

MAZA, ELIANA M
Estudio de electrodo

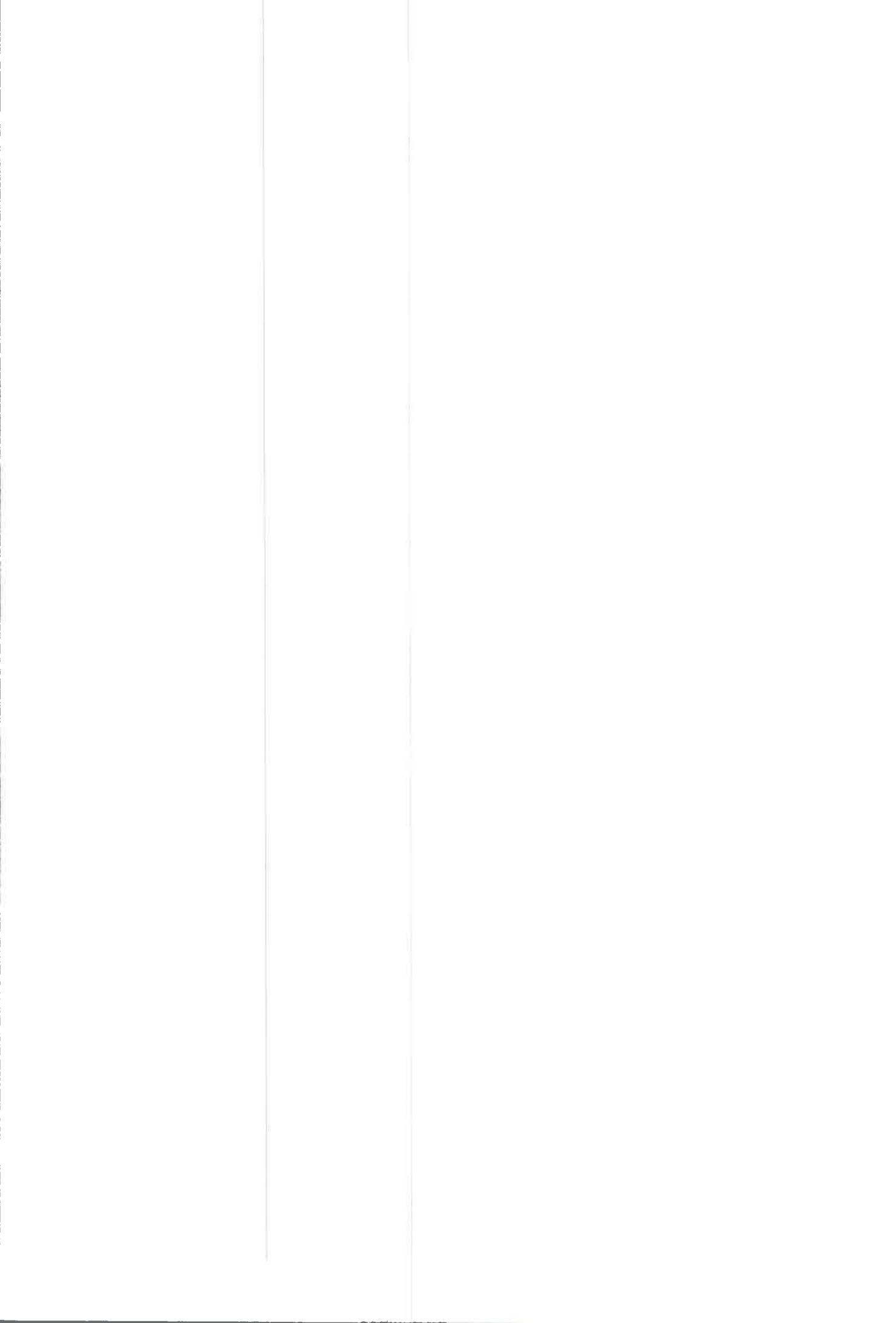


2013

72653

72653

Clasif:
T. 804



72653



CREER..CREAR..CRECER

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química

***“Estudios de electrodos de oro
modificados por monocapas
autoensambladas de tioles para ser
empleados como sensores electroanalíticos
en la determinación de antioxidantes
naturales”***

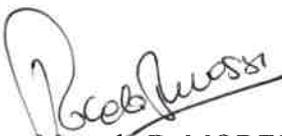
Tesis Doctoral en Ciencias Químicas

Eliana M. Maza

MARZO 2013

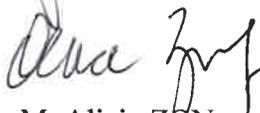
El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto para optar al Título de Doctora en Ciencias Químicas.

Directora:



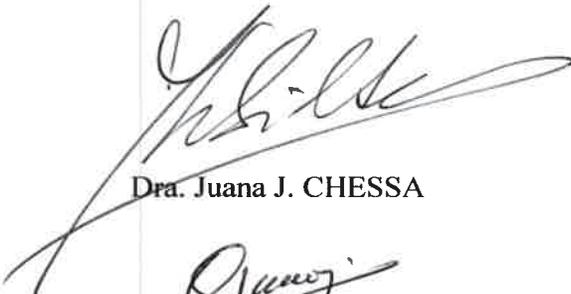
Dra. Marcela B. MORESSI

Co-Directora:

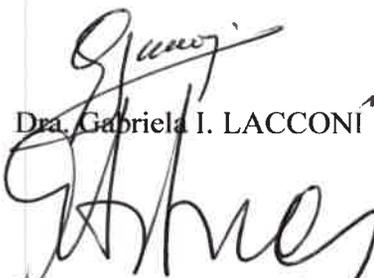


Dra. M. Alicia ZON

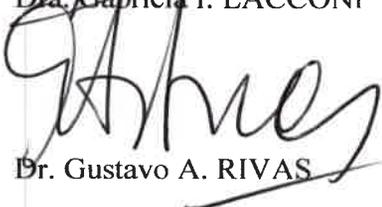
Miembros del Jurado:



Dra. Juana J. CHESSA



Dra. Gabriela I. LACCONI



Dr. Gustavo A. RIVAS

Río Cuarto, 25 de Marzo de 2013.

“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir.”

T.S. Eliot

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que, de una u otra manera, han estado presentes en el transcurso de esta etapa.

Deseo, en primer lugar, dar las gracias a Tito y Alicia y a todos los miembros que conforman el grupo dirigido por ellos, quienes en todo momento me han acompañado a lo largo de estos años: Álvaro, Meli, Paulo, Lore, Vane, Seba, Gerardo, Pato P., Fer, Adrián y César. A Pato M. y Fabi. A Juan Miguel M., por su ayuda desinteresada. A todas las personas que han pasado por el laboratorio alegrando el ambiente de trabajo.

Quiero agradecer especialmente a Marcela, la directora de este trabajo, que no sólo ha estado pendiente de la tesis sino que también, con gran paciencia y dedicación, ha estado siempre presente brindándome sus consejos. Por sus enseñanzas en todos los aspectos.

A los miembros del jurado: Nita, Gabriela y Gustavo, por haber seguido atentamente los avances de esta tesis y por los aportes realizados.

También quiero agradecer a Rafael Andreu, Juan José Calvente y a los integrantes de su grupo, perteneciente a la Universidad de Sevilla, quienes han puesto a mi disposición sus conocimientos, su tiempo y su cariño durante mi estancia en España. A Antonio, Francisco, Emilio, Domingo, José Luis, Víctor, Germán, Eva, Elia, Ana, Tomás.

A Rosita, Marisel, Negrita, Cacho, Daniela y Graciela por toda su ayuda.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por la prestación de sus instalaciones, y en particular a los integrantes del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Fisicoquímicas y Naturales, por brindarme lo necesario para esta tesis. A CONICET por la beca doctoral otorgada.

A mis compañeras/os y amigos/os del “Gran Becario”, con quienes hemos compartido risas, nervios, alegrías, tristezas y tantas otras cosas en la convivencia diaria: Ale, Lau, Clau, Jime T., Angélica, Jorge, Diana, Euge, Dani, Andrés, Gaby, Naty, Jime M., Javi, Eve, Fede, Pablo, Caro, Sil.

A esas amistades más que especiales, que permanecen a lo largo de los años: Lore, Jose y Mati, Noe y Jime G.

Y por supuesto a mi familia: mi mamá Irene, mis hermanas Natalia e Itatí, mi sobrina Candela. A mis tíos Jorge y Olga, María Rosa, Magda y Oscar, Lucía y especialmente a mi tía Estela por el apoyo constante a lo largo de la vida. A mis abuelos María y José, y a mis primos Seba, Jere, Fabri, Gabriel, Belén y Juan. Y a los que me guían desde arriba: mi papá Armando y mis abuelos Elda y Totó.

Agradezco a todos el apoyo mostrado durante la realización de esta tesis. Apoyo sin el cual esto no habría sido posible. Simplemente, gracias.

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

a) Publicaciones en revistas con referato

1) E. M. Maza, M. B. Moressi, H. Fernández, M. A. Zon

“Electrochemical oxidation of fisetin: Studies related to its adsorption on glassy carbon electrodes”

J. Electroanal. Chem., **675** (2012) 11–17.

2) E. M. Maza, H. Fernández, M. A. Zon, M. B. Moressi

“Determination of flavonoid fisetin at gold electrodes modified by 4-mercaptophenol self-assembled monolayers”

(2013), en redacción.

2) E. M. Maza, H. Fernández, M. A. Zon, M. B. Moressi

“Development of an electroanalytical method for determination of flavonoids using gold electrodes modified by 2-mercaptoethanesulfonic acid self-assembled monolayers. Application to a real sample”

(2013), en redacción.

b) Presentaciones a Congresos y/o Reuniones Científicas

1) E. M. Maza, M. A. Zon, H. Fernández, M. B. Moressi

“Estudio de la adsorción electroquímica del flavonoide fisetina sobre electrodos de carbono vítreo”

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

2) E. M. Maza, M. A. Zon, H. Fernández, M. B. Moressi

“Desarrollo de un método electroanalítico para la cuantificación de fisetina”

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

3) E. M. Maza, M. A. Zón, H. Fernández, M. B. Moressi

“Empleo de un electrodo de oro modificado con ácido 2-mercaptoetanosulfónico en la determinación de flavonoides”

IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica. X Encuentro Nacional de Química Analítica y Ambiental, Chile, Noviembre de 2010.

- 4) E. M. Maza, M. B. Moressi, A. Zon, H. Fernández, J. J. Calvente y R. Andreu
“Oxidación del catecol sobre superficies de oro modificadas con submonocapas de tioles”

XXXII Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química y XIII Encontro Ibérico de Electroquímica, Murcia, España, 6 al 9 de Septiembre de 2011.

- 5) E. M. Maza, J. J. Calvente, R. Andreu, A. Zon, H. Fernández y M. B. Moressi
“Estudio de submonocapas autoensambladas de tioles para ser empleadas como sensores electroanalíticos”

VI Congreso Argentino de Química Analítica. Santa Fe, Argentina, 26 al 29 de Septiembre de 2011.

- 6) E. M. Maza, H. Fernández, M. A. Zon, M. B. Moressi
“Estudio y caracterización de monocapas autoensambladas para ser utilizadas en determinaciones electroanalíticas”

Reunión Nano-Córdoba. Villa Carlos Paz, Argentina, 1 al 3 de Octubre de 2012.

- 7) E. M. Maza, H. Fernández, M. A. Zon, M. B. Moressi
“Desarrollo de un método electroanalítico para la determinación del flavonoide quercetina “Estudios de electrodos de oro modificados por monocapas autoensambladas de tioles para ser empleados como sensores electroanalíticos en la determinación de antioxidantes naturales”.en una formulación farmacéutica”

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

RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se llevaron a cabo estudios relacionados al comportamiento electroquímico del flavonoide fisetina (FIS) y se desarrollaron metodologías electroanalíticas para la determinación de flavonoides. Una de estas metodologías se probó exitosamente en forma directa en la determinación del flavonoide quercetina (QUER) en una formulación farmacéutica.

En primer lugar, el estudio de FIS se realizó sobre electrodos de carbono vítreo (CV) y de Au desnudo. El comportamiento fue semejante en ambos casos, siendo el mismo de naturaleza mixta: difusional/adsortiva. Sin embargo, debido a que sobre los electrodos de Au la reproducibilidad de las respuestas fue baja, sólo sobre CV se determinó la isoterma de adsorción y los parámetros cinéticos y termodinámicos correspondientes.

Posteriormente, se estudió el comportamiento electroquímico de FIS sobre electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas (MAE) de 11 tioles con diferentes características estructurales, observándose respuestas de distinta naturaleza, según los casos. La respuesta electroquímica de FIS fue de naturaleza adsortiva cuando el electrodo de Au se modificó con el 4-mercaptofenol (4-MF) y mostró un control difusional en el caso de la monocapa formada por el ácido 2-mercaptoetanosulfónico (2-MES). Ambos electrodos modificados se usaron en el desarrollo de técnicas electroanalíticas para la determinación de FIS. Además, se realizaron estudios con superficies modificadas con submonocapas (sMAE), que también permitieron el desarrollo de un método electroanalítico empleando 2-MES. Se encontró que con las sMAE se simplifica el diseño experimental, lo que presenta una ventaja respecto a las MAE.

Se realizaron estudios para la caracterización de MAE a partir de los cuales se lograron determinar el cubrimiento superficial, la orientación predominante de los tioles respecto a la superficie del electrodo y los pK_a superficiales. Estos resultados permitieron explicar las diferencias observadas en las respuestas de FIS sobre cada una de las superficies modificadas.

Finalmente, el método electroanalítico desarrollado con 2-MES para FIS se transfirió en forma directa a la determinación de QUER en una preparación farmacéutica. La validación del método se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección por arreglo de diodos.

ABSTRACT

The electrochemical behavior of fisetin (FIS) flavonoid was studied at different working electrodes. Electroanalytical methods were developed and one was used to determine the quercetin (QUER) flavonoid in a pharmaceutical formulation.

The FIS electrochemical behavior was first studied at glassy carbon (GC) and bare Au electrodes, showing on both electrodes surface properties. However, FIS electrochemical responses at bare Au electrodes were poorly reproducible. Thus, we only studied the specific interaction of FIS with GC electrodes and found the best adsorption isotherm that describes the specific interaction, and determined the corresponding thermodynamic and kinetics parameters of the surface redox couple.

On the other hand, we also studied the FIS electrochemical behavior at modified Au electrodes with self-assembled monolayers (SAM) obtained from 11 thiols with different chemical structures. We found that the electrochemical response at modified Au electrodes with 4-mercaptophenol (4-MP) showed an adsorption control. However, at modified Au electrodes with 2-mercaptoethanesulfonic acid (2-MES) showed a diffusion control. Both modified electrodes were then used to develop electroanalytical techniques to determine FIS. In addition, we also studied the use of modified Au electrodes with submonolayers (sSAM) obtained from 2-MES, finding that sSAM show advantages over SAM simplifying the design of experiments.

Studies were then conducted to characterize monolayers. Thus, we determined the surface coverage, the most probable orientation of thiols on the electrode surface and the surface pK_a 's. These results allowed us to explain the different found in the FIS electrochemical response on each modified surface.

Finally, the electroanalytical method developed to determine FIS with modified Au electrodes with 2-MES was used to determine QUER in a pharmaceutical preparation. These results were compared with those obtained from high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de este proyecto es estudiar las propiedades de electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas de distintos tipos de tioles, con el fin de desarrollar nuevos sensores electroanalíticos para la determinación de sustancias de interés alimenticio y en sistemas biológicos. Para ello, se plantean como objetivos específicos los siguientes:

Objetivos Especificos

Construir y caracterizar electrodos de Au modificados por auto-ensamblado molecular de distintos tipos de tioles.

Estudiar las interacciones químicas y físicas fundamentales que controlan la formación, estructura y reactividad de estas superficies; caracterizando la presencia de defectos y/o huecos que puedan estar presentes en las mismas.

Estudiar el comportamiento electroquímico de analitos de interés en alimentos y sistemas biológicos, particularmente, el antioxidante natural fisetina, tanto sobre este tipo de superficie como sobre electrodos sin modificar.

Investigar las señales electroquímicas adecuadas con el fin de caracterizar este tipo de electrodos modificados y utilizarlos en el desarrollo de métodos electroanalíticos alternativos.

El presente trabajo de Tesis ha sido organizado en diez capítulos. El **Capítulo 1** comprende la introducción, en la que se exponen aspectos fundamentales sobre las monocapas autoensambladas y los antioxidantes naturales. En el **Capítulo 2** se describen los fundamentos teóricos relacionados al sistema electroquímico y las técnicas empleadas en este trabajo de Tesis. En el **Capítulo 3** se describen los elementos y procedimientos experimentales necesarios para llevar a cabo los diferentes experimentos. El **Capítulo 4** comprende el estudio del comportamiento electroquímico del flavonoide fisetina sobre electrodos de carbono vítreo y Au, para luego, en el **Capítulo 5**, abordar el estudio sobre electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas de tioles. El **Capítulo 6** detalla la caracterización de las superficies modificadas mediante diversos métodos, lo que permite obtener información de las propiedades estructurales de las mismas. Sobre la base del análisis realizado previamente, en el **Capítulo 7** se desarrollan métodos electroanalíticos para la detección de fisetina y en el **Capítulo 8** se transfiere uno de estos métodos a la determinación del flavonoide quercetina en una muestra real, probando su validez con el empleo de una técnica cromatográfica (HPLC). En el **Capítulo 9** se presenta el estudio de submonocapas autoensambladas y se prueba su utilidad en la determinación de fisetina mediante el desarrollo de un método electroanalítico. Finalmente, en el **Capítulo 10** se resumen las principales conclusiones obtenidas a lo largo del trabajo y en el **Capítulo 11** se presenta la bibliografía.

Índice

Resumen	i
Abstract	ii
Objetivos	iii
Objetivo general	iii
Objetivos específicos	iii
Índice	v
Glosario	xi
Símbolos	xi
Abreviaturas	xiii

Capítulo 1. Introducción

1.1. Electroodos químicamente modificados	3
1.1.1. Generalidades de las monocapas autoensambladas	4
1.1.2. Métodos de preparación de monocapas autoensambladas de tioles	7
1.1.3. Transferencia electrónica sobre electrodos modificados con monocapas autoensambladas	9
1.1.4. Técnicas de caracterización de monocapas autoensambladas	10
1.2. Antioxidantes naturales	11
1.2.1. Flavonoides	12
1.2.1.1. Estructura y clasificación	12
1.2.1.2. Distribución en la naturaleza y acción antioxidante	13
1.2.1.3. Análisis de flavonoides	16

Capítulo 2. Fundamentos teóricos

2.1. Introducción	21
2.2. Naturaleza de las reacciones de electrodo	21
2.3. Celdas electroquímicas y potenciales de celda	22
2.4. Variables asociadas a un sistema electroquímico	24
2.5. Reversibilidad en procesos electroquímicos	25
2.6. Factores que afectan la velocidad de la reacción de electrodo	27
2.7. Modos de transferencia de masa	28
2.8. Técnicas electroquímicas empleadas	29
2.8.1. Técnicas voltamperométricas	31
2.8.1.1. Voltamperometría cíclica	32
2.8.1.1.1. Sistemas reversibles	35
2.8.1.1.2. Sistemas irreversibles y cuasi-reversibles	36
2.8.1.2. Voltamperometría de convolución	38
2.8.1.3. Voltamperometría de onda cuadrada	40
2.8.2. Espectroscopía de impedancia electroquímica	42
2.9. Técnica no electroquímica: Ángulo de contacto	46
2.10. Procesos de adsorción	48
2.10.1. Isotermas de adsorción	48

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1. Materiales	55
3.1.1. Reactivos y muestra real	55
3.1.2. Solventes	55

3.1.3. Soluciones	56
3.1.4. Tioles	56
3.2. Instrumental electroquímico	57
3.2.1. Celdas electroquímicas	57
3.2.2. Electroodos	58
3.2.2.1. Electroodos de trabajo	58
3.2.2.1.1. Tratamiento previo aplicado a los electroodos de trabajo	59
3.2.2.1.2. Determinación del área electroquímica del electrodo de Au policristalino	59
3.2.2.1.3. Modificación del electrodo de Au	62
3.2.2.2. Electroodos de referencia	62
3.2.2.3. Contraelectrodo	63
3.3. Técnicas empleadas	63
3.4. Equipamiento	64

Capítulo 4. Estudio del comportamiento electroquímico de fisetina sobre electroodos desnudos

4.1. Propiedades fisicoquímicas de fisetina	67
4.2. Medidas electroquímicas	68
4.2.1. Comportamiento electroquímico de fisetina sobre electroodos de carbono vítreo	68
4.2.1.1. Estudio del proceso controlado por difusión	75
4.2.1.1.1. Voltamperometría de convolución ..	76
4.2.1.2. Estudio del proceso controlado por adsorción	78
4.2.1.2.1. Concentración superficial de las especies adsorbidas	79

4.2.1.2.2. Isotherma de adsorción	79
4.2.1.2.3. Determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos de la reacción redox superficial mediante voltamperometría de onda cuadrada	83
4.2.1.2.3.1. Desdoblamiento del pico neto	83
4.2.1.2.3.2. Método del máximo cuasi-reversible	86
4.2.2. Comportamiento electroquímico de fisetina sobre un electrodo de Au sin modificar	89
4.3. Conclusiones	91

Capítulo 5. Estudio del comportamiento electroquímico de fisetina sobre electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas

5.1. 1-dodecanotiol	95
5.2. Bencenotiol	97
5.3. 6-mercapto-1-hexanol	97
5.4. 4-mercaptofenol	98
5.4.1. Caracterización de la cupla redox adsorbida	100
5.5. Ácido 4-mercaptobenzoico	104
5.6. Ácido 3-mercaptopropiónico	106
5.7. Ácido 2-mercaptoetanosulfónico	109
5.8. Cisteamina	113
5.9. 2-(dietilamino)etanotiol	117
5.10. 4-mercaptopiridina	120
5.11. 4-aminotiofenol	123
5.12. Conclusiones	125

Capítulo 6. Caracterización de monocapas autoensambladas de tioles

6.1. Estudios preliminares sobre el comportamiento de bloqueo monocapas autoensambladas de tioles	129
6.2. Desorción electroquímica de monocapas autoensambladas	132
6.2.1. Desorción oxidativa	133
6.2.2. Desorción reductiva	136
6.3. Espectroscopía de impedancia electroquímica	141
6.4. Determinación del pK_a aparente de monocapas autoensambladas	149
6.4.1. Determinación del pK_a aparente mediante voltamperometría cíclica	149
6.4.2. Determinación del pK_a aparente mediante medidas de ángulo de contacto	153
6.5. Conclusiones	157

Capítulo 7. Desarrollo de métodos electroanalíticos

7.1. Desarrollo de un método electroanalítico para la determinación de fisetina empleando monocapas autoensambladas de 4-mercaptofenol	161
7.1.1. Elección de las condiciones óptimas de trabajo	161
7.1.2. Curva de calibración de fisetina mediante voltamperometría de onda cuadrada	163
7.2. Desarrollo de un método electroanalítico para la determinación de fisetina empleando monocapas autoensambladas del ácido 2-mercaptoetanosulfónico	165
7.2.1. Elección de las condiciones óptimas de trabajo	165
7.2.2. Curva de calibración de FIS mediante voltamperometría de onda cuadrada	167
7.3. Conclusiones	169

Capítulo 8. Aplicación: determinación de quercetina en una formulación farmacéutica

8.1. Respuesta electroquímica de quercetina173

8.2. Determinación de quercetina en una muestra real176

 8.2.1. Determinación de quercetina mediante HPLC con detección por
 arreglo de diodos179

8.3. Conclusiones182

Capítulo 9. Submonocapas autoensambladas de tioles

9.1. Formación de submonocapas autoensambladas186

9.2. Comportamiento electroquímico de catecol190

9.3 Comportamiento de catecol sobre submonocapas autoensambladas192

 9.3.1. Estudio de la respuesta de catecol empleando una única celda195

9.4. Comportamiento de fisetina sobre submonocapas autoensambladas200

 9.4.1. Desarrollo de un método electroanalítico para la determinación de fisetina
 empleando submonocapas autoensambladas del ácido 2-mercaptoetanosulfónico202

9.5. Conclusiones204

Capítulo 10. Conclusiones generales207

Capítulo 11. Bibliografía211

Glosario

Símbolos

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>	<i>Unidades</i>
$\bar{\mu}_i^{0,\alpha}$	potencial electroquímico estándar de la sustancia <i>i</i> en una fase α	kJ mol^{-1}
$\bar{\mu}_i^\alpha$	potencial electroquímico de la sustancia <i>i</i> en una fase α	kJ mol^{-1}
ε	coeficiente de extinción molar	$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$
β	parámetro que expresa la fuerza de adsorción	—
δ	densidad	mg L^{-1}
κ	constante de velocidad adimensional	—
σ	parámetro de la impedancia de elemento de fase constante	—
<i>A</i>	área del electrodo	cm^2
a_i^α	actividad de la sustancia <i>i</i> en una fase α	—
c_i^*	concentración de <i>i</i> en el seno de la solución	M, mol cm^{-3}
C_d	capacitancia de la doble capa	F, F cm^{-2}
D_i	coeficiente de difusión de especies <i>i</i>	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
<i>E</i>	potencial	V
E_f^0	potencial formal	V
E^0	potencial estándar	V
$E_{1/2}$	potencial de media onda	V
E_c	potencial de inversión de la dirección del barrido en voltamperometría cíclica	V
E_f	potencial final en voltamperometría cíclica	V
E_i	potencial inicial en voltamperometría cíclica	V
E_p	potencial de pico	V
$E_{p,a}$	potencial de pico anódico	V
$E_{p,c}$	potencial de pico catódico	V
$E_{p/2}$	potencial de pico a la mitad de la corriente de pico	V

f	frecuencia de la onda cuadrada	s^{-1} , Hz
F	constante de Faraday	$C\ mol^{-1}$
g'	parámetro de interacción entre especies adsorbidas	—
I	corriente	A
I_d	corriente directa	A
I_i	corriente inversa	A
$I_{L,con}$	corriente límite convolucionada	A
I_n	corriente diferencial o neta	A
I_p	corriente de pico	A
$I_{p,a}$	corriente de pico anódica	A
$I_{p,c}$	corriente de pico catódica	A
$I_{p,n}$	corriente de pico neta	A
$I_{p,n,máx}$	corriente de pico neta máxima	A
k^0	constante de velocidad estándar	$cm\ s^{-1}$
n	número de electrones intercambiados por mol de sustancia	—
n_a	número de electrones aparente involucrados en la etapa determinante de la velocidad del proceso global	—
Q	carga	C
Q_{CPE}	parámetro de la impedancia de elemento de fase constante	$\mu\Omega^{-1}\ cm^{-2}\ s^\sigma$
R	constante universal de los gases	$J\ mol^{-1}\ K^{-1}$
R_{ct}	resistencia a la transferencia de carga	Ω
R_s	resistencia de la solución	Ω
T	temperatura	K
t_{ac}	tiempo de acumulación	min
t_d	tiempo de desorción	s
t_{mod}	tiempo de modificación	min
t_p	ancho o tiempo de pulso	s
$t_{R,i}$	tiempo de retención de la sustancia i en cromatografía líquida de alta eficacia	min
v	velocidad de barrido de potencial	$V\ s^{-1}$
W	impedancia de Warburg	Ω
$W_{1/2}$	ancho de pico a la altura media	V

Z	impedancia	Ω
Z_{CPE}	impedancia de elemento de fase constante	Ω
Z_f	impedancia del proceso de electrodo	Ω
α	coeficiente de transferencia catódico	—
Γ	concentración superficial	mol cm^{-2}
γ	ángulo de contacto	grados
γ_i	coeficiente de actividad para la especie i	—
ΔE_e	salto de escalera	V
ΔE_{oc}	amplitud de la onda cuadrada	V
ΔG_{ads}	energía libre de adsorción	kJ mol^{-1}
θ	cubrimiento superficial	—
θ_{imp}	cubrimiento superficial calculado por impedancia	—
θ_{ox}	cubrimiento superficial calculado por desorción oxidativa	—
θ_{red}	cubrimiento superficial calculado por desorción reductiva	—
τ	período de la onda cuadrada	s
φ	ángulo de fase	grados
ϕ	ángulo de fase entre señales sinusoidales	grados
ω	frecuencia angular	s^{-1} , Hz

Abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
2-DAET	2-(dietilamino)etanotiol
2-MES	ácido 2-mercaptoetanosulfónico
3-MP	ácido 3-mercaptopropiónico
4-ATF	4-aminotiofenol
4-MB	ácido 4-mercaptobenzoico
4-MF	4-mercaptofenol
4-MP	4-mercaptopiridina
6-M-1-H	6-mercapto-1-hexanol

ACN	acetonitrilo
AFM	microscopía de fuerza atómica
BT	bencenotiol
CA	cisteamina
CPE	elemento de fase constante
CV	carbono vítreo
DDT	1-dodecanotiol
DMSO	dimetilsulfóxido
ECS	electrodo de calomel saturado
EIE	espectroscopía de impedancia electroquímica
ENH	electrodo normal de hidrogeno
EQ	transferencia electrónica heterogénea seguida por una reacción química homogénea
EQEQ	transferencia electrónica heterogénea seguida por una reacción química homogénea, en secuencia
FIS	fisetina
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HT	1-hexanotiol
LDL	lipoproteínas de baja densidad
MAE	monocapa autoensamblada
QCM	microbalanza de cristal de cuarzo
QUER	quercetina
sMAE	submonocapa autoensamblada
STM	microscopía de efecto túnel
UHV	deposición en ultra alto vacío
VC	voltamperometría cíclica
VOC	voltamperometría de onda cuadrada
XPS	espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

Capítulo 1

Introducción

1.1. ELECTRODOS QUÍMICAMENTE MODIFICADOS

Se denominan electrodos químicamente modificados a aquellos materiales conductores o semiconductores que han sido cubiertos con una película monomolecular, multimolecular, iónica o polimérica con el objetivo de cambiar las propiedades electroquímicas, ópticas, etc., de la interface.^{1,2}

La modificación de la superficie de electrodos ha sido empleada extensamente en el campo de la electroanalítica durante los últimos años. Los motivos que han llevado al desarrollo de electrodos modificados, entre otros, han sido: i) aumentar las propiedades electrocatalíticas; ii) evitar efectos de pasivación de la superficie; iii) evitar reacciones químicas indeseables.^{3,4} En este aspecto, la modificación de electrodos de Au con monocapas autoensambladas (MAE) ha logrado mucha atención debido a su fácil preparación, excelentes propiedades y promisoria aplicabilidad en diversos campos de la ciencia.⁵⁻¹² Desde hace varios años, el estudio de superficies modificadas con MAE ha despertado gran interés y ha ido creciendo notablemente. En general, estos estudios han tenido dos objetivos fundamentales: a) estudiar la transferencia electrónica heterogénea a través de una interface bloqueada por la monocapa, es decir transferencia de electrones por efecto túnel;¹³⁻¹⁵ b) diseñar electrodos modificados que actúen como sensores y/o base para biosensores en aplicaciones electroanalíticas.¹⁶⁻²¹ Este segundo aspecto se basa en que, los electrodos modificados con MAE, permiten controlar y estructurar la interface sólido/líquido pudiendo aumentar la selectividad y sensibilidad y disminuir tanto los tiempos de respuesta como los sobrepotenciales.²²⁻²⁵ El resultado surge del bloqueo del acceso directo de sustancias a la superficie del electrodo, inhibiendo algunos procesos y promoviendo otros.²⁶ Estudios previos han mostrado que la modificación de la superficie del electrodo mediante una MAE afecta notoriamente la respuesta electroquímica de determinados analitos.^{23,24} Además, mediante el uso de MAE es posible la investigación de reacciones orgánicas superficiales,²⁷ el modelado de membranas celulares²⁸ y sirve como superficie modelo para estudiar las interacciones material/sangre para el desarrollo de dispositivos biomédicos.²⁹ Se ha buscado el diseño de películas específicas para aplicaciones tecnológicas, como por ejemplo, en optoelectrónica,³⁰ como películas inhibidoras de la corrosión o ataque químico,³¹ como películas lubricantes capaces de modificar la adhesión y la fricción de las superficies,³²

y el diseño y construcción de dispositivos electrónicos a escala nanométrica.³³ La comprensión y el control del transporte de carga a través de las películas moleculares de espesor nanométrico son de gran importancia en sistemas tecnológicos, tales como electrónica molecular y diseño de sensores.

1.1.1. Generalidades de las monocapas autoensambladas

Las MAE consisten en capas simples de moléculas orgánicas que se unen espontáneamente sobre un sustrato, generando superficies estables con un determinado grado de orientación, orden molecular y empaquetamiento o compactibilidad.

Las moléculas que forman las MAE constan de: a) un grupo de anclaje, con afinidad específica por el sustrato, b) un grupo que actúa como espaciador o puente molecular entre el electrodo metálico y la solución y c) un grupo terminal, que se encuentra en contacto con la solución, determinando en gran medida las propiedades superficiales de la monocapa¹² (Figura 1). La estructura de la MAE depende de las fuerzas que actúan entre los grupos espaciadores y los grupos terminales de las moléculas que la componen. Estas fuerzas incluyen interacciones de van der Waals y electrostáticas y efectos estéricos.^{2,5,6,34-36} La afinidad específica de estas moléculas por un sustrato, en muchos casos, desplaza de la superficie otros materiales orgánicos adsorbidos.

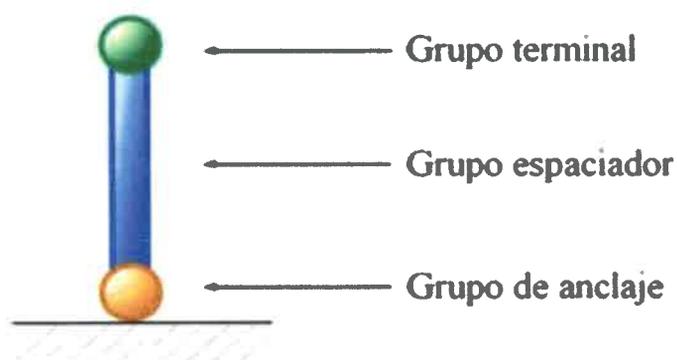


Figura 1. Característica estructural de moléculas capaces de formar una MAE.

Las MAE han sido preparadas sobre superficies de metales, óxidos metálicos y semiconductores. Los clorosilanos con cadenas alquílicas largas se autoensamblan sobre óxidos metálicos dopados como SnO₂, silicio con una delgada película de óxido y Au con y sin óxido superficial, para formar películas orgánicas delgadas.^{37,38} Del mismo modo, la generación de radicales alquilo sobre una superficie de silicio libre de óxido, resulta en la formación de una MAE densamente empaquetada en la cual el carbono metilénico está directamente enlazado a un átomo de silicio superficial.^{39,40} Las superficies metálicas empleadas para la formación de las MAE han sido diversas, entre ellas, Au, plata, cobre, platino y mercurio, utilizando compuestos de azufre, especialmente tioles, sulfuros y disulfuros como adsorbatos.⁶ En el caso de los tioles, el grupo de anclaje es el átomo de azufre, mientras que el grupo espaciador puede estar constituido por una cadena alifática, contener heteroátomos, grupos aromáticos, uniones no saturadas o fracciones de cadenas rígidas unidas a cadenas saturadas (con movilidad espacial). Usualmente, el grupo espaciador de la molécula promueve y organiza el autoensamblado según la importancia de las interacciones laterales relativas entre los adsorbatos.³⁷ Por otra parte, el grupo terminal puede ser, por ejemplo, un grupo alquilo (metilo, etilo, etc.), o el resto de una cadena insaturada (alqueno o alquino), o un grupo funcional como haluro, alcohol, carboxilo, amida, amina, etc., o un grupo aromático, por ejemplo, fenilo. El empleo de moléculas aromáticas para la formación de MAE, introduce interacciones fuertes molécula/sustrato y molécula/molécula mediadas por los anillos aromáticos. Además, los anillos aromáticos son más rígidos que las cadenas alquílicas, por lo que pueden tener un alto impacto sobre la estabilidad de la estructura.⁴¹

Entre las más estudiadas se encuentran las MAE que derivan de la adsorción de alcanotioles sobre la superficie de electrodos de Au(111). Un gran número de estudios estructurales prueban que, sobre tales superficies, los alcanotioles forman una monocapa altamente ordenada y densamente empaquetada⁴² con las cadenas carbonadas orientadas en paralelo entre sí, con una inclinación de aproximadamente 30° respecto a los átomos de Au subyacentes.²⁶ La estructura formada corresponde a un empaquetamiento hexagonal representado por $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$, donde 30° representa dicho ángulo de inclinación promedio. La concentración superficial, Γ , esperada para este tipo de estructura sobre superficies de Au(111) es $7,7 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.^{5,43}

Cuando la MAE está formada por otro tipo de tioles, la estructura de la misma depende, entre otros factores, de la longitud del tiol. Por ejemplo, a medida que disminuye la longitud de la cadena se observa un aumento progresivo en el grado de desorden en las estructuras, que presentan densidad de empaquetamiento y cubrimiento superficial cada vez menor.¹ Además, el tamaño de los grupos terminales de los tioles que conforman la MAE, por ej. $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ o $-\text{COOH}$, junto con las interacciones entre moléculas de tiol vecinas, también juegan un rol clave en el empaquetamiento y estructura de la MAE resultante.⁶ Cadenas más cortas de tiol con grupos terminales voluminosos normalmente forman monocapas menos densas y más desordenadas.⁴⁴ La reproducibilidad de estos resultados depende además de la cristalinidad del electrodo de Au.⁵ Los electrodos monocristalinos presentan un determinado plano en contacto con la solución, como por ejemplo (100), (110) o (111), los que se caracterizan por constituir superficies lisas y uniformes. Los electrodos policristalinos, por su parte, consisten en una variedad de dominios pequeños de diferentes caras y bordes cristalinos expuestos a la solución. La superficie se compone de una capa continua de islas contiguas o granos de metal que pueden variar en tamaño y forma.⁶ Cada cara presenta propiedades diferentes, por lo que el comportamiento de un electrodo policristalino representa un promedio que corresponde a los diferentes sitios y planos cristalinos.⁴³

Una MAE de tioles formada sobre superficies policristalinas puede presentar dos regiones características: una densamente empaquetada^{6,45,46} y otra en la que existen defectos. Entre los defectos se incluyen (Figura 2):

a) bordes de grano: regiones de la MAE que presentan diferentes orientaciones sobre granos adyacentes,^{45,47} b) bordes de dominios: incluyen diferencias en la inclinación, rotación y defectos por reclinación de las moléculas de tiol en los límites entre dominios diferentes de la MAE,^{45,48} c) islas vacantes: regiones de la MAE desplazadas en altura por el diámetro atómico del metal empleado como sustrato, respecto de las regiones que la rodean,⁴⁹ d) sitios colapsados: zonas de la MAE de menor espesor como resultado de un mayor ángulo de inclinación de las moléculas de tiol por encontrarse cerca de otros defectos o en los límites de dominios con orientaciones diferentes,^{50,51} e) huecos: superficies de sustrato expuestas a la solución,⁴⁷ f) defectos estructurales en la superficie del sustrato: defectos causados por las variaciones en la superficie.^{6,47}

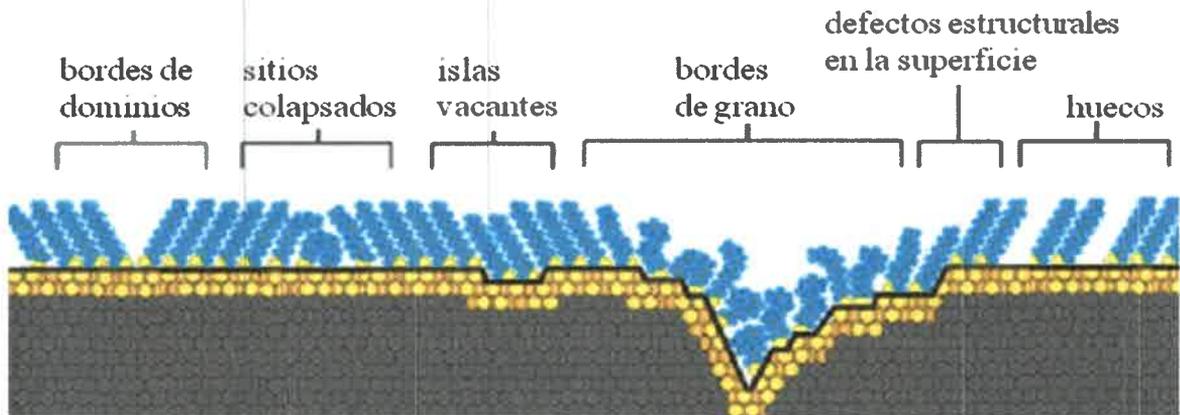


Figura 2. Representación esquemática de algunos de los defectos encontrados en MAE formadas sobre sustratos policristalinos. (Adaptada de Ref. 6).

La presencia de huecos en una MAE permite el acceso de los electrolitos y de la cupla redox hasta la superficie del electrodo. Estos huecos pueden ser el resultado de la adsorción imperfecta del tior en la superficie de Au durante la etapa de autoensamblado y/o de la pérdida posterior del tior durante el enjuague, almacenamiento o uso.⁵²

La alta afinidad de los tioles por los metales hace posible la formación de superficies orgánicas con funcionalidades químicas útiles y altamente versátiles, expuestas a la interface. Los grupos terminales propios de los tioles le confieren a la MAE determinadas propiedades superficiales que, a su vez, pueden ser adaptadas fácilmente para diversos fines, cambiando la naturaleza química de los mismos.⁵³

1.1.2. Métodos de preparación de monocapas autoensambladas de tioles

Antes de llevar a cabo la modificación propiamente dicha, la superficie del electrodo es pre-tratada de manera tal de obtener resultados reproducibles. Los procedimientos pueden ser mecánicos, químicos o electroquímicos, preparando así la superficie para los pasos de modificación subsiguientes.^{1,2,43}

Las MAE de tioles pueden ser preparadas de las siguientes maneras:

- a) por adsorción espontánea desde una fase vapor: por deposición en ultra alto vacío (UHV)^{6,34,54} o a presión ambiente a altas temperaturas, pudiendo obtenerse así monocapas densamente empaquetadas.⁵⁵
- b) por adsorción espontánea desde una fase líquida: es uno de los métodos más utilizados, consiste en la inmersión del sustrato en soluciones etanólicas o acuosas del tiol, usualmente 10^{-4} - 10^{-3} M, durante un determinado tiempo, denominado tiempo de modificación (t_{mod}), que puede variar de segundos a días.^{41,56}
- c) por electrodeposición: aplicando un potencial al sustrato que se encuentra en contacto con la solución de tiol.²⁶ El control potencioestático permite la producción de electrodos modificados de una manera fácil y altamente reproducible,⁷ por lo que representa una estrategia poderosa. La cantidad de tiol depositada es una función del tiempo en el que se mantiene el potencial de deposición.^{1,26}

El proceso de adsorción consta de dos etapas diferentes. La primera se produce de manera espontánea, como resultado de la afinidad del S por la superficie de Au, lo que conduce a la formación de una capa desordenada. La segunda etapa, de ordenamiento, se da en una escala de tiempo mayor y es impulsada por las interacciones entre los grupos espaciadores y terminales de las moléculas.¹

La reacción propuesta para la formación de la especie Au-tiolato es:^{5,34}



donde R puede ser una cadena carbonada o un grupo aromático, que a su vez contenga o no grupos terminales.

La estructura en sí de la MAE depende de factores tales como: el pre-tratamiento⁵⁷ y morfología del sustrato, el solvente de deposición,⁵⁸ la concentración⁷ y pureza del tiol, la temperatura,⁵⁹ el tiempo de inmersión o de modificación^{7,60} y la longitud de la cadena.^{1,60,61}

1.1.3. Transferencia electrónica sobre electrodos modificados con monocapas autoensambladas

Existen tres procesos diferentes por los cuales puede ocurrir la transferencia electrónica a través de una MAE: (i) efecto túnel de electrones en dominios libre de huecos (Figura 3 A); (ii) permeabilidad y difusión de las especies redox a través de la MAE (membrana), seguido por la transferencia electrónica sobre la superficie del electrodo (Figura 3 B); (iii) difusión de las especies redox en los sitios donde la MAE presenta huecos y/o defectos, produciéndose la transferencia electrónica sobre la superficie del electrodo (Figura 3 C).⁶²

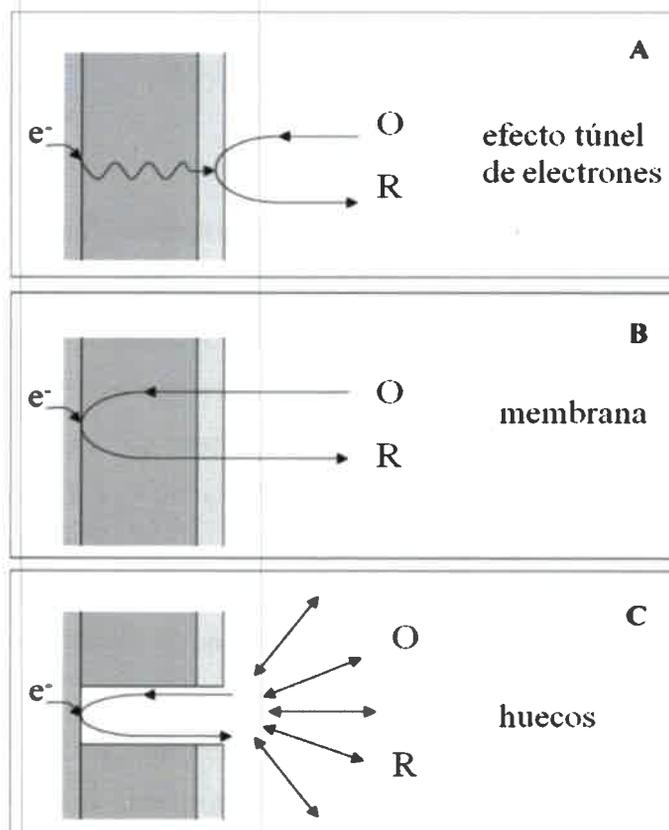


Figura 3. Representación esquemática de diferentes modelos para la descripción del proceso de transferencia electrónica a través de una MAE, con O/R como sistema redox soluble. Modelo de (A) efecto túnel de electrones, (B) membrana y (C) huecos. (Adaptada de Ref. 62).

Por otro lado, cuando los tioles que constituyen la superficie modificada tienen grupos funcionales terminales, la distancia entre los átomos de S unidos a la superficie del electrodo es mayor, con lo que permiten la permeabilidad no sólo de moléculas de agua, sino también de otras moléculas o iones a través de la MAE.⁶³ Es de esperar que la presencia de grupos terminales voluminosos permita la formación de MAE menos organizadas, más aún cuando se trate de cadenas carbonadas de tiol de longitud corta.

El funcionamiento global del sistema se encuentra determinado por la interrelación de los distintos procesos. La forma de los voltamperogramas cíclicos, obtenidos a partir de superficies de electrodos modificadas, depende del orden estructural y del espesor de la MAE, así como también de una serie de variables entre las que se encuentran el tamaño y la naturaleza química de la prueba redox y el solvente del medio, y la interacción de la prueba redox con los grupos terminales de la monocapa.⁵³

1.1.4. Técnicas de caracterización de monocapas autoensambladas

La caracterización de los electrodos modificados puede llevarse a cabo mediante métodos electroquímicos, espectroscópicos y microscópicos. Entre los métodos electroquímicos, se utilizan, por ej., voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica y, entre los no electroquímicos, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), elipsometría, resonancia de plasmón superficial, espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), microscopía de efecto túnel (STM), microscopía de fuerza atómica (AFM), microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) y ángulo de contacto.^{26,43}

Mediante este tipo de técnicas es posible determinar, entre otras características de las MAE, la concentración y el cubrimiento superficial del tiol, la densidad de empaquetamiento, la resistencia a la transferencia de carga, la composición elemental, el estado de organización y el espesor de la MAE. La combinación de las diferentes técnicas de caracterización no sólo es útil para conocer las características que presentan estas superficies, sino también como base para implementar estrategias de modificación que conduzcan al perfeccionamiento de tales estructuras.

1.2. ANTIOXIDANTES NATURALES

La denominación “antioxidantes” comprende sustancias con estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados, capaces de inhibir o retardar la oxidación en sistemas biológicos.^{64,65}

El uso empírico de los compuestos naturales como antioxidantes es muy antiguo. La popularidad del ahumado y el especiado como métodos caseros para la preservación de la carne, el pescado y otros alimentos ricos en grasas puede deberse, al menos en parte, al conocimiento de que estos tratamientos poseen un efecto de retardo sobre el proceso de rancidez.⁶⁶ Es muy difícil intentar definir los antioxidantes naturales pero, en general, el término se refiere a aquellas sustancias que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y de los animales y a aquellos que se forman durante el cocinado o el procesado de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales. La mayoría son compuestos fenólicos, entre los cuales los grupos principales son los tocoferoles, los ácidos fenólicos y los flavonoides.⁶⁷ Además, los productos naturales se presentan como sustancias más saludables y seguras, siendo una alternativa frente al uso de antioxidantes sintéticos ya que estudios toxicológicos alertan sobre el prolongado período de uso de los mismos.⁶⁶

Los flavonoides son los ingredientes nutraceuticos más activos en las plantas. El término “nutracéutico” se define como “un alimento o partes de alimentos que proveen beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades”. Puede tratarse de nutrientes aislados, suplementos dietarios, alimentos genéticamente modificados, productos a base de hierbas y productos procesados, como cereales, sopas y bebidas.⁶⁸

1.2.1. Flavonoides

1.2.1.1. Estructura y clasificación

Los flavonoides son un gran grupo de sustancias fenólicas de origen vegetal que se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado del tipo $C_6-C_3-C_6$. La estructura básica de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres átomos de carbono⁶⁷ que, habitualmente, ha sido condensada para formar un pirano o, menos frecuentemente, un furano. La cantidad y posición de los grupos $-OH$ en los flavonoides afectan su comportamiento electroquímico. La estructura básica y el sistema de numeración se muestran en la Figura 4.

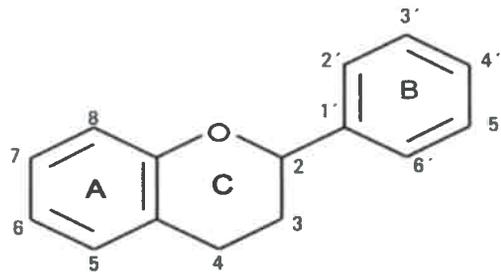


Figura 4. Estructura base de los flavonoides y sistema de numeración.

Estas sustancias se encuentran en todos los tejidos de las plantas superiores y pueden dividirse en diferentes grupos, de acuerdo a cómo varía su estructura básica (Figura 5), incluyendo las flavonas, los flavonoles, las flavononas y las chalconas. Las flavonas y los flavonoles se encuentran en prácticamente cualquier tipo de planta, especialmente en hojas y pétalos, siendo las flavonas las más habituales. Algunos ejemplos de compuestos flavonoides son la apigenina, la crisina, la luteolina, la datiscetina, la quercetina, la miricetina, la morina y el kaempferol. Aproximadamente el 90% de los flavonoides presentes en las plantas se encuentran como derivados glucosídicos, sin embargo, las agliconas son más activas sobre la oxidación en productos en masa y en bicapas de fosfolípidos.⁶⁶

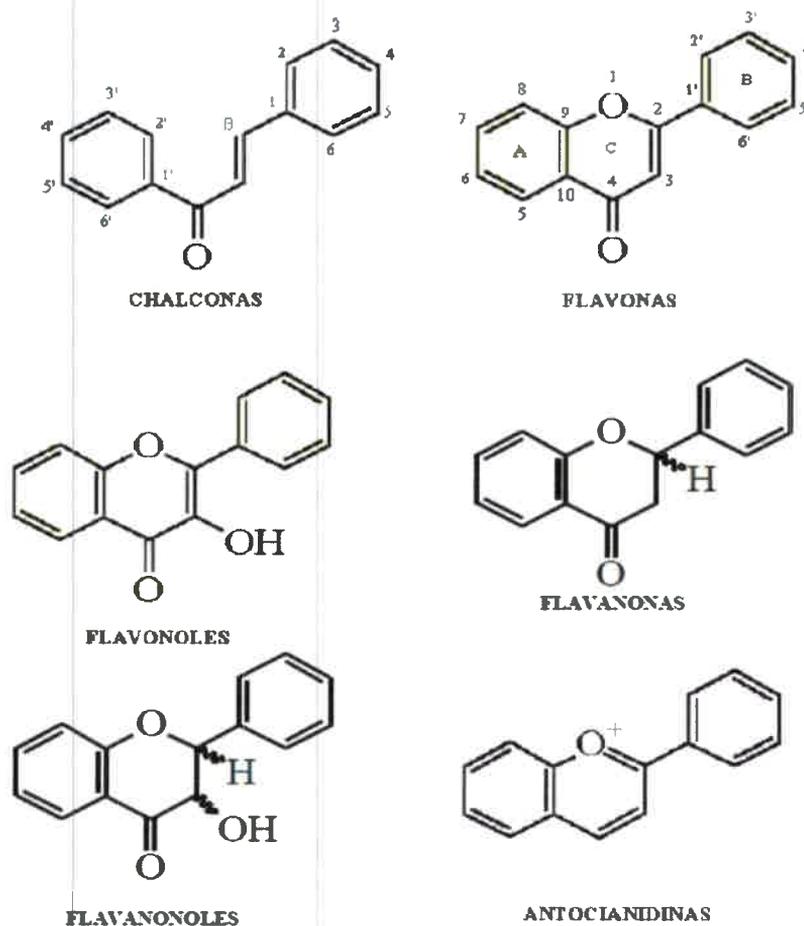


Figura 5. Estructuras básicas de algunas clases de flavonoides.

1.2.1.2. Distribución en la naturaleza y acción antioxidante

Los flavonoides representan una clase importante de compuestos polifenólicos de origen natural. En la ecología de las plantas juegan un rol fundamental ya que son responsables del color en las frutas y vegetales, actúan como atrayentes de insectos polinizadores, como catalizadores en la fotosíntesis y están involucrados en la protección contra la invasión microbiana.⁶⁹

Al formar parte de las plantas, los flavonoides son componentes importantes de la dieta alimentaria humana.⁷⁰ Las principales fuentes son las verduras, frutas, cereales y bebidas como el té, jugos y vino.

Los beneficios producidos por los flavonoides han sido relacionados con su actividad antioxidante, debido a la presencia de grupos oxhidrilo en su estructura, ya que existe considerable evidencia “*in vitro*” del efecto causado por los flavonoides incluidos en la ingesta natural. El consumo habitual de estos compuestos en la dieta reduce el riesgo de sufrir trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y accidente cerebro vascular.⁷¹ Además, los flavonoides muestran propiedades anticancerígenas, antivirales y antiinflamatorias, como consecuencia de su afinidad por las proteínas y sus propiedades antioxidantes,⁷² así como también otros efectos biológicos, como por ejemplo, antibacteriano, vasodilatador, antialérgico, antimutagénico y antiisquémico.^{70,73-76}

El creciente interés en el estudio de estas sustancias ha sido estimulado por sus potenciales beneficios para la salud. En este sentido, la investigación en el uso de medicamentos a base de flavonoides para la prevención y terapia de enfermedades mediadas por radicales libres (por ejemplo, aterosclerosis, isquemia, degeneración neuronal, enfermedades cardiovasculares) y otras enfermedades humanas, ha cobrado gran importancia.⁷⁷⁻⁷⁹ Se ha comprobado que flavonoles como la quercetina, la rutina, la gopipetina y la fisetina inhiben “*in vivo*” la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con lo cual podrían tener un rol importante en prevenir la aterosclerosis.⁸⁰

Numerosos flavonoides son utilizados actualmente por los laboratorios farmacéuticos en la elaboración de medicamentos de gran actividad biológica, entre los que se pueden mencionar aquellos utilizados para la prevención de la fragilidad capilar (antocianinas), vasodilatadores periféricos (biflavonoides), anticancerígenos (flavonoles como la quercetina), antivirósicos (antocianinas, quercetina, rutina, leuco-antocianinas, apigenina), prevención de osteoporosis (flavonas), antihemorrágicos (quercetina, flavonoles en general), antioxidantes (flavanonas, quercetina, taxifolina) inhibidores enzimáticos (quercetina, kaempferol, miricetina y fisetina).⁸⁰

Las propiedades de esta familia de compuestos naturales generan un interés especial en cuanto al desarrollo de nuevos métodos analíticos para su separación, identificación y cuantificación.

Del amplio grupo de flavonoides, en esta tesis se estudiaron particularmente fisetina y quercetina. Fisetina o 3,7,3',4' tetrahidroxiflavona (FIS) es abundante en las frutillas y también se encuentra en otras frutas y vegetales.⁸¹⁻⁸³ En los últimos años se ha centrado la atención en FIS como medicamento multi-funcional, ya que cuenta con un amplio espectro de actividades biológicas. En particular, FIS causa apoptosis en células cancerígenas,⁸⁴ suprime los procesos inflamatorios en los mastocitos humanos,⁸⁵ inhibe la agregación plaquetaria inducida por trombina y catepsina G,⁸⁶ actúa como eliminador de radicales libres,⁸⁷ produce la inactivación de las enzimas proteína kinasa C y proteinasa HIV-1, indispensables para el proceso de desarrollo del virus del HIV,⁸⁸ inhibe la glicosilación no enzimática de la hemoglobina,⁸⁹ y puede mejorar la memoria a largo plazo,⁹⁰ siendo eficaz en el tratamiento de pacientes con desórdenes de memoria⁹¹ gracias a su capacidad para intervenir en cada uno de los factores responsables de los déficits de las funciones cerebrales relacionados con la edad.⁹²

Por su parte, quercetina o 3,5,7,3',4' pentahidroxiflavona (QUER) es el flavonoide más abundante en productos de la dieta alimentaria humana y ha sido ampliamente investigado.⁹³ Se encuentra, por ejemplo, en cebollas, manzanas, frutillas, brócoli, té y vino tinto. En la actualidad QUER es ampliamente utilizada en la fabricación de formulaciones farmacéuticas debido a sus conocidas propiedades.

Las estructuras químicas de FIS y QUER se muestran en la Figura 6.

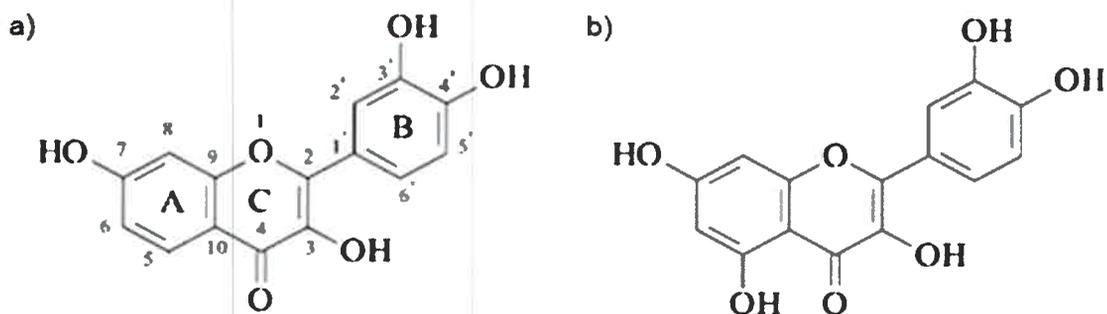


Figura 6. Estructuras químicas de los flavonoides a) fisetina y b) quercetina.

Como puede apreciarse, la única diferencia estructural entre ambos flavonoides consiste en el grupo oxhidrilo en la posición 5 del anillo A, el cual está presente sólo en QUER (ver Figura 4).

