	•	
	MARZARI Estudios de	, GABRIELA LO propiede
6.00-0	2014	73945



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química



Creer...Crear...Crecer

"ESTUDIOS DE PROPIEDADES Y APLICACIONES ELECTROQUIMIOLUMINISCENTES DE NUEVOS SISTEMAS ORGÁNICOS"

Marzari, Gabriela Lorena

TESIS DOCTORAL

Doctorado en Ciencias Químicas

101.5

MFN:	
Clasif:	
+	912

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

Doctorando: Lic. Gabriela Lorena Marzari.

Director de Tesis: Dr. Fernando Gabriel Fungo.

Co-Director de Tesis: Dr. Gustavo Morales.

Jurado de Tesis:

Dra. Marisa R. anto

Dr. Sonia G. Bertolotti Dr. José L. Fernández

30 de Mayo de 2014

A Pablo

A mis Papás

A Fabry

"Cuando un afán o una necesidad se repiten y personas de similar naturaleza y destino llevan adelante esfuerzos en la misma dirección por años o siglos en todo el mundo, el trabajo de una persona, por más ínfimo y solitario que sea se convierte en una parte del gigantesco esfuerzo del hombre por abarcar la complejidad del universo"

Pablo M.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo **Pabli**, por ser mi compañero incondicional en TODO, por su amor, por su paciencia y calma y por llenarme de fuerzas a cada instante...

A mi mamá Griselda y a mi papá Tino por darme la posibilidad de estudiar y formarme en lo que elegí, y por ser mi sostén desde el principio y para siempre. Al hermano más maravilloso y guerrero del universo, Fabri, por su fortaleza y ejemplo de vida, por su apoyo y confianza incondicional. Y a los tres por la hermosa familia que tenemos.

A mis suegros Adru y Walter por toda la contención y la alegría que me brindan a cada momento. A mis cuñados y amigos: Yoy, Dayi, Noel y Diego.

A mis tíos: Meme y Carlitos, a mi tía Yoli. A mi Abuela. A mis primos y primitos.

A mis amigas de la vida: Cora, Gise, Pau y Noe. A mis amigas/os de la uni: Diana, Eve, Eli, Jime M., Lau, Lore, Alvaro, Dani y Jorge por acompañarme y aguantarme en el día a día desde el comienzo.

A mi director **Fernando** (**Primo**) y co-director **Gustavo** (**Chon**), por guiarme y aconsejarme desinteresadamente y de la mejor manera para poder realizar este doctorado.

A los jurados de ésta Tesis: **Marisa, Sonia** y **José**, por sus excelentes aportes y consejos, por el tiempo y la disposición brindada en todo momento, por ajustarse a mis tiempos contra reloj.

Al grupo de trabajo: Lore, Toto, Dani, Luciana, Javi, Miguel, Nair, Dani, Belén y Marisa, por los hermosos y risueños momentos compartidos.

A mis compañeros/as y amigos/as de trabajo que me acompañaron, me ayudaron, me aguantaron y me escucharon cada día, a **TODO Gran Becario**: Jorge, Diana, Fede, Euge, Lore, Dani, Eli, Alvaro, Angelica, Pablo, Clau, Ale, Caro, Javi, Eve, Lau, Jime M, Jime T, Naty, Vale, Rebe, Luciano, Paula, Paulo, Dari, Rusbel, Cristian, Albi, Lau, Ceci, Cesar, Maqui, Juanse y Ema.

A Rosita, "Cacho", "Negrita", Marisel y Graciela por la predisposición y colaboración que me brindaron en todo momento.

A CONICET y a la UNRC, por brindarme el apoyo financiero y los medios necesarios para mi formación.

A todos los integrantes del Departamento de Química. En especial, al Dr. Leonides Sereno por ayudarme en el armado del equipamiento experimental y al Dr. Rodrigo Palacios, por su tiempo y conocimiento brindado.

A todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron en mi vida para llegar a esta instancia.

A Jesús y María por darme la gracia de vivir y ayudarme a transitar la vida!!!

A todos y cada uno de ustedes, les agradezco con todo mi corazón y les digo una y otra vez:

Muchísimas Gracias!!!

RESUMEN

En la presente Tesis se consolidó una técnica de estudio que no estaba desarrollada con anterioridad en el lugar de trabajo. Para ello, se diseñó y montó todo el equipamiento necesario para la generación y detección de la electroquimioluminiscencia (ECL). El trabajo de Tesis se basó en tres líneas diferentes, dos de ellas estuvieron relacionadas con el estudio y desarrollo de nuevos materiales con capacidad ECL (clasificados como moleculares y nanopartículas) y la otra estuvo asociada a una aplicación analítica de la ECL.

Por un lado, como sistema molecular, se estudió un conjunto de colorantes derivados del núcleo difluoro-boroindaceno (BODIPY), modificados sistemáticamente con grupos donores-aceptores de electrones en la posición 8 del núcleo BODIPY. Se logró demostrar que principalmente el comportamiento electroquímico y electroquimioluminiscente está influenciado por la capacidad —donor o aceptor de electrones— y por la distancia a la que se encuentra el sustituyente en la posición 8 del núcleo fotoactivo. Demostrando de este modo, que la variación de las características estructurales de estos colorantes permite modular sus propiedades redox y en consecuencia sus propiedades electroquimioluminiscentes. Estos estudios generaron conocimiento para diseñar estructuras con propiedades mejoradas y demostraron que tienen potencial para su posible uso como marcadores ECL con propiedades específicas y en dispositivos optoelectrónicos.

Por otro lado, como sistema nanoscópico, se sintetizó y caracterizó morfológica, estructural, química y fisicoquímicamente nanopartículas de carbono (CNPs). La exhaustiva caracterización estructural de las CNPs reveló que están constituidas por un núcleo grafitico rodeado por una capa amorfa de espesor variable. Tanto el interior como la capa exterior de carbono amorfo, se pueden describir como un material carbonoso con una mezcla de átomos de carbono con hibridación $sp^2 y sp^3$, que contienen baja cantidad de grupos funcionales derivados de heteroátomos, tal como se esperaba a partir del método de purificación propuesto. El comportamiento optoelectrónico no se puede asociar a efectos de confinamiento cuántico relacionado al tamaño y la forma de las nanopartículas, tal como se ha observado en otros sistemas reportados en la literatura. En este caso, todas las nanopartículas comparten una característica común, la capa de carbono amorfo, y según el trabajo desarrollado durante esta Tesis, esta particularidad parece jugar un papel importante en la determinación de sus propiedades optoelectrónicas.

El desarrollo de una aplicación analítica de la ECL se fundamentó en el potencial que presenta la técnica para la detección de herbicidas, como por ejemplo el glifosato (GLY). El GLY posee en su estructura un grupo amino capaz de funcionar como correactante de complejos de rutenio. Los resultados demostraron la posibilidad de generar ECL utilizando el GLY como coreactante de $Ru(bpy)_3^{+2}$ y además, revelaron que existía una correlación lineal entre la señal de ECL y la concentración de GLY demostrando la viabilidad de la técnica. Sin embargo, a causa de la formación de óxidos sobre la superficie del electrodo la señal ECL carece de la estabilidad y sensibilidad necesaria para detectar los niveles de GLY establecidos por las normativas vigentes. En función de ello, se usó electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas (SAMs) que poseían diferentes grupos terminales, con y sin carga. Se concluyó que el electrodo modificado con SAMs binarias de CH₃ | COOH exhibía el mejor desempeño analítico y permitió optimizar considerablemente el sensor desarrollado. En consecuencia el mejoramiento de ciertos parámetros experimentales, como la superficie del electrodo de trabajo, permitió desarrollar un método para detectar GLY sin previa modificación química.

ABSTRACT

In this thesis, a study technique that was not previously developed in the workplace was consolidated. To do this, we designed and assembled all the necessary equipment for the generation and detection of electrochemiluminescence (ECL). The development of this thesis was based on three different lines, two of which were related to the study and development of new materials with ECL capacity (classified as molecular and nanoparticles) and the other was associated with an analytical application of ECL.

Firstly, as a molecular system, a set of dyes derived from difluoro-boroindaceno core (BODIPY), systematically modified with electron donors and acceptors at the 8-position of BODIPY core was studied. It was proved that mainly the electrochemical behavior and electrochemiluminescent is influenced by capacity, donor or acceptor electron, and the distance that is the substituent at position 8 of the photoactive core. Thus demonstrating that the change of the structural features of these dyes can modulate its redox properties and consequently its electrochemiluminescent properties. These studies generated knowledge that allows the designing of structures with improved properties and demonstrated to have potential for possible use as ECL labels with specific properties and optoelectronic devices.

Furthermore, as a nanoscopic system, carbon nanoparticles (CNPs) were synthesized and characterized morphologically, structurally, chemically and physicochemically The complete structural characterization revealed that CNPs are constituted by a graphite core surrounded by an amorphous layer of variable thickness. Both the interior and the outer layer of the amorphous carbon can be described as a carbonaceous material with a mixture of carbon with sp² hybridized and sp³, containing low amounts of functional derivatives heteroatom groups, as it was expected from the purification method proposed. The optoelectronic behavior cannot be associated with quantum confinement effects related to the size and shape of the nanoparticles, as observed in other systems reported in the literature. In this case, all the nanoparticles share a common characteristic, the amorphous carbon layer, and as the work developed during this thesis, this feature seems to play an important role in determining their optoelectronic properties.

The development of an analytical ECL application was based on the potential that presents the technique for the detection of herbicides, such as glyphosate (GLY). The GLY in its structure has groups capable of functioning as developed complex reactants ruthenium. The results demonstrated the possibility to generate ECL using GLY as a coreactant of $Ru(bpy)_3^{+2}$, and they also revealed that there was a linear correlation between the ECL signal and GLY concentration indicating the feasibility of the technique. However, because of the formation of oxides on the surface of the electrode, the ECL signal lacks stability and sensitivity to detect the GLY levels established by current regulations. Accordingly, Au electrodes modified with self-assembled monolayers (SAMs) possessing different terminal groups, with and without load were used. It was concluded that the electrode modified with CH_3 COOH binary SAMs exhibited the best analytical performance and improved the developed sensor significantly. Consequently, the improvement of certain experimental parameters, such as the surface of the working electrode, allowed the development of a method for detecting GLY without a previous chemical modification.

RESUMEN DEL CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

ASPECTOS EXPERIMENTALES

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

Referencias

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>v</i>
ÍNDICE DE ESQUEMAS	<i>IX</i>
ÍNDICE DE TABLAS	XI
GLOSARIO	XIII
	l.

CAPÍTULO 1 ΙΝΤRΟDΗΟΟΙΟΝ

1.1. Electroquimioluminiscencia: definición y características generales	3
1.2. Un poco de historia.	5
1.3. Sistemas ECL	8
1.3.1. Sistemas moleculares	9
1.3.1.1. Sistemas Inorgánicos	9
1.3.1.2. Sistemas Orgánicos	
1.3.2. Sistemas de nanopartículas	
1.4. Aplicaciones Prácticas	
1.4.1. Aplicaciones Analíticas	
1.5. Sistemas de estudio y desarrollo de una aplicación analítica	19
1.5.1. Sistema de estudio: colorantes BODIPYs	
1.5.2. Sistema de estudio: Nanopartículas de Carbono	
1.5.3. Desarrollo de una aplicación ECL: Detección de Glifosato	23
CADÍTILOS	

CAPÍTULO 2 ORIETIVOS

ODJEIIV		
2.1. Objeti	os Generales	35
2.2. Objeti	os Específicos	35

CAPÍTULO 3	
FUNDAMENTOS TEORICOS DE LA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA	
3.1. Electroquimioluminiscencia	

1 010/16/16/06 120/16/06 DE MA EDBOTHO COMPLETENCE	
3.1. Electroquimioluminiscencia	
3.2. Mecanismos de generación de ECL	
3.2.1. Aniquilación de iones	
3.2.2. Correactantes ECL.	
3.2.2.1. Típicos sistemas ECL con correactantes y sus mecanismos	47
3.2.2.1.1. Correactantes del tipo "Oxidación-Reducción" o "Correactantes Anódica	os" 47
3.2.2.1.1.1. Sistema de correactantes ECL relacionado con Tri-n-propilamina (TPr	A)47
3.2.2.1.1.2. Otros sistemas de correactantes ECL relacionados con aminas	
3.2.2.1.2. Correactantes del tipo "Reducción-Oxidación" o "Correactantes Catodic	os"52
3.2.2.1.2.1. Sistema de correactante ECL relacionado con peróxido de benzoilo	53

I

CAPÍTULO 4

DISENO INSTRUMENTAL PARA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA	
4.1. Estado del conocimiento	59
4.2. Instrumentos para ECL desarrollados en otros laboratorios	59
4.2.1. Sistema con múltiples detectores y monocromador	65
4.3. Celda electroquímica y electrodos	68
4.3.1 Sistema PMT-ECL en la UNRC	72
4.3.2. Equipamiento para ECL: medición de espectros de ECL	80
4.4 Diseño y desarrollo del sistema de detección para ECL en la UNRC	70

CAPÍTULO 5

ASPECTOS EXPERIMENTALES

5.1. Reactivos	85
5.2. Electroquímica	86
5.3. Espectroscopia	87
5.3.1. Espectroscopia U.V-Visible	87
5.3.2. Espectroscopia de Emisión	88
5.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	88
5.3.4. Espectroscopia electrónica de pérdidas de energía (EELS)	89
5.3.5. Espectroscopia de ECL	89
5.4. Detección de ECL	89
5.3.1. Éspectroscopia U.V-Visible 8 5.3.2. Espectroscopia de Emisión 8 5.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear 8 5.3.4. Espectroscopia electrónica de pérdidas de energía (EELS) 8 5.3.5. Espectroscopia de ECL 8 5.4. Detección de ECL 8	87 88 89 89 89

CAPÍTULO 6

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF2-DIPIRROMETENOS

Estado del conocimiento	95
Caracterización espectroscópica: Fotofísica de los colorantes BODIPY	99
Caracterización electroquímica	. 107
Caracterización electroquimioluminiscente	
Conclusiones específicas	123
	Estado del conocimiento Caracterización espectroscópica: Fotofísica de los colorantes BODIPY Caracterización electroquímica Caracterización electroquimioluminiscente Conclusiones específicas

CAPÍTULO 7 NANOPARTÍCULAS DE CARBONO

NANOFAKIICULAS DE CARDONO	
7.1. Estado del conocimiento	
7.2. Síntesis de nanopartículas de carbono	
7.3. Caracterización de las Nanopartículas de Carbón	
7.3.1. Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM)	
7.3.2. Espectroscopia Infrarroja	
7.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	
7.3.4. Espectroscopia electrónica de pérdidas de energía	145
7.3.6. Caracterización electroquímica	
7.3.7. Caracterización electroquimioluminiscente	
7.4. Conclusiones específicas	

CAPÍTULO 8 DETECCIÓN DE GLIFOSATO POR ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA SOBRE AUTOENSAMBLADOS EN ORO 8.4.1. Detección cuantitativa de GLY en un electrodo de Au modificado: Au/SAM-CH₃ 195 8.4.2. Detección cuantitativa de GLY en electrodos de Au modificados: Au/SAM-

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES GENERALES Y CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	
9.1. Conclusiones Generales	
9.2. Conclusiones específicas	
9.2.1. Colorantes BODIPY	
9.2.2. Nanopartículas de carbono	
9.2.3. Desarrollo de una aplicación analítica: Detección de glifosato	
Referencias	164, 216

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea de tiempo donde se muestra el desarrollo de la ECL7
Figura 2. a) Estructura molecular del núcleo BODIPIY. b) Estructura molecular del PM
567
Figura 3. a) Respuesta de ECL en función del potencial y b) voltamperograma cíclico para
$Ru(bpy)_3^{+2}$ 1 nM en presencia de 0,1 M de TPrA c) Respuesta de ECL en función del
potencial para el mismo sistema pero con $Ru(bpy)_3^{+2}$ 1 μM . d) Respuesta de ECL en
función del potencial para diferentes concentraciones de Ru(bpy)3 ⁺² en presencia de 0,1 M
de TPrA
Figura 4. Sistema PMT-ECL
Figura 5. a) Respuesta de ECL típica en función del potencial aplicado obtenida durante un
voltamaperograma cíclico para Ru(bpy)3 ⁺² y TPrA en ACN. b) Respuesta de ECL en
función del tiempo obtenida a partir de experimentos de cronoamperometría en el mismo
sistema
Figura 6. Sistema CCD-ECL
Figura 7. Espectro de ECL para Ru(bpy) ₃ ⁺² 1 mM en ACN, obtenido mediante un CCD. 64
Figura 8. Sistema PD-ECL
Figura 9. Esquema general de un equipamiento para ECL
Figura 10. Celda electroquímica convencional de tres electrodos para ECL
Figura 11. Celdas electroquímicas no convencionales para ECL70
Figura 12. Diagrama general del equipamiento para ECL en la UNRC
Figura 13. Fotografía del equipamiento para ECL de la UNRC74
Figura 14. Fotomultiplicador utilizado como detector de luz para el equipamiento de ECL.
Figura 15. Disposición experimental para la celda electroquímica y el PMT dentro de la
caja negra75
Figura 16. Celda electroquímica y electrodo de trabajo (W) en forma de "L" para ECL. La
celda se construyó en la UNRC

