocolo de extracción de LUT descrito en el capítulo 2, se realizaron voltamperogramas de onda cuadrada, en las condiciones determinadas como óptimas para el estudio de LUT sobre electrodos de CV modificados con NTCPM/PEI.

Las respuestas voltamperométricas obtenidas, fueron similares a aquellas registradas en soluciones de LUT comercial.

Como puede observarse en la Fig. 4.80 una dilución del extracto metanólico, obtenido de las cáscaras de maní, en 1 M HClO₄ acuoso, muestra una $I_{p,n} = 6,2 \times 10^{-5}$ A. A partir de la curva de calibración realizada para LUT sobre electrodos de CV modificados con NTCPM/PEI, se pudo calcular que la c_{LUT}^* en la celda electroquímica fue de $1,95 \times 10^{-7}$ M, con lo cual, teniendo en cuentas las diluciones de trabajo utilizadas y la repeticiones realizadas, se obtiene que la c_{LUT}^* en la cáscara de maní fue $(1,3 \pm 0,2)$ % p/p.

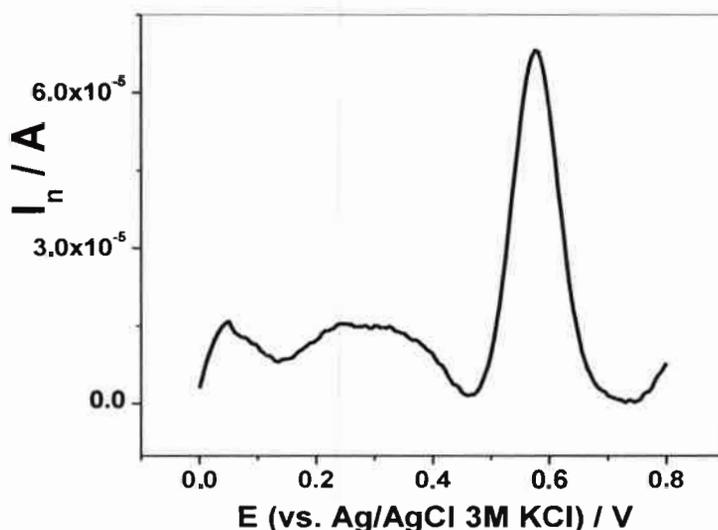


Figura 4.80. Voltamperograma de onda cuadrada en solución del extracto metanólico de cáscara de maní, diluido en 1 M HClO₄.

Estos resultados concuerdan razonablemente bien, con los valores informados para maníes maduros, informados en la literatura (Yen y col., 1993). Estos autores informan que la c_{LUT}^* varía entre 0,193 y 2,86 % (p/p) en cáscara entre 74 y 144 días después de sembrada la oleaginosa.

4.3.1.5.1.2. Determinación de la presencia de luteolina extractos de cáscara de maní mediante HPLC

En la Figs. 4.81 a y c se observan dos cromatogramas de extractos de cáscaras de maní. La presencia de LUT en estos pudo ser corroborada, mediante HPLC, puesto que, en el tiempo de retención de LUT, el cual es conocido bajo estas condiciones experimentales, apareció un pico, cuyo espectro uv-visible coincidió exactamente con el de este flavonoide en solución metanólica (Fig. 4.82).

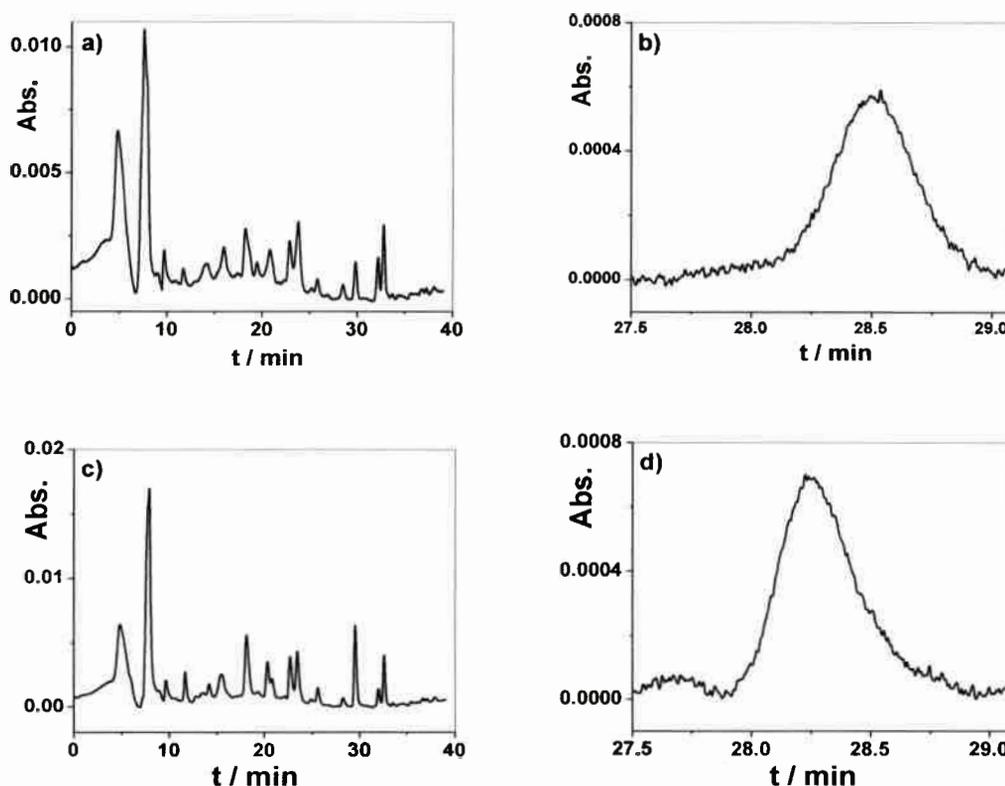


Figura 4.81. Cromatogramas HPLC de extractos metanólicos de cáscara de maní. *a y c) cromatograma completo. b y d) Ampliación de la zona próxima al tiempo de retención de LUT (28,5 min).*

Como puede observarse en las Figs. 4.81 b y d, el valor del área del pico cromatográfico obtenido a partir de las soluciones de los extractos, fue demasiado pequeño como para poder cuantificarlo con la curva de calibración generada a partir del reactivo comercial. Es por ello, que en este caso, la comparación sólo es realizada con lo informado en la bibliografía (Tesio y col., en redacción (a)).

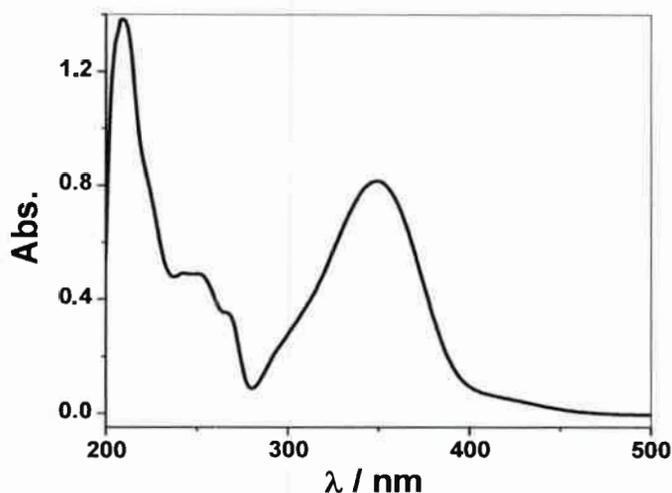


Figura 4.82. Espectro uv-visible de LUT en solución metanólica. $c_{LUT}^* = 1,00 \times 10^{-5} M$.

4.3.1.5.2. Cuantificación de luteolina en una formulación comercial

4.3.1.5.2.1. Estudios electroquímicos previos

Se adquirieron comercialmente pastillas de un suplemento dietario, llamado LUTIMAX, cuyo envase se puede observar en la Fig. 4.83 Los fabricantes del mismo, mediante su publicidad en la página web, declaran que el suplemento contiene el antioxidante LUT. Una vez adquirido, se encontró que el mismo, en su prospecto, indica contener como constituyente principal, además de LUT, otro antioxidante de la familia de los flavonoides, rutina (RUT), cuya estructura molecular se muestra en la Fig. 4.84.



Figura 4.83. Envase del suplemento dietario LUTIMAX.

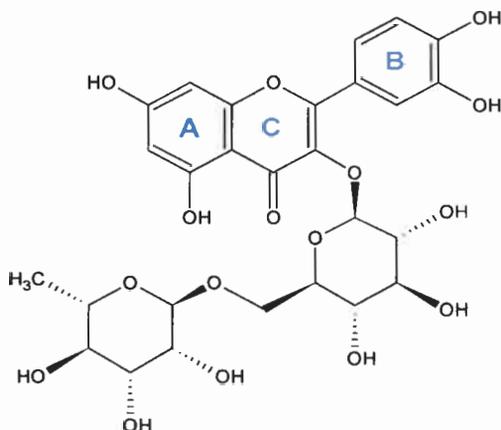


Figura 4.84. Estructura química de rutina.

Al contener la misma cantidad de miligramos de ambos antioxidantes (100 mg/pastilla) y, al tener dichos antioxidantes diferentes pesos moleculares, una vez disuelta la pastilla, la concentración molar de ambos difiere apreciablemente. Sabiendo que $PM_{LUT} = 286,24 \text{ g/mol}$ y $PM_{RUT} = 610,51 \text{ g/mol}$, el contenido de cada flavonoide en la pastilla es de $3,49 \times 10^{-4}$ y $1,64 \times 10^{-4}$ moles de LUT y RUT por pastilla, respectivamente. Las pastillas tuvieron un peso promedio de $(0,366 \pm 0,003) \text{ g}$.

En las Figs. 4.85 a y b se muestran los voltamperogramas cíclico y de onda cuadrada, obtenidos sobre el electrodo de CV desnudo para el extracto etanólico del

suplemento dietario. En ambos casos se observa una total superposición de los picos de oxidación de LUT y RUT.

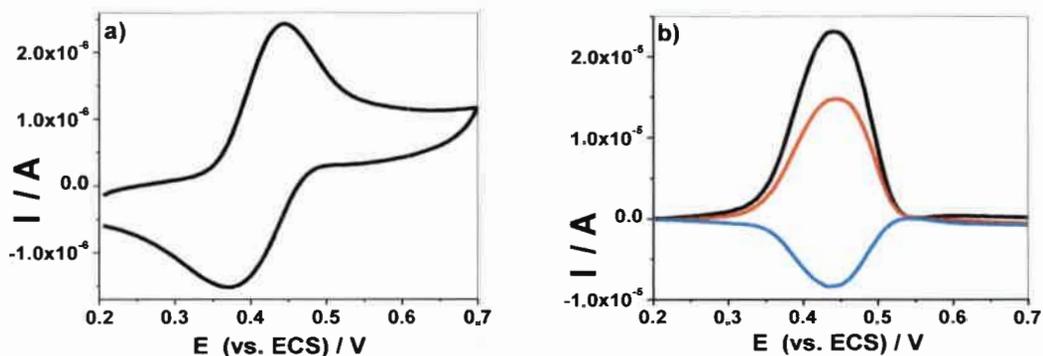


Figura 4.85. Voltamperogramas **a)** cíclico y **b)** de onda cuadrada obtenidos sobre el electrodo de carbono vítreo desnudo, para la solución etanólica de LUTIMAX en $1 \times 10^{-4} \text{ M HClO}_4 + 0,1 \text{ M NaClO}_4$.

Resultados similares, se obtuvieron con electrodos de CV modificados con NTCPM/PEI (Fig. 4.86).

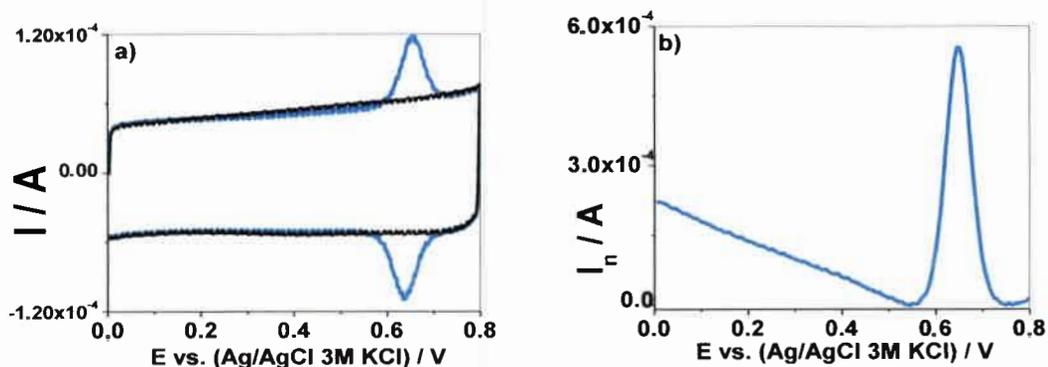


Figura 4.86. Voltamperogramas **a)** cíclicos y **b)** de onda cuadrada obtenidos sobre el electrodo de CV modificado con NTCPM/PEI, en solución etanólica de LUTIMAX en 1 M HClO_4 y (—) voltamperograma cíclico en solución del blanco.

Como puede observarse, LUT y RUT sólo difieren estructuralmente en cuanto al glucósido que RUT presenta en el anillo C (comparar Figs. 1.7 y 4.84). Debido a ello, se realizaron pruebas electroquímicas con el fin de conocer si existían diferencias en las

señales de oxidación. En las Figs. 4.87 a y b se puede observar que, en una mezcla equimolar de LUT y RUT, se observa un solo pico de oxidación electroquímica, típico de un sistema adsorbido y cuasi-reversible. Este comportamiento se observó en los distintos medios de reacción y concentraciones estudiadas. Así, en la Fig. 4.87a se muestra el voltamperograma cíclico obtenido para la mezcla equimolar de ambos antioxidantes en el medio de reacción: 1 M HClO₄ acuoso, a una $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ cuando la concentración de los antioxidantes fue $1 \times 10^{-6} \text{ M}$; mientras en la Fig. 4.87b el voltamperograma cíclico se registró para una concentración $1,75 \times 10^{-5} \text{ M}$ de ambos componentes de la mezcla, a una $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ y en el medio de reacción: $1 \times 10^{-4} \text{ M HClO}_4 + 0,1 \text{ M NaClO}_4$.

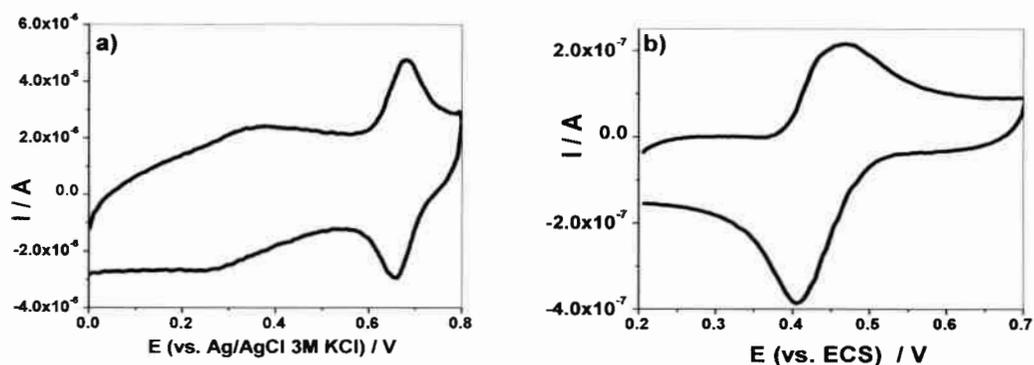


Figura 4.87. Voltamperogramas cíclicos sobre un electrodo de carbono vítreo: **a)** en solución equimolar de LUT/RUT $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ en 1 M HClO_4 , $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$; **b)** en solución equimolar de LUT/RUT $1,75 \times 10^{-5} \text{ M}$ en $1 \times 10^{-4} \text{ M HClO}_4 + 0,1 \text{ M NaClO}_4$, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$.

Sobre la base de estos resultados, se decidió proceder a separar los antioxidantes, mediante extracciones simples, para realizar su cuantificación.

4.3.1.5.2.2. Cromatografía en capa fina

Se preparó, tal como se describe a continuación, una mezcla de solventes, formada por, benceno:acetato de etilo:ácido acético, en proporciones 70:25:5, respectivamente, la cual fue llamada BEF, y utilizada como solvente de corrida (Cetkovic y col., 2003). Luego, se sembraron en una placa cromatográfica los tres

extractos de LUTIMAX y, junto a ellos, con fines comparativos, las dos soluciones de los reactivos comerciales de los flavonoides de interés, disueltos en etanol.

Haciendo uso de una cuba cromatográfica, se realizaron las corridas de TLC, con el fin de detectar la presencia o la ausencia de LUT en los diferentes extractos (Fig. 4.88).

TLC 1: Solvente de corrida: BEF

Calle 1: LUT comercial

Calle 2: RUT comercial

Calle 3: LUTIMAX en etanol

Calle 4: LUTIMAX en agua

Calle 5: LUTIMAX en agua/etanol

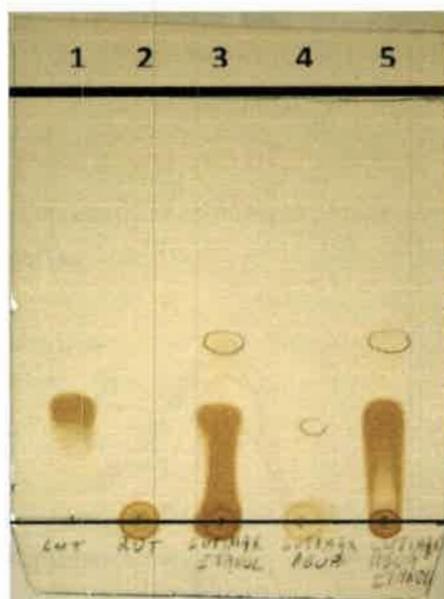


Figura 4.88. Placas de cromatografía de capa fina (TLC 1).