1.2.1.3. Análisis de flavonoides

En general, los métodos desarrollados hasta el momento para la cuantificación de flavonoides en diferentes matrices han sido cromatográficos.⁹⁴⁻⁹⁸ Principalmente, se ha utilizado HPLC con distintos tipos de detección, como espectrofotometría UV-visible y masa. Para la determinación de rutina, catequina y epicatequina se ha desarrollado un método de HPLC con detección electroquímica.⁹⁸ En cuanto a los métodos electroanalíticos desarrollados hasta el momento, se encuentra la voltamperometría de “stripping” adsorptiva acoplada a un sistema de inyección de flujo, utilizando un electrodo de pasta de carbono.⁹⁹ Este método se aplicó para la determinación simultánea de 12 flavonoides, entre ellos: QUER, FIS, morina y rutina. Por otro lado, se determinó quercetina mediante voltamperometría de pulso diferencial, empleando nanotubos de carbono modificados con parafina.¹⁰⁰ También se ha desarrollado un biosensor basado en enzimas peroxidasa inmovilizadas sobre kitosano entrecruzado químicamente con epíclorohidrina, incorporado a la pasta de carbono, para la determinación de rutina.¹⁰¹

A pesar de que se han desarrollado algunos métodos electroanalíticos alternativos a los cromatográficos para la determinación de flavonoides, los estudios realizados sobre el comportamiento electroquímico básico de estas sustancias son escasos y en muchos casos contradictorios.¹⁰²⁻¹⁰⁶ Hodnick y col.¹⁰² estudiaron el comportamiento electroquímico de varios flavonoides y encontraron que FIS en el medio formado por DMSO y solución reguladora de pH 7 sobre electrodos de carbono vítreo (CV) se oxida mediante un proceso complejo, correspondiendo la descarga principal a un proceso reversible que involucra dos electrones y dos protones. Por otra parte, Hendrickson y col.^{103,104} estudiaron el comportamiento electroquímico de QUER, luteolina y FIS en soluciones alcohólicas sobre el mismo electrodo. Ellos también encontraron que todos los flavonoides que poseen en el anillo B un grupo catecol, como FIS y QUER, presentan un mecanismo complejo, donde la primera onda de oxidación

corresponde a un proceso reversible que involucra $2e^-$ y $2H^+$. El primer pico de oxidación de todos los flavonoides con un grupo catecol en el anillo B muestra un comportamiento que puede ser descrito como un proceso reversible o cuasi-reversible que involucra $2e^-$ y $2H^+$.^{99,102-108} Por otro lado, Timbola y col.¹⁰⁶ discrepan con la interpretación dada por otros autores acerca de la naturaleza de los picos de oxidación que tienen lugar a potenciales más positivos que el primero, cuando se estudia el intervalo de potencial completo.

Recientemente, Markovic y col.⁶⁹ realizaron un estudio teórico y experimental relacionado con la actividad antioxidante de FIS, donde emplearon la voltamperometría cíclica para obtener el valor del potencial redox de FIS a diferentes pH sobre electrodos de carbono vítreo.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos

2.1. INTRODUCCIÓN

La electroquímica estudia los cambios químicos causados por el pasaje de una corriente eléctrica en una interface o la producción de una corriente eléctrica por reacciones químicas. La transferencia de carga puede ser homogénea, cuando ocurre en el seno de la solución, o heterogénea, cuando se produce sobre la superficie de un electrodo. Para mantener la electroneutralidad del sistema deben ocurrir simultáneamente, al menos, dos hemi-reacciones de transferencia de carga en direcciones opuestas. En el caso de una transferencia de carga heterogénea, estas hemi-reacciones ocurren en electrodos diferentes.

2.2. NATURALEZA DE LAS REACCIONES DE ELECTRODO

Las reacciones de electrodo o heterogéneas pueden ocurrir en una región interfacial, usualmente formada entre un material metálico o no metálico, conductor o semi-conductor, y una solución electrolítica conductora. En la región interfacial existe una distribución de cargas que difiere de la del seno de la solución y, como consecuencia, tienen lugar distintos procesos fisicoquímicos. En general, estos procesos pueden clasificarse como *faradaicos* y *no faradaicos*.⁴³ Los primeros comprenden a aquellos donde ocurre transferencia de carga a través de la interface, la que causa la oxidación o reducción según el sentido en que fluyan los electrones. Estos procesos son denominados faradaicos porque están gobernados por la *ley de Faraday*, que establece que la magnitud del cambio químico causado por el flujo de corriente es proporcional a la cantidad de carga que atraviesa la interface.

Por otra parte, se denominan no faradaicos a aquellos procesos que transcurren sin transferencia de carga a través de la interface. Estos procesos, tales como la adsorción y/o desorción de especies, solvente, etc., cambian la estructura de la interface electrodo/solución a medida que cambia el potencial de electrodo o la composición de la solución. En general, los procesos no faradaicos están asociados a corrientes capacitivas, de adsorción, o relacionadas con fenómenos de superficie (pseudocapacitivas).⁴³

Cuando ocurre una reacción de transferencia de carga en la interface pueden presentarse simultáneamente ambos procesos. En general, los procesos faradaicos son los de mayor interés en estudios electroquímicos. Sin embargo, los efectos de los procesos no faradaicos deben tenerse en cuenta en el análisis de los datos electroquímicos si se desea obtener información correcta acerca de la transferencia de carga.

El electrodo puede actuar como fuente (reducción) o como drenaje (oxidación) de los electrones transferidos hacia o desde las especies en solución. Para que la transferencia electrónica ocurra, debe existir una correspondencia entre los niveles de energía de los orbitales electrónicos del dador y aceptor, respectivamente. En un electrodo metálico, importa el nivel de energía del orbital más alto ocupado, denominado nivel de energía de Fermi, y en las especies solubles, es simplemente el nivel de energía del orbital de valencia. Para lograr tal correspondencia, el nivel de energía de Fermi es modificado haciendo que el potencial del electrodo sea suficientemente negativo (reducción) o positivo (oxidación).

Los valores de los potenciales pueden ser ajustados externamente. Así, es posible controlar el camino y la extensión de una reacción de electrodo.

2.3. CELDAS ELECTROQUÍMICAS Y POTENCIALES DE CELDA

Una de las fases que contribuye a la interface de interés es una solución electrolítica, a través de la cual la carga es transportada por el movimiento de los iones. Los electrolitos pueden ser soluciones líquidas, sales fundidas o sólidos iónicos conductores. La segunda fase es un electrodo, donde la carga es transportada por el movimiento electrónico. Los electrodos son materiales conductores o semiconductores, que pueden ser sólidos, por ejemplo, platino, níquel, oro, carbono en sus diferentes estados cristalinos, etc., o líquidos, como el mercurio (este último ya casi no se utiliza debido a su elevada toxicidad).

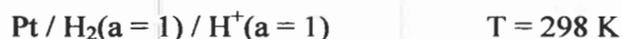
En la mayoría de los experimentos electroquímicos, el interés está centrado en los eventos que pueden ocurrir en una sola interface. Sin embargo, no se puede estudiar experimentalmente una interface aislada pero sí un conjunto de interfaces, las cuales

constituyen las llamadas *celdas electroquímicas*. Estos sistemas están compuestos por, al menos, dos electrodos, separados por una solución electrolítica.

En general existe una diferencia de potencial medible entre los electrodos, con o sin circulación de cargas. Esta diferencia es la resultante del conjunto de todas las diferencias de potencial eléctrico, atribuidas a la distribución de cargas de cada una de las interfaces existentes.

La magnitud de la diferencia de potencial en una interface, afecta a las energías relativas de los portadores de carga en las dos fases, por lo tanto, controla la dirección de la transferencia de carga. De este modo, la medida y el control de los potenciales de celda (la diferencia de potencial entre los electrodos de una celda) es uno de los aspectos más importantes de la electroquímica experimental.

La reacción electroquímica total que tiene lugar en una celda puede ser dividida en dos hemi-reacciones independientes, que deben describir los cambios químicos reales que se producen en los dos electrodos. Cada hemi-reacción responde a la diferencia de potencial interfacial para el electrodo correspondiente. En la mayoría de los casos, es de interés una de estas hemi-reacciones; el electrodo donde ocurre dicha hemi-reacción se denomina *electrodo de trabajo o indicador*. Dado que no es posible evaluar experimentalmente la diferencia de potencial de una interface electrodo/solución aislada, ya que sólo es medible la diferencia de potencial entre dos conductores electrónicos, los potenciales de electrodo de las hemi-reacciones son referidos al potencial de un *electrodo de referencia o patrón*. Este electrodo trabaja con una hemi-reacción en condiciones normalizadas, de manera que su potencial se mantiene constante. Luego, es posible asignar valores al potencial del electrodo de trabajo, en una escala cuyo cero es el valor de potencial del electrodo de referencia. Como ejemplo de este tipo de electrodo se puede citar al electrodo normal de hidrogeno (ENH):



donde las barras separan las distintas fases que componen el electrodo, y entre paréntesis se indican las actividades (a) correspondientes.

Todos los potenciales electroquímicos se tabulan con respecto al ENH, cuyo potencial absoluto se define como cero.

Por razones prácticas, normalmente se utilizan como electrodos de referencia interfaces cuasi-idealmente no polarizables,⁴³ diferentes del electrodo normal de hidrógeno. Los más utilizados son el electrodo de plata/cloruro de plata y el electrodo de calomel saturado (ECS), este último se representa por:¹⁰⁹



Dado que es un sistema no polarizable dentro de ciertos límites, su potencial es fijo y, por lo tanto, cualquier cambio en el potencial de la celda será atribuible al electrodo de trabajo. Cuando éste alcanza potenciales más negativos, la energía de los electrones aumenta, y, eventualmente, pueden alcanzar niveles suficientes como para ocupar estados vacantes de mayor energía que las correspondientes a las especies en el electrolito. En este caso existirá un flujo de electrones desde el electrodo hacia la solución, dando lugar a una corriente de reducción. Por el contrario, si la energía de los electrones es disminuida por imposición de un potencial más positivo en el electrodo de trabajo, es posible que los electrones del soluto en el electrolito encuentren un campo de energía potencial más favorable sobre el electrodo, provocando su transferencia. De esta manera, se genera un flujo de electrones desde la solución hacia el electrodo generando una corriente de oxidación. El potencial característico de estos procesos redox está relacionado al potencial estándar, E^0 , que tiene un valor determinado para cada especie electroactiva.

2.4. VARIABLES ASOCIADAS A UN SISTEMA ELECTROQUÍMICO

La investigación del comportamiento electroquímico de un dado sistema, por lo general, se realiza manteniendo constantes ciertas variables de la celda electroquímica y observando cómo varían las restantes en función de los cambios de ciertos parámetros,⁴³ como se indica en la Figura 7.



Figura 7. Variables que afectan la velocidad de una reacción de electrodo. A: fuente de potencial, B: microamperímetro, C: electrodos, D: solución electrolítica. (Adaptada de Ref. 43).

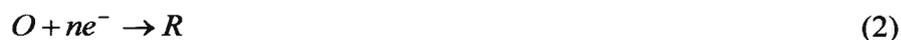
Las perturbaciones de un sistema redox en equilibrio, o en estado estacionario, generalmente son realizadas con ciertas funciones aplicadas a la celda electroquímica. Por ejemplo: un salto de potencial impuesto al electrodo de trabajo, puede implicar el seguimiento de la corriente o la carga en función del tiempo.

2.5. REVERSIBILIDAD EN PROCESOS ELECTROQUÍMICOS

Dado que en electroquímica se utilizan frecuentemente los términos *reversible* e *irreversible* aplicados a algún proceso de electrodo, su interpretación puede ser ambigua. Por lo tanto, a continuación, se realiza una descripción breve sobre los conceptos de reversibilidad:

a) Reversibilidad química

Si se supone el siguiente proceso de reducción en la superficie de un electrodo:



cuando se produce un flujo de electrones inverso al descrito, el fenómeno que ocurre es exactamente opuesto al anterior:



por lo tanto, se dice que el proceso de electrodo es químicamente reversible.

b) Reversibilidad termodinámica

Un proceso es termodinámicamente reversible cuando un cambio infinitesimal en su fuerza directriz hace que el proceso progrese en esa dirección. Un cambio reversible entre dos estados presupone una serie continua de estados de equilibrio, cuya sucesión involucra un intervalo de tiempo infinito. Cabe aclarar que si un proceso electroquímico es químicamente reversible, puede o no, ser reversible en sentido termodinámico.

c) Reversibilidad práctica

Dado que los procesos reales ocurren a velocidades finitas, éstos no pueden ser descritos como reversibles en el sentido estricto de la termodinámica. Sin embargo, los procesos electroquímicos pueden ocurrir en tiempos adecuados, de manera que las ecuaciones termodinámicas puedan ser aplicadas con bastante exactitud; bajo esas circunstancias, dichos procesos son llamados reversibles en un sentido práctico. Estos procesos cumplen con la ecuación de Nernst o alguna forma derivada de ella:

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{a_o^o}{a_r^r} \quad (4)$$

donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin, n es el número de electrones transferidos en la reacción, F es la constante de Faraday y a_O y a_R son las actividades de las formas oxidada y reducida, respectivamente, de la cupla:



mientras que r y o representan los coeficientes estequiométricos y n el número de electrones intercambiados.

Generalmente, resulta complicado trabajar con actividades para evaluar los potenciales de las hemi-reacciones, debido a que los coeficientes de actividad (γ) casi siempre son desconocidos. Una manera de evitar este inconveniente es trabajar con el potencial formal, E_f^0 , que se define como el potencial de la hemi-reacción (medido vs ENH) cuando los γ de las especies O y R son constantes. Para ello, la concentración de las otras sustancias presentes en el medio deben estar en exceso respecto de las concentraciones de O y R . De esta manera, el E_f^0 queda definido como:

$$E_f^0 = E^0 + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{\gamma_O^o}{\gamma_R^r} \quad (6)$$

Así, la ecuación de Nernst puede escribirse nuevamente como:

$$E = E_f^0 + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{c_O^o}{c_R^r} \quad (7)$$

2.6. FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE LA REACCIÓN DE ELECTRODO

Consideremos nuevamente la reacción de electrodo expresada en la ec. 5. Esta reacción está compuesta por una serie de etapas que causan la conversión de la especie

reducida disuelta, R , a la forma oxidada, O , también en solución. Esta serie de etapas gobierna la velocidad del proceso de electrodo y, en consecuencia, la corriente eléctrica.⁴³ Las etapas pueden resumirse en:

- Procesos de transporte de materia desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo y viceversa.
- Reacciones de transferencia de carga heterogéneas.
- Reacciones químicas precedentes o posteriores a la transferencia electrónica.
- Otras reacciones de superficie tales como adsorción, desorción o cristalización (electrodeposición).

Los procesos más simples involucran únicamente transferencia de masa de un reactivo al electrodo (etapa 1) y transferencia de carga heterogénea, no involucrando especies adsorbidas (etapa 2), y posterior transferencia de masa del producto hacia el seno de la solución.

Cualquiera de estas etapas puede controlar la velocidad del proceso global de electrodo. Si la velocidad está determinada por la transferencia de materia entre el seno de la solución y el electrodo, se dice que la reacción está controlada por difusión cuando la migración y convección se minimizan, como se discute más adelante.

Por otro lado, si la etapa determinante de la velocidad de la reacción global es la transferencia de carga, se dice que el proceso tiene control activado.

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

2.7. MODOS DE TRANSFERENCIA DE MASA

Existen tres mecanismos distintos por medio de los cuales los solutos pueden moverse a través de la solución. Ellos son difusión, migración y convección. Cada mecanismo está asociado a un gradiente de una propiedad particular.^{1,43}

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

- *Migración*: es un mecanismo de transporte que se observa solamente en solutos iónicos y ocurre como consecuencia de la fuerza que experimenta el ion cuando es sometido a un campo eléctrico.

- *Convección*: en este mecanismo de transporte el soluto se mueve en virtud del movimiento que sufre la solución. Es posible distinguir dos tipos de convección: forzada y natural. En el primer caso, la misma puede resultar de la agitación de la solución, la rotación del electrodo, la utilización de celdas de flujo, etc. y se controla experimentalmente. La convección natural, en general no deseada, surge como consecuencia de gradientes de densidad causados a su vez por gradientes de temperatura o concentración. Los experimentos electroquímicos generalmente son diseñados de manera tal de minimizar la convección natural.

2.8. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EMPLEADAS

La implementación de las distintas técnicas electroquímicas implica, desde un punto de vista eléctrico, el manejo de las tres variables principales: potencial (E), corriente (I) y tiempo (t). Siempre que se condicione una, las otras quedan como grado de libertad y evolucionan según las características del sistema electroquímico en estudio. Según la dependencia con el tiempo, los procesos electroquímicos pueden ser clasificados en dos grandes grupos:⁴³

- *Experimentos en condición de estado estacionario*: son aquellos que generan una única relación $I-E$, que no involucra la frecuencia o el tiempo. Una característica de tales experimentos es su independencia con los detalles de la técnica experimental. Un experimento estacionario puede o no implicar un estado de

equilibrio, mientras que lo contrario se cumple: un experimento en equilibrio implica necesariamente un estado estacionario.

- **Experimentos en condición de estado no estacionario:** en general, es posible aplicar a un sistema en equilibrio o en estado estacionario un estímulo o perturbación adecuada durante un cierto tiempo. Según sea la naturaleza y duración de la perturbación, el sistema retorna al equilibrio o evoluciona a un nuevo estado estacionario. La perturbación puede ser una función periódica, donde la I y el E varían periódicamente con el tiempo a una dada frecuencia impuesta (por ejemplo, la voltamperometría de corriente alterna), o puede tratarse de un experimento de transitorio, donde la I y el E varían con el tiempo en una forma no repetitiva (por ejemplo, las voltamperometrías de saltos, pulsos, barrido lineal, cíclico y tipo escalera). Generalmente, uno de los dos parámetros eléctricos (I o E) sigue alguna de las variaciones mencionadas y se registra el otro en función del tiempo.

Como se describió en cada punto, estas técnicas involucran el control del potencial del electrodo (o de la corriente) como variable independiente. En estos métodos, los solutos en la solución sufren oxidación o reducción en la superficie del electrodo, generando una I medida (o controlada). La respuesta depende de la reactividad de los solutos, medida por un potencial característico de oxidación o reducción, de la velocidad de transferencia de masa del soluto entre la solución y el electrodo, y de los parámetros de activación de la transferencia de carga.

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

- **Potenciostáticas:** son aquellas en las que se controla el potencial, aplicando una perturbación según una función perfectamente conocida en el tiempo, característica de cada técnica, siendo la I la variable independiente.

- **Galvanostáticas:** son aquellas en las que se controla la corriente, y el potencial es la variable independiente.

En la Figura 8 se muestra un diagrama de bloques del circuito básico usado en estas técnicas.⁴³

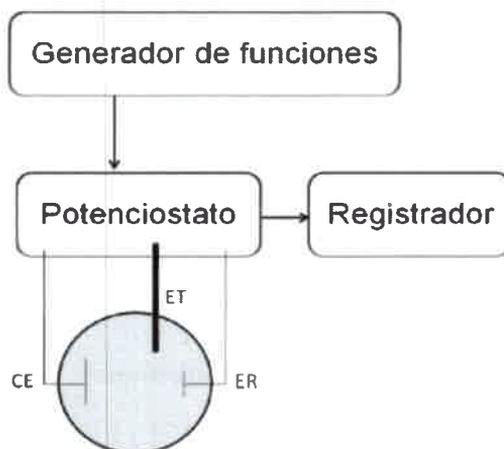


Figura 8. Circuito básico utilizado en las técnicas electroquímicas. *ET = electrodo de trabajo, CE = contraelectrodo, ER = electrodo de referencia.*

El generador de funciones es el instrumento que suministra el programa de potencial. La señal producida se transmite al potenciostato, que cumple la función de imponer al electrodo de trabajo algún valor de potencial para mantener una diferencia de potencial constante respecto al electrodo de referencia. La respuesta en corriente del sistema electroquímico a la perturbación de potencial impuesta se registra en función del tiempo mediante un osciloscopio o registrador adecuado.⁴³

A continuación se describen las técnicas electroquímicas utilizadas en este trabajo: voltamperometrías cíclica (VC), de convolución y de onda cuadrada (VOC) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE).

2.8.1. Técnicas voltamperométricas

El objetivo de un experimento voltamperométrico es establecer la dependencia entre el potencial y la corriente faradaica debida a alguna reacción de electrodo de interés. Por lo tanto, las corrientes capacitivas y/o pequeñas corrientes faradaicas debidas a impurezas difíciles de eliminar, deben sustraerse de las corrientes medidas. Un procedimiento normalmente utilizado es la sustracción del “blanco” de la solución. El “blanco” es un voltamperograma registrado bajo condiciones idénticas a las de la

solución, pero en ausencia de la especie electroactiva de interés. Luego, por sustracción del segundo al primero, es posible eliminar los efectos indeseables.¹¹⁰

La voltamperometría es muy utilizada, principalmente, como herramienta para la dilucidación de los mecanismos de reacción de los procesos electroquímicos, procesos de adsorción sobre superficies, mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados y para medir la concentración de las especies químicas presentes en solución.

Las técnicas voltamperométricas se distinguen entre sí según el tipo de variación de potencial aplicado al electrodo de trabajo.

2.8.1.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es la técnica más ampliamente utilizada para la adquisición de información cualitativa acerca de las reacciones electroquímicas, ya que provee rápidamente información sobre la termodinámica de los procesos redox, la cinética de las reacciones de transferencia electrónica heterogénea y sobre reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción. La VC es generalmente el primer experimento llevado a cabo en un estudio electroquímico, que permite una rápida localización de los potenciales redox de las especies electroactivas y una conveniente evaluación de los efectos del medio sobre los procesos redox.¹

En VC, la región de potencial de trabajo se recorre desde un valor inicial (E_i) hasta un valor final (E_f), pasando por un potencial donde se invierte el sentido del barrido del mismo, denominado potencial de corte (E_c). El potencial se varía de una manera lineal con el tiempo, con lo que la forma de onda aplicada al electrodo de trabajo es triangular (Figura 9 a). En este tipo de perturbación, la pendiente de la variación de potencial se conoce como “velocidad de barrido de potencial”, v . El barrido puede ser iniciado en cualquier sentido (anódico o catódico).

Durante el barrido de potencial, se mide la corriente resultante de acuerdo al potencial aplicado. El gráfico de corriente-potencial resultante es conocido como voltamperograma cíclico. La Figura 9 b ilustra la respuesta esperada para una cupla

redox reversible durante un ciclo de potencial (ec. 5). Aquí se ilustra el caso en que sólo la forma oxidada O se encuentra presente inicialmente en el medio de reacción.^{1,43}

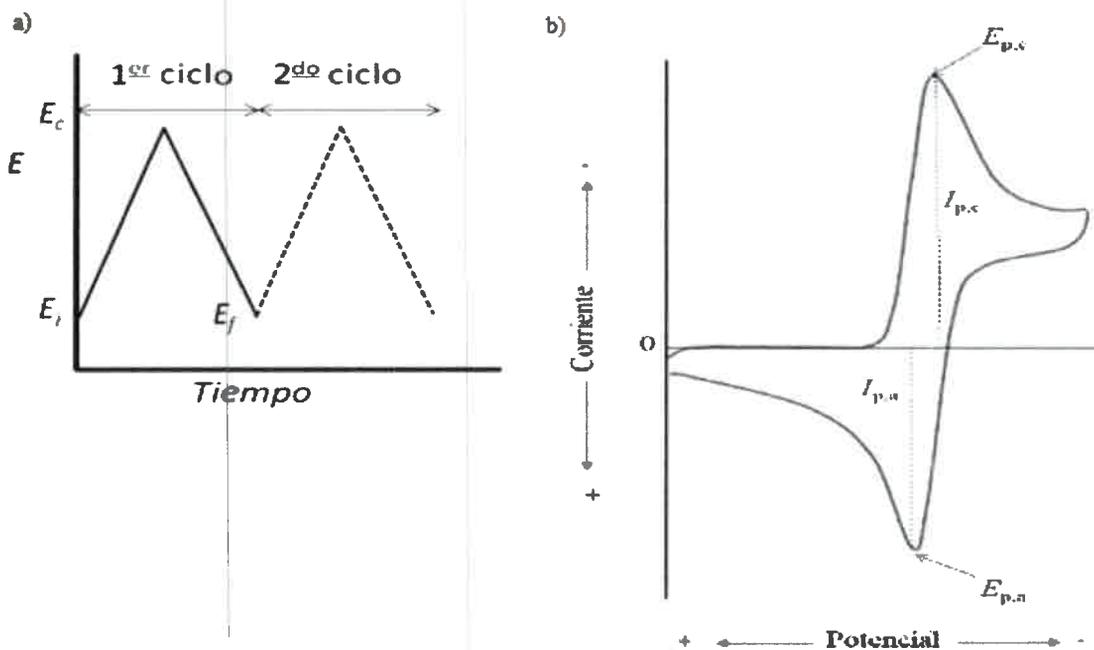


Figura 9. a) Señal de potencial de excitación utilizada en voltamperometría cíclica. b) Voltamperograma cíclico típico de un proceso redox reversible $O + ne^- \rightleftharpoons R$. $E_{p,c}$ es el potencial de pico catódico, $E_{p,a}$ es el potencial de pico anódico, $I_{p,c}$ es la corriente de pico catódica e $I_{p,a}$ es la corriente de pico anódica. (Adaptada de Ref. 1).

La forma característica de los picos de los voltamperogramas cíclicos son causados por la formación de una capa de difusión de la especie electroactiva cerca de la superficie del electrodo.^{1,43} En la Figura 10 podemos observar los perfiles de concentración en función de la distancia, perpendicular a la superficie del electrodo, durante la aplicación del barrido de potencial al electrodo de trabajo. Cuando se aplica el valor de potencial inicial (Figura 10 a) no hay reacción faradaica, por lo que el aporte de corriente se debe exclusivamente a corrientes no faradaicas o capacitivas. A medida que el potencial se va haciendo más catódico y se acerca al potencial estándar (E°) de la cupla redox (Figura 10 b), la concentración de la especie electroactiva O en cercanías a

la superficie del electrodo comienza a disminuir, incrementándose el flujo de ésta hacia la superficie del electrodo y, por lo tanto, la corriente. Cuando el potencial es más negativo que E^0 , la corriente seguirá incrementando hasta alcanzar un valor máximo, debido al consumo total de O en la superficie del electrodo. El gradiente de concentración de O en este punto es máximo (Figura 10 c). Si el potencial se sigue aumentando, la corriente cae como consecuencia de que se produce un incremento en el espesor de la capa de difusión. La disminución de la corriente se produce de manera exponencial con el tiempo, como predice la ecuación de Cottrell⁴³ (Figura 10 d). La existencia de la onda anódica (barrido inverso) se explica teniendo en cuenta que, al potencial en el cual la dirección del barrido de potencial se invierte (E_c), existe un exceso de R en la interface electrodo/solución.

Los picos de corriente así obtenidos reflejan los cambios continuos del gradiente de concentración con el tiempo.¹

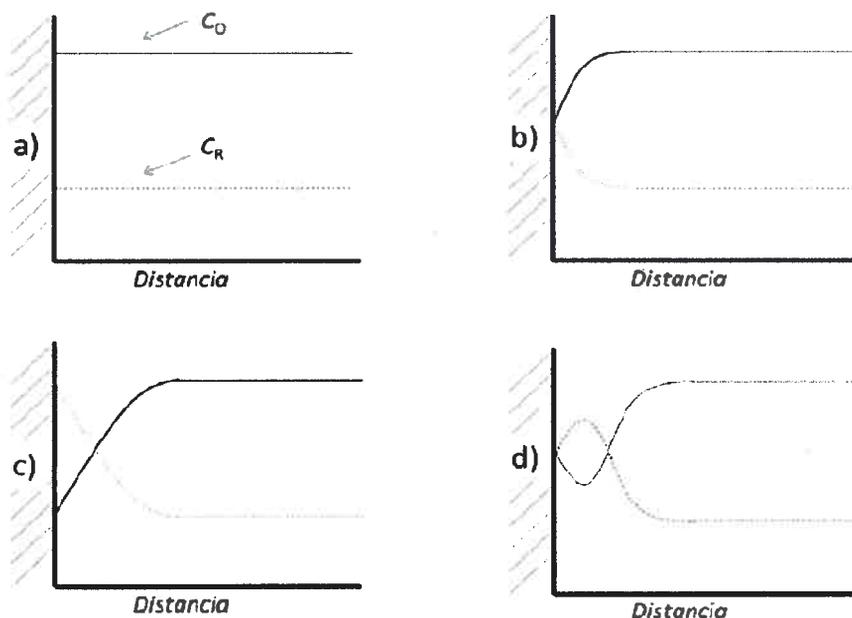


Figura 10. Distribuciones de concentraciones de las formas oxidada y reducida de la cupla redox a diferentes tiempos correspondientes al a) potencial inicial, b y d) al potencial estándar de la cupla durante el barrido de directo e inverso y c) al potencial donde la concentración de reactivo sobre la superficie del electrodo es cero. (Adaptada de Ref. 1).

Los voltamperogramas cíclicos muestran cuatro parámetros importantes: la corriente de pico anódico ($I_{p,a}$), el potencial de pico anódico ($E_{p,a}$), que es el potencial al cual la corriente alcanza el máximo valor, y los correspondientes valores de corriente de pico catódica ($I_{p,c}$) y potencial de pico catódico ($E_{p,c}$) catódicos, los cuales proveen las bases para el análisis de las respuestas voltamperométricas.¹¹¹

2.8.1.1.1. Sistemas reversibles

La corriente de pico catódica (para un proceso de reducción) para una cupla reversible (a 25 °C) controlada por difusión es descrita por la ecuación de Randles-Sevcik:^{43,111}

$$I_{p,c} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A c_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (8)$$

donde n es el número de electrones intercambiados por molécula, A es el área del electrodo en cm^2 , c_o^* es la concentración de O en el seno de la solución en mol cm^{-3} , D_o es el coeficiente de difusión de O en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ y v es la velocidad de barrido de potencial en V s^{-1} . De acuerdo con esta ecuación, la corriente es directamente proporcional a c_o^* y a la raíz cuadrada de v .

Nicholson¹¹² sugirió que la relación entre las corrientes de pico anódica ($I_{p,a}$) y la de pico catódica ($I_{p,c}$) puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$\frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} = \frac{(I_{p,a})_0}{I_{p,c}} + \frac{0,485(I_{sp})_0}{I_{p,c}} + 0,086 \quad (9)$$

donde $(I_{p,a})_0$ es la corriente de pico anódica medida con respecto al cero de corriente, $(I_{sp})_0$ es la corriente al potencial E_c medida también respecto del cero de corriente e $I_{p,c}$ es la corriente del pico catódico, medida también respecto del cero de corriente. La relación $I_{p,a} / I_{p,c}$ (ec. 9) es igual a 1 para una cupla redox simple (ec. 5). La desviación

de esta relación del valor unitario es indicativa de complicaciones cinéticas u otro tipo de complicaciones en el proceso de electrodo.

Por su parte, la posición del pico sobre el eje de potencial está relacionado con el potencial formal del proceso redox. Para una cupla reversible está centrado entre $E_{p,c}$ y $E_{p,a}$.

$$E_f^0 \cong \frac{E_{p,c} + E_{p,a}}{2} \quad (10)$$

y la separación entre los picos puede expresarse como:

$$\Delta E_p = E_{p,c} - E_{p,a} = \frac{0,059}{n} V \quad \text{a } 25 \text{ }^\circ\text{C} \quad (11)$$

De este modo, la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico puede ser usada para determinar el número de electrones transferidos en la reacción de electrodo. Un proceso de transferencia monoelectrónica rápida exhibe un ΔE_p de alrededor de 59 mV. Ambos potenciales de pico son independientes de la velocidad de barrido. Es posible relacionar el potencial de pico a la mitad de la corriente de pico ($E_{p/2}$) con el potencial de media onda del sistema, $E_{1/2}$:⁴³

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm \frac{0,028}{n} V \quad \text{a } 25 \text{ }^\circ\text{C} \quad (12)$$

2.8.1.1.2. Sistemas irreversibles y cuasi-reversibles

En los procesos “*irreversibles*”, aquellos con cinética de intercambio de electrones lenta, los picos individuales son de menor intensidad respecto de los procesos reversibles y se encuentran ampliamente separados (Figura 11 a). Por su parte, se denominan sistemas “*cuasi-reversibles*” a aquellos cuya velocidad de transferencia de carga es comparable con la velocidad de transferencia de masa. Para estos procesos, los

voltamperogramas exhiben una mayor separación entre los potenciales de pico respecto al sistema reversible (Figura 11 b).

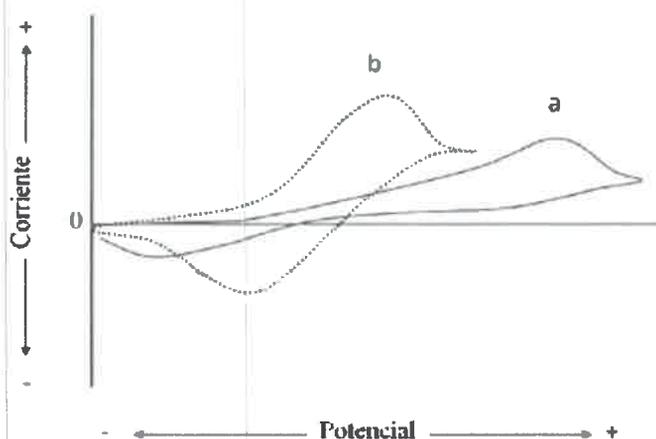


Figura 11. Voltamperogramas cíclicos para procesos redox a) irreversibles y b) cuasi-reversibles. (Adaptada de Ref. 1).

Los sistemas irreversibles están caracterizados por un cambio de la posición del potencial de pico con la velocidad de barrido, de acuerdo a:

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad \text{a } 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (13)$$

donde k^0 es la constante de velocidad estándar, α es el coeficiente de transferencia catódico y n_a es el número de electrones aparente involucrados en la etapa determinante de la velocidad del proceso global.

La corriente de pico catódica (para un proceso de reducción) se expresa por:

$$I_{p,c} = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{3/2} A c D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{a } 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (14)$$

Para los sistemas cuasi-reversibles (con $10^{-1} > k^0 > 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$) la corriente es controlada tanto por la transferencia de carga como por el transporte de masa. La forma

de los voltamperogramas cíclicos es una función de $k^\circ / \sqrt{\pi a D}$ (donde $a = nFv / RT$). A medida que $k^\circ / \sqrt{\pi a D}$ se incrementa, el proceso se aproxima al caso reversible. Para valores pequeños de $k^\circ / \sqrt{\pi a D}$, el sistema exhibe un comportamiento irreversible.

En sistemas más complejos, por ejemplo, con reacciones químicas homogéneas acopladas al proceso de transferencia de carga, la respuesta electroquímica difiere con respecto a la de un sistema simple. Los criterios de diagnóstico utilizados para su caracterización se basan, por lo general, en las variaciones de E_p y la I_p con respecto a la concentración en el seno de la solución y la velocidad de barrido, la relación $I_{p,a} / I_{p,c}$, etc., que adoptan características propias según el mecanismo particular de que se trate.^{111,112}

2.8.1.2. Voltamperometría de convolución

Un tratamiento matemático de las curvas $I-E$ obtenidas mediante VC permite transformar las mismas y obtener respuestas similares a las encontradas en voltamperometría de estado estacionario, las cuales suelen presentar mayores ventajas a la hora de procesar los datos experimentales. Esta transformación se basa en el principio de la convolución, que involucra cálculos de integrales del tipo:^{43,113}

$$I_{con} = \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{i(v)}{(t-v)^{1/2}} dv \quad (15)$$

donde I_{con} es la correspondiente corriente convolucionada.

Bajo condiciones controladas por difusión, donde $c_O(0,t) = 0$, $I_{con}(t)$ alcanza su valor límite o máximo, $I_{L,con}$, siendo

$$I_{L,con} = nFAD_O^{1/2} c_O^* \quad (16)$$

Es importante resaltar que esta ecuación es independiente del mecanismo de reacción y depende únicamente de la concentración del sustrato de partida.

Para una reacción reversible (ec. 5), se tiene una ecuación con la misma forma que las curvas voltamperométricas en estado estacionario:^{43,114}

$$E = E_{1/2} + \frac{2,303RT}{nF} \log \frac{I_{L,con} - I_{con}(t)}{I_{con}(t)} \quad (17)$$

Así, un gráfico de E vs $\log((I_{L,con} - I_{con}(t))/I_{con}(t))$ será lineal, con una pendiente de $0,059/n$ V a 25 °C, siendo posible determinar el $E_{1/2}$ de la reacción a partir de la ordenada al origen de dicho gráfico. Las curvas de la corriente convolucionada $I_{con}(t)$ vs E para los barridos directo e inverso se superponen, con la $I_{con}(t)$ retornando a cero a un potencial lo suficientemente positivo, donde $c_R(0,t) = 0$, para una cupla redox simple como la representada por la ec. 5 (Figura 12).

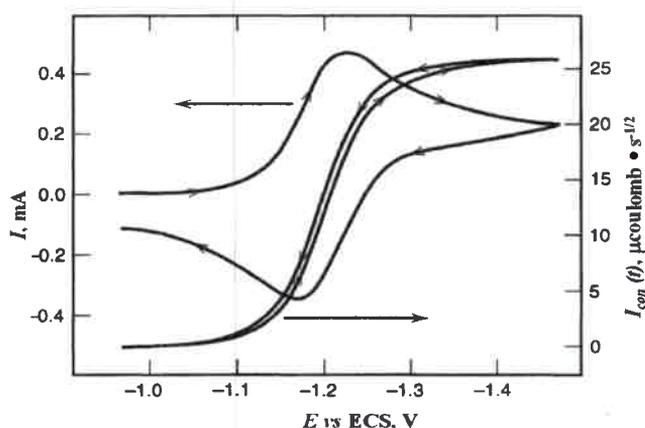


Figura 12. Voltamperogramas experimentales cíclico y de convolución de *p*-nitrotolueno 1,84 mM en acetonitrilo + perclorato de tetraetilamonio 0,2 M, obtenidos con un electrodo de gota suspendida de mercurio, $\nu = 50 \text{ V s}^{-1}$. (Adaptada de Ref. 43).

En cambio, cuando la reacción de electrodo es cuasi-reversible las curvas de las corrientes convolucionadas directas e inversa presentan histéresis (Figura 13).^{43,113,115}

Este efecto se puede explicar como consecuencia del corrimiento de los valores de los $E_{p,c}$ y $E_{p,a}$ respecto a sus valores reversibles.

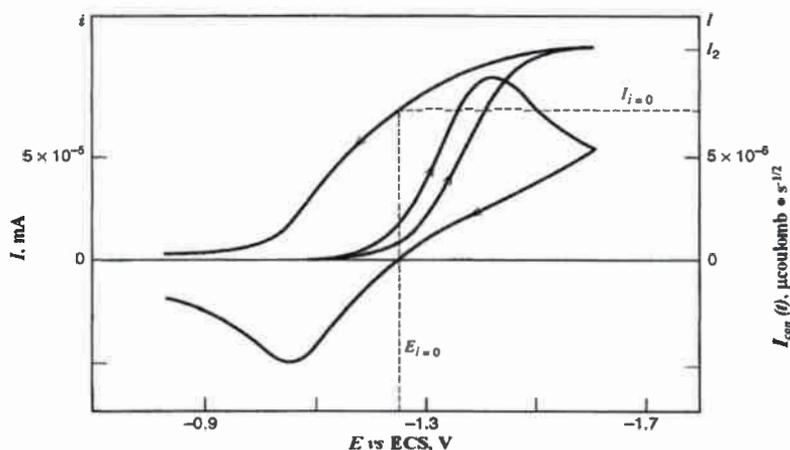


Figura 13. Voltamperogramas experimentales cíclico y de convolución de *ter*-nitrobutano 0,5 mM en dimetilformamida + ioduro de tetra-*n*-butilamonio 0,1 M, $\nu = 17,9 \text{ V s}^{-1}$. (Adaptada de Ref. 43).

Así, la técnica de convolución de los voltamperogramas cíclicos es útil para comprobar la reversibilidad del sistema electroquímico, o bien, la existencia de alguna complicación cinética posterior acoplada a la transferencia de carga inicial. Los métodos de convolución simplifican el tratamiento de los datos de los procesos de electrodo con reacciones químicas acopladas y pueden ser útiles en aplicaciones analíticas.⁴³

2.8.1.3. Voltamperometría de onda cuadrada

Las técnicas de voltamperometrías de pulsos, entre las cuales se encuentran la voltamperometría de pulso normal, de pulso diferencial y VOC, fueron introducidas por Barker y Jenkins¹¹⁶ y están dirigidas, principalmente, a reducir los efectos producidos por las corrientes capacitivas en las respuestas voltamperométricas, mejorando así los límites de detección. La diferencia entre las distintas técnicas de pulso es el tipo de onda de excitación y el tipo de muestreo de corriente aplicado a cada una de ellas.

El programa de potencial que se aplica en VOC se muestra en la Figura 14.¹¹⁰ La forma de onda consiste en una onda cuadrada simétrica, de amplitud ΔE_{oc} , superpuesta sobre un barrido de escalera, ΔE_e , donde un período completo de la onda cuadrada 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 . La corriente es muestreada dos veces durante cada ciclo de la onda cuadrada: durante la última porción de cada hemi-ciclo, esto es, una vez al final del pulso directo y una vez al final del pulso inverso. Siendo m el número de ciclos aplicados, la corriente de los hemi-ciclos directos, con $m = 1, 3, 5, \dots$, se denomina corriente directa (I_d), la de los hemi-ciclos inversos, $m = 2, 4, 6, \dots$, corriente inversa (I_i). La corriente diferencial o neta (I_n) para cada ciclo se define como $I_n = I_d - I_i$.

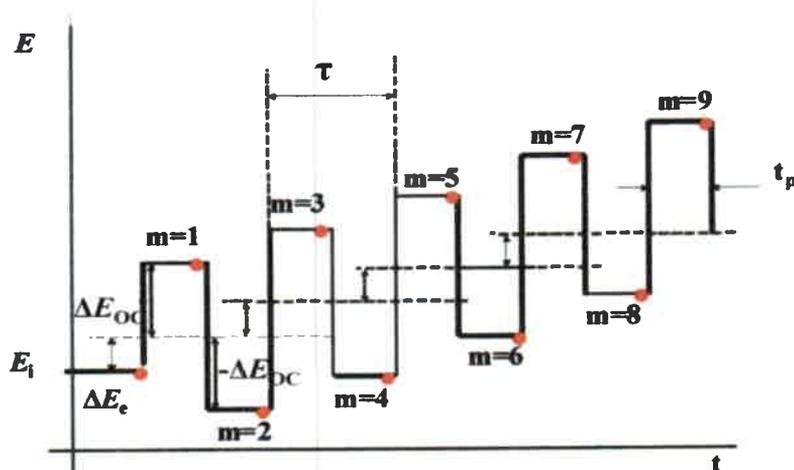


Figura 14. Programa de saltos de potencial aplicado al electrodo de trabajo en un experimento de VOC. ΔE_{oc} : amplitud de la onda cuadrada., ΔE_e : salto de escalera, τ : período de la onda cuadrada, t_p : tiempo de pulso. (●) Puntos donde se realiza el muestreo de la corriente. (Adaptada de Ref. 110).

El resultado de un experimento de VOC son tres voltamperogramas que muestran las corrientes directa, inversa y neta en función del potencial del barrido de escalera correspondiente. La Figura 15 muestra la respuesta que se obtiene para un sistema redox reversible controlado por difusión. Debido a que la corriente es muestreada en ambos pulsos, en el mismo experimento se obtienen los picos

correspondientes a la oxidación y reducción de las especies electroactivas sobre la superficie del electrodo. Por ser de signos opuestos, la diferencia entre I_d y I_i resulta en una I_n mayor a los componentes individuales, lo que le confiere gran sensibilidad a la técnica para sistemas reversibles o cuasi-reversibles. Esta ventaja de la VOC respecto de las otras técnicas de pulso se pierde cuando la reversibilidad del sistema disminuye.

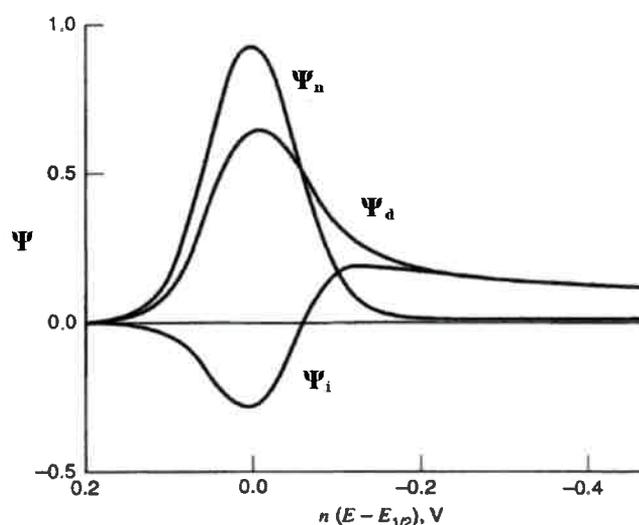


Figura 15. Voltamperograma de onda cuadrada para una transferencia electrónica reversible con corrientes adimensionales directa (Ψ_d), inversa (Ψ_i) y neta (Ψ_n) normalizadas. (Adaptada de Ref. 110).

2.8.2. Espectroscopía de impedancia electroquímica

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE) es una técnica útil para el estudio de sistemas electroquímicos ya que permite investigar las características de los electrodos modificados así como también la velocidad de las reacciones electroquímicas.^{1,117} La impedancia constituye la resistencia compleja total de un sistema cuando fluye una corriente a través de un circuito, el cual consiste en una combinación de resistores y capacitores.

La técnica consiste en la aplicación al electrodo de trabajo de una perturbación periódica de potencial de pequeña amplitud, dada por:

$$E(t) = E_0 \text{sen}(\omega t) \quad (18)$$

donde $E(t)$ es el valor del potencial al tiempo t , E_0 es la amplitud de la perturbación y ω es la frecuencia angular.

Como consecuencia de la perturbación aplicada, se obtiene una respuesta de corriente, $j(t)$, también de tipo sinusoidal y que está desfasada de la señal de perturbación por un ángulo ϕ , el cual es función de ω :

$$j(t) = j_0 \text{sen}(\omega t + \phi) \quad (19)$$

donde j_0 representa la longitud del vector corriente, el cual rota a una frecuencia ω .

La medición de la diferencia de fase y de la amplitud permite el análisis del proceso de electrodo en relación a las contribuciones difusional, cinética, de doble capa, reacciones homogéneas acopladas, etc.

La impedancia del sistema, $Z(\omega)$, se define como el cociente entre la perturbación aplicada y la respuesta de corriente obtenida:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{j(t)} = \frac{E_0 \text{sen}(\omega t)}{j_0 \text{sen}(\omega t + \phi)} \quad (20)$$

De esta manera, la impedancia $Z(\omega)$ de un sistema puede ser expresada mediante un número complejo que puede ser representado en coordenadas polares o cartesianas:

$$Z(\omega) = Z_{real} + i Z_{im} \quad (21 a)$$

o

$$Z(\omega) = |Z(\omega)| e^{i\phi} \quad (21 b)$$

donde $|Z(\omega)|$ representa el módulo de la impedancia e $i = -\sqrt{-1}$.

El espectro de impedancia resultante puede ser representado utilizando dos tipos de diagramas, denominados de Nyquist^{118,119} y de Bode.¹¹⁹ Si bien ambas representaciones son equivalentes, resultan complementarias ya que de cada una de ellas puede obtenerse de manera directa distinta información. En la representación o diagrama de Nyquist se grafica la componente imaginaria de la impedancia en función de la componente real (Figura 16). Generalmente, incluye una región semi-circular a frecuencias altas, correspondiente al proceso limitado por transferencia de carga, seguida por una línea recta a frecuencias bajas, que representa el proceso limitado por difusión. Los espectros pueden ser utilizados para obtener información sobre las características de transferencia de carga y difusionales. Para el caso de procesos de transferencia de carga rápidos el espectro sólo incluye la parte lineal, mientras que los procesos de transferencia de carga lentos se caracterizan por una gran región semi-circular.

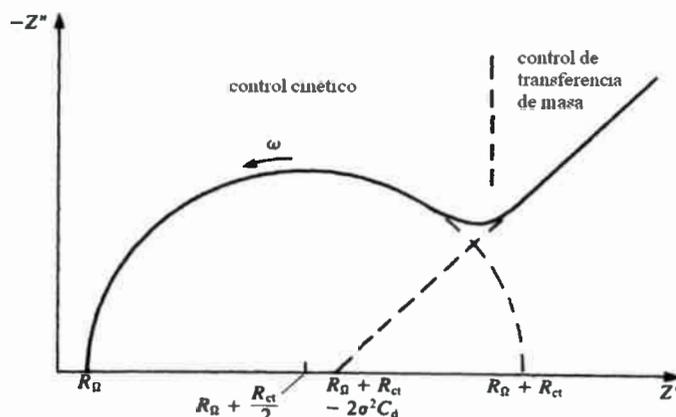


Figura 16. Diagrama de Nyquist en el plano complejo para un sistema electroquímico simple $O + ne^- \rightleftharpoons R$. (Adaptada de Ref. 43).

En el diagrama de Bode se grafican la impedancia $|Z|$ (Figura 17 a) y el ángulo de fase ϕ (Figura 17 b) en función de la frecuencia, en escala logarítmica. La ventaja de estos diagramas es que la dependencia con la frecuencia se aprecia más claramente, ya que el comportamiento de impedancia a frecuencias altas se muestra con el mismo peso

a lo largo del gráfico.²⁶ En el diagrama de ángulo de fase es posible observar claramente la existencia o no de desviaciones del comportamiento capacitivo ideal.¹¹⁹

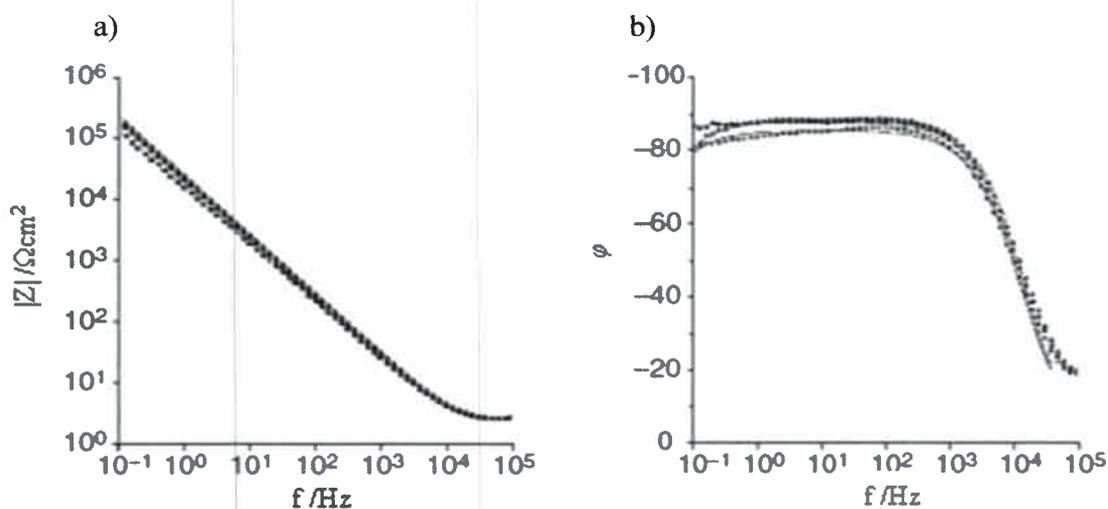


Figura 17. Diagrama de Bode para el comportamiento de impedancia de la doble capa en un electrodo de Au oxidado. a) impedancia $|Z|$ y b) ángulo de fase φ en función de la frecuencia, en escala logarítmica. (Adaptada de Ref. 119).

La interpretación de la respuesta de una interface electroquímica en un experimento de EIE, requiere la elaboración de un modelo que contemple las características esenciales del sistema en términos de circuitos eléctricos equivalentes. A partir de los elementos de los mismos se obtienen los parámetros que caracterizan al sistema. La Figura 18 muestra el modelo de circuito eléctrico equivalente de Randles para un proceso de electrodo simple. La impedancia del proceso de electrodo, Z_f , incluye la resistencia a la transferencia de carga, R_{ct} , y la impedancia de Warburg, W , que resulta de la difusión de los iones desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo. Cuando existen otros pasos, ya sean homogéneos o heterogéneos, deben utilizarse circuitos más complejos.¹²⁰

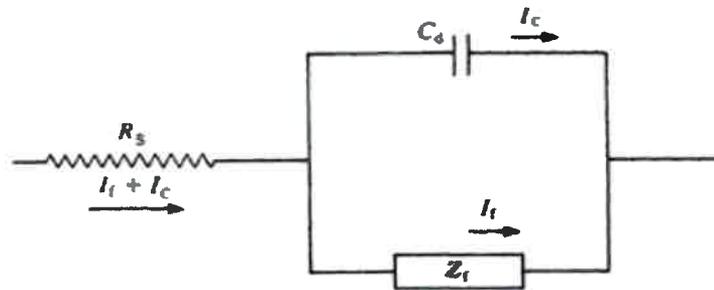


Figura 18. Circuito eléctrico equivalente para una celda electroquímica para un proceso de electrodo simple. R_s es la resistencia de la solución, Z_f la impedancia del proceso de electrodo y C_d la capacitancia de la doble capa eléctrica.

Generalmente, el comportamiento capacitivo en un sistema real no se describe adecuadamente por un capacitor de placas paralelas, por lo que, a menudo, se emplea en su lugar un elemento de fase constante (CPE) para representar la capacitancia de la doble capa.^{5,24,121} La impedancia de CPE está dada por:

$$Z_{\text{CPE}} = \frac{1}{Q_{\text{CPE}}(i\omega)^\sigma} \quad (22)$$

donde Q_{CPE} es una constante, ω es la frecuencia angular y σ está relacionada con el ángulo de rotación de una línea de transmisión capacitiva en los gráficos de plano complejos. Para $\sigma = 1$ la impedancia de CPE es igual a la de un capacitor ideal. Debido a su sensibilidad con el espesor y la constante dieléctrica de la monocapa adsorbida, la capacitancia de la doble capa se utiliza comúnmente como fuente de información acerca de la estructura interfacial electrodo/solución.¹²²

2.9. TÉCNICA NO ELECTROQUÍMICA: ÁNGULO DE CONTACTO

El ángulo de contacto se refiere al ángulo que forma la superficie de un líquido al ponerse en contacto con un sólido y puede definirse como el ángulo medido dentro

del líquido, entre la superficie sólida y el plano tangente a la superficie del líquido, en la línea de intersección¹²³ (Figura 19).

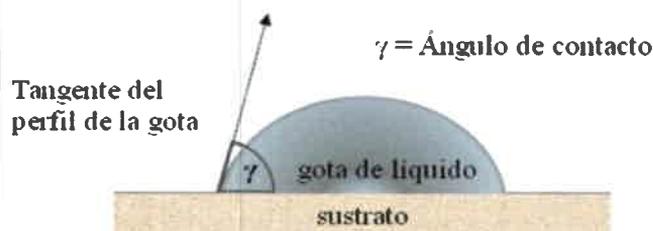


Figura 19. Ángulo de contacto de una gota de líquido sobre una superficie sólida.

El ángulo de contacto depende de varios factores, como la rugosidad, la manera de preparación y la limpieza de la superficie¹²⁴ y, en gran medida, de la energía superficial del material, definida como la energía necesaria para romper los enlaces intermoleculares, dando lugar a una superficie. El valor del ángulo de contacto depende, principalmente, de la relación que existe entre las fuerzas cohesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido. Por ejemplo, cuando las fuerzas adhesivas con la superficie del sólido son muy grandes en relación a las fuerzas cohesivas, el ángulo de contacto es menor de 90° .

Las medidas de ángulo de contacto brindan información sobre la composición y la estructura de las superficies, en especial, acerca del grado de su naturaleza hidrofóbica, cuando el líquido empleado es agua.¹²⁵

Para superficies modificadas con MAE, esta técnica permite investigar la relación entre las propiedades y la química de tales superficies debido a que la mojabilidad (capacidad de un fluido para mojar una superficie) varía con la densidad, espesor y grado de orden de la MAE, así como también con la polaridad de los grupos funcionales superficiales.^{126,127} Se conoce, por ej., que para MAE compactas de alcanotioles sobre electrodos de Au(111) se obtienen ángulos de contacto de agua de 112° , mientras que para superficies hidrofílicas los ángulos son menores a 15° , característicos de superficies altamente hidrofóbicas o hidrofílicas, respectivamente, con pocos defectos.⁵

2.10. PROCESOS DE ADSORCIÓN

La adsorción resulta de una amplia variedad de interacciones entre las especies adsorbentes y la superficie del electrodo. En algunos casos, se trata simplemente de fuerzas electrostáticas, como la adsorción de cationes y aniones sobre una superficie de carga opuesta, o de interacciones carga-dipolo, mientras que otras especies pueden formar enlaces covalentes con la superficie del electrodo.¹²⁸ Dependiendo de la naturaleza de la adsorción, ésta se puede clasificar como *no específica* o *específica*, no existiendo una delimitación clara entre ambas. Cuando están involucradas fuerzas electrostáticas de largo alcance, que perturban la distribución de los iones cercanos a la superficie del electrodo, la adsorción se denomina *no específica*. Por su parte, cuando la interacción entre el adsorbato y el electrodo causa la formación de una monocapa, parcial o completa, se denomina adsorción *específica*.⁴³

El grado de adsorción específica varía con la concentración de la especie en solución, con el tamaño de la molécula adsorbida y con la orientación sobre la superficie del electrodo, entre otros factores. Para especies electroactivas y productos de reacciones de electrodo, la respuesta faradaica puede ser usada para determinar la cantidad de especies adsorbidas, pudiendo describirse el grado de cubrimiento de la superficie mediante *isotermas de adsorción*.²⁶

2.10.1. Isotermas de adsorción

La relación entre la cantidad de sustancia *i* adsorbida sobre una superficie de electrodo por unidad de área, Γ_i , la actividad en el seno de la solución, a_i^b , y el estado eléctrico del sistema, a una dada temperatura, está dada por la isoterma de adsorción.⁴³ Ésta se obtiene a partir de la igualdad entre los potenciales electroquímicos de la especie *i* en solución y adsorbida, que están en equilibrio:

$$\bar{\mu}_i^A = \bar{\mu}_i^b \quad (23)$$

donde los superíndices A y b se refieren a la especie i adsorbida y en solución, respectivamente. Así,

$$\bar{\mu}_i^{-0,A} + RT \ln a_i^A = \bar{\mu}_i^{-0,b} + RT \ln a_i^b \quad (24)$$

donde los términos $\bar{\mu}_i^{-0}$ son los potenciales electroquímicos estándares. La energía libre de adsorción estándar, ΔG_{ads} , que es función del potencial de electrodo, se define como

$$\Delta G_{ads} = \bar{\mu}_i^{-0,A} - \bar{\mu}_i^{-0,b} \quad (25)$$

por lo que:

$$a_i^A = a_i^b e^{-\Delta G_{ads}/RT} = \beta_i a_i^b \quad (26)$$

donde β_i expresa la fuerza de la adsorción y se define como:^{129,130}

$$\beta_i = \exp\left(\frac{-\Delta G_{ads}}{RT}\right) \quad (27)$$

y los demás parámetros tienen su significado usual.¹³¹

La ec. 26 representa la forma general de una isoterma de adsorción, con a_i^A como función de a_i^b y β_i . A partir de diferentes relaciones entre a_i^A y Γ_i , surgen como resultado diferentes modelos de isotermas. Entre las más utilizadas se encuentran:⁴³

- *Isoterma de Langmuir*: considera que: (a) no existe interacción entre las especies adsorbidas en la superficie del sustrato (electrodo), (b) la superficie es homogénea, con lo cual supone que todos los sitios superficiales poseen igual energía de adsorción, y (c) a altas actividades en el seno de la solución, se produce la saturación de la superficie por el adsorbato, Γ_s . De este modo, se llega a:

$$\frac{\Gamma_i}{\Gamma_s - \Gamma_i} = \beta_i a_i^b \quad (28)$$

donde β es el coeficiente de adsorción.

En términos del cubrimiento superficial, expresado como $\theta = \Gamma_i / \Gamma_s$, la isoterma de Langmuir tiene la forma:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \beta_i a_i^b \quad (29)$$

- *Isoterma de Temkin*: considera que la energía libre de adsorción es función lineal del grado de cubrimiento de acuerdo a:

$$\Gamma_i = \frac{RT}{2g} \ln(\beta_i a_i^b) \quad (0,2 < \theta < 0,8) \quad (30)$$

donde g es un parámetro que caracteriza la interacción entre las especies adsorbidas, por lo que varía con el cubrimiento. Cuando $a_i^b \rightarrow 0$, $\theta \rightarrow \infty$ y cuando $a_i^b \rightarrow \infty$, $\theta \rightarrow 0$, apartándose del comportamiento físico de la adsorción, por lo que la ec. 30 es válida para $0,2 < \theta < 0,8$.