Figura 17. Nuevo instrumento para ECL en la UNRC. a) Nueva celda electroquímica de
teflón. b) Vista inferior de la celda: se observa la ventana de cuarzo y los electrodos
permanecen fijos en el nuevo diseño. c) El PMT se encuentra debajo de la celda y más
próximo al electrodo emisor de luz77
Figura 18. a) y c) Respuesta de corriente (i) en función del tiempo para uno y dos saltos de
potencial respectivamente. b) y d) Respuesta de ECL en función del tiempo para uno y dos
saltos de potencial respectivamente. Sistema de estudio: $Ru(bpy)_3^{2+}/TPrA$ en buffer de
fosfato pH 879
Figura 19. Equipamiento para medir espectros de ECL en la UNRC. a) Soporte de la celda
electroquímica adaptado a la cavidad oscura del fluorómetro. b) Conexión eléctrica entre el
potenciostato (unidad electroquímica) y el fluorómetro (unidad espectrofotométrica)80
Figura 20. Espectro de ECL para Ru(bpy) ₃ ²⁺ (1 mM) en ACN
Figura 21. a) Estructura molecular del núcleo BODIPIY. b) Estructura molecular del PM
567
Figura 22. Estructuras moleculares y acrónimos de los colorantes BODIPY98
Figura 23. Espectros de absorción () y de fluorescencia () en ACN para la serie PnAc y
para P3MA101
Figura 24. Espectro de absorción () y de fluorescencia () en ACN104
Figura 25. Espectro de absorción () y de fluorescencia () para la serie $P1Ar_n$ en ACN.
Figura 26. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN.
Figura 27. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN.
Figura 28. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN.
112 Figura 28. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN. 115 Figura 29. Espectros de absorción (), fluorescencia () y de ECL (••••) en solución 1 mM
112 Figura 28. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN. 115 Figura 29. Espectros de absorción (), fluorescencia () y de ECL (••••) en solución 1 mM de cada colorantes en ACN con 0,1 M TBAHF ₆ como electrolito soporte.
112 Figura 28. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN. 115 Figura 29. Espectros de absorción (), fluorescencia () y de ECL (•••) en solución 1 mM de cada colorantes en ACN con 0,1 M TBAHF ₆ como electrolito soporte. 119 Figura 30. Respuesta cronoamperométrica y de ECL luego de sucesivos pulsos de

Figura 31. Imágenes TEM representativas de las CNPs en baja (a y b) y alta resolución
(HRTEM c-e). Las fotografías c y d muestran la distribución de forma y tamaño, mientras
que las d-erevelan las variaciones para una misma morfología134
Figura 32. Imágenes HRTEM seleccionadas para mostrar la distribución de forma y
tamaño de las CNPs y las variaciones para una misma morfología
Figura 33. Imagen HRTEM para una CNP
Figura 34. Espectro FT-IR de las CNPs purificadas (magenta) y la sal de amonio
precursora (negro)
Figura 35. Espectro de resonancia magnética nuclear ¹³ C-RMN de CNPs registrado en
CDCl ₃
Figura 36. a) Imagen obtenida por HRTEM de una CNP donde se indican las regiones en
las que se adquirieron los espectros EELS. b) Espectro EELS de una CNP acotado a la
región correspondiente al borde K (estado 1s) para C
Figura 37. a) Espectro de absorción UV-visible de las CNPs en THF a 25 °C. b) Espectros
de fluorescencia normalizada de las CNPs en solución de THF a 25°C144
Figura 38. Gráfico de la energía del pico de máxima emisión y su correspondiente
intensidad en función de la energía del haz de excitación146
Figura 39. a) Espectros de excitación de las CNPs en THF a 25 °C. b) Espectros de
excitación normalizados de la banda de menor energía, obtenidos a tres longitudes de
emisión diferentes: I: 2,94 eV (422 nm) II: 2,80 eV (442 nm) y III: 2,19 eV (567 nm) 148
Figura 40. Voltamperograma cíclico para la primera fracción de CNPs en THF
Figura 41. Voltamperogramas de pulso diferencial para la primera fracción de CNPs en
THF
Figura 42. Espectro de ECL de las CNPs en solución de THF y 10 mM de BPO 157
Figura 43. Estructura molecular del Glifosato
Figura 44. Voltamperogramas cíclicos de $Ru(bpy)_3^{+2}$ (1 mM) en solución de PBS pH 8
sobre un electrodo de a) Pt y uno de c) Au. Voltamperogramas cíclicos de GLY (0,3 mM y
0,5 mM) en PBS pH 8 sobre un electrodo de b) Pt y uno de d) Au
Figura 45. Diagrama de saltos de potencial aplicados

Figura 46. Intensidad de ECL vs. tiempo para un salto de potencial sobre un electrodo de Pt, entre un $E_i = 0$ V y un $E_f = 1, 1$ V. a) $Ru(bpy)_3^{+2}$ (1 mM, la misma para los tres casos) b) $Ru(bpy)_{3}^{+2}+GLY (25 \ \mu M) c) Ru(bpy)_{3}^{+2}+GLY (100 \ \mu M).$ 183 **Figura 47.** Intensidad de ECL en función del tiempo para el sistema $Ru(bpy)_{3}^{+2}/GLY$ (1) mM/50 µM) en 0,1 M PBS (pH 8) sobre un a) electrodo de Pt y un b) electrodo de Au...184 Figura 48. Intensidad de ECL vs. tiempo para un salto de potencial entre un $E_i = 0V y un$ $E_f = 0.9V$ en presencia de un electrodo de Au. a) $Ru(bpy)_3^{+2}$ (1 mM en 0.1 M PBS (pH 8) en los tres casos) b) $Ru(bpy)_3^{+2} + GLY (25 \ \mu M) c) Ru(bpy)_3^{+2} + GLY (100 \ \mu M).....186$ **Figura 49.** Voltamperograma y la correspondiente respuesta de ECL para $Ru(bpy)_3^{+2}$ (1) mM) en 0,1 M PBS (pH8) y en presencia de GLY (100 µM)......187 Figura 50. Curvas de calibración de GLY: a) con un electrodo de Pt y b) con un electrodo de Au......189 Figura 51. Comportamiento electroquímico de una solución de PBS pH 8 en a) electrodo de Au desnudo y b) electrodo de oro modificado: Au/SAM-CH3. c) Voltamperograma cíclico para una solución de Ru(bpy)₃⁺² (1 mM) en solución de PBS pH 8 sobre el electrodo Au/SAM-CH₃. El voltamperograma a rayas (---) representa la respuesta de una solución de **Figura 52.** Intensidad de ECL vs. tiempo para un salto de potencial entre un $E_i = 0 V y E_i$ 0,9 V sobre un electrodo de Au modificado: Au/SAM-CH₃. a) $Ru(bpy)_{3}^{+2}$ (1 mM en los tres Figura 53. Intensidad de ECL en función del tiempo para el sistema Ru(bpy)₃⁺²/GLY (1 mM/50 µM) en 0,1 M PBS (pH 8) sobre un a) electrodo de Au desnudo y un b) electrodo Figura 54. Curvas de calibración de GLY: a) con un electrodo de Au desnudo; b) con un electrodo de Au modificado -Au/SAM-CH₃-.....196 Figura 55. Curvas de calibración de GLY: a) con un electrodo de Au/SAM-COOH y b) Figura 56. Curvas de calibración de GLY: a) con un electrodo de Au/SAM-NH₂ y b) con

VIII

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo general de ECL
Esquema 2. Conversión de energía eléctrica en luz4
Esquema 3. Mecanismo de ECL para Ru(bpy) ₃ ⁺² en ACN
Esquema 4. Mecanismo de ECL para $Ru(bpy)_3^{+2}$ y oxalato en solución acuosa
Esquema 5. Mecanismo de ECL: aniquilación de iones
Esquema 6. Generación de ECL desde excímeros y exciplejos
Esquema 7. Mecanismo de ECL: correactantes anódicos ("oxidación-reducción")
Esquema 8. Mecanismo de ECL: correactantes catódicos ("reducción-oxidación")43
Esquema 9. Mecanismo general de ECL con un correactante catódico
Esquema 10. Mecanismo de ECL para Ru(bpy) ₃ ²⁺ /TPrA: con oxidación electroquímica de
TPrA y oxidación homogénea de Ru(bpy) ₃ ²⁺
Esquema 11. Mecanismo de ECL para Ru(bpy) ₃ ²⁺ /TPrA: "ruta catalítica" con oxidación
electroquímica de TPrA
Esquema 12. Mecanismo de ECL para Ru(bpy) ₃ ²⁺ /TPrA: "ruta catalítica" con oxidación
electroquímica de TPrA
Esquema 13. Mecanismo de ECL para Ru(bpy) ₃ ²⁺ /TPrA: "ruta catalítica" con oxidación
homogénea de TPrA
Esquema 14. Mecanismo de ECL para R y peróxido de benzoilo (BPO)54
Esquema 15. Reacción heterogénea para la reducción catódica de ácidos carboxílicos en
solventes orgánicos
Esquema 16. Reacción heterogénea para la reducción catódica de cloruro de bencilo en
solventes orgánicos
Esquema 17. Reacción heterogénea para la reducción catódica de ésteres en solventes
orgánicos114
Esquema 18. Síntesis de la nanopartículas de carbono
Esquema 19. Mecanismo de ECL para las CNPs y peróxido de benzoilo (BPO)
Esquema 20. Equilibrios ácido-base del glifosato con sus pK _a correspondientes
Esquema 21. Mecanismo general de sistema ECL con correactante anódico
Esquema 22. Mecanismo general de ECL entre $Ru(bpy)_3^{+2}$ y GLY
IX

Esquema 23. Meca	nismo propuesto d	ie ECL entre R	$Ru(bpy)_3^{+2} y GL^{-1}$	Y	
Esquema 24. Mod	elo simplificado p	para explicar	la transferencia	electrónica de	especies
cargadas en solució	n a través de SAM	Is de alcanotio	les con una carg	a neta	200

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Típicos correactantes de ECL	
Tabla 2. Propiedades espectroscópicas	
Tabla 3. Propiedades electroquímicas	
Tabla 4. Límites permisibles de glifosato por algunas organizaciones mundiales.	173
Tabla 5. Curvas de calibración y parámetros analíticos para la determinación	de GLY en
agua	
Tabla 6. Curvas de calibración y parámetros analíticos para la determinación	de GLY en
agua	
Tabla 7. Curvas de calibración y parámetros analíticos para la determinación	de GLY en
agua	

GLOSARIO DE MOLÉCULAS

 $\mathbf{Ru(bpy)_3}^{+2}$. Cloruro tris(bipiridilo) de rutenio (II)



Rubreno. 5,6,11,12-tetrafenilnaftaceno



DPA.

9,10-difenilantraceno



Colorantes BODIPYs (Capítulo 6)

Grupo PnR

XIII

P1OH. 4,4-Difluor-8-(hidroxi-metil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-boro-3a,4adiaza-s-indaceno



P2CO2H. 4,4-Difluor-8-(carboxi-etil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-boro-3a,4a-diaza-*s*-indaceno



P1Ac.4,4-Difluor-8-(acetiloximetil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno



P3MA. 4,4-Difluor-8-(3-(2-en-2-metil-acetiloxi)propil)-1,3,5,7-tetrametil-

2,6-dietil-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno



XIV



P5Ac. 4,4-Difluor-8-(acetiloxi-pentil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-boro-3a,4adiaza-*s*-indaceno



P10Ac. 4,4-Difluor-8-(acetiloxi-decil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-boro-3a,4adiaza-s-indaceno



Grupo P1ArnR

P1Ar1Cl. 4,4-Difluor-8-(4-cloro-fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-boro-3a,4adiaza-s-indaceno



XV

P1Ar3Br. 4,4-Difluor-8-(4-(3-bromo-propil)fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4boro-3a,4a-diaza-s-indaceno



P1Ar1Ac. 4,4-Difluor-8-(4-(acetiloxi-metil)fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4boro-3a,4a-diaza-s-indaceno



P1Ar3Ac. 4,4-Difluor-8-(4-(3-acetiloxi-propil)fenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-boro-3a,4a-diaza-*s*-indaceno



Glifosato (GLY). N-(fosfonometil)glicina (Capítulo 8)



1-undecanotiol (UDT)



Acido 11-mercapto-undecanoico (MUA)



11-mercapto-undecilamina (AUT)



XVII

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Α	Área
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
Ag/AgCl	Electrodo de plata, cloruro de plata
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
ATT	Aniquilación triplete-triplete
Au	Oro
BODIPY	difluoro-boroindaceno o boro-dipirrometeno
BPO	Peróxido de benzoilo
bpy	Ligandos bipiridilos
BZ	Benceno
C	Carbono
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CDs	Puntos cuánticos de carbono
CE	Electroforesis capilar
CNIA	Comisión nacional de investigación sobre agroquímicos
CNPs	Nanopartículas de carbono
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
Ct	Contraelectrodo
CWQG	Canadian Water Quality Guidelines for Glyphosate for the Protection of Aquatic Life
DBAE	2-(Dibutylamino)ethanol

XIX

DCEt	Dicloroetano
DCMe	Diclorometano
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMF	Dimetilformamida
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial
E ₀₋₀	Energía de transición cero-cero
ECL	Electrochemiluminescence, electroquimioluminiscencia
ECS	Electrodo de Calomel Saturado
EELS	Espectroscopía electrónica de pérdidas de energía
$\mathbf{E}_{\mathbf{f}}$	Potencial final
Ei	Potencial inicial
E _p	Potencial de pico
EPP	Agencia de protección ambiental de los EE.UU
Es	Energía del estado excitado singlete
Et	Energía del estado excitado triplete
Fc/Fc^+	Ferroceno/Ferrocinio
FFT	Transformada de Fourier
FIA	Análisis de inyección por flujo
FL	Fotoluminiscencia
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de fourier
GC	Cromatografía gaseosa
GLY	Glyphosate, glifosato
НОМО	High Occupied Molecular Orbital, Orbital Molecular más alto Ocupado
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de masas acoplado

HRTEM	High-Resolution Transmission Electron Microscopy, microscopia electrónica de transmición de alta resolución		
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria		
i _p	Corriente de pico		
IR	Espectroscopia infrarroja		
ΙΤΟ	Indium- Tin Oxide, Oxido de Estaño dopado con Indio		
LC	Cromatografía Líquida		
LEDs	Diodos emisores de luz		
LOD	Límite de detección		
LUMO	Low Occupied Molecular Orbital, Orbital Molecular más bajo Desocupado		
Me ₄ Si	Tetrametilsilano		
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido		
NPs	Nanopartículas		
OLED	Organic Light Emitting Diodes, diodo orgánico emisor de luz		
OMS	Organización mundial de la salud		
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos		
PAMAM	Dendrímeros de poly(amidoamina)		
PBS	Buffer de fosfato		
PD	Fotodiodo		
PEG	Polietilenglicol		
phen	Fenantrolina		
PMT	Fotomultiplicador		
PPV	Polifenil venileno		
Pt	Platino		
R	Electrodo de referencia		
SAM	Self-assembled monolayer, monocapa autoensamblada		

XXI

SDR	Desviación estándar relativa
TBAHFF	Hexafluorfosfato de tetrabutilamonio
TEAP	
TEM	Transmission Electron Microscopy, microscopia electrónica de transmisión
THF	Tetrahidro furano
UV-Visible	Espectroscopia Ultravioleta-Visible
v	Velocidad de barrido
VC	Voltamperometría cíclica
VCs	Voltamperogramas cíclicos
W	Electrodo de trabajo
ΔΕ	Separación de potenciales de picos anódico y catódico
μTAS	Microsistemas de análisis total

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. Electroquimioluminiscencia: definición y características generales

La *electroquimioluminiscencia* (ECL) es un proceso de emisión de luz, que ocurre sobre la superficie de un electrodo dentro de una celda electroquímica. Este fenómeno es producido por una reacción de transferencia de cargas energéticamente favorecida entre iones generados electroquímicamente (**Esquema 1**).^{1,2} Un sistema típico está formado por una solución que contiene los reactivos A y B conjuntamente con el electrolito soporte. La secuencia de reacción para generar una especie en estado excitado y la consecuente emisión de luz está representada en el siguiente esquema:

$A + e^- \rightarrow A^{-\bullet}$	(proceso de reducción sobre un electrodo)
$B - e^- \rightarrow B^{+\bullet}$	(proceso de oxidación sobre un electrodo)
$A^{-\bullet} + B^{+\bullet} \rightarrow {}^{1}A^{*} + B$	(formación estado excitado)
$^{1}A^{*} \rightarrow A + hv$	(emisión de luz)

Esquema 1. Mecanismo general de ECL.