Se pudo observar en TLC 1:

Calle 1: LUT comercial muestra una mancha cromatográfica.

Calle 2: RUT comercial no corre en esta mezcla de solventes.

Calle 3: El extracto de LUTIMAX disuelto en etanol muestra un frente con una mancha que puede ser identificada como LUT. Sin embargo, se observa, además, una mancha con un R_f mayor al de LUT. Dicha mancha no fue identificada.

Calle 4: LUTIMAX en agua muestra una pequeña mancha con R_f semejante al de LUT, no observándose la mancha con el R_f mayor, indicada previamente.

Calle 5: LUTIMAX en agua/etanol muestra un frente similar al del extracto de LUTIMAX en etanol y también la mancha no identificada, con R_f mayor.

El extracto de LUTIMAX en etanol, así como el LUTIMAX en agua/etanol contienen LUT, mientras que el extracto de LUTIMAX en agua no contiene cantidades considerables de este antioxidante (Fig. 4.88, calles 3, 4 y 5).

4.3.1.5.2.3. Electroquímica en solución de los extractos

Se preparó una solución del extracto etanólico de LUTIMAX, agregando 100 μL de solución de LUTIMAX en etanol a 10 mL de una solución de HClO_4 1×10^{-4} M + 0,1 M NaClO_4 . Se realizaron voltamperogramas cíclicos de esta solución (Fig. 4.89).

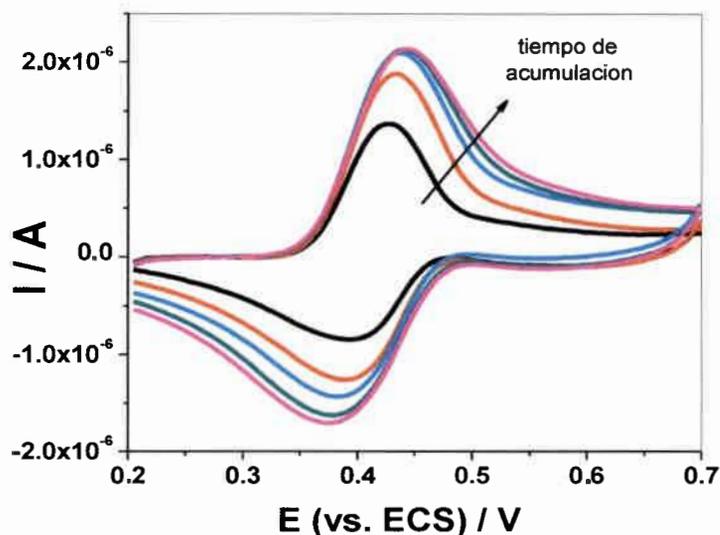


Figura 4.89. Voltamperogramas cíclicos de una solución del extracto de LUTIMAX en etanol. (-) $t_{ac} = 0$; (-) $t_{ac} = 3$; (-) $t_{ac} = 7$; (-) $t_{ac} = 14$; y (-) $t_{ac} = 21$ min. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.
Medio de reacción: $1 \times 10^{-4} \text{ M HClO}_4 + 0,1 \text{ M NaClO}_4$.

Se puede observar que a medida que aumentó el tiempo de acumulación (t_{ac}) la señal de corriente fue aumentando, hasta estabilizarse, aproximadamente a los 15-20 min. Este comportamiento es similar al encontrado en soluciones de LUT preparadas a partir del reactivo comercial. Una vez estabilizada la señal, se procedió a agregar alícuotas de LUT, de concentración conocida, en la celda electroquímica a los efectos de estudiar el comportamiento de la señal bajo estas nuevas condiciones (Fig. 4.90).

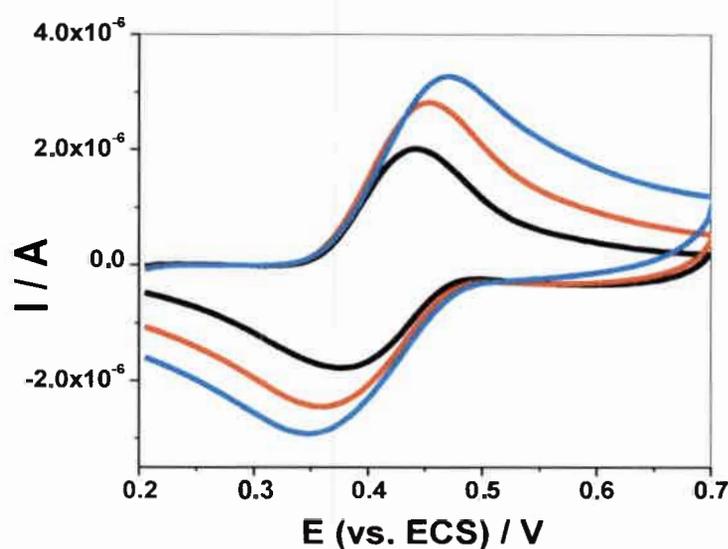


Figura 4.90. Voltamperogramas cíclicos: (-) de solución del extracto de LUTIMAX en etanol; (-) el mismo extracto + 30 μL de LUT $3,5 \times 10^{-3}$ M y (-) el mismo extracto + 60 μL de LUT $3,5 \times 10^{-3}$ M. $t_{ac} = 20$ min. Las demás condiciones experimentales son iguales a las de la Fig. 4.89.

Se puede observar cómo, a medida que se incrementa la concentración de LUT en la celda, también se incrementa la señal y, a su vez, el potencial de pico anódico se desplaza hacia valores más positivos.

De la misma manera, se procedió con el extracto de LUTIMAX en agua/etanol; Se preparó una solución del extracto, agregando 100 μL de solución de LUTIMAX en agua/etanol en 10 mL de solución 1×10^{-4} M HClO_4 + 0,1 M NaClO_4 . Se registraron los siguientes voltamperogramas cíclicos (Fig. 4.91).

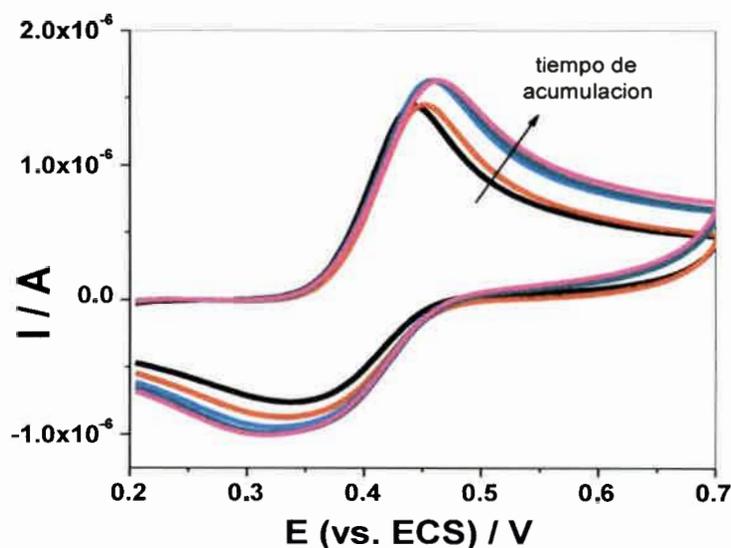


Figura 4.91. Voltamperogramas cíclicos de la solución del extracto de LUTIMAX en agua/etanol. (-) $t_{ac} = 0$; (-) $t_{ac} = 3$; (-) $t_{ac} = 8$; (-) $t_{ac} = 13$; y (-) $t_{ac} = 18$ min. Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 4.89.

Se puede notar que, si bien, en el caso del extracto de agua/etanol se obtuvieron valores de corrientes menores, lo cual estaría indicando que la concentración de moléculas electroactivas es menor, se pudo haber eliminado RUT, ya que es más soluble en agua. El comportamiento de la señal fue similar al caso del extracto de LUTIMAX en etanol, llegando a condiciones de corriente de pico constante una vez alcanzado un t_{ac} de aproximadamente 20 min. Una vez estabilizada la señal, se procedió a agregar alícuotas de LUT de concentración conocida (Fig. 4.92).

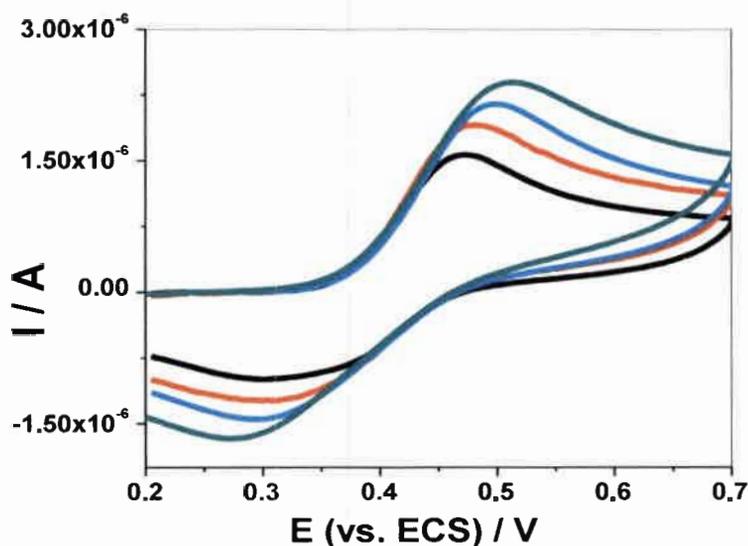


Figura 4.92. Voltamperogramas cíclicos: (-) en solución del extracto de LUTIMAX en agua/etanol; (-) el mismo extracto + 30 μL de LUT $3,5 \times 10^{-3}$ M; (-) el mismo extracto + 60 μL de LUT $3,5 \times 10^{-3}$ M. (-) el mismo extracto + 90 μL de LUT $3,5 \times 10^{-3}$ M. $t_{ac} = 20$ min. Las demás condiciones experimentales son iguales a las de la Fig. 4.89.

A modo de comparación entre ambos extractos, a continuación se muestran superpuestos los voltamperogramas cíclicos (Fig. 4.93a) y de onda cuadrada (Fig. 4.93b). En ambos casos, se puede observar cómo los extractos de etanol producen mayores señales de corriente que los extractos de agua/etanol. Por otra parte, en los voltamperogramas de onda cuadrada se observa una gran diferencia entre las intensidades de corriente de ambos extractos, producto de la diferencia de concentraciones de especies electroactiva en las soluciones.

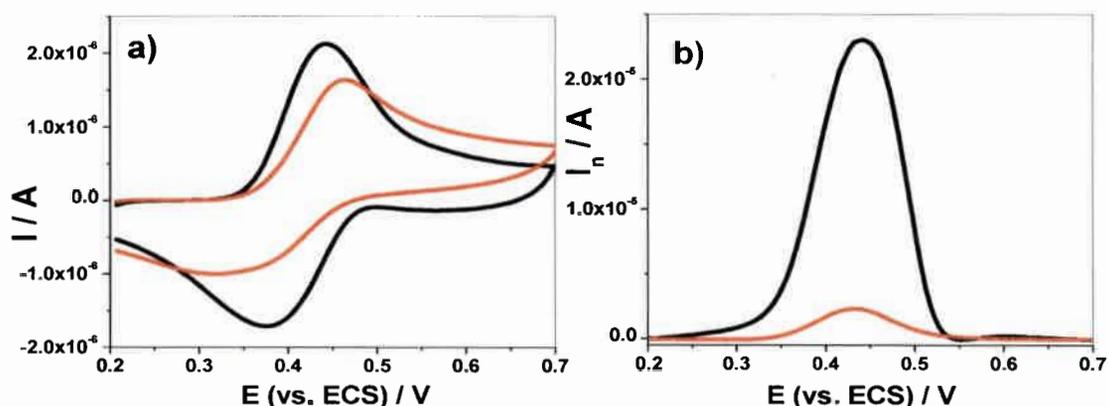


Figura 4.93. Voltamperogramas **a)** cíclicos, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ y **b)** de onda cuadrada, $f = 10 \text{ Hz}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$ y $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$. (—) de solución del extracto de LUTIMAX en etanol y (—) de solución del extracto de LUTIMAX en agua/etanol. $t_{ac} = 20 \text{ min}$. Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 4.89.

4.3.1.5.2.4. Determinación electroquímica del contenido de luteolina en los extractos etanólicos

Se realizaron voltamperogramas de onda cuadrada, en las condiciones de trabajo determinadas como óptimas para la cuantificación de LUT con electrodos de CV modificados con NTCPM/PEI, en las soluciones de los extractos etanólicos, previamente lavados con agua, de LUTIMAX. En la Fig. 4.94 se puede observar los registros obtenidos con diferentes electrodos, del mismo extracto.

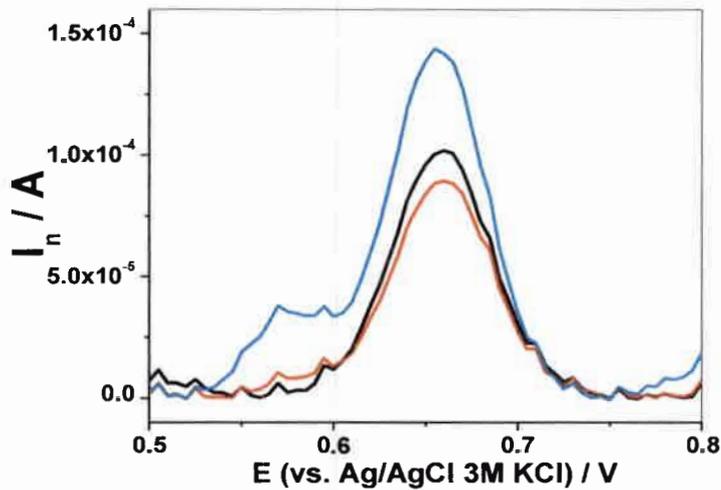


Figura 4.94. Voltamperogramas de onda cuadrada, en solución del extracto de LUTIMAX en agua/etanol.

Un análisis de estos voltamperogramas de onda cuadrada en solución del extracto, dió como valor promedio de $I_{p,n} = (1,1 \pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ A}$. Haciendo uso de la curva de calibración electroquímica de LUT se pudo calcular un valor de c_{LUT}^* (en la celda) = $9,1 \times 10^{-7} \text{ M}$. con lo cual, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se obtuvo, un valor promedio de LUT por pastilla de $(82 \pm 27) \text{ mg}$, que concuerda razonablemente bien con lo informado por el fabricante (100 mg/pastilla) (Tesio y col., en redacción (a)).

4.3.1.5.2.5. Determinación del contenido de luteolina en LUTIMAX por HPLC

Las mismas soluciones de los extractos, utilizados para la cuantificación de LUT en LUTIMAX por el método electroquímico, fueron inyectadas en un cromatógrafo HPLC, con el fin de comparar los resultados obtenidos mediante ambos métodos (Fig. 4.95).

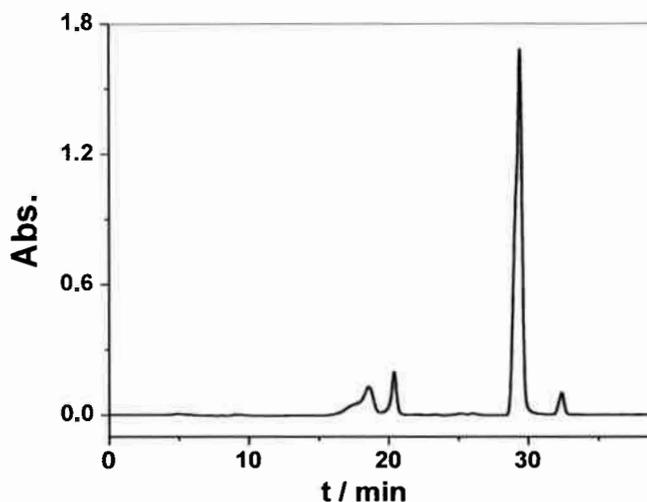


Figura 4.95. *Cromatograma HPLC de un extracto de LUTIMAX en agua/etanol.*

Así, del cromatograma anterior, se calculó el valor del área del pico centrado en 29 min, la cual fue de $6,0 \times 10^7$. Haciendo uso de la curva de calibración para la cuantificación de LUT por HPLC, se pudo calcular un valor de c_{LUT}^* (en la solución inyectada) = $9,6 \times 10^{-4}$ M. Con lo cual, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y las repeticiones realizadas, se obtuvo, un valor promedio de LUT por pastilla de (93 ± 8) mg. Así, el error relativo porcentual para la determinación de LUT entre los métodos cromatográficos y electroquímico fue del 12%.

4.3.1.5.3. Determinación simultánea del contenido de luteolina y rutina en un suplemento dietario utilizando redes neuronales artificiales

Para el análisis de los resultados, obtenidos a partir de medidas electroanalíticas de luteolina y rutina, se hizo uso de una herramienta quimiométrica, conocida como redes neuronales artificiales, dado que las señales electroquímicas de ambos compuestos presentan un alto grado de solapamiento.

Por lo tanto, se creó una red supervisada, tipo “feed-forward network”, con una capa de entrada, una oculta y una de salida. El número de neuronas de la capa de entrada fue igual al número de intensidades de corriente medidas cuando se registró

cada voltamperograma de onda cuadrada en la ventana de potencial elegida ($E_i = 0,400$ V y $E_f = 0,900$ V), es decir 101 neuronas. El número de neuronas de la capa oculta se varió, entre uno y quince, hasta encontrar la red con la que se obtuvo el menor error cuadrático medio (mse). Finalmente, la capa de salida, estuvo constituida por dos neuronas, las cuales representaron las concentraciones de rutina y luteolina.

Se utilizó un entrenamiento de la red, conocido como: “Levenberg-Marquardt backpropagation”. Las funciones de transferencia elegidas fueron: “Tansig”, para la capa oculta, y “Purelin”, para la capa de salida.