- *Isoterma de Freundlich*: considera la no uniformidad de la superficie de los sólidos, con lo cual se puede plantear una distribución de sitios de energía. Cuando esta función de distribución diferencial contiene un exponencial en ΔG_{ads} , se tiene la expresión de la isoterma de Freundlich:

$$\theta = A c_i^{*1/n} \quad (31)$$

o, en forma lineal:

$$\ln \theta = \ln A + \frac{1}{n} \ln c_i^* \quad (32)$$

donde $A = RTnb'$ y $b' = be^{-\Delta G_{ads}/RT}$, siendo c_i^* la concentración del adsorbato en el seno de la solución. El parámetro A es una medida de la capacidad adsorbente del sustrato y nos da una idea de la intensidad de adsorción, debiendo ser mayor a 1. Esta isoterma, en los casos límite se desvía de la realidad ya que predice un valor de θ infinito para c_i^* infinita y para θ próximo a 0, ΔG_{ads} tendría que acercarse a infinito. Por lo tanto, las ec. 31 y 32 son válidas para un grado de cubrimiento intermedio.

- *Isoterma de Frumkin*: considera la existencia de interacciones de largo alcance entre las especies adsorbidas. Surge de la suposición de que la energía libre de adsorción, definida en la ec. 25, se relaciona linealmente con Γ_i :

$$\Delta G_{ads}(\text{Frumkin}) = \Delta G_{ads}(\text{Langmuir}) - 2g\Gamma_i \quad (33)$$

El parámetro g expresa la manera en la cual el incremento en el cubrimiento produce cambios en la energía de adsorción de las especies i . Si g es positiva, las interacciones entre las moléculas vecinas adsorbidas en la superficie del electrodo son atractivas, y si g es negativa, las interacciones son repulsivas. A medida que g tiende a 0, la isoterma de Frumkin se aproxima a la de Langmuir.

La isoterma de Frumkin puede escribirse como:

$$\beta_i a_i^b = \frac{\Gamma_i}{\Gamma_s - \Gamma_i} \exp\left(\frac{2g\Gamma_i}{RT}\right) \quad (34)$$

o

$$\beta_i c_i^* = \frac{\theta}{1-\theta} e^{g'\theta} \quad (35)$$

donde el coeficiente de actividad de la especie i está incluida en el parámetro β y $g' = 2g\Gamma_s / RT$. El intervalo de g' generalmente es $-2 \leq g' \leq 2$.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. MATERIALES

3.1.1. Reactivos y muestra real

Los flavonoides FIS, QUER y naringina y catecol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y se emplearon sin tratamiento previo. Se mantuvieron a una temperatura de 4 °C y protegidos de la luz. $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ y $K_3[Fe(CN)_6]$ fueron marca Merck p.a.

Como muestra real se utilizó la formulación farmacéutica denominada Artihial, de origen español, del laboratorio Masterdiet s.l., la cual contiene un concentrado de flavonoides de origen natural, rico en QUER y naringina.

3.1.2. Solventes

El agua utilizada fue ultrapura, purificada con un sistema Millipore Milli-Q, o bidestilada en nuestro laboratorio. Para ello, el agua destilada se sometió a un segundo proceso de destilación en presencia de $KMnO_4$ en medio básico, a los efectos de eliminar los restos de materia orgánica. Debido a la baja solubilidad en agua de algunos de ellos, se empleó dimetilsulfóxido (DMSO, Merck p.a.) como co-solvente, a los efectos de favorecer la solubilidad de los antioxidantes estudiados y de facilitar la disolución de compuestos policíclicos en futuras aplicaciones.

Las soluciones reguladoras de diferentes pH fueron tanto comerciales (Merck p.a.) como preparadas en el laboratorio. La composición de las soluciones reguladoras comerciales fue: para pH 2 y 4 citrato/HCl, para pH 7 Na_2HPO_4/KH_2PO_4 y, en el caso de pH 10, ácido bórico/KCl. Por otro lado, las soluciones reguladoras preparadas en el laboratorio fueron de concentración 0,100 M y consistieron en mezclas de soluciones de fosfatos (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 y H_3PO_4 , Merck p.a.) en las proporciones adecuadas, de manera de obtener los diferentes valores de pH.

3.1.3. Soluciones

Las soluciones patrones de FIS, QUER y naringina fueron de concentración 1×10^{-2} o 1×10^{-3} M, se prepararon en DMSO y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente, tomando alícuotas adecuadas de la solución patrón correspondiente. En todos los casos, el medio consistió en disoluciones acuosas formadas por 15 o 20 % de DMSO y soluciones reguladoras de distintos pH.

Por su parte, las soluciones de QUER, naringina y de la muestra real empleadas en las medidas de HPLC con detección por arreglo de diodos, fueron preparadas en metanol.

Las soluciones acuosas de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ / $K_3[Fe(CN)_6]$ fueron de concentración 1×10^{-3} M y 0,100 M de KCl como electrolito soporte y se utilizaron en las medidas de impedancia. Soluciones de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ 1×10^{-3} M preparadas con soluciones reguladoras de distintos pH se emplearon en la determinación de los pK_a superficiales de las MAE.

Las soluciones de trabajo de catecol fueron de concentración 5×10^{-4} M y se prepararon diariamente. En todos los casos, el medio consistió en disoluciones acuosas formadas por 15 % de DMSO + 85 % solución reguladora de fosfatos de pH 4.

Antes de realizar los experimentos electroquímicos, todas las soluciones fueron desgasadas, burbujeando nitrógeno de alta pureza dentro de la celda electroquímica durante, al menos, 10 min.

3.1.4. Tioles

Los tioles empleados para la modificación del electrodo de Au fueron: 1-hexanotiol, 1-dodecanotiol, bencenotiol, 6-mercapto-1-hexanol, 4-mercaptofenol, ácido 4-mercaptobenzoico, ácido 3-mercaptopropiónico, ácido 2-mercaptoetanosulfónico, 2-aminoetanotiol (cisteamina), 2-(dietilamino)etanotiol, 4-mercaptopiridina y 4-aminotiofenol, obtenidos de Fluka y Sigma-Aldrich. En la Tabla 1 se muestra la fórmula química, la abreviación, el peso molecular (PM) y la densidad (δ) de los mismos.

Tabla 1. Propiedades físicas de los tioles empleados en la modificación de electrodos de Au.

Nombre	Fórmula	PM	δ /mg L ⁻¹
1-hexanotiol (HT)	SH-(CH ₂) ₅ -CH ₃	118,2	0,84
1-dodecanotiol (DDT)	SH-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	202,4	0,845
bencenotiol (BT)	SH-C ₆ H ₅	110,18	1,073
6-mercaptop-1-hexanol (6-M-1-H)	SH-(CH ₂) ₆ -OH	134,24	0,985
4-mercaptofenol (4-MF)	SH-C ₆ H ₄ -OH	126,18	Sólido
ácido 4-mercaptobenzoico (4-MB)	SH-C ₆ H ₄ -COOH	154,19	Sólido
ácido 3-mercaptopropiónico (3-MP)	SH-(CH ₂) ₂ -COOH	106,1	1,22
ácido 2-mercaptoetanosulfónico (2-MES)	SH-(CH ₂) ₂ -SO ₃ Na	164,18	Sólido
cisteamina (CA)	SH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	77,15	Sólido
2-(dietilamino)etanotiol (2-DAET)	SH-(CH ₂) ₂ -N(CH ₂ -CH ₃) ₂	169,72	Sólido
4-mercaptopiridina (4-MP)	SH-C ₅ H ₄ N	111,17	Sólido
4-aminotiofenol (4-ATF)	SH-C ₆ H ₄ -NH ₂	125,19	Sólido

3.2. INSTRUMENTAL ELECTROQUÍMICO

3.2.1. Celdas electroquímicas

En general, las medidas se realizaron empleando celdas electroquímicas convencionales de tres electrodos, con dos compartimentos y burbujeador de gases incorporado (Figura 20). Los dos compartimentos de la celda están separados entre sí mediante un fino capilar Luggin, con un área de sección transversal pequeña. En el compartimiento principal se sitúan el contra-electrodo y el electrodo de trabajo, los cuales están sujetos con una tapa de teflón. En el compartimiento lateral de la celda se coloca el electrodo de referencia, con el propósito de impedir la contaminación de la solución de trabajo debido a los componentes propios del mismo. La capacidad de la celda es de 10 mL.

Durante las mediciones electroquímicas la celda se sumergió en un baño termostático para garantizar el control de la temperatura en los experimentos, la cual fue de 20 o 25 °C, según el experimento.

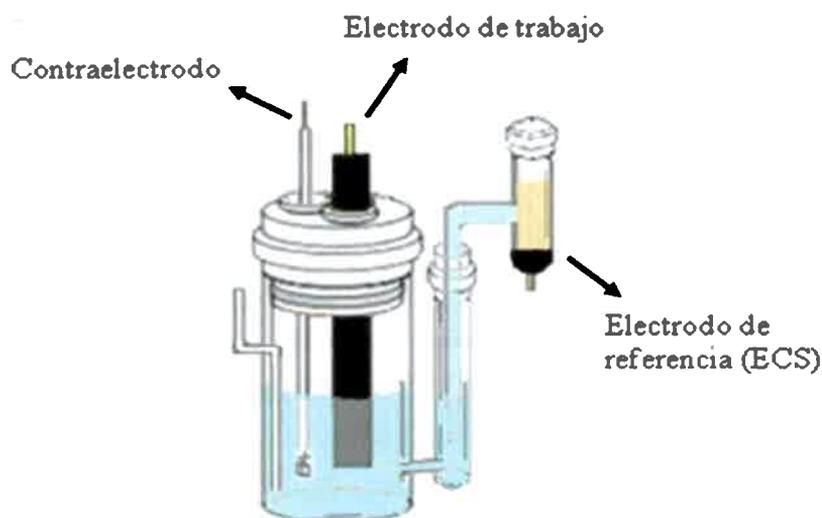


Figura 20. Representación esquemática de la celda convencional de tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia de calomel saturado (ECS) y contraelectrodo.

3.2.2. Electrodos

3.2.2.1. Electrodos de trabajo

Como electrodo de trabajo se utilizaron un disco de CV y un disco de Au policristalino, ambos de área geométrica $A = 0,071 \text{ cm}^2$. Los electrodos fueron adquiridos de Bioanalytical System (BAS) y constan de un disco de aproximadamente 3 mm de diámetro, inserto en un cilindro de teflón.

Los electrodos de trabajo se sometieron a un pre-tratamiento, mecánico y electroquímico, a los efectos de poder obtener resultados reproducibles.

3.2.2.1.1. Tratamiento previo aplicado a los electrodos de trabajo

El electrodo de CV, antes de cada medida, se pulió con polvo de alúmina (Fisher, 0,3 y 0,05 μm) sobre un paño húmedo, se enjuagó con abundante cantidad de agua destilada y se sumergió en un baño de ultrasonido durante 2 min a fin de retirar los restos de alúmina. Una vez pulido, el electrodo se activó electroquímicamente en una solución acuosa de NaOH 1,00 M, aplicando un salto de potencial de 1,200 V durante 5 min, siguiendo un procedimiento descrito previamente por Anjo y col.¹³²

Los electrodos de Au, antes de cada medida o modificación, se pulieron sobre una lija gastada y húmeda y se enjuagaron con abundante cantidad de agua destilada. Posteriormente, se activaron electroquímicamente, ciclando el potencial entre -0,200 y 1,700 V a 0,700 V s^{-1} en una solución acuosa de H_2SO_4 0,500 M, hasta obtener el voltamperograma cíclico característico de un electrodo de Au limpio, registrado a 0,100 V s^{-1} .¹³³

3.2.2.1.2. Determinación del área electroquímica del electrodo de Au policristalino

El área electroquímica se puede obtener utilizando dos metodologías diferentes: mediante el pico de reducción de los óxidos de Au o a partir de la desorción reductiva de una MAE compacta de un alcanotiol.

La Figura 21 muestra un voltamperograma cíclico de un electrodo de Au policristalino registrado en una solución acuosa de H_2SO_4 0,500 M, posterior al pretratamiento de limpieza (sección 3.2.2.1.1.). Este voltamperograma cíclico es característico de la superficie de un electrodo de Au, presentando una zona de formación de óxidos a partir de aproximadamente 0,900 V vs ECS y el respectivo pico de reducción de los mismos al invertir el sentido del barrido de potencial, a un $E_{p,c}$ de 0,700 V.

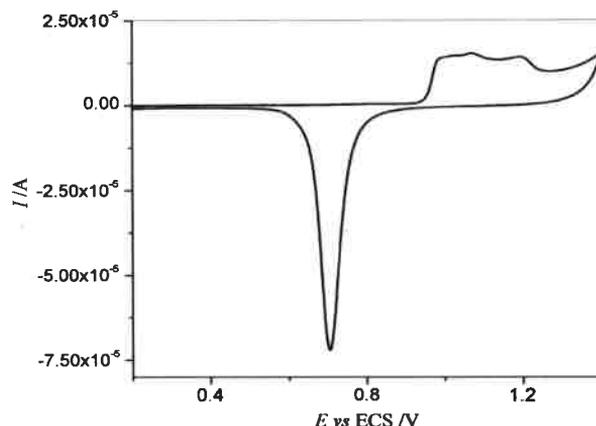


Figura 21. Voltamperograma cíclico de un electrodo de Au desnudo registrado en una solución acuosa de H_2SO_4 0,500 M. $v = 0,100 V s^{-1}$.

La carga del pico de reducción de una monocapa de óxido de Au por unidad de área es $420 \mu C cm^{-2}$.¹³⁴ Por lo tanto, a partir de la carga correspondiente al pico de reducción del óxido y aplicando una regla de tres simple, es posible obtener el área electroquímica del electrodo. El valor de la carga promedio que se obtuvo experimentalmente a partir de la integración de los picos de reducción de voltamperogramas cíclicos repetitivos permitió calcular un área promedio de $(0,119 \pm 0,005) cm^2$.

Por otro lado, cuando se tiene una MAE es posible producir su desorción reductiva en una solución básica, aplicando un potencial lo suficientemente negativo.¹³⁵ De la integración del pico de reducción, mediante la cual se obtiene el valor de la carga (Q), es posible determinar la concentración superficial de la sustancia adsorbida a partir de la siguiente ecuación:

$$\Gamma = \frac{Q}{n F A} \quad (36)$$

donde A es el área del electrodo, Q la carga comprendida bajo el/los pico/s de desorción reductiva, n el número de electrones intercambiados, F la constante de Faraday y Γ la concentración superficial. Sin embargo, conociendo Γ y determinando Q es factible

calcular el área electroquímica del electrodo. Como se mencionó en la sección 1.1.1., se espera que los alcanotioles de cadena larga formen MAE con estructuras altamente ordenadas y densamente empaquetadas sobre superficies de Au(111),¹³⁶⁻¹⁴⁰ con $\Gamma = 7,7 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$.⁴³ Para la determinación del área electroquímica a partir de este método, el electrodo se modificó con una MAE de 1-dodecanotiol (DDT) por deposición gaseosa del tiol durante 30 min a 60 °C, considerándose la formación de una monocapa compacta, y se produjo su desorción en medio básico. La Figura 22 muestra el voltamperograma de desorción reductiva de la MAE de DDT en KOH 1,00 M.

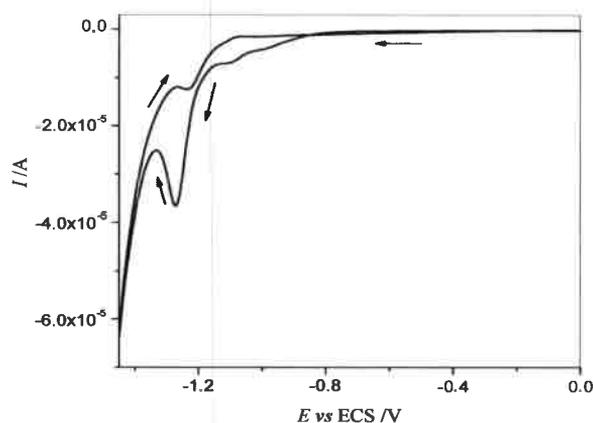


Figura 22. Voltamperograma cíclico de desorción de una MAE de DDT sobre Au en una solución de KOH 1,00 M. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. Las flechas indican la dirección del barrido de potencial.

A partir del voltamperograma cíclico se obtuvo la carga correspondiente a la desorción de la MAE y empleando $\Gamma = 7,7 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ y la ec. 36 fue posible calcular el área del electrodo de Au, obteniéndose un valor de $0,148 \text{ cm}^2$.

Los valores de áreas obtenidos a partir de los dos métodos concuerdan razonablemente bien (a pesar de que en el segundo se consideró el valor de Γ que se obtiene sobre superficies de Au(111)), por lo que se consideró como área electroquímica el promedio de ambas, siendo $(0,13 \pm 0,02) \text{ cm}^2$. Por otra parte, de la relación entre las áreas electroquímica y geométrica se obtuvo un valor para el factor de rugosidad de 1,8.

3.2.2.1.3. Modificación del electrodo de Au

La modificación del electrodo de Au con las MAE se realizó por inmersión del electrodo limpio en soluciones etanólicas 10 o 5 mM del tiol correspondiente, durante un determinado tiempo, denominado tiempo de modificación (t_{mod}). Posteriormente, el electrodo fue lavado con etanol y luego con abundante agua destilada. En todos los casos, la solución del tiol se agitó durante la modificación. El t_{mod} se varió dependiendo del experimento planificado.

3.2.2.2. Electrodo de referencia

Como electrodos de referencia se utilizaron electrodos de calomel saturado (ECS), fabricados en nuestro laboratorio; de Ag/AgCl saturado con KCl y un alambre de Ag, como electrodo de pseudoreferencia.

La Figura 23 a muestra el esquema del electrodo de Ag/AgCl y la Figura 23 b, del ECS fabricado en nuestro laboratorio. El ECS consiste en un tubo de 6 mm de diámetro, el cual posee dos ramas. En una de las ramas se suelda un alambre de Pt y se coloca Hg purificado de manera de cubrir toda la superficie del Pt; por encima del Hg, se agrega la pasta de calomel (Hg_2Cl_2) y una solución acuosa saturada de KCl. La otra rama, que realiza el contacto con la solución, se rellena con agar- KNO_3 3 %. Éste actúa como puente salino. Es importante que no exista flujo de materia hacia el compartimento de trabajo. Una vez preparado el electrodo, se compara su potencial frente a otro ECS y se verifica, una vez alcanzado el equilibrio, que la diferencia de potencial entre ellos no sea mayor que $\pm 0,001$ V a temperatura ambiente.

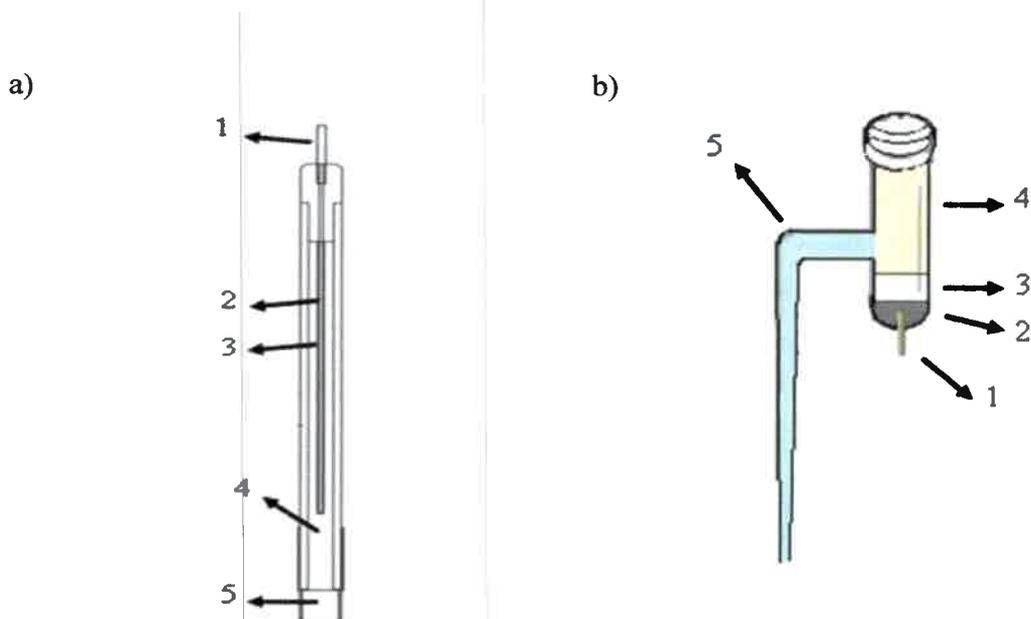


Figura 23. Representación esquemática del electrodo de referencia de a) Ag/AgCl: 1) contacto de Pt, 2) alambre de Ag, 3) AgCl, 4) solución saturada de KCl, 5) tapón poroso; y de b) calomel saturado: 1) contacto de Pt, 2) Hg, 3) pasta de calomel/ Hg_2Cl_2 , 4) solución saturada de KCl, 5) puente salino, agar- KNO_3 .

3.2.2.3. Contraelectrodo

Como contraelectrodo se utilizó un alambre de Pt en forma de espiral, de área superior a la del electrodo de trabajo ($A \approx 2 \text{ cm}^2$).

3.3. TÉCNICAS EMPLEADAS

Las técnicas electroquímicas que se emplearon fueron las voltamperometrías cíclicas (VC) y de onda cuadrada (VOC) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Además, se aplicaron las técnicas de ángulo de contacto, espectrofotometría UV-Visible y HPLC con detección por arreglo de diodos.

3.4. EQUIPAMIENTO

Las medidas electroquímicas se realizaron utilizando un potenciostato AUTOLAB PGSTAT30, acoplado a una PC, con software electroquímico incorporado, GPES y FRA 4.9, Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands.

Para las medidas de pH se utilizó un peachimetro comercial, marca Orion, modelo 720A, el que se calibró diariamente con soluciones reguladoras comerciales.

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

Las medidas de HPLC se realizaron con un cromatógrafo Waters E2695, con detector por arreglo de diodos Waters 2998, con inyector automático. La columna fue de fase reversa Luna C18(2) 150 x 4,60 mm y 5 μm de tamaño de partícula.

Para las medidas de ángulo de contacto se utilizó un microscopio, marca Intel Play QX3, que cuenta con un objetivo de 60X. Las fotografías tomadas por el microscopio fueron analizadas mediante el software Image J (plugins DROP ANALYSIS).

Capítulo 4

Estudio del comportamiento electroquímico de fisetina sobre electrodos desnudos

En este capítulo se muestran los resultados relacionados con el comportamiento electroquímico de FIS sobre electrodos de CV y Au desnudos, como así también los experimentos llevados a cabo para determinar distintas propiedades fisicoquímicas del flavonoide.

4.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE Fisetina

En general, los flavonoides, por ser compuestos polifenólicos, son solubles en agua. Sin embargo, la solubilidad de FIS en agua es baja, siendo totalmente soluble en solventes no acuosos, como alcoholes, dimetilsulfóxido (DMSO) y acetonitrilo (ACN).

De acuerdo a su estructura química (Figura 6 a) se espera que FIS presente varios valores de pK_a . Sin embargo, en la literatura se informaron sólo dos: $pK_{a1} = 7,64$ y $pK_{a2} = 9,44$.¹⁴¹ Debido a la escasa solubilidad en agua estos valores fueron obtenidos por extrapolación a partir de medidas realizadas en mezclas metanol/agua.¹⁴¹ El tercer pK_a no se ha podido obtener con exactitud, siendo el mismo mayor que 12.

Por otra parte, se realizó un estudio de absorción UV-visible a distintas concentraciones de FIS, c_{FIS}^* . La Figura 24 muestra los espectros de absorción UV-visible característicos de FIS en DMSO.

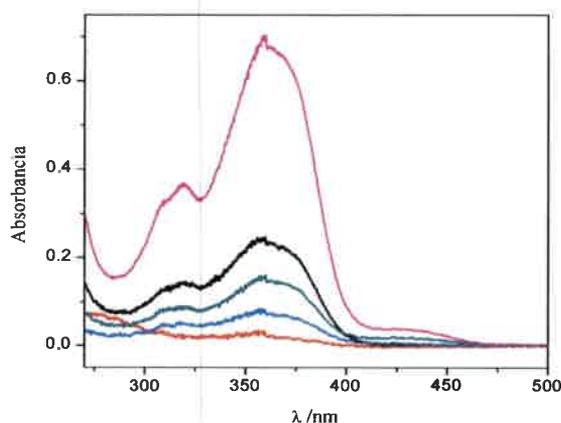


Figura 24. Espectros de absorción UV-visible de FIS en DMSO. Camino óptico $b = 1$ cm. c_{FIS}^* = (-) $1,1 \times 10^{-6}$; (-) $3,7 \times 10^{-6}$; (-) $7,4 \times 10^{-6}$; (-) $1,1 \times 10^{-5}$ y (-) $3,0 \times 10^{-5}$ M.

FIS presenta un máximo de absorción a $\lambda = 357$ nm. A partir de estos espectros, se obtuvo un gráfico de absorbancia en función de c_{FIS}^* , verificándose el cumplimiento de la ley de Lambert y Beer ($r = 0,9992$), obteniendo un coeficiente de extinción molar $\epsilon = (2,58 \pm 0,05) \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a la λ de máxima absorción y para el intervalo de concentraciones estudiado ($1,1 \times 10^{-6}$ a $3,0 \times 10^{-5}$ M).

4.2. MEDIDAS ELECTROQUÍMICAS

4.2.1. Comportamiento electroquímico de fisetina sobre electrodos de carbono vítreo

En primer lugar se procedió al estudio del comportamiento electroquímico de FIS empleando electrodos de CV como electrodos de trabajo. La Figura 25 muestra voltamperogramas cíclicos de FIS, obtenidos sobre electrodos de CV en un medio de reacción formado por 15 % de DMSO + 85 % de solución reguladora comercial de pH 4. Se observa que FIS se oxida electroquímicamente mediante un mecanismo de reacción complejo. El voltamperograma registrado en la región de potenciales entre -0,200 y 1,00 V presenta tres ondas de oxidación, siendo la señal I el pico de oxidación la principal. Según la bibliografía existente, esta señal corresponde a la oxidación del grupo catecol del anillo B (Figura 6 a), involucrando el intercambio de $2e^-$ y $2H^+$.^{69,107,142} Por su parte, las señales II y III corresponderían a la oxidación del -OH del C-3 del anillo C^{69,107} y del -OH del C-7 del anillo A,^{69,143} respectivamente. La interpretación de estas dos últimas señales sigue aún bajo discusión, ya que Timbola y col.¹⁰⁶ proponen que podría tratarse de la oxidación de los productos de reacción generados a partir de la señal I.

También se puede observar en la Figura 25 que, si el barrido se invierte a un potencial de 0,430 V, es posible verificar la reversibilidad de la señal I.

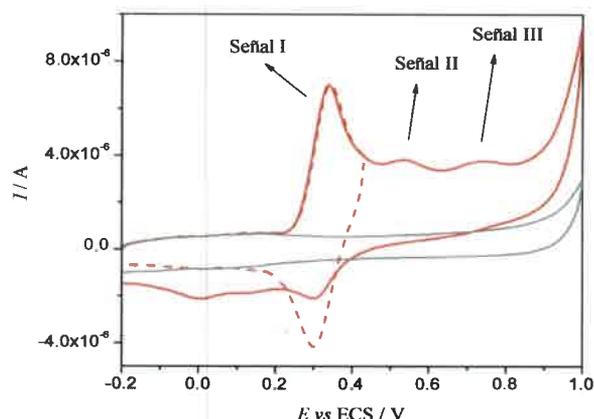


Figura 25. Voltamperogramas cíclicos registrados en una solución de FIS hasta 1,00 V (línea roja continua) y hasta 0,430 V (línea roja discontinua) y en solución de blanco (línea gris continua). $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

En las Figuras 26 a y b se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos a diferentes valores de pH. Como puede observarse, la respuesta es fuertemente dependiente del mismo. Así, al aumentar el pH disminuye notablemente la intensidad de las señales, a la vez que se produce un ensanchamiento de las mismas y, simultáneamente, un corrimiento hacia potenciales menos anódicos.

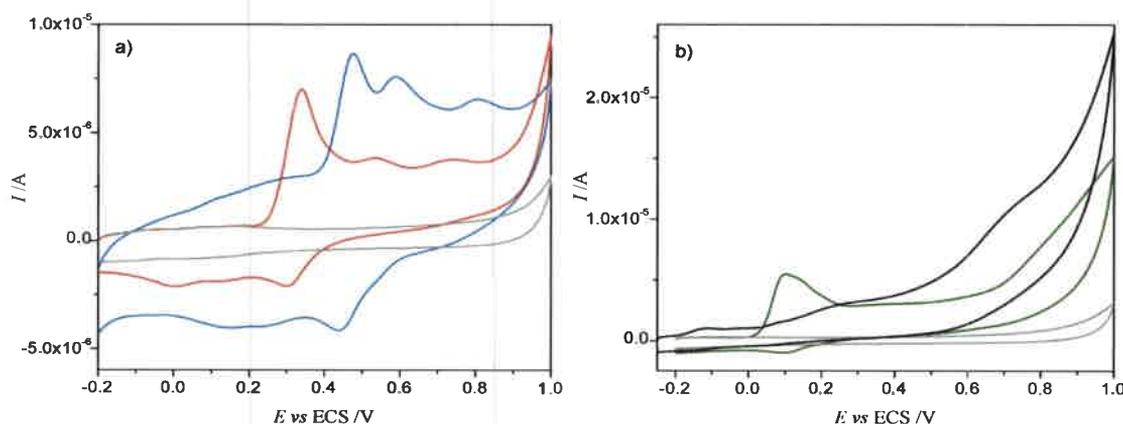


Figura 26. Voltamperogramas cíclicos registrados en una solución de FIS. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de diferentes pH. a) pH (-) 2 y (-) 4 y b) pH (-) 7 y (-) 10. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

A pH 2 se observa poca diferencia entre los E_p de las dos primeras señales, dificultándose su separación, mientras que a pH 10 los picos no se encuentran bien definidos. Dadas las respuestas obtenidas, se realizó un estudio con la velocidad de barrido de potencial sobre la señal del pico I a los pH 4 y 7. Se conoce que cuando el proceso de electrodo está controlado por difusión, un gráfico de la corriente de pico anódica ($I_{p,a}$) vs $v^{1/2}$ es lineal, mientras que para una cupla redox superficial $I_{p,a}$ muestra un comportamiento lineal en función de v .⁴³ En el intervalo de velocidades estudiado se encontró una relación lineal de $I_{p,a}$ tanto en función de $v^{1/2}$ como de v (Figura 27), a partir de lo que se pudo inferir que esta señal presenta muy probablemente un control mixto: difusional y adsorptivo.

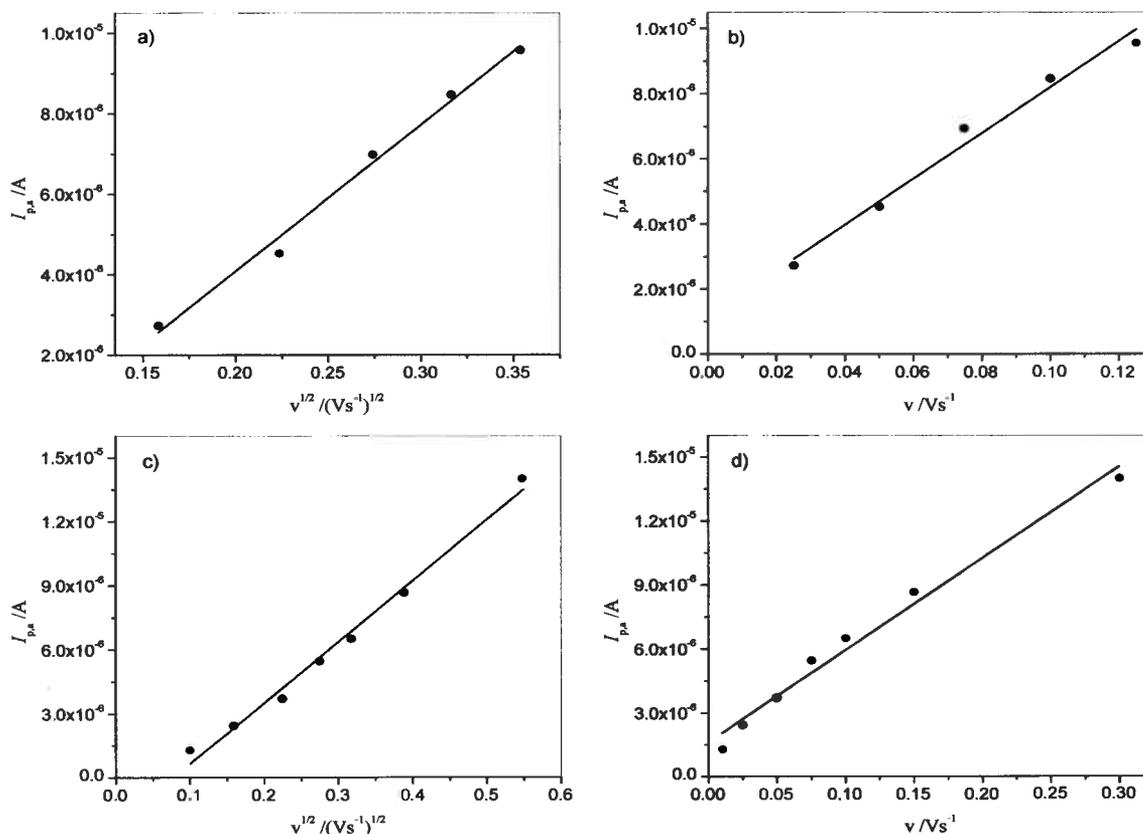


Figura 27. Dependencia de $I_{p,a}$ con a) $v^{1/2}$ a pH 4, $r = 0,9886$; b) v a pH 4, $r = 0,9759$; c) $v^{1/2}$ a pH 7, $r = 0,9879$ y d) v a pH 7, $r = 0,9786$. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4}$ M. Medio: FIS en 15 % DMSO + 85 % solución reguladora.

La adsorción de FIS sobre la superficie del electrodo de CV a los pH estudiados se corroboró mediante experimentos de transferencia del electrodo de trabajo a la solución de blanco. Así, luego de registrar cada voltamperograma cíclico en la solución de FIS, se registró otro bajo las mismas condiciones experimentales, pero en la solución del blanco, donde claramente se observa la definición de una cupla redox superficial cuasi-reversible (Figuras 28 a y b).

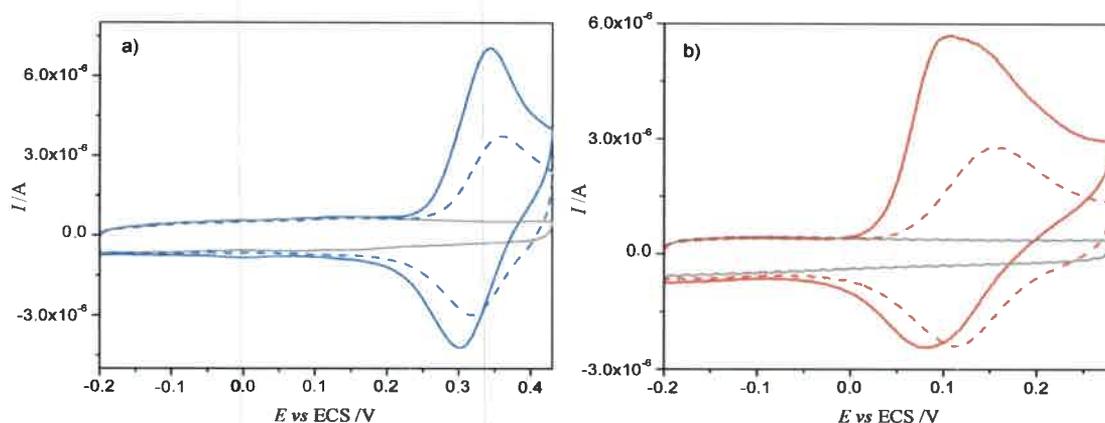


Figura 28. Voltamperogramas cíclicos registrados en solución de FIS (líneas continuas) y en solución de blanco (líneas discontinuas) después de registrar los voltamperogramas cíclicos en presencia de FIS. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora comercial de pH a) 4 y b) 7. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

La adsorción que se produce sobre la superficie del electrodo de CV puede estar dada por FIS, por especies producidas a partir de la reacción redox, o por ambas. Para determinar la naturaleza de la sustancia que se adsorbe, se procedió a verificar la adsorción espontánea de FIS sobre la superficie de electrodos de CV. Para ello, se sumergió el electrodo en una solución de FIS, sin realizar barridos en la misma, y se registró luego un voltamperograma cíclico en la solución del blanco. La Figura 29 muestra la respuesta obtenida, lo que indicaría que FIS se adsorbe espontáneamente sobre la superficie del electrodo. La Figura 29 muestra dos voltamperogramas cíclicos: uno registrado en la solución del blanco después de acumular FIS sobre la superficie del electrodo y, el otro, registrado en el blanco después de haber realizado un

voltamperograma cíclico en la solución de FIS. Las formas de ambos voltamperogramas son semejantes e indicarían que tanto FIS como el producto del primer pico de oxidación estarían adsorbidos sobre la superficie de electrodos de CV.

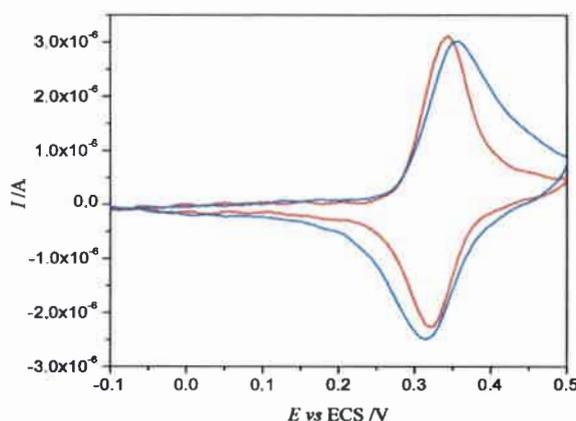


Figura 29. Voltamperogramas cíclicos registrados en una solución de blanco, posterior a la adsorción de FIS durante 1 min: con registro previo de voltamperogramas en solución de FIS (-), y sin haber registrado voltamperogramas en solución de FIS (-). $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

A partir del experimento de transferencia del electrodo a la solución de blanco es factible separar el proceso difusional del adsorbtivo, ya que la respuesta obtenida en la solución de blanco corresponde sólo al componente adsorbtivo. Por lo tanto, el componente difusional se podría obtener de forma aproximada, en cada caso, mediante la diferencia entre el voltamperograma cíclico registrado en una solución de FIS y aquel registrado luego en la solución de blanco. La Figura 30 muestra este procedimiento para los dos valores de pH estudiados.

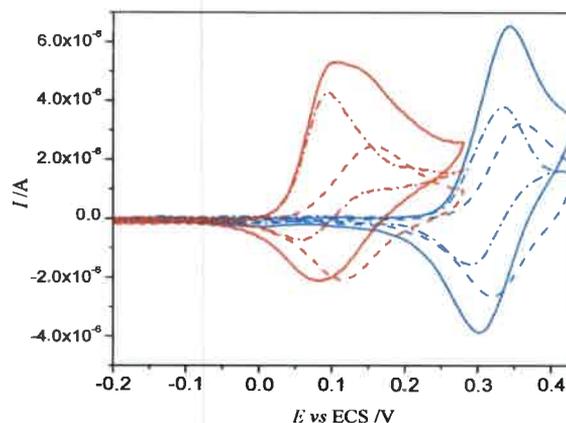


Figura 30. Voltamperogramas cíclicos registrados en solución de FIS (línea continua), en el blanco después de transferir el electrodo a dicha solución (línea discontinua) y el que resulta de la diferencia entre ambos (línea discontinua con puntos) registrados a pH (-) 4 y (-) 7. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora.

A partir de los voltamperogramas cíclicos obtenidos para los procesos difusional y adsortivo en forma separada, se analizó su comportamiento con la velocidad de barrido.

Las Figuras 31 a-d muestran la dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$ y v para los voltamperogramas difusionales y adsortivos, respectivamente, a pH 4 y 7.

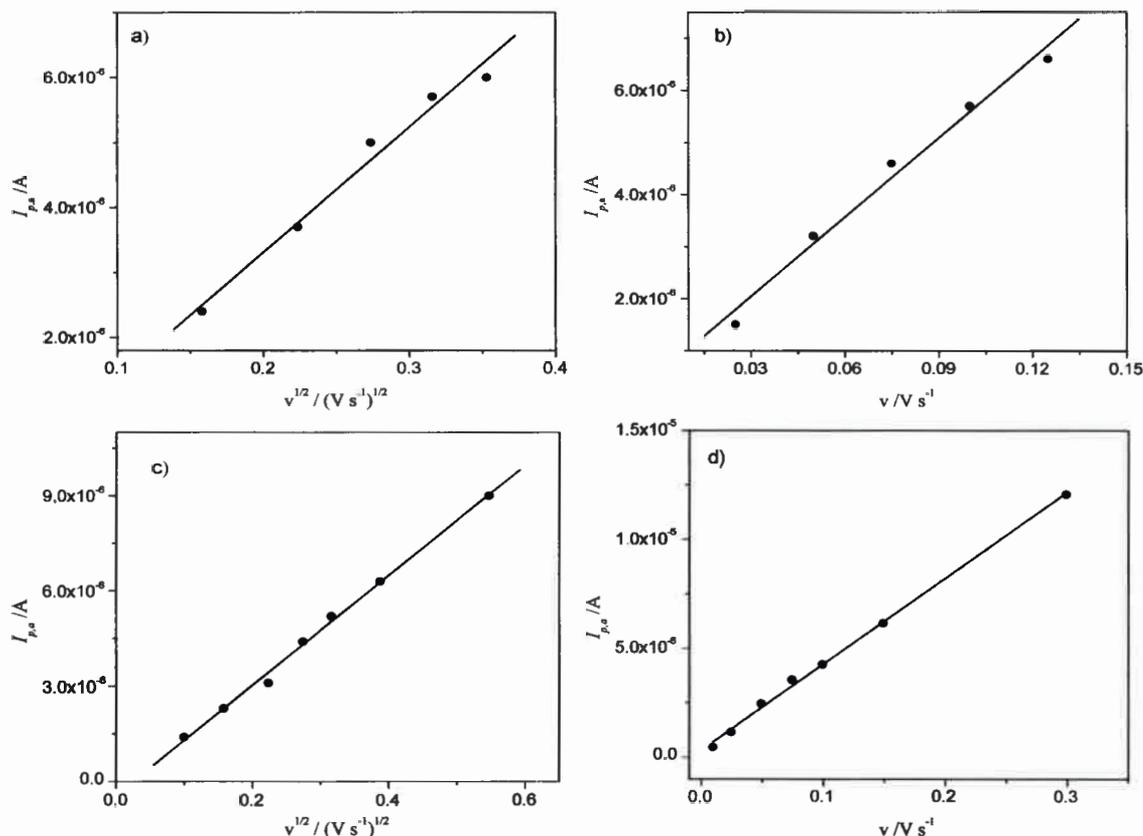


Figura 31. Dependencia de $I_{p,a}$ con a) $v^{1/2}$ para el componente difusional a pH 4, $r = 0,9899$; b) v para el componente adsorptivo a pH 4, $r = 0,9979$; c) $v^{1/2}$ para el componente difusional a pH 7, $r = 0,9980$ y d) v para el componente adsorptivo a pH 7, $r = 0,9974$. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4}$ M. Medio: FIS en 15 % DMSO + 85 % solución reguladora.

En el caso de pH 4, realizando barridos sucesivos en la solución de blanco no se produce la limpieza de la superficie del electrodo, por lo que fue necesario pulirlo y activarlo entre medidas. A pH 7, en cambio, no fue necesario realizarle el pre-tratamiento al electrodo ya que fue posible recuperar la superficie con barridos sucesivos en la solución de blanco. Esto pondría en evidencia que la adsorción es más fuerte a pH 4 que a pH 7. Así, en la Figura 31 puede apreciarse que se encuentra una mejor linealidad a pH 7 que a pH 4, para la dependencia de $I_{p,a}$ tanto con $v^{1/2}$ como con v .

Los experimentos del estudio de la adsorción se llevaron a cabo adsorbiendo FIS por inmersión del electrodo de trabajo en la solución correspondiente, a circuito abierto.

4.2.1.1. Estudio del proceso controlado por difusión

A partir del análisis realizado de los voltamperogramas difusionales obtenidos como se explicó previamente, fue posible determinar un coeficiente de difusión aparente de FIS, D_{FIS} , y corroborar el número de electrones intercambiados por mol de sustancia electrolizada, n .

En primer lugar, se determinó la diferencia entre el potencial de pico anódico y catódico, ΔE_p , para todos los voltamperogramas cíclicos obtenidos. Los valores hallados se encontraron entre 0,038 - 0,040 V a $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ para ambos pH. Estos valores están razonablemente de acuerdo con lo que se espera teóricamente para una cupla redox nernstiana bielectrónica, esto es, 0,030 V a 25 °C.⁴³

Por su parte, la relación entre las corrientes de pico catódica y anódica ($I_{p,c} / I_{p,a}$), determinada usando el método propuesto por Nicholson,¹¹² fue menor a 1 para velocidades de barrido bajas, tendiendo a dicho valor con el incremento de v . Este resultado indicaría que la oxidación electroquímica de FIS corresponde a un mecanismo del tipo EQEQ, donde E representa una etapa electroquímica y Q una etapa química.

Además, se estudió la variación del potencial de pico anódico $E_{p,a}$ con $\log v$. Se conoce que cuando un sistema es reversible el E_p es independiente de v y de c_{FIS}^* , mientras que cuando existe alguna complicación química acoplada a la transferencia de carga, el E_p es dependiente tanto de v como de c_{FIS}^* . En las Figuras 32 a y b se muestran las variaciones del $E_{p,a}$ con $\log v$ para ambos valores de pH. Puede observarse que a pH 7 el gráfico muestra una pendiente cercana a 0,020 V (valor esperado para un mecanismo de reacción del tipo EQ) mientras que a pH 4 el $E_{p,a}$ no varía con v .

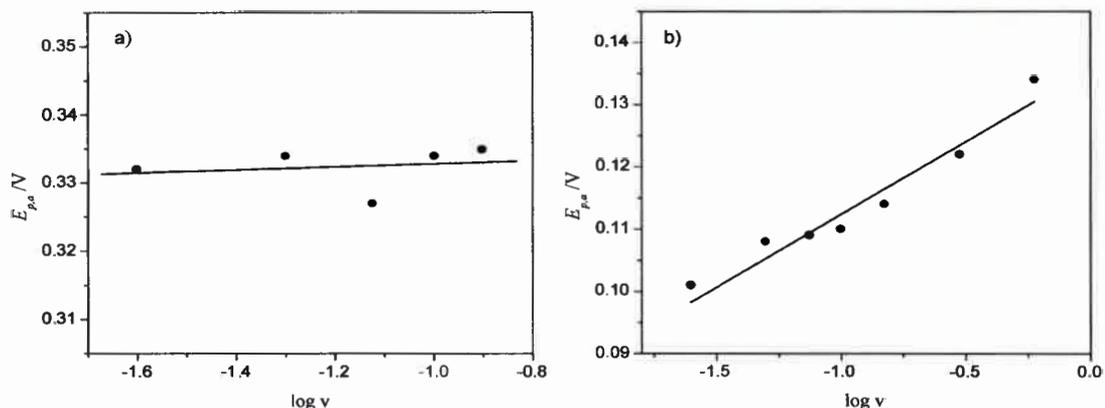


Figura 32. Variación del E_p vs $\log v$. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4}$ M. a) pH 4; b) pH 7, pendiente: $(0,023 \pm 0,003)$ V década $^{-1}$, $r = 0,9375$. Medio: FIS en 15 % DMSO + 85 % solución reguladora.

Estos resultados estarían confirmando que la primera descarga de FIS involucra $2e^-$ y sigue un mecanismo del tipo EQEQ, en donde las etapas químicas corresponderían a la transferencia de protones, la cual se ve favorecida con la disminución del pH. Esto, a su vez, concuerda con que la oxidación corresponde al grupo catecol del anillo B de FIS (Figura 6 a).

4.2.1.1.1. Voltamperometría de convolución

Para determinar el coeficiente de difusión de FIS y el número de electrones intercambiados por la cupla redox se aplicó la técnica de convolución. En las Figuras 33 a y b se muestran voltamperogramas cíclicos de FIS, conjuntamente con los correspondientes voltamperogramas convolucionados a los pH estudiados.

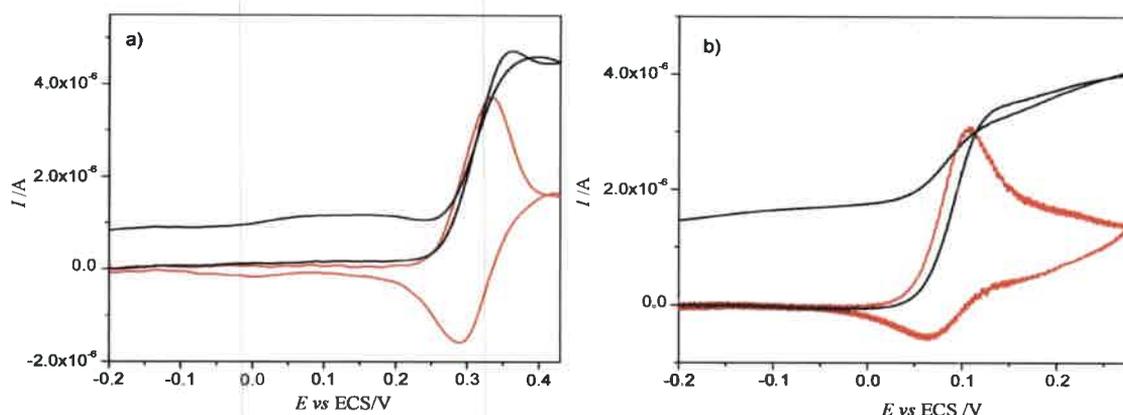


Figura 33. Voltamperogramas cíclicos registrados en solución de FIS corregidos por el blanco (-) y los correspondientes voltamperogramas convolucionados (-). Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH a) 4 y b) 7. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Como puede observarse en la Figura 33, los voltamperogramas cíclicos convolucionados de FIS, después de haber sustraído la corriente de blanco, muestran histéresis entre las corrientes de convolución directa e inversa para las velocidades de barrido estudiadas. Este comportamiento es característico de reacciones de electrodo cuasi-reversibles con reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga inicial.⁴³

Dado que la adsorción es más fuerte a pH 4, en los voltamperogramas cíclicos difusionales obtenidos de la resta no se logra eliminar totalmente la componente adsorptiva, lo que se corrobora con la pobre definición de la corriente límite convolucionada $I_{L,con}$. Por lo tanto, para la obtención del coeficiente de difusión aparente, D_{FIS} , sólo se analizó el pH 7.

El voltamperograma convolucionado alcanza una $I_{L,con}$, a partir de la cual se puede calcular D_{FIS} :¹¹³

$$I_{L,con} = nFAD_{FIS}^{1/2}c_{FIS}^* \quad (37)$$

Utilizando el valor de $I_{L,con}$ calculado a partir del promedio de las $I_{L,con}$ obtenidas en el intervalo de v entre 0,025 y 0,600 $V s^{-1}$ y, considerando que $n = 2$ y $A = 0,071 cm^2$,

se obtuvo un valor de $D_{FIS} = (3,1 \pm 0,5) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ en este medio. El valor de D_{FIS} encontrado es razonable para este tipo de moléculas en el medio de reacción utilizado.

Por otro lado, a partir del análisis logarítmico de los voltamperogramas convolucionados es posible corroborar el número de electrones intercambiados por la cupla redox. La Figura 34 muestra el gráfico de E vs $\log\{(I_{L,c} - I_{con}(t))/I_{con}(t)\}$ a pH 7, el que fue lineal, obteniéndose una pendiente cercana a $0,030 \text{ V década}^{-1}$, en buen acuerdo con el esperado teóricamente para una transferencia de carga bielectrónica.¹¹³

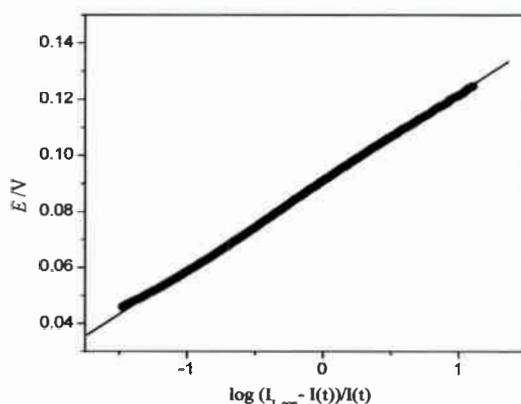


Figura 34. Dependencia del E con $\log\{(I_{L,c} - I_{con}(t))/I_{con}(t)\}$ a pH 7. Pendiente = $0,031 \text{ V década}^{-1}$, $r = 0,9997$. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

4.2.1.2. Estudio del proceso controlado por adsorción

Dado que FIS se adsorbe específicamente sobre electrodos de carbono vítreo, se estudió el proceso de adsorción. El estudio se llevó a cabo a pH 4 ya que, como se mostró anteriormente, a medida que el pH disminuye se favorece la adsorción. En principio, esta interacción puede explicarse considerando que sobre una superficie activada de CV pueden estar presentes varios grupos funcionales, tales como: fenol, carbonilo y lactona, entre otros,¹⁴⁴ los que interaccionarían con los grupos funcionales presentes en la estructura química de FIS produciendo la adsorción selectiva.

Se determinó el tipo de isoterma de adsorción que mejor describe la interacción específica de FIS con electrodos de CV y los parámetros cinéticos y termodinámicos correspondientes.

4.2.1.2.1. Concentración superficial de las especies adsorbidas

El área bajo el pico de oxidación y/o reducción de un voltamperograma cíclico de adsorción, luego de sustraer las corrientes capacitivas, representa la carga Q asociada al proceso redox. Para el sistema bajo estudio es sabido que FIS se oxida a la correspondiente quinona,^{69,107,142} por lo tanto, y considerando la ec. 36, se tiene $Q_{FIS} = nFA\Gamma_{FIS}$ y $Q_{QUI} = nFA\Gamma_{QUI}$ para FIS y la quinona, respectivamente. A partir de voltamperogramas cíclicos registrados en un intervalo de velocidades desde 0,025 a 0,125 V s⁻¹, se determinaron los valores promedio $\Gamma_{FIS} = (3,4 \pm 0,3) \times 10^{-10}$ mol cm⁻² y $\Gamma_{QUI} = (4,7 \pm 0,7) \times 10^{-10}$ mol cm⁻² para $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4}$ M. Estos valores están de acuerdo con los esperados teóricamente para la formación de una monocapa de sustancia adsorbida.⁴³

4.2.1.2.2. Isoterma de adsorción

En primer lugar, se llevaron a cabo estudios para encontrar el potencial, E_{ac} , y el tiempo de acumulación, t_{ac} , más apropiados para llevar a cabo la adsorción de FIS sobre la superficie del electrodo. Se utilizó VOC por ser una técnica más sensible.

Para ello, el electrodo se mantuvo en una solución de FIS mientras el E_{ac} se varió desde -0,300 a 0,100 V en intervalos de 0,100 V. Los voltamperogramas de onda cuadrada registrados en la solución de blanco después de cada E_{ac} aplicado, no mostraron diferencias significativas en los valores de corriente. Por otra parte, tampoco se observó una diferencia significativa en los valores de corriente cuando la acumulación de FIS se realizó a circuito abierto. Sobre la base de estos resultados, la

adsorción FIS se llevó a cabo a circuito abierto por inmersión del electrodo de CV en una solución de FIS durante un t_{ac} dado.

Para establecer el tiempo de acumulación más adecuado se realizaron experimentos a distintas concentraciones de FIS. Para cada concentración empleada, la adsorción de FIS se llevó a cabo en soluciones agitadas, en donde el electrodo de CV quedó inmerso durante un determinado tiempo a circuito abierto, registrándose luego los voltamperogramas de onda cuadrada en solución de blanco.

En todos los casos, después de la acumulación de FIS sobre la superficie de electrodos de CV y, antes de ser transferido a la celda que contiene la solución de blanco, el electrodo se enjuagó con abundante agua. Además, el electrodo fue pulido y activado antes de cada experimento, como se describió anteriormente (sección 3.2.2.1.1.).

La Figura 35 muestra los tres registros de corriente de un voltamperograma de onda cuadrada registrado en la solución de blanco, bajo las condiciones experimentales indicadas previamente.

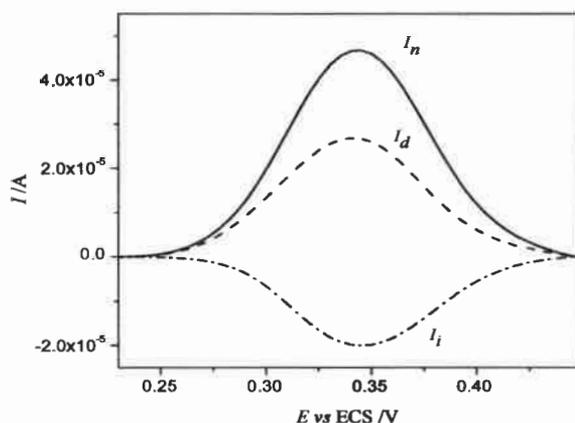


Figura 35. Voltamperograma de onda cuadrada de FIS registrado en una solución de blanco. $t_{ac} = 30 \text{ min}$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$. $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$, $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Para cada una de las concentraciones, la $I_{p,n}$ aumenta a medida que lo hace el t_{ac} , hasta llegar a un valor de $I_{p,n}$ constante. La condición de equilibrio de adsorción varía

con la concentración de FIS. A concentraciones menores que 1×10^{-6} M, el equilibrio de adsorción superficial se obtiene para un t_{ac} de 30 min, por lo que se fijó este tiempo como el apropiado para llevar a cabo los experimentos. Cuando c_{FIS}^* es mayor que 1×10^{-6} M, a $t_{ac} = 30$ min. el electrodo se cubre completamente y la corriente de pico neta así obtenida corresponde al valor de la corriente de pico neta máxima ($I_{p,n,máx}$).

Por otra parte, el cubrimiento superficial se puede expresar como $\theta = I_{p,n} / I_{p,n,máx}$, donde $I_{p,n}$ es la corriente de pico de los voltamperogramas de onda cuadrada obtenida a un t_{ac} de 30 min para diferentes c_{FIS}^* y $I_{p,n,máx}$ es el máximo valor de corriente de pico obtenida al mismo t_{ac} para la mayor concentración de FIS estudiada, $c_{FIS}^* = 5 \times 10^{-6}$ M.

A partir de los datos de la curva de $I_{p,n}$ en función de c_{FIS}^* se determinó el valor de $I_{p,n,máx}$ para el cálculo de θ . Posteriormente, se obtuvo el gráfico de c_{FIS}^* en función de θ y se realizaron los análisis correspondientes de modo tal de determinar cuál es la isoterma de adsorción que ajusta mejor los datos experimentales.^{43,131} Así, se encontró que la isoterma de adsorción de Frumkin es la que mejor describe la interacción específica de FIS con los electrodos de CV.