Los compuestos A y B pueden ser la misma especie, por ejemplo $Ru(bpy)_3^{+2}$ en su forma oxidada y reducida, o pueden ser dos especies químicas diferentes. La ECL es un fenómeno donde los reactantes pueden ser generados electroquímicamente por dos mecanismos posibles: vía aniquilación y vía correactantes. Ambos mecanismos tienen diversas ventajas, y siguen caminos separados para generar el estado excitado que finalmente emite luz en la región visible del espectro electromagnético.^{1,2}

En un sentido más general el fenómeno de ECL supone la transformación de energía eléctrica en energía química y la consecuente obtención de luz, como producto de la reacción de transferencia electrónica que tiene lugar dentro de una celda electroquímica (Esquema 2).

A + B + electricidad \rightarrow iones radicales \rightarrow estados excitados $\rightarrow hv$ (energía eléctrica \rightarrow energía química \rightarrow luz como producto)

Esquema 2. Conversión de energía eléctrica en luz.

En relación a otras técnicas que implican procesos de emisión de luz, la ECL es una clase particular de quimioluminiscencia (QL). En la QL el proceso de emisión es generado a partir de la mezcla de una molécula emisora con reactivos apropiados en un recipiente de reacción. Mientras que en el caso de la ECL, el proceso de emisión es controlado por la corriente que pasa a través del electrodo que actúa como un centro emisor. También, debido a su naturaleza, la ECL es una técnica que presenta numerosas ventajas desde el punto de vista analítico, ya que combina la alta sensibilidad de las técnicas fluorescentes con el control que otorgan las técnicas electroquímicas.

Como técnica analítica, la ECL tiene también algunas primacías con respecto a la QL:

Presenta mayor libertad espacial. Debido a que la reacción electroluminiscente solo ocurre en la capa de difusión del electrodo. En este caso, el punto de emisión puede ser controlado o manipulado por medio del movimiento del electrodo y su correspondiente ajuste frente a la ventana del detector electroquimioluminiscente o modificando el área y/o geometría del mismo.

Es una técnica altamente selectiva. Ya que la generación de estados excitados puede ser controlada cambiando el potencial del electrodo.

Es una técnica no destructiva. Ya quelas especies electroquimioluminiscentes son regenerados después de la emisión.

Por otra parte, debido a su naturaleza, la ECL combina la alta sensibilidad de las técnicas basadas en el fenómeno de fluorescencia con el control que otorgan las técnicas electroquímicas. En comparación con la fluorescencia, no necesita una fuente de luz de excitación, por lo que los problemas relacionados con la dispersión y las impurezas luminosas están ausentes. Además, la especificidad de la reacción electroquimioluminiscente asociada con marcadores ECL (*ECL labels*), por ejemplo Ru(bpy)₃⁺² y especies de correactantes, disminuyen los problemas de "self-quenching".^{2,3}

Por lo tanto, la ECL es una técnica que presenta numerosas ventajas para estudiar las propiedades optoelectrónicas de diferentes sistemas y desarrollar aplicaciones analíticas.¹⁻¹¹ En este sentido, la ECL ha ganado considerable atención como método de análisis debido a sus características esenciales, tales como la alta sensibilidad, selectividad y un amplio intervalo dinámico lineal para una variedad de analitos.¹²⁻¹⁵ Así, ha sido empleada enestudios básicos de las propiedades optoelectrónicas de numerosos sistemas^{1,2,4,10,16} y en estudios analíticos basados en oxalato,¹⁷ alquilaminas,¹⁸ aminoácidos,^{19,20} NADH,²¹⁻²³ ADN²⁴ y compuestos farmacéuticos.^{7,25-28}

En resumen, todas las características mencionadas le confieren a la técnica un gran potencial para ser utilizada como herramienta en el estudio de las propiedades optoelectrónicas (dilucidar mecanismos, evaluar estabilidad de especies, identificar estados activos, etc.) de diferentes sistemas, en el desarrollo de nuevos emisores ECL, ya sean moleculares –orgánicos e inorgánicos–, políméricos o nanomateriales. El potencial analítico de la ECL –sencillez instrumental, alta sensibilidad y selectividad, etc.– le confieren una capacidad significativa para acoplarse con otras técnicas y lograr un extenso abanico de aplicaciones en diferentes áreas, tales como química analítica, bioquímica, bioimágenes, biosensores, inmunoensayos biológicos.^{1,2,4}

INTRODUCCIÓN

1.2. Un poco de historia...

El fenómeno de ECL fue observado por primera vez en la década de 1920,^{29,30} El primer reporte detallado fue publicado por Hercules en 1964.³¹ En este trabajo se utilizaron electrodos de platino en soluciones de acetonitrilo (ACN) o dimetilformamida (DMF) observando emisión de luz con una serie de hidrocarburos, incluyendo el 9,10-difenilantraceno (DPA), antraceno y rubreno.

La Figura 1 muestra una línea del tiempo con los acontecimientos de ECL más relevantes desde su aparición hasta el año 2002.⁴ En los primeros reportes sobre ECL, los detalles experimentales –tanto del estudio electroquímico como espectroscópico– no fueron especificados, únicamente se reportó la detección del fenómeno ECL a través de la observación con los ojos de los investigadores.

Poco tiempo después, comenzaron a aparecer los primeros trabajos basados en el tratamiento teórico de la respuesta de ECL, en términos de los mecanismos de formación del estado excitado y la forma de los transientes electroquimioluminiscentes. La fotoluminiscencia de $Ru(bpy)_3^{+2}$ fue reportada en 1952³² y su comportamiento espectroscópico fue estudiado con más detalles hacia los años 60.³³ La ECL de este complejo organometálico en solución de ACN fue observada recién en 1972.³⁴

INTRODUCCIÓN



Figura 1. Línea de tiempo donde se muestra el desarrollo de la ECL. [Adaptado de referencia: W. Miao, Electrogenerated chemiluminescence and its biorelated applications. Chem Rev 108(7):2506–2553]

Desde entonces, el fenómeno ha sido extensamente estudiado para elucidar su mecanismo y origen, encontrar nuevos compuestos emisores y consecuentes aplicaciones, desarrollar equipamiento más sencillo y accesible y lograr límites de detección más bajos para el análisis cuantitativo de diferentes analitos. En este sentido ha surgido una extensa lista de publicaciones científicas, desde artículos científicos hasta libros completos, que han permitido reunir los aspectos más relevantes de la ECL.^{1,2,4,10,12-15,35-40} También, han sido registradas numerosas patentes sobre la temática desde julio de 1964 hasta nuestros días.^{41,42} Al año siguiente del estudio de Hercules, Bard y sus colaboradores completaron la observación del proceso de ECL en hidrocarburos aromáticos.⁴³ Los resultados sugirieron que ya sea el catión radical u otras especies oxidantes, formadas durante experimentos de voltamperometría cíclica, podrían dar como resultado la emisión de luz.

Posteriormente, a comienzos de la década de 1970, el desarrollo de la ECL estuvo relacionado con las contribuciones científicas realizadas por el Prof. Fritz Pragst. Su aporte benefició significativamente la comprensión de los mecanismos en la química orgánica, las reacciones que involucran transferencias de energía y transferencias de carga, y la exploración de los estados tripletes, logrando de esta manera una interrelación entre la
química orgánica, la electroquímica y la fotoquímica.⁴⁴ Más recientemente, Allen Bard y colaboradores publicaron el primer libro en el área¹ donde se compilan los avances en ECL. En el año 2013 se divulgó el libro titulado "Electrogenerated Chemiluminescence, Protocols and Applications" a cargo de Saima Parveen y colaboradores.²

Con el transcurso del tiempo la ECL se convirtió en un área que atrajo la atención de muchos investigadores para realizar trabajos vinculados a diferentes aspectos: teoría básica, compuestos emisores de ECL, elucidación de mecanismos, aplicaciones, etc. Consecuentemente, los avances en el ámbito de la ECL se incrementaron de manera exponencial durante más de 45 años. Como ya se mencionó en párrafos anteriores, la ECL se ha convertido en una herramienta analítica muy potente y ha sido utilizada en muchas áreas, como: ciencia forense, medio ambiente, biomedicina, inmunoensayos, etc. ^{1,2,4,10} Esta técnica también ha sido empleada efectivamente como un detector acoplado a diferentes métodos de análisis: análisis de inyección por flujo (*flow injection analysis*, FIA), cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), electroforesis capilar (*capillary electrophoresis*, CE) y microsistemas de análisis total (*micro total analysis*, µTAS).^{10,45}

En consecuencia, en la última década el número de publicaciones ha crecido notablemente, muchas de las cuales estuvieron enfocadas a bio-aplicaciones.^{2,4,46}

1.3. Sistemas ECL

Desde un punto de vista tecnológico, la búsqueda de nuevos compuestos con mayores eficiencias ECL y la modificación de alguna porción de su estructura química para el posterior etiquetado de biomoléculas son las fuerzas impulsoras que conducen al diseño y síntesis de nuevas especies ECL. Para los fines de esta Tesis el extenso abanico de compuestos emisores ECL será divido en dos grupos: (I) sistemas moleculares, el que a su vez se subdivide en: *i*) moléculas inorgánicas derivadas de complejos organometálicos y *ii*) moléculas orgánicas, representadas principalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y (II) sistemas de nanopartículas, esencialmente de materiales semiconductores y derivados de carbono. A continuación se presentará el estado del arte de cada uno de los grupos mencionados con una breve descripción de las últimas investigaciones encontradas en la literatura.

1.3.1. Sistemas moleculares

1.3.1.1. Sistemas Inorgánicos

Una gran variedad de complejos organometálicos basados en Ag, Al, Au, Cd, Cr, Cu, Eu, Hg, Ir, Mo, W, Os, Pd, Pt, Re, Ru, Si, Tb y Tl han exhibido propiedades de ECL.² No obstante, el primer y más valioso –por su invaluable rol en el área hasta el presente– complejo inorgánico que presentó ECL fue el $Ru(bpy)_3^{+2}$. La fotoluminiscencia de $Ru(bpy)_3^{+2}$ fue reportada en 1952³² y su comportamiento espectroscópico fue estudiado con más detalles hacia los años 60.³³ La ECL de esta especie en solución de ACN fue observada en 1972³⁴ y se propuso la siguiente secuencia de reacciones (**Esquema 3**):

$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{+2} - e^{-} \rightarrow \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{+3}$	(oxidación electroquímica)
$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{+2} + e^- \to \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{+1}$	(reducción electroquímica)
$Ru(bpy)_{3}^{+1} + Ru(bpy)_{3}^{+3} \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{+2^{*}} + Ru(bpy)_{3}^{+2}$	(formación estado excitado)
$Ru(bpy)_{3}^{*2^{*}} \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{*2} + h\nu$	(emisión de luz)

Esquema 3. Mecanismo de ECL para Ru(bpy)₃⁺² en ACN.³⁴

La solubilidad y estabilidad en agua del complejo $Ru(bpy)_3^{+2}$ impulsó el desarrollo de la ECL en medios acuosos.⁴⁷ Sin embargo, existía la dificultad asociada con el hecho de que la ventana de potencial del agua era más pequeña en comparación con la mayoría de los solventes orgánicos, tal como ACN impidiendo la reducción del $Ru(bpy)_3^{+2}$. Entonces, era necesario el hallazgo de especies solubles en agua que pudieran formar mediante procesos

de oxidación un compuesto reductor para la posterior reacción con $Ru(bpy)_3^{+3}$. Este tipo de especies se conoce con el nombre de correactantes y el primer descubrimiento fue el anión oxalato en el año 1977. EL mecanismo de ECL para esta especie se ejemplifica en el **Esquema 4.**

$$C_2O_4^{-2}$$
 - e → CO_2^- + CO_2
Ru(bpy)₃⁺² + CO_2^- → Ru(bpy)₃⁺²[•] + CO_2

Esquema 4. Mecanismo de ECL para Ru(bpy)₃⁺² y oxalato en solución acuosa.⁴⁸

De esta manera, la ECL puede ser generada simplemente por la oxidación de $Ru(bpy)_{3}^{+2}$ y oxalato en solución acuosa.⁴⁸ Años más tarde se encontró un correactante más eficiente para $Ru(bpy)_{3}^{+2}$, la tri-n-propilamina (TPrA)^{18,49}.La ECL basada en $Ru(bpy)_{3}^{+2}$ y sus derivados posee considerables ventajas debido principalmente a la alta sensibilidad en medio acuoso conjuntamente con las excelentes propiedades redox y fotofísicas que ofrecen estos compuestos. Además $Ru(bpy)_{3}^{+2}$ posee compatibilidad con numerosos analitos y ha sido utilizado para la detección de muchos correactantes, tales como oxalato,⁴⁸ alkilaminas,⁵⁰ aminoácidos,⁵¹ acido ascórbico²⁵ y otros compuestos farmacéuticos.^{52,53} A su vez, el $Ru(bpy)_{3}^{+2}$ conjuntamente con la TPrA como correactante, forman el sistema base de los equipamientos comerciales utilizados en inmunoanálisis y análisis de ADN, entre otras biomoléculas. La elección de este sistema se debe a la tremenda sensibilidad que permite alcanzar el $Ru(bpy)_{3}^{+2}$ como marcador ECL para detectar concentraciones del orden de subpicomolar (~10⁻¹²) y a la gran variación de la intensidad de ECL, aproximadamente seis órdenes de magnitud.³⁶

Por todo lo descripto arriba, muchos métodos de síntesis han sido adaptados para diseñar o modificar los grupos ligados en los complejos de Ru con el objetivo de mejorar su habilidad para el reconocimiento molecular. Por ejemplo, complejos de Ru con funcionalidades de éteres corona unidas covalentemente a los ligandos bipiridilos (*bpy*) o fenantrolina (*phen*) han sido usados para la detección de cationes metálicos ya sea por el mecanismo de aniquilación de iones o por el de correactantes.⁵⁴⁻⁶⁰ También se ha observado

la generación de ECL a partir $Ru(bpy)_3^{+2}$ sobre distintos sustratos, tales como geles de $Ru(bpy)_3^{+2}$,⁶¹ en cristales derivados de sol-gel,⁶² películas finas compuestas de sílica y nafion⁶³ mediante el uso de correactantes.

La generación de ECL desde complejos derivados del $Ru(bpy)_3^{+2}$ ha sido extensamente estudiada. Por ejemplo, el complejo $[Ru(bpy)_2dpz]^{+2}(dppz = dipirido[3,2-a:20,30-c]fenacina)$ tiene la habilidad de poder intercalarse con alta afinidad dentro de las moléculas de ADN debido a su extensa estructura aromática.⁶⁴ Esta molécula posee un comportamiento fotoluminiscente un tanto particular: en solución acuosa no muestran fotoluminiscencia, sin embargo cuando se agregan moléculas de ADN la fotoluminiscencia incrementa notablemente. Igualmente, la producción de ECL en presencia de oxalato como correactante es despreciable, aunque cuando se intercalan estructuras de ácidos nucleicos la intensidad de ECL aumenta unas 1000 veces aproximadamente.⁶⁴ Este tipo de moléculas se identifica en la literatura con la denominación de *"light switch"* y resultan prometedoras para los estudios basados en la interacción con ADN y para la construcción de biosensores relacionados.

De manera similar el Ru(bpz)₃⁺²(bpz)2,20-bipiracina), otro complejo de Ru, ha atraído gran atención en la comunidad científica debido a que genera ECL en ACN mediante la formación de los estados +3 y +1 de Ru. Este complejo ha sido utilizado para determinar persulfato (correactante catódico) en solución acuosa con límites de detección (LOD) del orden del nanomolar.³⁹ Otras estrategias, tales como la síntesis y el estudio del comportamiento de complejos de Ru multimetálicos se encuentran reportadas en la literatura.^{65,66} La utilización de complejos supramoleculares de Ru con más de un núcleo metálico, del mismo átomo o de átomos diferentes, ofrecen un enfoque para incrementar y modular la eficiencia de ECL.

Independientemente de los complejos de Ru, los sistemas ECL polipiridínicos de otros metales poseen una oxidación electroquímica irreversible no obstante el proceso de reducción es reversible. En estos sistemas, el mecanismo de ECL no debería incluir la oxidación electroquímica de estas moléculas.⁶⁷ En estos casos, la emisión de ECL puede ser

generada en presencia de TPrA como correactante con pulsos de potencial lo suficientemente positivos para oxidar la TPrA pero inferiores al requerido para oxidar el $\operatorname{Ru}(bpy)_3^{+2.68}$ La utilización de potenciales electroquímicos más bajos provee un camino alternativo para detectar ADN, ya que la secuencia de oligonucleótidos podría ser dañada irreversiblemente a potenciales superiores a 1 V versus ECS.