4.3.1.5.3.1. Preparación de las muestras

Para utilizar esta metodología, se prepararon mezclas de distintas concentraciones, tanto en RUT como en LUT, en HClO_4 1M acuoso, las que se detallan en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. c_{LUT}^* y c_{RUT}^* para cada muestra utilizada

Muestra	c_{LUT}^* (M)	c_{RUT}^* (M)	Muestra	c_{LUT}^* (M)	c_{RUT}^* (M)
1	$6,00 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-4}$	11	$7,50 \times 10^{-5}$	$7,50 \times 10^{-5}$
2	$6,00 \times 10^{-5}$	$3,40 \times 10^{-6}$	12	$5,00 \times 10^{-6}$	$5,00 \times 10^{-6}$
3	$1,20 \times 10^{-4}$	$6,00 \times 10^{-5}$	13	$5,00 \times 10^{-6}$	$7,50 \times 10^{-5}$
4	$6,00 \times 10^{-5}$	$6,00 \times 10^{-5}$	14	$4,00 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-6}$
5	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$	15	$7,50 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-5}$
6	$1,00 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-5}$	16	$4,00 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-5}$
7	$3,40 \times 10^{-6}$	$6,00 \times 10^{-5}$	17	$4,00 \times 10^{-5}$	$7,50 \times 10^{-5}$
8	$2,00 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$	18	$5,00 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-5}$
9	$2,00 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-4}$	19	$7,50 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-6}$
10	$6,00 \times 10^{-5}$	$6,00 \times 10^{-5}$			

Las muestras 1-10 fueron diseñadas para componer el conjunto denominado “de calibración”. Las concentraciones de las mismas fueron establecidas a través de un diseño experimental para dos factores, diseño “central compuesto” del tipo “ $2^2 +$

estrella”, rotable y con dos puntos centrales (Fig. 4.96a), en un intervalo de concentraciones para ambos analitos, entre $2,00 \times 10^{-5}$ y $1,00 \times 10^{-4}$ M.

Las muestras 11-19, fueron diseñadas con el fin de armar un conjunto de validación. Los valores de concentraciones, se fijaron, haciendo uso de un diseño factorial de 3 niveles con 2 factores (3^2) (Fig. 4.96b), en un intervalo de concentraciones para ambos analitos, entre $5,00 \times 10^{-6}$ y $7,50 \times 10^{-5}$ M.

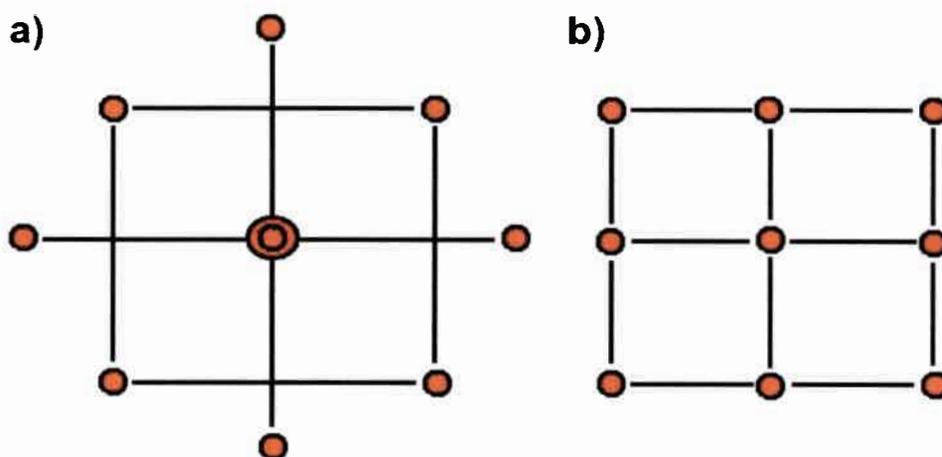


Figura 4.96. Diseños experimentales utilizados. a) diseño “central compuesto” del tipo “ $2^2 +$ estrella”, rotable y con dos puntos centrales y b) diseño factorial de 3 niveles, con 2 factores (3^2).

4.3.1.5.3.2. Resultados

Para las determinaciones experimentales se utilizaron los electrodos de CV-NTCPM/PEI y, se registraron los voltamperogramas de onda cuadrada en las condiciones óptimas, determinadas para el estudio de LUT, en cada una de las soluciones preparadas de acuerdo a la tabla 4.11. Por último, se analizaron los datos experimentales obtenidos utilizando una red neuronal artificial para determinar las concentraciones relativas de cada analito.

Previo al uso de la red neuronal para la determinación de las concentraciones en la muestra, se procedió con el armado de la misma. De esta manera, con el objetivo de determinar el número de neuronas de la capa oculta, se realizaron distintos entrenamientos variando el número de uno a quince. Durante esta etapa se utilizó el

conjunto de calibración, considerando un 80% para entrenamiento y un 20% para testear la red.

Siempre que se ejecutó la red, el número de neuronas que presentó un menor error fue variable, pero siempre menor a diez, siendo el número siete el que más veces presentó un mse más pequeño.

En la Tabla 4.12 se muestra el resultado de los errores de cada red, cuando se varió el número de neuronas. El mse más bajo se alcanzó en la red con el número de neuronas igual a siete.

Tabla 4.12. *Variación de los errores cuadráticos medios con respecto al número de neuronas de la capa oculta.*

N° de neuronas de la capa oculta	mse
1	$8,9626 \times 10^{-10}$
2	$7,6344 \times 10^{-10}$
3	$4,3841 \times 10^{-10}$
4	$9,4962 \times 10^{-10}$
5	$1,3974 \times 10^{-9}$
6	$9,2003 \times 10^{-10}$
7	$2,8360 \times 10^{-10}$
8	$4,2849 \times 10^{-10}$
9	$3,2996 \times 10^{-10}$
10	$9,1171 \times 10^{-10}$
11	$4,1285 \times 10^{-10}$
12	$4,8941 \times 10^{-10}$
13	$4,1342 \times 10^{-10}$
14	$3,0772 \times 10^{-10}$
15	$4,3020 \times 10^{-10}$

Una vez seleccionado el número de neuronas de la capa oculta, igual a siete, éste se mantuvo constante y se efectuaron nuevos entrenamientos con el fin de optimizar la red.

Para la elección de la mejor red se utilizaron como criterio los errores mse (“mean squared normalized error”), RMSE (“root mean square error”), y los errores relativos de rutina y luteolina. Durante la optimización, se hizo uso nuevamente del conjunto de voltamperogramas denominado “conjunto de calibración” (Fig. 4.97). De este conjunto, el 80% se utilizó para entrenamiento y, el 20% restante para testear la red durante los entrenamientos.

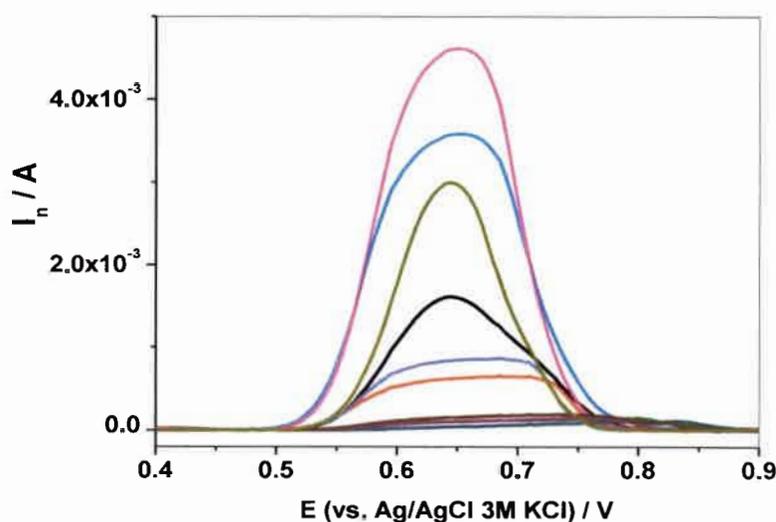


Figura 4.97. Voltamperogramas de onda cuadrada en las soluciones que formaron parte del conjunto de calibración (muestras 1-10 de la Tabla 4.11).

Además, para validar la red, cada vez que finalizó el entrenamiento de la misma, se utilizó el conjunto independiente de datos experimentales, denominado “conjunto de validación” (Fig. 4.98).

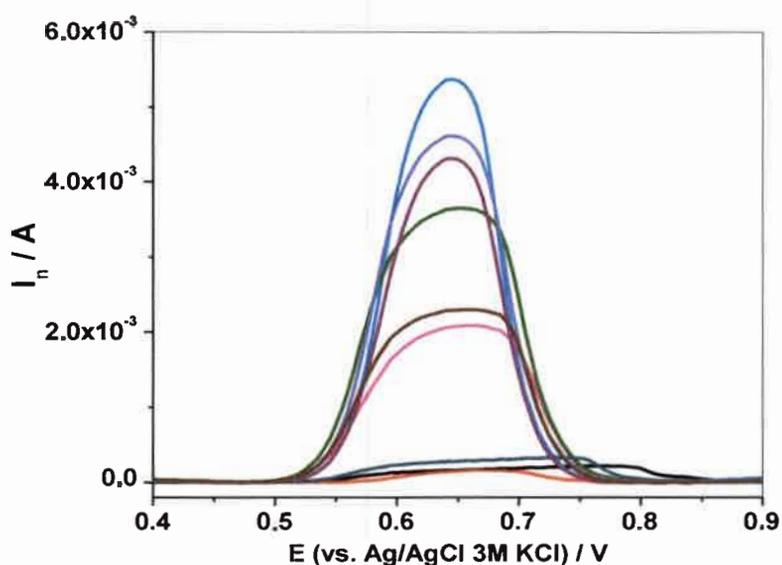


Figura 4.98. Voltamperogramas de onda cuadrada en las soluciones que formaron parte del conjunto de validación (muestras 11-19 de la Tabla 4.11).

En las Tablas 4.13 y 4.14 se muestran los valores de RMSE y mse global para el conjunto de calibración y para el conjunto de validación, respectivamente, obtenidos con la red elegida.

Tabla 4.13. Resultados de RMSE y mse obtenidos para el conjunto de calibración utilizando la mejor red.

	LUT	RUT
RMSE	$1,42 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^{-5}$
mse	$2,03 \times 10^{-10}$	$3,62 \times 10^{-10}$

Tabla 4.14. Resultados de RMSE y mse obtenidos para el conjunto de validación utilizando la mejor red.

	LUT	RUT
RMSE	$1,52 \times 10^{-5}$	$5,01 \times 10^{-5}$
mse	$2,30 \times 10^{-10}$	$2,51 \times 10^{-11}$

Con esta red, cuyo mse, resultó ser menor al de todas las redes probadas, se obtuvieron los valores de concentraciones de LUT y RUT para el conjunto de calibración durante el entrenamiento y, para el conjunto de validación, una vez entrenada la red, las que se resumen en la tabla 4.15.

Tabla 4.15. Resultados obtenidos. Discriminado por conjunto de calibración y conjunto de validación.

c_{LUT}^* real	c_{RUT}^* real	c_{LUT}^* Calculada	c_{RUT}^* Calculado	Error relativo en la c_{LUT}^*	Error relativo en la c_{RUT}^*
Conjunto de calibración					
$6,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,64738 \times 10^{-5}$	$1,55881 \times 10^{-6}$
$6,0 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$6,00005 \times 10^{-5}$	$3,4003 \times 10^{-6}$	$8,4417 \times 10^{-4}$	0,00888
$1,2 \times 10^{-4}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$1,15211 \times 10^{-4}$	$6,37503 \times 10^{-5}$	3,99078	6,25054
$6,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$1,04818 \times 10^{-4}$	$1,2008 \times 10^{-4}$	74,69672	100,13317
$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$9,99999 \times 10^{-5}$	$1,40653 \times 10^{-6}$	$6,49363 \times 10^{-5}$
$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,3533 \times 10^{-5}$	$6,90825 \times 10^{-5}$
$3,4 \times 10^{-6}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$3,4018 \times 10^{-6}$	$6,00009 \times 10^{-5}$	0,05287	0,00155
$2,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$1,99995 \times 10^{-5}$	$1,99998 \times 10^{-5}$	0,00227	0,00118
$2,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$9,99998 \times 10^{-5}$	$8,39321 \times 10^{-5}$	$1,57074 \times 10^{-4}$
$6,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$5,92755 \times 10^{-6}$	$7,05533 \times 10^{-5}$
Conjunto de validación					
$7,5 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$1,41692 \times 10^{-5}$	$5,55512 \times 10^{-5}$
$5,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$5,00007 \times 10^{-6}$	$5,00012 \times 10^{-6}$	0,00131	0,00248
$5,0 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$5,00207 \times 10^{-6}$	$7,49997 \times 10^{-5}$	0,04133	$3,97657 \times 10^{-4}$
$4,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$4,00001 \times 10^{-5}$	$5,00008 \times 10^{-6}$	$1,44801 \times 10^{-4}$	0,00156
$7,5 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,16883 \times 10^{-4}$	$-2,9828 \times 10^{-5}$	55,8438	174,56997
$4,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$5,79907 \times 10^{-5}$	$5,1086 \times 10^{-5}$	44,97668	27,71488
$4,0 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$4,00002 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$3,86599 \times 10^{-4}$	$3,47794 \times 10^{-5}$
$5,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$5,00019 \times 10^{-6}$	$4,00002 \times 10^{-5}$	0,00386	$4,40522 \times 10^{-4}$
$7,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$7,50001 \times 10^{-5}$	$5,0001 \times 10^{-6}$	$1,1632 \times 10^{-4}$	0,00202

En las Figuras 4.99 y 4.100 se muestran los ajustes entre los valores de concentración calculados y los reales para ambos analitos, en el conjunto de calibración y en el conjunto de validación, respectivamente.

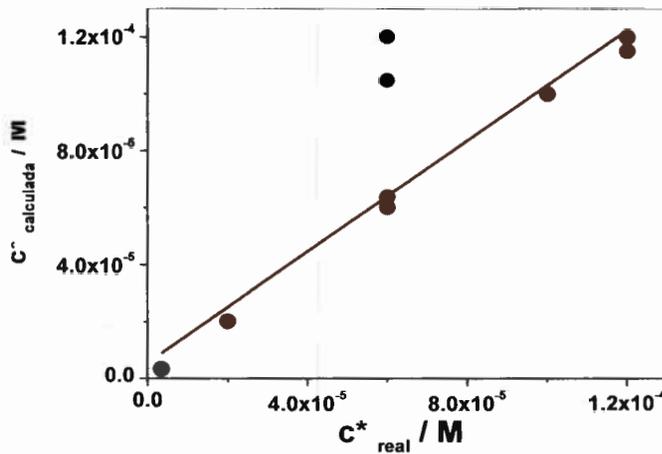


Figura 4.99. Comparación entre los valores de c_{LUT}^* y c_{RUT}^* determinados por la red neuronal y los valores reales en el conjunto de calibración. (●) Puntos experimentales, (—) Regresión lineal que mejor ajustó los puntos experimentales ($r = 0,9134$).

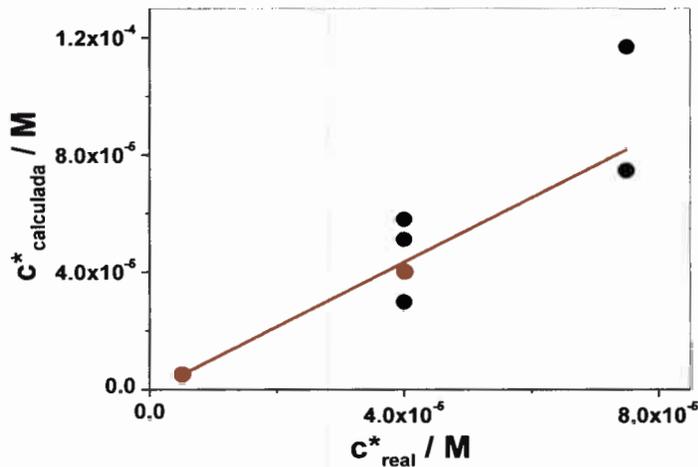


Figura 4.100. Comparación entre los valores de c_{LUT}^* y c_{RUT}^* determinados por la red neuronal y los valores reales en el conjunto de validación. (●) Puntos experimentales, (—) Regresión lineal que mejor ajustó los puntos experimentales ($r = 0,9492$).

En las Figuras 4.101 y 4.102 se grafican los perfiles de concentraciones obtenidos a partir de la red optimizada vs. el número de muestra analizada para cada analito.