En la Figura 36 a se muestran los datos experimentales y el ajuste obtenido para la isoterma de Frumkin (ec. 35) para $0,17 < \theta < 0,79$. La línea punteada representa el ajuste realizado para la isoterma de Langmuir (ec. 29). La Figura 36 b muestra el ajuste de los datos para la forma linealizada de la ecuación de Frumkin, dada por:

$$\ln\left(\frac{\theta}{1-\theta}\right) + g'\theta = \ln c_{FIS}^* + \ln \beta \quad (38)$$

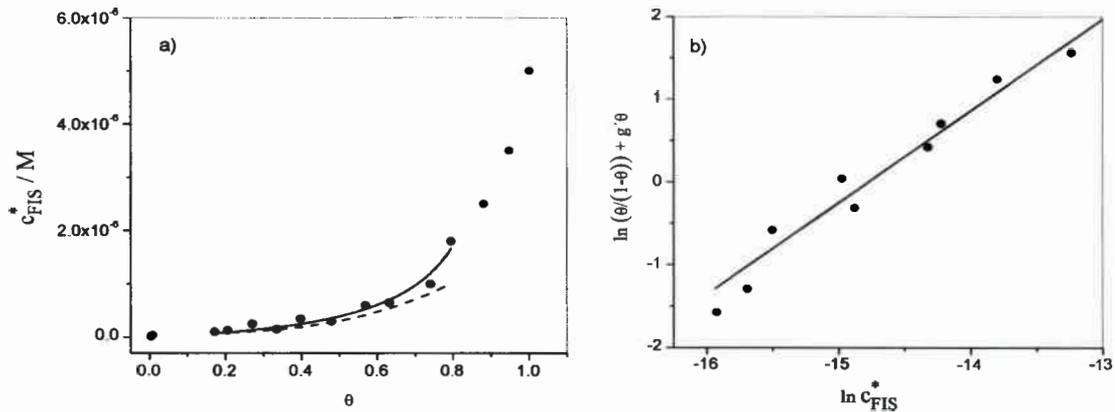


Figura 36. a) c_{FIS}^* vs θ . Los puntos experimentales se representan por (\bullet), la línea continua es el resultado del mejor ajuste, correspondiente a la isoterma de adsorción de Frumkin, con $\chi^2 = 6,35 \times 10^{-16}$. $t_{ac} = 30$ min. $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. La línea discontinua es el ajuste obtenido para la isoterma de Langmuir. (b) Forma logarítmica de la isoterma de adsorción de Frumkin, $r = 0,9765$.

Mediante el ajuste se obtuvieron valores de $\beta = 3 \times 10^6$ y $g' = (0,31 \pm 0,05)$, con $\chi^2 = 1,24 \times 10^{-16}$. A partir de β es posible calcular ΔG_{ads} de acuerdo a la ec. 27, obteniéndose un valor de $\Delta G_{ads} = -36$ kJ mol $^{-1}$. El hecho de que el valor del ΔG_{ads} sea negativo indica que el proceso global de adsorción de FIS sobre la superficie de electrodos de CV es energéticamente favorable. Además, el parámetro de interacción g' tiene un valor positivo, que indica que, en este caso, las interacciones entre las moléculas adsorbidas son atractivas.^{43,130,145} El gráfico de $\ln(\theta/(1-\theta)) + g'\theta$ vs $\ln c_{FIS}^*$ es lineal (Figura 36 b), con una pendiente de $(1,1 \pm 0,1)$ y una ordenada al origen de (16 ± 1) . Se determinaron además los valores de $\beta = 8 \times 10^6$ y $g' = 0,29$, siendo similares a los obtenidos anteriormente. Los resultados obtenidos para FIS están de acuerdo con los determinados previamente en nuestro laboratorio para el flavonoide morina, cuya estructura química es similar a la de FIS.¹⁴⁶

4.2.1.2.3. Determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos de la reacción redox superficial mediante voltamperometría de onda cuadrada

Es bien conocido que la VOC es una técnica poderosa para caracterizar reacciones redox superficiales.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Las respuestas voltamperométricas de reacciones redox entre reactivos y productos, ambos adsorbidos sobre la superficie del electrodo, están caracterizadas por el “desdoblamiento del pico neto”,^{149,150} a partir del cual se pueden determinar el potencial formal (E_f^0) y el coeficiente de transferencia anódico ($1-\alpha$) de la cupla redox adsorbida, y el llamado “máximo cuasi-reversible”,¹⁴⁹⁻¹⁵⁵ del cual se obtiene la constante de velocidad formal aparente ($k_{s,ap}$).

4.2.1.2.3.1. Desdoblamiento del pico neto

El análisis teórico de la VOC de las especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo predice que la corriente de pico neta se desdoble en dos y la altura de pico se aproxime a cero a medida que aumenta la velocidad de reacción.^{149,154,155} El desdoblamiento del pico neto es causado por la separación de los picos directo e inverso a medida que el parámetro adimensional, κ , aumenta. Este parámetro describe la importancia relativa de la cinética de la transferencia de carga y depende de la constante de velocidad efectiva para la transferencia de carga y del período de la onda cuadrada. Cuando $\kappa \gg 1$ la reacción se comporta reversiblemente, mientras que para $\kappa \ll 1$ se comporta totalmente irreversible.¹⁵⁶ Experimentalmente, este comportamiento puede observarse disminuyendo la frecuencia de la onda cuadrada, f , o incrementando su amplitud, ΔE_{oc} . Los cambios en la forma del pico, que contienen información cinética, se producen más efectivamente por variación en la amplitud de la onda.^{149,155} A partir del desdoblamiento del pico pueden determinarse E_f^0 y $(1-\alpha)$ de la cupla redox adsorbida.

Se realizaron una serie de experimentos de VOC en los cuales se varió la amplitud, manteniendo la frecuencia constante. Esto se llevó a cabo a dos frecuencias

distintas, obteniéndose el mismo resultado. La Figura 37 muestra los resultados obtenidos a $f = 10$ Hz.

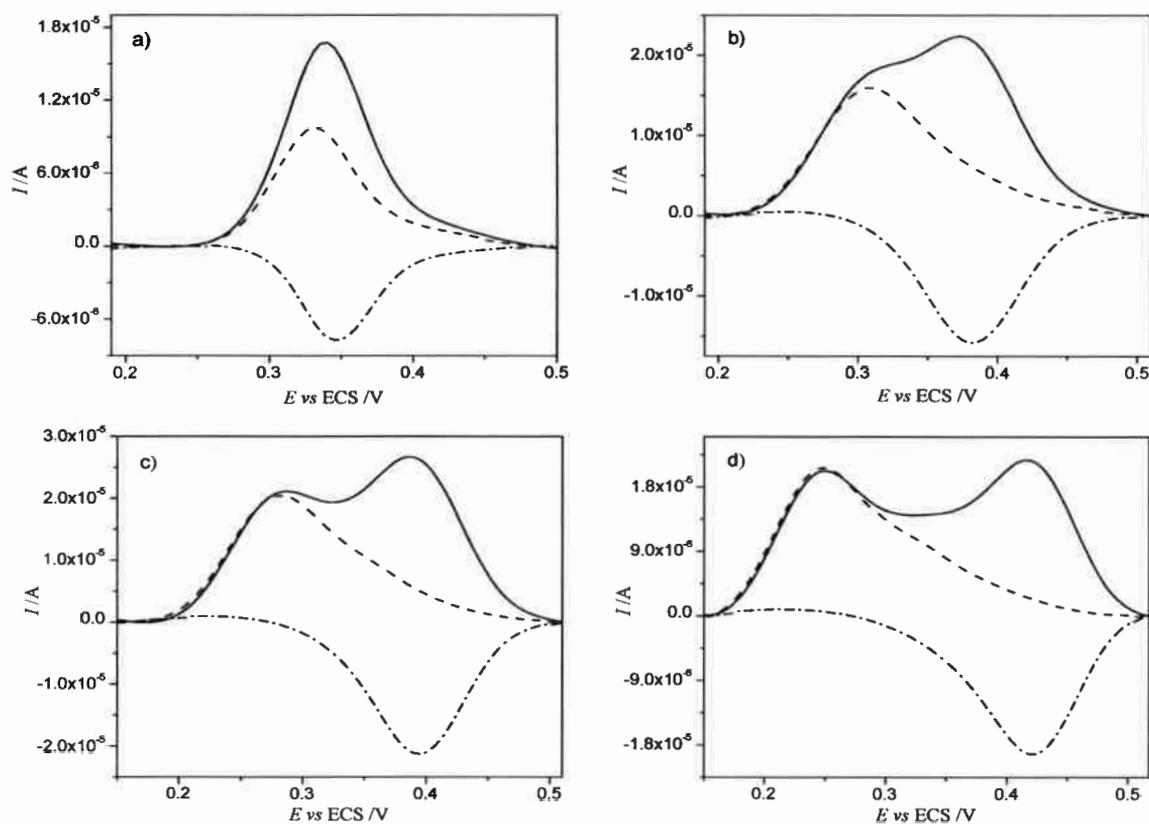


Figura 37. Voltamperogramas de onda cuadrada a diferentes amplitudes de la onda, registrados en una solución de blanco. $t_{ac} = 30$ min. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-6}$ M. $f = 10$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V. $\Delta E_{oc} =$ a) 0,025 V; b) 0,075 V; c) 0,100 V y d) 0,130 V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Como puede observarse, para pequeños ΔE_{oc} se presenta un pico neto simple bien definido. Sin embargo, el pico comienza a desdoblarse a $\Delta E_{oc} = 0,075$ V y se encuentra casi totalmente desdoblado a $\Delta E_{oc} = 0,130$ V a $f = 10$ Hz. Como se mencionó previamente, el desdoblamiento del pico neto es dependiente de la relación entre la constante de velocidad de la cupla redox superficial y el potencial; por lo tanto, el comportamiento de la cupla redox varía de un mecanismo cuasi-reversible a uno reversible a medida que ΔE_{oc} aumenta.

A partir del desdoblamiento del pico es posible determinar el E_f^0 como la semisuma de los E_p de las respuestas directa e inversa y, además, $(1-\alpha)$ usando la relación:¹⁵⁰

$$I_{p,a} / I_{p,c} = 5,6414 \exp[-3,4606(1-\alpha)] \quad (39)$$

La Tabla 2 muestra los valores obtenidos para las dos frecuencias estudiadas.

Tabla 2. Potenciales de pico anódico ($E_{p,a}$) y catódico ($E_{p,c}$), relación entre corrientes de pico anódica y catódica ($I_{p,a} / I_{p,c}$) para los picos de VOC desdoblados, y valores de $(1-\alpha)$ calculados para la cupla redox adsorbida sobre electrodos de CV.

f /Hz	ΔE_{oc} /V	$E_{p,a}$ /V	$E_{p,c}$ /V	E_f^0 /V	$I_{p,a} / I_{p,c}$	$(1-\alpha)$
10	0,025	0,331	0,345	0,338	1,23	0,44
	0,075	0,306	0,379	0,342	0,97	0,51
	0,100	0,282	0,394	0,338	0,93	0,52
	0,130	0,248	0,419	0,333	1,05	0,49
20	0,025	0,340	0,345	0,342	1,34	0,41
	0,075	0,321	0,370	0,345	1,01	0,50
	0,100	0,311	0,370	0,340	0,98	0,51
	0,130	0,287	0,389	0,338	0,97	0,51

A partir de estos resultados se obtuvo un valor promedio de $\overline{E_f^0} = (0,340 \pm 0,003)$ V, $\overline{I_{p,a} / I_{p,c}} = (1,1 \pm 0,1)$ y $\overline{(1-\alpha)} = (0,49 \pm 0,04)$.¹⁴⁵

El valor determinado para $\overline{(1-\alpha)}$ es cercano al reportado previamente por Golabi y col.¹⁰⁷ para el primer pico de oxidación de FIS ($(1-\alpha) = 0,54$), obtenido mediante experimentos de VC realizados en soluciones reguladoras de pH 6, luego de producir la adsorción de FIS a partir de una solución etanólica.

4.2.1.2.3.2. Método del máximo cuasi-reversible

Cuando la adsorción del reactivo y del producto de una cupla redox superficial cuasi-reversible es igualmente fuerte, un gráfico de $I_{p,n}/f$ vs f , obtenido a partir de los voltamperogramas de onda cuadrada a diferentes frecuencias, muestra un máximo que aparece a una frecuencia, denominada frecuencia crítica máxima, que es proporcional a la constante de velocidad formal k_s de la reacción redox.^{151,152,155}

Según la teoría, se ha demostrado que, en la región del máximo del gráfico de $I_{p,n}$ vs f , la curva puede ser aproximada por la parábola dada por:^{151,155}

$$(I_{p,n}/f) - (I_{p,n}/f)_{\max} = -a(\kappa_{\max}/f)^2 (f - k_s/\kappa_{\max})^2 \quad (40)$$

con $a = 3nFAc^*D^{1/2}$, donde n es el número de electrones intercambiados por mol de sustancia electrolizada, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, c^* es la concentración del reactivo en el seno de la solución y D es el coeficiente de difusión del reactivo. A partir de la ec. 40 puede deducirse que, si $(I_{p,n}/f) = (I_{p,n}/f)_{\max}$, entonces $f_{\max} = k_s/\kappa_{\max}$. Por lo tanto:

$$k_s = \kappa_{\max} f_{\max} \quad (41)$$

donde κ_{\max} es un parámetro cinético y f_{\max} es la frecuencia crítica máxima determinada a partir del gráfico de $I_{p,n}/f$ vs f . El parámetro κ_{\max} depende del producto entre el número de electrones intercambiados y la amplitud de la onda cuadrada ($n\Delta E_{oc}$) y del coeficiente de transferencia ($1-\alpha$), pero es independiente del producto entre el número de electrones y el salto de escalera ($n\Delta E_c$), y de la cantidad de sustrato adsorbida inicialmente (Γ^*), esto si no hay interacciones entre las moléculas adsorbidas.¹⁵⁵ κ_{\max} está tabulado con lo cual a partir de la ec. 41 es posible obtener el valor de k_s .¹⁵¹ En presencia de interacciones laterales entre las especies adsorbidas, la constante de velocidad formal aparente para la cupla redox superficial se define como:^{154,155}

$$k_{s,ap} = k_s \exp(-2g'\theta) \tag{42}$$

donde $g'\theta$ es el producto de interacción. Por lo tanto, el grado de interacción depende tanto del cubrimiento superficial como del parámetro de interacción.^{154,155} Entonces, para alcanzar el máximo cuasi-reversible, se debe satisfacer la ecuación:

$$k_{s,ap} = (\kappa_{int})_{max} f_{max} \tag{43}$$

donde $(\kappa_{int})_{max}$ es igual al κ_{max} donde no existen interacciones entre las moléculas adsorbidas. Además, es posible inferir que cuando las fuerzas de interacción son atractivas ($g' > 0$), la constante de velocidad formal del proceso redox superficial decrece.

La Figura 38 muestra el máximo cuasi-reversible para FIS a dos concentraciones distintas.

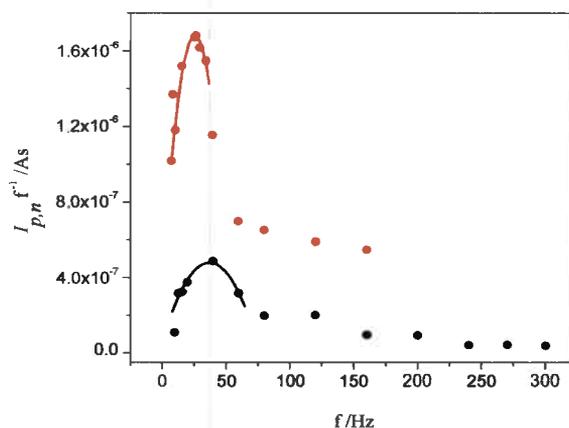


Figura 38. Dependencia entre $I_{p,n} / f$ y f . $t_{ac} = 30 \text{ min}$. $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$. $c_{FIS}^* = (\bullet) 1 \times 10^{-7} \text{ M}$ y $(\bullet) 1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

La Figura 39 muestra los gráficos de $I_{p,n}$ vs f a frecuencias bajas ($f \leq 30 \text{ Hz}$), donde se observa una dependencia lineal, como se espera teóricamente para una cupla redox superficial en condiciones cercanas a la reversibilidad.¹⁵⁵

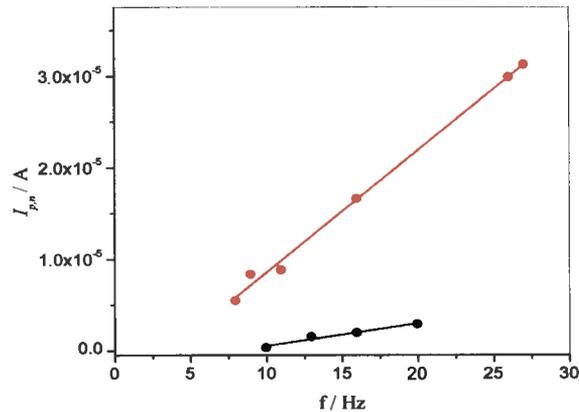


Figura 39. Dependencia entre $I_{p,n}$ y f a bajas frecuencias. $t_{ac} = 30$ min. $\Delta E_{oc} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V. $c_{FIS}^* = (\bullet) 1 \times 10^{-7}$ M, $r = 0,9828$ y $(\bullet) 1 \times 10^{-6}$ M, $r = 0,9975$.

La frecuencia crítica máxima decrece a medida que c_{FIS}^* aumenta (Tabla 3), como se espera teóricamente para una cupla redox superficial con interacciones atractivas entre las moléculas adsorbidas.^{154,155}

Tabla 3. Dependencia del máximo de frecuencia con la concentración de FIS. $\Delta E_{oc} = 0,025$ V; $\Delta E_e = 0,005$ V; $t_{ac} = 30$ min.

c_{FIS}^* / μ M	θ	f_{max} / s^{-1}	$k_{s,ap}$ / s^{-1}
0,10	0,26	38	34
0,50	0,50	34	30
0,75	0,64	31	28
1,00	0,87	26	23

A partir del máximo cuasi-reversible se obtuvo el valor promedio de $\overline{f_{max}} = (32 \pm 5)$ Hz. Por otro lado, los valores de $k_{s,ap}$ se calcularon con la ec. 43. Para ello, se obtuvo $\kappa_{max} = 0,88$ a partir de la Tabla 2 en la Ref. 155, considerando $n\Delta E_{oc} = 0,050$ V y $(1-\alpha) = 0,49$, determinado mediante el desdoblamiento del pico

voltamperométrico neto, como se describió en la sección anterior. El error en la estimación de $k_{s,ap}$ usando κ_{max} es cercano al 10 %.¹⁵⁵

Un gráfico de $\ln k_{s,ap}$ vs θ fue lineal en el intervalo $0,26 < \theta < 0,87$, con $r = 0,9892$. De la ordenada al origen y la pendiente de este gráfico se obtuvieron valores de $k_s = 41 \text{ s}^{-1}$ y $g' = (0,31 \pm 0,06)$. El valor de g' está de acuerdo con el encontrado previamente a partir del ajuste de la isoterma de adsorción de Frumkin ($g' = 0,31$).

El valor de k_s calculado es aproximadamente 2,5 veces mayor que el previamente informado por Golabi y col.;¹⁰⁷ probablemente la diferencia se deba al medio de reacción empleado en cada caso.

4.2.2. Comportamiento electroquímico de fisetina sobre un electrodo de Au sin modificar

Una vez realizados los estudios del comportamiento electroquímico de FIS sobre electrodos de CV, se procedió a su estudio sobre electrodos de Au ya que sobre esta superficie es posible obtener las MAE.

La Figura 40 muestra las respuestas obtenidas sobre un electrodo de Au desnudo. Se presentan tres ondas de oxidación, siendo la primera la descarga principal. Como puede observarse, la señal electroquímica sobre esta superficie es similar a la encontrada sobre CV (Figura 25). Estas respuestas voltamperométricas ponen de manifiesto, también para esta superficie, un mecanismo de reacción electroquímico complejo.

Por otro lado, en la Figura 40 se observa que la señal no logra estabilizarse con los barridos sucesivos, presentándose, además de una disminución en la intensidad, la pérdida en la definición de la respuesta voltamperométrica.

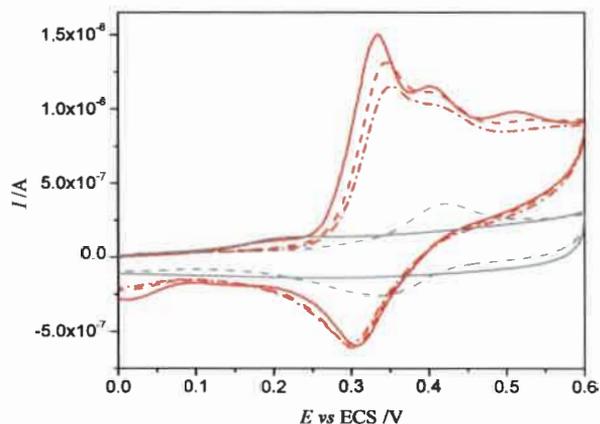


Figura 40. Voltamperogramas cíclicos consecutivos de FIS y en solución de blanco registrados antes (línea gris continua) y después (línea gris discontinua) de los barridos en la solución de FIS. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Se encontró que sobre el electrodo de Au también se produce la adsorción de FIS, revelándose así un comportamiento semejante al observado en el estudio de la oxidación electroquímica sobre electrodos de CV. La adsorción sobre el electrodo de Au se evidenció mediante la transferencia de éste a una solución de blanco (línea gris discontinua en la Figura 40), luego de haber registrado voltamperogramas cíclicos en la solución de FIS. No es posible remover totalmente lo adsorbido mediante barridos sucesivos en la solución de blanco, por lo que fue necesario pulir y activar el electrodo entre las medidas. Este hecho estaría poniendo de manifiesto la existencia de una adsorción fuerte sobre la superficie del electrodo. Otro experimento realizado consistió en mantener el electrodo en la solución de FIS durante un determinado tiempo, registrándose luego voltamperogramas cíclicos en la misma. En éstos, se observa que la intensidad del segundo pico aumenta poniendo de manifiesto su naturaleza adsortiva (resultados no mostrados).

Cabe aclarar que el potencial máximo al cual se puede llegar con el electrodo de Au es de aproximadamente 0,700 V, ya que a partir de este valor comienza a observarse la descarga correspondiente a la formación de los óxidos de Au.

Sobre electrodos de Au desnudos no fue posible obtener respuestas reproducibles, lo que impidió que se llevaran a cabo los estudios para caracterizar el proceso de adsorción de FIS como se hizo en el caso de CV.

4.3. CONCLUSIONES

En la superficie de carbono vítreo, fisetina muestra un control mixto, difusional y adsorptivo. Además, se demostró que tanto fisetina como el producto de reacción del primer pico de oxidación, se adsorben fuertemente sobre dicha superficie. La isoterma de adsorción de Frumkin es la que mejor describe la interacción específica de fisetina con los electrodos de carbono vítreo a pH 4. Se realizó una caracterización completa de cupla redox superficial de fisetina mediante VOC, combinando los métodos del “máximo cuasi-reversible” y del “desdoblamiento del pico neto”. Se determinaron valores de E_f^0 , $(1-\alpha)$ y k_s .

Por otro lado, la respuesta electroquímica de fisetina sobre electrodos de Au desnudo presentó un comportamiento semejante al observado sobre carbono vítreo. Si bien fisetina mostró actividad superficial sobre ambas superficies, en el electrodo de Au desnudo resultó complicado obtener respuestas reproducibles.

Capítulo 5

Estudio del comportamiento electroquímico de fisetina sobre electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas

Tal como se ha mencionado en la introducción, la modificación de la superficie del electrodo puede mejorar notablemente la respuesta electroquímica de un analito. Por ello, se llevó a cabo el estudio del comportamiento electroquímico de FIS sobre electrodos modificados con MAE de diferentes tioles, los cuales se encuentran tabulados en la sección 3.1.4. Se seleccionaron 11 tioles con diferentes características estructurales que incluyen grupos nitrogenados y oxigenados, tales como aminos primarios o terciarios, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ y $-\text{SO}_3^-$ como grupos funcionales terminales, tanto de cadenas alifáticas como de anillos aromáticos.

Las condiciones comunes bajo las cuales se realizaron los experimentos con cada tiol fueron: $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M, $c_{tiol} = 5$ mM y $t_{mod} = 60$ min, a excepción del DDT para el cual el t_{mod} fue de 10 min.

En este capítulo se muestran los estudios del comportamiento electroquímico de FIS sobre electrodos de Au modificados con MAE de diferentes tioles.

5.1. 1-DODECANOTIOL

La Figura 41 muestra las respuestas obtenidas sobre un electrodo de Au modificado con DDT. En un primer barrido se observan dos picos de oxidación a $E_{p,a} = 0,455$ y $0,645$ V y se insinúa también un pico de reducción, con un $E_{p,c} = 0,178$ V, cuando se invierte la dirección del barrido de potencial. La respuesta fue disminuyendo considerablemente con los barridos sucesivos, lo que indicaría la pasivación de la superficie del electrodo.

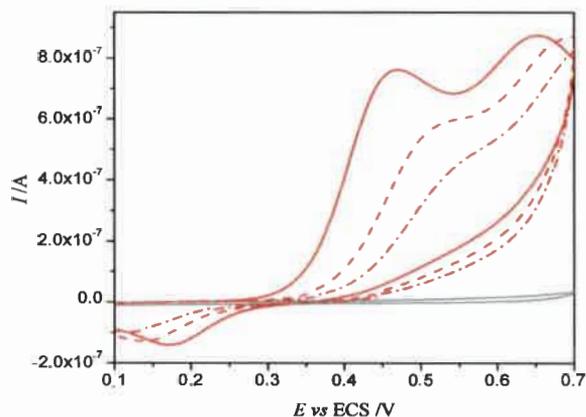


Figura 41. Voltamperogramas cíclicos consecutivos de FIS sobre el electrodo de Au modificado con DDT y del blanco correspondiente. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. $t_{mod} = 10 min$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Comparando esta respuesta con la correspondiente al Au no modificado, podemos concluir que con esta monocapa no se logran mejoras en la señal voltamperométrica de FIS. La MAE está actuando como una barrera a la transferencia de carga y no evita la pasivación de la superficie del electrodo.

El mismo comportamiento se observó cuando la inversión de potencial se realizó a 0,550 V (Figura 42).

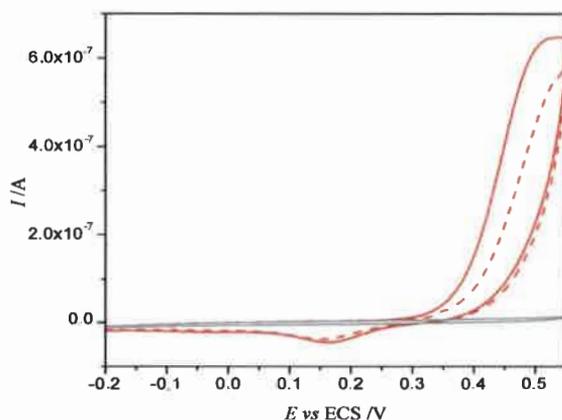


Figura 42. Voltamperogramas cíclicos consecutivos de FIS sobre el electrodo de Au modificado con DDT y del blanco correspondiente. $c_{FIS}^* = 1,85 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. $t_{mod} = 10 min$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

5.2. BENCENOTIOL

En la Figura 43 se muestran las respuestas obtenidas para FIS sobre el electrodo de Au modificado con BT. Como puede observarse, se obtiene una respuesta característica de aquellos procesos que son inhibidos por la presencia de la monocapa. Se observa también que la respuesta decae con los barridos consecutivos.

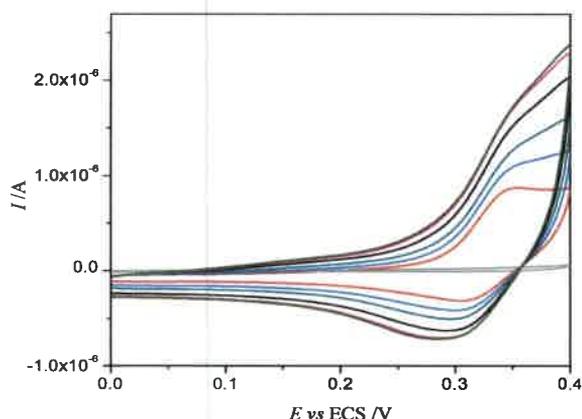


Figura 43. Voltamperogramas en FIS consecutivos sobre el electrodo de Au modificado con BT y del blanco correspondiente. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

5.3. 6-MERCAPTO-1-HEXANOL

En la Figura 44 se muestran voltamperogramas cíclicos registrados en la solución de FIS sobre electrodos de Au modificados con 6-M-1-H y del blanco correspondiente. En el voltamperograma cíclico de FIS se observan dos picos de oxidación poco definidos.

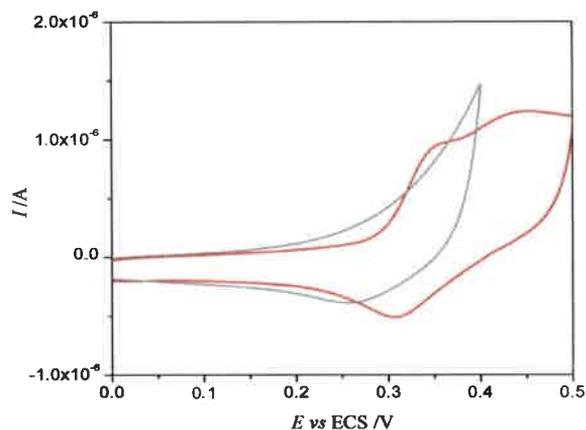


Figura 44. Voltamperogramas cíclicos de FIS sobre el electrodo de Au modificado con 6-M-1-H (línea roja). $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

5.4. 4-MERCAPTOFENOL

En la Figura 45 se muestran voltamperogramas cíclicos obtenidos con una MAE de 4-MF. Se observa un pico de oxidación alrededor de 0,375 V y su pico de reducción complementario cuando se invierte la dirección del barrido de potencial. La señal se estabiliza en el tercer ciclo. Cuando se llevó a cabo el estudio con v , se encontró que la dependencia de $I_{p,a}$ resultó lineal tanto con v como con $v^{1/2}$, indicando la existencia de un control mixto para la reacción redox: difusional y adsorbtivo. Se confirma la presencia de especies adsorbidas cuando se registró un voltamperograma cíclico después de transferir el electrodo a una solución de blanco. La respuesta obtenida se muestra también en la Figura 45 (línea gris discontinua). La descarga que se observa en la solución de blanco presenta $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ similares a los de los voltamperogramas registrados en la solución de FIS.

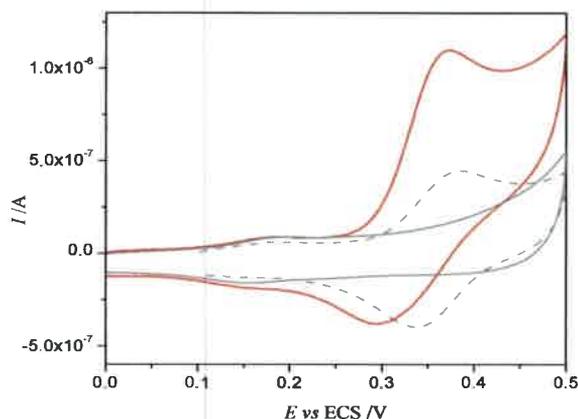


Figura 45. Voltamperogramas cíclicos registrados en FIS sobre el electrodo de Au modificado con 4-MF (línea roja continua) y en solución de blanco antes (línea gris continua) y después (línea gris discontinua) de registrar los voltamperogramas en la solución de FIS. $c_{FIS}^* = 1,89 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: DMSO al 15 % + 85 % solución reguladora de pH 4.

En la Figura 46 se muestra que la descarga también se observa si, en lugar de realizar barridos en la solución de FIS, se deja el electrodo inmerso en la misma a circuito abierto durante un tiempo dado. Este hecho corrobora que FIS se adsorbe sobre la superficie modificada.

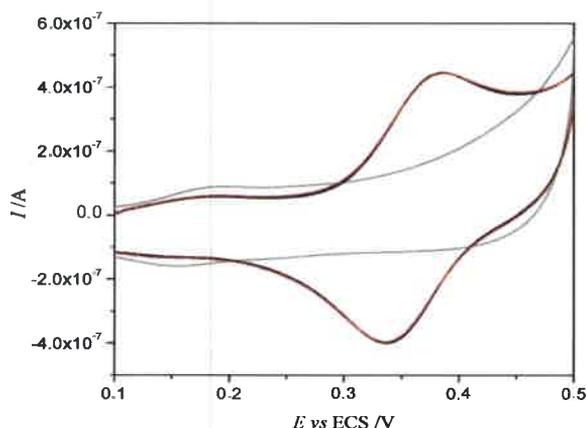


Figura 46. Voltamperogramas registrados en solución de blanco sobre el electrodo de Au modificado con 4-MF antes (-) y después (-) de sumergir el electrodo en la solución de FIS, siendo (-) un barrido consecutivo. $c_{FIS}^* = 1,89 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

La Figura 47 muestra barridos registrados en la solución del blanco a diferentes potenciales de inversión. En primer lugar, la figura muestra la estabilidad de la MAE, que presenta una ventana de potencial hasta 0,600 V aproximadamente. Por otro lado, puede observarse también que, con barridos consecutivos en solución del blanco, no se manifiestan modificaciones en la señal correspondiente a la especie adsorbida sobre la superficie del electrodo modificada.

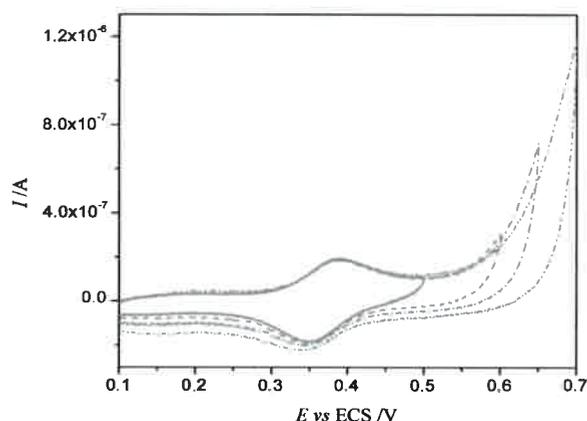


Figura 47. Voltamperogramas cíclicos consecutivos registrados sobre el electrodo de Au modificado con 4-MF en solución del blanco a distintos intervalos de potencial. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Estos resultados muestran que la modificación del electrodo con 4-MF favorece la adsorción de FIS y ayuda a aumentar la reproducibilidad de las medidas, dado que protege al electrodo de la contaminación con productos de la reacción.

5.4.1. Caracterización de la cupla redox adsorbida

Como se mencionó anteriormente, FIS se adsorbe sobre electrodos modificados con 4-MF por lo cual se llevó a cabo la caracterización de la cupla redox superficial. Para ello, en primer lugar, se analizó la dependencia de I_p con la velocidad de barrido. La Figura 48 muestra las respuestas lineales de $I_{p,a}$ y $I_{p,c}$ en función de v , con $r = 0,9849$ y $0,9853$, respectivamente, obtenidas a partir de voltamperogramas cíclicos registrados

en una solución de $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-8}$ M. Esta concentración es lo suficientemente baja como para sólo considerar la contribución adsortiva del sistema.

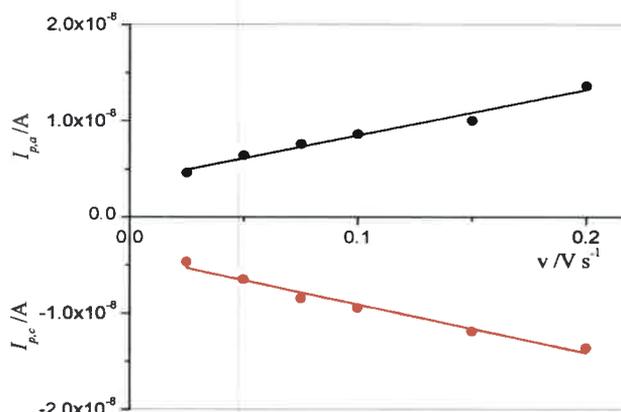


Figura 48. Dependencia de $I_{p,a}$ y $I_{p,c}$ con v . $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-8}$ M.

Por otro lado, siguiendo el procedimiento empleado para la superficie de electrodos de CV, a partir de voltamperogramas cíclicos registrados en un intervalo de velocidades desde 0,025 a 0,200 $V s^{-1}$ y, considerando el área electroquímica del electrodo (sección 3.2.2.1.2.), se determinaron los valores promedio $\Gamma_{FIS} = (1,6 \pm 0,2) \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ y $\Gamma_{QII} = (1,9 \pm 0,2) \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ para $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-6}$ M. Estos resultados demuestran que tanto FIS como su quinona se adsorben sobre la superficie del electrodo de Au modificado con 4-MF, como en el caso de sobre CV.¹⁴⁵ De igual manera, la adsorción específica sobre la MAE de 4-MF se explicaría por la interacción de FIS con los grupos fenólicos que se encuentran sobre la superficie modificada. Los valores de Γ obtenidos indicarían un cubrimiento menor al de una monocapa.⁴³

Dada la naturaleza cuasi-reversible de la adsorción de FIS sobre esta superficie es posible, mediante VOC, caracterizar la cupla redox adsorbida determinando parámetros cinéticos y termodinámicos a partir de estudios de “desdoblamiento del pico neto”^{145,150} y de “máximo cuasi-reversible”.^{145-153,155}

El experimento de “desdoblamiento del pico neto” se llevó a cabo variando la amplitud a una frecuencia constante, 10 y 20 Hz. La Figura 49 muestra los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos a $f = 10$ Hz, los cuales son iguales a los obtenidos para $f = 20$ Hz.

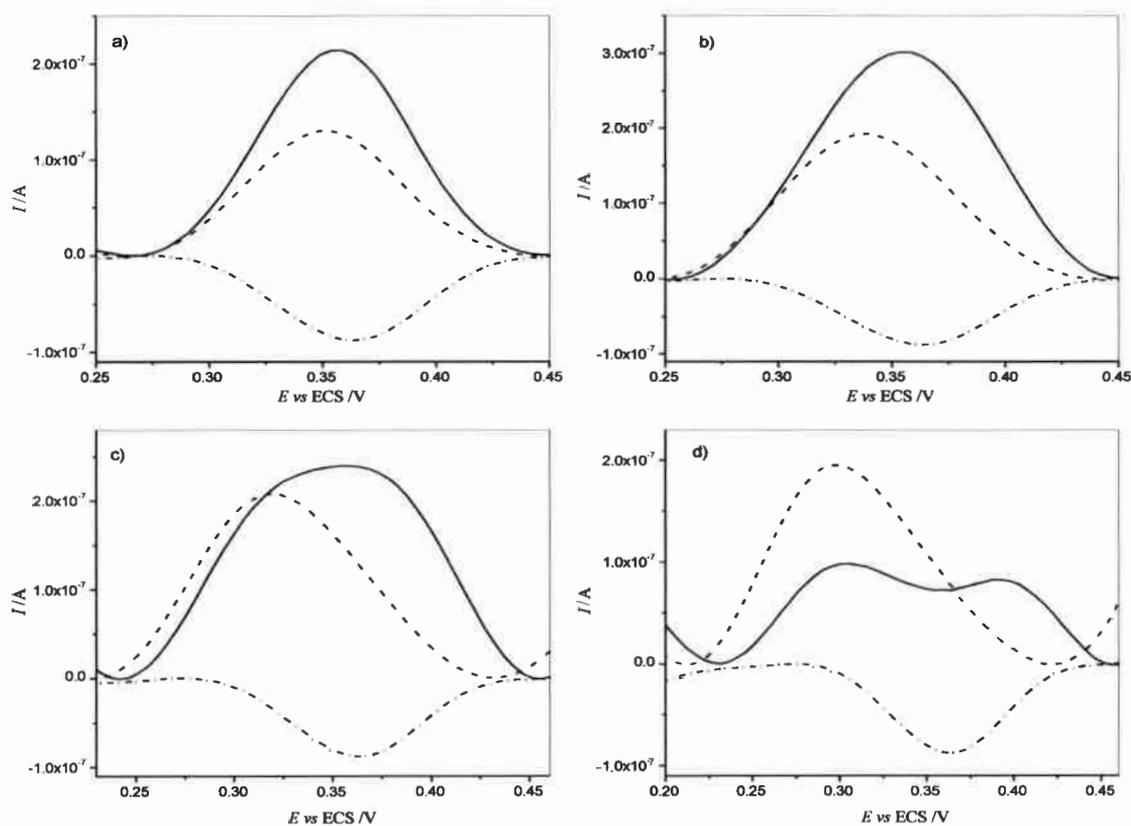


Figura 49. Voltamperogramas de onda cuadrada a diferentes amplitudes de la onda, obtenidos sobre un electrodo de Au modificado con 4-MF. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-6}$ M. $f = 10$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V. $t_{ac} = 900$ s. $\Delta E_{oc} =$ a) 0,025 V; b) 0,050 V; c) 0,075 V y d) 0,100 V.

A ΔE_{oc} pequeños se observa un pico neto simple, que comienza a desdoblarse a medida que se aumenta la amplitud, presentándose casi totalmente desdoblado a $\Delta E_{oc} = 0,100$ V para $f = 10$ Hz.

El E_f^0 puede determinarse como la semisuma de los E_p de las respuestas directa e inversa, mientras que para la determinación de $(1-\alpha)$ se emplea la ec. 39.

En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos para las dos frecuencias estudiadas.

Tabla 4. Potenciales de pico anódico ($E_{p,a}$) y catódico ($E_{p,c}$), relación entre las corrientes de pico anódica y catódica ($I_{p,a}/I_{p,c}$) para los picos de VOC desdoblados, y valores de $(1-\alpha)$ para la cupla redox adsorbida sobre electrodos de Au modificados con 4-MF.

f/Hz	ΔE_{oc} /V	$E_{p,a}$ /V	$E_{p,c}$ /V	$I_{p,a}/I_{p,c}$	$(1-\alpha)$
10	0,025	0,349	0,364	1,5	0,39
	0,050	0,339	0,373	1,2	0,44
	0,075	0,320	0,388	1,2	0,45
	0,100	0,300	0,403	1,1	0,46
20	0,025	0,354	0,364	1,6	0,35
	0,050	0,339	0,373	1,25	0,44
	0,075	0,325	0,383	1,1	0,46
	0,100	0,305	0,398	1,1	0,46

A partir de estos resultados se obtuvo un valor promedio de $\overline{E_f^0} = (0,355 \pm 0,003)$ V y $(1-\alpha) = (0,43 \pm 0,04)$, el que está de acuerdo con el obtenido sobre electrodos de CV (sección 4.2.1.2.3.1.).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, si la adsorción del reactivo y del producto de una cupla redox superficial cuasi-reversible es igualmente fuerte, un gráfico de $I_{p,n}/f$ vs f , obtenido a partir de los voltamperogramas de onda cuadrada variando la frecuencia, muestra un máximo a una frecuencia que es proporcional a la constante de velocidad formal k_s de la reacción redox,¹⁵¹⁻¹⁵³ con lo que es posible obtener el valor de k_s . En la Figura 50 se presenta el gráfico de $I_{p,n}/f$ en función de f para la cupla redox adsorbida sobre la superficie modificada con 4-MF. Como puede observarse, en este caso no fue posible determinar el máximo cuasi-reversible de la cupla redox, el que se encontraría a frecuencias menores a la mínima frecuencia que se ha podido medir experimentalmente (8 Hz). Este resultado implica que la velocidad de

la transferencia de carga de la cupla redox superficial sería menor que la encontrada sobre la superficie del electrodo de CV.

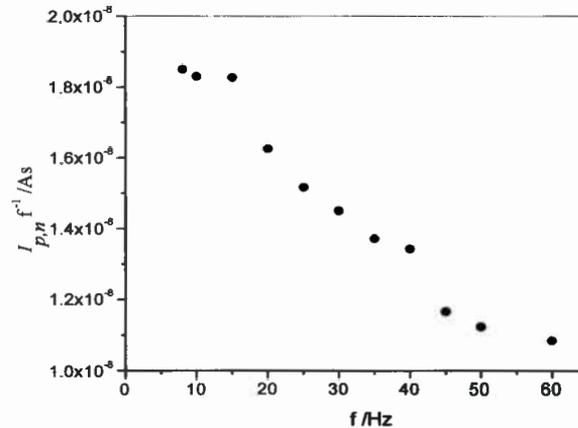


Figura 50. Dependencia entre $I_{p,n}/f$ y f obtenida de FIS sobre el electrodo de Au modificado con 4-MF. $t_{ac} = 900$ s. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-6}$ M. $\Delta E_{oc} = 0,025$ V, $\Delta E_e = 0,005$ V.

5.5. ÁCIDO 4-MERCAPTOBENZOICO

La respuesta encontrada para FIS sobre el electrodo de Au modificado con 4-MB se presenta en la Figura 51. A su vez, se muestra también el blanco tomado luego de registrar voltamperogramas en FIS, donde se observa una variación en el blanco respecto del blanco original, debido a la adsorción de alguna especie. La estabilización de la respuesta se logró después de realizar aproximadamente 10 voltamperogramas consecutivos. No se observan otros picos de oxidación cuando el intervalo de potencial se extiende hasta 0,700 V.

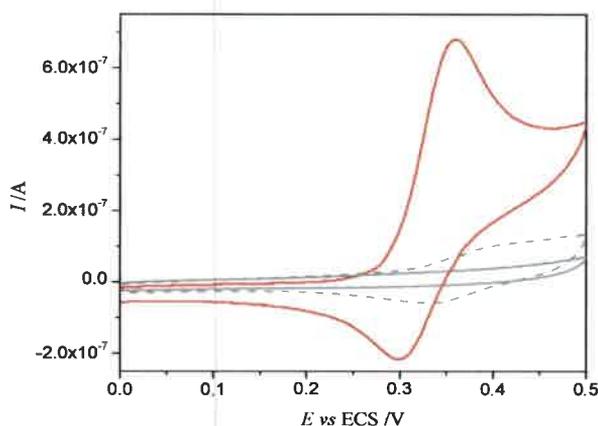


Figura 51. Voltamperogramas cíclicos registrados en FIS sobre el electrodo de Au modificado con 4-MB (línea roja continua) y en solución del blanco antes (línea gris continua) y después (línea gris discontinua) de realizar los barridos en la solución de FIS. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

La Figura 52 muestra el estudio con v realizado para la respuesta encontrada. Los voltamperogramas cíclicos se obtuvieron restando el blanco correspondiente, registrado con posterioridad, para eliminar la componente adsorptiva. Si bien se ha restado el blanco para eliminar la adsorción, la gráfica de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$ presenta dispersión y un coeficiente de correlación lineal bajo, $r = 0,9112$.

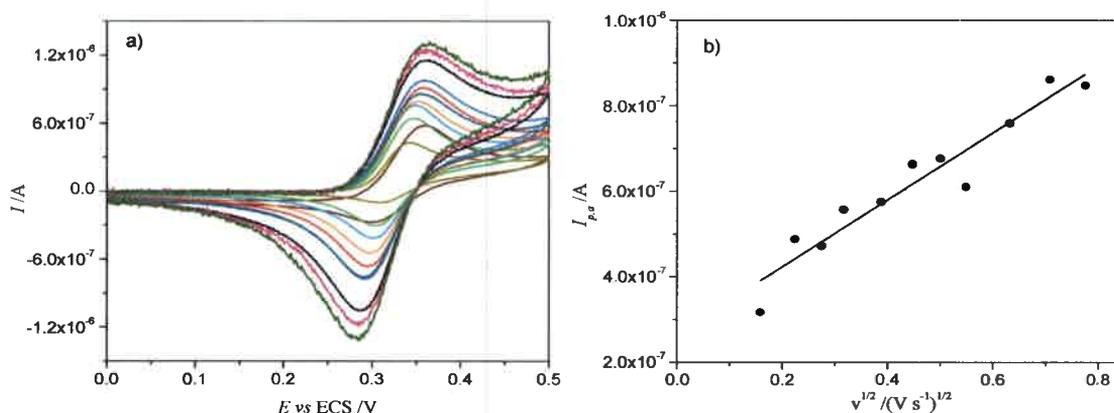


Figura 52. a) Voltamperogramas cíclicos de FIS a distintas v , corregidos por sus respectivos blancos, registrados sobre el electrodo de Au modificado con 4-MB. b) Dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$. $r = 0,9112$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,025$ a $0,600 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Estos resultados muestran que, si bien la señal encontrada sobre esta superficie es muy buena, tiene lugar un proceso de adsorción que dificulta obtener reproducibilidad en la respuesta.

5.6. ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÓNICO

La Figura 53 muestra la respuesta de FIS sobre el electrodo de Au modificado con 3-MP. Se observa un pico de oxidación y el pico de reducción complementario durante el barrido inverso. La respuesta se estabiliza a partir del tercer ciclo y muestra un comportamiento cuasi-reversible, con un $\Delta E_p = 0,029$ V.

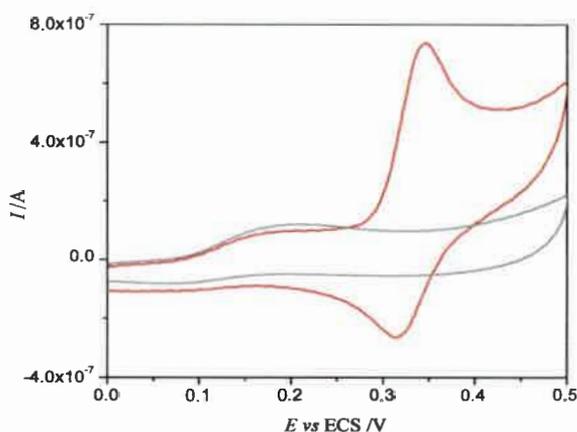


Figura 53. Voltamperogramas cíclicos de FIS (-) y su correspondiente blanco (-), obtenidos sobre el electrodo de Au modificado con 3-MP. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $\nu = 0,050$ V s⁻¹. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Al registrar los voltamperogramas cíclicos en la solución del blanco, luego de hacerlo en la solución de FIS, se observó que los mismos son prácticamente iguales a los obtenidos al comienzo del experimento. Así, se realizaron estudios con la velocidad de barrido empleando el mismo electrodo modificado (Figura 54 a). En la Figura 54 b se observa que la dependencia de $I_{p,a}$ con $\nu^{1/2}$ es lineal, indicando que la reacción de electrodo se encuentra gobernada por difusión. No hay relación lineal de $I_{p,a}$ con ν .

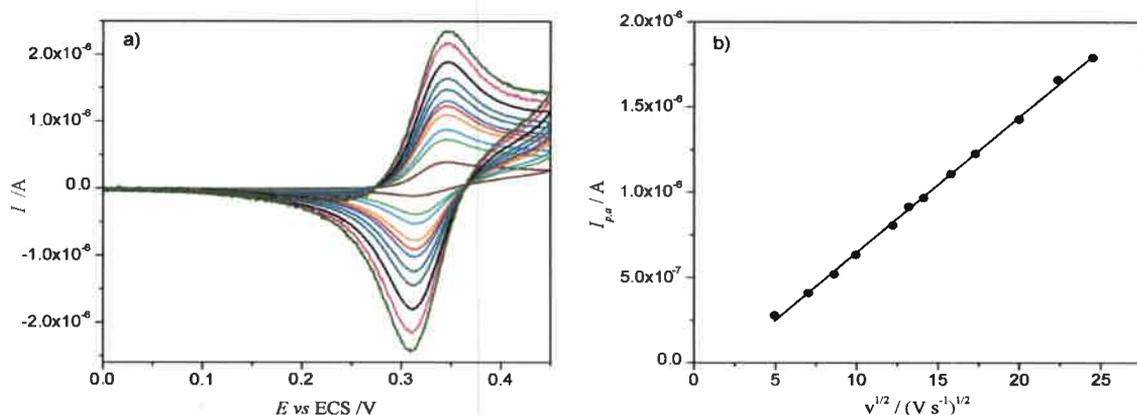


Figura 54. a) Voltamperogramas cíclicos de FIS a distintas velocidades de barrido y corregidos con sus respectivos blancos, registrados sobre el electrodo de Au modificado con 3-MP. b) Dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$, $r = 0,9986$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,025$ a $0,600$ $V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

También se realizaron experimentos de VOC a distintas frecuencias. En la Figura 55 se muestran los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos a distintas f y la dependencia de $I_{p,n}$ con $f^{1/2}$, la cual resultó lineal.

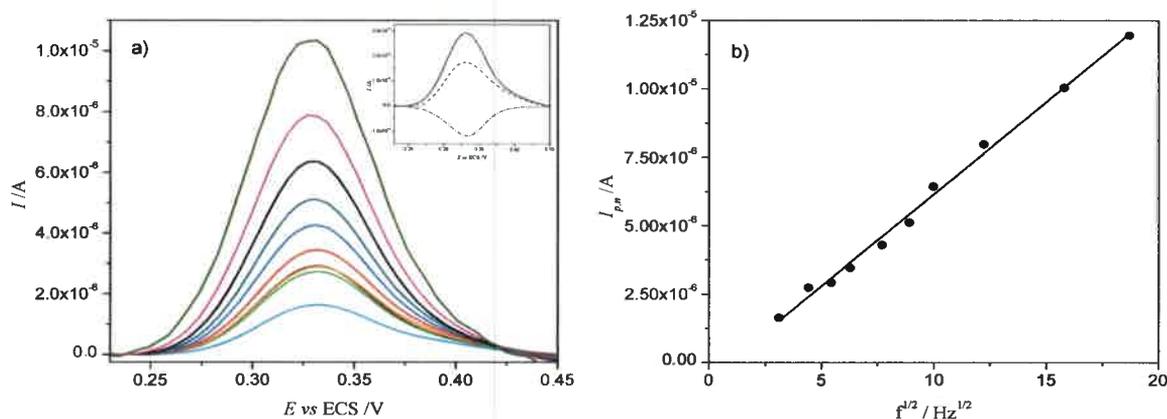


Figura 55. a) Voltamperogramas de onda cuadrada de FIS a distintas f obtenidos sobre el electrodo de Au modificado con 3-MP. En el inserto se muestran las corrientes neta, directa e inversa de un voltamperograma de onda cuadrada. $f = 20$ Hz. b) Dependencia de $I_{p,n}$ con $f^{1/2}$, $r = 0,9936$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Como puede observarse en el inserto de la Figura 55 a, la respuesta tiene carácter cuasi-reversible. Un criterio de diagnóstico comúnmente aplicado en VOC es el ancho de pico a la altura media ($W_{1/2}$) el cual, para procesos cuasi-reversibles controlados por difusión, se define según:¹⁵⁷

$$nW_{1/2} = 0,126 V \quad (44)$$

Los datos obtenidos muestran un $W_{1/2}$ de 0,068 V. De acuerdo este valor de $W_{1/2}$ y al $\Delta E_p = 0,029$ V hallado por VC se corrobora que la respuesta observada sobre el electrodo modificado con 3-MP corresponde a la descarga del grupo catecol del anillo B de FIS (Figura 6 a) que involucra $2e^-$.

Cuando se comparan voltamperogramas cíclicos registrados en la solución de FIS en diferentes instancias del experimento, se encuentra que, si bien el pico de interés se mantiene en intensidad, aparece un hombro después del mismo (Figura 56).

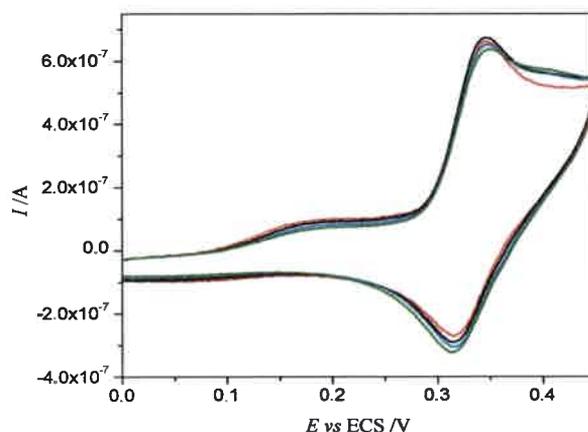


Figura 56. Voltamperogramas cíclicos de FIS obtenidos sobre el electrodo de Au modificado con 3-MP: primer registra (-), después de registrar los voltamperogramas cíclicos en la solución del blanco a diferentes v (-), después de registrar los voltamperogramas cíclicos en la solución de FIS a diferentes v (-) y después de registrar los voltamperogramas de onda cuadrada en la solución de FIS a diferentes f (-). $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s^{-1} . Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Por otra parte, en la Figura 57 se comparan los voltamperogramas cíclicos registrados en la solución del blanco al comienzo y al final de los experimentos, donde se observa que hay adsorción de alguna especie sobre la superficie del electrodo modificado. La Figura 57 muestra, además, barridos realizados en soluciones del blanco a diferentes intervalos de potencial, con el fin de verificar el intervalo de estabilidad de la monocapa. Como puede observarse, hasta 0,600 V es posible trabajar sin que la MAE se destruya.

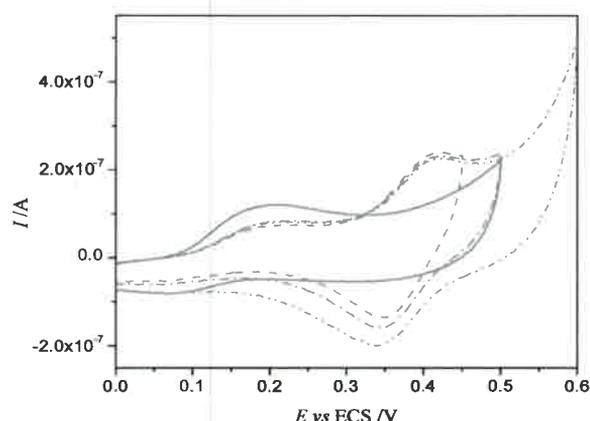


Figura 57. Voltamperogramas cíclicos registrados en la solución del blanco con electrodos de Au modificados con 3-MP en distintas ventanas de potencial. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

5.7. ÁCIDO 2-MERCAPTOETANOSULFÓNICO

La respuesta de FIS sobre este electrodo modificado se muestra en la Figura 58. Se observa un pico de oxidación y el correspondiente pico de reducción complementario cuando se invierte la dirección del barrido de potencial. La respuesta se estabiliza a partir del tercer ciclo, sin embargo no hay una disminución importante de la señal de los picos en los primeros barridos.

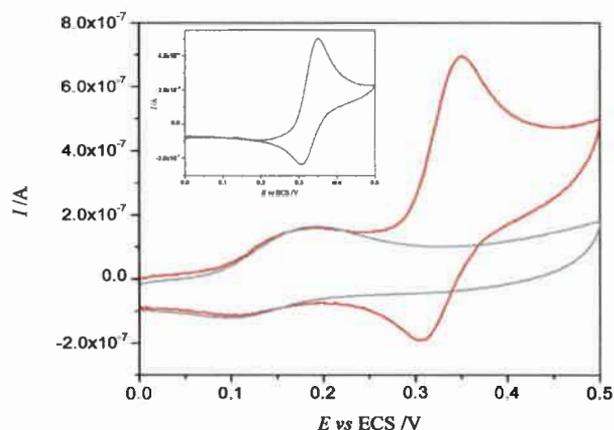


Figura 58. Voltamperogramas cíclicos registrados en FIS (-) y en la solución del blanco (-) sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4. En el inserto se muestra el voltamperograma cíclico de FIS corregido por el blanco.

Después de registrar los voltamperogramas cíclicos en la solución de FIS, se llevó el electrodo a la solución del blanco y se realizaron barridos en el mismo. En este caso, no se observaron cambios de los blancos respecto de aquellos registrados al comienzo. El comportamiento descrito está de acuerdo con un sistema que sólo presenta un control difusional. En función de estos resultados, se llevaron a cabo estudios de VC, variando la velocidad de barrido del potencial y de VOC, variando la frecuencia.