A pesar de que los complejos de Ir(III) han exhibido emisión de ECL más eficiente que el Ru(bpy)₃⁺², su uso es limitado debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas y a su sensible inactivación por el oxígeno molecular (*quenching*).^{36,56,69-73} Sin embargo, la creciente investigación de este tipo de complejos ha permitido sintetizar nuevos compuestos más solubles en solución acuosa. Por ejemplo un complejo neutro de Ir(III) completamente insoluble fue encapsulado dentro de NPs mixtas de sílica-PEG,^{4,74,75} lo cual permitió no solo mejorar la solubilidad sino también limitar la inactivación de la emisión ECL por moléculas de agua y oxígeno. Estas alternativas ofrecen un nuevo camino para obtener una gran cantidad de materiales ECL solubles en agua.

Los complejos de Os(II) con *bpy* (bipiridilo) y *phen* (fenantrolina), como grupos ligandos, también han mostrado la generación de ECL mediante el mecanismo de aniquilación de iones. También, se ha observado el fenómeno de ECL en este tipo de complejos en presencia de correactantes, tal como persulfato.⁷⁶ La ECL también se ha extendido hacia sistemas basados en otros metales, tales como Al(III)^{77,78} y Cu(II),^{79,80}cuya detección resulta necesaria tanto para la salud humana como para el medio ambiente.

1.3.1.2. Sistemas Orgánicos

El primer reporte detallado de ECL tuvo como protagonista moléculas orgánicas.^{31,43,81} Posteriormente, otras moléculas tal como PAHs, DPA, rubreno fueron extensamente estudiadas debido a sus rendimientos cuánticos de fluorescencia muy altos y a su capacidad para formar cationes y aniones radicales estables en solventes orgánicos. Otros compuestos como el luminol, los ésteres de acridonio, algunos polímeros y siloles

(análogos a los pirroles pero con Si) han sido investigados por su capacidad para generar ECL.² La ECL desde luminol permite detectar sensiblemente peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es producido como producto de algunas reacciones de muchas sustancias biológicas. Consecuentemente el luminol es ampliamente utilizado para la construcción de biosensores.

En particular, ciertos electrodos (ITO) modificados con nanopartículas de Au (NPs-Au) ofrecen una alternativa interesante para el desarrollo de biosensores sensibles en el pH fisiológico debido a la excelente biocompatibilidad de las NPs-Au.^{36,82} El lucigenin, un éster acrodinio, también presenta emisión de ECL en presencia de $H_2O_2^{83,84}$ y ha sido utilizado en la detección de riboflavina,⁸⁵ gonadotropina coriónica humana (hormona glicoproteíca producida por la mujer durante el embarazo)⁸⁶ y el grupo hemo.⁸⁷ Separadamente, la ECL a partir de lucigenin ha sido estudiada con electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas (SAMs) de tioles alifáticos.⁸⁴ Este estudio es uno de los únicos antecedentes de ECL con electrodos modificados con SAMs. En este caso, la modificación de los sustratos de Au y la presencia de moléculas de surfactante (Triton X-100) provocaron un considerable aumento en la señal de ECL.

Algunos PAHs derivados del fluoreno presentan una eficiencia de ECL considerable.⁸⁸ Otros compuestos derivados del DPA, pireno y antraceno fueron sintetizados usando fluoreno como agente protector (*capping agent*). Estas moléculas son candidatos potenciales para la generación de ECL debido a sus altos rendimientos de fluorescencia y a la estabilidad de sus iones radicales. La introducción de unidades de fulereno evita las interacciones inter cromóforos y bloque las posiciones activas del núcleo del PAH, sujeto a descomposición electroquímica.

Particularmente, las moléculas de pireno presentan características electroquimioluminiscentes bastante pobres debido a la inestabilidad electroquímica de sus cationes radicales. Sin embargo, una estrategia para aumentar su capacidad de generar ECL y producir cationes radicales estables es la introducción de grupos donores de electrones en la periferia del pireno. De este modo, derivados del pirenos han mostrado mayores

eficiencias de ECL en función del número de unidades donoras de electrones (por ejemplo N,N-dimetil anilina) ubicadas en la periferia.^{89,90}

La acción laser mediante ECL fue desarrollada en 1998.⁹¹ Un laser ECL tendría algunas ventajas sobre los láseres de colorantes tradicionales. Así, un láser que funciona por este principio no requeriría de una fuente láser adicional para producir el estado excitado requerido en el colorante y puede ofrecer ventajas adicionales en términos de potencia, capacidad de sintonización y la variedad de longitudes de onda disponibles. Años después, se reportó el estudio del comportamiento electroquímico, fotofísico y de ECL de cinco colorantes láseres.⁹² En otro estudio, se utilizó rodamina B —uno de los colorantes láseres más estudiado— como sensibilizador para aumentar la débil señal de ECL proveniente de la tiamina (vitamina B1) en solución alcalina. El proceso involucra una transferencia de energía entre un producto oxidado en estado excitado de la vitamina B1 y la rodamina B.⁹³

También se ha observado emisión de ECL desde moléculas que poseen dos cromóforos en la misma estructura molecular. Por ejemplo, la ECL desde 2,20-bis (10-fenilantraceno-9-yl)-9,90-spirobifluoreno ocurre mediante una transferencia simultánea de dos electrones. En este caso, la molécula está compuesta por dos unidades de fenilantraceno unidas entre sí por una configuración *"spiro"* fluoreno.¹⁶ Debido a la presencia de dos centros redox la generación de ECL sigue la ruta de aniquilación de iones.⁹⁴ Otro ejemplo similar se observa para 3,6-dispirobifluorene-N-phenylcar-bazole, el cual contiene dos grupos *"spiro"* fluoreno unidos covalentemente a un núcleo de N-fenilcarbasol.⁹⁵ Estas arquitecturas químicas del tipo donor-aceptor de electrones ofrecen una alternativa interesante para diseñar nuevos materiales con potencial de ECL.

El fluoreno y sus derivados han sido ampliamente estudiados en el área de la optoelectrónica.⁹⁶⁻⁹⁸ Por otra parte, la introducción de grupos aceptores de electrones permite entre otros efectos reducir su *"band gap"*, logrando de esta manera una emisión de ECL más estable y modificar la posición del máximo de emisión ECL desde la porción azul al verde del espectro visible.¹⁶ Por consiguiente, la habilidad que presentan estos sistemas



para modificar la luminiscencia mediante la elección adecuada de grupos aceptores de electrones, los convierte en posibles candidatos para diseñar marcadores ECL con múltiples longitudes de onda.^{16,88} Por otro lado, el ajuste de los potenciales electroquímicos de compuestos híbridos basados en siloles y tiofeno, mediante la modificación de grupos sustituyentes y la protección estérica de las posiciones más reactivas, ha permitido generar cationes radicales estables para la producción de ECL.⁹⁹ Entonces, la destreza que presentan estos sistemas a la modificación de sus propiedades electroquímicas los convierte en materiales atractivos para la generación eficiente de ECL.³⁶

Por otra parte, la ECL ha sido desarrollada en polímeros orgánicos. Por ejemplo, el dendrímero PAMAM con grupos terminales OH en presencia de (NH₄)₂S₂O₈ como correactante genera una importante señal de ECL en solución acuosa y una fluorescencia intensa en la región azul del espectro electromagnético.^{100,101} Otros compuestos poliméricos derivados del polifenil venileno (PPV) has sido estudiados como sistemas ECL en presencia de TPrA como correactante.¹⁰² También, un polímero conjugado semiconductor posee la capacidad de producir películas finas con capacidad de ECL mediante la oxidación electroquímica de la película en presencia de un correactante anódico.¹⁰³ El mecanismo de ECL propuesto, el comportamiento redox y la transición crítica de hinchado (*swelling*) del polímero tiene una importante inferencia en el diseño y el modo de operación electroquímico de dispositivos optoelectrónicos, tal como diodos emisores de luz (LEDs), transistores de efecto de campo sensibles químicamente, ventanas "*inteligentes*" recubiertas con materiales electrocrómicos y ciertos tipos de celdas solares.^{10,36}

1.3.2. Sistemas de nanopartículas

A diferencia de los sistemas moleculares electroquimioluminiscentes, ya sean orgánicos o inorgánicos, los sistemas basados en nanopartículas (NPs) se han desarrollado durante la última década. El fenómeno de ECL a partir de NPs apareció por primera vez en 2002.¹⁰⁴ La ECL desde NPs semiconductoras de Si fue generada en una solución de ACN mediante ambos mecanismos de ECL, aniquilación y correactantes. Especialmente los

nanocristales de semiconductores o más conocidos como puntos cuánticos (*quantum dots* QDs) han sido extensamente estudiados. La ECL basada en CdSe,^{105,106} CdS,¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ CdTe^{55,110} y ZnS¹¹¹ y en QDs de PbS¹¹² y ZnSe^{112,113} fue observada y aplicada en el campo de los biosensores.

La ECL también ha sido generada en elementos semiconductores, tales como Si y Ge, además de los compuestos semiconductores ya mencionados en el párrafo anterior. El mecanismo de ECL en estas NPs de semiconductores sigue ambas rutas conocidas —aniquilación y correactantes—.^{2,114} Asimismo en los últimos años, NPs de óxido de grafeno,¹¹⁵⁻¹¹⁷ y NPs de carbono han exhibido potencial para producir ECL.^{118,119} Generalmente la generación de ECL en NPs de semiconductores, mediante la ruta de correactantes, utiliza H₂O₂ y peroxidisulfato a potenciales altos.² Sin embargo, estudios recientes revelan la utilización de aminas, tal como DBAE (una amina terciaria), en la producción de ECL a potenciales más bajos.¹²⁰

En la literatura también se encuentran reportes de ECL en nanopartículas del tipo *core-shell*. Myung y colaboradores reportaron la utilización de NPs de CdSe/ZnSe para la generación de ECL.¹²¹ En este caso, las NPs de CdSe fueron recubiertas por una capa protectora de ZnSe, el espectro de ECL resultante presentaba una banda de emisión que estaba corrida aproximadamente 200 nm desde el borde de la banda de fluorescencia. Otros estudios reportan la producción de ECL en películas de NPs, tales como películas de NPs de PbSe¹²² y de CdSe,¹²³ y en películas de NPs del tipo *core/shell*, tales como CdSe/ZnS,¹²⁴ ZnS/CdSe¹²⁵ y CdSe/CdS,¹²⁵ lo cual resulta relevante debido a las posibles aplicaciones en sistemas optoelectrónicos o como componentes en dispositivos nanoelectrónicos.

Por otra parte, debido a las propiedades distintivas que presentan los nanomateriales es muy atrayente observar el fenómeno de ECL desde complejos de Ru en la nano escala. En este sentido, se ha observado la generación de ECL a partir de nanocintas obtenidas desde un derivado de $Ru(bpy)_3^{+2}$ insoluble en agua, $[Ru(bpy)_2(4,40-(CH_3(CH_2)_{14}COO)^{-2}bpy)](ClO_4)_2$, con TPrA como correactante.¹²⁶

A diferencia de las investigaciones realizadas con NPs derivadas de metales y elementos semiconductores, los estudios de ECL en NPs de carbono, que son de particular interés en esta Tesis, datan del año 2008 en adelante y se trata de un campo menos explorado pero que sin embargo presenta potenciales aplicaciones. Bard y sus colaboradores reportaron uno de los primeros estudios de ECL basado en NPs de carbono.¹²⁷ El fenómeno de ECL fue observado a partir de una suspensión de NPs de óxido de grafeno en presencia de altas concentraciones de TPrA, usado como correactante. Además, en dicho reporte también se menciona la generación de ECL mediante la oxidación electroquímica de grafito pirolítico altamente orientado. Estos estudios proveen una interesante alternativa para estudiar no sólo la electroquímica de NPs de carbono y otras NPs metálicas, tales como de Au y Pt, sino también la base de futuras aplicaciones electroanalíticas altamente sensibles.

También el fenómeno de ECL ha sido observado en otras nanoestructuras de carbono, tal como puntos cuánticos de carbono (CDs).^{118,128-132} Estas investigaciones revelan que la generación de ECL puede ocurrir mediante ambos mecanismos, aniquilación y correactantes. A excepción de un estudio muy reciente,¹²⁹ el resto utiliza S₂O₈⁻² para la producción de ECL en CDs.^{128,130}

1.4. Aplicaciones Prácticas

1.4.1. Aplicaciones Analíticas

La aparición de la ECL en solución acuosa y especialmente el descubrimiento de especies correactantes permitieron pensar a la ECL como un método adecuado para el análisis. Diferentes compuestos fueron descubiertos para su utilización como correactantes tales como oxalato, piruvato, TPrA, etc., los cuales podían reaccionar con $Ru(bpy)_3^{+2}$ para producir la emisión de ECL en numerosas aplicaciones analíticas. Un tipo diferente de aplicación analítica implica el uso de $Ru(bpy)_3^{+2}$ u otro emisor activo de ECL como una etiqueta o marcador, por lo general en una molécula de interés biológico o un anticuerpo,

reemplazando de esta forma los marcadores radiactivos o fluorescentes utilizados anteriormente.^{10,46}

La sensibilidad de $Ru(bpy)_3^{+2}$ en las determinaciones de ECL es alta, hasta niveles del orden de 10^{-12} M, y la linealidad de la respuesta con la concentración es buena en amplio intervalo de concentraciones.^{1-3,133} Como se mencionó previamente, la ECL posee ciertas ventajas respecto de los marcadores fluorescentes, ya que no requiere una fuente de luz de excitación y por consiguiente, los problemas relacionados a la dispersión de luz y a la presencia de impurezas fluorescentes en la muestra están ausentes.

Por lo tanto, la ECL se ha utilizado comercialmente para inmuno análisis y análisis de ADN.^{10,46,134-137} Actualmente, los métodos analíticos basados en la ECL permiten detectar biomoléculas en una intervalo amplio de pesos molecularesmediante la construcción de bio e inmunosensores.^{7,8,21,28,128,132,138} Mediante la ECL es posible monitorear en qué concentración o simplemente la presencia de proteínas específicas o ciertas secuencias de ADN.^{10,36} Otra aplicación de la ECL ha sido el seguimiento de la actividad enzimática dentro de células vivas.^{4,11,46}

Por último, pero no por ello menos importante los equipamientos instrumentales para desarrollar experimentos de ECL son relativamente simples y de bajo costo si se lo compara con otras técnicas que pueden alcanzar rendimientos similares. Además la sencillez y la alta especificidad que distinguen cada experimento de ECL son las características claves que trasladan el desarrollo de la técnica a otras áreas, tales como diagnóstico clínico, análisis de comestibles y herbicidas y la investigación de nuevos materiales.

1.4.2. ECL en estado solido: películas finas, dispositivos electrónicos y OLEDs

Desde los orígenes de la ECL había interés en el uso de este fenómeno para la iluminación, pantallas y LED. Las investigaciones originariasno permitieron desarrollar dispositivos comerciales, tal vez porque el funcionamiento operativo y el encapsulación del

material emisor no era el adecuado. Sin embargo, con el correr del tiempo comenzaron a aparecer nuevas investigaciones que revelaban la generación de ECL en películas finas de Ru(bpy)₃⁺²,¹ películas de polímeros como el poli (vinil-9,10-difenilantraceno).^{134,139} En los últimos años, han crecido las investigaciones relacionadas a la producción de ECL en estado sólido y materiales poliméricos.^{40,46,140-142} Por otro parte, la ECL es una herramienta invaluable a la hora de evaluar las propiedades optoelectrónicas de nuevos materiales en solución, como paso previo a su caracterización en estado sólido, o en dispositivos que requieren complejas tecnologías de armado.

1.5. Sistemas de estudio y desarrollo de una aplicación analítica

El avance de esta Tesis comenzó en primera instancia con el diseño y montaje del equipamiento experimental de generación y detección de ECL, en el laboratorio de optoelectrónica de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), tal como se describe en el Capítulo 3. En segundo lugar, se presenta un estudio básico de dos sistemas electroquimioluminiscentes, un sistema de moléculas orgánicas y un sistema de nanopartículas de carbono, donde se correlaciona el comportamiento electroquímico, fotofísico y de ECL con la estructura molecular y morfológica de ambos sistemas respectivamente. Finalmente, se muestra una aplicación analítica de la técnica, de gran impacto ambiental y sociocultural para nuestra región.

Los dos grandes sistemas electroquimioluminiscentes estudiados corresponden por un lado a una serie colorantes orgánicos basada en el núcleo difluoro-boroindaceno o borodipirrometeno (BODIPY). Y por otro lado, el otro sistema corresponde a un tipo de nanomateriales basados en carbono más específicamente, nanopartículas de carbono (CNPs). A continuación se detalla brevemente cada unos de los sistemas electroquimioluminiscentes agrupándolos de acuerdo a la naturaleza del material. Y seguidamente se presenta el desarrollo de la ECL como técnica de detección para glifosato, un herbicida organofosforado de amplio uso a nivel mundial y nacional.