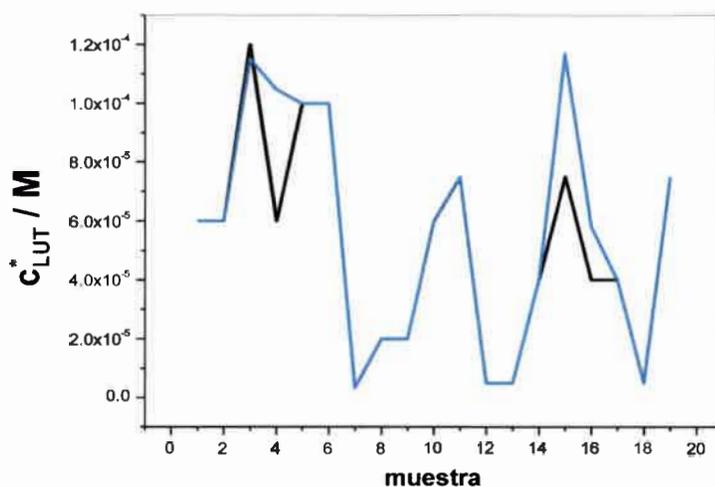


Figura 4.101. *Perfiles de concentración para las soluciones de LUT. (—) Concentración real; (—) Concentración calculada por la mejor red obtenida.*

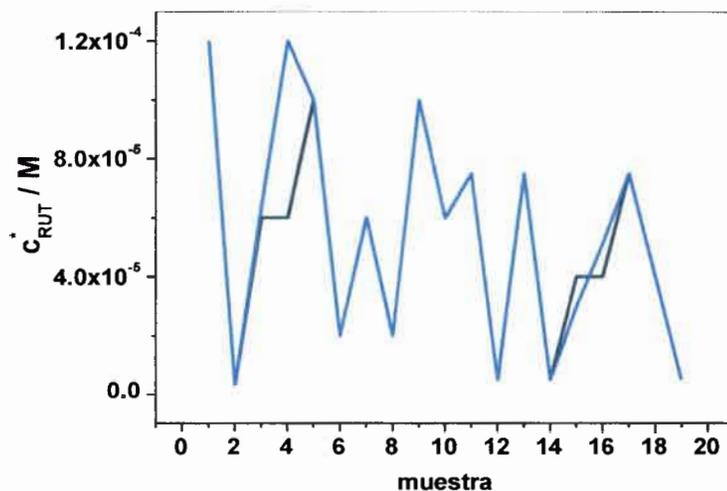


Figura 4.102. *Perfiles de concentración para las soluciones de RUT. (—) Concentración real; (—) Concentración calculada por la mejor red obtenida.*

Una vez optimizada y validada la red, cuya arquitectura resultó igual a 101-7-2, se la utilizó para calcular las concentraciones de las soluciones de LUTIMAX (LUTIMAX 1 y 2), preparadas simplemente disolviendo parte de una pastilla en etanol, sin realizar extracciones previas. Los voltamperogramas de onda cuadrada utilizados se muestran en la Fig. 4.103. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.16.

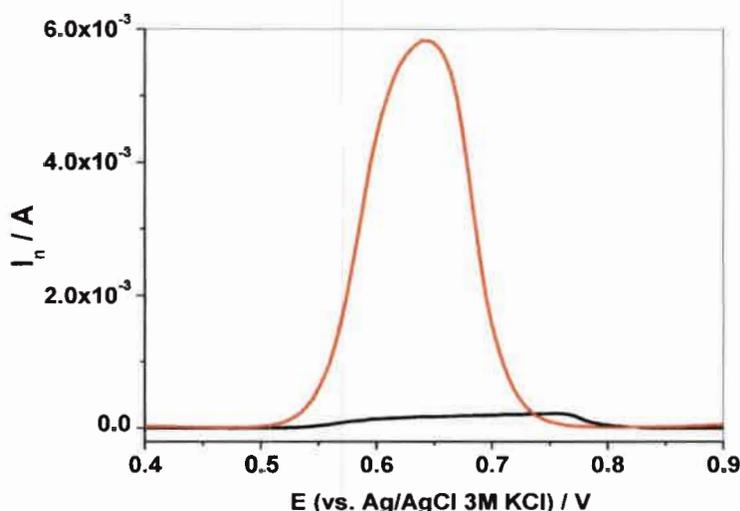


Figura 4.103. Voltamperogramas de onda cuadrada en soluciones de LUTIMAX en etanol de diferentes concentraciones. (—) LUTIMAX 1 y (—) LUTIMAX 2.

Tabla 4.16. Resultados obtenidos en la determinación del contenido de LUT y RUT en la pastilla de LUTIMAX.

	Valores reales		Valores calculados	
	LUTIMAX 1	LUTIMAX 2	LUTIMAX 1	LUTIMAX 2
c_{LUT}^* (M)	$9,00 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-5}$	$8,36 \times 10^{-5}$	$3,81 \times 10^{-5}$
c_{RUT}^* (M)	$4,20 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-5}$	$3,83 \times 10^{-5}$	$1,74 \times 10^{-5}$

Así, teniendo en cuenta las diluciones realizadas en la preparación de las soluciones de trabajo, los valores de c_{LUT}^* y c_{RUT}^* en la pastilla fueron, $(92,6 \pm 0,4)$ y (92 ± 1) mg/pastilla, respectivamente, lo que concuerda muy bien con los valores informados por el fabricante (100 mg/pastilla de LUT y RUT) (Tesio y col., en redacción (b)).

4.4. Referencias bibliográficas

- Anjo, D. M., M. Kahr, M. M. Khodabakhsh, S. Nowinski, M Wagner, Electrochemical activation of carbon electrodes in base: minimization of dopamine adsorption and electrode capacitance, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2603-2608.
- Aragão Catunda Jr., F. E., M. F. de Araujo, A. M. Granero, F. J. Arévalo, M. G. de Carvalho, M. A. Zon, H. Fernández, The redox thermodynamics and kinetics of flavonoid rutin adsorbed at glassy carbon electrodes by stripping square wave voltammetry, *Electrochim. Acta*, **56** (2011) 9707-9713.
- Baizer, M. M., H. Lund. "Organic Electrochemistry" Marcel Dekker, INC. USA, 1991.
- Bard, A. J., L. R. Faulkner, en: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*", 2nd. Ed. J. Wiley, New York, 2001.
- Brand-Williams W., M. E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm-Wiss. u-technol*, **28** (1995) 25-30.
- Cetkovic, G.S., S.M. Đilas, J. M. Čanadanović-Brunet, V. T. Tumbas, Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L) extracts, *APTEFF* **34** (2003) 93-102.
- Christie, J. H., R. A. Osteryoung, F. C. Anson, Application of double potential-step chronocoulometry to the study of reactant adsorption theory, *J. Electroanal. Chem.*, **13** (1967) 236-244.
- Conway, B. E., D. C. W. Kannangara, Zinc Oxidation and Redeposition Processes in Aqueous Alkali and Carbonate Solutions, *J. Electrochem. Soc.*, **134** (1987) 894-906.
- Giannakopoulos, E., Y. Deligiannakis, Thermodynamics of adsorption of dithiocarbamates at the hanging mercury drop, *Langmuir*, **23** (2007) 2453-2462.
- Heyrovský, M., S. Vavricka, On the dependence of polarography half-wave potentials: I. Fundamental relations, *J. Electroanal. Chem.* **36** (1972) 203-221.
- Hodnick, W. F., E. B. Milosavljevic, J. H. Nelson, R. S. Pardini, *Biochem. Pharmac.* **37** (1988) 2607.

- Imbeaux, J.C., J. M. Saveant, Convolutive potential sweep voltammetry: I. Introduction, *J. Electroanal. Chem.*, **44** (1973) 169-187.
- Komorsky-Lovric, S., M. Lovric, Square-wave voltammetry of quasi-reversible surface redox reactions, *J. Electroanal. Chem.*, **384** (1995) 115-122.
- Mirceski, V., M. Lovrick, R. Gulaboski, Theoretical and experimental study of the surface redox reaction involving interactions between the adsorbed particles under conditions of square-wave voltammetry, *J. Electroanal. Chem.*, **515** (2001) 91-100.
- Mirceski, V., M. Lovric, Split Square-Wave Voltammograms of Surface Redox Reactions, *Electroanalysis*, **9** (1997) 1283-1287.
- Mirceski, V., S. Komorski-Lovric, M. Lovric, Square wave voltammetry. Theory and Application, F. Scholz (Ed.), *Monographs in Electrochemistry*, Springer, Leizig, Germany, 2007.
- Morrison, R. T., R. N. Boyd, *Química Orgánica*, Addison Wesley, 5ta. Ed., México, 1998.
- O'Dea, J. J., J. G. Osteryoung, Characterization of quasi-reversible surface processes by square-wave voltammetry, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 3090-3097.
- Tesio, A.Y., A.M. Granero, H. Fernández, M.A. Zon, Characterization of the surface redox process of adsorbed morin at glassy carbon electrodes, *Electrochim. Acta*, **56** (2011) 2321-2327.
- Tesio, A.Y., S. N. Robledo, H. Fernández, M. A. Zon, Electrochemical oxidation of butein at glassy carbon electrodes, *Bioelectrochem.* **91** (2013) 62-69.
- Tesio, A. Y., N. Vettorazzi, N. F. Ferreyra, G. A. Rivas, H. Fernández, A. M. Granero, M. A. Zon, Development of an electrochemical sensor for the determination of the flavonoid luteolin in peanut samples using glassy carbon electrodes modified with multiwall carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine, (2013), en redacción (a).
- Tesio, A.Y., S. N. Robledo, A.M. Granero, H. Fernández, M.A. Zon, Simultaneous electroanalytical determination of luteolin and rutin using artificial neural networks, (2013), en redacción (b).

Yen, G. C., P.D. Duh, C. L. Tsai, Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls, *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993) 67-70.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se estudió, por una parte, el comportamiento electroquímico de los antioxidantes naturales morina, buteina y luteolina en distintos medios de reacción y, en el caso de luteolina, sobre diferentes materiales de electrodo, como así también sus propiedades ácido-base y las capacidades antioxidantes de los tres flavonoides.

El conocimiento de las constantes de acidez es importante para poder comprender tanto sus efectos fisiológicos, como también los mecanismos de reacción. Las propiedades ácidas se estudiaron registrando espectros de absorción uv-visible del sustrato a diferentes valores de pH y analizando estos datos con una metodología desarrollada en nuestro laboratorio. Estos estudios permitieron determinar los valores de los coeficientes de extinción molar de las distintas especies presentes en solución y los valores de las constantes de acidez aparentes de los tres flavonoides.

En lo relacionado a los estudios electroquímicos, se comenzó en primer lugar a dilucidar cuál era el mejor pre-tratamiento a realizar al electrodo de carbono vítreoutilizado, en la mayoría de los casos, como electrodo de trabajo.

Se encontró que la reacción de electrodo para los tres antioxidantes presentó un control mixto: difusión/adsorción. Sin embargo, sólo en el caso de morina se logró estudiar su comportamiento bajo condiciones, principalmente, de difusión, considerando que fue el flavonoide donde su adsorción sobre la superficie de electrodos de carbono vítreo fue menor comparada con la adsorción de los otros dos flavonoides estudiados. Así, se pudo determinar los coeficientes de difusión de la molécula en estado oxidado y en estado reducido, como así también el número de electrones intercambiados en el proceso de electrodo.

Por otra parte, se encontró que los tres flavonoides se adsorben específicamente sobre electrodos de carbón vítreo desnudos, bajo determinadas condiciones experimentales, a partir de soluciones acuosas preparadas a partir del reactivo comercial. Se eligió, para cada uno de los mismos, el medio de reacción que resultó más satisfactorio en cada caso. Se determinó el potencial de acumulación (E_{ac}) y el tiempo de acumulación (t_{ac}) óptimos para favorecer la interacción específica de los

antioxidantes con la superficie del electrodo. Luego de la acumulación de los antioxidantes sobre la superficie del electrodo, la oxidación electroquímica superficial se estudió tanto por voltamperometría cíclica como por voltamperometría de onda cuadrada. En el caso de morina y buteina, se logró dilucidar que la isoterma de adsorción que mejor describe la interacción específica del analito con la superficie de los electrodos de carbono vítreo fue la isoterma de Frumkin. Para los tres antioxidantes se realizó una caracterización termodinámica y cinética completa (potencial de media onda, constante de velocidad formal y coeficiente de transferencia anódico) del proceso redox global superficial empleando los métodos del “máximo cuasi-reversible” y del “desdoblamiento del pico de onda cuadrada neto”.

Finalmente, se optimizaron las condiciones experimentales para la oxidación electroquímica de luteolina sobre electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono, dispersos sobre polietilenimina. Con ellos se construyó una curva de calibración para luteolina, con el fin de realizar su determinación en matrices reales. Para tal fin se utilizaron dos muestras de distinta naturaleza. Por un lado, cáscaras de maní y, por otro, un suplemento dietario. En el primer caso, se logró, mediante una extracción simple, preparar una solución que contenía el extracto de luteolina, proveniente de la cáscara y, luego, determinar la concentración de este flavonoide en la misma. La presencia de luteolina en esta solución fue corroborada por HPLC y los resultados cuantitativos fueron comparados con los datos publicados en la bibliografía, estando ambos en muy buena concordancia. El suplemento dietario, además de contener luteolina, posee otro flavonoide (rutina), el cual tiene una respuesta electroquímica similar al de luteolina. Por lo tanto, se utilizó una herramienta quimiométrica, conocida como redes neuronales artificiales, para poder realizar la cuantificación de ambos flavonoides sin tener que realizar procesos separativos previos. Los resultados obtenidos fueron contrastados por una metodología alternativa, HPLC, obteniéndose resultados que se comparan razonablemente bien con los obtenidos por los otros métodos.

A nuestro conocimiento, el empleo de la metodología citada para determinar el contenido de luteolina en matrices reales, tales como la cáscara de maní o el suplemento dietario, aparece como una alternativa muy valiosa respecto de las técnicas cromatográficas. Además, la instrumentación requerida es de menor costo que aquella

necesaria para realizar medidas cromatográficas y el tiempo que insume la realización de un experimento particular es significativamente menor.

ANEXO I

Fabricación de nanoelectrodos metálicos para su utilización en el desarrollo y caracterización de plataformas nanoestructuradas mediante microscopía de barrido electroquímico.

1.1. Introducción

La microscopía de barrido electroquímico (SECM) se ha utilizado desde que fue establecida formalmente por Bard y col., (1989) para una amplia gama de aplicaciones, la mayoría de ellas en términos de microescala, empleando ultra-microelectrodos (UME) como sondas (o tips) electroquímicas (Bard & Mirkin, 2001; Wittstock y col., 2007; Takahashi y col., 2006). Una de estas aplicaciones ha sido el mapeo de la actividad de las enzimas inmovilizadas sobre las superficies, debido a la importancia práctica que esto posee, para la optimización de biosensores y biochips. (Parra y col., 2006; Roberts y col., 2007; Pellisier y col., 2008; Nogala y col., 2010). La caracterización de la distribución de enzimas inmovilizadas ha sido llevada a cabo, usando la SEMC, ya sea en el modo de realimentación (FB) (Schäfer y col., 2007; Pellisier y col., 2008; Nogala y col., 2010) ó en el modo de generación-recolección (GC)(Wittstock y col., 1997; Zhao y col., 2004). En el modo FB, para el mapeo de la actividad redox, la sonda UME se utiliza para oxidar o reducir un mediador de electrones redox (reversible), mediante la aplicación de un potencial, en el cual, el proceso de conversión, es controlado por la difusión, al mismo tiempo que la punta barre la superficie. El proceso de retroalimentación se produce cuando el mediador redox, generado en la punta, difunde hacia la muestra y es restaurado a su estado de oxidación original, a través de la reacción enzimática catalizada por una enzima inmovilizada. Después, el mediador difunde nuevamente a la punta y, se establece así, un bucle de retroalimentación, dando lugar a una corriente electrocatalítica en el UME. Este modo de operación se ha utilizado para enzimas oxido-reductasas, donde se facilita la transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y el UME por la presencia del mediador redox. En el modo de GC, el UME se utiliza ya sea para detectar

el producto redox-activo generado en la superficie de la muestra después de la conversión enzimática de un sustrato o para la generación de este último. Por lo tanto, se puede emplear para investigar cualquier enzima con la capacidad de generar o agotar cualquier sustancia electroactiva cerca de la superficie de la muestra.

Ambos modos SECM han permitido la obtención de imágenes de las posiciones relativas de las superficies bioactivas modificadas por enzimas, pero sólo en la escala de longitud de las micras. En los últimos años, muchos esfuerzos se han intentado para mejorar su resolución espacial, ampliación a la nanoescala, intentando convertirse en una técnica poderosa en el dominio de caracterización dentro de escaneado con microscopías sonda. El progreso ha sido estimulado por los avances en la fabricación de nanoelectrodos geoméricamente bien definidos, de diferentes materiales, siendo los nanoelectrodos de Pt los más ampliamente utilizados como puntas en SECM (Shao y col., 1997; Katemann & Schuhmann, 2002; Arrigan, 2004).

La utilización de estos electrodos metálicos, de dimensiones nanométricas tiene un gran interés dentro de la nanoelectroquímica (Murray, 2008) debido a las ventajas que estos presentan, como son sus menores caídas óhmicas (IR) y efectos de carga de la doble capa eléctrica, una mayor velocidad de transporte de masa una y menor influencia de la resistencia de la solución, lo que permite estudiar cinéticas de reacciones rápidas de transferencia de carga (Sun y col., 2006; Velmurugan y col., 2009; Agyekum y col., 2010; Liu y col., 2010). Esto hace que los nanoelectrodos se estén convirtiendo en importantes herramientas para aplicaciones que van desde la visualización en alta resolución mediante microscopía de barrido electroquímico (SECM) (Zhang y col., 2007), a la investigación electroquímica de moléculas redox (Watkins & White, 2004), nanopartículas individuales (Georganopoulou y col., 2004), o estudio de catálisis enzimática de proteínas (Bard, 2008), así como en su utilización para la nanoestructuración de superficies (Deiss y col., 2010). Es en éste último punto en donde subyace el interés, entre otros, que se tiene desde la química analítica, de producir estos electrodos, para la generación de nuevos sensores de diminutas dimensiones, con diversas aplicaciones.

Uno de los principales desafíos que se plantean, a la hora de la utilización de estos nanoelectrodos es su fabricación de una manera reproducible, con una geometría bien definida y de tamaños por debajo de los 3 nm, que permitan alcanzar una

resolución molecular. Para ello, se han descrito diferentes métodos que incluyen, desde la encapsulación del metal en vidrio para un posterior pulido (Zhang y col., 2007); el estiramiento asistido por láser del hilo metálico introducido en un capilar de micropipeta (Shao y col., 1997); el corte preciso del hilo mediante procedimientos químicos y electroquímicos para un posterior recubrimiento con una capa de poliimida que es selectivamente eliminada (Sun y col., 2001) o mediante el recubrimiento controlado del electrodo con una tinte electroforética (Watkins & White, 2004). Sin embargo, existen todavía aspectos a controlar y sólo unos pocos trabajos han sido publicados en relación a la fabricación de nanoelectrodos de esas dimensiones (Li y col., 2009; Jena y col., 2010) con vistas a su posterior aplicación en la nanoestructuración enzimática de superficies (Bard, 2008) y nanoestructuración de superficies en general.