En la Figura 59 se muestra el comportamiento del sistema a las diferentes velocidades de barrido. Se encontró que la dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$ fue lineal ($r = 0,9932$) mientras que $I_{p,a}$ vs v no lo fue (Figura 59 c). En cuanto al valor de los ΔE_p obtenidos para las v estudiadas, se encontró que tiene un valor promedio de 0,035 V, lo que corrobora que el número de electrones intercambiados es 2.⁴⁵

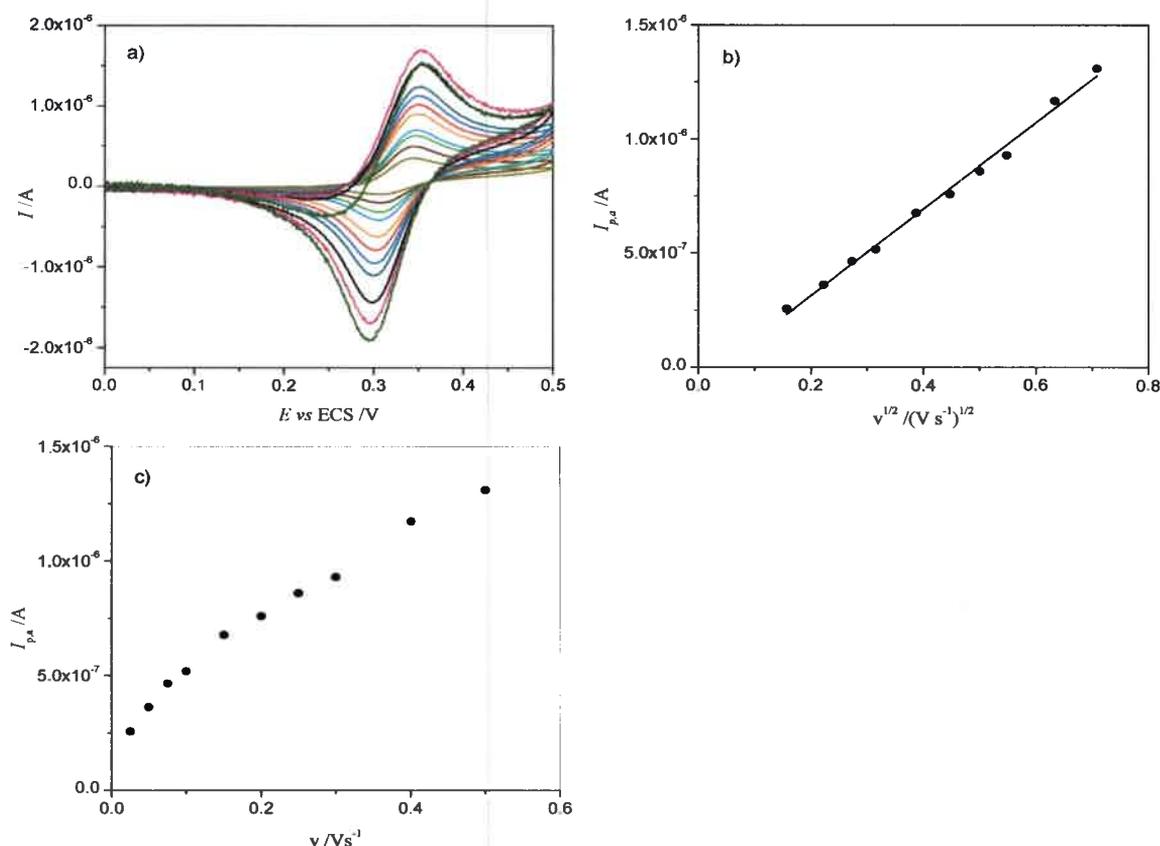


Figura 59. a) Voltamperogramas cíclicos de FIS a distintas velocidades y corregidos con sus respectivos blancos, registrados sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. b) Dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$, $r = 0,9932$. c) Dependencia de $I_{p,a}$ con v . $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,025$ a $0,600 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

La Figura 60 muestra un voltamperograma de onda cuadrada del sistema. En este caso, también se observa la reversibilidad de la señal y el $W_{1/2}$ tiene el valor de 0,068 V, indicando también que el número de electrones intercambiados es 2.¹⁵⁷

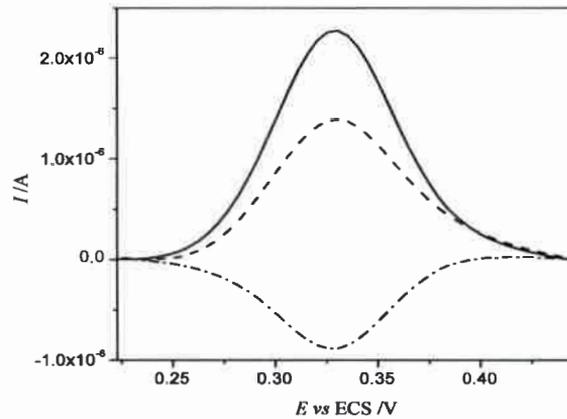


Figura 60. Voltamperograma de onda cuadrada de FIS registrado sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Por su parte, la Figura 61 muestra las respuestas obtenidas de experimentos de VOC registrados a diferentes frecuencias y la dependencia de $I_{p,n}$ con $f^{1/2}$.

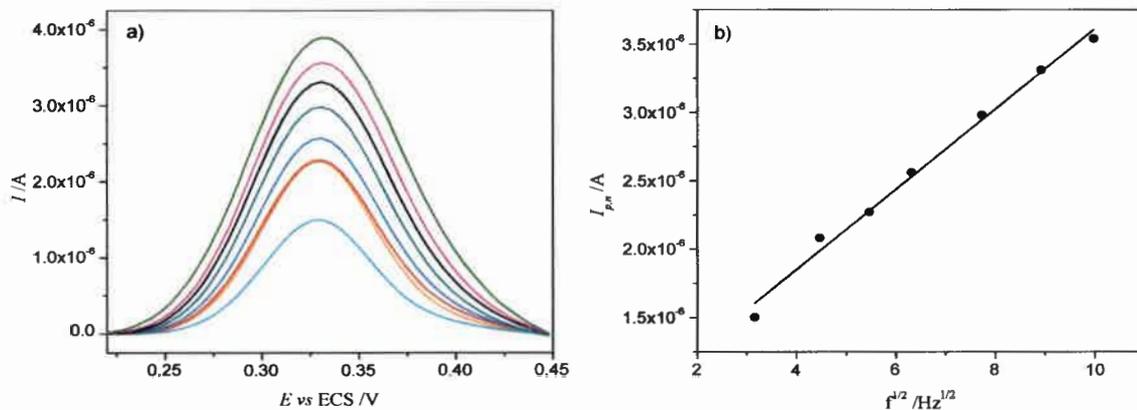


Figura 61. a) Voltamperogramas de onda cuadrada de FIS a distintas f , registrados sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. b) Dependencia de $I_{p,n}$ con $f^{1/2}$, $r = 0,9900$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $f = 10$ a 250 Hz. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Al comparar los voltamperogramas cíclicos registrados antes y después de los estudios de VC con la velocidad de barrido y de VOC con la frecuencia, se encuentra que la forma de la respuesta se mantiene, así como también la intensidad de la misma. Este es un aspecto sumamente importante, ya que se verifica que la respuesta no se ve afectada con el uso prolongado del electrodo modificado.

Por último, se realizan barridos en distintas ventanas de potencial en la solución del blanco, con el fin de determinar la ventana de potencial de la MAE (Figura 62). Se observa que hasta 0,600 V es posible utilizar el electrodo modificado sin inconvenientes.

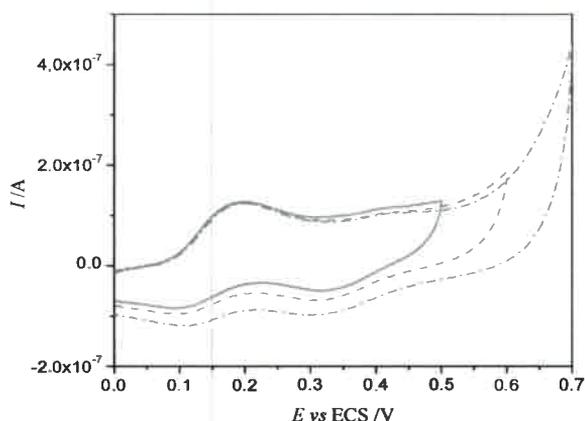


Figura 62. Voltamperogramas cíclicos en la solución del blanco registrados sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES en distintas ventanas de potencial. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

5.8. CISTEAMINA

En la Figura 63 se muestra la respuesta de FIS obtenida sobre el electrodo modificado con CA. En este caso puede observarse una mejora notable de la respuesta electroquímica comparada con la obtenida sobre el electrodo sin modificar. La respuesta muestra un comportamiento cuasi-reversible, con un $\Delta E_p = 0,033 \text{ V}$. Además, la intensidad de la señal disminuyó sólo levemente del primer al segundo barrido,

estabilizándose la respuesta en el tercer ciclo, lo que pone de manifiesto que esta monocapa evita la pasivación de la superficie del electrodo.

Posteriormente, utilizando el mismo electrodo modificado, se procedió a realizar un estudio con la velocidad de barrido.

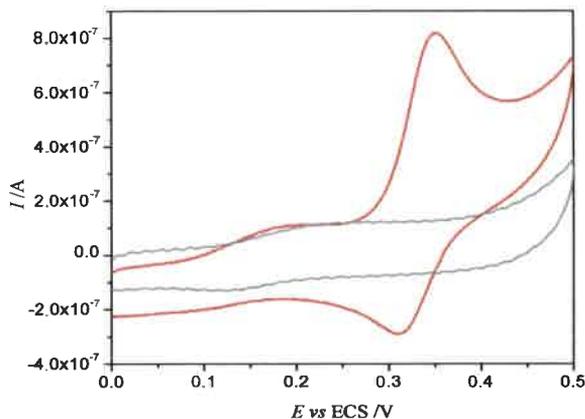


Figura 63. Voltamperogramas cíclicos de FIS (-) y del blanco correspondiente (-), registrados sobre el electrodo de Au modificado con CA. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

La Figura 64 muestra los voltamperogramas cíclicos de FIS a diferentes velocidades de barrido y la Figura 65, la dependencia de I_p con v y $v^{1/2}$. En ambos casos la relación que se observa es lineal, por lo que se infiere un control mixto en el proceso de electrodo: difusión y adsorción.

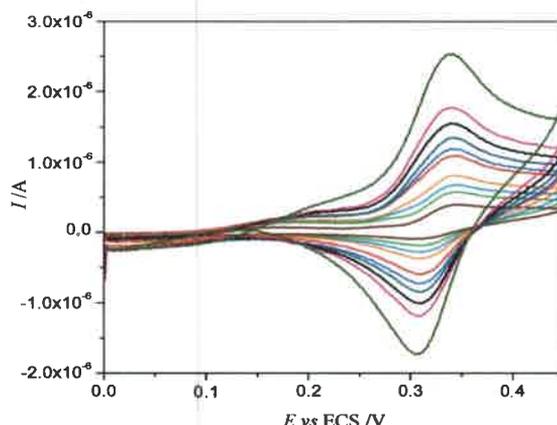


Figura 64. Voltamperogramas cíclicos de FIS a distintas v , corregidos con sus respectivos blancos, registrados sobre el electrodo de Au modificado con CA. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050$ a $0,500 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

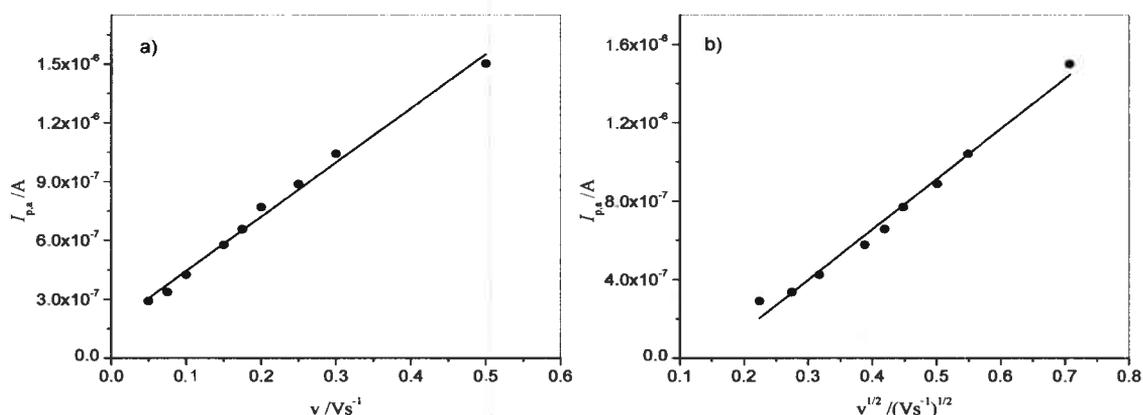


Figura 65. Dependencia de a) $I_{p,a}$ con v , $r = 0,9910$ y b) $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$, $r = 0,9843$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

La adsorción se verificó mediante el registro de un VC en la solución del blanco, con posterioridad al estudio con v en la solución de FIS, como se muestra en la Figura 66.

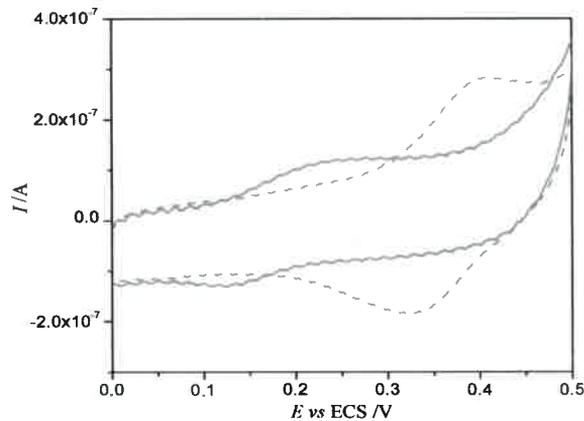


Figura 66. Voltamperogramas cíclicos en solución del blanco antes (línea gris continua) y después (línea gris discontinua) de los estudios con velocidad de barrido en la solución de FIS empleando el electrodo de Au modificado con CA. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

También se realizaron experimentos de VOC a distintas frecuencias. La Figura 67 muestra los voltamperogramas de onda cuadrada registrados y la dependencia lineal de $I_{p,n}$ con $f^{1/2}$. La dependencia de la $I_{p,n}$ con f tiene un coeficiente de correlación $r = 0,9712$. Los experimentos de VOC son más rápidos que los de VC, por lo que en los primeros la adsorción se manifiesta en menor medida, como puede notarse a partir de los coeficientes de correlación lineal obtenidos de los ajustes.

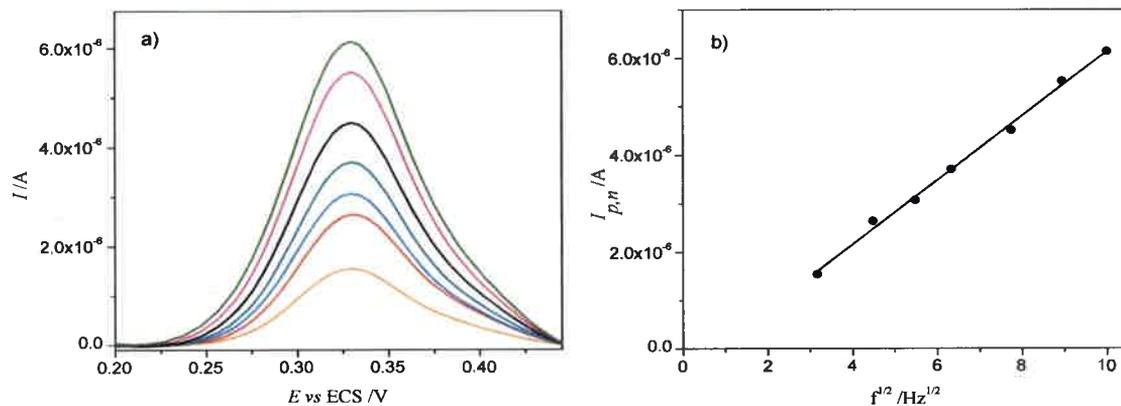


Figura 67. a) Voltamperogramas de onda cuadrada de FIS a distintas f , obtenidos con el electrodo de Au modificado con CA. b) Dependencia de $I_{p,n}$ con $f^{1/2}$, $r = 0,9954$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $f = 10$ a 250 Hz, $\Delta E_e = 0,005 V$, $\Delta E_{oc} = 0,025 V$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

En este caso, se encontraron valores de $\Delta E_p = 0,033$ V y $W_{1/2} = 0,063$ V, los cuales también muestran $n = 2$.^{43,157}

Por último, la Figura 68 muestra barridos realizados en soluciones del blanco. Como puede observarse, el intervalo de estabilidad de la monocapa es hasta 0,700 V, aproximadamente.

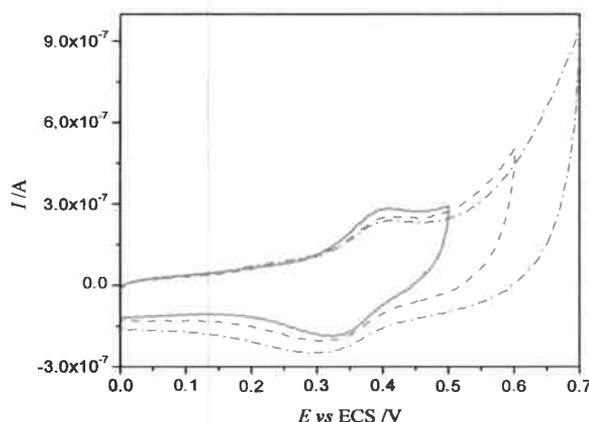


Figura 68. Voltamperogramas cíclicos en solución del blanco en distintas ventanas de potencial, registrados sobre el electrodo de Au modificado con CA. $v = 0,050$ V s⁻¹. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

5.9. 2-(DIETILAMINO)ETANOTIOL

En la Figura 69 se muestran las respuestas de FIS obtenidas sobre el electrodo modificado con 2-DAET. Se observa un comportamiento semejante al del electrodo de Au sin modificar, mostrando dos señales de oxidación, siendo la primera señal cuasi-reversible. La respuesta se modifica con los barridos sucesivos, estabilizándose aproximadamente a partir del octavo ciclo.

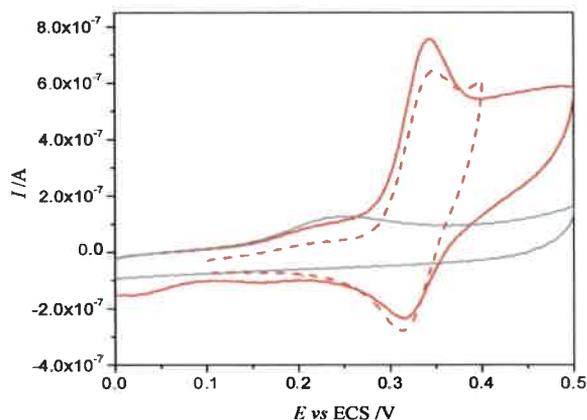


Figura 69. Voltamperogramas cíclicos de FIS en distintos intervalos de potencial y en solución del blanco, registrados sobre el electrodo de Au modificado con 2-DAET. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Posteriormente al registro de los voltamperogramas cíclicos en soluciones de FIS, se procedió a registrar los mismos en una solución de blanco (Figura 70). Como puede observarse, aparece una señal que indica la adsorción de alguna especie. Esto puede corroborarse en la Figura 71, donde se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados en la solución de FIS al comienzo (línea roja continua) y luego de varios barridos de potencial (línea roja discontinua).

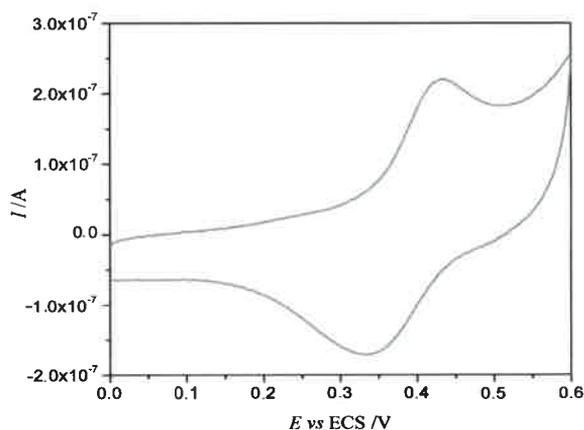


Figura 70. Voltamperogramas cíclicos registrados en la solución del blanco después de barridos en la solución de FIS sobre el electrodo de Au modificado con 2-DAET. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

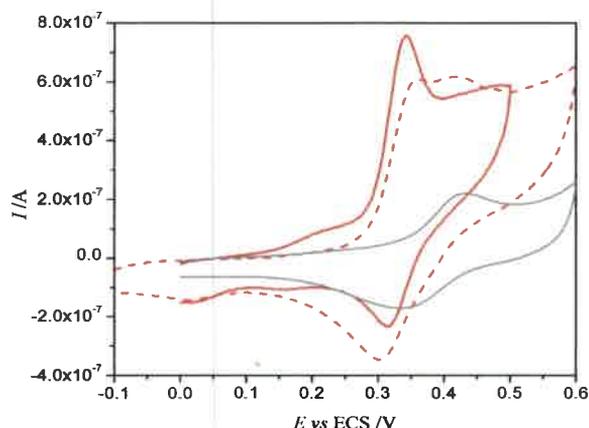


Figura 71. Voltamperogramas cíclicos en solución de FIS obtenidos sobre el electrodo de Au modificado con 2-DAET: primer registro (línea roja continua), registrado después de los estudios con v y f (línea roja discontinua). $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

No obstante, se realizó un estudio con v del primer pico, invirtiendo el barrido de potencial a 0,400 V. La Figura 72 muestra los voltamperogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido y la dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$. La linealidad de esta gráfica reveló que la reacción de electrodo de esta señal está controlada por difusión.⁴³ También se determinó un valor de $\Delta E_p = (0,029 \pm 0,005) V$ para todas las v estudiadas.

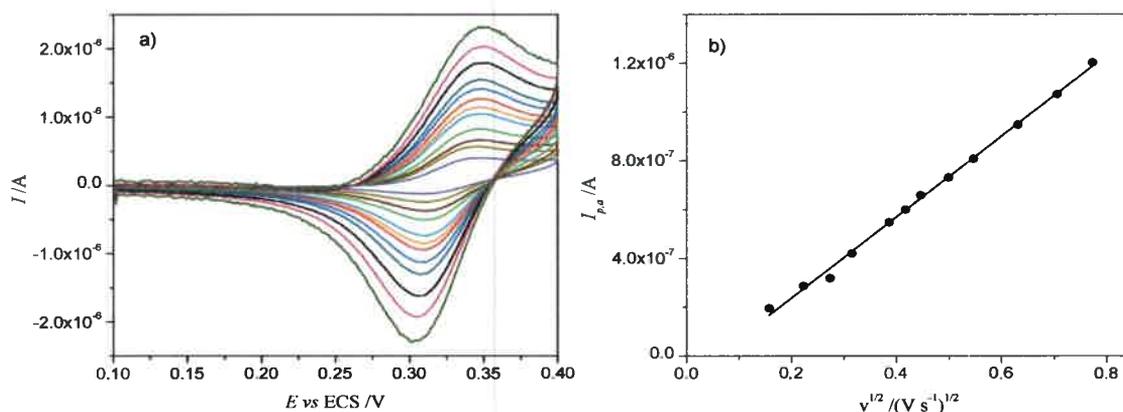


Figura 72. a) Voltamperogramas cíclicos en FIS a distintas velocidades, corregidos con sus respectivos blancos registrados sobre el electrodo de Au modificado con 2-DAET. b) Dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$, $r = 0,9970$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,025$ a $0,600 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

También se registraron voltamperogramas de onda cuadrada a distintas f sobre la primera señal. Como puede observarse, a partir de las I_d e I_i , la respuesta corresponde a un comportamiento cuasi-reversible (Figura 73).

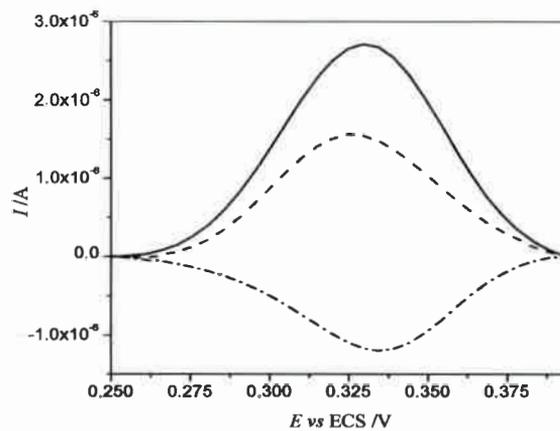


Figura 73. Voltamperograma de onda cuadrada registrado en la solución de FIS sobre el electrodo de Au modificado con 2-DAET. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Se obtuvo un valor para el $W_{1/2}$ de 0,063 V el cual, junto al valor de $\Delta \bar{E}_p = 0,029$ V, indica que la descarga electroquímica involucra $2e^-$.^{43,157} Se observó, además, una dependencia lineal entre $I_{p,n}$ y $f^{1/2}$, en el intervalo de f estudiado.¹⁵⁷

5.10. 4-MERCAPTOPIRIDINA

En la Figura 74 se muestran las respuestas de FIS sobre el electrodo modificado con 4-MP.

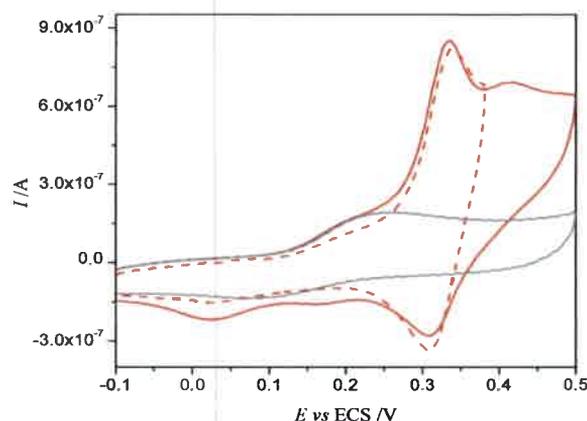


Figura 74. Voltamperogramas cíclicos registrados en la solución de FIS en distintos intervalos de potencial y en solución de blanco (-) sobre el electrodo de Au modificado con 4-MP. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Se observa que el comportamiento electroquímico de FIS sobre el electrodo modificado con este tiol es prácticamente igual al observado sobre el electrodo modificado con 2-DAET. Voltamperogramas cíclicos obtenidos en la solución de blanco también manifiestan una descarga correspondiente a la adsorción de alguna especie (Figura 75).

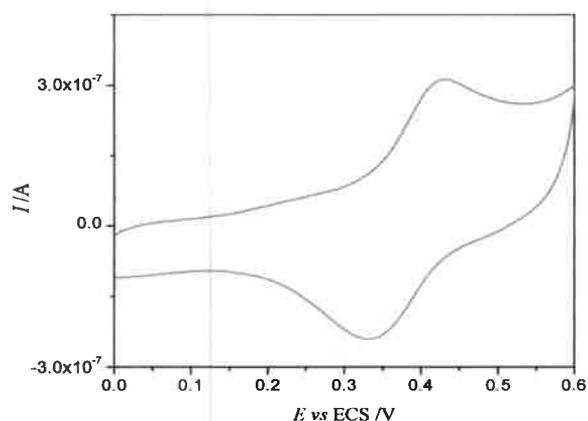


Figura 75. Voltamperograma cíclico registrado en la solución del blanco después de los barridos en la solución de FIS obtenido sobre el electrodo de Au modificado con 4-MP. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

En la Figura 76 a se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para el estudio con v sobre la primera señal, para lo cual se invirtió el barrido en 0,375 V. La Figura 76 b muestra la dependencia entre $I_{p,a}$ y $v^{1/2}$, a partir de la cual se puede inferir que la primera señal de oxidación de FIS está controlada, principalmente, por difusión. El $\Delta E_p = 0,027$ V también manifiesta que la descarga involucra $2e^-$.⁴³

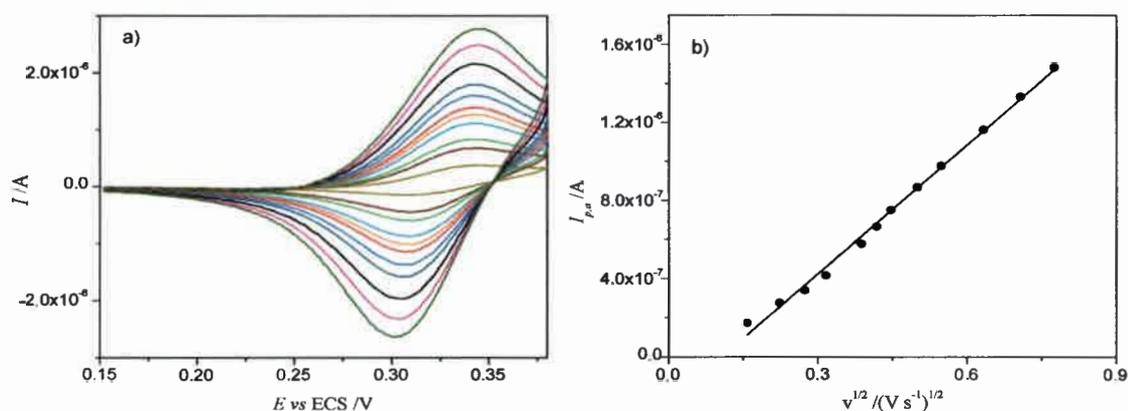


Figura 76. a) Voltamperogramas cíclicos de FIS a distintas velocidades, corregidos con sus respectivos blanco, obtenidos sobre el electrodo de Au modificado con 4-MP. b) Dependencia de $I_{p,a}$ con $v^{1/2}$, $r = 0,9950$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,025$ a $0,600$ $V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Además, se registró un voltamperograma de onda cuadrada el que, al igual que en los otros casos, muestra el comportamiento cuasi-reversible del primer pico voltamperométrico (Figura 77), con un $W_{1/2} = 0,063$ V, manifestando el intercambio de $2e^-$.¹⁵⁷

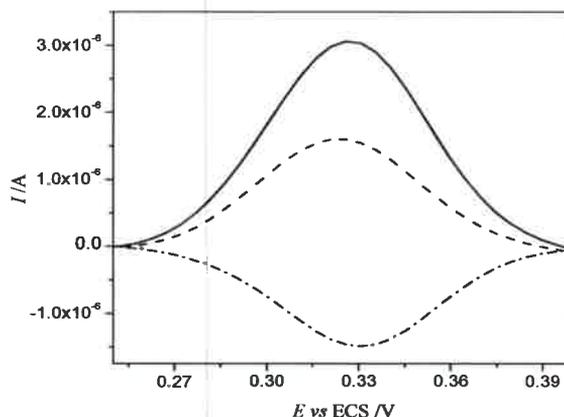


Figura 77. Voltamperograma de onda cuadrada registrado en la solución de FIS sobre el electrodo de Au modificado con 4-MP. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

5.11. 4-AMINOTIOFENOL

En la Figura 78 se muestra la respuesta de VC obtenida para FIS sobre el electrodo modificado con 4-ATF. Como se puede apreciar, después del primer pico de oxidación se presenta una onda poco definida. Debido a que esta onda se superpone a la primera descarga, no es posible invertir el potencial de manera tal de evitar la aparición de la misma, como en los casos mostrados anteriormente. Además, se observó que con los barridos consecutivos en la solución de FIS la respuesta pierde definición.

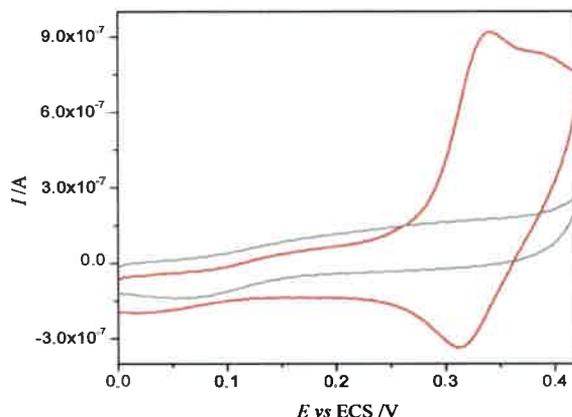


Figura 78. Voltamperogramas cíclicos registrados en FIS (-) y en la solución del blanco (-) sobre el electrodo de Au modificado con 4-ATF. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Al comparar los voltamperogramas cíclicos registrados en la solución de blanco, antes y después de haber realizado barridos en la solución de FIS, se encontró que el comportamiento es similar al observado sobre los electrodos modificados con 4-MP y 2-DAET (Figura 79). Es decir, se observa la adsorción de alguna especie.

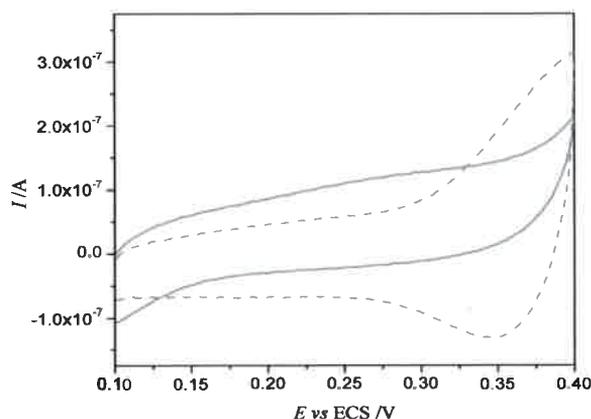


Figura 79. Voltamperogramas cíclicos en la solución del blanco registrados sobre el electrodo de Au modificado con 4-ATF antes (línea continua) y después (línea discontinua) de registrar voltamperogramas en la solución de FIS. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Por otra parte, el intervalo de estabilidad de la monocapa se encuentra en una ventana de potencial de hasta 0,450 V aproximadamente, ya que si el potencial de inversión supera dicho valor la monocapa de 4-ATF se desorbe. Por lo tanto, cuando se realizó el registro de voltamperogramas en una ventana de potencial mayor, no fue posible observar si se logra definir un pico adsorptivo, como en el caso de los demás tioles con respuestas similares.

5.12. CONCLUSIONES

Se pudieron obtener las siguientes conclusiones, según el comportamiento electroquímico de fisetina sobre la superficie de electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de diferentes tioles: para tioles cuya cadena carbonada es relativamente larga (1-dodecanotiol y 6-mercapto-1-hexanol) la monocapa desfavorece la respuesta electroquímica, actuando como una barrera a la transferencia electrónica y no evita los procesos de pasivación, respuesta característica de los alcanotioles. El resto de los tioles probados, cuyas cadenas carbonadas son cortas o contienen un anillo aromático, no inhiben la respuesta electroquímica de FIS en ningún caso y las mismas poseen diferentes características dependiendo del tiol del que se trate. Para este analito se puede afirmar que la respuesta se ve favorecida aún más cuando el tiol posee un grupo oxigenado respecto de los que poseen nitrógeno, observándose tanto respuestas difusionales como de naturaleza superficial, según los casos.

Si bien varios de los tioles muestran señales apreciables de FIS que pueden ser útiles analíticamente, el ácido 2-mercaptoetanosulfónico y 4-mercaptofenol se muestran como excelentes tioles para modificar el electrodo. El primero porque FIS tiene una respuesta difusional totalmente reproducible y el segundo porque muestra adsorción al igual que sobre la superficie de electrodos de carbono vítreo, pero evitando la pasivación.

Capítulo 6

Caracterización de monocapas autoensambladas de tioles

En este capítulo se presentan los estudios realizados para la caracterización de las MAE, llevados a cabo con el fin de dilucidar los aspectos estructurales que afectan la respuesta de FIS bajo las condiciones empleadas.

Las propiedades interfaciales están definidas por la estructura de la superficie a nivel molecular,¹⁵⁸ por lo que su estudio resulta de sumo interés. Existen diferentes técnicas adecuadas para obtener información útil sobre determinadas propiedades de una monocapa autoensamblada. En este trabajo, se utilizaron tanto técnicas electroquímicas (VC, EIE) y como técnicas no electroquímicas (medida del ángulo de contacto), para la determinación del cubrimiento superficial, el grado de ordenamiento de las MAE y los pK_a superficiales.

Las MAE se prepararon como se describe en la sección 3.2.2.1.3., en soluciones etanólicas 5 mM del tiol, empleando un t_{mod} igual a 60 min para 4-MF, 2-MES, BT, 3-MP, 6-M-1-H y CA, mientras que las de DDT fueron preparadas con un t_{mod} de 30 o 60 min, dependiendo del experimento.

6.1. ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE BLOQUEO DE MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS DE TIOLES

A causa de que existe una relación entre el orden estructural de una MAE y el comportamiento electroquímico de una cupla redox dada, a través del grado de inhibición o de bloqueo de una reacción redox es posible obtener información en cuanto a la integridad y calidad de empaquetamiento del tiol sobre la superficie del electrodo.^{52,53} La Figura 80 muestra voltamperogramas cíclicos registrados en una solución de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ sobre el electrodo de Au desnudo y modificado con los tioles 4-MF, 2-MES, BT, 6-M-1-H y DDT.

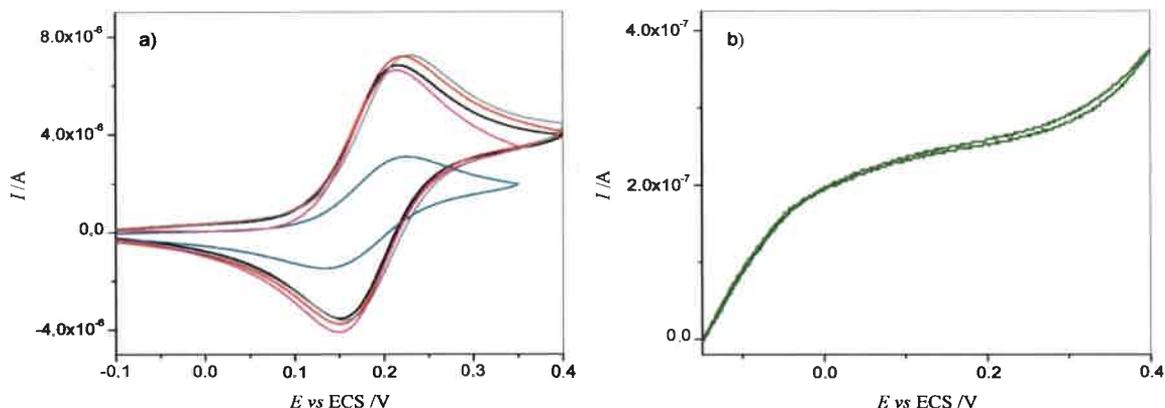


Figura 80. Voltamperogramas cíclicos de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/-3}$ 1×10^{-3} M en KCl 0,100 M sobre electrodos de a) Au (-) desnudo y modificados con (-) 4-MF, (-) 2-MES, (-) BT, (-) 6-M-1-H ($t_{\text{mod}} = 60$ min) y b) (-) DDT ($t_{\text{mod}} = 30$ min). $v = 0,050$ V s^{-1} .

Sobre el electrodo de Au desnudo, la cupla redox muestra la respuesta difusional reversible característica de la misma, al igual que para las MAE de 4-MF, 2-MES, BT y 6-M-1-H (Figura 80 a). Sin embargo, puede observarse que en el caso de 6-M-1-H la intensidad de la señal es considerablemente menor y la separación de los potenciales de pico es mayor en comparación a los voltamperogramas restantes, que son similares entre sí. Por otro lado, como se observa en la Figura 80 b, el electrodo modificado con DDT no muestra corriente faradaica; el voltamperograma cambia significativamente a una forma capacitiva, luego de la modificación del electrodo.

La disminución en la respuesta de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/-3}$ sobre la MAE de 6-M-1-H indica que el largo de la cadena del tiol favorece la formación de una estructura relativamente ordenada.⁵ La señal en forma de pico está asociada a una mayor o menor contribución de transferencia electrónica por permeabilidad o a través de huecos.^{42,52,159}

Por lo tanto, el hecho de observar una respuesta faradaica permitiría concluir que el grado de ordenamiento de estas MAE es bajo y que presentan defectos o huecos en su estructura.⁵ La variabilidad en la corriente faradaica para electrodos cubiertos con diferentes MAE, manteniendo los demás factores constantes, se le atribuye a la existencia de diferencias en la densidad y en la fracción del área de los huecos.⁵

Los resultados obtenidos con DDT indicarían la alta capacidad de bloqueo de la MAE, debida a la ausencia de defectos estructurales ya que, de lo contrario, las especies

electroactivas podrían aproximarse a la superficie del electrodo para que ocurra la transferencia de carga.^{52,159,160} La inhibición de un proceso faradaico simple en el cual ambas formas, oxidada y reducida, de la cupla redox son solubles es una manifestación del bloqueo de la MAE.⁵ En presencia de la MAE de DDT, la cupla redox no puede entrar en contacto con la superficie del electrodo y, por lo tanto, la transferencia de carga ocurre por efecto túnel a través de los sitios colapsados y/o dominios bien ensamblados de la MAE.¹⁶⁰ Estos resultados son acordes a la formación de estructuras altamente empaquetadas a partir de alcanotioles de cadenas largas.¹⁶¹

Por otro lado, mediante medidas de ángulo de contacto es posible explorar la estructura de las MAE. Un alto grado de empaquetamiento y orientación de las moléculas del tiol genera una superficie en la cual sólo los grupos terminales están expuestos al medio. Este tipo de superficies muestra propiedades de mojabilidad características.⁵ Los valores de ángulo de contacto más altos (medidos en agua) se presentan para MAE compactas con $-\text{CH}_3$ como grupo terminal, mientras que los menores ($< 15^\circ$) se observan para los grupos terminales muy polares, como $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$.^{5,159}

La Figura 81 muestra los perfiles de gota de agua depositada sobre Au desnudo y las MAE de 4-MF, 2-MES y 6-M-1-H a pH 4, a partir de los cuales se determinaron los siguientes ángulos de contacto: $47,43^\circ$; $41,33^\circ$; $47,30^\circ$ y $49,75^\circ$, respectivamente.



Figura 81. Imágenes de perfiles de gotas para la medición de los ángulos de contacto sobre superficies de Au desnudo y modificadas con las MAE de 4-MF, 2-MES y 6-M-1-H a pH 4.

Según los valores hallados, no existen diferencias considerables entre el electrodo de Au desnudo y modificado con las MAE de 4-MF, 2-MES y 6-M-1-H a pH 4. Además, los ángulos son significativamente mayores a los esperados para

estructuras compactas de tioles con grupos terminales hidrofílicos. Esto estaría indicando que, bajo las condiciones experimentales empleadas, la formación de las MAE no resulta en estructuras altamente ordenadas, sino por el contrario, pone en evidencia la obtención de superficies no compactas.^{158,162} El incremento del ángulo de contacto en tioles alifáticos, respecto a los ángulos correspondientes a estructuras densamente empaquetadas, resulta de los cambios conformacionales que sufren las cadenas para minimizar la energía libre, permitiendo que los grupos terminales queden orientados hacia el interior de la monocapa, quedando expuestas a la solución las cadenas carbonadas.¹⁶³ El grado de desorden está relacionado tanto a la flexibilidad de la cadena alquílica como al estado de carga de los grupos terminales.¹⁶³ De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que a pH 4 la tendencia en el aumento de la calidad de empaquetamiento de las MAE es 6-M-1-H < 2-MES < 4-MF.

6.2. DESORCIÓN ELECTROQUÍMICA DE MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS

La desorción electroquímica estudiada mediante VC se emplea para determinar el cubrimiento superficial del tiol adsorbido sobre el electrodo de Au.⁶² Un barrido de potencial realizado a un electrodo modificado, aplicando potenciales lo suficientemente positivos o negativos, produce la desorción del tiol,³⁵ generando aniones sulfoxi o tiolatos, respectivamente.^{164,165}

En general, de los procesos de desorción de una MAE es posible obtener información relacionada a su estabilidad y determinar la densidad de empaquetamiento de la misma.^{8,43,44}

Por otra parte, los procesos de desorción reductiva y oxidativa de una MAE determinan los límites catódico y anódico de su ventana de potencial, respectivamente.'

6.2.1. Desorción oxidativa

Como se dijo anteriormente, la aplicación de potenciales positivos causa la desorción del tiol, eliminándose de la superficie de manera completa e irreversible.³⁵ Cuando se llevan a cabo experimentos de VC a potenciales suficientemente anódicos, se observa un gran pico de oxidación en la zona de potencial en la que normalmente se produce la formación de la capa superficial de óxidos de Au. Por lo tanto, el pico observado se debe a la suma de ambos procesos: la formación de óxidos de Au y la oxidación del enlace del tiol.¹⁶⁴ El proceso de oxidación es complejo e involucra múltiples pasos consecutivos.^{44,164}

La Figura 82 muestra voltamperogramas cíclicos de desorción oxidativa de los tioles 4-MF, 2-MES, BT, 3-MP, 6-M-1-H y DDT, junto con el voltamperograma de Au desnudo a modo de comparación.

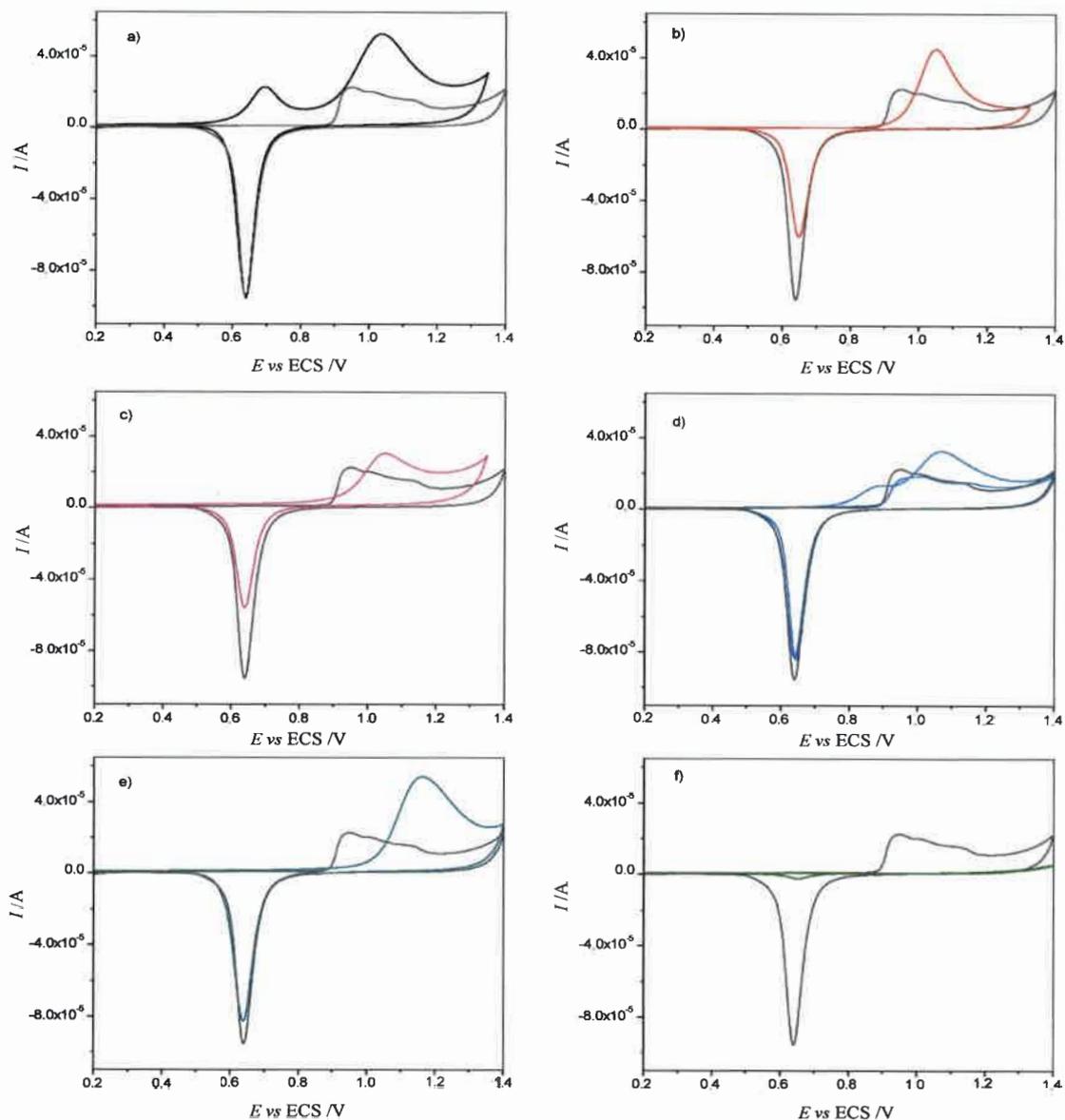


Figura 82. Voltamperogramas cíclicos de desorción oxidativa registrados en H_2SO_4 0,500 M, para las MAE de a) 4-MF, b) 2-MES, c) BT, d) 3-MP, e) 6-M-1-H, f) DDT ($t_{mod} = 60$ min). Para cada MAE se muestra el voltamperograma cíclico de Au desnudo registrado bajo las mismas condiciones, para su comparación. $v = 0,100 V s^{-1}$.

En la figura puede observarse claramente cómo el perfil de los voltamperogramas se ve afectado por la presencia de las distintas MAE. Los picos anódicos son los que presentan mayor cambio respecto al Au desnudo, mientras que el

pico catódico no muestra grandes variaciones. En todos los casos estudiados, un segundo barrido consecutivo de desorción muestra un voltamperograma muy similar al del electrodo de Au desnudo, por lo que se puede considerar que la desorción se completó en el primer barrido.

En el caso de DDT no se observaron picos de oxidación, inclusive invirtiendo el potencial en 1,700 V, donde ya se manifiesta la descarga del solvente. Sin embargo, a partir del tercer voltamperograma cíclico comenzaron a observarse los picos correspondientes a la formación de los óxidos de Au. La supresión de las corrientes que indican la formación de los óxidos de Au es característica de la formación de una MAE altamente estable con propiedades aislantes.^{5,44,125} Esta inhibición probablemente se deba a la exclusión de agua de la superficie del Au por la presencia de una MAE bien compacta,⁵ que genera un ambiente altamente hidrofóbico. La aparición de la descarga correspondiente a los óxidos de Au es evidencia de la presencia de huecos en la MAE, generados por la desorción del tiol.⁵

Por otro lado, la inestabilidad de las MAE es mayor en el caso de estar formadas por tioles de cadenas alifáticas cortas¹⁶⁶ o tioles aromáticos.¹⁶⁷ En base a los potenciales en los que comienza a observarse la descarga, el orden de estabilidad para las MAE es 4-MF < 3-MP < BT ~ 2-MES < 6-M-1-H < DDT.

El cubrimiento superficial, θ_{ox} , donde el subíndice indica que se trata de los valores obtenidos para la desorción oxidativa, se calculó como la relación entre la carga obtenida para cada tiol y la correspondiente al Au desnudo. La presencia de un proceso faradaico junto con la señal de desorción no permite determinar de manera directa la cantidad de moléculas adsorbidas,¹⁶⁸ por lo que las cargas de los picos anódicos correspondientes a las MAE (Q_{ox}) fueron calculadas sustrayendo la carga del Au desnudo (Q_{Au}). En la Tabla 5 se muestran los valores de Q_{ox} y θ_{ox} para los distintos tioles.

Tabla 5. Valores de los parámetros obtenidos a partir de la desorción oxidativa de las MAE formadas con diferentes tioles.

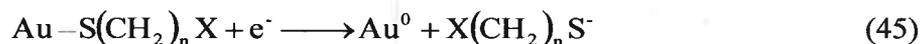
MAE	Q _{ox} (μC)	θ _{ox} = Q _{ox} /Q _{Au}
4-MF	36,8	2,63
2-MES	36,0	1,18
3-MP	24,3	0,93
BT	7,85	0,80
6-M-1-H	37,7	1,92
DDT	—	—

Como se observa en la tabla, los valores de θ_{ox} encontrados para las MAE de 4-MF y 6-M-1-H son grandes en relación a los de los tioles restantes y superan ampliamente el valor máximo esperado (θ_{ox} = 1). Esto se debe a que ambos tioles presentan en su estructura el grupo –OH, el cual se oxida para generar grupos carbonílicos, incluso a potenciales menores que el correspondiente a la oxidación del enlace S–Au.⁴⁴ En general, además del grupo terminal, también se oxida el enlace S–C, no conociéndose el estado final de oxidación.⁴⁴ En algunos casos, como en el de 4-MF y en el de 3-MP (Figura 82), esto se manifiesta por la presencia de múltiples picos de oxidación.⁴⁴

Por lo expuesto anteriormente, en muchos casos los valores de θ_{ox} no son considerados como buenos indicadores de cubrimiento superficial.

6.2.2. Desorción reductiva

Cuando un electrodo modificado se coloca en una solución acuosa o etanólica en un medio neutro o básico^{169,170} y se aplica un potencial negativo, se produce la desorción reductiva de los tioles que conforman la MAE.^{135,171} La reacción electroquímica involucrada es:¹⁷²



donde X representa el grupo funcional del tiol. Esta reacción se ve facilitada si los productos redox cargados pueden estabilizarse por los cationes presentes en la solución, mediante la penetración de éstos a la MAE. La reacción dependerá, entre otros factores, del potencial de carga cero, de las propiedades de empaquetamiento de la MAE, las interacciones cohesivas intermoleculares, la longitud de la cadena, los sitios de enlace del sustrato, el pH y la presencia de co-adsorbatos y aniones.⁴⁴ Por lo tanto, los voltamperogramas de desorción reductiva proveen información acerca de la estabilidad electroquímica, compactibilidad y propiedades de bloqueo de las moléculas adsorbidas sobre la superficie del electrodo.

La Figura 83 muestra tres voltamperogramas cíclicos consecutivos de desorción reductiva de las MAE formadas a partir de los diferentes tioles. Los registros se realizaron en KOH 1,00 M acuoso. A modo de comparación, en la Figura 83 f se muestran los voltamperogramas consecutivos de desorción reductiva de una MAE compacta de DDT, obtenida por deposición gaseosa del tiol durante 30 min a 60 °C. Para las MAE de 4-MF, 2-MES y 3-MP se observan dos picos de desorción, mientras que para BT y 6-M-1-H se distinguen tres. La presencia de múltiples ondas se atribuye a la variación en el potencial de desorción de moléculas de tiol adsorbidas en diferentes dominios cristalográficos del electrodo de Au policristalino, como consecuencia de la diferencia de energía de unión entre el tiol y cada uno de estos sitios.^{62,173} La rugosidad del sustrato induce a la formación de distintos dominios en la MAE, los cuales difieren en estabilidad, grado de orden y, por lo tanto, en permeabilidad. Por este motivo, los distintos dominios poseen propiedades de transferencia de carga diferentes,¹⁷⁴ que resultan en distintos picos en VC.¹⁷⁵ En el caso extremo donde la unión entre moléculas de tiol es muy fuerte, la MAE se desorbe súbitamente a un dado potencial,¹⁷⁶ como se observa para el caso de DDT (Figura 83 f).

Por otra parte, la posición y la forma de los picos de desorción dan una idea acerca de la compactibilidad de la MAE.⁵⁴ Los potenciales de pico aportan información acerca de la fuerza del enlace S-Au y de las interacciones entre cadenas, es decir, puente hidrógeno, π - π y/o van Der Waals.⁴⁴ Así, valores de $E_{p,c}$ más negativos indican

mayor estabilidad^{8,174} y picos más angostos, interacciones más fuertes entre las moléculas adsorbidas.⁵⁴ En cuanto a la posición de los picos, se observa que el $E_{p,c}$ más anódico es de la MAE de DDT, a -1,27 V, seguido por los $E_{p,c}$ de 6-M-1-H y BT, que se encuentran a -1,25 y -1,17 V, respectivamente. Si bien 6-M-1-H y BT presentan $E_{p,c}$ similares al correspondiente a DDT, muestran, además, otros picos de desorción, lo cual indicaría que la unión entre las moléculas de estos tioles no es tan fuerte. Para las MAE restantes el $E_{p,c}$ del pico más negativo es -0,89 V, indicando que las MAE formadas a partir de 4-MF, 2-MES y 3-MP no serían suficientemente compactas. Según estos resultados, la estabilidad de las MAE está de acuerdo a lo encontrado en los experimentos de desorción oxidativa (Tabla 5).

Con respecto al ancho de pico a la altura media ($W_{1/2}$), valores pequeños son indicativos de interacciones laterales fuertes entre las moléculas adsorbidas,^{111,122,176} incluso cuando el cubrimiento superficial (θ) es bajo.

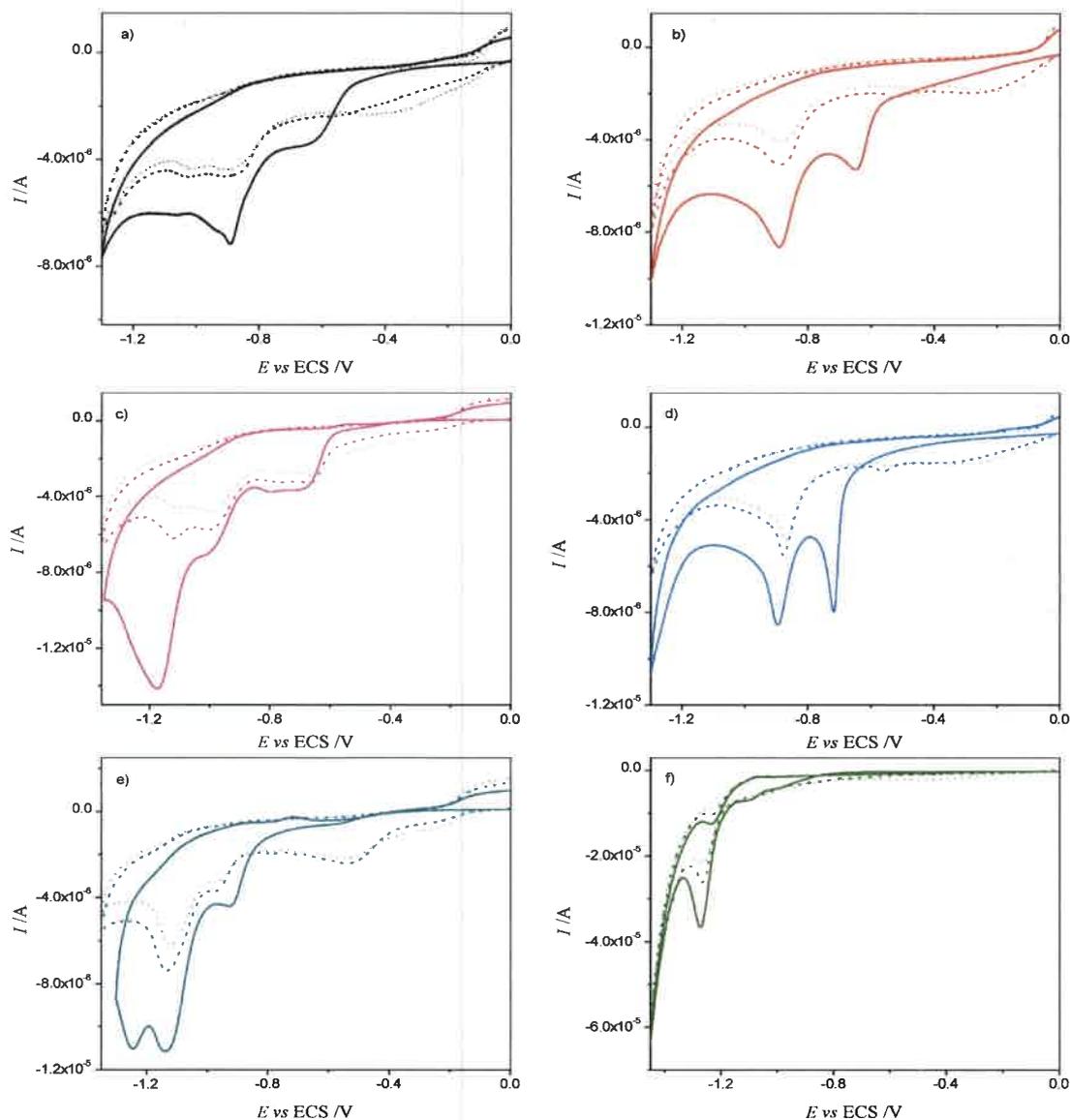


Figura 83. Voltamperogramas cíclicos de desorción consecutivos registrados en KOH 1,00 M, luego de la modificación del electrodo de Au con a) 4-MF, b) 2-MES, c) BT, d) 3-MP, e) 6-M-1-H ($t_{\text{mod}} = 60 \text{ min}$) y f) DDT ($t_{\text{mod}} = 30 \text{ min a } 60 \text{ }^\circ\text{C}$). $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

En el segundo y tercer voltamperograma registrados se observa que la intensidad de los picos disminuye, a la vez que se desplazan hacia $E_{p,c}$ menos negativos, señalando que en cada ciclo resulta más fácil producir la desorción de tiol remanente. Esto está de acuerdo con estudios que sugieren que la desorción ocurre con mayor facilidad en los sitios en los que la MAE presenta defectos.^{35,177}

A partir de los voltamperogramas cíclicos de desorción es posible determinar la concentración superficial por integración del área del pico de reducción. Teniendo en cuenta el área electroquímica calculada para el electrodo de Au policristalino, la carga Q_{red} obtenida integrando el pico de reducción de los voltamperogramas cíclicos de desorción y haciendo uso de la ec. 36, se determinó el Γ para las MAE de 4-MF, 2-MES, 3-MP, BT y 6-M-1-H. El θ_{red} , correspondiente al cubrimiento superficial, donde el subíndice señala que se trata de los valores obtenidos por desorción reductiva, se calculó como la relación entre la concentración superficial calculada para cada tiol y la correspondiente a una MAE compacta ($\Gamma = 7,7 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$)⁴³. En la Tabla 6 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 6. Valores de los parámetros obtenidos a partir de la desorción reductiva de las MAE formadas con diferentes tioles.