1.5.1. Sistema de estudio: colorantes BODIPYs

Idealmente, los sistemas moleculares que presentan ECL deben ser capaces de generar cationes y aniones radicales estables con suficiente energía para producir estados excitados que emitan luz con alto rendimiento. Por lo tanto, en esta Tesis se propone desarrollar y estudiar las características electroquímicas, fotofísicas y electroquimioluminiscentes de nuevos materiales con propiedades electroluminiscentes.

En el Capítulo 6 se presenta una nueva familia de colorantes basada en el núcleo difluoro-boroindaceno o boro-dipirrometeno (BODIPY, **Figura 2a**) que consiste en dos anillos pirrolidínicos unidos entre sí por un grupo metino y un grupo BF₂. Estos colorantes y sus derivados fueron desarrollados a finales de 1980 por su aplicación en láseres y son estudiados hasta el presente.¹⁴³⁻¹⁴⁹ Los colorantes BODIPY representan una clase importante de moléculas que se caracterizan por poseer fuertes bandas de absorción y emisión en la región visible del espectro electromagnético, una alta fotoestabilidad y un pequeño corrimiento de Stokes.^{144,150,151} Desde el punto de vista de la ECL, el interés por esta familia de colorantes radica en el hecho de que sus propiedades espectroscópicas y electroquímicas dependen de la ubicación y naturaleza de los grupos sustituyentes ubicados en la periferia del núcleo BODIPY, lo que permite a través del diseño molecular modular sus propiedades optoelectrotrónicas.^{92,94,149,152-165}

Con respecto al fenómeno de ECL, por un lado estos colorantes poseen altos rendimientos quánticos de emisión y por el otro, forman cationes y aniones radicales estables cuando las posiciones sobre el anillo más reactivas se encuentran bloqueadas.^{92,164,165} Las excelentes propiedades fluorescentes de estas moléculas han hecho que estos fluoróforos se utilicen en muchas aplicaciones, especialmente en el marcado de proteínas y DNA en investigaciones bioquímicas.^{149,152,165} En años recientes se han sintetizado derivados de estos colorantes láseres cuya fluorescencia es sensible a la presencia de aniones o protones.^{147,148,166} Estas aplicaciones analíticas, conjuntamente con la capacidad de formar radicales estables, convierten a estos colorantes láseres en buenos candidatos para la producción de ECL.

20

Un estudio precedente revela que los colorantes que tienen todas las posiciones del núcleo BODIPY (**Figura 2b**) bloqueadas por grupos alquílicos, presentan un comportamiento electroquímico reversible tanto para el proceso de oxidación como para el de reducción y una señal de ECL moderadamente intensa.⁹² Sin embargo, se conoce que los grupos sustituyentes en las posiciones 2 y 6 afectan considerablemente la estabilidad de los cationes radicales mientras que la sustitución de la posición 8 provoca importantes cambios en la estabilidad del anión radical electrogenerado.¹⁶⁵



Figura 2. a) Estructura molecular del núcleo BODIPIY. b) Estructura molecular del PM 567.

En este sentido y con el objetivo de encontrar nuevos colorantes para la producción de ECL, se diseñó una serie de moléculas derivadas del colorante comercial PM 567. La estructura molecular de cada colorante fue modificada sistemáticamente con diferentes grupos sustituyentes ubicados en la posición 8 del núcleo BODIPY. En general, se cambió la capacidad donor-aceptor de electrones del grupo sustituyente y se varió el largo y el grado de conjugación del espaciador –cadena alquílica o grupo p-fenilo– que lo separa del anillo central. En consecuencia, se espera que las moléculas a estudiar sean potenciales candidatos para la generación de ECL ya que por un lado, deberían poseer una intensa fluorescencia, debido a que son derivados del núcleo BODIPY y por otro lado, generar iones radicales estables por tratarse de un conjunto de colorantes BODIPY completamente sustituidos.

No obstante, los grupos funcionales que sustituyen al núcleo BODIPY pueden afectar sus características electroquímicas específicamente, la estabilidad de las especies

cargadas como consecuencia de posibles reacciones inherentes al propio grupo sustituyente. Adicionalmente, se presupone que el carácter donor-aceptor de electrones del grupo ubicado en la posición 8 afecta sensiblemente la energía de formación del anión radical. Por consiguiente, se espera que el comportamiento electroquimioluminiscente del colorante sea modificado. Los resultados obtenidos son correlacionados con la estructura molecular de los colorantes con la idea de generar conocimiento que permita proyectar estructuras optimizadas.

1.5.2. Sistema de estudio: Nanopartículas de Carbono

Los nanomateriales han despertando un gran interés en el campo de los biosensores debido a sus únicas propiedades fisicoquímicas.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ La mayoría de estos nanomateriales utilizados en aplicaciones ECL son derivados de costosos metales preciosos y/o elementos tóxicos. Sin embargo, en los últimos años se han sintetizado nanopartículas fluorescentes de carbono (CNPs) de baja toxicidad que prometen múltiples aplicaciones en el área biológica y optoelectrónica.¹⁷¹⁻¹⁷⁹ En este marco, se investigó el potencial electroquimioluminiscente de CNPs.

En el Capítulo 7 se presenta un estudio integral de nanopartículas de carbono (CNPs). En primer lugar se sintetizaron CNPs a partir de precursores moleculares empleando un método de tratamiento térmicosencillo ^{180,181} y poniendo especial énfasis en el método de purificación. Para ello se usó el método de separación basado en cromatografía en columna con sílica gel, mediante el cual se pretende separar y obtener CNPs que posean la menor cantidad posible de grupos funcionales en su superficie. De esta forma, se intenta evitar posibles contribuciones al comportamiento fisicoquímico de las CNPs, desde la presencia de grupos superficiales oxigenados que puedan presentar algún comportamiento fotofísico y/o electroquímico en particular. De esta manera, se obtiene un sistema más sencillo que permite correlacionar los resultados obtenidos con las características estructurales de las CNPs.

22

En segundo lugar, se procedió a caracterizar morfológicamente, estructuralmente, químicamente y fisicoquímicamente el sistema de nanopartículas. Se utilizó la microscopía electrónica de electrones (TEM) para la comprobación de la existencia de nanopartículas y seguidamente se usó la espectroscopia IR, EELS y ¹³C-NMR para obtener información acerca de la estructura química —presencia o ausencia de ciertas funcionalidades— de las mismas. Luego, se examinó el comportamiento fotofísico, electroquímico y electroquimioluminiscente a fin de poder relacionar su estructura molecular con sus propiedades optoelectrónicas.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la mayoría de los sistemas nanométricos utilizados en aplicaciones electroquimioluminiscentes son derivados de metales preciosos costosos y/o elementos tóxicos,^{2,4,182} los nanomateriales carbonosos se muestran como una alternativa viable por numerosas razones. Entre ellas se puede mencionar que son fáciles de sintetizar, económicos, amigables con el ambiente, poseen características fisicoquímicas únicas, buena compatibilidad y baja toxicidad en organismos vivos.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Estas características han despertado gran interés en las siguientes áreas: biomedicina especialmente en el uso para imágenes celulares (bioimágenes),^{171,172-175,183-185} bioanálitica,¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ conversión de energía,¹⁷⁶ fotocatálisis^{177,178,189} y optoelectrónica.^{179,190} Este interés en aplicaciones concretas ha llevado a que en los últimos años haya crecido notablemente el interés de explorar nuevos métodos de síntesis y estudiar sus propiedades.

1.5.3. Desarrollo de una aplicación ECL: Detección de Glifosato

Debido a su naturaleza, la ECL es una potente técnica para el desarrollo de biosensores e inmunoensayos debido a que combina las ventajas de la selectividad electroquímica y la sensibilidad de la técnica ECL.^{2,10,46} Además, la ECL ofrece varias ventajas en relación al equipamiento sencillo y de bajo costo en comparación con otras técnicas que ofrecen límites de detección similares.

23

En Argentina, el herbicida GLY se utiliza extensivamente en la agricultura conjuntamente con otros agroquímicos. A modo de ejemplo, se utilizan más de ochenta millones de kilogramos por año de GLY.¹⁹¹ Por lo tanto, el seguimiento a niveles residuales de varios productos agrícolas en el suelo, en la atmósfera, en aguas superficiales y subterráneas ha atraído una considerable atención debido al posible peligro para la salud humana y el ambiente. Por otra parte, debido a las características fisicoquímicas del GLY, el desarrollo de métodos de detección representa un desafío analítico. Actualmente, para obtener límites de detección del orden de los sugeridos para agua potable, la mayoría de los métodos desarrollados requieren procedimientos de derivatización química.¹⁹²⁻¹⁹⁶

En este contexto, el Poder Ejecutivo Nacional en el año 2009 crea una Comisión Nacional de Investigación de productos agroquímicos para determinar su impacto en la salud y en el medio ambiente y estimular estudios científicos.¹⁹¹ En este marco, en el Capítulo 7 se presenta una aplicación de la ECL a fin de desarrollar un método analítico de glifosato que no requiera de la modificación química previa.Para ellos, se desarrollo una técnica de detección y cuantificación de glifosato, en presencia de Ru(bpy)₃²⁺ como especie emisora de luz y glifosato como correactante. Dado el potencial analítico de la ECL conjuntamente con la elevada sensibilidad del Ru(bpy)₃²⁺ en solución acuosa, la detección de GLY mediante la ECL resulta una alternativa muy interesante debido a que actualmente existen serias limitaciones en los métodos estandarizados que se utilizan.

En el desarrollo inicial de la técnica se utilizó como electrodos de trabajo sustratos metálicos, tales como Pt y Au, para evaluar la factibilidad del sistema electroquimioluminiscente propuesto: Ru(bpy)₃²⁺/GLY. Luego, con el objetivo de optimizar el método de detección se estudió la generación y cuantificación de la ECL mediante el uso de electrodos de Au modificados con monocapas autoensambladas de alcanotioles. También en esta segunda etapa fue necesario perfeccionar el diseño del equipamiento instrumental del laboratorio.

Referencias

(1) Bard, A. J. In *Electrogenerated Chemiluminescence*; Marcel Dekker: New York, 2004.

(2) Parveen, S. In *Protocols and Applications*; Springer, 2013.

(3) Yuan, Y.; Han, S.; Hu, L.; Parveen, S.; Xu, G. *Electrochimica Acta* 2012, 82, 484.

(4) Miao, W. Chemical Reviews 2008, 108, 2506.

(5) Li, H.; Xie, C.; Fu, X. Sensors and Actuators B: Chemical 2013, 181, 858.

(6) Lv, X.; Li, Y.; Cao, W.; Yan, T.; Li, Y.; Du, B.; Wei, Q. Sensors and Actuators B: Chemical 2014.

(7) Yuan, D.; Chen, S.; Yuan, R.; Zhang, J.; Liu, X. Sensors and Actuators B: Chemical 2014, 191, 415.

(8) Zhang, M.; Yuan, R.; Chai, Y.; Chen, S.; Zhong, H.; Wang, C.; Cheng, Y. Biosensors and Bioelectronics 2012, 32, 288.

(9) Wilson, R.; Clavering, C.; Hutchinson, A. Analytical Chemistry 2003, 75, 4244.

(10) Kulmala, S.; Kankare, J. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2013.

(11) Chen, X.-m.; Su, B.-y.; Song, X.-h.; Chen, Q.-a.; Chen, X.; Wang, X.-r. Trends in Analytical Chemistry 2011, 30, 665.

(12) Fähnrich, K. A.; Pravda, M.; Guilbault, G. G. Talanta 2001, 54, 531.

(13) Knight, A. W. TrAC Trends in Analytical Chemistry 1999, 18, 47.

(14) Lee, W.-Y. Mikrochim Acta 1997, 127, 19.

(15) Gerardi, R. D.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W. Analytica Chimica Acta 1999, 378, 1.

(16) Fungo, F.; Wong, K.-T.; Ku, S.-Y.; Hung, Y.-Y.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry B 2005, 109, 3984.

(17) Rubinstein, I.; Martin, C. R.; Bard, A. J. Analytical Chemistry 1983, 55, 1580.

(18) Noffsinger, J. B.; Danielson, N. D. Analytical Chemistry 1987, 59, 865.

(19) Brune, S. N.; Bobbitt, D. R. Talanta 1991, 38, 419.

(20) Brune, S. N.; Bobbitt, D. R. Analytical Chemistry 1992, 64, 166.

(21) Martin, A. F.; Nieman, T. A. Analytica Chimica Acta 1993, 281, 475.

(22) Lee, W.-Y.; Nieman, T. A. Analytical Chemistry 1995, 67, 1789.

(23) Downey, T. M.; Nieman, T. A. Analytical Chemistry 1992, 64, 261.

(24) Dennany, L.; Forster, R. J.; Rusling, J. F. Journal of the American Chemical Society 2003, 125, 5213.

(25) Zorzi, M.; Pastore, P.; Magno, F. Analytical Chemistry 2000, 72, 4934.

(26) Greenway, G. M.; Nelstrop, L. J.; Port, S. N. Analytica Chimica Acta 2000, 405, 43.

(27) Park, Y.-J.; Lee, D. W.; Lee, W.-Y. Analytica Chimica Acta 2002, 471, 51.

(28) Li, F.; Cui, H.; Lin, X.-Q. Analytica Chimica Acta 2002, 471, 187.

(29) Dufford, R. T.; Nightingale, D.; Gaddum, L. W. Journal of the American Chemical Society 1927, 49, 1858.

(30) Harvey, N. The Journal of Physical Chemistry 1928, 33, 1456.

(31) Hercules, D. M. Science 1964, 145, 808.

(32) Paris, J. P.; Brandt, W. W. Journal of the American Chemical Society 1959, 81, 5001.

(33) Crosby, G. A. Accounts of Chemical Research 1975, 8, 231.

(34) Tokel, N. E.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1972, 94, 2862.

(35) Bard, A. J. In Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation; Wiley 2000; Vol. 11, p 9842.

(36) Hu, L.; Xu, G. Chemical Society Reviews 2010, 39, 3275.

(37) Bard, A.; Rubinstein, I. Electroanal. Chem. 2003, 22.

(38) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; John Wiley & Sons, Inc.: United States of America, 2001.

(39) Knight, A. W.; Greenway, G. M. Analyst 1994, 119, 879.

(40) Mitschke, U.; Bauerle, P. Journal of Materials Chemistry 2000, 10, 1471.

(41) Maricle, D. L.; Rauhut, M. M. US Patent 3,654,525, April 4, 1972.

(42) Chandross, E. A.; Visco, R. E. US Patent 3,319,132, May 9, 1967.

(43) Santhanam, K. S. V.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society **1965**, 87, 139.

(44) Agbaria, R. A.; Oldham, P. B.; McCarroll, M.; McGown, L. B.; Warner, I. M. Analytical Chemistry 2002, 74, 3952.

(45) Yin, X.-B.; Dong, S.; Wang, E. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2004, 23, 432.

(46) Muzyka, K. Biosensors and Bioelectronics 2014, 54, 393.

(47) Hercules, D. M.; Lytle, F. E. Journal of the American Chemical Society 1966, 88, 4745.

(48) Chang, M.-M.; Saji, T.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1977, 99, 5399.

(49) Leland, J. K.; Powell, M. J. Journal of The Electrochemical Society 1990, 137, 3127.

(50) Zu, Y.; Bard, A. J. Analytical Chemistr 2000, 72, 3223.

(51) Skotty, D. R.; Lee, W.-Y.; Nieman, T. A. Analytical Chemistry 1996, 68, 1530.

(52) Xu, G.; Dong, S. Analytical Chemistry 2000, 72, 5308.

(53) Shi; Liu; Li; Xu Analytical Chemistry 2006, 78, 7330.

(54) Schimmel, C.; Frazer, D.; Glenny, R. W. Am. J. Physiol. 2001, 280, H2496.

- (55) Bae, Y.; Myung, N.; Bard, A. J. Nano Letters 2004, 4, 1153.
- (56) Bruce, D.; Richter, M. M. Analytical Chemistry 2002, 74, 1340.
- (57) Bruce, D.; Richter, M. M.; Brewer, K. J. Analytical Chemistry 2002, 74,

3157.

(58) Lai, R. Y.; Chiba, M.; Kitamura, N.; Bard, A. J. Analytical Chemistry 2001, 74, 551.

- (59) Chen, Y.; Lin, Z.; Sun, J.; Chen, G. *Electrophoresis* 2007, 28, 3250.
- (60) Muegge, B. D.; Richter, M. M. Analytical Chemistry 2001, 74, 547.

(61) Collinson, M. M.; Taussig, J.; Martin, S. A. Chemistry of Materials 1999, 11, 2594.

(62) Collinson, M. M.; Novak, B.; Martin, S. A.; Taussig, J. S. Analytical Chemistry 2000, 72, 2914.

(63) Khramov, A. N.; Collinson, M. M. Analytical Chemistry 2000, 72, 2943.

(64) Hu, L.; Bian, Z.; Li, H.; Han, S.; Yuan, Y.; Gao, L.; Xu, G. Analytical Chemistry 2009, 81, 9807.