I.2. Resultados y discusión

I.2.1. Preparación de nanoelectrodos de Pt

Se fabricaron nanoelectrodos de Pt mediante la introducción de un hilo de Pt de 25 μm en un capilar, previamente estirado. El capilar fue sellado, dejando una parte del hilo de Pt en su exterior, el cual fue cortado mediante un tratamiento electroquímico. Finalmente, se procedió a recubrir la superficie del electrodo con diversos métodos con el fin de disminuir su área efectiva. Las diferentes etapas del proceso de fabricación fueron caracterizadas utilizando microscopía de barrido SECM.

El proceso se esquematiza a continuación (Fig. A.1):



Figura A1. Esquema del proceso de fabricación de los nanoelectrodos.

Los resultados de cada etapa se exponen en los siguientes apartados:

I.2.1.1. Estiramiento del capilar

Se utilizó un capilar de vidrio de 10 cm de largo, con un diámetro interno de 0,1 cm, el cual se estiró en una máquina desarrollada para tal fin, hasta que el mismo se cortó en dos, generando dos nuevos capilares, cada uno con un extremo agudo y con un diámetro interior de menor dimensión que el de partida. Las condiciones de calentamiento y estiramiento fueron optimizadas hasta lograr los capilares del tamaño deseado.

I.2.1.2. Inserción del Pt, Cu y contacto

Se utilizaron dos métodos para hacer el contacto entre el alambre conector de cobre y el hilo de platino. Primeramente, se hizo uso de una pintura de plata. Para ello, se pintaron ambas superficies, se las dejó en contacto y, finalmente, cuando se evaporó el solvente, se pudo utilizar el electrodo. Los resultados electroquímicos demostraron que el contacto era lo suficientemente apto para realizar las medidas. Sin embargo, se

buscó un método alternativo, ya que, a la hora de manipularlos, estos se mostraron demasiado frágiles.

El método alternativo elegido fue la soldadura con estaño, la que se llevó a cabo directamente en el interior del capilar aplicando calor, con una llama de gas butano, desde el exterior. Con los resultados electroquímicos se pudo interpretar que la soldadura obtenida era la adecuada, ya que presentaba una alta conductividad. Se prefirió este método, por sobre el primero, debido a que con él, se generaron electrodos más robustos y duraderos.

En la Fig. A2 se muestra un voltamperograma cíclico de la solución de blanco obtenida con un nanoelectrodo construido siguiendo la segunda metodología previamente descrita.

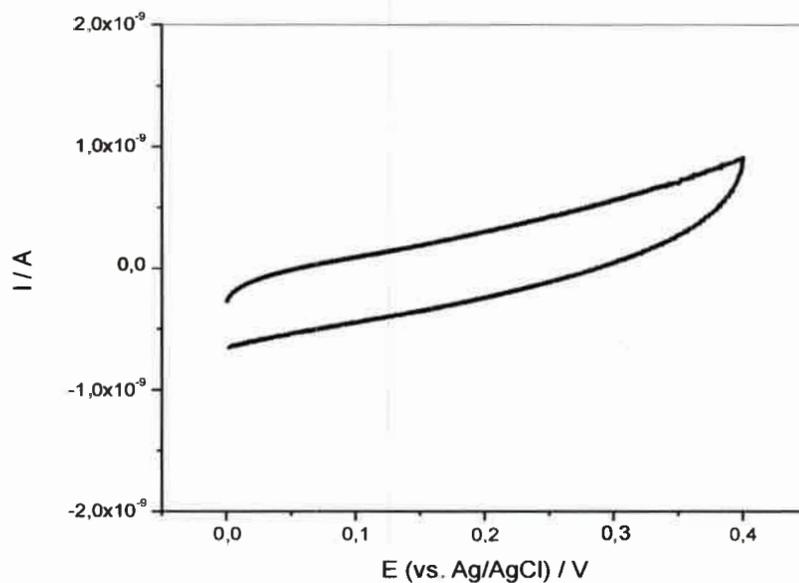


Figura A2. Voltamperograma cíclico registrado en solución 0,1 M KCl acuoso, con un nanoelectrodo de platino soldado en su interior con estaño.

I.2.1.3. Corte electroquímico

Para eliminar el excedente de hilo de platino que, luego de la fabricación, quedaba por fuera del capilar de vidrio se realizó un corte electroquímico. Este se llevó a cabo, sumergiendo el hilo de platino en una gota de solución de cloruro de calcio en

medio ácido (HCl 0,01M), la cual estaba ubicada en un rulo de alambre conductor, montado bajo la lupa. Una vez sumergido el electrodo, se cerró el circuito eléctrico, colocando el cátodo de una fuente de corriente continua al rulo que sostenía la gota, y el ánodo al electrodo de platino. Se aplicaron 2 V de corriente continua por un tiempo aproximado de 2 min. El proceso se observó a través de una lupa y, se determinó como finalización del cortado cuando no se generaron más burbujas sobre la superficie de Pt (Fig. A3).

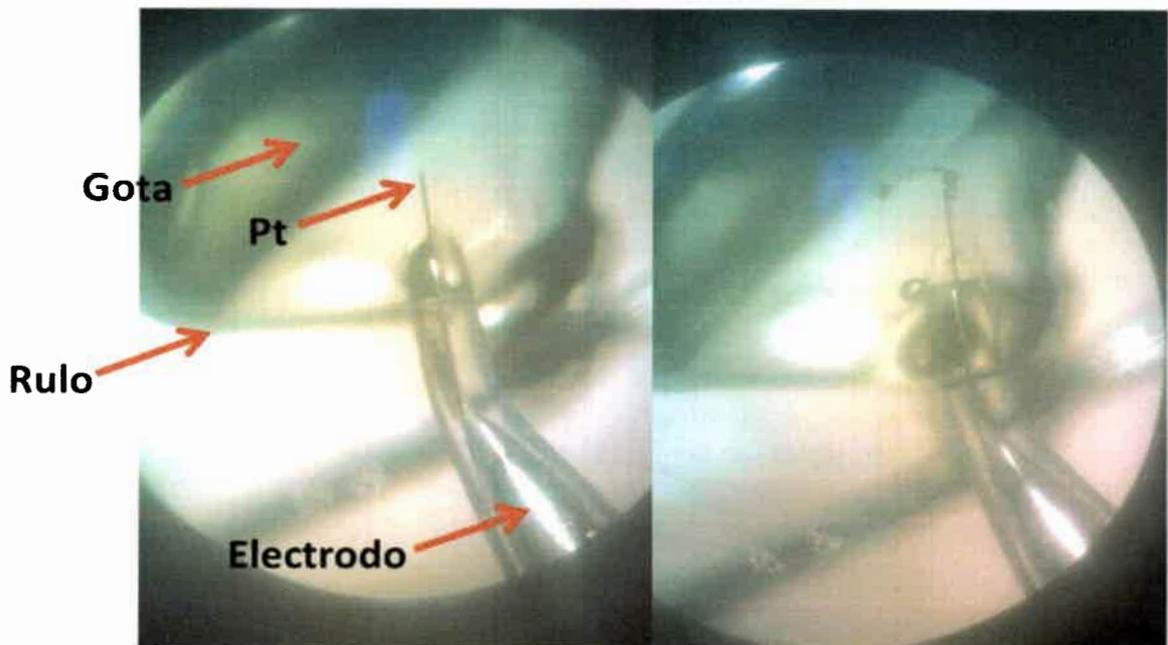


Figura A3. *Fotografías tomadas a través de una lupa en donde se observa el seguimiento del proceso de corte electroquímico.*

I.2.1.4. Reducción del área del electrodo

Luego del corte electroquímico, el área del electrodo quedó próxima a la de la sección plana del hilo de platino de partida ($\varnothing = 25 \mu\text{m}$). Para disminuir el tamaño de la misma se estudiaron dos métodos, los que se describen a continuación:

1.2.1.4.1. Polimerización asistida por temperatura

Se realizó la reacción de polimerización entre 4,4-oxidianilina y ácido 1,2,4,5-bencentetracarboxílico, asistida por temperatura (Fig. A4), sobre el electrodo de platino. Para ello, se añadieron las cantidades adecuadas de cada reactivo y, luego, se sumergió sólo la punta del electrodo. Una vez que todo el extremo del mismo quedó impregnado con la solución, se lo colocó en una estufa, por 2 hs a una temperatura de 180 °C. Al finalizar este proceso, el Pt del electrodo quedó recubierto en su totalidad por una capa de polímero amarillo oscuro, eléctricamente aislante.

Para ser utilizado como electrodo, éste, previamente, debió ser sumergido, breves instantes, en una solución de NaOH diluido, para remover parte del polímero aislante. El seguimiento de este proceso se realizó electroquímicamente, hasta que se generó un electrodo de dimensiones deseadas.

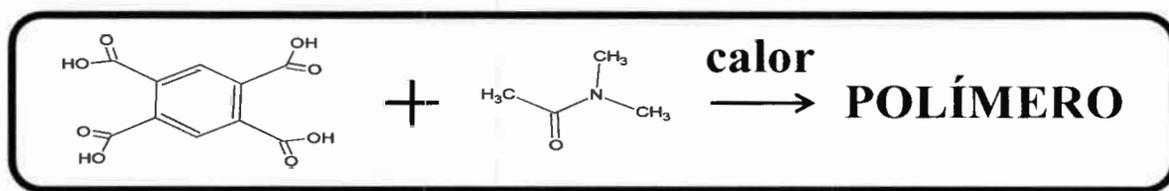


Figura A4. *Reactivos de la polimerización: 4,4-oxidianilina y ácido 1,2,4,5-bencentetracarboxílico.*

Con los electrodos producidos con este método se obtuvieron resultados adecuados, pero su duración fue demasiado corta, ya que usándolo repetidas veces, el polímero se separó del vidrio, en todos los casos.

1.2.1.4.2. Electropolimerización de fenol

En busca de una alternativa más práctica y duradera al método anteriormente desarrollado, se experimentó con otro método de aislación. Para ello, se generó electroquímicamente un polifenol aislante sobre la superficie de platino. Esto se consiguió haciendo uso de una celda convencional de tres electrodos (contraelectrodo: alambre de plata; electrodo referencia: Ag/AgCl; electrodo de trabajo: el propio electrodo de platino) conteniendo la solución de fenol y, mediante la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica se consiguió aislar, gradualmente, la

superficie del Pt. En las Figs. A5-7 se pueden observar los voltamperogramas correspondientes, tanto en solución de fenol, como en las dos soluciones de trabajo utilizadas ($K_3[Fe(CN)_6]$ y $K_2[IrCl_6]$).

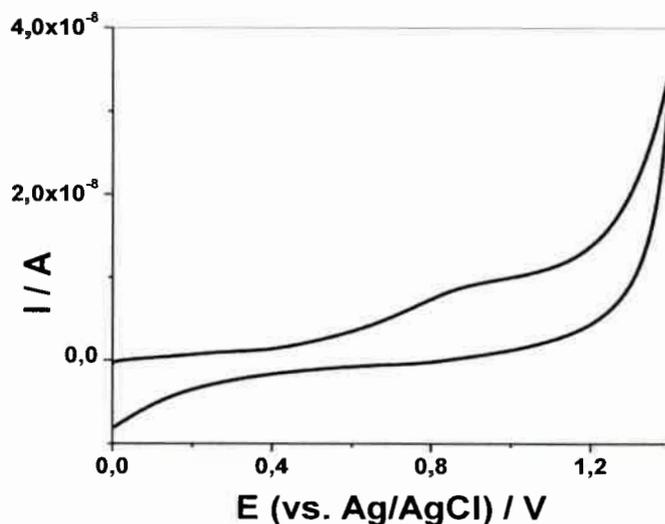


Figura A5. Voltamperograma cíclico obtenido con un nanoelectrodo de Pt en solución de fenol 0,16 mM acuoso. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

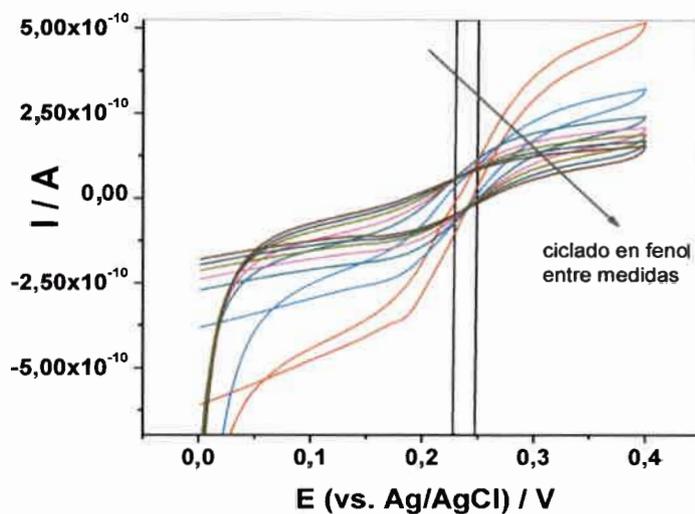


Figura A6. Voltamperogramas cíclicos obtenidos con un nanoelectrodo de Pt en solución 0,01 M de ferricianuro de potasio, luego de los voltamperogramas cíclicos registrados en solución de fenol. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

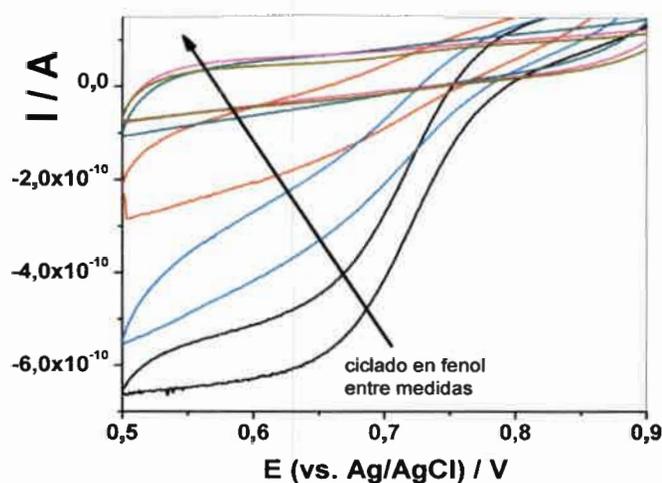


Figura A7. Voltamperogramas cíclicos obtenidos con un nanoelectrodo de Pt en solución 2 mM de hexacloroiridiato acuoso, luego de los voltamperogramas cíclicos registrados en solución de fenol. $v = 0,001 \text{ V s}^{-1}$.

En la Fig. A8 se muestra un gráfico en donde se puede ver la disminución del área del electrodo de trabajo (calculado como radio), producto de los sucesivos barridos de potencial en la solución de fenol.

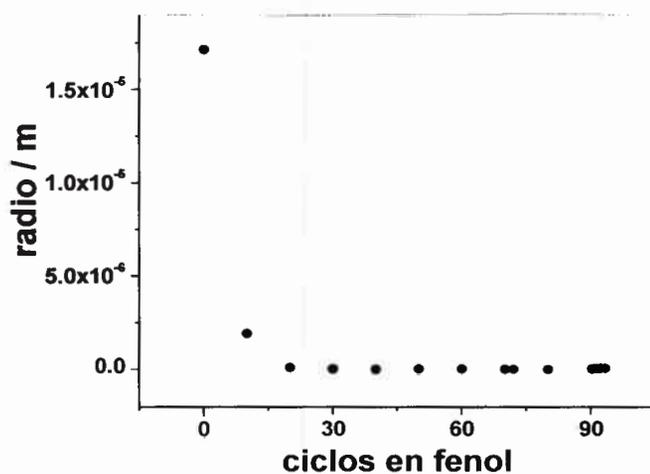


Figura A8. Radio del nanoelectrodo de platino vs. ciclos realizados en solución de fenol. Los radios fueron calculados a partir de la i_L de voltamperogramas cíclicos en solución 10 mM ferrocianuro a $v = 0,001 \text{ V s}^{-1}$, luego de "x" ciclos de 0 a 1,400 V a $0,050 \text{ V s}^{-1}$ en solución 0,16 mM fenol.

En las Figs. A9-13 se observan las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (SEM) y el perfil de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDAX) de la superficie del nanoelectrodo de platino resultante.



Figura A9. Imagen SEM, 800 X. Extremo del capilar de vidrio, con el Pt inserto y recubierto del polímero aislante. Los dos áreas oscuras, son burbujas de aire, atrapadas en el vidrio del capilar.



Figura A10. Imagen SEM, 6000 X. Extremo del capilar de vidrio con el Pt inserto y recubierto de polímero aislante. Se pueden observar los efectos generados por el corte electroquímico.



Figura. A11. Imagen SEM, 13000 X. Extremo del capilar de vidrio con el Pt inserto y recubierto de polímero aislante. Se logra observar el recubrimiento del polímero, como zonas oscuras sobre el metal.

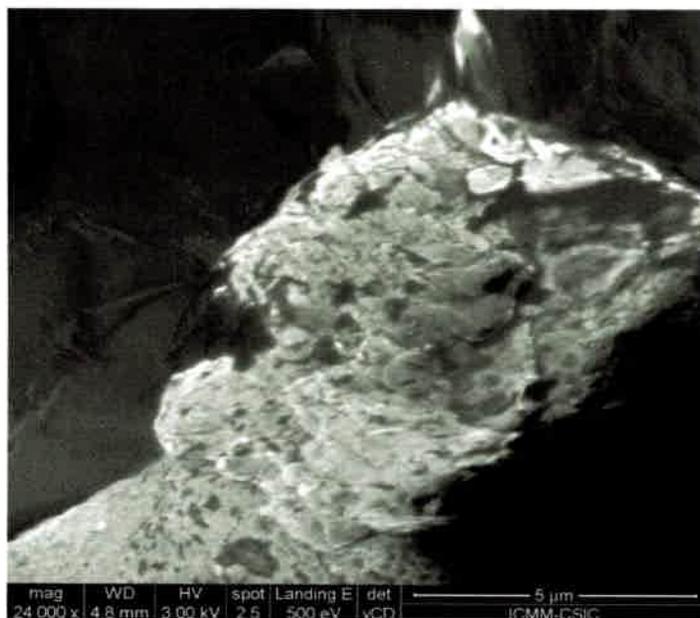


Figura A12. Imagen SEM, 24000 X. Extremo del capilar de vidrio con el Pt inserto y recubierto de polímero aislante. Se observa en mayor detalle el recubrimiento del polímero, como zonas oscuras sobre el metal.