MAE	$Q_{\text{red}} (\mu\text{C})$	$\Gamma (\text{mol cm}^{-2})$	θ_{red}	$E_{p,1} / E_{p,2} / E_{p,3} (\text{V})$	$W_{1/2,1} / W_{1/2,2} / W_{1/2,3} (\text{V})^*$
4-MF	7,8	$6,2 \times 10^{-10}$	0,80	-0,62 / -0,89	0,127 / 0,112
2-MES	9	$7,2 \times 10^{-10}$	0,92	-0,64 / -0,89	0,075 / 0,110
3-MP	10	$8,2 \times 10^{-10}$	1,05	-0,72 / -0,89	0,038 / 0,068
BT	15	12×10^{-10}	1,54	-0,68 / -0,98 / -1,17	0,159 / 0,082 / 0,140
6-M-1-H	9,4	$7,5 \times 10^{-10}$	0,97	-0,91 / -1,12 / -1,25	0,066 / 0,087 / 0,061
DDT	12	$9,5 \times 10^{-10}$	1,23	-1,27	0,059

* $W_{1/2,1}$, $W_{1/2,2}$ y $W_{1/2,3}$ son los $W_{1/2}$ del primer, segundo y tercer pico, respectivamente.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 6, se podría concluir que las interacciones laterales entre las moléculas adsorbidas son más débiles para 4-MF, 2-MES y BT que para 3-MP y 6-M-1-H, las cuales son comparables con el valor obtenido para la MAE compacta de DDT. Sin embargo, en base a los voltamperogramas cíclicos en la Figura 83, probablemente algunos picos de desorción se encuentran solapados, con lo cual afectaría la determinación de $W_{1/2}$.

Por otro lado, se observa que BT presenta un valor de θ_{red} incluso superior al de DDT. Esto se debe a que los tioles aromáticos pueden formar monocapas más densamente empaquetadas y ordenadas que los alcanotioles, a causa del gran número de interacciones π - π que tienen lugar en este tipo de estructuras.^{8,53,178,179} El menor cubrimiento superficial de 4-MF respecto a BT puede ser atribuido a la presencia del grupo -OH, que debilita la interacción π - π entre los anillos aromáticos por su efecto dador de electrones.

Los datos de las concentraciones superficiales experimentales son del orden de aquellas obtenidas asumiendo una MAE compacta adsorbida en dirección perpendicular respecto a la superficie del electrodo, indicando que los tioles de las MAE estudiadas deberían estar adsorbidos en un ángulo similar.^{122,180} Ramírez y col.⁷ demostraron, mediante cálculos computacionales basados en el modelo molecular para una MAE de 4-MF, que concentraciones superficiales máximas de $3,4 \times 10^{-10}$ y $8,7 \times 10^{-10}$ mol cm⁻² se corresponden con una orientación paralela y perpendicular a la superficie del electrodo, respectivamente. Por lo tanto, los valores de Γ mostrados en la Tabla 6 serían consistentes con la formación de MAE cuyas moléculas se encuentran, en términos generales, con orientación perpendicular sobre la superficie del electrodo. Este supuesto, combinado con el grado de cubrimiento del electrodo modificado y, con las interacciones laterales relativamente débiles entre las moléculas de tiol, señala que las MAE obtenidas presentan defectos y no se encuentran densamente empaquetadas.

Para este tipo de tioles, los valores de θ que se obtienen mediante los experimentos de desorción oxidativa y reductiva son de diferente naturaleza, ya que con la desorción oxidativa se produce la oxidación de diferentes partes del tiol, además de la del enlace S-Au (sección 6.2.1.). Por ello, θ_{ox} y θ_{red} no son comparables.

6.3. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA

La impedancia electroquímica permite estudiar la capacidad de bloqueo de una MAE, evaluar la presencia de defectos y/o huecos y determinar el grado de desorden.^{50,181}

La Figura 84 muestra los espectros de impedancia electroquímica según la representación de Nyquist, obtenidos en una solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ para el electrodo de Au desnudo y modificado con 4-MF, 2-MES, BT, 6-M-1-H y DDT. Los datos fueron registrados a 0,190 V vs ECS, valor correspondiente al potencial formal de la cupla redox empleada, determinado a partir de un voltamperograma cíclico obtenido previamente.

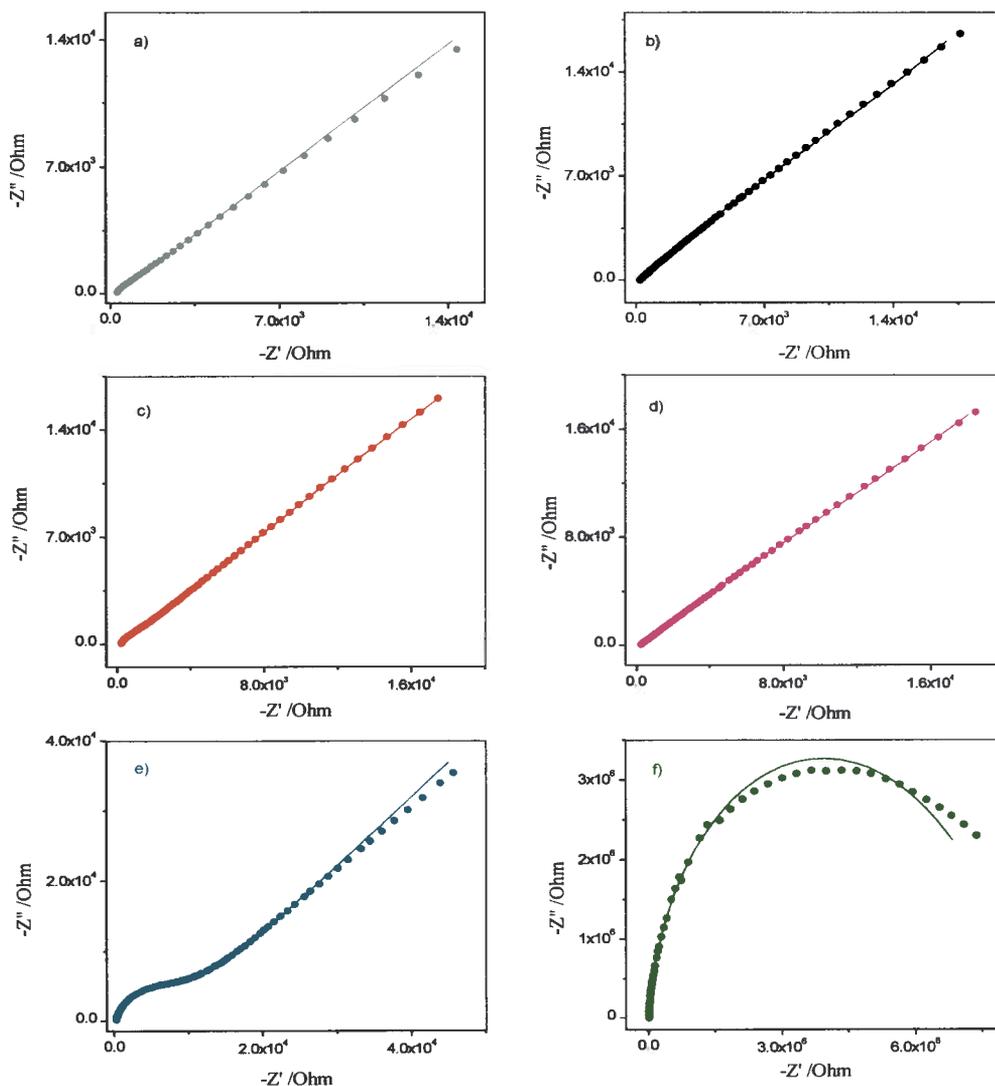


Figura 84. Diagramas de Nyquist registrados en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y KCl 0,100 M sobre electrodos de Au a) desnudo y modificados con b) 4-MF, c) 2-MES, d) BT, e) 6-M-1-H y f) DDT ($t_{\text{mod}} = 30 \text{ min}$). Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua, el mejor ajuste. Intervalo de frecuencias: 0,1 Hz a 10 kHz.

El gráfico de impedancia del electrodo de Au desnudo (Figura 84 a) muestra una dependencia lineal con pendiente cercana a 1 en el intervalo de frecuencias elegido (0,1 Hz a 10 kHz), característica de un proceso electroquímico limitado por la difusión del reactivo (pendiente de Warburg unitaria). El circuito equivalente que describe este comportamiento se muestra en la Figura 85 a, donde CPE representa el elemento de fase constante, R_s la resistencia de la solución, y los parámetros R_{ct} y W son la resistencia a la transferencia de carga y la impedancia de Warburg, respectivamente, causada por la transferencia de masa desde el seno de la solución hasta el sitio de reacción.

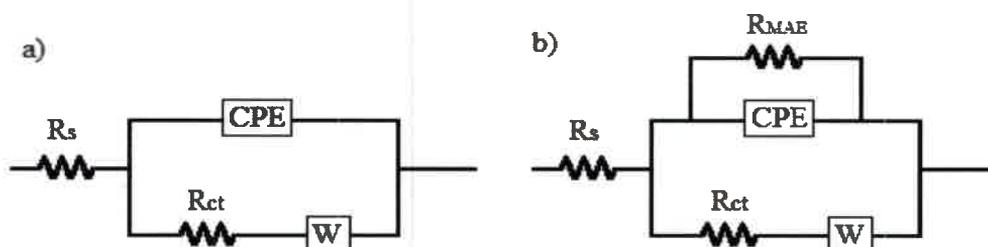


Figura 85. Circuitos eléctricos equivalentes empleados para ajustar los gráficos de impedancia para los electrodos de a) Au desnudo y modificados con 4-MF, 2-MES, BT, 6-M-1-H y b) Au modificado con DDT.

Por el contrario, para DDT (Figura 84 f) se observa un semicírculo en el intervalo completo de frecuencias, lo cual corresponde a un proceso limitado por transferencia de carga. El circuito equivalente que describe este comportamiento se muestra en la Figura 85 b, donde aparece una nueva resistencia a la transferencia de carga (R_{MAE}), correspondiente a la resistencia que presenta la presencia de la MAE.

Para las MAE formadas por 4-MF, 2-MES y BT (Figuras 84 b, c y d, respectivamente), a frecuencias altas se aprecia un semicírculo muy pequeño, siendo la respuesta similar a la obtenida para el electrodo de Au desnudo. A frecuencias bajas, la semejanza con el comportamiento del Au desnudo es indicativa del solapamiento de las capas de difusión vecinas, debido a la proximidad entre los defectos y/o huecos en una dada MAE.⁵² La extensión de la impedancia de Warburg en los gráficos de Nyquist indica que, para la mayor parte del intervalo de frecuencias aplicado, la transferencia

electrónica entre los electrodos de Au modificados con 4-MF, 2-MES y BT y la prueba redox se encuentra limitada por difusión. El mejor ajuste para estas superficies se obtuvo con el circuito equivalente de la Figura 85 a. A partir de lo observado, se infiere que la presencia de estas MAE no impone una resistencia importante a la transferencia de carga.

Para 6-M-1-H (Figura 84 e) la situación es intermedia entre la de DDT y las restantes superficies, ya que a frecuencias altas se observa un semicírculo bien definido seguido por una parte lineal. Si bien la magnitud del semicírculo indicaría que la resistencia a la transferencia de carga comienza a ser importante, el mejor ajuste se obtuvo con el circuito equivalente de la Figura 85 a.

El comportamiento que presenta cada una de las MAE se puede explicar mediante las estructuras químicas de los tioles que las componen. Así, 2-MES, por ser un tiol de cadena corta, permite la llegada de la cupla redox a la superficie del electrodo, no ofreciendo resistencia importante a la transferencia de carga. Por su parte, el sistema de electrones π conjugados del anillo bencénico puede promover la transferencia de electrones a través de la MAE.^{8,42} Con lo cual, 4-MF y BT presentan una alta conductividad eléctrica debido a la fácil deslocalización de los electrones en el anillo,^{53,178,182} lo que se traduce, también, en una baja resistencia a la transferencia de carga. Sin embargo, debido a que la transferencia de carga se produce también en los sitios defectuosos de las MAE, no es posible la separación entre lo que corresponde a la descarga a través del enlace y la descarga debida a la difusión de las especies hasta la superficie del electrodo a través de los huecos.⁴² Finalmente, las cadenas de hidrocarburos saturados que poseen los alcanotioles actúan como capas aislantes, siendo más eficaces las de mayor longitud debido a que forman monocapas más compactas y organizadas,^{53,182} lo que se ve reflejado en los espectros de impedancia de las MAE de 6-M-1-H y DDT.

Tal como se explicó en la sección 2.8.2., otra manera de llevar a cabo el análisis de los espectros de impedancia es mediante los diagramas de Bode, que consisten en graficar el módulo de la impedancia, $|Z|$, y el ángulo de fase, φ , en función del logaritmo de la frecuencia. Estos diagramas se muestran en la Figura 86.

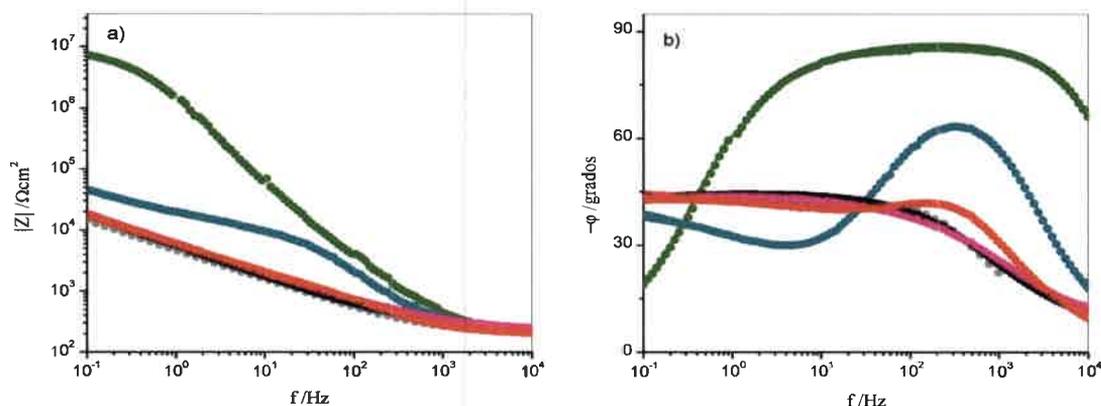


Figura 86. Diagramas de Bode registrados en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3} 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y KCl 0,100 M sobre electrodos de Au (-) desnudo y modificados con (-) 4-MF, (-) 2-MES, (-) BT, (-) 6-M-1-H ($t_{\text{mod}} = 60 \text{ min}$) y (-) DDT ($t_{\text{mod}} = 30 \text{ min}$). Los puntos representan los datos experimentales y la línea continua, el mejor ajuste. Intervalo de frecuencias: 0,1 Hz a 10 kHz.

En la Figura 86 a se puede apreciar que para casi todo el intervalo de frecuencias, la MAE de DDT muestra mayores valores de impedancia, seguida por 6-M-1-H, mientras que las restantes MAE muestran un comportamiento similar al del Au desnudo y, por lo tanto, mayor permeabilidad.^{121,165}

La Figura 86 b muestra la variación de ϕ con la frecuencia. El ángulo de fase es una medida de la importancia relativa de las vías resistivas y capacitivas dentro de un circuito, a una frecuencia dada.¹²¹ Ángulos de fase cercanos a 90° indican la presencia de un buen material aislante dieléctrico sobre la superficie del electrodo.¹⁶⁵ Por el contrario, ángulos más pequeños indicarían que la MAE es más permeable y, en consecuencia, más conductora. En esta representación también se puede observar la similitud entre las señales del Au desnudo y de las MAE de 4-MF y BT. Sin embargo, puede apreciarse, con mayor claridad que en la Figura 86 a, la diferencia existente entre estas respuestas y la de 2-MES, lo que se ve reflejado también en un mayor valor de R_{ct} obtenido del ajuste de los gráficos (Tabla 7). Las medidas de ϕ permiten distinguir con mayor claridad las diferencias en la permeabilidad¹²¹ entre las MAE estudiadas.

Asumiendo que toda la corriente faradaica de la prueba redox es debida a la descarga de la misma en los defectos en la MAE, es posible obtener el cubrimiento superficial (θ_{imp}) a partir de la siguiente ecuación:¹⁸⁰

$$\theta_{imp} = 1 - \frac{R_{ct,Au}}{R_{ct,MAE}} \quad (46)$$

donde $R_{ct,Au}$ es la resistencia a la transferencia de carga del electrodo de Au desnudo y $R_{ct,MAE}$ es la correspondiente a la del electrodo modificado, ambas obtenidas de los ajustes.

En la Tabla 7 se presentan los valores de los elementos de circuito equivalente obtenidos a partir de los ajustes realizados y el cubrimiento superficial, θ_{imp} , calculado.

Tabla 7. Valores de los elementos de circuito equivalentes que mejor ajustan la respuesta electroquímica de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ sobre los electrodos de Au desnudo y modificados con los diferentes tioles.

MAE	Q_{CPE} ($\mu\Omega^{-1} \text{cm}^{-2} \text{s}^\sigma$)*	σ^*	R_{ct} (k Ω)	R_{MAE} (k Ω)	χ^2	θ_{imp}
Au Desnudo	1,404 ± 0,437	1,00 ± 0,07	0,297 ± 0,135	–	0,008	–
4-MF	0,1503 ± 0,0791	0,89 ± 0,02	0,342 ± 0,005	–	0,028	0,131
2-MES	6,295 ± 0,421	0,765 ± 0,008	1,547 ± 0,078	–	0,026	0,808
BT	0,1989 ± 0,0220	0,97 ± 0,04	0,317 ± 0,008	–	0,024	0,063
6-M-1-H	0,7622 ± 0,0134	0,883 ± 0,002	9,450 ± 0,085	–	0,026	0,969
DDT	0,0284 ± 0,0034	0,98 ± 0,02	575	8,7 ± 0,3	0,267	0,999

* Q_{CPE} y σ son los parámetros de la impedancia de CPE (Z_{CPE}), dada en la ec. 22.

Los valores de σ varían entre 0 y 1 y reflejan la idealidad del capacitor. $\sigma = 1$ indica que el comportamiento de CPE es igual al del capacitor ideal,^{52,175} mientras que

valores menores a la unidad son indicativos de desorden estructural en la MAE.¹⁶³ Valores de $0,95 \leq \sigma \leq 0,97$ indican que la MAE presenta un pequeño número de huecos y sitios colapsados, mientras que $\sigma > 0,97$ indican que sólo contiene sitios colapsados.⁵⁰ Sin embargo, sobre Au policristalino siempre se observan desviaciones de la unidad en el intervalo $0,88 < \sigma < 1$, incluso para cubrimientos suficientemente altos, a causa de imperfecciones debidas a las diferentes caras cristalinas y a la rugosidad de la superficie.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Como puede observarse en la Tabla 7, los valores de σ obtenidos varían entre 0,765 y 0,98 (correspondientes a 2-MES y DDT, respectivamente). Con excepción al 2-MES, los σ restantes se encuentran comprendidos en el intervalo correspondiente a las desviaciones sobre Au policristalino, lo que indica que, en estos casos, el comportamiento de CPE no se encuentra muy alejado al del capacitor ideal.⁵² Según σ , el grado de ordenamiento creciente de las estructuras de las MAE viene dado por 2-MES < 6-M-1-H < 4-MF < BT < DDT.

Valores pequeños en la capacitancia sugieren una menor permeabilidad de la MAE, lo que indica que es más compacta.¹⁷⁵ La capacitancia puede, además, ser correlacionada con diversos factores estructurales, tales como el espesor, empaquetamiento y propiedades dieléctricas.¹⁶⁵ La magnitud de CPE (Q_{CPE}) tiene el siguiente orden para las MAE estudiadas: DDT < 4-MF < BT < 6-M-1-H < 2-MES. Si se asume un modelo de placas paralelas, en el que la superficie de Au y los iones fisisorbidos en la interface MAE/electrolito actúan como placas y el tiol como material dieléctrico, la diferencia en la capacitancia de las distintas MAE puede ser atribuido a la relación de la constante dieléctrica con el espesor de la misma; estando ambos parámetros asociados con la estructura de empaquetamiento de la MAE.¹⁶⁵

Las MAE con mayor orden conformacional ($\sigma \sim 1$) y más densamente empaquetadas (capacitancias menores), podrían tener una menor constante dieléctrica,¹⁶⁰ a causa de la exclusión de las moléculas de solvente polar de la superficie hidrofóbica, y un mayor espesor, debido a un menor ángulo de inclinación.¹⁶⁵

Por otro lado, los valores de R_{ct} para la cupla redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ en presencia de las diferentes MAE son mayores que para el caso del electrodo de Au desnudo,^{52,160} siendo BT < 4-MF < 2-MES < 6-M-1-H < DDT el orden correspondiente de menor a mayor R_{ct} . Sólo fue posible obtener la R_{MAE} para DDT, ya que fue el único tiol para el cual el mejor ajuste se obtuvo con el circuito equivalente mostrado en la Figura 85 b.

La resistencia de la solución, R_s , depende de la geometría del electrodo y de las propiedades de la solución, por lo que no debe verse afectada por las modificaciones que tienen lugar en la superficie del electrodo.^{22,160} Los valores de R_s obtenidos de los ajustes se mantuvieron constantes, con un valor promedio de $213 \pm 7 \Omega$, siendo este valor el esperado para el medio de reacción utilizado.

Con respecto al cubrimiento superficial, se observan valores muy distintos entre 2-MES, 6-M-1-H, DDT y 4-MF, BT. Esto se debe a que sólo los valores de θ_{imp} correspondientes a las MAE de cadenas alifáticas pueden ser considerados como cubrimiento superficial, ya que en el caso de tioles aromáticos, la R_{ct} obtenida también comprende la corriente transferida a través de los enlaces $\pi-\pi$. Esto se ve reflejado en el bajo valor de θ_{imp} calculado para 4-MF y BT, los cuales son mucho menores a lo esperado según las restantes determinaciones realizadas. Para los tioles alifáticos, el orden hallado fue 2-MES < 6-M-1-H < DDT, el que es esperado debido al largo de las cadenas y a la presencia o no de grupos terminales.

En general, de lo presentado en la Tabla 7, se observa que los valores más altos de σ se corresponden con los menores de Q_{CPE} , lo cual es consistente con el hecho de que las MAE más ordenadas son las más densamente empaquetadas. Estos resultados también están de acuerdo con los valores de R_{ct} hallados. Para los tioles de cadenas lineales, la compactibilidad, el orden y la resistencia a la transferencia de carga se incrementa en el sentido 2-MES < 6-M-1-H < DDT, de acuerdo a la longitud de las cadenas y a la naturaleza de los grupos terminales. Entre cadenas cortas de tiol es menor la cantidad de las interacciones de van der Waals que tienen lugar y, por lo tanto, son más débiles que en el caso de las cadenas más largas. Además, los grupos terminales voluminosos interfieren en el ordenamiento de la MAE, más aún si se encuentran cargados, ya que la repulsión electrostática entre los grupos cargados en la interface MAE/electrolito desestabiliza la monocapa.^{186,187} Por su parte, 4-MF y BT forman estructuras más compactas que las de 6-M-1-H y 2-MES gracias a las fuertes interacciones existentes entre los anillos aromáticos de moléculas de tiol adyacentes; motivo por el cual tales MAE también presentan menores resistencias a la transferencia de carga.

Lo encontrado a partir del análisis de impedancia se corresponde con lo observado en VC (sección 6.1.), donde la respuesta de la cupla redox sobre las MAE de

4-MF, 2-MES y BT no presenta cambios importantes respecto al Au desnudo, mientras que la de 6-M-1-H decrece un poco y la de DDT bloquea la descarga de la cupla redox.

6.4. DETERMINACIÓN DEL pK_a APARENTE DE MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS

El pK_a superficial de una MAE es uno de los parámetros más importantes de las propiedades superficiales ya que no sólo indica la acidez de la MAE, sino que también da a conocer el estado de carga de la superficie a un determinado valor de pH.^{57,60} El pK_a superficial aparente puede ser determinado mediante diferentes técnicas,^{60,161,188-194} siendo las más simples y prácticas aquellas que consisten en la obtención de curvas de titulación a partir de medidas de VC y ángulo de contacto. Entre estas últimas, la técnica de ángulo de contacto presenta, además, la ventaja de no depender del empleo de una cupla redox. A continuación se presenta la determinación de los pK_a superficiales aparentes de las MAE formadas por 4-MF, 2-MES, 3-MP, 6-M-1-H y CA.

6.4.1. Determinación del pK_a aparente mediante voltamperometría cíclica

La técnica de titulación electroquímica mediante VC consiste en obtener las $I_{p,a}$ de los voltamperogramas cíclicos de una cupla redox, tal como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, en soluciones de diferentes pH.^{60,191} La respuesta que se obtiene sobre electrodos de Au desnudo es independiente del pH del medio. Sin embargo, cuando la superficie se encuentra modificada con un determinado tiol, el estado de disociación de sus grupos terminales es el factor que controla la transferencia de carga entre la prueba redox y el electrodo.¹⁹⁵

Siendo AH el grupo ácido terminal de una MAE, el pK_a superficial se puede definir, a partir del equilibrio de ionización del mismo, como:¹⁹¹



$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \quad (48)$$

donde $[A^-]$ y $[AH]$ son las concentraciones superficiales de las moléculas disociadas y no disociadas de la MAE, respectivamente. El pK_a puede obtenerse a partir de la ec. 48:

$$pK_a = pH + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (49)$$

Asumiendo que la corriente total aparente (I) tiene contribuciones independientes de la corriente generada a través de la MAE disociada (I_{A^-}) y de la no disociada (I_{AH}), se obtiene $I = I_{A^-}[A^-] + I_{AH}[AH]$. Usando $[A^-] + [AH] = 1$ y las ecuaciones anteriores, se obtiene:

$$pK_a = pH + \log \frac{(I_{AH} - I_{A^-})}{(I - I_{A^-}) - 1} \quad (50)$$

donde I_{A^-} e I_{AH} pueden ser determinadas a valores de pH suficientemente altos y bajos,^{60,191} respectivamente. Reordenando la ecuación anterior, se obtiene la siguiente relación:

$$I = I_{A^-} + \frac{I_{AH} - I_{A^-}}{10^{pK_a - pH} + 1} \quad (51)$$

Así, un gráfico de $I(I_{p,a})$ en función del pH resulta en una curva sigmoidea, con un punto de inflexión dado por el pK_a superficial de la MAE.

La Figura 87 muestra la dependencia de $I_{p,a}$, registrada en una solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} 1 \times 10^{-3}$ M en función del pH, sobre electrodos modificados con 4-MF, 2-MES, 3-MP, 6-M-1-H y CA. Como insertos en la figura se presentan las curvas diferenciales, correspondientes al ajuste de los datos experimentales, a partir de las que

se obtuvieron valores de pK_a de 9,76, 4,99, 6,82 y 6,56 para las MAE de 4-MF, 3-MP, 6-M-1-H y CA, respectivamente. En el caso de la MAE de 2-MES no fue posible determinar el valor del pK_a , lo que implica que el grupo terminal se encuentra deprotonado a todos los pH estudiados. En la región de pH por debajo de los valores encontrados para 3-MP y 4-MF, la superficie se encuentra neutra, mientras que para 6-M-1-H y CA la superficie se encuentra cargada positivamente.¹⁸⁸ Por su parte, el pK_a estimado para 3-MP está de acuerdo con el encontrado en bibliografía,^{60,191} mientras que el determinado para CA resultó menor (siendo 7,6 en bibliografía).¹⁹³ Si bien tales determinaciones también fueron realizadas sobre electrodos de Au policristalino, el pK_a aumenta con la homogeneidad de la superficie, es decir, es dependiente de la rugosidad.¹⁹⁴ En particular, según la Ref. 193, el pK_a de CA fue determinado sobre una superficie con un factor de rugosidad de 1,6, mientras que el del electrodo empleado en este trabajo es 1,8 (sección 3.2.2.1.2.); esto explicaría las diferencias encontradas.

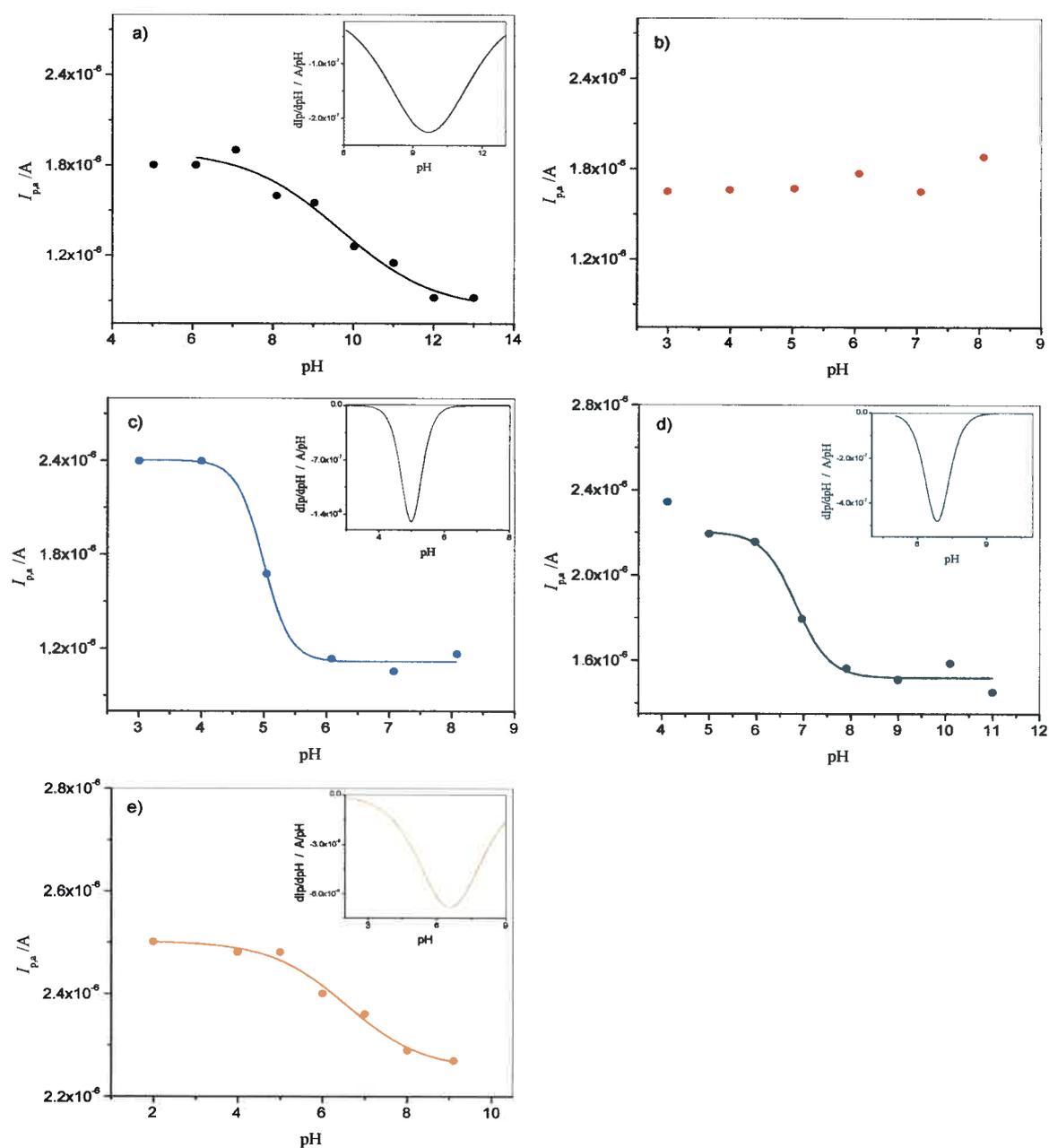


Figura 87. Dependencia de $I_{p,a}$ con el pH para las MAE formadas por a) 4-MF, b) 2-MES, c) 3-MP, d) 6-M-I-H y e) CA. Los puntos representan los datos experimentales y la línea, el ajuste realizado con la ec. 51. En los insertos se muestran las curvas diferenciales correspondientes al ajuste de los datos experimentales.

La transferencia de electrones entre el electrodo y la especie electroactiva está relacionada con el estado de carga del grupo terminal de la MAE,⁶⁰ debido a la interacción entre ambos. Si se trata de un tiol con un grupo ácido terminal, como 3-MP y 4-MF, a pH bajos la MAE no presenta carga, pero con el incremento del pH las cargas negativas de los grupos disociados causan la repulsión del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, lo que se ve reflejado en la disminución de la corriente y el aumento en la separación de los picos de los voltamperogramas cíclicos.^{57,60,180,191} Si el grupo terminal del tiol consiste en $-\text{NH}_2$, o en $-\text{OH}$, como CA y 6-M-1-H, a pH bajos se encuentran positivamente cargados, con lo cual se favorece la respuesta de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, que muestra un comportamiento reversible debido a la atracción electrostática entre cargas opuestas.^{127,191}

6.4.2. Determinación del pK_a aparente mediante medidas del ángulo de contacto

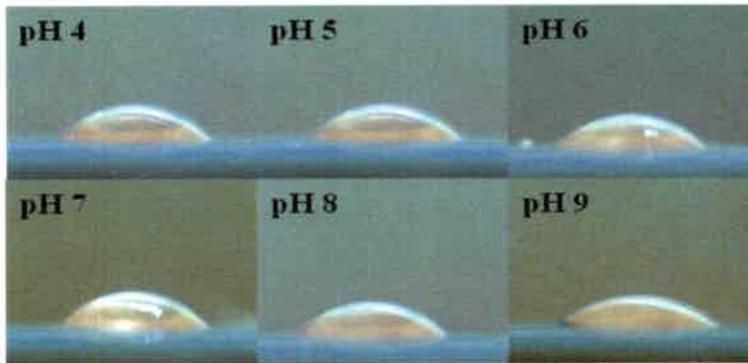
Cuando la hidrofobicidad de una superficie modificada es susceptible al pH de la solución en contacto, es posible determinar el pK_a superficial de una MAE mediante una titulación por ángulo de contacto (γ).^{127,189,191} De manera similar a la descrita anteriormente, un gráfico del coseno del ángulo de contacto en función del pH permite obtener el pK_a superficial de la MAE, determinando el valor de pH correspondiente al punto de inflexión. La relación equivalente a la empleada en VC (ec. 51), que describe la curva sigmoidea obtenida para el ángulo de contacto con el pH, está dada por:¹⁸⁹

$$\cos \gamma = \cos \gamma_{AH} + \frac{\cos \gamma_{A^-} - \cos \gamma_{AH}}{10^{\text{pK}_a - \text{pH}} + 1} \quad (52)$$

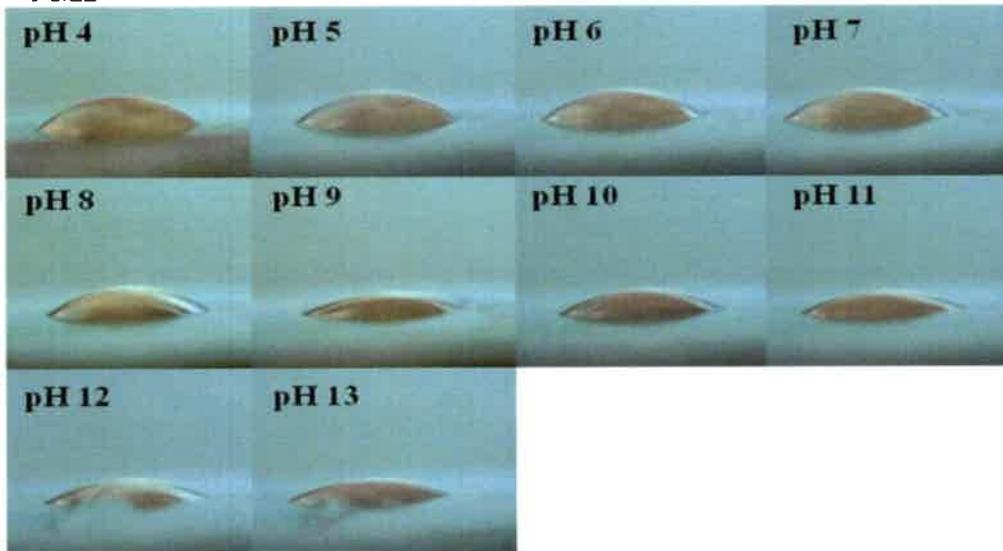
donde los términos $\cos \gamma_{AH}$ y $\cos \gamma_{A^-}$ corresponden a los ángulos de contacto a los cuales el tiol se encuentra protonado y deprotonado, respectivamente.

Se realizaron medidas de ángulo de contacto para los electrodos de Au desnudo y modificados con las MAE de 4-MF, 2-MES y 6-M-1-H, empleando gotas de diferentes pH. Entre una medida y otra, el electrodo modificado fue enjuagado, en primer lugar, con agua y, luego, con la solución reguladora empleada para la determinación posterior.¹⁸⁹ La Figura 88 muestra los perfiles de gotas así obtenidos.

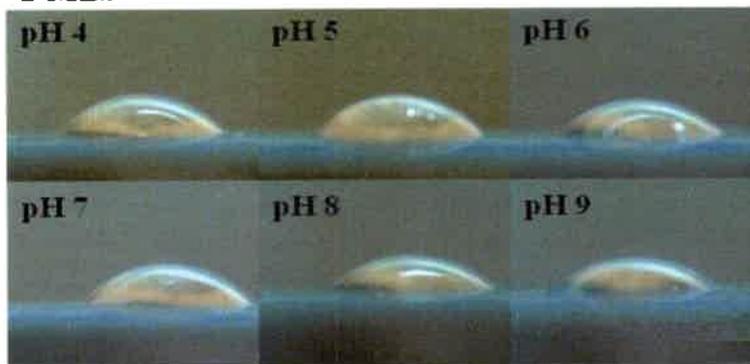
Au desnudo



4-MF



2-MES



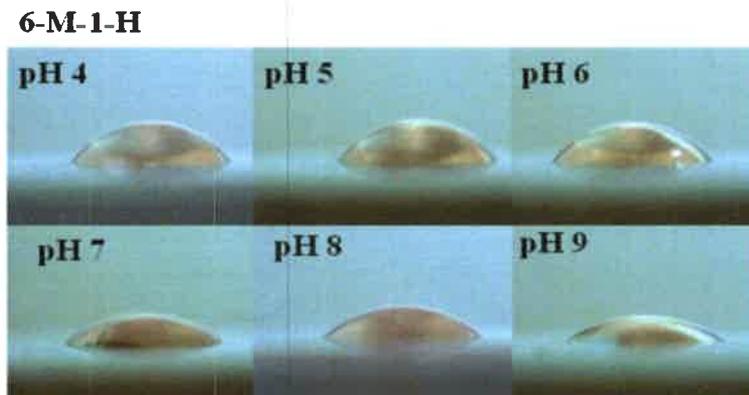


Figura 88. Imágenes de perfiles de gotas para medición de los ángulos de contacto sobre superficies de Au desnudo y modificados con las MAE de 4-MF, 2-MES y 6-M-1-H a diferentes pH.

Los valores de los ángulos de contacto medidos para 2-MES se encontraron entre 45° y 53° , indicando que para esta MAE las propiedades químicas y estructurales son similares a diferentes pH.

En la Figura 89 se presenta la relación entre el $\cos \gamma$ y el pH de las gotas mostradas en la figura anterior y, en el inserto, las curvas diferenciales correspondientes al ajuste de los datos experimentales.

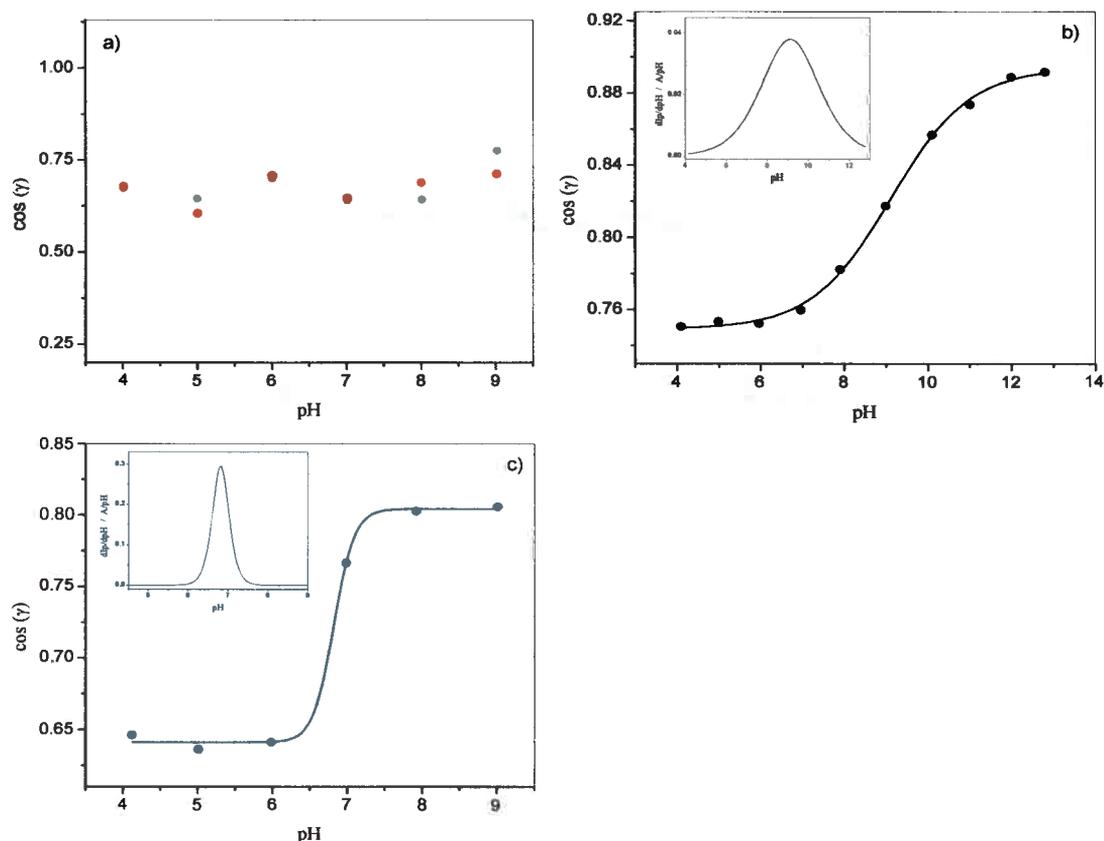


Figura 89. Curvas de titulación: relación entre el $\cos \gamma$ y el pH de la gota. Electrodo: a) (●) Au desnudo y modificados con (●) 2-MES, b) 4-MF y c) 6-M-1-H. En los insertos se muestran las curvas diferenciales correspondientes al ajuste de los datos experimentales.

Las superficies de Au desnudo y 2-MES no se vieron afectadas por el cambio de pH de la gota. A partir del ajuste de los datos experimentales se obtuvieron valores de pK_a de 9,11 y 6,83 para las MAE de 4-MF y 6-M-1-H, respectivamente. Los resultados encontrados para las superficies analizadas son acordes a lo observado mediante VC.

Los valores obtenidos para los ángulos de contacto son mayores a los esperados para superficies ordenadas y compactas^{5,159} (sección 6.1.), lo que reflejaría el grado de desorden de las MAE a todos los pH estudiados, revelando que los grupos terminales no están del todo expuestos a la superficie.¹⁸⁹ Si bien los valores de los ángulos de contacto encontrados no se corresponden con los esperados para MAE altamente ordenadas, los

cambios que se producen con la variación del pH fueron suficientes para la determinación de los pK_a superficiales.

Los valores de pK_a superficiales aparentes, ya sean determinados por titulación electroquímica o ángulo de contacto, son mayores o menores que en solución, según se trate de ácidos o bases, respectivamente. Por ejemplo, el pK_a de 3-MP en solución es 4,9¹⁹¹ y el de CA ($-NH_3^+$) es 10,6,¹²⁷ mientras que para las MAE de estos tioles se obtuvieron valores de 4,99 y 6,56.

El incremento en el pK_a superficial respecto al de solución de un tiol con grupo terminal ácido puede ser atribuido a la formación intermolecular de enlaces puente hidrógeno, lo que provoca que los protones se encuentren más firmemente unidos a la superficie de la MAE, dificultándose la deprotonación.^{60,190,191,194} Además, la deprotonación de una MAE de un ácido es termodinámicamente desfavorable debido a la gran repulsión electrostática que experimentan los grupos ionizados en la interface monocapa/solución.^{180,190} De igual manera, la repulsión entre las cargas positivas de los grupos protonados de tioles con grupos terminales básicos, es energéticamente desfavorable, lo cual facilitaría el proceso de deprotonación y, por ende, la disminución del pK_a superficial respecto al de solución.

El pK_a superficial es sensible al espesor, orden, densidad y características estructurales de la MAE,^{126,127} ya que son factores que afectan la interacción entre los grupos terminales y, por lo tanto, la facilidad con la que se produce el cambio en la carga superficial de la monocapa.⁶⁰ Es por ello que la rugosidad de la superficie también es un aspecto importante.¹⁹⁴ Por lo anterior, se infiere que los pK_a determinados son particularmente válidos para las MAE preparadas bajo determinadas condiciones, sobre una superficie de Au policristalino con un dado factor de rugosidad.

6.5. CONCLUSIONES

En general, los valores de θ altos encontrados estarían manifestando que los defectos estructurales de las MAE, más que los huecos, son en gran medida responsables del comportamiento observado en los distintos medios estudiados.

Por otra parte, se observó que la naturaleza de los grupos terminales de los diferentes tioles tiene influencia sobre la respuesta de desorción oxidativa y reductiva de las monocapas y la facilidad de transferencia electrónica, dejando en evidencia que juega un rol importante en las estructuras de las MAE. Se encontró que para los tioles alifáticos, el cubrimiento superficial, el orden, la compactibilidad y la resistencia a la transferencia de carga aumentan con el incremento del largo de la cadena y la disminución del tamaño del grupo terminal, esto es, 2-MES < 6-M-1-H < DDT. En cuanto a los tioles aromáticos, si bien se encontró que la MAE de 4-MF es levemente más compacta, con BT se logra mayor cubrimiento superficial y orden, así como también menor resistencia a la transferencia de carga.

Además, los resultados obtenidos demuestran que, para determinadas superficies modificadas, es posible controlar el estado de carga de las moléculas del tiol que conforman la monocapa variando el pH del medio.

Capítulo 7

Desarrollo de métodos electroanalíticos

A partir de los estudios realizados, se eligieron las MAE formadas por 4-MF y 2-MES como tioles para la implementación de posibles sensores, con el fin de su aplicación en el desarrollo de métodos electroanalíticos para la cuantificación de FIS. Como se mencionó anteriormente, ambos tioles son de importancia analítica ya que sobre MAE de 4-MF FIS muestra adsorción al igual que sobre la superficie de electrodos de carbono vítreo, pero evitando la pasivación, mientras que sobre la superficie de Au modificada con 2-MES, FIS presenta una respuesta difusional.

En este capítulo se muestran los estudios realizados en el desarrollo de los métodos electroanalíticos.

7.1. DESARROLLO DE UN MÉTODO ELECTROANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE Fisetina EMPLEANDO MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS DE 4-MERCAPTOFENOL

7.1.1. Elección de las condiciones óptimas de trabajo

Como se describió anteriormente, FIS muestra adsorción espontánea (Figura 46) sobre el electrodo modificado con 4-MF. Cuando se tiene una señal correspondiente a una adsorción, se deben determinar el t_{ac} óptimo y verificar la influencia de la aplicación de un potencial al proceso de adsorción, de esta manera se optimiza el método, obteniéndose la máxima sensibilidad. En el caso de las MAE el t_{mod} del electrodo aparece como otra variable que puede afectar la señal. Por lo tanto, en primer lugar se estudiaron estas variables para el desarrollo del método electroanalítico. Las medidas se realizaron empleando VOC como técnica electroquímica, dadas las ventajas que se conoce que posee esta técnica a la hora de ser utilizada con fines cuantitativos.^{43,110,155,157}

En primer lugar, se llevaron a cabo los estudios variando el potencial de acumulación, E_{ac} , entre -0,100 y 0,100 V. Los resultados obtenidos demostraron que no existen cambios significativos en la respuesta con los diferentes E_{ac} aplicados. Sí pudo observarse que la aplicación de un E_{ac} favorece el fenómeno de adsorción, si se lo

compara con la señal obtenida a circuito abierto. Por lo tanto, se seleccionó 0,100 V como E_{ac} .

Por otra parte, se observa un incremento en la señal de adsorción de FIS con el t_{ac} , como se muestra en la Figura 90. Los voltamperogramas de onda cuadrada se obtuvieron luego de dejar sumergido el electrodo en la solución de FIS durante un determinado tiempo, registrando la respuesta en la misma.

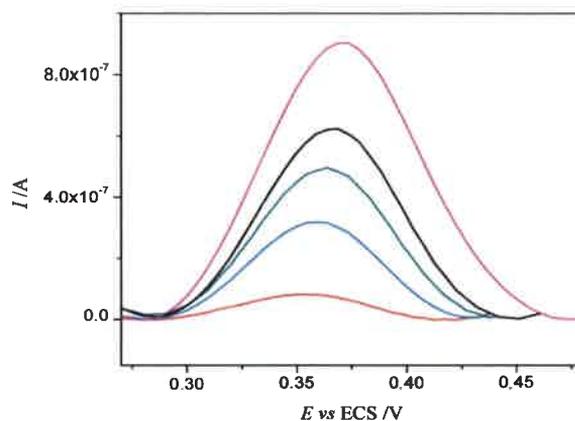


Figura 90. Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en solución de FIS a distintos t_{ac} . $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-6} M$. $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$, $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4. $t_{ac} = (-) 15 \text{ s}$, $(-) 300 \text{ s}$, $(-) 600 \text{ s}$, $(-) 900 \text{ s}$, $(-) 1200 \text{ s}$.

En la Figura 91 se muestran los estudios realizados variando el t_{ac} y el t_{mod} ; se presenta la variación en la respuesta ($I_{p,n}$) de FIS para diferentes t_{ac} y t_{mod} del electrodo. Se observó que para $t_{mod} = 60 \text{ min}$, la $I_{p,n}$ alcanza un valor constante a partir de aproximadamente 900 s. Si bien al disminuir el t_{mod} del electrodo se ve favorecida la respuesta, el valor constante en la $I_{p,n}$ se alcanzaría a un t_{ac} demasiado elevado. Se presenta entonces una situación de compromiso entre la rapidez y la sensibilidad de la determinación. Dadas estas condiciones, se consideró como óptimo desde el punto de vista analítico la selección de $t_{ac} = 900 \text{ s}$ para $t_{mod} = 60 \text{ min}$.

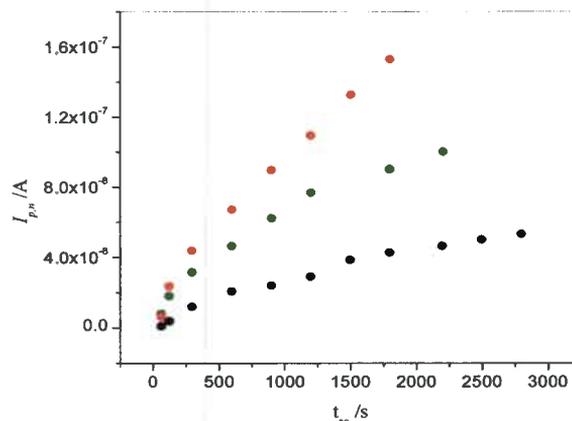


Figura 91. Dependencia de $I_{p,n}$ con t_{ac} a distintos t_{mod} . $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-8}$ M. $E_{ac} = 0,100$ V. $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. $t_{mod} = (\bullet)$ 15 min, (\bullet) 30 min y (\bullet) 60 min. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4.

Finalmente, las condiciones de trabajo seleccionadas son: $E_{ac} = 0,100$ V, $t_{mod} = 60$ min y $t_{ac} = 900$ s.

7.1.2. Curva de calibración de fisetina mediante voltamperometría de onda cuadrada

Se procedió a la construcción de curvas de calibración empleando los parámetros óptimos seleccionados y la VOC como técnica electroquímica. Los voltamperogramas se obtuvieron luego de dejar sumergido el electrodo en la solución de FIS, registrando la respuesta en la solución del blanco.

La Figura 92 a muestra las respuestas obtenidas mediante VOC para distintas c_{FIS}^* y la Figura 92 b, la correspondiente curva de calibración.

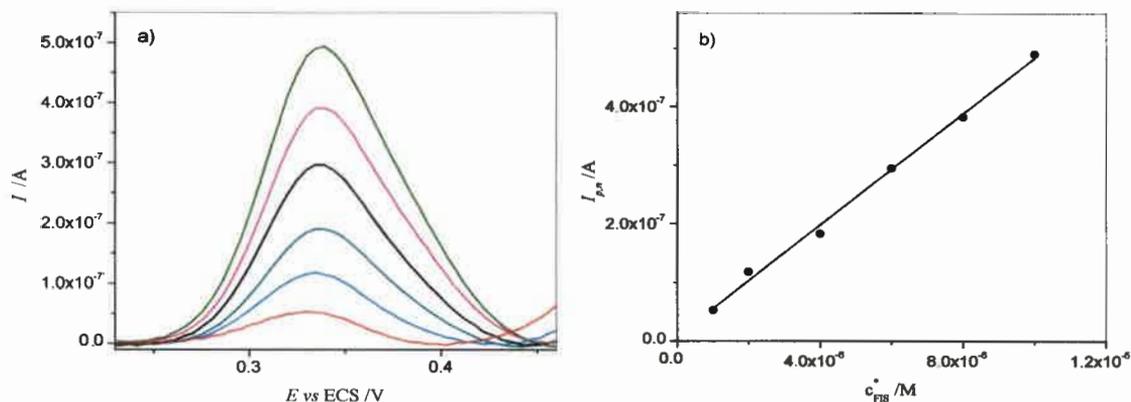


Figura 92. a) Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en solución del blanco, luego de haber dejado el electrodo sumergido en soluciones de distintas c_{FIS}^* . $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4. b) Dependencia de $I_{p,n}$ con c_{FIS}^* . $r = 0,9975$. $t_{ac} = 900$ s.

Se obtuvo un intervalo lineal entre 1×10^{-6} y 1×10^{-5} M. La recta de regresión lineal obtenida mediante un procedimiento de ajuste por cuadrados mínimos fue:

$$I_{p,n} = (0,063 \pm 0,001) c_{FIS}^* + (1,8 \pm 0,8) \times 10^{-8} \quad r = 0,9988$$

La concentración más baja medida para una relación señal:ruido de 3:1 fue 5×10^{-7} M, lo cual corresponde a 0,143 ppm.

Se encontró que el electrodo puede ser reutilizado si se lo deja un determinado tiempo en la solución del blanco. De esta manera, se llevaron a cabo estudios de repetibilidad realizando medidas de curvas de calibración con un mismo electrodo modificado. Para ello, luego de la construcción de la primera curva, el electrodo se guardó a 4 °C en contacto con una solución de blanco (15 % de DMSO + 85 % de solución reguladora de pH 4) hasta el día siguiente, con el fin de producir la desorción de FIS adsorbida en la MAE y realizar así una segunda curva. A partir de las pendientes de las curvas de calibración se calculó la desviación estándar relativa porcentual entre las medidas realizadas, la cual fue del 1,3 %.

La reproducibilidad se determinó a partir de cinco medidas realizadas con electrodos diferentes, es decir, el electrodo fue modificado cada vez. De las pendientes de las curvas de calibración se obtuvo una desviación estándar relativa porcentual del 1,6 %.

7.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO ELECTROANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE Fisetina EMPLEANDO MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS DEL ÁCIDO 2-MERCAPTOETANOSULFÓNICO

7.2.1. Elección de las condiciones óptimas de trabajo

La respuesta de FIS sobre la MAE de 2-MES, a diferencia de lo observado con 4-MF, está controlada por difusión (Figura 53), siendo la misma altamente reproducible. Bajo estas condiciones sólo se puede variar el t_{mod} y el medio de reacción para encontrar las condiciones experimentales óptimas que le otorguen al método la máxima sensibilidad.

En primer lugar, se realizó un estudio del t_{mod} para la formación de la MAE. Las Figuras 93 a, b y c muestran los resultados obtenidos para $t_{\text{mod}} = 5, 30$ y 60 min, respectivamente. Para cada figura, los voltamperogramas cíclicos mostrados con distintas líneas corresponden a los obtenidos al mismo t_{mod} con distintos electrodos. Si bien el t_{mod} no afecta la señal, se puede observar que a tiempos cortos no se obtiene buena reproducibilidad. Por el contrario, cuando el t_{mod} del electrodo es de 60 min se obtiene prácticamente la misma respuesta con electrodos diferentes. Estos resultados podrían explicarse considerando que tiempos de modificación menores a 60 min no permiten que la monocapa formada se organice de la misma manera cada vez que se generan estas superficies. Se seleccionó, por lo tanto, un $t_{\text{mod}} = 60$ min.

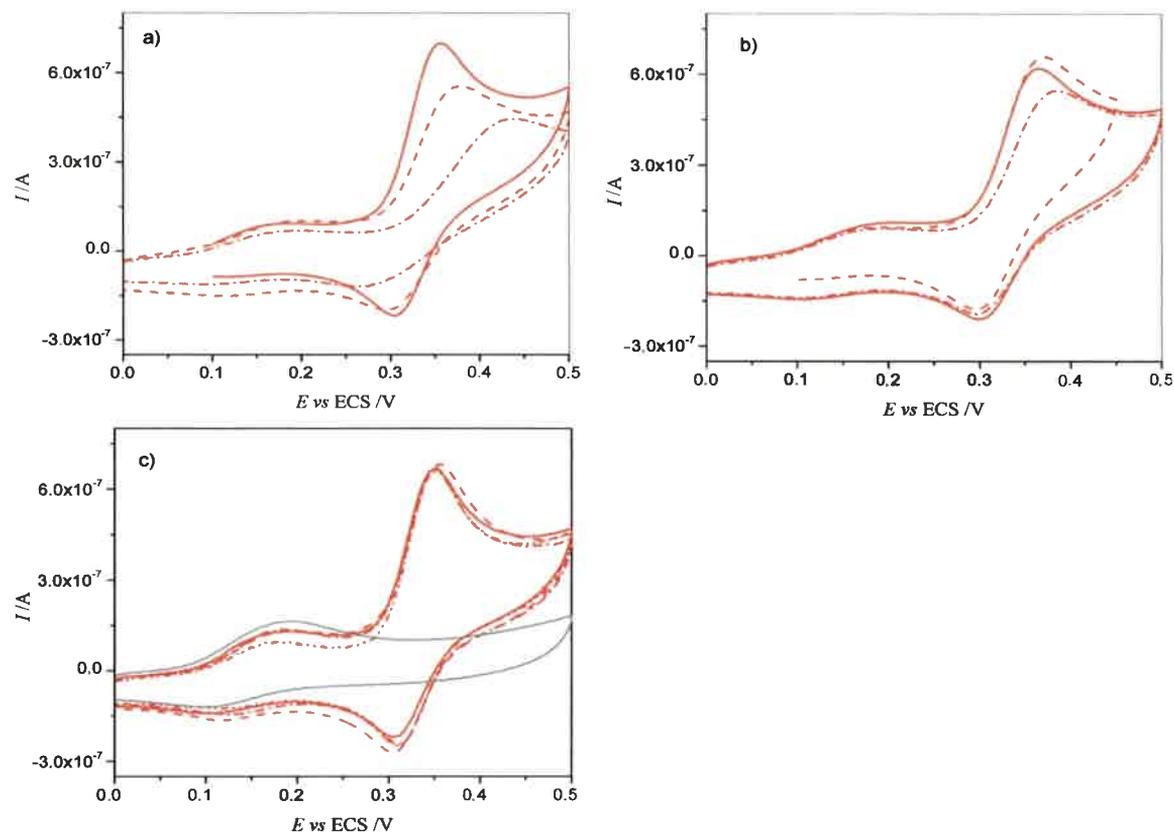


Figura 93. Voltamperogramas cíclicos de FIS registrados con electrodos modificados con 2-MES a distintos $t_{mod} =$ a) 5 min, b) 30 min, y c) 60 min. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Por otro lado, una variable importante a tener en cuenta es el pH del medio ya que, tal como se mencionó, la principal descarga de FIS involucra H^+ . Se realizaron estudios variando el pH del medio. La Figura 94 a muestra los voltamperogramas de FIS obtenidos en presencia de soluciones reguladoras entre pH 2 y 8. Puede observarse que, a medida que aumenta el pH de la solución, se produce un desplazamiento de la señal a potenciales menos positivos. Las respuestas de mayor reversibilidad se logran a pH 3, 4 y 5, mientras que a pH 2, 6, 7 y 8 se insinúa un pico de reducción complementario. Si bien a partir de estos resultados se observa que es factible emplear tanto pH 4 como 5 para los fines planteados, en esta oportunidad se seleccionó pH 5, dado que a este valor se obtiene una respuesta favorable en un intervalo de potencial conveniente.