(65) Wang, S.; Milam, J.; Ohlin, A. C.; Rambaran, V. H.; Clark, E.; Ward, W.; Seymour, L.; Casey, W. H.; Holder, A. A.; Miao, W. Analytical Chemistry **2009**, *81*, 4068.

(66) Richter, M. M.; Bard, A. J.; Kim, W.; Schmehl, R. H. Analytical Chemistry 1998, 70, 310.

(67) Lo, K. K.-W.; Chung, C.-K.; Lee, T. K.-M.; Lui, L.-H.; Tsang, K. H.-K.; Zhu, N. *Inorganic Chemistry* **2003**, *42*, 6886.

(68) Miao, W.; Choi, J.-P.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2002, 124, 14478.

(69) Cole, C.; Muegge, B. D.; Richter, M. M. Analytical Chemistry 2003, 75, 601.

(70) Muegge, B. D.; Richter, M. M. Analytical Chemistry 2003, 76, 73.

(71) Kazuki, N.; Yuji, H.; Tsuyoshi, T.; Kenichi, S.; Takashi, F. Japanese Journal of Applied Physics 2001, 40, L945.

(72) Gross, E. M.; Armstrong, N. R.; Wightman, R. M. Journal of The Electrochemical Society 2002, 149, E137.

(73) Kapturkiewicz, A.; Angulo, G. Dalton Transactions 2003, 3907.

(74) Richter, M. M. Chemical Reviews 2004, 104, 3003.

(75) Kiran, R. V.; Zammit, E. M.; Hogan, C. F.; James, B. D.; Barnett, N. W.; Francis, P. S. Analyst 2009, 134, 1297.

(76) Bolletta, F.; Rossi, A.; Balzani, V. Inorganica Chimica Acta 1981, 53, L23.

(77) Martin, C. R. Science 1994, 266, 1961.

(78) Muegge, B. D.; Brooks, S.; Richter, M. M. Anal. Chem. 2003, 75, 1102.

(79) McCall, J.; Bruce, D.; Workman, S.; Cole, C.; Richter, M. M. Analytical Chemistry 2001, 73, 4617.

(80) High, B.; Bruce, D.; Richter, M. M. Analytica Chimica Acta 2001, 449, 17.

(81) Visco, R. E.; Chandross, E. A. Journal of the American Chemical Society 1964, 86, 5350.

(82) Dong, Y.-P.; Cui, H.; Wang, C.-M. The Journal of Physical Chemistry B 2006, 110, 18408.

(83) Legg, K. D.; Hercules, D. M. J. Am. Chem. Soc. 1969, 91, 1902.

(84) Haapakka, K. E.; Kankare, J. J. Analytica Chimica Acta 1981, 130, 415.

(85) Zhang, C.; Qi, H. Analytical Sciences 2002, 18, 819.

(86) Lin, J. M.; Yamada, M. Microchem. J. 1998, 58, 105.

(87) Nan Chen, G.; Zhang, L.; Er Lin, R.; Cong Yang, Z.; Ping Duan, J.; Qing Chen, H.; Brynn Hibbert, D. *Talanta* 2000, 50, 1275.

(88) Omer, K. M.; Ku, S.-Y.; Wong, K.-T.; Bard, A. J. Angewandte Chemie International Edition 2009, 48, 9300.

27

(89) Oh, J.-W.; Lee, Y. O.; Kim, T. H.; Ko, K. C.; Lee, J. Y.; Kim, H.; Kim, J. S. Angewandte Chemie International Edition 2009, 48, 2522.

(90) Lai, R. Y.; Fleming, J. J.; Merner, B. L.; Vermeij, R. J.; Bodwell, G. J.; Bard, A. J. *The Journal of Physical Chemistry A* 2003, 108, 376.

(91) Horiuchi, T.; Niwa, O.; Hatakenaka, N. Nature 1998, 394, 659.

(92) Lai, R. Y.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry B 2003, 107, 5036.

(93) Zhang, C.; Zhou, G.; Zhang, Z.; Aizawa, M. Analytica Chimica Acta 1999, 394, 165.

(94) Sartin, M. M.; Camerel, F.; Ziessel, R.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry C 2008, 112, 10833.

(95) Rashidnadimi, S.; Hung, T. H.; Wong, K.-T.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2007, 130, 634.

(96) Wallace, L. U.; Chen, S. H.; Scherf, U., Neher, D. In Polyfluorenes; Springer Berlin Heidelberg, **2008**; Vol. 212, p 145.

(97) Bernius, M. T.; Inbasekaran, M.; O'Brien, J.; Wu, W. Advanced Materials 2000, 12, 1737.

(98) Tang, S.; Liu, M. R.; Lu, P.; Xia, H.; Li, M.; Xie, Z. Q.; Shen, F. Z.; Gu, C.; Wang, H. P.; Yang, B.; Ma, Y. G. Advanced Functional Materials 2007, 17, 2869.

(99) Lee, K. S.; Zu, Y.; Herrmann, A.; Geerts, Y.; Mullen, K.; Bard, A. J. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 3513.

(100) Ma, F.; Zhang, Y.; Qi, H.; Gao, Q.; Zhang, C.; Miao, W. Biosensors and Bioelectronics 2012, 32, 37.

(101) Lee, W. I.; Bae, Y.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2004, 126, 8358.

(102) Rosado, D. J.; Miao, W.; Sun, Q.; Deng, Y. The Journal of Physical Chemistry B 2006, 110, 15719.

(103) Chang, Y.-L.; Palacios, R. E.; Chen, J.-T.; Stevenson, K. J.; Guo, S.; Lackowski, W. M.; Barbara, P. F. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131, 14166.

(104) Ding, Z.; Quinn, B. M.; Haram, S. K.; Pell, L. E.; Korgel, B. A.; Bard, A. J. Science 2002, 296, 1293.

(105) Liu, S.; Zhang, X.; Yu, Y.; Zou, G. Biosensors and Bioelectronics 2014, 55, 203.

(106) Myung, N.; Ding, Z.; Bard, A. J. Nano Letters 2002, 2, 1315.

(107) Shi, C.; Shan, Y.; Xu, J.; Chen, H. Electrochimica Acta 2010, 55, 8268.

(108) Jie, G.; Liu, B.; Pan, H.; Zhu, J.-J.; Chen, H.-Y. Analytical Chemistry 2007, 79, 5574.

(109) Pan, Z.-Q.; Shi, C.-G.; Fan, H.; Bao, N.; Yu, C.-M.; Liu, Y.; Lu, R.; Zhang, Q.-H.; Gu, H.-Y. Sensors and Actuators B: Chemical 2012, 174, 421.

(110) Liu, X.; Jiang, H.; Lei, J.; Ju, H. Analytical Chemistry 2007, 79, 8055.

(111) Shen, L.; Cui, X.; Qi, H.; Zhang, C. The Journal of Physical Chemistry C 2007, 111, 8172.

(112) Sun, L.; Bao, L.; Hyun, B.-R.; Bartnik, A. C.; Zhong, Y.-W.; Reed, J. C.; Pang, D.-W.; Abruña, H. D.; Malliaras, G. G.; Wise, F. W. *Nano Letters* **2008**, *9*, 789.

(113) Hu, X.; Han, H.; Hua, L.; Sheng, Z. Biosensors and Bioelectronics 2010, 25, 1843.

(114) Myung, N.; Lu, X.; Johnston, K. P.; Bard, A. J. Nano Letters 2003, 4, 183.

(115) Fan, F.-R. F.; Park, S.; Zhu, Y.; Ruoff, R. S.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2008, 131, 937.

(116) Wang, Y.; Lu, J.; Tang, L.; Chang, H.; Li, J. Analytical Chemistry 2009, 81, 9710.

(117) He, Y.; Huang, G.; Jiang, J.; Zhang, Q.; Cui, H. Carbon 2013, 56, 201.

(118) Zheng, L.; Chi, Y.; Dong, Y.; Lin, J.; Wang, B. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 4564.

(119) Zhu, H.; Wang, X.; Li, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Yang, X. Chemical Communications 2009, 5118.

(120) Zhang, L.; Zou, X.; Ying, E.; Dong, S. The Journal of Physical Chemistry C 2008, 112, 4451.

(121) Myung, N.; Bae, Y.; Bard, A. J. Nano Letters 2003, 3, 1053.

(122) Wehrenberg, B. L.; Guyot-Sionnest, P. Journal of the American Chemical Society 2003, 125, 7806.

(123) Guyot-Sionnest, P.; Wang, C. The Journal of Physical Chemistry B 2003, 107, 7355.

(124) Hikmet, R. A. M.; Talapin, D. V.; Weller, H. Journal of Applied Physics 2003, 93, 3509.

(125) Poznyak, S. K.; Talapin, D. V.; Shevchenko, E. V.; Weller, H. Nano Letters 2004, 4, 693.

(126) Yu, J.; Fan, F.-R. F.; Pan, S.; Lynch, V. M.; Omer, K. M.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2008, 130, 7196.

(127) Fan, F.-R. F.; Park, S.; Zhu, Y.; Ruoff, R. S.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 937.

(128) Wu, L.; Li, M.; Zhang, M.; Yan, M.; Ge, S.; Yu, J. Sensors and Actuators B: Chemical 2013, 186, 761.

(129) Dong, Y.; Chen, C.; Lin, J.; Zhou, N.; Chi, Y.; Chen, G. Carbon 2013, 56, 12.

(130) Dong, Y.; Zhou, N.; Lin, X.; Lin, J.; Chi, Y.; Chen, G. Chemistry of Materials 2010, 22, 5895.

(131) Xu, Z.; Yu, J.; Liu, G. Sensors and Actuators B: Chemical 2013, 181, 209.

(132) Li, S.; Luo, J.; Yang, X.; Wan, Y.; Liu, C. Sensors and Actuators B: Chemical 2014, 197, 43.

(133) Ege, D.; Becker, W. G.; Bard, A. J. Analytical Chemistry 1984, 56, 2413.

(134) Abruna, H. D.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1982, 104, 2641.

(135) Bard, A.; Whitesides, G. M. US Patent 5, 221, 605, 1993.

(136) Blackburn, G. F.; Shah, H. P.; Kenten, J. H.; Leland, J.; Kamin, R. A.; Link,

J.; Peterman, J.; Powell, M. J.; Shah, A.; Talley, D. B. *Clinical chemistry* **1991**, *37*, 1534. (137) Wei, H.; Wang, E. *Luminescence* **2011**, *26*, 77.

(157) Wei, H.; Wang, E. Luminescence 2011, 20, 77.

(138) Tong, X.; Sheng, P.; Yan, Z.; Tran.T, T.; Wang, X.; Cai, J.; Cai, Q. Sensors and Actuators B: Chemical 2014, 198, 41.

(139) Fan, F. R. F.; Mau, A.; Bard, A. J. Chemical Physics Letters 1985, 116, 400.

(140) Farinola, G. M.; Ragni, R. Chemical Society Reviews 2011, 40, 3467.

(141) Xu, H.; Chen, R.; Sun, Q.; Lai, W.; Su, Q.; Huang, W.; Liu, X. Chemical Society Reviews 2014, 43, 3259.

(142) Li, M.-J.; Shi, Y.-Q.; Lan, T.-Y.; Yang, H.-H.; Chen, G.-N. Journal of Electroanalytical Chemistry 2013, 702, 25.

(143) Treibs, A. Ann. Chem. 1968, 718.

(144) Loudet, A.; Burgess, K. Chemical Reviews 2007, 107, 4891.

(145) Gomez-Duran, C. F. A.; Garcia-Moreno, I.; Costela, A.; Martin, V.; Sastre, R.; Banuelos, J.; Lopez Arbeloa, F.; Lopez Arbeloa, I.; Pena-Cabrera, E. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 5103.

(146) Leonardi, M. J.; Topka, M. R.; Dinolfo, P. H. Inorganic Chemistry 2012, 51, 13114.

(147) Rosenthal, J.; Lippard, S. J. Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 5536.

(148) Kamiya, M.; Johnsson, K. Analytical Chemistry 2010, 82, 6472.

(149) Bañuelos, J.; Lopez Arbeloa, F.; Arbeloa, T.; Martinez, V.; López Arbeloa, I. In *Chromic Materials, Phenomena and their Technological Applications;* Applied Science Innovations Pvt. Ltd., **2012**.

(150) Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A. New Journal of Chemistry 2007, 31, 496.

(151) Benniston, A. C.; Copley, G. Physical Chemistry Chemical Physics 2009, 11, 4124.

(152) Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Daub, J. Angewandte Chemie International Edition 2001, 40, 385.

(153) Burghart, A.; Kim, H.; Welch, M. B.; Thoresen, L. H.; Reibenspies, J.; Burgess, K.; Bergström, F.; Johansson, L. B. Å. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 7813.

(154) Beer, G.; Niederalt, C.; Grimme, S.; Daub, J. Angewandte Chemie International Edition 2000, 39, 3252.

(155) Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Krüger, R.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry C 2010, 114, 14453.

(156) Nepomnyashchii, A. B.; Cho, S.; Rossky, P. J.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 17550.

(157) Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2011, 133, 8633.

(158) Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2011, 133, 19498.

(159) Rosenthal, J.; Nepomnyashchii, A. B.; Kozhukh, J.; Bard, A. J.; Lippard, S. J. The Journal of Physical Chemistry C 2011, 115, 17993.

(160) Suk, J.; Omer, K. M.; Bura, T.; Ziessel, R.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry C 2011, 115, 15361.

(161) Gresser, R.; Hummert, M.; Hartmann, H.; Leo, K.; Riede, M. Chemistry – A European Journal 2011, 17, 2939.

(162) Kollmannsberger, M.; Gareis, T.; Heinl, S.; Daub, J.; Breu, J. Angewandte Chemie International Edition in English 1997, 36, 1333.

(163) Chen, J.; Burghart, A.; Derecskei-Kovacs, A.; Burgess, K. The Journal of Organic Chemistry 2000, 65, 2900.

(164) Goze, C.; Ulrich, G.; Mallon, L. J.; Allen, B. D.; Harriman, A.; Ziessel, R. Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 10231.

(165) Nepomnyashchii, A. B.; Bard, A. J. Accounts of Chemical Research 2012, 45, 1844.

(166) Kennedy, D. P.; Kormos, C. M.; Burdette, S. C. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 8578.

(167) Baker, S. N.; Baker, G. A. Angewandte Chemie International Edition 2010, 49, 6726.

(168) Zhao, Q.-L.; Zhang, Z.-L.; Huang, B.-H.; Peng, J.; Zhang, M.; Pang, D.-W. Chemical Communications 2008, 5116.

(169) Li, Q.; Ohulchanskyy, T. Y.; Liu, R.; Koynov, K.; Wu, D.; Best, A.; Kumar, R.; Bonoiu, A.; Prasad, P. N. *The Journal of Physical Chemistry C* 2010, *114*, 12062.

(170) Pelley, J. L.; Daar, A. S.; Saner, M. A. Toxicological Sciences 2009, 112, 276.

(171) Fang, Y.; Guo, S.; Li, D.; Zhu, C.; Ren, W.; Dong, S.; Wang, E. ACS Nano **2011**, *6*, 400.

(172) Fan, R.-J.; Sun, Q.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Lu, A.-H. Carbon 2014, 71, 87.

(173) Chang, C.-C.; Hsieh, M.-C.; Lin, J.-C.; Chang, T.-C. Biomaterials 2012, 33, 897.

(174) Hu, L.; Sun, Y.; Li, S.; Wang, X.; Hu, K.; Wang, L.; Liang, X.-j.; Wu, Y. Carbon 2014, 67, 508.

(175) Ong, L. C.; Ang, L. Y.; Alonso, S.; Zhang, Y. Biomaterials 2014, 35, 2987.

(176) Erokhin, A. V.; Lokteva, E. S.; Yermakov, A. Y.; Boukhvalov, D. W.; Maslakov, K. I.; Golubina, E. V.; Uimin, M. A. Carbon 2014, 74, 291.

(177) Yu, B. Y.; Kwak, S.-Y. Journal of Materials Chemistry 2012, 22, 8345.

(178) Zhuo, S.; Shao, M.; Lee, S.-T. ACS Nano 2012, 6, 1059.

(179) Guo, X.; Wang, C.-F.; Yu, Z.-Y.; Chen, L.; Chen, S. Chemical Communications 2012, 48, 2692.

(180) Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P. Small 2008, 4, 455.

(181) Krysmann, M. J.; Kelarakis, A.; Dallas, P.; Giannelis, E. P. Journal of the American Chemical Society 2011, 134, 747.

(182) Forster, R. J.; Bertoncello, P.; Keyes, T. E. Annu Rev Anal Chem 2009, 2, 359.

(183) Liu, C.; Zhang, P.; Tian, F.; Li, W.; Li, F.; Liu, W. Journal of Materials Chemistry 2011, 21, 13163.

(184) Oh, W. K.; Yoon, H.; Jang, J. Biomaterials 2010, 31, 1342.

(185) Zhu, A.; Qu, Q.; Shao, X.; Kong, B.; Tian, Y. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 7185.