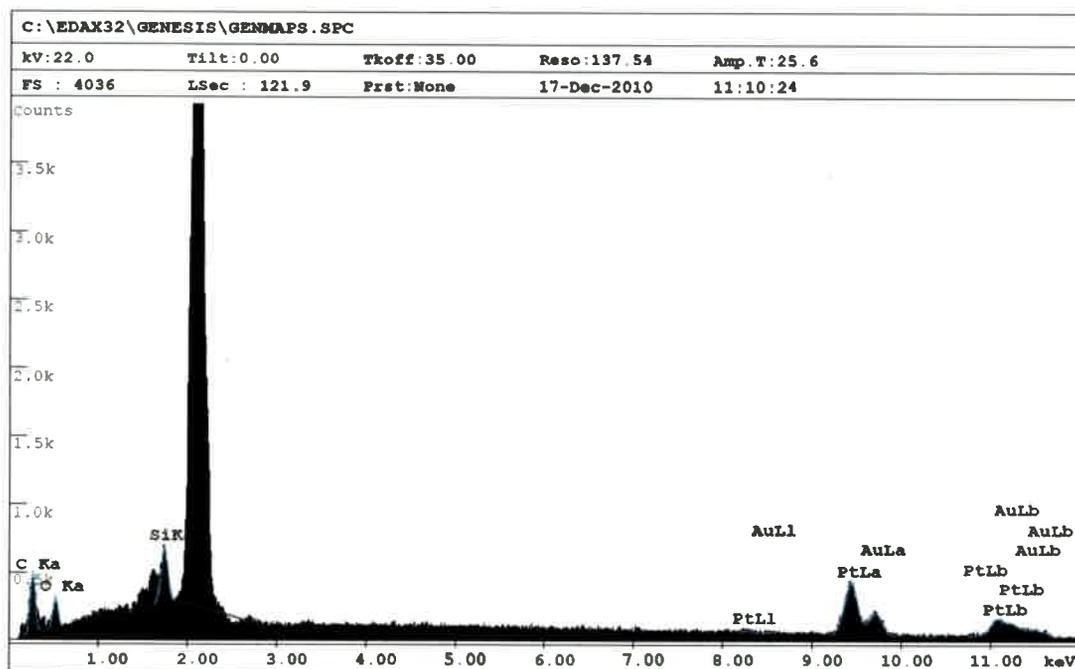


Figura A13. Analisis EDAX de la superficie del electrodo de Pt.

Finalmente, se eligió este método de reducción del área del electrodo para confeccionar los electrodos, ya que, con el mismo, se obtuvieron respuestas electroquímicas adecuadas y, además, los electrodos, mostraron ser más duraderos que los producidos por el método de la polimerización asistida por temperatura.

Con el electrodo en esta instancia, luego de probar su comportamiento electroquímico y, observando su estado, mediante microscopía electrónica, se lo utilizó como punta de un microscopio de barrido electroquímico.

1.2.2. Comportamiento del nanoelectrodo de platino como “punta” de un microscopio de barrido electroquímico

Con los nanoelectrodos ya disponibles, se hizo uso de los mismos como puntas de un microscopio de barrido electroquímico (Fig. A.14), en donde se realizaron diferentes pruebas, con el fin de conocer sus prestaciones.

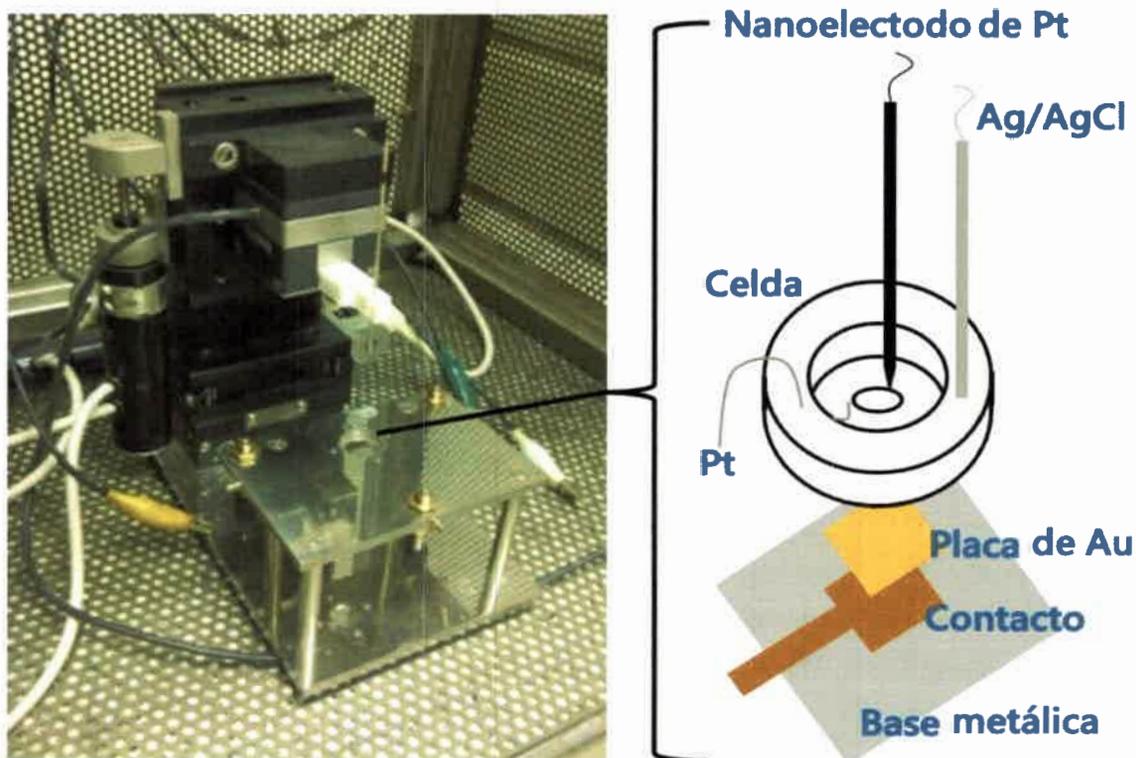


Figura A14. Fotografía de un microscopio de barrido electroquímico y esquema de la celda de trabajo y su entorno.

I.2.2.1. Ensayos

Utilizando el piezoeléctrico del equipo, se aproximó el nanoelectrodo hasta unos pocos nanómetros de una superficie de oro lisa y se observó su comportamiento electroquímico “*in-situ*”. Haciendo uso del bipotenciostato, se realizó una cronoamperometría de 60 s a 1,200 V (vs. Ag/AgCl) en una solución reguladora de fosfato 0,1 M de pH 7 y se midió la respuesta del mismo cuando a la placa de oro se le aplicó un potencial constante de 0,300 V (vs. Ag/AgCl) y cuando este potencial ya no se aplicó. Como se puede observar en la Fig. A15, la presencia del peróxido de hidrógeno generado en la superficie del oro, hace que la señal de corriente sobre el nanoelectrodo varíe.

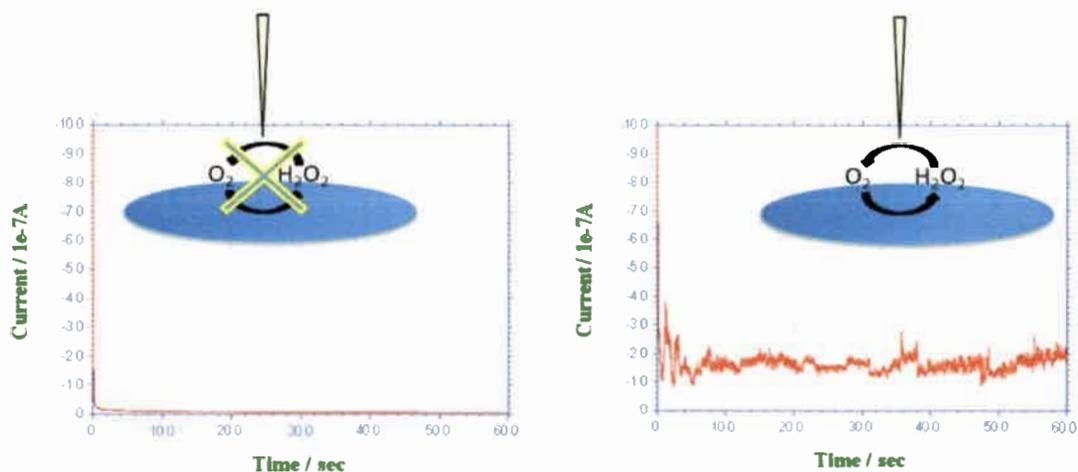


Figura A15. *Cronoamperometrías realizadas en una solución reguladora de fosfatos, 0,2 M, pH 7 (solución blanco). a) sin aplicar y b) aplicando potencial sobre el electrodo de oro.*

Seguidamente, se comprobó la reproducibilidad de estos datos. Para ello, se realizó la misma cronoamperometría repetidas veces. En la Fig. A16 se observan nuevamente las variaciones de la corriente en el nanoelectrodo, producto del peróxido de hidrógeno, generado al aplicar un potencial constante en el electrodo de oro.

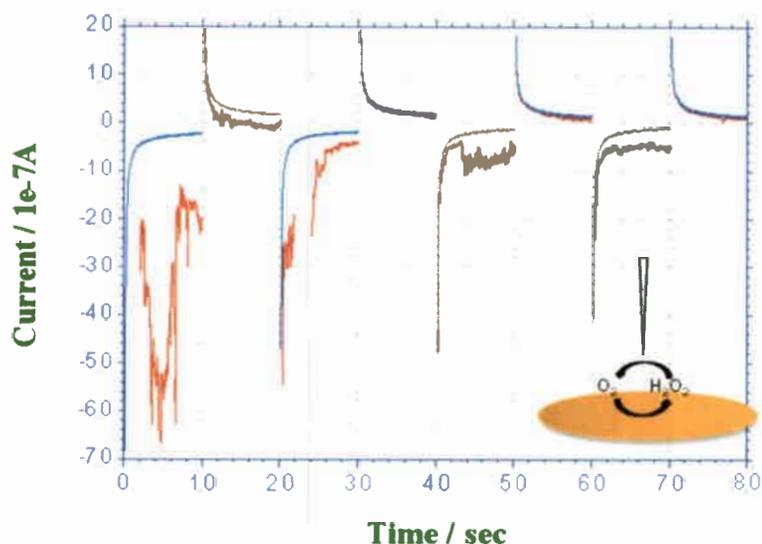


Figura A16. Sucesión de *cronoamperometrías* realizadas en el solución del blanco, (-) sin aplicar y (-) aplicando potencial sobre el electrodo de oro.

Posteriormente, se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica y se observó que los resultados fueron congruentes a los de la técnica de cronoamperometría, siendo ambos resultados dependientes del potencial aplicado a la placa de oro, como se puede ver en la Fig. A17.

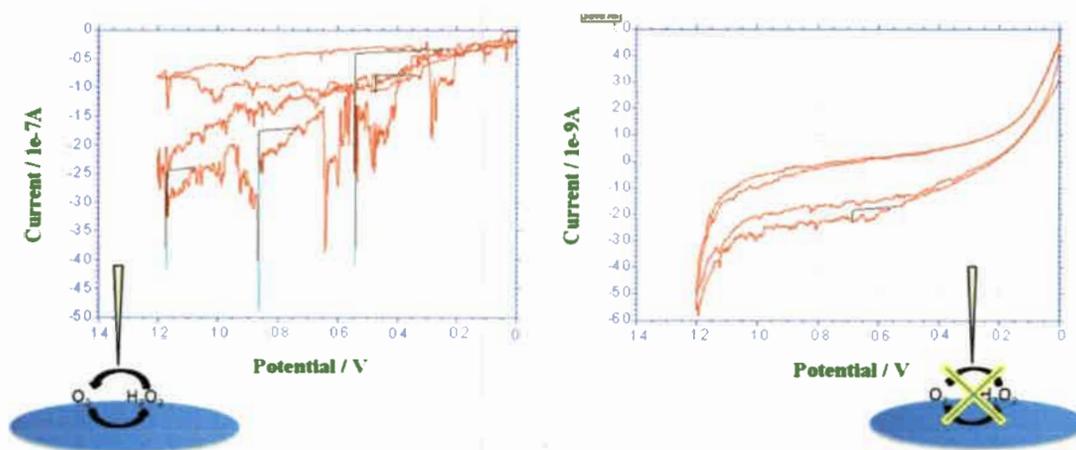


Figura A17. Voltamperogramas cíclicos obtenidos con un nanoelectrodo de Pt, próximo a la placa de oro; a la izquierda cuando se le aplicó 0,300 V (vs. Ag/AgCl) a esta última; a la derecha sin aplicar potencial sobre la placa de oro. Las pequeñas variaciones de corriente observadas en los voltamperogramas cíclicos de la derecha son debidas a los restos de peróxido de hidrógeno que quedaron presentes en la solución, producto de aplicar el potencial anteriormente.

I.2.2.2. Cálculos previos

Previo a la realización de las experiencias sobre las plataformas nanoestructuradas, se determinó electroquímicamente el área efectiva del electrodo de oro desnudo, para conocer cuál era la superficie máxima de trabajo disponible (delimitada por el tamaño de la celda del microscopio de barrido electroquímico) y, a continuación, se calculó el recubrimiento superficial de tioles con los cuales, posteriormente, estas placas de oro fueron modificadas para diversas experiencias.

I.2.2.2.1. Cálculo del área efectiva del electrodo de oro

Se realizó un voltamperograma cíclico de la placa de oro colocada en la celda de trabajo del microscopio de barrido electroquímico, en donde sólo queda expuesta una parte de la misma y, mediante el análisis de la integral del pico voltamperométrico generado por la reducción de los óxidos de oro, que aparece a 0,500 V (vs. Ag/AgCl), se logró determinar que el área del electrodo de trabajo fue de 0,154 cm² (Fig. A18) (Sawyer y col., 1995).

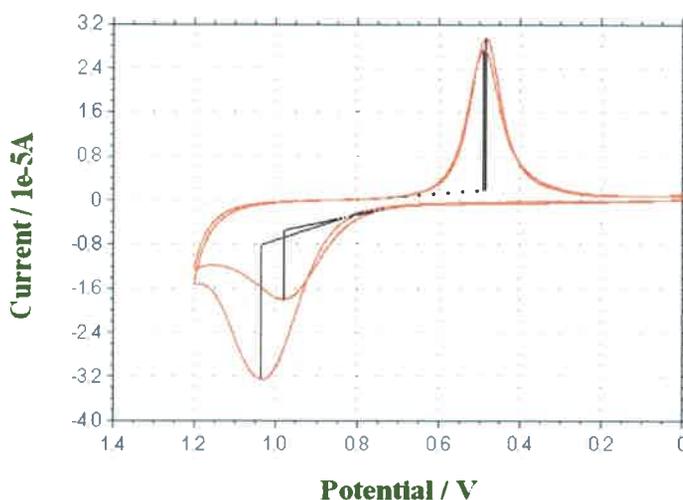


Figura A18. Voltamperograma cíclico del electrodo de oro desnudo en una solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7.

1.2.2.2.2. Cálculo del recubrimiento superficial del electrodo de oro

A fin de conocer la concentración de tioles en la superficie del electrodo de oro. Se modificó la superficie de la placa de oro con hexanotiol y, a continuación se colocó la misma en la celda electroquímica del microscopio de barrido y se procedió a desorber la capa de tioles aplicando barridos de potencial, desde -0,400 a -1,350 V (Finklea, 1996). Mediante la integración del primer pico que apareció en el voltamperograma cíclico de desorción, se logró determinar el recubrimiento superficial que originalmente poseía el hexanotiol, bajo esas condiciones de trabajo, sobre la placa de oro, el valor del mismo fue de 3.0×10^{-10} moles cm^{-2} (Fig. A.19).

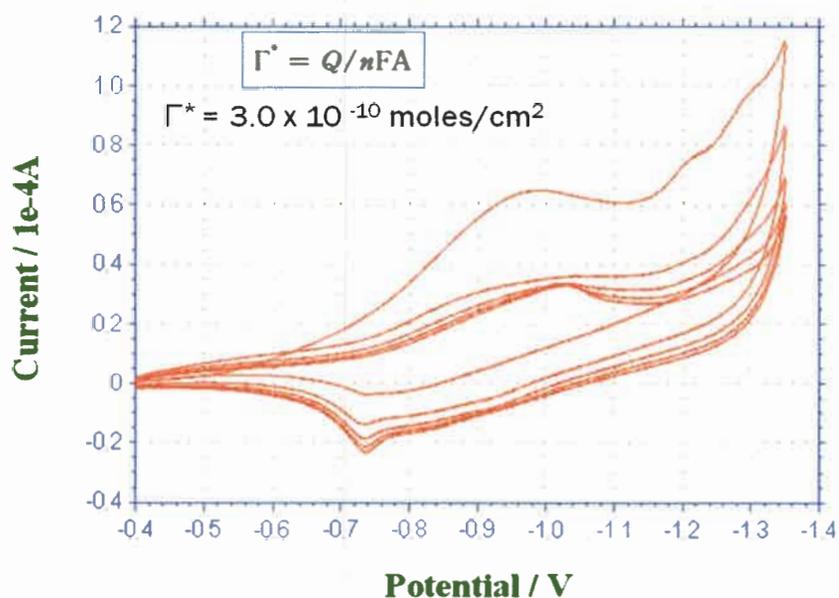


Figura A19. Voltamperogramas cíclicos de la desorción de hexanotiol depositado sobre la placa de oro.