Además, un gráfico de E_p en función del pH (Figura 94 b) mostró una pendiente de $-(0,063 \pm 0,002)$ V/unidad de pH, lo que concuerda con el valor teórico esperado para una reacción electroquímica en la cual se intercambian igual número de electrones y protones,¹⁹⁶ en este caso $2e^-$ y $2H^+$.

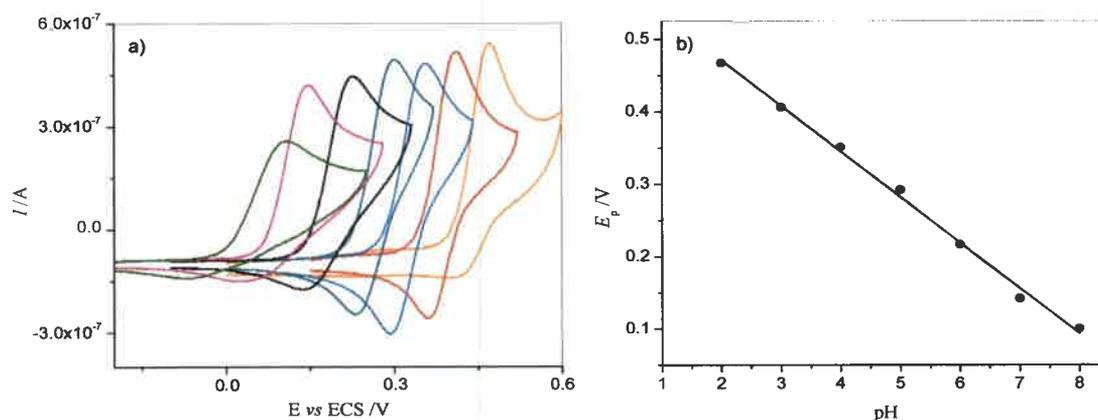


Figura 94. a) Voltamperogramas cíclicos de FIS a diferentes pH, obtenidos sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. pH (-) 2; (-) 3; (-) 4; (-) 5; (-) 6; (-) 7; (-) 8. b) Dependencia de E_p con el pH, $r = 0,9978$. $c_{FIS}^* = 1 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,050$ V s^{-1} .

7.2.2. Curva de calibración de fisetina mediante voltamperometría de onda cuadrada

A fin de determinar FIS cuantitativamente, se procedió a la construcción de curvas de calibración empleando la VOC como técnica electroquímica.

Las Figuras 95 a y b muestran las respuestas obtenidas en VOC para distintas c_{FIS}^* y la correspondiente curva de calibración, respectivamente.

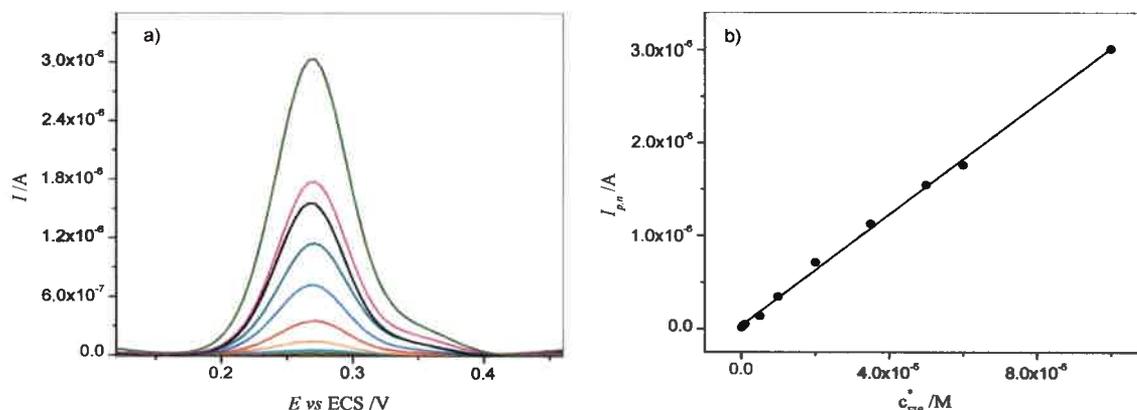


Figura 95. a) Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en soluciones de distintas c_{FIS}^* , obtenidos sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 5. b) Dependencia de $I_{p,n}$ con c_{FIS}^* . $r = 0,9989$.

Se obtuvo un intervalo lineal entre 1×10^{-7} y 1×10^{-4} M. La recta de regresión lineal obtenida mediante un procedimiento de ajuste por cuadrados mínimos fue:

$$I_{p,n} = (0,027 \pm 0,001) c_{FIS}^* + (10 \pm 5) \times 10^{-8} \quad r = 0,9919$$

La concentración más baja medida para una relación señal:ruido de 3:1 fue 1×10^{-7} M, lo cual corresponde a 29 ppb.

Los estudios de repetibilidad se llevaron a cabo realizando cinco curvas de calibración con un mismo electrodo modificado. Las medidas correspondientes a cuatro de las curvas se realizaron de manera consecutiva, lo que fue posible debido al carácter difusional del sistema, que no requiere la recuperación de la superficie, a diferencia de 4-MF. Además, el electrodo no se ve afectado entre las medidas, ya que no ocurren fenómenos de pasivación de la superficie. Luego, el electrodo se guardó a 4 °C en contacto con una solución del blanco y fue utilizado al día siguiente para la realización de la quinta curva de calibración. A partir de las pendientes de las curvas se calculó la desviación estándar relativa porcentual entre las medidas realizadas, la cual fue del 0,5 %.

La reproducibilidad se determinó a partir de cuatro medidas realizadas con electrodos diferentes, es decir, el electrodo fue modificado cada vez. De las pendientes de las curvas de calibración se obtuvo una desviación estándar relativa porcentual del 2,2 %.

7.3. CONCLUSIONES

A partir de las respuestas de fisetina obtenidas con monocapas autoensambladas de diferentes tioles, fue posible encontrar señales adecuadas para el desarrollo de métodos electroanalíticos. De los tioles estudiados, se seleccionaron 4-mercaptófenol y el ácido 2-mercaptoetanosulfónico como posibles sensores, para cada uno de los cuales se desarrolló un método electroanalítico para la cuantificación de fisetina.

En ambos casos se ha logrado obtener curvas de calibración con muy buenos parámetros analíticos, reproducibilidad del método y estabilidad del electrodo modificado, siendo más sensible y reproducible la MAE del ácido 2-mercaptoetanosulfónico por el carácter difusional de la señal.

Capítulo 8

Aplicación: determinación de quercetina en una formulación farmacéutica

El método electroanalítico desarrollado para la determinación de FIS empleando la MAE de 2-MES, se transfirió de manera directa a la determinación de QUER, dada la similitud estructural entre estos flavonoides (Figuras 6 a y b). En este capítulo se muestra la determinación del flavonoide quercetina en una muestra real mediante la aplicación del método electroanalítico y se lo compara con un método de HPLC.

8.1. RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE QUERCETINA

Al igual que en el caso de FIS, la solubilidad de QUER en agua es baja. De acuerdo a su estructura química (Figura 6 b), se espera que QUER presente varios valores de pK_a . Sin embargo, en la literatura se informan sólo tres valores: $pK_{a1} = 7,65$, $pK_{a2} = 9,39$ y $pK_{a3} = 11,51$.¹⁴¹ Éstos fueron obtenidos por extrapolación a partir de medidas realizadas en mezclas metanol/agua debido a su escasa solubilidad en agua. El cuarto pK_a no se han podido obtener con exactitud, siendo el mismo mayor que 12.

La Figura 96 muestra la respuesta de QUER obtenida sobre un electrodo de Au desnudo. El primer voltamperograma cíclico registrado presenta tres ondas de oxidación, cuyas intensidades disminuyen al realizar barridos consecutivos. La señal obtenida para este electrodo es similar a la que presenta sobre electrodos de CV, superficie en la que también se pone de manifiesto un mecanismo de reacción electroquímica complejo.¹⁰⁴

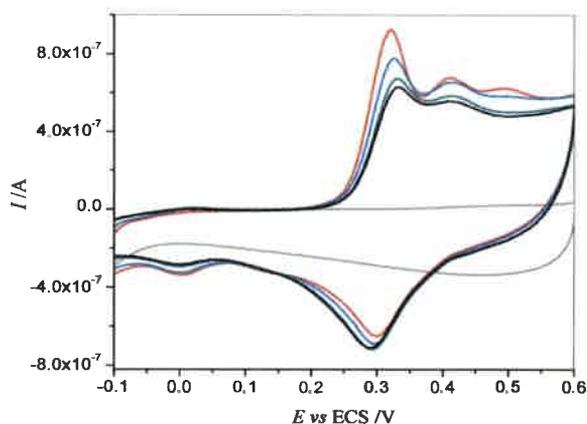


Figura 96. Voltamperogramas cíclicos de QUER consecutivos y el correspondiente blanco, registrados sobre un electrodo de Au desnudo. $c_{QUER}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $\nu = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 20 % DMSO + 80 % solución reguladora de pH 4.

La Figura 97 muestra la señal de QUER sobre un electrodo modificado con 2-MES. Se observa que, al igual que la respuesta de FIS obtenida sobre esta superficie (Figura 58), QUER presenta un solo pico de oxidación, de carácter difusional. Además, al transferir el electrodo a la solución de blanco, luego de registrar voltamperogramas en las soluciones de QUER, no se observaron cambios respecto del blanco inicial. Esto indica que sobre la superficie del electrodo no se produce adsorción de ninguna especie presente en solución.

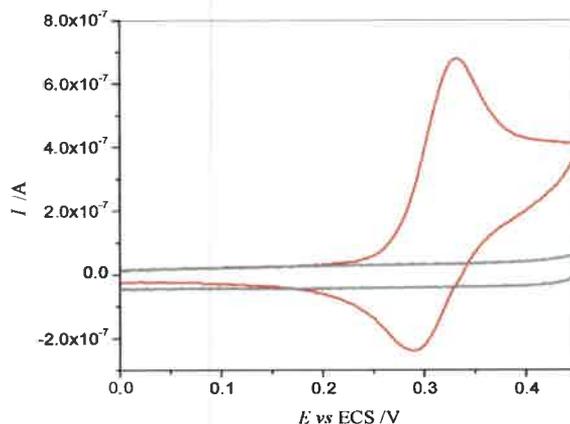


Figura 97. Voltamperogramas cíclicos registrados en solución de QUER y en la solución correspondiente de blanco, sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. $c_{QUER}^* = 1 \times 10^{-4} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$. Medio: 20 % DMSO + 80 % solución reguladora de pH 4.

Para la determinación cuantitativa de QUER se realizaron curvas de calibración en soluciones a pH 4 aplicando VOC. La Figura 98 muestra las respuestas obtenidas para distintas concentraciones y la correspondiente curva de calibración.

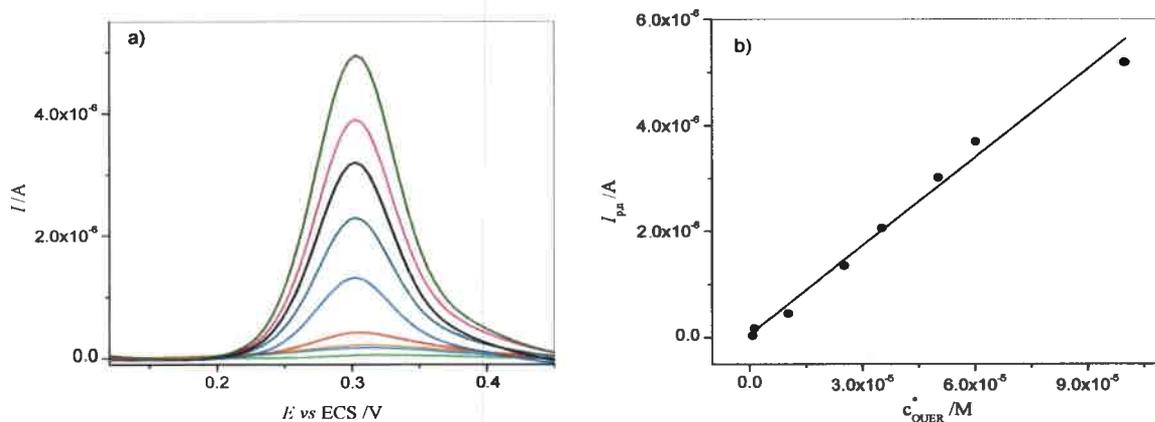


Figura 98. a) Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en soluciones de distintas c_{QUER}^* , sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. $f = 20 Hz$. $\Delta E_e = 0,005 V$, $\Delta E_{oc} = 0,025 V$. Medio: 20 % DMSO + 80 % solución reguladora de pH 4. b) Dependencia de $I_{p,n}$ con c_{QUER}^* . $r = 0,9933$.

Se obtuvo un intervalo lineal entre 1×10^{-7} y 1×10^{-4} M, la recta de regresión lineal obtenida mediante un procedimiento de ajuste por cuadrados mínimos fue:

$$I_{p,n} = (0,056 \pm 0,002) c_{\text{QUER}}^* + (8 \pm 1) \times 10^{-8} \quad r = 0,9933$$

La concentración más baja medida para una relación señal:ruido de 3:1 fue 1×10^{-7} M, lo cual corresponde a 0,034 ppm.

Los estudios de repetibilidad se llevaron a cabo realizando medidas de tres curvas de calibración con un mismo electrodo modificado. Para ello, se realizaron las medidas correspondientes de manera consecutiva, lo que fue posible debido al carácter difusional del sistema. Además, al igual que con FIS, el electrodo no se ve afectado entre las medidas, ya que no ocurren fenómenos de pasivación de la superficie. A partir de las pendientes de las curvas de calibración se calculó la desviación estándar relativa porcentual, la cual fue de 1,5 %.

La reproducibilidad se determinó a partir de medidas realizadas con dos electrodos diferentes, es decir, el electrodo fue modificado cada vez. De las pendientes de las curvas de calibración se obtuvo una desviación estándar relativa porcentual de 0,14 %.

Los valores de desviaciones estándares relativas son comparables con los obtenidos para los métodos electroanalíticos desarrollados para FIS.

8.2. DETERMINACIÓN DE QUERCETINA EN UNA MUESTRA REAL

El método electroanalítico desarrollado para la determinación de FIS y de QUER empleando la MAE de 2-MES, se aplicó a la cuantificación directa de QUER en una formulación farmacéutica comercial. La formulación farmacéutica Artihial (descrita anteriormente) contiene QUER y naringina en proporción de 30 y 10 mg por cada sobre de 30 g, respectivamente, según se declara en el producto. Además, contiene maltodextrina, fructosa, colágeno hidrolizado, ácido cítrico anhidro, sorbato de potasio, ácido hialurónico, aroma de frutos del bosque, acesulfame y celulosa.

En la Figura 99 se muestra la estructura química de naringina.

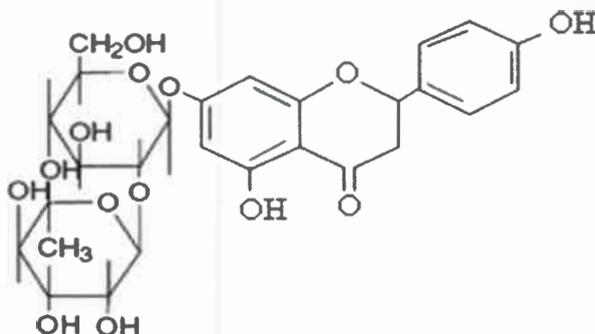


Figura 99. Estructura química del flavonoide naringina.

Con el fin de establecer si naringina es un interferente en la determinación de QUER, se analizó su respuesta sobre el electrodo de Au desnudo y modificado con 2-MES.

Las Figuras 100 a y b muestran los voltamperogramas cíclicos de naringina sobre electrodos de Au desnudo y modificado con 2-MES, respectivamente. Se observa que los voltamperogramas registrados no presentan picos de oxidación entre los potenciales -0,100 y 0,600 V. Este comportamiento se debe a que la naringina no contiene en su estructura al grupo catecol y el C-3 del anillo C no posee el grupo enol, que son los responsables de los picos I y II característicos en los voltamperogramas de FIS y QUER, respectivamente.^{104,142,143}

Se observa, además, que cuando el electrodo no está modificado (Figura 100 a) se produce la pasivación de la superficie. Sin embargo, la pasivación se evita si el electrodo está modificado con 2-MES (Figura 100 b). Por lo tanto, la presencia de naringina no interferiría en la señal electroquímica de QUER obtenida sobre la superficie modificada.

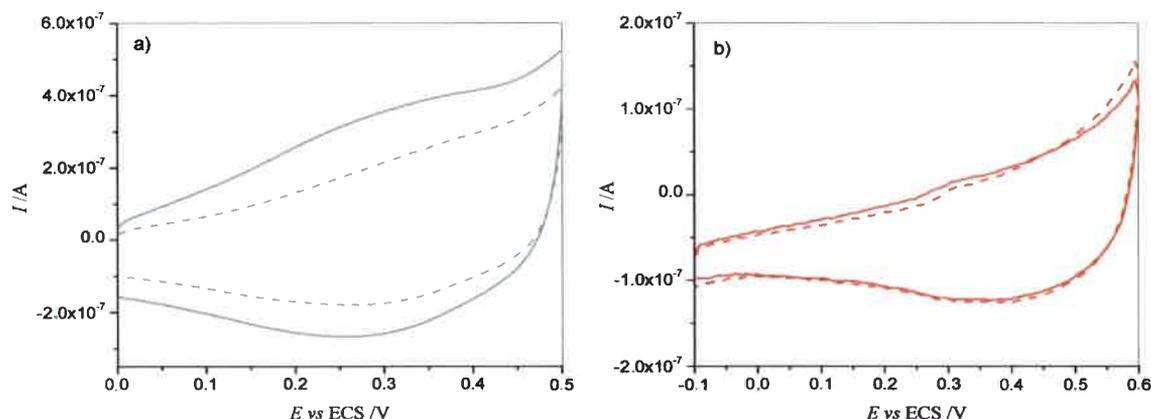


Figura 100. Primer voltamperograma registrado en una solución de naringina (línea continua) y voltamperograma registrado a los 10 min en la misma solución (línea discontinua) sobre un electrodo de Au a) desnudo y b) modificado con 2-MES. $c_{naringina}^* = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. Medio: 20 % DMSO + 80 % solución reguladora de pH 4.

Para la determinación de QUER en la muestra real se disolvió el contenido de un sobre de Artihial en 50 mL de DMSO y se dejó la solución en reposo durante 24 h para producir la decantación de los compuestos insolubles. Las determinaciones fueron realizadas tomando alícuotas de la fracción soluble, llevándolas a un volumen de 10 mL y composición final de 20 % de DMSO + 80 % de solución reguladora de pH 4.

La Figura 101 muestra el voltamperograma de onda cuadrada obtenido en la solución de la muestra, preparada según lo indicado en el párrafo anterior.

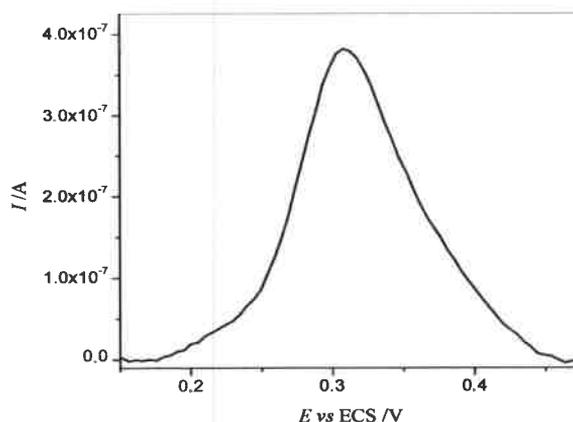


Figura 101. a) Voltamperograma de onda cuadrada registrado en una solución de Artihial, sobre el electrodo de Au modificado con 2-MES. $f = 20 \text{ Hz}$, $\Delta E_e = 0,005 \text{ V}$, $\Delta E_{oc} = 0,025 \text{ V}$. Medio: 20 % DMSO + 80 % solución reguladora de pH 4.

Como puede observarse, el $E_{p,n}$ se corresponde con el de QUER y la señal aumenta al hacer agregados de cantidades conocidas de QUER comercial. Las medidas realizadas en la solución de la muestra no provocaron fenómenos de pasivación ni de adsorción de especies sobre la superficie, lo cual se corroboró registrando voltamperogramas luego de la transferencia del electrodo a una solución de blanco.

A partir de la respuesta obtenida en VOC y de la curva de calibración (Figura 98 b) se determinó una concentración promedio de 29,3 mg de QUER por sobre. El valor determinado corresponde al 97,7 % del valor informado.

8.2.1. Determinación de quercetina mediante HPLC con detección por arreglo de diodos

Con el fin de validar el método electroanalítico, se procedió a realizar la determinación de QUER en la formulación farmacéutica mediante un método alternativo, como HPLC con detección por arreglo de diodos. Para ello, en primer lugar, se registraron los respectivos espectros de absorción UV-Visible de QUER y naringina en metanol.

Condiciones cromatográficas

Como fase móvil se utilizaron las mezclas: agua:ácido acético en proporción 99:1, y metanol:acetonitrilo:ácido acético en proporción 89:10:1, denominadas solvente A y solvente B, respectivamente. La elución se realizó con un método por gradiente, donde la composición inicial fue de 60 % del solvente A, la que fue reducida a 5 % en 30 min, con retorno final a 60 % de solvente A después de 32 min. El intervalo de longitudes de onda fue de 270 a 380 nm. La velocidad de flujo fue de 0,2 mL min⁻¹.

Las soluciones empleadas fueron filtradas y desgasadas. El volumen de inyección de las muestras de QUER, naringina y de la formulación farmacéutica fue de 15 µL.

La Figura 102 muestra los cromatogramas obtenidos para soluciones patrones de QUER y naringina y el correspondiente a una solución mezcla de ambos. Los tiempos de retención, t_R , de naringina y QUER fueron 19,5 y 27,5 min, respectivamente.

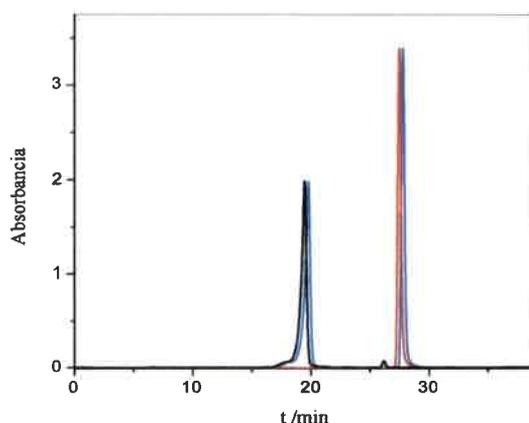


Figura 102. Cromatogramas HPLC de (-) QUER, (-) naringina y (-) la mezcla de ambos. $\lambda = 375 \text{ nm}$. $c_{\text{QUER}}^* = c_{\text{naringina}}^* = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$. $t_{R,\text{QUER}} = 27,5 \text{ min}$, $t_{R,\text{naringina}} = 19,5 \text{ min}$.

Como puede observarse, existe una muy buena resolución de los picos en la mezcla, por lo que se procedió a realizar el calibrado a partir de soluciones patrones de la mezcla de ambos flavonoides.

La Figura 103 muestra el cromatograma de la formulación farmacéutica, en el que el primer pico corresponde a naringina y el tercero a QUER.

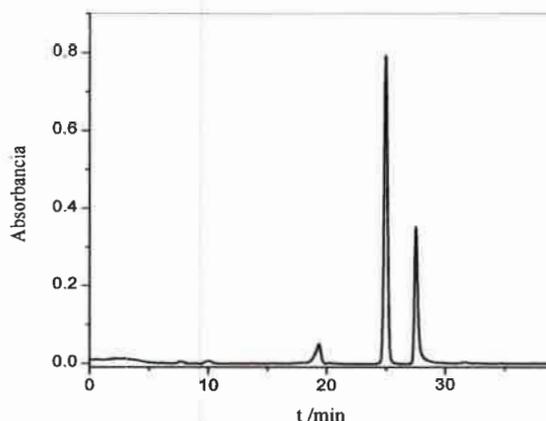


Figura 103. Cromatograma HPLC de la formulación farmacéutica Artihial. $\lambda = 375 \text{ nm}$.

Debido a que mediante esta técnica es posible detectar la presencia de naringina, se decidió llevar a cabo también su cuantificación. En la Figura 104 se muestran las curvas de calibración de QUER y naringina obtenidas. Para la construcción de las curvas se emplearon las áreas debajo de los picos del cromatograma a $\lambda = 375 \text{ nm}$.

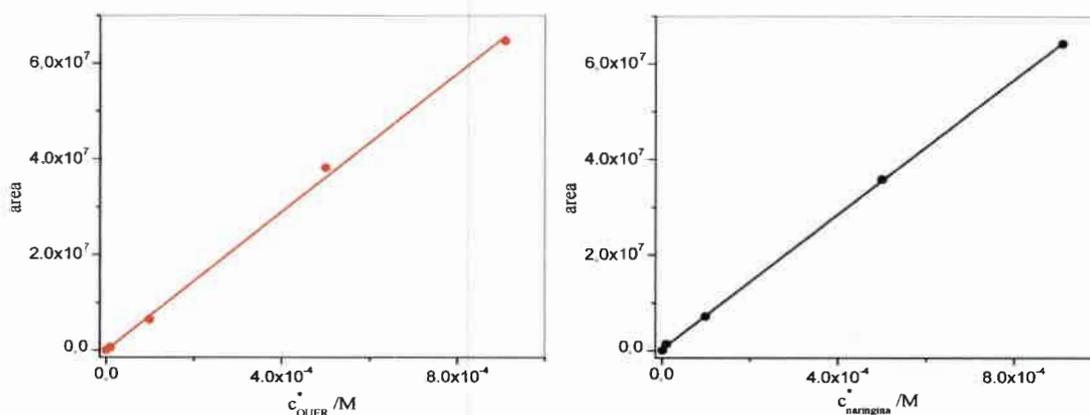


Figura 104. Dependencia de la absorbancia con a) c_{QUER}^* , $r = 0,9988$ y b) $c_{naringina}^*$, $r = 0,9998$. $\lambda = 375 \text{ nm}$. $c_{QUER}^* = c_{naringina}^* = 9,1 \times 10^{-7}$, 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 5×10^{-4} y $9,1 \times 10^{-4} \text{ M}$.

La respuesta fue lineal, para ambas especies, en el intervalo de concentraciones empleadas. Las rectas de regresión lineal obtenidas mediante un procedimiento de ajuste por cuadrados mínimos para QUER y naringina, respectivamente, fueron:

$$\text{área} = (72 \pm 2) \times 10^9 c_{\text{QUER}}^* + (71 \pm 8) \times 10^3 \quad r = 0,9988$$

$$\text{área} = (703 \pm 5) \times 10^8 c_{\text{naringina}}^* + (4 \pm 2) \times 10^5 \quad r = 0,9998$$

A partir de la respuesta obtenida por HPLC y de las curvas de calibración, realizadas por duplicado, se determinó una concentración promedio de 28,9 mg de QUER y de 8,7 mg de naringina por sobre de 30 g de la formulación farmacéutica. Estos valores corresponden a un 96,3 % y 87,0 % de lo declarado en el sobre, respectivamente. El resultado obtenido para QUER concuerda razonablemente bien con el determinado por el método electroanalítico.

8.3. CONCLUSIONES

El método electroanalítico desarrollado para fisetina a partir de monocapas autoensambladas del ácido 2-mercaptoetanosulfónico se transfirió en forma directa a la determinación de quercetina, otro flavonoide de características estructurales semejantes. Por otro lado, fue posible corroborar la validez del método electroanalítico mediante la técnica de HPLC con detección por arreglo de diodos.

La diferencia entre los valores establecidos para la cantidad de QUER presente en la formulación Artihial, hallados mediante las dos técnicas diferentes, fue de 0,4 mg (1,4 %), demostrándose, de esta manera, la equivalencia entre los métodos para la determinación de QUER. Los resultados obtenidos indican que es factible aplicar los métodos desarrollados a la determinación de QUER en muestras reales. En particular, el método electroanalítico demostró ser sencillo, rápido y reproducible.

Capítulo 9

Submonocapas autoensambladas de tioles

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento sobre el estudio de monocapas con el objetivo de obtener un sensor electroanalítico, se concluye que es fundamental la presencia de defectos para poder obtener una respuesta electroquímica. En los últimos años ha surgido un nuevo concepto: submonocapas autoensambladas (sMAE), que constituye una alternativa interesante para la modificación del electrodo y su empleo como sensor. Si bien no existe una definición concreta de submonocapa, se puede considerar que se tiene una submonocapa de tior cuando éste se ha adsorbido sólo en parte de la superficie, de manera que genera los efectos deseados de la presencia de una MAE, sin evitar la descarga del analito. Las superficies generadas presentan un gran número de defectos, condición óptima para la detección electroquímica de analitos orgánicos policíclicos con electrodos metálicos, de manera tal que la adsorción y la velocidad de transferencia de carga del analito se vean favorecidas.^{23,24} Esto ocurre en el límite de una monocapa diluida, es decir, en una submonocapa, ya que los adsorbatos se encuentran rodeados por moléculas de solvente y las restricciones estéricas entre ellos son insignificantes.¹⁹⁷ La obtención este tipo de superficies modificadas requiere trabajar a concentraciones bajas de tior y a tiempos de modificación suficientemente cortos.

Carrillo y col.¹⁹⁸ comprobaron que esta estrategia es útil para analizar electroquímicamente mezclas de aminas aromáticas. Por su parte, Calvente y col. emplearon superficies con cubrimientos extremadamente bajos (concentraciones de tior por debajo de milimolar) en el desarrollo de un tratamiento unificado de voltamperometrías de “stripping” y de monocapas,^{197,199} en el análisis de los efectos de la solvatación hidrofóbica de interfaces⁵⁸ y en la investigación de la organización interfacial en la formación de la monocapa.^{122,197}

Con el fin de obtener un gran número de defectos superficiales se procedió al estudio de sMAE de tioles.

En este capítulo, se muestra el procedimiento para la obtención de sMAE y el desarrollo de un método electroanalítico para la determinación de FIS, empleando sMAE. Puesto que la respuesta voltamperométrica de la mayor parte de los antioxidantes está ligada a la oxidación de grupos fenólicos, para el estudio de sMAE se eligió como cupla modelo la oxidación electroquímica del catecol. Los tioles empleados en esta etapa son 4-MF, 2-MES, BT y HT (hexanotior).

9.1. FORMACIÓN DE SUBMONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS

Como se mencionó anteriormente, para obtener sMAE se requiere trabajar a concentraciones de tiol (c_{tiol}) bajas y a t_{mod} suficientemente cortos. Inicialmente, la formación se llevó a cabo por el método más simple, que consiste en la adsorción espontánea de tiol sobre la superficie del electrodo a partir de la inmersión de éste en una solución etanólica, tal como se procedió en la formación de MAE (sección 3.2.2.1.3.). Bajo estas condiciones se encontró que las sMAE no eran reproducibles, con lo cual se procedió a aplicar el método potencioestático para su formación. El proceso de adsorción electro-asistida es muy rápido²⁰⁰ y permite un mayor control del ensamblado molecular,¹²⁵ ayudando a la organización de la monocapa.²⁰⁰ Este fenómeno puede influir en varios parámetros importantes, tales como la orientación molecular, el anclaje de cabeza de grupo y las propiedades de adsorción.¹²⁵

La Figura 105 muestra el esquema de modificación para el método potencioestático. El procedimiento consistió en la modificación electroquímica del electrodo de Au inmerso en una solución de tiol en KOH 1,00 M etanólico. Antes de la modificación propiamente dicha, se aplicó un salto de potencial de -1,300 V durante un dado tiempo, denominado tiempo de desorción (t_d), con el fin de desorber las moléculas de tiol adsorbidas espontáneamente. Este procedimiento se realizó para tener un mayor control del proceso de modificación, logrando reproducibilidad en el mismo, ya que la aplicación inicial de un t_d iguala las condiciones en las que se encuentra la superficie del electrodo al momento de proceder a la modificación. Posteriormente, se aplicó un salto de potencial de -0,600 V durante un determinado t_{mod} . Una vez obtenida la sMAE de la manera descrita, el electrodo se enjuagó con etanol y, luego, con abundante agua destilada y se transfirió a una celda conteniendo la solución de analito, donde se registró su respuesta.

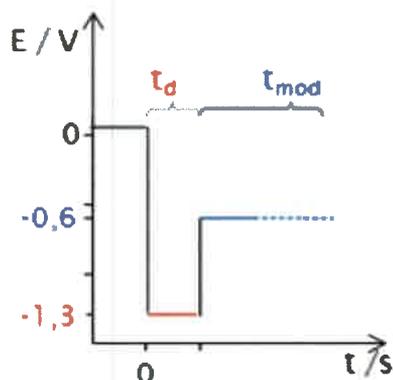


Figura 105. Esquema de modificación electroquímica del electrodo de Au en solución de tiol en KOH 1,00 M etanólico.

El método de modificación descrito, según el cual se transfiere el electrodo de una celda a otra, es el que se utiliza habitualmente. Dado que, para obtener SMAE se emplean c_{tiol} muy bajas, se decidió trabajar también en una única celda donde se llevara a cabo la modificación y el registro del voltamperograma cíclico del analito, de manera tal de evitar así la transferencia del electrodo.

En la Figura 106 se muestra el procedimiento seguido para la modificación realizada en presencia del analito. Al electrodo inmerso en una solución de tiol y FIS en 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4, se le aplicaron saltos de potencial como se describió anteriormente en la Figura 105. En este medio de reacción, al aplicar un potencial de -1,300 V para la desorción de las moléculas adsorbidas espontáneamente, se genera H_2 sobre la superficie del electrodo. Para liberar el H_2 , antes de llevar a cabo la modificación el electrodo de Au se agitó suavemente, sin desconectar la celda. A diferencia del método descrito en la Figura 105, donde el medio de modificación es básico, en este caso se emplea una solución reguladora de pH 4. Por cada unidad de pH se considera que se produce una variación de 0,060 V en el potencial del sistema, con lo cual, para asegurar la equivalencia en las condiciones de modificación, el potencial de modificación (E_{mod}) aplicado en este medio fue -0,200 V en lugar de -0,600 V. Los voltamperogramas cíclicos de FIS fueron registrados a continuación. El uso de una concentración de tiol baja asegura que la difusión libre de las moléculas de tiol no interfiera con la señal electroquímica generada.¹⁹⁷

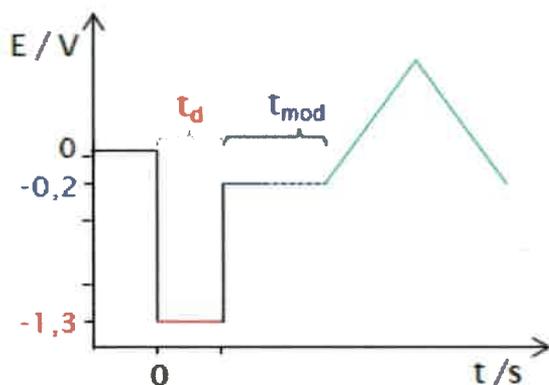


Figura 106. Esquema de modificación electroquímica del electrodo de Au en la solución de tiol y FIS en 15 % DMSO + solución reguladora de fosfatos de pH 4.

En ambos métodos, los tiempos de desorción y de modificación se variaron dependiendo del experimento realizado y se indican en las figuras correspondientes. Las soluciones de tiol empleadas para la formación de SMAE fueron de concentraciones comprendidas entre 5 y 200 μM .

Para poder correlacionar la respuesta voltamperométrica con la composición superficial, se llevaron a cabo experimentos adicionales de desorción reductiva en disoluciones de KOH 1,00 M en etanol, pudiendo establecerse una relación cuantitativa entre el t_{mod} del electrodo y la concentración o el cubrimiento superficial del tiol. En la Figura 107 se muestran las distintas curvas de Γ y θ obtenidas en función del t_{mod} . Para la obtención de los gráficos se integró el voltamperograma cíclico en el rango de potencial completo y se consideró el área electroquímica del electrodo de Au policristalino (determinada como se indica en la sección 3.2.2.1.2.) para los cálculos correspondientes, según la ec. 36. El cubrimiento superficial se calculó de la relación entre la concentración superficial obtenida y la de una monocapa compacta.

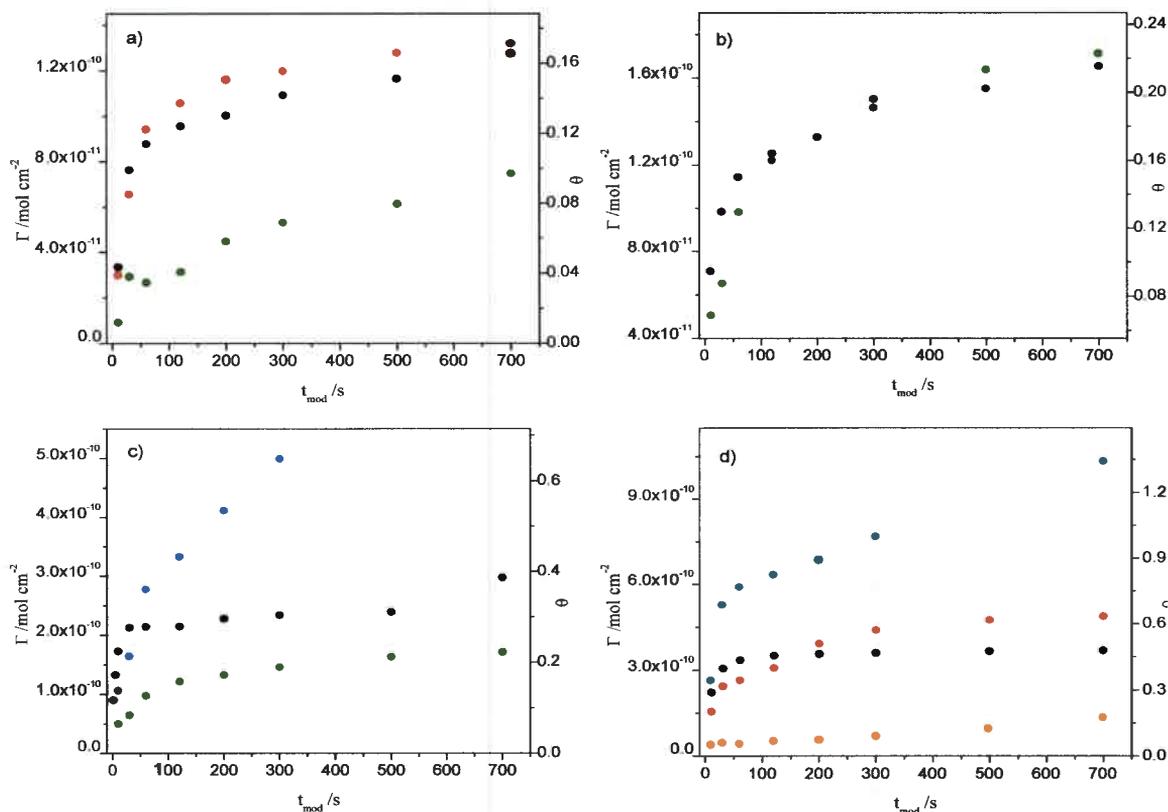


Figura 107. Curvas de concentración superficial, Γ (mol cm⁻²), y de cubrimiento superficial, θ , en función del t_{mod} (s). a) 4-MF, b) 2-MES, c) BT, d) HT. $c_{tioles} = (\bullet) 1 \mu\text{M}$, $(\bullet) 5 \mu\text{M}$, $(\bullet) 10 \mu\text{M}$, $(\bullet) 30 \mu\text{M}$, $(\bullet) 50 \mu\text{M}$, $(\bullet) 100 \mu\text{M}$.

Las curvas de concentración y/o cubrimiento superficial brindan información acerca de la superficie del electrodo, dando a conocer si se tiene sMAE o MAE. En realidad, no existe un límite exacto entre un tipo de cubrimiento y otro. Además, el número de moléculas que pueden adsorberse sobre la superficie del electrodo para formar una monocapa es dependiente del tamaño de las mismas.⁴³

Como puede observarse, cuando el electrodo se modifica con 4-MF y 2-MES, θ no supera el valor de 0,24 bajo todas las condiciones de trabajo empleadas. En el caso de BT y sobre todo en el de HT, los cubrimientos superficiales son mucho mayores. Se ha probado que hasta una concentración superficial máxima aproximadamente de $3,4 \times 10^{-10}$ ($\theta = 0,44$) los tioles no se encuentran orientados perpendicularmente sobre la

superficie del electrodo.⁷ Teniendo en cuenta lo anterior, se puede considerar que por encima de $\theta \sim 0,4$ o $0,5$ se obtienen monocapas, para BT el límite corresponde a $c_{tio1} = 3,5 \times 10^{-10} \mu\text{M}$ a $t_{\text{mod}} = 120$ s y para HT está marcado por la curva hallada para $c_{tio1} = 30 \mu\text{M}$, mientras que por debajo de estos valores sería posible la obtención de submonocapas sobre la superficie.

Por lo tanto, al momento de llevar a cabo la modificación del electrodo es posible seleccionar las condiciones experimentales adecuadas, de manera tal de obtener la superficie deseada.

9.2. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE CATECOL

La Figura 108 muestra la respuesta de catecol obtenida sobre un electrodo de Au desnudo en la región de potenciales entre $-0,100$ y $0,550$ V. El comportamiento observado es el conocido, un proceso redox reversible, el cual involucra $2e^-$ y $2H^+$.^{201,202}

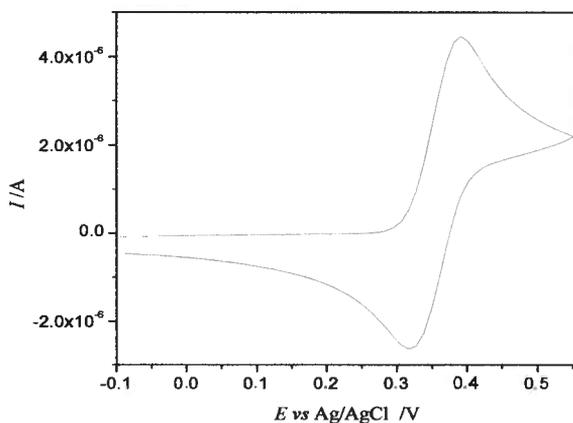


Figura 108. Voltamperograma cíclico de catecol sobre un electrodo de Au sin modificar registrado en 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4. $c_{\text{catecol}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

La Figura 109 muestra las respuestas de catecol obtenidas sobre MAE de los diferentes tioles, en comparación con la correspondiente a Au sin modificar.

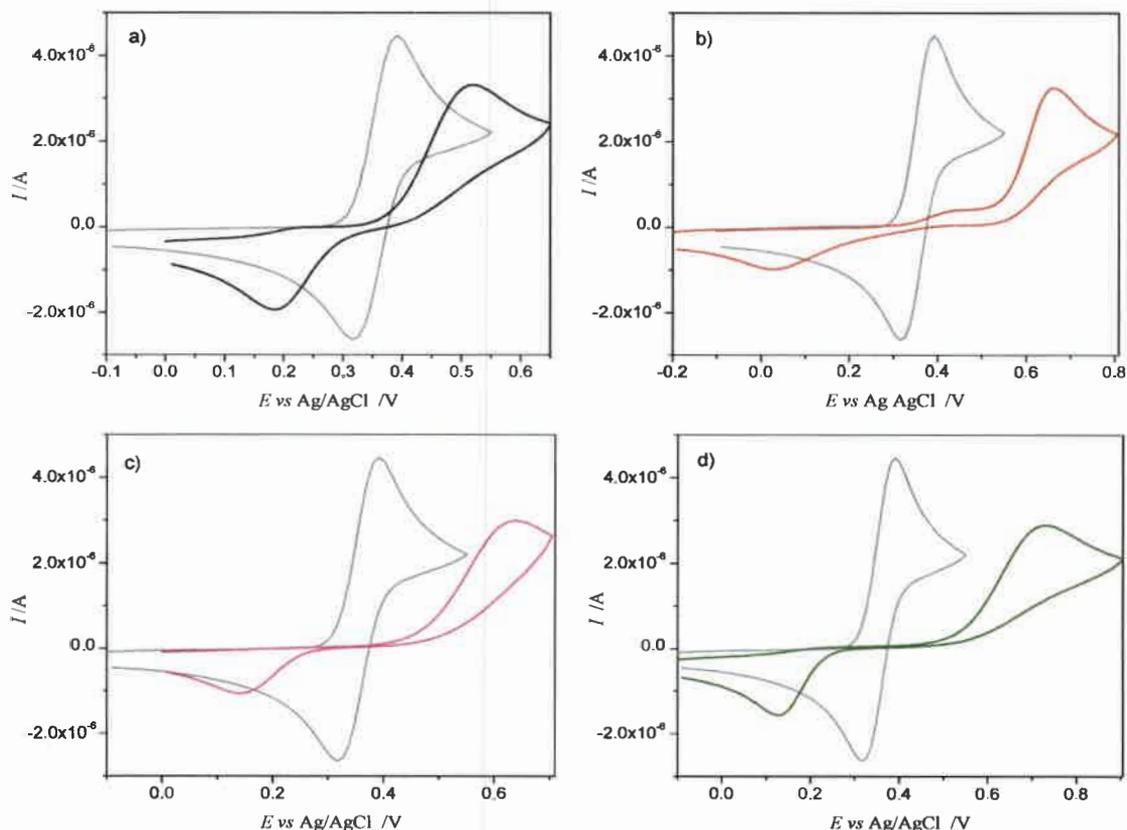


Figura 109. Voltamperogramas cíclicos de catecol sobre Au (-) sin modificar y modificado con a) 4-MF, b) 2-MES, c) BT y d) HT. $c_{\text{tiol}} = 5 \text{ mM}$. $t_{\text{mod}} = 60 \text{ min}$. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4. $c_{\text{catecol}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

Como puede apreciarse, la presencia de la MAE produce la separación entre los potenciales de pico y la disminución en la intensidad de la corriente del catecol, lo que indica que la respuesta se ve desfavorecida en todos los casos. Se observa que la disminución de la velocidad de oxidación es más marcada en el caso de los tioles alifáticos que en el de los aromáticos, sugiriendo para estos últimos una mejor conducción electrónica a través de los anillos aromáticos de las moléculas del tiol adsorbidas.

9.3. COMPORTAMIENTO DE CATECOL SOBRE SUBMONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS

La Figura 110 muestra la respuesta de catecol sobre las sMAE obtenidas según el esquema de modificación presentado en la Figura 105. Tal como se describió, luego de la modificación potenciostática, el electrodo se enjuagó y se transfirió a una celda conteniendo la solución del analito, donde se registró el correspondiente voltamperograma cíclico. Se muestran las respuestas obtenidas a distintos t_{mod} para soluciones de tiol de concentración $5 \mu\text{M}$.

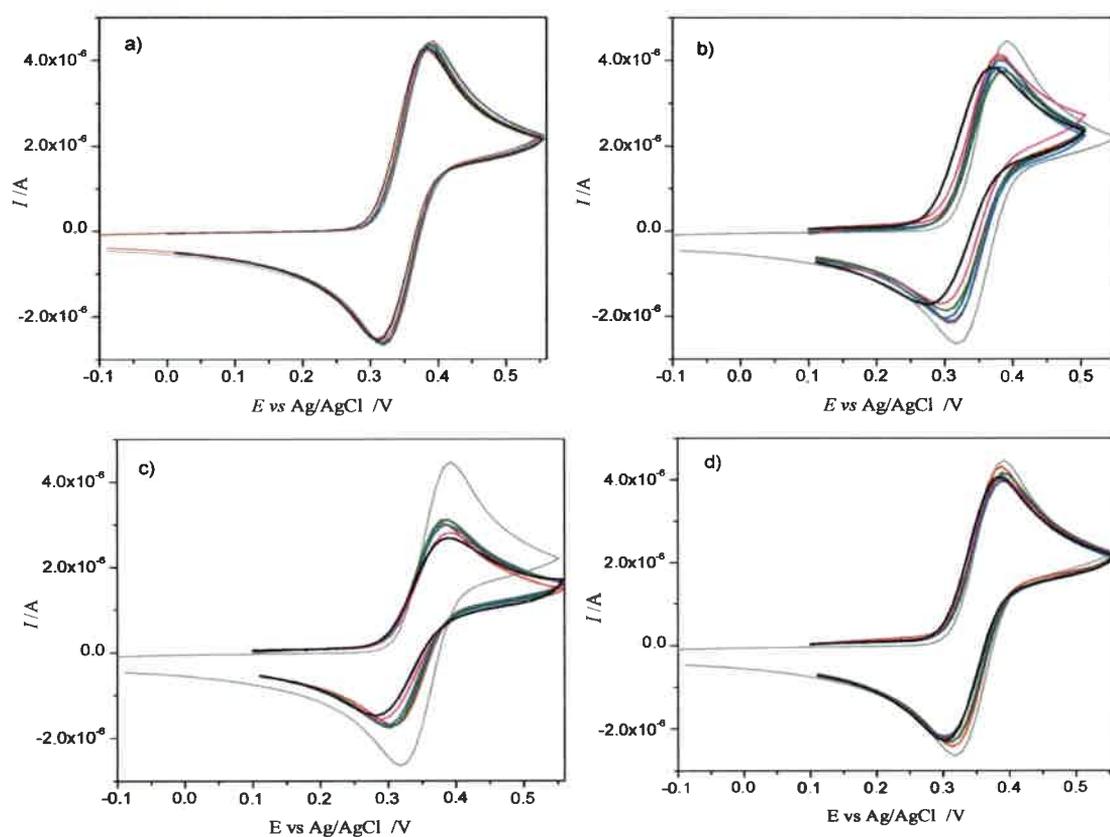


Figura 110. Voltamperogramas cíclicos de catecol sobre electrodos de Au modificados con a) 4-MF, b) 2-MES, c) BT y d) HT. $c_{\text{tiol}} = 5 \mu\text{M}$ en solución de KOH $1,00 \text{ M}$. $c_{\text{catecol}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. (-) Au desnudo, $t_{\text{mod}} = (-) 10 \text{ s}$, $(-) 30 \text{ s}$, $(-) 60 \text{ s}$, $(-) 120 \text{ s}$, $(-) 200 \text{ s}$, $(-) 300 \text{ s}$, $(-) 700 \text{ s}$.

Puede observarse que, excepto para BT para el cual la señal de catecol disminuyó notablemente, se observa que los voltamperogramas cíclicos sobre las sMAE son similares al registrado sobre el electrodo de Au desnudo. Además, la respuesta de catecol no presenta cambios significativos con la variación del t_{mod} . Puede concluirse entonces que, cuando el tiol no cubre totalmente la superficie del electrodo, es factible obtener una respuesta similar a la del electrodo de Au desnudo, lo que puede resultar de gran interés en el estudio de analitos cuyas respuestas electroquímicas sean complejas, dado que la presencia de la sMAE quizás pueda evitar o inhibir los procesos de pasivación, sin afectar la respuesta electroquímica de interés.

La Figura 111 muestra la respuesta de catecol obtenida para sMAE de cada uno de los tioles a concentraciones 10 o 30 μM y distintos t_{mod} , utilizando el procedimiento descrito en la Figura 106.

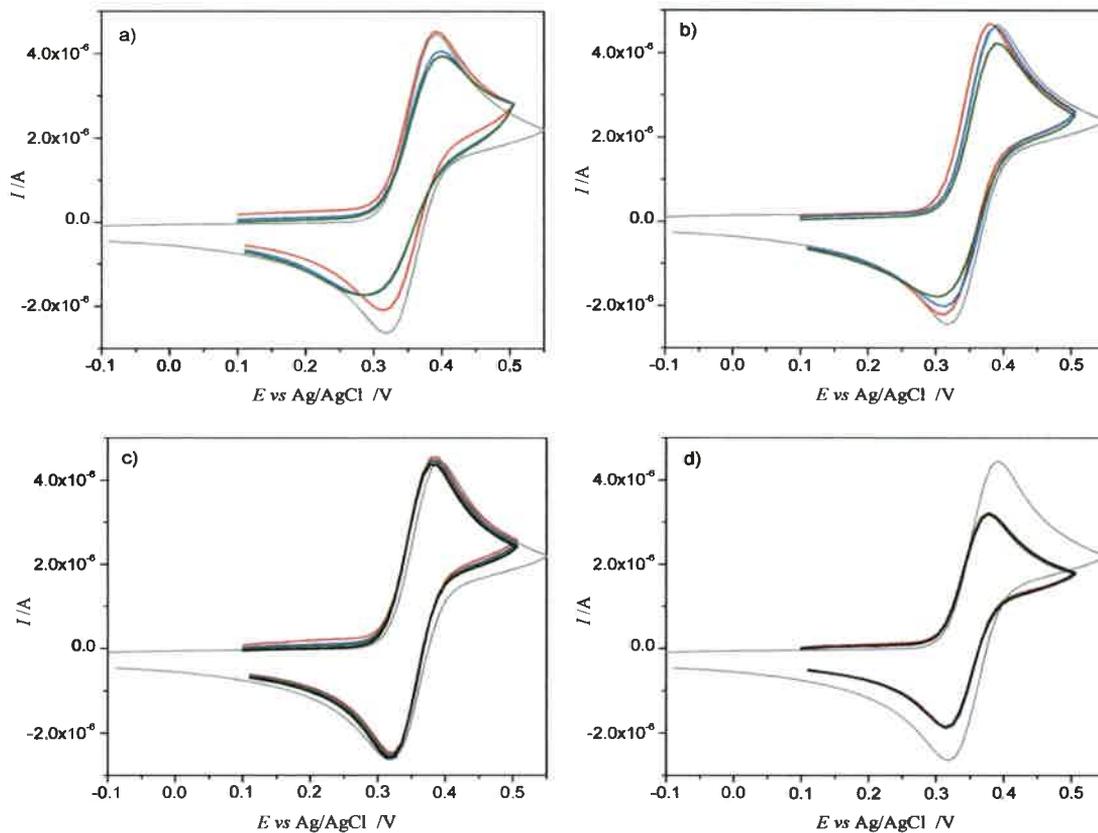


Figura 111. Voltamperogramas cíclicos de catecol sobre electrodos de Au modificados con a) $10 \mu\text{M}$ 4-MF ($t_d = 40 \text{ s}$), b) $30 \mu\text{M}$ 2-MES ($t_d = 20 \text{ s}$), c) $10 \mu\text{M}$ BT ($t_d = 20 \text{ s}$) y d) $10 \mu\text{M}$ HT ($t_d = 10 \text{ s}$). $c_{\text{catecol}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. (-) Au desnudo, $t_{\text{mod}} =$ (-) 10 s , (-) 30 s , (-) 60 s , (-) 120 s , (-) 300 s .

Puede observarse que, con la metodología de trabajo aplicada, las respuestas prácticamente no se ven afectadas. Esto indica que la presencia del tiol en la celda y la formación de la sMAE sobre la superficie del electrodo, no producen variaciones en la respuesta con respecto a la que se obtiene sobre electrodos de Au sin modificar. Sólo se observa una disminución en la intensidad de la corriente para HT, y un aumento para el BT, si se las compara con las obtenidas cuando se realiza la transferencia del electrodo para el registro de los voltamperogramas (Figura 110). Lo encontrado para HT puede deberse a que la concentración de tiol empleada en ambos experimentos es diferente, siendo mayor en el último caso, donde la superficie se encuentra más cubierta por el

tiol, tendiendo a bloquear la misma, resultado esperado considerando que se trata de un alcanotiol. Una situación contraria ocurre con BT, que favorece la descarga en un dado intervalo de concentración de tiol.

9.3.1. Estudio de la respuesta de catecol empleando una única celda

4-mercaptofenol

La Figura 112 muestra la señal de catecol en presencia de SMAE de 4-MF. En este caso, se observa que la respuesta no se desfavorece sólo si se trabaja a concentraciones de tiol de $10 \mu\text{M}$ y a t_{mod} muy pequeño (10 s), condición bajo la cual la concentración superficial es de $3 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$.

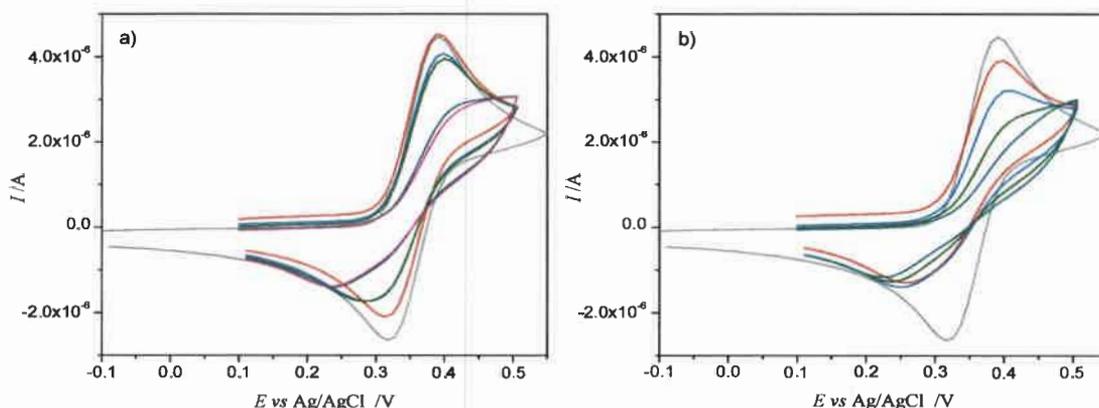


Figura 112. Voltamperogramas cíclicos de catecol sobre electrodos de Au modificados con 4-MF. a) $c_{\text{tiol}} = 10 \mu\text{M}$, b) $c_{\text{tiol}} = 50 \mu\text{M}$. $c_{\text{catecol}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. $t_d = 40 \text{ s}$. (-) Au desnudo, $t_{\text{mod}} =$ (-) 10 s, (-) 30 s, (-) 60 s, (-) 120 s, (-) 200 s.

Aunque en todo el intervalo de t_{mod} (Figura 107 a) Γ se mantiene por debajo de $1,4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ para concentraciones de tiol menores a $30 \mu\text{M}$, según la Figura 112 a, valores mayores a $6 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ ($\theta = 0,078$) muestran influencia sobre la respuesta de catecol.

Ácido 2-mercaptoetanosulfónico

La Figura 113, por su parte, muestra la señal de catecol en presencia de SMAE de 2-MES. En este caso, la respuesta no se ve afectada cuando se trabaja a una concentración de hasta 50 μM de tiol, siempre que el t_{mod} esté por debajo de los 100 s, ya que puede observarse que, a pesar de trabajar a una concentración 30 μM de tiol, cuando el t_{mod} es de 300 s la respuesta comienza a inhibirse.