(186) Kim, D.; Pikhitsa, P. V.; Yang, H.; Choi, M. Nanotechnology 2011, 22, 485501.

(187) Shi, W.; Wang, Q.; Long, Y.; Cheng, Z.; Chen, S.; Zheng, H.; Huang, Y. Chemical Communications 2011, 47, 6695.

(188) Selvan, S. T.; Tan, T. T. Y.; Yi, D. K.; Jana, N. R. Langmuir 2009, 26, 11631.

(189) Li, H.; He, X.; Kang, Z.; Huang, H.; Liu, Y.; Liu, J.; Lian, S.; Tsang, C. H. A.; Yang, X.; Lee, S.-T. Angewandte Chemie International Edition 2010, 49, 4430.

(190) Wang, F.; Chen, Y.-h.; Liu, C.-y.; Ma, D.-g. Chemical Communications 2011, 47, 3502.

(191) Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos (CNIA) Evaluación de la Información Científica Vinculada al Glifosato en su Incidencia sobre la Salud Humana y el Ambiente, Decreto 21/2009.

(192) Muzyka, E. N.; Rozhitskii, N. N. JAnal Chem 2010, 65, 550.

(193) Su, M.; Wei, W.; Liu, S. Analytica Chimica Acta 2011, 704, 16.

(194) Martínez Vidal, J. L.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Journal of Chromatography A 2009, 1216, 6767.

(195) Botero-Coy, A. M.; Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Journal of Chromatography A 2013, 1313, 157.

(196) Botero-Coy, A. M.; Ibáñez, M.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Journal of Chromatography A 2013, 1292, 132.

CAPÍTULO 2

х

OBJETIVOS

2.1. Objetivos Generales

- * Desarrollar, estudiar y proyectar sistemas orgánicos moleculares y nanoscópicos electroquimioluminiscentes que presenten altos rendimientos quánticos de emisión y características generales que los conviertan de utilidad práctica en el campo de la optoelectrónica y la química analítica.
- * Correlacionar las características estructurales y electrónicas de los nuevos sistemas con sus propiedades electroquimioluminiscentes con el fin de alcanzar un mayor entendimiento de este fenómeno y proyectar nuevas estructuras con propiedades electroquimioluminiscentes mejoradas.
- Desarrollar aplicaciones prácticas de la electroquimioluminiscencia en el campo de la química analítica.

Para cumplimentar tales propósitos se propusieron diferentes objetivos específicos que se detallan a continuación.

2.2. Objetivos Específicos

- Articular y perfeccionar técnicas de estudios, que no estaban desarrolladas en el lugar de trabajo (UNRC), para poder detectar y estudiar fenómenos electroquimioluminiscentes.
- Realizar estudios de electroquimioluminiscencia de sistemas moleculares derivados del núcleo difluoro-boroindaceno o boro-dipirrometeno (BODIPY) a fin de relacionar sus propiedades electroquímicas, fotofísicas y de electroquimioluminiscencia con sus características estructurales.
- Realizar estudios electroquimioluminiscencia de sistemas nanoscópicos derivados de nanopartículas de carbono (CNPs). Desarrollar un método de síntesis y purificación CNPs que permita minimizar o controlar la cantidad de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas.

OBJETIVOS

- Investigar el potencial electroquimioluminiscente de las CNPs a fin de correlacionar sus propiedades, electroquímicas, fotofísicas y de ECL con sus características químicas y estructurales.
- * Desarrollar un método de detección de herbicidas basado en la ECL.
- * Evaluar la posibilidad de utilizar el sistema Ru(bpy)₃²⁺/GLY como sistema ECL, para la detección y cuantificación de GLY.
- * Optimizar el método de detección de acuerdo a las reglamentaciones vigentes en el ámbito nacional e internacional para agua potable.



CAPÍTULO 3

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

3.1. Electroquimioluminiscencia

La *electroquimioluminiscencia* (ECL) es un proceso de emisión de luz producido por una reacción de transferencia de cargas energéticamente favorecida entre iones generados electroquímicamente, la cual promueve la generación de especies emisoras de luz. En el fenómeno de ECL los reactantes pueden ser generados electroquímicamente mediante dos mecanismos posibles, vía aniquilación y vía correactantes, estas especies electrogeneradas se combinan luego para generar luz. Ambos mecanismos tienen diversas ventajas y siguen caminos separados para generar el estado excitado que finalmente emite luz. A continuación, se realizará una descripción detalla de cada uno de los mecanismos.

3.2. Mecanismos de generación de ECL

3.2.1. Aniquilación de iones

El mecanismo de generación de ECL en solución, es bien conocido. Un esquema general involucra una reacción de aniquilación de iones, lo cual requiere la generación de aniones y cationes radicales en la interfase de un electrodo por medio de barridos o saltos de potencial eléctrico. Las dos especies cargadas opuestamente pueden dar lugar a una reacción de transferencia de cargas que conduce a la formación de un estado excitado, singlete o triplete, dependiendo de la energética de la reacción.

$R-e \rightarrow R^{+\bullet}$	(oxidación electroqumíca)	(a)
$R - e \rightarrow R^{-\bullet}$	(reducción electroqumíca)	(b)
$R^{+\bullet} + R^{-\bullet} \to R^* + R$	(formación del estado excitado)	(c)
$R^* \rightarrow R + hv$	(emisión de luz)	(d)

Esquema 5. Mecanismo de ECL: aniquilación de iones.

39

Como se observa en el **Esquema 5**, después de que el emisor (R) es electroquímicamente oxidado (**reacción a**) y reducido (**reacción b**), el catión radical (\mathbb{R}^+) y anión radical (\mathbb{R}^-) son aniquilados entre sí para formar la especie en estado excitado (\mathbb{R}^+) (**reacción c**), la cual será responsable de la correspondiente emisión de luz (**reacción d**). La entalpía, que está directamente relacionada con la energía disponible en la reacción de aniquilación de iones (**reacción c**), se puede calcular de acuerdo a la siguiente expresión

$$-\Delta H_{ann}^{\circ} = -\Delta G_{ann}^{\circ} - T * \Delta S_{ann}^{\circ} = \Delta E_{ann}^{\circ} - T * \Delta S_{ann}^{\circ}$$
(1)

Donde, el ΔG°_{ann} puede ser expresado en función de los potenciales estándar de la especie R y el término $T\Delta S$ se estima en un valor aproximado de 0,1 (±0,1) eV a 25 °C.¹⁻⁷ Comúnmente, se utilizan los potenciales de pico, E_p (en volts, obtenidos desde un voltamperograma cíclico) a 25 °C, como una aproximación para el $\Delta E^{\circ,1}$ En consecuencia, la (1 se expresa de la siguiente forma:

$$-\Delta H_{ann}^{\circ} \approx E_{p}(R/R^{+\bullet}) - E_{p}(R^{-\bullet}/R) - 0,1$$
 (2)

Luego, la energía disponible en la reacción de transferencia de carga $(-\Delta H_{ann})$ gobierna que estados excitados serán producidos. Entonces, si la magnitud de la entalpía es suficiente para producir directamente el primer estado excitado singlete, es decir $-\Delta H_{ann} > E_s$ $(E_s:$ energía del estado excitado singlete), se dice que la ECL es generada por medio de una "*ruta-S*" donde es posible formar directamente la especie ${}^{l}R^{*}$ (**reacción c1**) y se indica que es un sistema energéticamente suficiente o favorable.

$R^{++} + R^{-+} \rightarrow R^{+} + R$ (formación del estado excitado singlete) (c1)

Por el contrario, si el valor de $-\Delta H_{ann}$ no es suficiente para producir el estado excitado singlete, pero sí lo es como para originar un estado triplete de energía E_t , es decir 40

que la entalpía de la reacción de aniquilación (**reacción c Esquema 1**) es mayor que la energía del estado triplete pero menor que la energía del primer estado singlete ($E_t < -\Delta H_{ann} < E_s$). Entonces, en este caso se forma la especie ${}^{3}R^{*}$ (**reacción c2**) y luego es posible la formación del estado singlete emisor por medio de una reacción de aniquilación triplete-triplete (ATT, **reacción d**), dicho mecanismo es conocido como "*ruta-T*" o sistemas energéticamente deficientes.

 $R^{+*} + R^{-*} \rightarrow {}^{3}R^{*} + R$ (formación del estado excitado triplete) (c2) ${}^{3}R^{*} + {}^{3}R^{*} \rightarrow {}^{1}R^{*} + R$ (aniquilación triplete - triplete) (e)

En algunos casos, la reacción de aniquilación de iones además de generar estados excitados singlete y triplete (**reacciones c, c1 y c2**) puede conducir a la formación de excímeros (dímeros excitados) y exciplejos (complejos excitados) y por consiguiente, la emisión puede observarse desde estas nuevas especies. Un ejemplo son las moléculas que tienen un importante solapamiento de orbitales π , como los hidrocarburos aromáticos policíclicos planos (PAHs) —pireno y perileno—.^{8,9} Otras reacciones tal como el proceso de ATT, pueden conducir a la formación de excímeros y/o exciplejos.¹⁰ Las reacciones asociadas a la aparición de estas especies se dice que siguen la "*ruta-E*" y se resumen en el **Esquema 6**.

$\mathbf{R}^{+\bullet} + \mathbf{R}^{-\bullet} \to \mathbf{R}_2^*$	(formación de excímero)	(f)
$\mathbf{R}^{+\bullet} + \mathbf{R}^{-\bullet} \rightarrow (\mathbf{R}\mathbf{R}')^{*}$	(formación de exciplejo)	(g)
${}^{3}R^{*}+{}^{3}R^{*}^{1}R^{*}_{2}$	(ATT formación de excímero)	(h)

Esquema 6. Generación de ECL desde excímeros y exciplejos.

Por lo tanto, deben cumplirse ciertas condiciones para la generación eficiente de señal electroquimioluminiscente en el mecanismo de aniquilación de iones

electrogenerados las cuales son:¹¹ (I) iones radicales estables de las moléculas precursoras en el electrolito de interés, que pueden ser evaluados a través de una respuesta de voltamperometría cíclica (VC), (II) alta eficiencia de fotoluminiscencia (FL) en el producto proveniente de la reacción de transferencia de electrones, que a menudo se puede calcular desde un experimento de fluorescencia y (III) energía ($-\Delta H_{ann}$) suficiente en la reacción de aniquilación para producir el estado excitado necesario para la emisión de luz.

3.2.2. Correactantes ECL

En la actualidad, todos los instrumentos analíticos de ECL comercialmente disponibles están basados en la tecnología de correactantes. En consecuencia, es importante la comprensión de los mecanismos de ECL que involucran este tipo de especies. A diferencia de la aniquilación de iones, en la que se requiere la generación electroquímica de ambos precursores electroquimioluminiscentes –cationes y aniones radicales–, el uso de correactantes supone que la ECL es generada en la interfase de un electrodo por un barrido de potencial unidireccional, en una solución que contenga la especie emisora de luz y el correactante, pueden ser primero oxidados o reducidos en el electrodo para formar radicales e intermediarios. Estas especies intermediarias provenientes del correactante, por descomposición química, formarán potentes agentes oxidantes o reductores para producir los estados excitados necesarios para la emisión de luz.

A menudo, las reacciones de ECL con correactantes (C) se nombran como "oxidación-reducción" o "correactantes anódicos", cuando la especie intermediaria altamente reductora (C^{\neq}_{red}) es generada después de una oxidación electroquímica (**Esquema 7**), y "reducción-oxidación" o "correactantes catódicos", cuando el poderoso intermediario oxidante (C^{\neq}_{ox}) es formado después de una reducción electroquímica (**Esquema 8**).^{12,13}

42

$$\begin{array}{c} R - e^{-} \rightarrow R^{+ \bullet} \\ C - e^{-} \rightarrow C^{+ \bullet} \end{array}$$
 (oxidación electroquímica) (a)

$$R^{+*} + C \rightarrow R + C^{+*}$$

$$C^{+*} \rightarrow C^{\neq}_{red}$$

$$C^{\neq}_{red} + R \rightarrow R^{-*} + P$$
(reacciones del correactante) (b)

$$\begin{array}{c} \mathbb{R}^{+*} + \mathbb{R}^{-*} \to \mathbb{R}^{*} + \mathbb{R} \\ \mathbb{R}^{+*} + \mathbb{C}_{red}^{\neq} \to \mathbb{R}^{*} + \mathbb{P} \end{array}$$
 (formación del estado excitado) (c)

 $R^* \rightarrow R + hv$ } (emisión de luz)(d)

Esquema 7. Mecanismo de ECL: correactantes anódicos ("oxidación-reducción"). Donde R: luminóforo, C: correactante, C^{\pm} : intermediario del correactante con subíndice "red" para un agente reductor, P: producto asociado con las reacciones de C^{\pm} .

$$\begin{array}{c} R + e^{-} \rightarrow R^{-*} \\ C + e^{-} \rightarrow C^{-*} \end{array} \left. \begin{array}{c} (reducción \ electroquímica) \ (a) \\ \\ R^{-*} + C \rightarrow R^{-*} \\ C^{-*} \rightarrow C_{ox}^{*} \\ C_{ox}^{*} + R \rightarrow R^{+*} + P \end{array} \right\} (reacciones \ del \ correactante) \ (b) \\ \\ R^{+*} + R^{-*} \rightarrow R^{*} + R \\ R^{-*} + C_{ox}^{*} \rightarrow R^{*} + P \end{array} \right\} (formación \ del \ estado \ excitado) \ (c)$$

 $\mathbb{R}^* \rightarrow \mathbb{R} + hv$ (emisión de luz) (d)

Esquema 8. Mecanismo de ECL: correactantes catódicos ("reducción-oxidación"). Donde R: luminóforo, C: correactante, C^{\pm} : intermediario del correactante con subíndice "Ox" para un agente oxidante, P: producto asociado con las reacciones de C^{\pm} .

43

Por lo tanto, un correactante es una especie que luego de una oxidación o reducción electroquímica (reacciones a) es sometido a una descomposición química para formar un intermediario fuertemente reductor u oxidante (reacciones b) que pueda reaccionar con el luminóforo oxidado o reducido para generar los estados excitados (reacciones c) en la especie electroquimioluminiscente (en los **Esquema 7** y **8**). A diferencia del mecanismo de aniquilación de iones ECL, la secuencia de reacciones en presencia de un correactante parece ser más complicado (tal como se detallará más adelante para dos ejemplos concretos) pero en general son tres los procesos involucrados y se clasifican de la siguiente manera: (**a**,**b**) reacciones redox sobre la superficie del electrodo, (**c**) reacciones químicas homogéneas (reacciones del correactante y formación del estado excitado) y (**d**) emisión de luz. En el **Esquema 9** se resume estos cuatro tipos de reacciones para un correactante catódico, de igual manera ocurre con un correactante anódico.

$$R + e^{-} \rightarrow R^{-*}$$

$$C + e^{-} \rightarrow C^{-*}$$

$$R^{+*} + R^{-*} \rightarrow R^{*} + R$$

$$R^{-*} + C^{*}_{ox} \rightarrow R^{*} + P$$

$$(c)$$

$$R^{*} \rightarrow R + hv$$

$$(d)$$

Esquema 9. Mecanismo general de ECL con un correactante catódico.

Dependiendo de la naturaleza del electrodo de trabajo y el potencial redox del correactante, son posibles tanto las reacciones químicas homogéneas como heterogéneas. Con respecto, a la formación de especies en estado excitado, también existen dos vías generales: la clásica aniquilación de iones y la reacción que implica la participación de intermediarios provenientes del correactante.

El uso de correactantes es especialmente útil cuando el catión (R^{++}) o anión radical (R^{-+}) no es lo suficientemente estable para producir una señal de ECL, o cuando la ventana
FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

electroquímica del solvente no es lo suficientemente amplia como para formar R⁺ y R⁻. También, la utilización de estos compuestos puede hacer posible el proceso de ECL cuando algunas sustancias fluorescentes solo tienen una reducción u oxidación electroquímicamente reversible. De la misma manera, cuando la reacción de aniquilación entre especies oxidadas y reducidas no es energéticamente suficiente, el uso de un correactante ayuda a producir una señal más intensa. Finalmente otra ventaja es que se puede eliminar el efecto "quenching" del oxígeno, presente en el mecanismo de aniquilación de iones, en las reacciones del tipo "oxidación-reducción", por lo que un experimento de ECL puede ser llevado a cabo en presencia de aire.¹⁴

Cabe destacar que en el mecanismo de generación de ECL a través de aniquilaciones de iones (**Esquema 5**), todos los reactivos de partida pueden ser regenerados después de la emisión de luz. Por el contrario, en un sistema de ECL con correactante, tal como $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2^+}$ [rutenio(II) tris(2,2'-bipiridilo)]/TPrA (tri-n-propilamina), solamente la especie emisora de luz puede ser regenerada, mientras que el correactante es consumido mediante procesos químicos y electroquímicos.