1.2.2.3. Utilización del electrodo como punta del microscopio de barrido: mapeo de superficies

En las mismas condiciones experimentales que los ensayos anteriores, se realizaron los mapeos de las superficies de oro desnudo con el fin de comprobar el adecuado comportamiento del nanoelectrodo de Pt en esta técnica. Los mapeos bi y tridimensionales, obtenidos como medidas de corriente de oxidación del peróxido de hidrógeno, nos indicó que el electrodo y la técnica estaban en condiciones de ser

utilizadas para sensar plataformas nanoestructuradas. Cabe aclarar que los valores de corrientes observados no poseen un significado físico, ya que dependen de la distancia entre los electrodos y, por lo tanto, no es posible la comparación de los mismos en diferentes experimentos (Figs. A20 a-d).

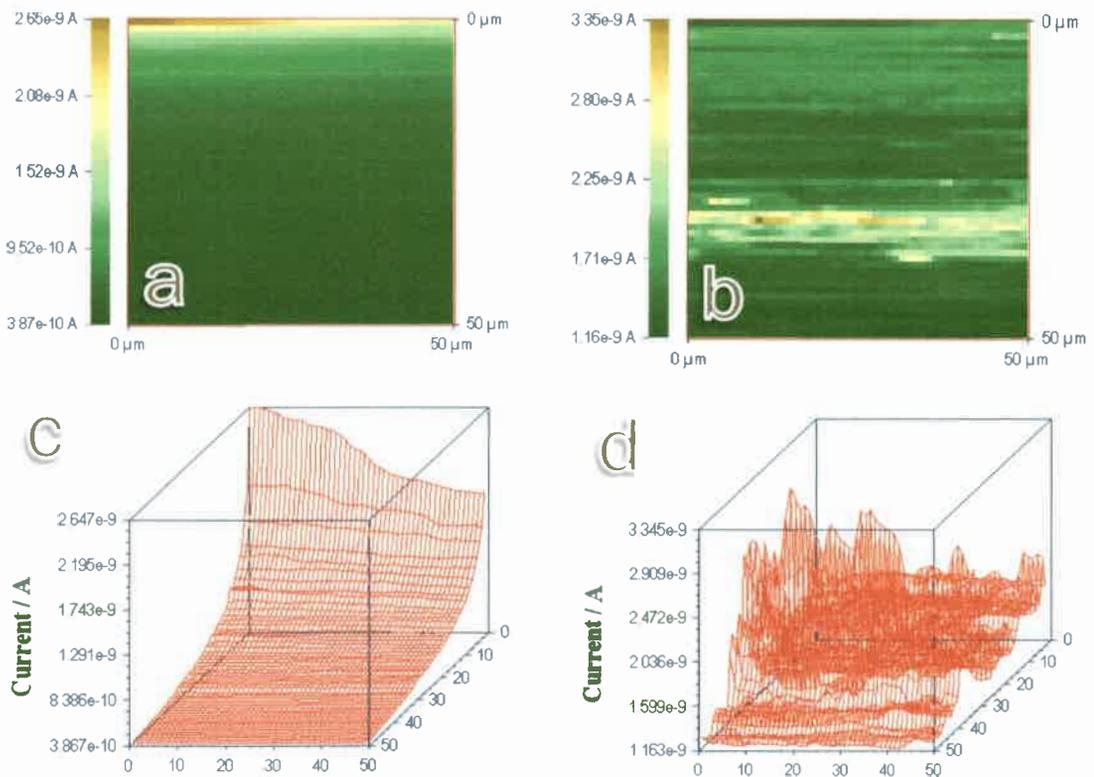


Figura A20. Mapeos de oro desnudo aplicándole 1,200 V al nanoelectrodo de platino. Solución reguladora de fosfatos 0,2 M, pH 7.

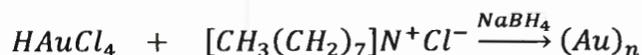
a y b) bidimensionales. a) circuito abierto. b) -0,300 V aplicados a la placa de oro. c y d) tridimensionales. c) circuito abierto. d) -0,300 V aplicados a la placa de oro.

I.2.2.3.1. Sensado de plataformas nanoestructuradas

Se modificaron placas de oro con diversos analitos y se procedió a “mapear” la estructuración de la superficie obtenida.

I.2.2.3.1.1. Modificación de la superficie con nanopartículas pequeñas

Se sintetizaron nanopartículas de oro (npAu) a través de la reacción siguiente (Brust y col., 1998).



Se registró un espectro de absorción uv-visible de la solución final (Fig. A21) y se determinó el diámetro de las npAu haciendo uso del método publicado por Haiss y col. (2007). Para ello, se determinó el cociente entre la absorbancia máxima de la solución y la absorbancia a $\lambda = 450$ nm, el cual fue 1,32. Con este valor se ingresó a la tabla 1 de la mencionada publicación y se obtuvo así, el diámetro promedio de las nanopartículas en solución, el mismo fue de 5,5 nm.

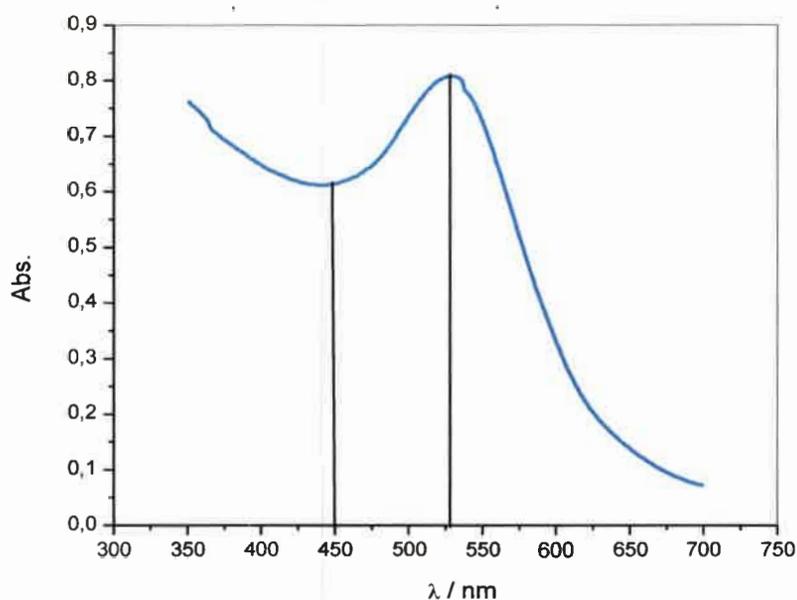


Figura A21. Espectro de absorción uv-visible de la solución de nanopartículas de oro. Las líneas indican las longitudes de onda utilizadas para el cálculo de su diámetro.

Con las npAu se modificaron 4 placas de oro, diferenciándose entre ellas tan sólo por la cantidad de npAu depositadas (densidad superficial de nanopartículas). Para lograr esto, se dividió en cuatro partes iguales a una placa de oro comercial (25 x 25 x 0,127 mm, Alfa Aesar GmbH & Co KG) y se la sumergió por 48 h en una solución de

hexanotiol. A continuación se lavaron las placas con agua y se secaron al aire. Luego, se colocó cada placa en una solución de 1-9 nonanoditiol por diferentes períodos de tiempo. Los tiempos de modificación con el ditiol elegidos fueron: 5 min para la placa 1, 10 min para la placa 2, 15 min para la placa 3 y 20 min, para la placa 4. Finalmente, las placas fueron lavadas, secadas y, por último, se las sumergió 5 min en la solución de npAu previamente sintetizadas. Luego de un último lavado, las placas fueron utilizadas como superficies nanoestructuradas para ser “observadas” con los nanoelectrodos de Pt, utilizados como puntas del microscopio de barrido electroquímico.

Tal como se muestra en los siguientes mapeos tridimensionales (Figs. A22 y A23), se logró sensar esta diferencia de concentraciones superficiales haciendo uso de los nanoelectrodos de platino.

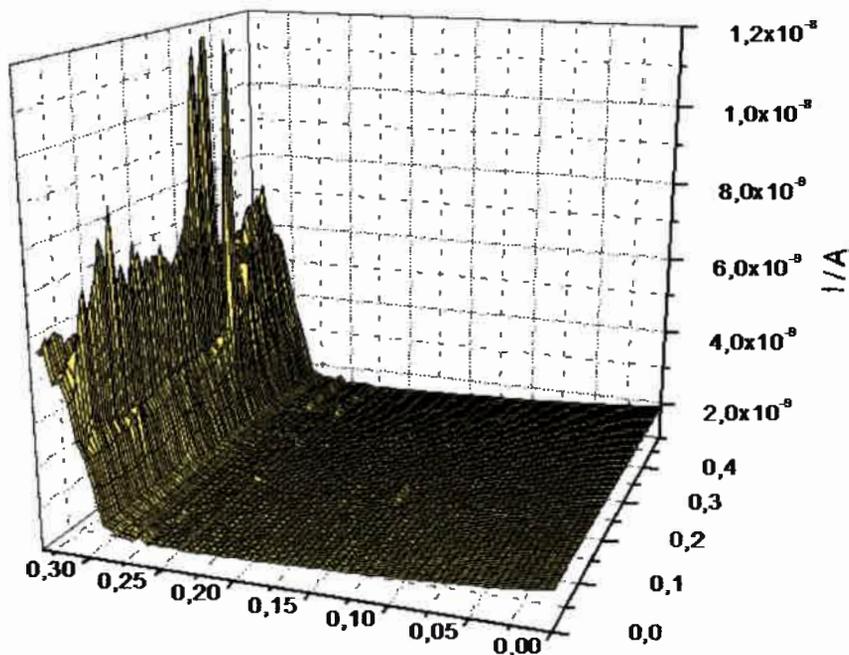


Figura A22. Mapeo de la placa 1 con un nanoelectrodo de Pt. Nanoelectrodo de Pt ($\phi \approx 18$ nm).

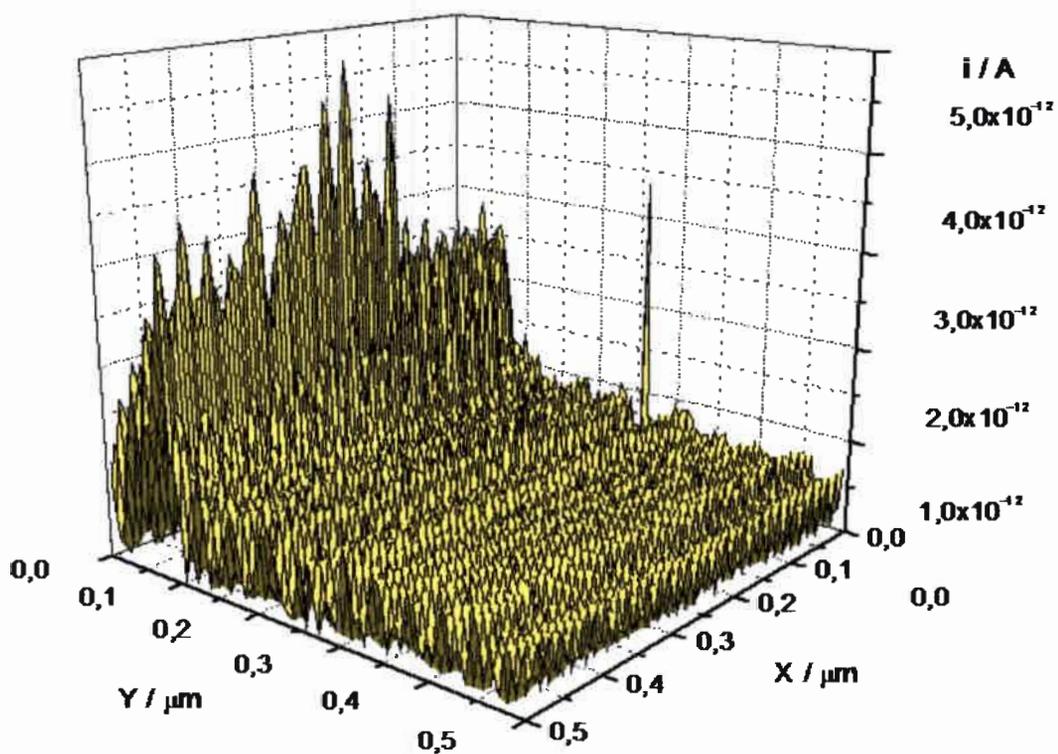


Figura A23. Mapeo de la placa 4 con un nanoelectrodo de Pt. Nanoelectrodo de Pt ($\phi \approx 260 \text{ nm}$).

A diferencia de los mapeos superficiales, cuando se barrió la placa de oro en una sola dirección, (por ejemplo en dirección X, a $Y = \text{constante}$) fue posible apreciar, aún mejor, como se logran sensar pequeños grupos de npAu (Fig. A24):

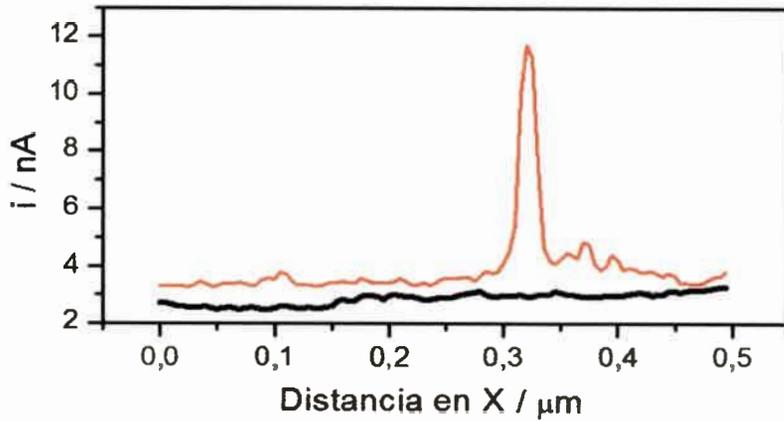


Figura A24. Barridos lineales sobre la placa 1. (→) zona con presencia de nanopartículas. (←) zona aislante, ausencia de npAu.

Luego de las medidas con el microscopio de barrido electroquímico se corroboró la presencia real de los depósitos de npAu mediante microscopía de barrido electrónico. Las imágenes obtenidas muestran las cadenas diluidas de npAu (Fig. A25).

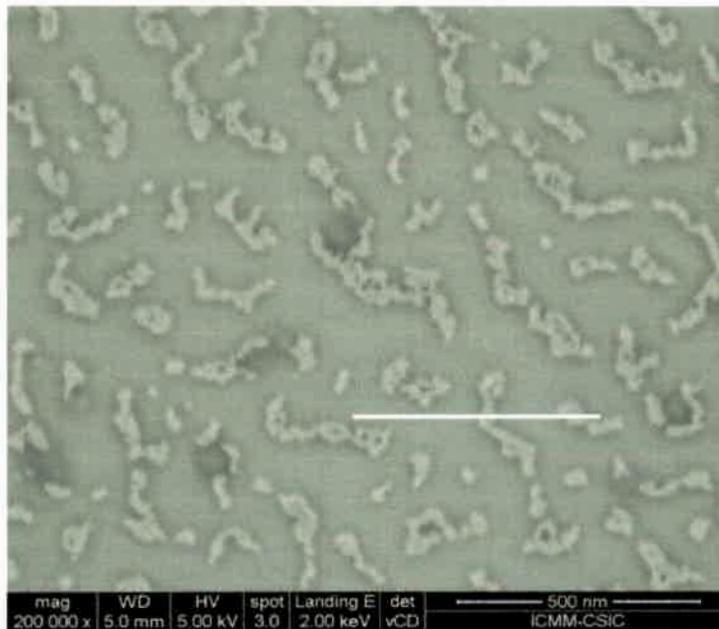


Figura A25. Imagen SEM 200.000 X – Placa 1, con depósito de npAu de $\phi \approx 5,5$ nm. La barra blanca representa, a modo de ejemplo, una línea sensada con el microscopio de barrido electroquímico.

Los mismos estudios se realizaron con npAu de mayor tamaño (11 nm), obteniéndose resultados similares. Estas npAu, al tener un mayor tamaño, necesitaron ser estabilizadas con citrato y, por lo tanto, estaban cargadas. Así, antes de ser sensadas en el microscopio de barrido electroquímico hubo que disminuir el pH de la solución, con el fin de neutralizar las cargas (para poder notar, mediante el uso del microscopio de barrido electroquímico, la aproximación de la punta a la superficie de la placa de oro modificada), lo que provocó la aglomeración de las mismas. El producto de esta unión de partículas es lo que, finalmente, se registró en los mapeos tridimensionales. A continuación se muestra un mapeo obtenido y la correspondiente imagen SEM de la misma placa de oro (Figs. A26 y A27).