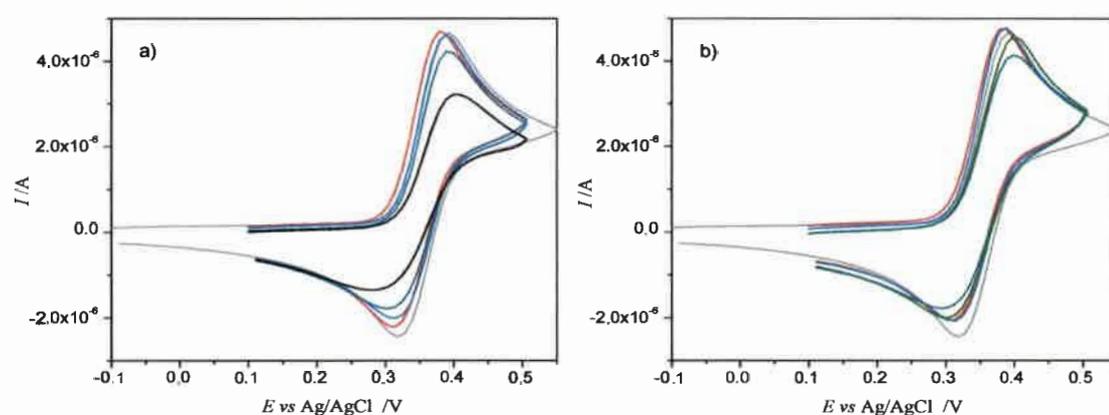


Figura 113. Voltamperogramas cíclicos de catecol sobre electrodos de Au modificados con 2-MES. a) $c_{\text{tiol}} = 30 \mu\text{M}$ ($t_d = 20 \text{ s}$), b) $c_{\text{tiol}} = 50 \mu\text{M}$ ($t_d = 100 \text{ s}$). $c_{\text{catecol}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. (-) Au desnudo, $t_{\text{mod}} =$ (-) 10 s, (-) 30 s, (-) 60 s, (-) 120 s, (-) 300 s.

Las curvas obtenidas para 5 y 30 μM de 2-MES (Figura 107 b) muestran que en todo el intervalo de t_{mod} empleados, Γ es menor a $1,8 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Debido a la similitud en las respuestas de catecol a 30 y 50 μM , se puede inferir que en este último caso, por lo menos hasta 120 s de modificación, la concentración superficial se encuentra en el mismo intervalo. Sin embargo, a $c_{\text{tiol}} = 30 \mu\text{M}$ y 300 s si bien la cantidad de moléculas de tiol adsorbidas es baja ($\Gamma \sim 1,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ o $\theta \sim 0,195$) se observa que la señal de catecol disminuye haciéndose más irreversible, lo cual puede deberse a las características que el grupo funcional le confiere a esta superficie.

Bencenotiol

La Figura 114 muestra la señal de catecol en presencia de sMAE de BT. En este caso, sólo cuando se trabaja a concentración de $10 \mu\text{M}$ del tiol no se ve afectada la respuesta de catecol, aún cuando se aumenta el t_{mod} . Por el contrario, cuando la concentración del tiol es $50 \mu\text{M}$ sólo se obtiene una buena respuesta de catecol cuando el t_{mod} es lo suficientemente pequeño ($< 30 \text{ s}$) y a $100 \mu\text{M}$ a todos los t_{mod} la señal es de baja intensidad y más irreversible.

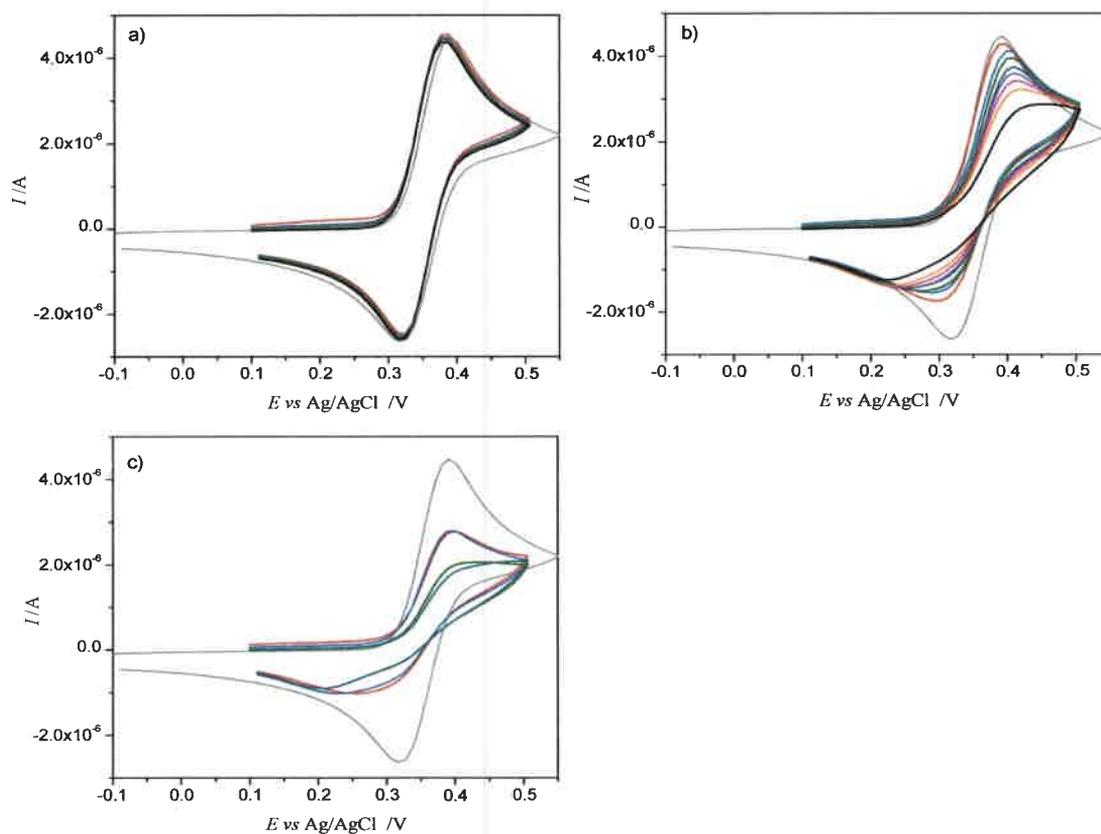


Figura 114. Voltamperogramas cíclicos de catecol sobre electrodos de Au modificados con BT. a) $c_{\text{tiol}} = 10 \mu\text{M}$ ($t_d = 20 \text{ s}$), b) $c_{\text{tiol}} = 50 \mu\text{M}$ ($t_d = 40 \text{ s}$), c) $c_{\text{tiol}} = 100 \mu\text{M}$ ($t_d = 40 \text{ s}$). $c_{\text{catecol}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. (-) Au desnudo, $t_{\text{mod}} =$ (-) 10 s, (-) 30 s, (-) 60 s, (-) 120 s, (-) 150 s, (-) 200 s, (-) 250 s, (-) 300 s.

A $c_{\text{tiol}} = 10 \mu\text{M}$ la señal de catecol se asemeja a la del electrodo de Au desnudo. Según lo observado en la Figura 107 c, se infiere que para tal concentración, el valor de Γ se encontraría por debajo de $3,4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Por su parte, para $c_{\text{tiol}} = 50 \mu\text{M}$ esto ocurre sólo a los t_{mod} más bajos (10, 30, 60 y 120 s), para los cuales todavía se considera la formación de una sMAE, mientras que a t_{mod} mayores se consideraría una MAE. Para $c_{\text{tiol}} = 100 \mu\text{M}$ no se cuenta con la curva correspondiente de manera de determinar el t_{mod} al cual se dejarían de obtener sMAE, sin embargo, se puede decir que el comportamiento es similar al de $50 \mu\text{M}$.

Hexanotiol

La Figura 115 muestra la señal de catecol en presencia de sMAE de HT a distintas concentraciones del tiol y t_{mod} . Se observa que para concentraciones entre 10 y $50 \mu\text{M}$ de tiol la respuesta de catecol se ve poco afectada, mostrando sólo una disminución en la corriente, aunque se incremente el t_{mod} . Sin embargo, cuando la concentración del tiol supera los $100 \mu\text{M}$ se comienza a desfavorecer la descarga de catecol, siendo importantes los cambios a medida que aumenta el t_{mod} .

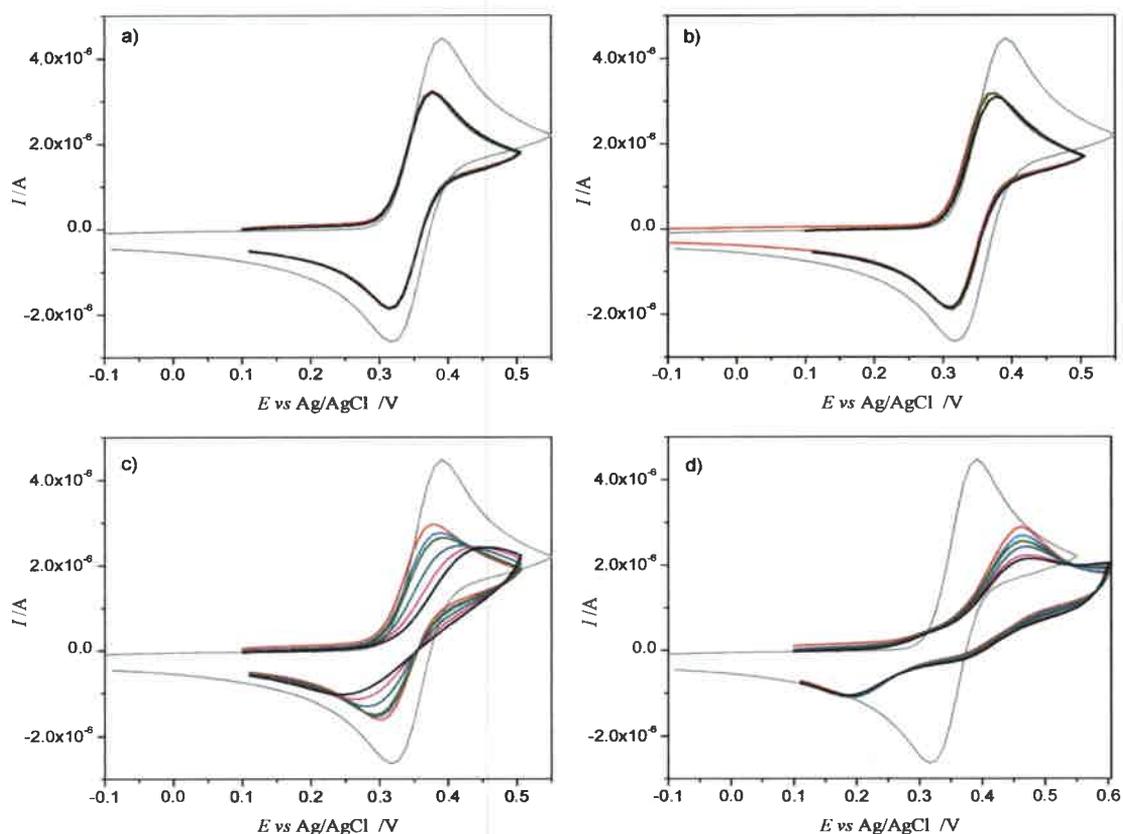


Figura 115. Voltamperogramas cíclicos de catecol sobre electrodos de Au modificados con HT a) $c_{tio1} = 10 \mu\text{M}$ ($t_d = 10 \text{ s}$), b) $c_{tio1} = 50 \mu\text{M}$ ($t_d = 10 \text{ s}$), c) $c_{tio1} = 100 \mu\text{M}$ ($t_d = 20 \text{ s}$), d) $c_{tio1} = 200 \mu\text{M}$ ($t_d = 20 \text{ s}$). $c_{catecol}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. (-) Au desnudo, $t_{mod} =$ (-) 10 s, (-) 30 s, (-) 60 s, (-) 120 s, (-) 200 s, (-) 300 s.

Comparando estos resultados con la dependencia de la concentración superficial con el t_{mod} mostrada en la Figura 107 d, se observa que a $c_{tio1} = 10$ y $30 \mu\text{M}$ y hasta los 200 s de tiempo de modificación, θ se mantiene alrededor de 0,45, mientras que para $c_{tio1} = 100 \mu\text{M}$ a los 30 s ya se encuentra por encima de $\theta = 0,65$.

En general, para los tioles estudiados, se aprecia que a concentraciones lo suficientemente bajas de tiol no se observan diferencias entre las respuestas de catecol obtenidas sobre electrodos de Au modificados y sin modificar. Sin embargo, a una dada

concentración, dependiente de cada tiol, la señal comienza a afectarse por la presencia de la SMAE.

9.4. COMPORTAMIENTO DE FISETINA SOBRE SUBMONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS

Con el fin de conocer el efecto de la presencia de una SMAE en sistemas más complejos se estudió la respuesta de FIS sobre una submonocapa de 2-MES. En este caso se aplicó directamente el método de una única celda (Figura 106), lo que implica un beneficio, desde el punto de vista analítico, por su sencillez y rapidez.

La Figura 116 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos para FIS, empleando diferentes c_{tiol} y t_{mod} .

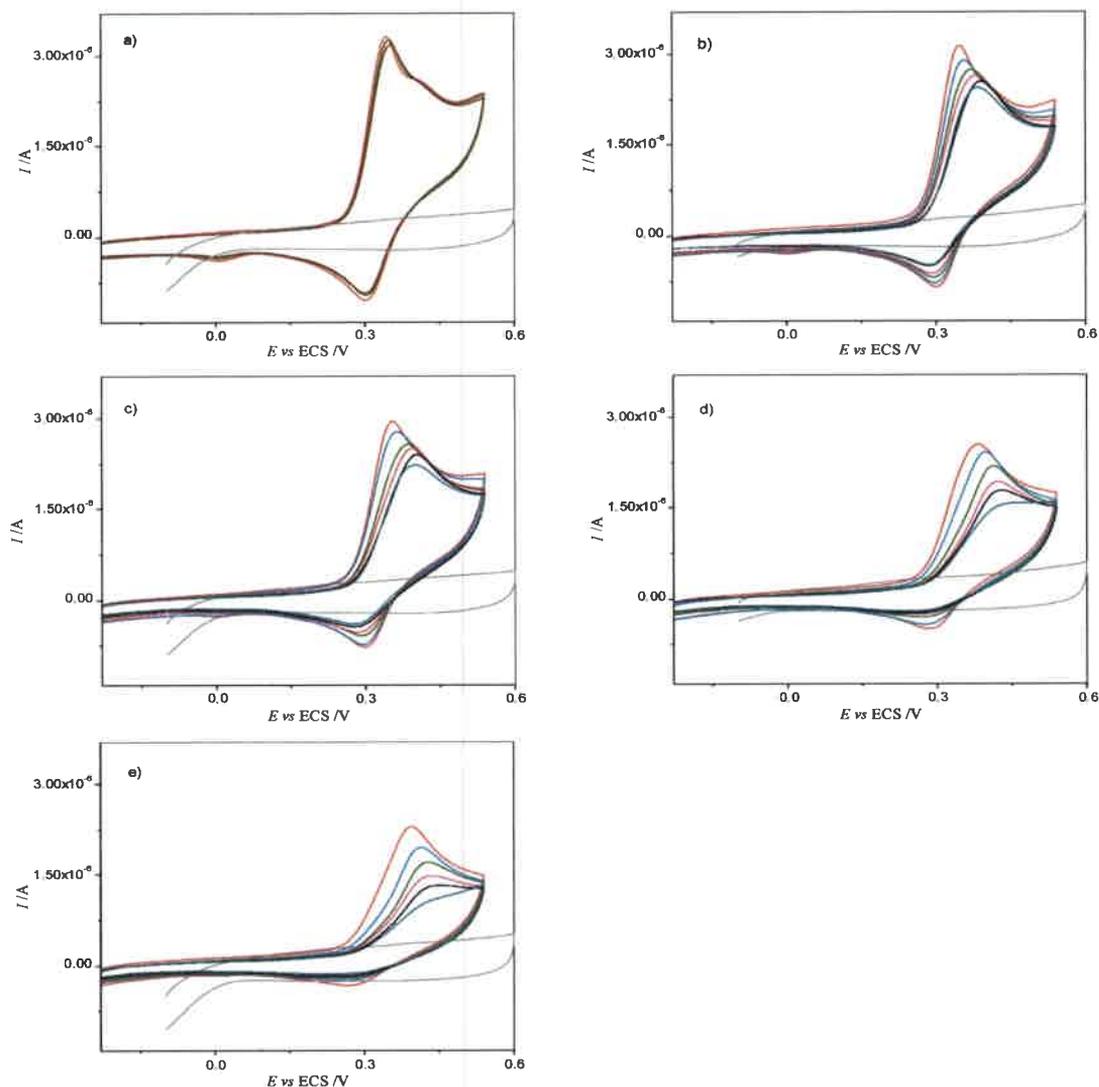


Figura 116. Voltamperogramas cíclicos de FIS sobre electrodos de Au modificados con sMAE de 2-MES. a) $c_{\text{tiol}} = 10 \mu\text{M}$, b) $c_{\text{tiol}} = 30 \mu\text{M}$, c) $c_{\text{tiol}} = 50 \mu\text{M}$, d) $c_{\text{tiol}} = 100 \mu\text{M}$ y e) $c_{\text{tiol}} = 200 \mu\text{M}$. $t_{\text{mod}} = (-) 10, (-) 50, (-) 80 \text{ s}, (-) 100, (-) 200, (-) 300$ y $(-) 700 \text{ s}, (-)$ voltamperograma de blanco posterior. $c_{\text{FIS}}^* = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. $t_d = 40 \text{ s}$.

Se observa que a una concentración $10 \mu\text{M}$ de 2-MES, a todos los t_{mod} estudiados, FIS presenta un pico principal de oxidación, seguido por otro de menor intensidad. Esta respuesta es consistente con las señales I y II de FIS sobre el electrodo

de Au desnudo (Figura 40). Sin embargo, a partir de c_{tiol} de 30 μM (Figura 116 b) se observa un solo pico de oxidación, tal como ocurre con la superficie modificada con MAE de 2-MES (Figura 58). La señal de FIS disminuye progresivamente con el aumento del t_{mod} , a la vez que se produce una leve separación entre los potenciales de pico. Este comportamiento se acentúa a medida que aumenta la concentración de tiol en solución.

Por lo tanto, en el caso de FIS, a c_{tiol} lo suficientemente bajas la respuesta sobre sMAE aún guarda similitud con la del electrodo de Au desnudo, no siendo suficiente la modificación para evitar la segunda descarga. A c_{tiol} mayores, de 30 μM en adelante, el cubrimiento de la superficie permite la obtención de una señal más simple, la cual se ve afectada tanto por c_{tiol} como por t_{mod} . Se observa que para FIS, por ser un sistema más complejo que catecol, la respuesta es más sensible al cambio de las condiciones experimentales relacionadas con la concentración del tiol y el tiempo de modificación.

Un aspecto importante a destacar es la gran reproducibilidad de los voltamperogramas cíclicos obtenidos mediante este método, probablemente gracias a la eficiencia con la que se realiza la limpieza de la superficie entre las medidas, por la aplicación de un potencial y la no manipulación del electrodo. Esto último queda demostrado al observar los voltamperogramas registrados en la solución de blanco, luego de las medidas en la solución de FIS + tiol.

9.4.1. Desarrollo de un método electroanalítico para la determinación de fisetina empleando submonocapas autoensambladas del ácido 2-mercaptoetanosulfónico

Con el objetivo de determinar FIS cuantitativamente, se procedió a la construcción de curvas de calibración empleando VOC como técnica electroquímica. En principio, se seleccionaron $c_{\text{tiol}} = 50 \mu\text{M}$ y $t_{\text{mod}} = 10 \text{ s}$; sin embargo, dadas las respuestas mostradas anteriormente, es posible emplear diferentes combinaciones de c_{tiol} y t_{mod} .

La Figura 117 muestra las respuestas obtenidas en VOC para distintas c_{FIS}^* y la curva de calibración correspondiente.

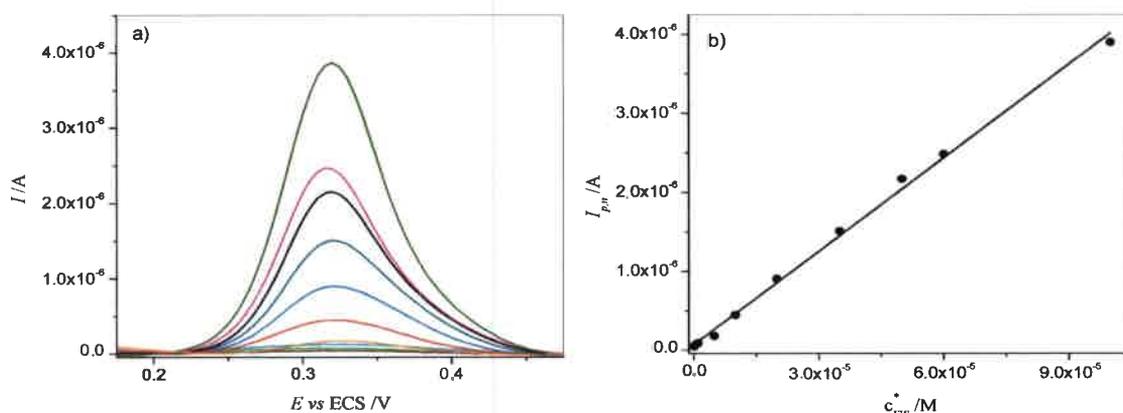


Figura 117. a) Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en soluciones de distintas c_{FIS}^* , sobre un electrodo de Au modificado con sMAE de 2-MES. $f = 20$ Hz, $\Delta E_e = 0,005$ V, $\Delta E_{oc} = 0,025$ V. Medio: 15 % DMSO + 85 % solución reguladora de pH 4. b) Dependencia de $I_{p,n}$ con c_{FIS}^* , $r = 0,9976$.

Se obtuvo un intervalo lineal entre 1×10^{-7} y 1×10^{-4} M, la recta de regresión lineal obtenida mediante un procedimiento de ajuste por cuadrados mínimos fue:

$$I_{p,n} = (0,0394 \pm 0,0007) c_{FIS}^* + (7 \pm 3) \times 10^{-8} \quad r = 0,9976$$

La concentración más baja medida para una relación señal:ruido de 3:1 fue 1×10^{-7} M, lo cual corresponde a 0,029 ppm.

Los estudios de repetibilidad se llevaron a cabo realizando dos curvas de calibración con un mismo electrodo, es decir, sin pulirlo ni activarlo. Sin embargo, dada la metodología de trabajo, la superficie se modificó para realizar cada determinación. Las medidas correspondientes a cada una de las curvas se realizaron de manera consecutiva. A partir de las pendientes de las curvas de calibración se calculó la desviación estándar relativa porcentual, que fue del 0,02 %.

La reproducibilidad se determinó a partir de dos medidas realizadas con electrodos diferentes, es decir, el electrodo fue pulido y activado entre una curva de calibración y la otra. De las pendientes de las curvas se obtuvo una desviación estándar relativa porcentual del 0,9 %.

La Tabla 8 compara los parámetros analíticos obtenidos para los métodos desarrollados empleando MAE y sMAE.

Tabla 8. Parámetros correspondientes a los métodos electroanalíticos desarrollados con MAE y sMAE.

Electrodo/	Repetibilidad (%)	Reproducibilidad (%)
MAE 4-MF	1,3	1,6
MAE 2-MES	0,5	2,2
sMAE 2-MES	0,02	0,9

Puede observarse que es posible mejorar notablemente tanto la repetibilidad como la reproducibilidad del método cuando se emplean sMAE. Esto probablemente se deba a las condiciones experimentales mediante las cuales se evita la manipulación del electrodo, así como también al mayor control sobre el procedimiento experimental.

9.5. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados mostrados, se puso en evidencia la importancia que tiene el hecho de poder controlar la superficie que se desea obtener, ya que el grado de cubrimiento del electrodo es importante al momento de registrar la respuesta del analito.

Se encontró que la modificación a potencial controlado permite lograr una mayor reproducibilidad en la obtención de sMAE y que es posible el empleo de una única celda que contiene tanto el tiol como el analito, simplificando la determinación experimental y evitando la manipulación del electrodo.

En cuanto a la cupla catecol, en todos los casos se observa una disminución de la velocidad de oxidación al aumentar la concentración superficial del tiol por encima de un umbral. Para HT y BT, este valor coincide aproximadamente con el cubrimiento de una monocapa de tiol que no se encuentra adsorbida en perpendicular con la superficie

del electrodo ($\sim 3-3,4 \times 10^{-10}$ mol cm⁻²).^{7,122} Por su parte, para 4-MF y 2-MES los cambios en la respuesta de catecol se dan a Γ menores, posiblemente, por la influencia de los grupos terminales de cada tiol. Por debajo de este umbral, dependiente de cada tiol, la presencia de la submonocapa no afecta la respuesta del catecol, siendo, en estos casos, similar a la del electrodo de Au desnudo. En presencia de una MAE la respuesta electroquímica se ve desfavorecida en todos los casos.

Se encontró que las diferencias entre las respuestas obtenidas con MAE o sMAE son significativas y se dan con todos los tioles estudiados. Estos resultados permiten concluir que es factible encontrar condiciones de modificación del electrodo para favorecer la respuesta desde un punto de vista analítico. En este aspecto, mediante el desarrollo de un método electroanalítico para la determinación de FIS empleando sMAE, quedó demostrada la posibilidad de llevar a cabo determinaciones analíticas en este tipo de superficies.

Finalmente, la escasa información bibliográfica sobre este tipo de superficies abre un vasto campo de posibilidades en el estudio y aplicación de las mismas.

Capítulo 10

Conclusiones generales

A partir de los resultados obtenidos se pueden realizar las siguientes conclusiones: para monocapas autoensambladas formadas por tioles de cadena carbonada relativamente larga (como dodecanotiol y 6-mercapto-1-hexanol), la presencia de la monocapa desfavorece la respuesta electroquímica de fisetina, actuando como una barrera a la transferencia electrónica, sin evitar los fenómenos de pasivación. Sin embargo, cuando el tiol es de cadena corta o posee un anillo aromático permite observar la descarga de fisetina, la que se ve más o menos favorecida, dependiendo de la presencia de grupos funcionales en el tiol. Se observó que las mejores respuestas se obtienen cuando el tiol posee un grupo oxigenado. Así, los tioles 4-mercaptofenol y ácido 2-mercaptoetanosulfónico fueron los que presentaron la mejor respuesta, siendo ambas diferentes, ya que fisetina se adsorbe sobre las monocapas de 4-mercaptofenol y, por el contrario, presenta una respuesta controlada por difusión sobre las monocapas del ácido 2-mercaptoetanosulfónico.

En general, a partir de los estudios realizados para caracterizar las diferentes monocapas, se puede concluir que las características estructurales de las mismas son dependientes de numerosos factores, siendo los más importantes la naturaleza de los tioles que las constituyen y la solución con la que están en contacto, ya que las propiedades electroquímicas pueden variarse dependiendo de sus condiciones.

En particular, bajo las condiciones empleadas, tanto 4-mercaptofenol como el ácido 2-mercaptoetanosulfónico forman monocapas con un cubrimiento relativamente alto y con una orientación perpendicular a la superficie del electrodo, pero con un bajo grado de empaquetamiento, lo que es esperado para tioles de cadena corta. Además, a partir de la determinación de los pK_a superficiales, se pudo concluir que el ácido 2-mercaptoetanosulfónico se presenta deprotonado a todos los valores de pH estudiados, generando una superficie modificada con una alta carga negativa. Por el contrario, el 4-mercaptofenol presenta un valor de pK_a de 9,76, lo que implica que a pH 4 o 5 se encuentra protonado. Estos resultados permiten explicar las diferencias observadas en ambas respuestas, ya que por un lado, al estar protonado, el 4-mercaptofenol se asemeja a la superficie del carbono vítreo, favoreciendo, de la misma manera, la adsorción de fisetina. Por el contrario, para el caso del ácido 2-mercaptoetanosulfónico la elevada carga superficial negativa sería fundamental para evitar los fenómenos de pasivación e

incluso la propia adsorción de fisetina sobre la superficie del electrodo, lo que permite obtener una respuesta controlada por difusión y altamente reproducible.

De esta manera, fue posible encontrar respuestas adecuadas sobre electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas, que permitieron el desarrollo de métodos electroanalíticos para la determinación de fisetina. Los métodos presentaron intervalos lineales razonables con muy buenos límites de detección y los electrodos mostraron ser altamente reproducibles. Los resultados para la monocapa autoensamblada del ácido 2-mercaptoetanosulfónico pudieron ser transferidos en forma directa a otro flavonoide muy abundante en la naturaleza, como lo es la quercetina, que cuenta con características estructurales semejantes, el cual se determinó en una muestra real. El método electroquímico fue comparado con otro ampliamente usado, HPLC con detección por arreglo de diodos, pudiendo confirmar su equivalencia en la determinación de quercetina, estableciendo a su vez las ventajas de cada uno. En particular, el método electroanalítico frente al de HPLC presenta las ventajas de ser rápido, de bajo costo y del empleo de pequeñas cantidades de solvente.

Por último, el empleo de submonocapas como sensores electroquímicos abre un importante campo de posibilidades en electroanalítica debido a que los experimentos realizados demostraron que es posible desarrollar métodos que permitan obtener excelentes parámetros analíticos y que, a su vez, sean de una extremada simpleza experimental.

Así, se demostró una vez más que la electroquímica es una herramienta poderosa para el estudio de productos naturales y, debido a sus características particulares, se ha convertido en un método analítico alternativo.



Capítulo 11

Bibliografía

-
- ¹ J. Wang, “*Analytical Electrochemistry*”, Wiley-VCH, 3rd Ed., New Jersey, 2006.
 - ² C. G. Zoski, “*Handbook of Electrochemistry*”, 1st. Ed. Elsevier, New Mexico, USA, 2007.
 - ³ A. Ulman, “*An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir- Blodgett to Self-assembly*”, Academic Press, San Diego, CA, 1991.
 - ⁴ F. D’Eramo, A. H. Arévalo, “*Polymers films derived of polynuclear aromatic amines. Some applications in electroanalysis*”, Recent Developments and Applications of Electroanalytical Chemistry, H. Fernandez and M. A. Zon (Eds.), Research Signpost, Trivandrum, India, 2002.
 - ⁵ H. O. Finklea, “*Electrochemistry of organized monolayers of thiols and related molecules on electrodes*”, Electroanalytical Chemistry, A. J. Bard and I. Rubinstein (Eds.), Marcel Dekker, New York, Vol 19, 1996.
 - ⁶ J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **105** (2005) 1103.
 - ⁷ P. Ramírez, R. Andreu, J. J. Calvente, C. J. Calzado, G. López-Pérez, *J. Electroanal. Chem.* **582** (2005) 179.
 - ⁸ R. K. Shervedani, A. Hatefi-Mehrjardi, M. K. Babadi, *Electrochim. Acta* **52** (2007) 7051.
 - ⁹ S. Behera, C. Retna Raj, *Sens. Act. B* **128** (2007) 31.
 - ¹⁰ H. M. Saavedra, C. M. Thompson, J. N. Hohman, V. H. Crespi, P. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009) 2252.
 - ¹¹ F. Li, L. Tang, W. Zhou, Q. Guo, *Langmuir* **26** (2010) 9484.
 - ¹² L. Srisombat, A. C. Jamison, T. R. Lee, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **390** (2011) 1.
 - ¹³ C. J. Miller, M. Gratzel, *J. Phys. Chem.* **95** (1991) 5225.
 - ¹⁴ S. E. Creager, K. Weber, *Langmuir* **9** (1993) 844.
 - ¹⁵ D. Evans, R. Wampler, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 4666.
 - ¹⁶ K. D. Schierbaum, T. Weiss, E. U. Thoenen van Velzen, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, W. Göpel, *Science* **265** (1994) 1413.
 - ¹⁷ M. T. Rojas, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5883.

-
- ¹⁸ M. T. Rojas, R. Koniger, J. F. Stoddart, A. E. Kaifer, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 336.
- ¹⁹ I. Turyan, D. Mandler, *Anal. Chem.* **69** (1997) 894.
- ²⁰ C. Retna Raj, T. Ohsaka, *J. Electroanal. Chem.* **496** (2001) 44.
- ²¹ P. Ihalainen, H. Majumdar, A. Määttänen, S. Wang, R. Österbacka, J. Peltonen, *Biochim. Biophys. Acta* (2012), en prensa.
- ²² F. Lisdat, B. Ge, E. Forster, R. Reszka, F. W. Scheller, *Anal. Chem.* **71** (1999) 1359.
- ²³ M. B. Moressi, R. Andreu, J. J. Calvente, H. Fernández, M. A. Zón, *J. Electroanal. Chem.* **570** (2004) 209.
- ²⁴ M. B. Moressi, J. J. Calvente, R. Andreu, H. Fernández, M. A. Zón, *J. Electroanal. Chem.* **605** (2007) 118.
- ²⁵ D. Mandler, S. Kraus-Ophir, *J. Solid State Electrochem.* **15** (2011) 1535.
- ²⁶ C. M. Brett, A. M. Oliveira Brett, *“Electrochemistry principles, Methods and Applications”*, Oxford Science Publications, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- ²⁷ L. A. Hockett, S. E. Creager, *Langmuir* **11** (1995) 2318.
- ²⁸ D. C. Myles, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 7413.
- ²⁹ C. –H. Shen, J. –C. Lin, *Colloids Surf., B* **101** (2013) 376.
- ³⁰ A. Ulman, *“Thin films: self-assembled monolayers of thiols”*, Academic Press, New York, 1998.
- ³¹ F. P. Zamborini, R. M. Crooks, *Langmuir* **14** (1998) 3279.
- ³² X. Xiao, J. Hu, D. H. Charych, M. Salmeron, *Langmuir* **12** (1996) 235.
- ³³ D. G. Walter, D. J. Campbell, C. A. Mirkin, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 402.
- ³⁴ A Ulman, *Chem. Rev.* **96** (1996) 1533.
- ³⁵ M. A. Schneeweiss, H. Hagenström, M. J. Esplandiu, D. M. Kolb, *Appl. Phys. A* **69** (1999) 537.
- ³⁶ C. Vericat, M. E. Vela, G. A. Benitez, J. A. Martin Gago, X. Torrelles, R. C. Salvarezza, *J. Phys.: Condes. Matter* **18** (2006) R867.
- ³⁷ H. O. Finklea, *“Self-Assembled Monolayers on Electrodes”*, en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers (Ed.), J. Wiley, New York, 2000.
- ³⁸ J. –R. Roy, M. –A. Laliberté, S. Lavoie, M. Castonguay, P. H. McBreen, *Surf. Sci.* **578** (2005) 43.
- ³⁹ L. Zhang, L. L. S. Chen, S. Jiang, *Langmuir* **18** (2002) 5448.

-
- ⁴⁰ R. L. Cicero, M. R. Linford, C. E. D. Chidsey, *Langmuir* **16** (2002) 5688.
- ⁴¹ F. Schreiber, *Prog. Surf. Sci.* **65** (2000) 151.
- ⁴² R. P. Janek, W. R. Fawcett, *Langmuir* **14** (1998) 3011.
- ⁴³ A. J. Bard, L. R. Faulkner, en: “*Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*”, 2nd. Ed. J. Wiley, New York, 2001.
- ⁴⁴ M. J. Esplandiu, H. Hagenström, D. M. Kolb, *Langmuir* **17** (2001) 828.
- ⁴⁵ G. E. Poirier, *Chem. Rev.* **97** (1997) 1117.
- ⁴⁶ L. Patrone, S. Palacin, J. -P. Bourgoïn, M. H. V. Werts, *Langmuir* **20** (2004) 11577.
- ⁴⁷ C. O’Dwyer, G. Gay, B.V. de Leseqno, J. Weiner, *Langmuir* **20** (2004) 8172.
- ⁴⁸ D. H. Dahanayaka, J. X. Wang, S. Hossain, L. A. Bumm, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 6052.
- ⁴⁹ G. H. Yang, N. A. Amro, Z. B. Starkewolfe, G. Y. Liu, *Langmuir* **20** (2004) 3995.
- ⁵⁰ P. Diao, D. Jiang, X. Cui, D. Gu, R. Tong, B. Zhong, *J. Electroanal. Chem.* **464** (1999) 61.
- ⁵¹ Y. L. Qian, G. H. Yang, J. J. Yu, T. A. Jung, G. Y. Liu, *Langmuir* **19** (2003) 6056.
- ⁵² S. Campuzano, M. Pedrero, C. Montemayor, E. Fatás, J. M. Pingarrón, *J. Electroanal. Chem.* **586** (2006) 112.
- ⁵³ F. Pak, K. Meral, R. Altundaş, D. Ekinçi, *J. Electroanal. Chem.* **654** (2011) 20.
- ⁵⁴ J. J. Calvente, G. López-Pérez, P. Ramírez, H. Fernández, M. A. Zón, W. H. Mulder, R. Andreu, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 6476.
- ⁵⁵ A. L. Deering, S. M. Van Lue, S. A. Kandel, *Langmuir* **21** (2005) 10260.
- ⁵⁶ F. Schreiber, *J. Phys.: Condens. Matter* **16** (2004) R881.
- ⁵⁷ Q. Cheng, A. Brajter-Toth, *Anal. Chem.* **68** (1996) 4180.
- ⁵⁸ J. J. Calvente, R. Andreu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12** (2010) 13519.
- ⁵⁹ R. Yamada, H. Wano, K. Uosaki, *Langmuir* **16** (2000) 5523.
- ⁶⁰ Z. Dai, H. Ju, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3** (2001) 3769.
- ⁶¹ K. A. Peterlinz, R. Goergiadis, *Langmuir* **12** (1996) 4731.
- ⁶² C. Mokrani, J. Fatisson, L. Guérente, P. Labbé, *Langmuir* **21** (2005) 4400.
- ⁶³ D. Jianyuan, L. Zhiguo, S. Yanqing, C. Jiongjia, K. Jing, B. Shuping, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2009) 1074.

-
- ⁶⁴ I. Mann, R. J. Davinson, J. B. Hobbs, D. V. Banthorpe and J. B. Harbone, “*Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*”, J. Wiley & Sons, USA, 1994.
- ⁶⁵ M. Laguerre, E. A. Decker, J. Lecomte, P. Villeneuve, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13** (2010) 518.
- ⁶⁶ J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, “*Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*”, Acirbia, Zaragoza, España, 2005.
- ⁶⁷ a) J. Kuhnu, “*The Flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition*”, *World Rev. Nutr. Diet* **24** (1976) 177; b) B. A. Bohm, “*Introduction to Flavonoids*”, Harwood Academic Publishers, Singapore, capítulo 2, 1998.
- ⁶⁸ E. Grotewold, “*The Science of Flavonoids*”, Springer, New York, USA, 2008.
- ⁶⁹ Z. S. Marković, S. V. Mentus, J. M. Dimitrić Marković, *J. Phys. Chem. A*, **113** (2009) 14170.
- ⁷⁰ D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, *Fitoterapia* **82** (2011) 513.
- ⁷¹ Q. R. D. Jones, J. Warford, H. P. Vasantha Rupasinghe, G. S. Robertson, *Trends Pharmacol. Sci.* **33** (2012) 602.
- ⁷² P. Greenwald, C. K. Clifford, J. A. Milner, *Eur. J. Cancer* **37** (2001) 948.
- ⁷³ J. V. Formica, W. Regelson, *Food Chem. Toxicol.* **33** (1995) 1061.
- ⁷⁴ G. G. Duthie, S. J. Duthie, J. A. M. Kyle, *Nutr. Res. Rev.* **13** (2000) 79.
- ⁷⁵ J. M. Weber, A. Ruzindana-Umunyana, L. Imbeault, S. Sircar, *Antiviral Res.* **58** (2003) 167.
- ⁷⁶ J. Vaya, S. Mahmood, A. Goldblum, M. Aviram, N. Volkova, A. Shaalan, R. Musa, S. Tamir, *Phytochemistry* **62** (2003) 89.
- ⁷⁷ S.V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tomic, B. Marjanovic, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 4846.
- ⁷⁸ S. A. B. E. van Acker, M. N. J. L. Tromp, G. R. M. M. Haenen, W. J. F. van der Vijgh, A. Bast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214** (1995) 755.
- ⁷⁹ C. Rice-Evans, *Curr. Med. Chem.* **8** (2001) 791.
- ⁸⁰ F. Shahidi, P. K. Wanasundara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32** (1992) 67.
- ⁸¹ B. Sengupta, A. Banerjee, P. K. Sengupta, *J. Photochem. Photobiol. B* **80** (2005) 79.
- ⁸² M. Mohapatra, A. K. Mishra, *J. Phys. Chem. B* **115** (2011) 9962.

-
- ⁸³ S. Chaudhuri, S. Chakraborty, P. K. Sengupta, *Biophys. Chem.* **154** (2011) 26.
- ⁸⁴ J. Y. Kim, Y. K. Jeon, W. Jeon, M. J. Nam, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 2259.
- ⁸⁵ H. H. Park, S. Lee, J. M. Oh, *Pharmacol. Res.* **55** (2007) 31.
- ⁸⁶ R. N. Puri, R. W. Colman, *Anal. Biochem.* **210** (1993) 50.
- ⁸⁷ B. Sengupta, A. Banerjee, P. K. Sengupta, *FEBS Lett.* **570** (2004) 77.
- ⁸⁸ R. I. Brinkworth, M. J. Stoermer, D. P. Fairlie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188** (1992) 631.
- ⁸⁹ B. Sengupta, J. Swenson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334** (2005) 954.
- ⁹⁰ D. Gormin, A. Sytnik, M. Kasha, *J. Phys. Chem. A* **101** (1997) 672.
- ⁹¹ P. Maher, T. Akaishi, K. Abe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (2006) 16568.
- ⁹² P. Maher, *Genes Nutr.* **4** (2009) 297.
- ⁹³ S. W. Lamson, M. S. Brignall, *Altern. Med. Rev.* **5** (2000) 196.
- ⁹⁴ K. Aaby, E. Hvattum, G. Skrede, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 4595.
- ⁹⁵ I. Molnar-Perl, Z. Füzfai, *Review J. Chromatogr. A* **1073** (2005) 201.
- ⁹⁶ E. de Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* **1112** (2006) 31.
- ⁹⁷ L. -Z. Lin, J. M. Harnly, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 1084.
- ⁹⁸ A. M. Danila, A. Kotani, H. Hakamata, F. Kusu, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 1139.
- ⁹⁹ G. J. Volikakis, C. E. Efstathiou, *Talanta* **51** (2000) 775.
- ¹⁰⁰ G. -P. Jin, J. -B. He, Z. -B. Rui, F. -S. Meng, *Electrochim. Acta* **51** (2006) 4341.
- ¹⁰¹ I. R. W. Zwirtes de Oliveira, S. C. Fernandes, I. C. Vieira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 366.
- ¹⁰² W. F. Hodnick, E. B. Milosavljevic, J. H. Nelson, R. S. Pardini, *Biochem. Pharmacol.* **37** (1988) 2607.
- ¹⁰³ H. P. Hendrickson, M. Sahafayen, M. A. Bell, A. D. Kaufman, M. E. Hadwiger, C. E. Lunte, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12** (1994) 335.
- ¹⁰⁴ H. P. Hendrickson, A. D. Kaufman, C. E. Lunte, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12** (1994) 325.
- ¹⁰⁵ A. M. Brett, M. E. Ghica, *Electroanal.* **15** (2003) 22.
- ¹⁰⁶ A. K. Timbola, C. D. De Souza, C. Giacomelli, A. Spinelli, *J. Braz. Chem. Soc.* **17** (2006) 139.

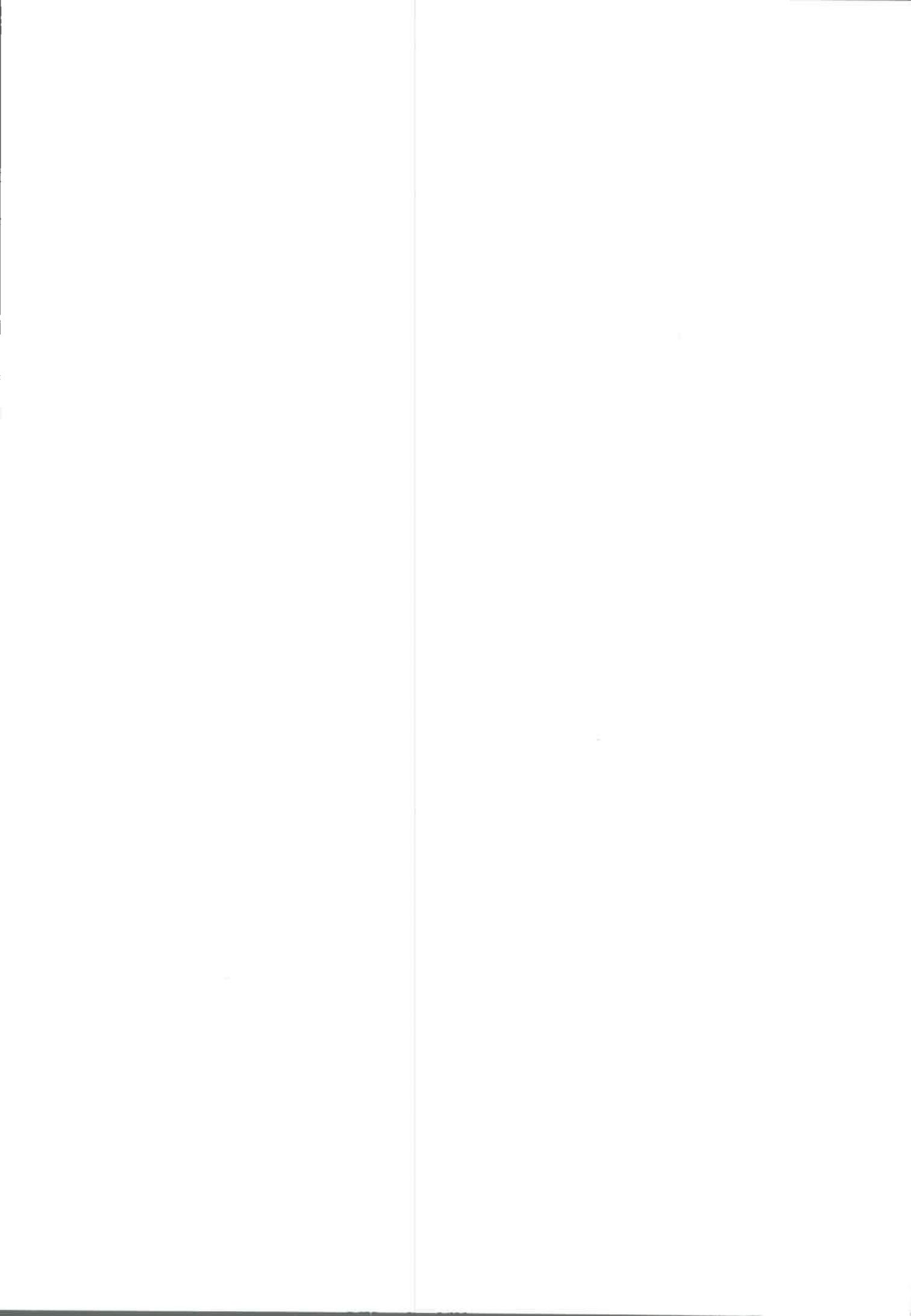
-
- ¹⁰⁷ S. M. Golabi, L. Irannejad, *Electroanal.* **17** (2005) 985.
- ¹⁰⁸ P. Janeiro, O. Corduneanu, A. M. Oliveira Brett, *Electroanal.* **17** (2005) 1059.
- ¹⁰⁹ D. J. G. Ives, G. J. Janz, *“Reference Electrodes”*, Academic Press, New York, 1974.
- ¹¹⁰ K. B. Oldham, J. C. Myland, *“Fundamentals of Electrochemical Science”*, Academic Press, San Diego, California, 1994.
- ¹¹¹ R. S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.* **36** (1964) 706.
- ¹¹² R. S. Nicholson, *Anal. Chem.* **37** (1965) 1351.
- ¹¹³ J. C. Imbeaux, J. M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.* **44** (1973) 169.
- ¹¹⁴ J. M. Savéant, D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.* **65** (1975) 57.
- ¹¹⁵ J. Leddy, A. J. Bard, *J. Electroanal. Chem.* **189** (1985) 203.
- ¹¹⁶ G. C. Barker, I. L. Jenkins, *Analyst* **77** (1952) 685.
- ¹¹⁷ J. R. Macdonald, *Ann. Biomed. Eng.* **20** (1992) 289.
- ¹¹⁸ A. Lasia, *“Electrochemical Impedance Spectroscopy and its applications. Modern aspects of Electrochemistry”*, B. E. Conway, J. O’M. Bockris, R. E. White (Eds.), Kluwer academic / Plenum Publishers, New York, USA, 1990.
- ¹¹⁹ J. R. Macdonald, E. Barsoukov, *“Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Applications”*, 2nd Ed., J. Wiley, New Jersey, USA, 2005.
- ¹²⁰ C. Gabrielli, *“Use and applications of electrochemical impedance techniques”*, technical report, Schlumberger Technologies, Hampshire, United Kingdom, 1990.
- ¹²¹ G. K. Olivier, D. Shin, J. Frechette, *J. Electroanal. Chem.* **639** (2010) 50.
- ¹²² J. J. Calvente, R. Andreu, L. González, M.-L. A. Gil, J. D. Mozo, E. Roldán, *J. Phys. Chem. B* **105** (2001) 5477.
- ¹²³ A. M. Collieu, D. J. Powney, *“The mechanical and thermal Properties of Materials”*, Ed. Reverté, 1977.
- ¹²⁴ Y. C. Jung, B. Bhushan, *Nanotechnology* **17** (2006) 4971.
- ¹²⁵ A. Maho, J. Denayer, J. Delhalle, Z. Mekhalif, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 3954.
- ¹²⁶ J. Wang, L. M. Frostman, M. D. Ward, *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 5224.
- ¹²⁷ H. Zhang, H. -X. He, J. Wang, T. Mu, Z. -F. Liu, *Appl. Phys. A* **66** (1998) 269.
- ¹²⁸ N. Alonso-Vante, *“Electroquímica y electrocatálisis. Materiales: aspectos fundamentales y aplicaciones”*, Ciudad Educativa, Buenos Aires, Argentina, Vol. Ia, 2002.

-
- ¹²⁹ J. Lyklema, “*Fundamentals of Interface and colloid Science*”, Vol. 2, Academic Press, London, United Kingdom, 1995.
- ¹³⁰ E. Giannakopoulos, Y. Deligiannakis, *Langmuir* **23** (2007) 2453.
- ¹³¹ A. W. Adamson, “*Physical Chemistry of surfaces*”, 5th Ed., Wiley, New York, USA, 1990.
- ¹³² D. M. Anjo, M. Kahr, M. M. Khodabakhsh, S. Nowinski, M. Wanger, *Anal. Chem.* **61** (1989) 2603.
- ¹³³ D. T. Sawyer, A. Sobkowiak, J. L. Roberts, “*Electrochemistry for chemists*”, 2nd Ed., J. Wiley, New York, USA, 1995.
- ¹³⁴ M. E. Vela, R. C. Salvarezza, A. Arvia, *J. Electrochim. Acta* **35** (1990) 117.
- ¹³⁵ J. L. Shepherd, A. Kell, E. Chung, C. W. Sinclar, M. S. Workentin, D. J. Bizzotto, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 8329.
- ¹³⁶ D. -F. Yang, C. P. Wilde, M. Morin, *Langmuir* **12** (1996) 6570.
- ¹³⁷ D. -F. Yang, M. Morin, *J. Electroanal. Chem.* **429** (1997) 1.
- ¹³⁸ D. -F. Yang, C. P. Wilde, M. Morin, *Langmuir* **13** (1997) 243.
- ¹³⁹ T. Kawaguchi, H. Yasuda, K. Shimazu, M. D. Porter, *Langmuir* **16** (2000) 9830.
- ¹⁴⁰ P. Diao, M. Guo, T. Ruting, *J. Electroanal. Chem.* **495** (2001) 98.
- ¹⁴¹ J. M. Herrero-Martinez, C. Repollés, E. Bosch, M. Rosés, C. Rafols, *Talanta* **74** (2008) 1008.
- ¹⁴² D. Nematollahi, M. Malakzadeh, *J. Electroanal. Chem.* **547** (2003) 191.
- ¹⁴³ B. Yang, A. Kotani, K. Arai, F. Kusu, *Anal. Sci.* **17** (2001) 599.
- ¹⁴⁴ R. L. Mc. Creery, in “*Carbon Electrodes: Structural Effects on Electron Transfer Kinetics in Electroanalytical Chemistry*”, Vol. 17, A. J. Bard (Ed.), Marcel Dekker, New York, USA, 1991, págs. 221-274.
- ¹⁴⁵ E. M. Maza, M. B. Moressi, H. Fernández, M. A. Zon, *J. Electroanal. Chem.*, **675** (2012) 11.
- ¹⁴⁶ A. Y. Tesio, A. M. Granero, H. Fernández, M. A. Zon, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 2321.
- ¹⁴⁷ M. Lovric, S. Komorsky-Lovric, R. W. Murry, *Electrochim. Acta* **33** (1988) 739.
- ¹⁴⁸ J. J. O’Dea, A. Ribes, J. G. Osteryoung, *J. Electroanal. Chem.* **345** (1993) 287.
- ¹⁴⁹ J. J. O’Dea, J. G. Osteryoung, *Anal. Chem.* **65** (1993) 3090.
- ¹⁵⁰ V. Mirceski, M. Lovric, *Electroanal.* **9** (1997) 1283.

-
- ¹⁵¹ S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, Z. Fresenius, *Anal. Chem.* **335** (1989) 289.
- ¹⁵² S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, *J. Electroanal. Chem.* **384** (1995) 115.
- ¹⁵³ S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, *Electrochim. Acta* **40** (1995) 1781.
- ¹⁵⁴ V. Mirceski, M. Lovric, R. Gulaboski, *J. Electroanal. Chem.* **515** (2001) 91.
- ¹⁵⁵ V. Mirceski, S. Komorsky-Lovric, M. Lovric, “*Square Wave Voltammetry Theory and Application*”, Springer, Leipzig, Germany, 2007.
- ¹⁵⁶ J. G. Osteryoung, R. A. Osteryoung, *Anal. Chem.* **57** (1985) 101A.
- ¹⁵⁷ J. J. O’Dea, J. Osteryoung, T. Lane, *J. Phys. Chem.* **90** (1986) 2761.
- ¹⁵⁸ J. Lahann, S. Mitragotri, T. -N. Tran, H. Kaido, J. Sundaram, I. S. Choi, S. Hoffer, G. A. Somorjai, R. Langer, *Science* **299** (2003) 371.
- ¹⁵⁹ S. M. Mendoza, I. Arfaoui, S. Zanarini, F. Paolucci, P. Rudolf, *Langmuir* **23** (2007) 582.
- ¹⁶⁰ L. V. Protsailo, W. R. Fawcett, *Electrochim. Acta* **45** (2000) 3497.
- ¹⁶¹ M. Rooth, A. M. Shaw, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006) 4741.
- ¹⁶² G. K. Olivier, D. Shin, J. B. Gilbert, L. M. A. Monzon, J. Frechette, *Langmuir* **25** (2009) 2159.
- ¹⁶³ M. L. Carot, V. A. Macagno, P. Paredes-Olivera, E. M. Patrito, *J. Phys. Chem. C* **111** (2007) 4294.
- ¹⁶⁴ C. A. Widrig, C. Chung, M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.* **310** (1991) 335.
- ¹⁶⁵ W. Wang, S. Zhang, P. Chinwangso, R. C. Advincula, T. R. Lee, *J. Phys. Chem. C* **113** (2009) 3717.
- ¹⁶⁶ C. E. D. Chidsey, D. N. Loiacono, *Langmuir* **6** (1990) 682.
- ¹⁶⁷ E. Sabatani, J. Cohen-Boulakia, M. Bruening, I. Rubinstein, *Langmuir* **9** (1993) 2974.
- ¹⁶⁸ J. J. Calvente, Z. Kováčová, M. D. Sanchez, R. Andreu, W. R. Fawcett, *Langmuir* **12** (1996) 5696.
- ¹⁶⁹ H. Munakata, D. Oyamatsu, S. Kuwabata, *Langmuir* **20** (2004) 10123.
- ¹⁷⁰ B. M. Quinn, K. Kontturi, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 7168.
- ¹⁷¹ P. R. Unwin, A. J. Bard, *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 5035.
- ¹⁷² S. -S. Wong, M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.* **485** (2000) 135.
- ¹⁷³ A. J. Tudos, D. C. Johnson, *Anal. Chem.* **67** (1995) 557.
- ¹⁷⁴ C. -J. Zhong, M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.* **425** (1997) 147.

- ¹⁷⁵ M. L. Carot, M. J. Esplandiu, F. P. Cometto, E. M. Patriito, V. A. Macagno, J. Electroanal. Chem. **579** (2005) 13.
- ¹⁷⁶ K. Aoki, T. Kakiuchi, J. Electroanal. Chem. **452** (1998) 187.
- ¹⁷⁷ W. H. Mulder, J. J. Calvente, R. Andreu, Langmuir **17** (2001) 3273.
- ¹⁷⁸ Q. Jin, J. A. Rodriguez, C. Z. Li, Y. Darici, N. J. Tao, Surf. Sci. **425** (1999) 101.
- ¹⁷⁹ R. F. Dou, X. Ma, L. Xi, H. L. Yip, K. Y. Wong, W. M. Lau, J. Jia, Q. Xue, W. Yang, H. Ma, A. K. Jen, Langmuir **22** (2006) 3049.
- ¹⁸⁰ T. F. Paulo, H. D. Abruña, I. C. N. Diógenes, Langmuir **28** (2012) 17825.
- ¹⁸¹ N. K. Chaki, M. Aslam, J. Sharma, K. Vijayamohan, Proc. Indian Acad. Sci. **113** (2001) 659.
- ¹⁸² Y. Kazzi, H. Awada, M. David, M. Nardin, Surf. Interf. Anal. **39** (2007) 691.
- ¹⁸³ E. Boubour, R. B. Lennox, J. Phys. Chem. B **104** (2000) 9004.
- ¹⁸⁴ E. Boubour, R. B. Lennox, Langmuir **16** (2000) 4222.
- ¹⁸⁵ E. Boubour, R. B. Lennox, Langmuir **16** (2000) 7464.
- ¹⁸⁶ S. I. Imabayashi, M. Iida, D. Hobara, Z. Q. Feng, K. Niki, T. Kakiuchi, J. Electroanal. Chem. **428** (1997) 33.
- ¹⁸⁷ T. Kakiuchi, M. Iida, S. I. Imabayashi, K. Niki, Langmuir **16** (2000) 5397.
- ¹⁸⁸ J. Bagg, M. D. Haber, H. P. Gregor, J. Colloid Interface Sci. **22** (1966) 138.
- ¹⁸⁹ S. E. Creager, J. Clarke, Langmuir **10** (1994) 3675.
- ¹⁹⁰ K. Hu, A. J. Bard, Langmuir **13** (1997) 5114.
- ¹⁹¹ J. Zhao, L. Luo, X. Yang, E. Wang, S. Dong, Electroanal. **11** (1999) 1108.
- ¹⁹² G. H. Lu, C. Y. Liu, H. Y. Zhao, W. Liu, L. P. Jiang, L. Y. Jiang, Chin. Chem. Lett. **15** (2004) 827.
- ¹⁹³ R. K. Shervedani, M. Bagherzadeh, S. A. Mozaffari, Sens. Act. B **115** (2006) 614.
- ¹⁹⁴ S. C. Burris, Y. Zhou, W. A. Maupin, A. J. Ebelhar, M. W. Daugherty, J. Phys. Chem. C **112** (2008) 6811.
- ¹⁹⁵ P. Buhlmann, H. Aoki, K. P. Xiao, A. Amemiya, K. Tohda, Y. Umezawa, Electroanal. **10** (1998) 1149.
- ¹⁹⁶ M. Heyrosky, S. Vavrica, J. Electroanal. Chem. **36** (1972) 203.
- ¹⁹⁷ J. J. Calvente, R. Andreu, Anal. Chem. **83** (2011) 6401.
- ¹⁹⁸ I. Carrillo, M. C. Quintana, A. M. Esteva, L. Hernández, P. Hernández, Electroanal. **20** (2008) 2614.

-
- ¹⁹⁹ J. J. Calvente, M. Molero, R. Andreu, G. López-Pérez, A. M. Luque, *Anal. Chem.* **84** (2012) 1034.
- ²⁰⁰ F. Ma, R. B. Lennox, *Langmuir* **16** (2000) 6188.
- ²⁰¹ A. J. S. Ahammad, S. Sarker, M. A. Rahman, J. J. Lee, *Electroanal.* **22** (2010) 694.
- ²⁰² M. Lv, M. Wei, F. Rong, C. Terashima, A. Fujishima, Z. -Z. Gu, *Electroanal.* **22** (2010) 199.



72653

U.N.R.C.
Biblioteca Central



72653

843201-070001