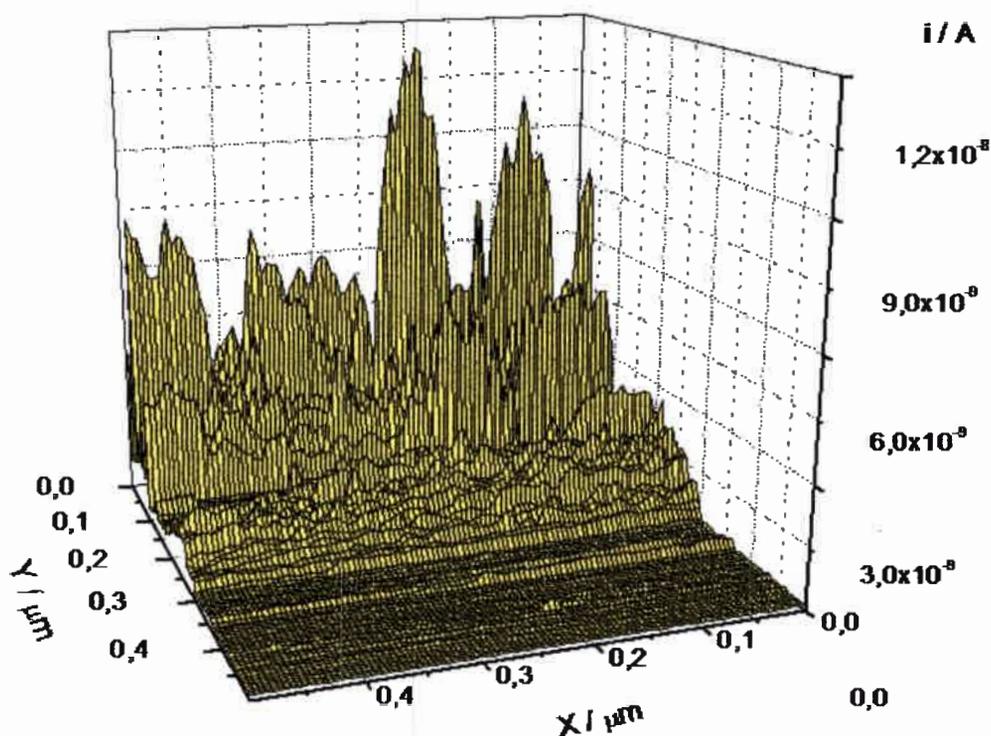


Figura A26. Mapeo de una placa de oro con depósito de npAu de $\Phi \approx 11$ nm (aglomeradas), con un nanoelectrodo de Pt.



Figura A27. *Imagen SEM 240.000 X – Placa de oro con depósito de npAu de $\phi \approx 11$ nm. La barra blanca representa, a modo de ejemplo, una línea sensada con el microscopio de barrido electroquímico.*

Finalmente, se comenzó a estudiar la respuesta electroquímica obtenida para placas de oro modificadas con cadenas de ADN intercaladas con rutenio. Se logró observar su presencia en el microscopio de barrido electroquímico pero, por razones de tiempo (Finalización de la Beca de Formación Permanente, otorgada por la Fundación Carolina), estos estudios no pudieron profundizarse. Un mapeo tridimensional de estas placas se puede ver a continuación (Fig. A28), en donde se observa una distribución superficial de las cadenas muy diferente a la de las npAu. Las imágenes SEM no pudieron realizarse debido a las mismas razones de falta de tiempo.

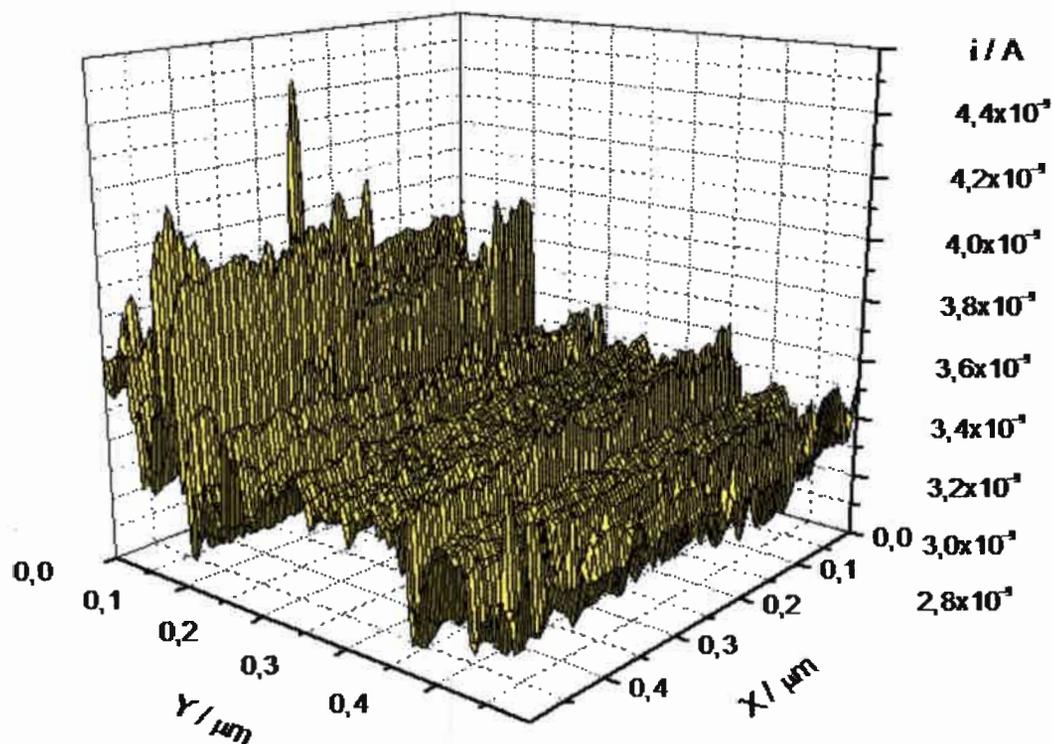


Figura A28. Mapeo de una placa de oro con depósito de cadenas de ADN intercaladas con rutenio.

I.3. Conclusiones

Haciendo uso de un microscopio de barrido electroquímico, se realizaron estudios para una primera aproximación a los sistemas nanométricos. A fin de que estos resultados puedan ayudar en el desarrollo de futuros biosensores, que permitan realizar determinaciones electroanalíticas de los antioxidantes, en una primera etapa empleando los reactivos comerciales y, luego, transferir estos resultados al análisis de muestras reales que contengan estos analitos. En cuanto a este tópico, se logró fabricar electrodos de platino de tamaños nanométricos, los cuales fueron utilizados como puntas de un microscopio de barrido electroquímico, mostrándose aptos para tal fin. Con ellos, se consiguió “mapear” superficies nanoestructuradas y hasta se llegó a diferenciar superficies con diferentes concentraciones superficiales, sobre placas de oro con depósitos de nanopartículas de oro. La resolución de estos sistemas pudo llevarse a cabo tanto en barridos bidimensionales como en tridimensionales, los cuales fueron

corroborados con estudios de las mismas placas, utilizando microscopía electrónica de barrido.

Resumiendo:

- Se logró fabricar electrodos de platino de tamaños nanométricos.
- Se realizaron variaciones a métodos actuales de fabricación, tanto en el contacto eléctrico como en la disminución del área, encontrándose buenos resultados.
- En las imágenes SEM se puede observar el polímero recubriendo la superficie, sólo cuando es en multicapas muy gruesas, con lo cual, se puede pensar que existen pequeños poros en diversas partes del Pt que, en solución, actúan como un arreglo de nanoelectrodos, con un área igual a la suma de toda la superficie (área que se calculó a partir de la medida de la corriente límite del nanoelectrodo) y que, cuando el electrodo está próximo a una superficie, y es usado como “tip”, sólo contribuye a la señal de corriente el poro que se encuentra más próximo a esta superficie.
- Estos nanoelectrodos se han podido utilizar como puntas (“tips”) de un microscopio de barrido electroquímico, logrando caracterizar superficies nanoestructuradas sobre placas de oro.

I.4. Referencias bibliográficas

- Abad, J. M., A. Y. Tesio, F. Pariente, E. Lorenzo, Scaling down of Scanning Electrochemical Microscopy to the nanoscale level achieving Single-molecule imaging resolution, (2013), enviado para su publicación.
- Agyekum, I., C. Nimley, C. Yang, P.-. Sun., Combination of Scanning Electron Microscopy in the Characterization of a Nanometer-Sized Electrode and Current Fluctuation Observed at a Nanometer-Sized Electrode, *J. Phys. Chem. C.* **114** (2010) 14970-14974.
- Arrigan, D. W. M., Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications, *Analyst* **129** (2004) 1157-1165.
- Bard, A. J., F. R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev, Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles, *Anal. Chem.* **61** (1989) 132-138.
- Bard, A. J., Mirkin, M. V., Scanning Electrochemical Microscopy; Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2001.
- Bard, A. J., Toward Single Enzyme Molecule Electrochemistry , *ACS Nano* **2** (2008) 2437-2440.
- Brust, M., D. Bethell, C. J. Kiely, D. J. Schiffrin, Self-Assembled Gold Nanoparticle Thin Films with Nonmetallic Optical and Electronic Properties, *Langmuir* **14** (1998) 5425-5429.
- Deiss, F., C. Combellas, C. Fretigny, N. Sojic, F. Kanoufi, Lithography by Scanning Electrochemical Microscopy with a Multiscaled Electrode, *Anal. Chem.* **82** (2010) 5169-5175.
- Finklea, H. O., "Electrochemistry of organized monolayer of thiols and related molecules on electrodes", *Electroanalytical Chemistry*, A. J. Bard and I. Rubinstein (Eds), Macel Dekker, New York, Vol 19, 1996.
- Georganopoulou, D., M. V. Mirkin, R. W. Murray, SECM Measurement of the Fast Electron Transfer Dynamics between Au³⁺ Nanoparticles and Aqueous Redox Species at a Liquid/Liquid Interface, *Nanolett.* **9** (2004) 1763-1767.

- Haiss, W., N. T. K., Thanh, J., Aveyard, D. G., Fernig, Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra, *Anal. Chem.* **79** (2007) 4215-4221.
- Jena, B. K., S. J. Percival, B. Zhang, Au Disk Nanoelectrode by Electrochemical Deposition in a Nanopore, *Anal. Chem.* **82** (2010) 6737-6743.
- Katemann, B. B., W. Schuhmann, Fabrication and Characterization of Needle-Type, *Electroanal.* **14** (2002) 22-28.
- Li, Y., D. Bergman, B. Zhang. *Anal. Chem.* **81** (2009) 5496-
- Liu, Y., R. He, Q. Zhang, S. Chen, Theory of Electrochemistry for Nanometer-Sized Disk Electrodes, *J. Phys. Chem. C.* **114** (2010) 10812-10822.
- Murray, R. W., Nanoelectrochemistry: Metal Nanoparticles, Nanoelectrodes, and Nanopores, *Chem. Rev.* **108** (2008) 2688-2720.
- Nogala, W., K. Szot, M. Burchardt, F. Roelfs, J. Rogalski, M. Opalloa, G. Wittstock, Feedback mode SECM study of laccase and bilirubin oxidase immobilised in a sol-gel processed silicate film, *Analyst* **135** (2010) 2051-2058.
- Parra, A.; E. Casero, L. Vázquez, J. Jin, F. Pariente, E. Lorenzo, Microscopic and Voltammetric Characterization of Bioanalytical Platforms Based on Lactate Oxidase, *Langmuir* **22** (2006) 5443-5450.
- Pellissier, M., D. Zigah, F. Barriere, P. Hapiot, Optimized Preparation and Scanning Electrochemical Microscopy Analysis in Feedback Mode of Glucose Oxidase Layers Grafted onto Conducting Carbon Surfaces, *Langmuir* **24** (2008) 9089-9095.
- Roberts, W. S., D. J. Lonsdale, J. Griffiths, S. P. J. Higson, Advances in the application of scanning electrochemical microscopy to bioanalytical systems, *Biosens. Bioelectron.* **23** (2007) 301-318.
- Sawyer, D. T., A. Sobkowiak, J. L. Roberts, Jr. *Electrochemistry for Chemists*. Ed. J. Wiley, New York, U.S.A., 1995.

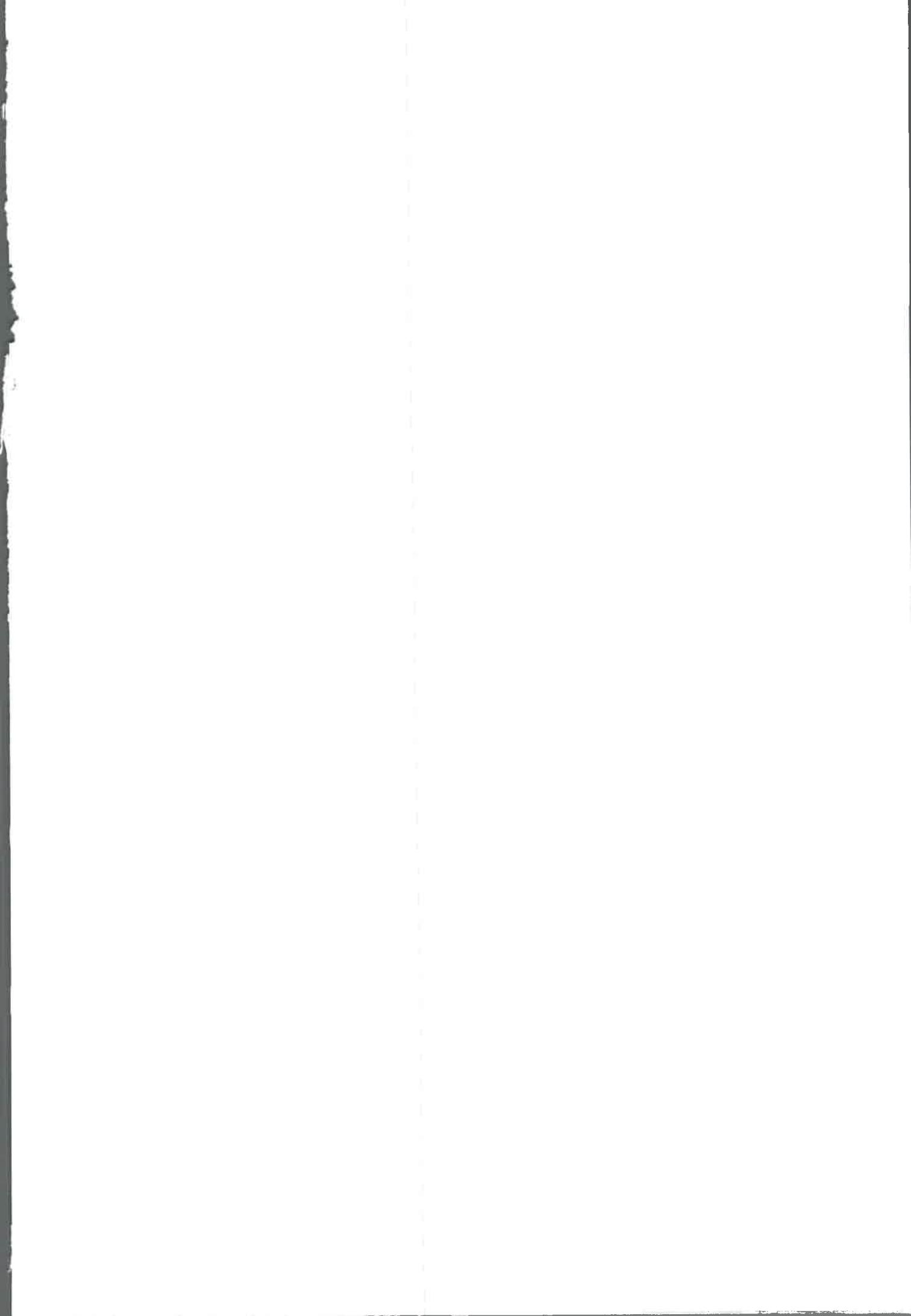
- Schäfer, D., M. Maciejewska, W. Schuhmann, Advances in the application of scanning electrochemical microscopy to bioanalytical systems, *Biosens. Bioelectron.* **22** (2007) 1887-1895.
- Shao, Y., M. V. Mirkin, G. Fish, S. Kokotov, D. Palanker, A. Lewis, Nanometer-Sized Electrochemical Sensors, *Anal. Chem.* **69** (1997) 1627-1634.
- Sun, P., M.V. Mirkin, Kinetics of Electron-Transfer Reactions at Nanoelectrodes, *Anal. Chem.* **78** (2006) 6526-6534.
- Sun, P., Z. Zhang, J. Guo, Y. Shao, Fabrication of Nanometer-Sized Electrodes and Tips for Scanning Electrochemical Microscopy, *Anal. Chem.* **73** (2001) 5346-5351.
- Takahashi, Y., Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, Y. Yamada, T. Matsue, Fabrication of Nanometer-Sized Electrodes and Tips for Scanning Electrochemical Microscopy, *Langmuir* **22** (2006) 10299-10306.
- Velmurugan, J., P. Sun, M. V. Mirkin, Scanning Electrochemical Microscopy with Gold Nanotips: The Effect of Electrode Material on Electron Transfer Rates, *J. Phys. Chem. C.* **113** (2009) 459-464.
- Watkins, J. J., H. S. White, The Role of the Electrical Double Layer and Ion Pairing on the Electrochemical Oxidation of Hexachloroiridate(III) at Pt Electrodes of Nanometer Dimensions, *Langmuir* **20** (2004) 5474-5483.
- Wittstock, G., M. Burchard, S. E. Pust, Y. Shen, C. Zhao, Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates, *Angew. Chem.* **46** (2007) 1584-1617.
- Wittstock, G., W. Schuhmann, Formation and Imaging of Microscopic Enzymatically Active Spots on an Alkanethiolate-Covered Gold Electrode by Scanning Electrochemical Microscopy, *Anal. Chem.* **69** (1997) 5059-5066.
- Zhang, B., J. Galusha, P. G. Shiozawa, G. Wang, A. J. Bergren, R. M. Jones, R. J. White, E. N. Ervin, C. C. Cauley, H. S. White, Bench-Top Method for Fabricating Glass-Sealed Nanodisk Electrodes, Glass Nanopore Electrodes, and Glass Nanopore Membranes of Controlled Size, *Anal. Chem.* **79** (2007) 4778-4787.

Zhang, M., G. Wittstock, Y. Shao, H. B. Girault, Scanning Electrochemical Microscopy as a Readout Tool for Protein Electrophoresis, *Anal. Chem.* **79** (2007) 4833-4839.

Zhao, C. G. Wittstock, Scanning Electrochemical Microscopy of Quinoprotein Glucose Dehydrogenase, *Anal. Chem.* **76** (2004) 3145-3154.







71409

U. H. R. C.
Biblioteca Central



71409