En la **Tabla 1** se muestra un listado de típicos sistemas ECL con correactantes, para los cuales los mecanismos de reacción se encuentran bien estudiados.¹⁴ Además de ellos existen otros compuestos de origen biológico, farmacéutico, etc. que han mostrado potencial para actuar como correactantes de ECL.^{15,16} En esta lista se puede observar que los intermediarios generados *in-situ* a partir de los correactantes son agentes reductores fuertes (en la "oxidación-reducción" ECL) o agentes oxidantes potentes (en la "reducción-oxidación" ECL), según lo indican sus potenciales redox estándares.¹⁴

45

Tipo de correactante	Luminóforo	Correactante	Principal intermediario	E° intermediario (V vs NHE)	Observaciones
oxidación- reducción	Ru(bpy) ₃ ²⁺	$Oxalato(C_2O_4^{2^*})^*$	CO ₂ -	CO ₂ /CO ₂ · -1.9 V ¹⁷	а
	$Ru(bpy)_3^{2+}$	Piruvato/Ce(III)	CH ₃ CO [•]		b
	Ru(bpy) ₃ ²⁺	Tri- <i>n</i> -propilamina [TPrA, (CH ₃ CH ₂ CH ₂) ₃)N]	TPrA ^{+•} , TPrA [•]	TPrA ^{+*} /TPrA +1.1 V, ^{18,19} P ₁ /TPrA [*] -1.5 V ¹⁹	с
	$Ru(bpy)_3^{2+}$	Hidrazina (N ₂ H ₄)	N ₂ H ₂ , N ₂ H ₃ *	$N_2H_2/N_2 < -2.3 V^{20,21}$	d
reducción- oxidación	$Ru(bpy)_3^{2+}$	Persulfato $(S_2O_8^{2-})$	SO4	SO ₄ -'/ SO ₄ ²⁻ +2.9 V ²²	e
	Hidrocarburos aromáticos	Peróxido de benzoilo [BPO, (C ₆ H ₅ CO ₂) ₂]	C ₆ H ₅ CO ₂	C ₆ H ₅ CO ₂ '/ C ₆ H ₅ CO ₂ +1.7 V ²³	f
	$Ru(bpy)_3^{2+}$	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	OH	OH'/OH ⁻ 1.77–1.91 V ²⁴⁻²⁶	g

Tabla 1. Típicos correactantes de ECL

^a Primer correactante reportado del tipo "oxidación-redución" ECL. ^bReducción natural de CH₃CO similar a la de CO₂[•]. ^c Ampliamente usado en equipos comerciales de ECL. ^d Sistema complicado. ^e Primer sistema de correactante ECL del tipo "reducción-oxidación". ^f Puede usarse peróxido de hidrogeno. ^g Los estudios se realizaron en una solución buffer de fosfato a pH 7,5, donde el Ru(bpy)₃⁺ reducido electroquímicamente puede ser absorbido y precipitado sobre el electrodo. A concentraciones >1 mM H₂O₂ con 0,10 mM Ru(bpy)₃²⁺ existe un efecto "quenching".

En resumen, se deben considerar numerosos criterios necesarios para un buen correactante de ECL tales como la solubilidad, la estabilidad electroquímica, las propiedades cinéticas, el efecto "quenching", la señal ECL de base, etc.^{11,14,16} De todos ellos, el más importante corresponde a las propiedades electroquímicas del correactante, el cual debe ser fácilmente oxidado o reducido en presencia de un luminóforo en la superficie de un electrodo y posteriormente, debe participaren una rápida reacción química para formar un intermediario que tenga un poder reductor u oxidante poderoso para reaccionar con el emisor oxidado o reducido. Por último, reaccionar con la especie emisora para formar el estado excitado emisor de luz.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

A continuación se describen algunos ejemplos representativos de correactantes anódicos y catódicos y se discutirán los mecanismos involucrados en la generación de ECL.

3.2.2.1. Típicos sistemas ECL con correactantes y sus mecanismos

3.2.2.1.1. Correactantes del tipo "Oxidación-Reducción" o "Correactantes Anódicos"

Aunque hay una gran variedad de moléculas que presentan ECL, la gran mayoría de las publicaciones que tratan de correactantes y sus aplicaciones analíticas, se basan principalmente en la utilización de $Ru(bpy)_3^{2+}$ o sus derivados como la especie emisora de luz. Debido a las excelentes propiedades químicas, electroquímicas y fotoquímicas, incluso en medios acuosos y en presencia de oxigeno, que presenta este complejo.²⁷ Como ejemplo, se describirá en detalle el sistema ECL $Ru(bpy)_3^{2+}/TPrA$ que es de importancia para esta Tesis.

3.2.2.1.1.1. Sistema de correactantes ECL relacionado con Tri-n-propilamina (TPrA)

La mayoría de las aplicaciones de ECL reportadas a la fecha, involucran $Ru(bpy)_3^{2+}$ o sus derivados como centro emisor y TPrA como correactante. Debido a que el sistema $Ru(bpy)_3^{2+/}$ TPrA presenta la mayor eficiencia de ECL y como tal, constituye la base de los dispositivos comerciales para inmunoensayos y análisis con ADN.^{11,14,16,28}

El mecanismo de reacción en este sistema es muy complicado y ha sido extensamente estudiado.^{11,14,16,18,29} Habitualmente un gráfico de la intensidad de ECL en función del potencial aplicado se compone de dos ondas. La primera ocurre a 0,9 V vs un electrodo de Ag/AgCl y se corresponde con la oxidación directa de TPrA sobre un electrodo carbono vítreo y se encuentra montada sobre la segunda onda que aparece a 1,14 V vs Ag/AgCl cuando las concentraciones de Ru(bpy)₃²⁺ son relativamente altas (~mM, **Figura 3d**). El segundo pico aparece al potencial en que es oxidado el Ru(bpy)₃^{2+ 18,30}Ambas ondas electroquímicas producen la emisión desde la especie

 $(Ru(bpy)_3^{2+})^*$.³⁰ La intensidad relativa de ECL de la primer onda es significativa en soluciones diluidas de Ru(bpy)_3²⁺(<µM, **Figura 3a** y **3c**) y 0,1 M de TPrA. Así, la mayor parte de la señal de ECL obtenida en sistemas con bajas concentraciones de analitos, como lo son los estudios relacionados con inmunoensayos y con sondas de ADN con Ru(bpy)_3²⁺ como marcador ECL, probablemente se origine en la primer señal de ECL.



Figura 3. a) Respuesta de ECL en función del potencial y **b)** voltamperograma cíclico para Ru(bpy)₃⁺² 1 nM en presencia de 0,1 M de TPrA (buffer 0, 1 M de Tris/0.10 M LiClO4,pH 8) con un electrodo de carbono vítreo. v: 50 mV/s. **c)** Respuesta de ECL en función del potencial para el mismo sistema pero con Ru(bpy)₃⁺² 1 μ M. La escala para la intensidad de ECL es 100 veces mayor que la del inciso a.¹⁸ **d)** Respuesta de ECL en función del potencial para diferentes concentraciones de Ru(bpy)₃⁺² en presencia de 0,1 M de TPrA (0,2 M PBS, pH 8,5). [Ru(bpy)₃⁺²]: 1 mM (--), 0.50 mM (---), 0.10 mM (---) y 0.05 mM (----)

El **Esquema 10** resume el mecanismo relacionado con la primer onda de ECL, donde el catión radical TPrA⁺⁺ formado durante la oxidación de TPrA es un intermediario lo suficientemente estable –con un tiempo de vida media de ~ 0,2 ms–que puede oxidar al Ru(bpy)₃⁺ –formado a partir de la reducción de Ru(bpy)₃²⁺ por el radical libre (TPrA⁺)– para dar (Ru(bpy)₃²⁺)^{*}.¹⁸



Esquema 10. Mecanismo de ECL para Ru(bpy)₃²⁺/TPrA: con oxidación electroquímica de TPrA y oxidación homogénea de Ru(bpy)₃²⁺. Donde TPrA⁺= (CH₃CH₂CH₂)₃N⁺, TPrAH⁺= Pr₃NH⁺, TPrA⁺= Pr₂NC·HCH₂-CH₃y P₁= Pr₂N⁺C=HCH₂CH₃.

El mecanismo de reacción del segundo pico sigue la clásica vía de correactante, "oxidación reducción ", donde la oxidación de TPrA genera un intermediario fuertemente reductor TPrA^{*}, $(E^{\circ}P_1/TPrA^{\circ\approx} -1,7 \text{ V vs ECS})$.¹⁹ Este proceso puede ocurrir a través de una vía denominada "ruta catalítica", donde el Ru(bpy)₃³⁺ generado electroquímicamente reacciona con TPrA mediante reacción directa en el electrodo como lo describen los **Esquema 11-13**.¹⁸

Mientras que la "ruta catalítica" que se muestra en el **Esquema 13** implica la oxidación homogénea de TPrA con $Ru(bpy)_3^{3^+}$.¹⁸ La contribución de este proceso a la intensidad global de ECL depende de la concentración de $Ru(bpy)_3^{2^+}$, la cual es pequeña cuando se usan bajas concentraciones de $Ru(bpy)_3^{2^+}$.³¹ En resumen el estado excitado de $Ru(bpy)_3^{2^+}$ se pueden producir a través de tres rutas diferentes: (I) la oxidación de $Ru(bpy)_3^+$ por el catión radical TPrA⁺⁺ (**Esquema 10**), (II) la reducción de $Ru(bpy)_3^{3^+}$ por el radical libre TPrA⁺ (**Esquema 11**) y (III) mediante la reacción de aniquilación entre las especies: $Ru(bpy)_3^{3^+}y Ru(bpy)_3^+$ (**Esquema 12**).



Esquema 11. Mecanismo de ECL para Ru(bpy)₃²⁺/TPrA: "ruta catalítica" con oxidación electroquímica de TPrA. Donde TPrA⁺ (CH₃CH₂CH₂)₃N⁺, TPrAH⁺ = Pr₃NH⁺, TPrA·= Pr₂NC·HCH₂-CH₃, P_1 = Pr₂N⁺C=HCH₂CH₃y P_2 = Pr₂NH + CH₃CH₂-CHO]



Esquema 12. Mecanismo de ECL para $Ru(bpy)_3^{2+}/TPrA$: "ruta catalítica" con oxidación electroquímica de TPrA. Donde $TPrA^+ = (CH_3CH_2CH_2)_3N^+$, $TPrAH^+ = Pr_3NH^+$, $TPrA = Pr_2NC+HCH_2-CH_3, P_1 = Pr_2N^+C = HCH_2CH_3, P_2 = Pr_2NH + CH_3CH_2-CHO]$



Esquema 13. Mecanismo de ECL para $Ru(bpy)_3^{2^+}/TPrA$: "ruta catalítica" con oxidación homogénea de TPrA. Donde TPrA⁺= $(CH_3CH_2CH_2)_3N^+$, TPrAH⁺= Pr_3NH^+ y TPrA⁺= Pr_2NC ·HCH₂-CH₃.

Para el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2^+}/\text{TPrA}$, la oxidación directa de TPrA sobre el electrodo desempeña un papel importante en el proceso de ECL y por tanto depende del material del electrodo y la hidrofobicidad de su superficie.¹⁴ También, se ha encontrado que la

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

intensidad de ECL de la primer y segunda onda es proporcional a la concentración de TPrA en un amplio intervalo de concentraciones (0,001-0,10 M).^{11,14,16,18} Se debe tener en cuenta que el O₂ disuelto puede influir en la intensidad de la señal cuando se utilizan bajas concentraciones de TPrA (<20 mM).³² Este comportamiento se explica en base a los mecanismos de ECL descritos en los **Esquema 10-12** y teniendo presente que un gran exceso de intermediarios radicales en presencia de altas concentraciones de TPrA permite reducir el O₂ disuelto dentro de la capa de reacción, de manera que este no ejerza un efecto de "*quenching*" sobre la emisión. Sin embargo, para bajas concentraciones de TPrA la oxidación del correactante genera una pequeña cantidad de intermediarios reductores y de esta forma el O₂ actúa como un interceptor. En consecuencia, destruye los intermediarios antes que participen en la reacción de ECL, dando lugar a una reducción en la intensidad de emisión. En este último caso, la ruta inicial de ECL menos eficiente es significativamente afectada.

La respuesta de ECL en el sistema $Ru(bpy)_3^{2^+}/TPrA$, también depende del pH de la solución:^{33,34} se observa un notable incremento a pH>5,5 y con un valor máximo a pH 7,5.³² La explicación de lo anteriormente expuesto no está clara pero puede estar asociada a reacciones de deprotonación de las especies TPrAH⁺ y TPrA⁺⁺ (**Esquema 10-12**), así como a la estabilidad en el medio de los intermediarios formados. La disminución en la solubilidad de la TPrA a valores altos de pH podría ser otra razón por la que se produce el máximo de intensidad de ECL a un pH de 7,5.

Un estudio reciente sobre la influencia de la naturaleza, la concentración y el pH del buffer en el paso determinante de la velocidad de sistemas $Ru(bpy)_3^{2+}/aminas$ alifáticas terciarias reveló que la deprotonación del ión amonio es el paso que determina la velocidad de reacción a pH<5, mientras que la deprotonación del catión radical es el paso determinante a pH>5.²⁹ Por lo general, valores de pH superiores a 9 no deben ser utilizados porque el Ru(bpy)_3³⁺ generado en el electrodo puede reaccionar con los iones oxidrilos presentes en la solución para producir una significativa señal de base.^{11,14,16,29}

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

3.2.2.1.1.2. Otros sistemas de correactantes ECL relacionados con aminas

De la misma manera que para TPrA, una amplia variedad de aminas pueden ser utilizadas como correactantes y formar parte en las reacciones de ECL con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Dado que los grupos amino son frecuentes en numerosos compuestos biológicos y farmacológicos importantes, incluyendo aminoácidos, péptidos y proteínas entre otros, el sistema de correactante: $-\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{amina}$ forma la base de un gran número de estudios basadosen la detección y determinación de especies biorelacionadas.^{15,35} Varios investigadores han intentado correlacionar la eficiencia de ECL con la estructura molecular de las aminas.^{14,33,36-40} Aunque no hay criterios estrictos sobre el tema se adopta como regla general, que el aumento en la intensidad de ECL sigue el siguiente orden: amina primaria <secundaria < terciaria, observándose límites de detección más bajos para las aminas terciarias.^{34,41}

Como se observa en los **Esquema 10-12**, la amina debe tener un átomo de hidrógeno unido al carbono adyacente (C- α) al átomo de nitrógeno, entonces después del proceso de oxidación el catión radical puede perder un átomo de hidrógeno y formar el radical reductor.³³ También la naturaleza de los sustituyentes unidos al nitrógeno o al C- α afecta la intensidad de ECL. En general grupos atractores de electrones provocan una disminución en la intensidad, mientras que grupos donores inducen el efecto opuesto.

3.2.2.1.2. Correactantes del tipo "Reducción-Oxidación" o "Correactantes Catodicos"

Existen numerosos correactantes del tipo catódico ("reducción-oxidación", Tabla 1). Todos ellos exhiben mecanismos de reacción similares al mostrado en el Esquema 8. En esta Tesis se utilizará peróxido de benzoilo (BPO) para el estudio de ECL en nanopartículas de carbono, que se presenta en el Capítulo 7. A continuación se describe el mecanismo para la generación de ECL con BPO.

3.2.2.1.2.1. Sistema de correactante ECL relacionado con peróxido de benzoilo

Los peróxidos se usan como correactantes debido a que producen agentes oxidantes potentes cuando son reducidos electroquímicamente o en solución. En solventes orgánicos el peróxido de benzoilo puede ser usado para generar ECL mediante reacciones del tipo "reducción-oxidación". La mayoría de los estudios que se han realizado con BPO involucran la generación de ECL desde hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) tales como rubreno, DPA, antraceno, pireno y compuestos derivados, etc..^{23,42-44} El **Esquema 14** detalla la secuencia de reacciones que se llevan a cabo para la producción de estados excitados singlete en moléculas aromáticas mediante la generación electroquímica de aniones radicales en presencia de BPO.^{23,42-44}

La reacción 1 representa el proceso de reducción electroquímica de hidrocarburos aromáticos, mientras que la reacción 2 manifiesta la reducción irreversible de BPO en el electrodo. El proceso de reducción electroquímica para BPO se caracteriza por un pico irreversible a -0,36 V vs ECS. También, la reducción de BPO puede ocurrir en solución mediante el anión radical electrogenerado desde el hidrocarburo aromático (R⁻⁺), tal como lo revela la reacción 3. Luego, debido a la inestabilidad del BPO⁻, éste rápidamente se descompone en la cupla anión/radical benzoato (C₆H₅CO₂⁻/C₆H₅CO₂⁻), la cual actúa como correactante (reacción 4). La reacción 5 conduce a la formación de estados excitados tripletes en las moléculas de hidrocarburo. Sin embargo, Chandross y sus colaboradores sugieren que la población directa del estado excitado singlete (reacción 5a) puede ocurrir mediante la oxidación del anión benzoato a 1,5 V vs ECS,²³ en lugar de 0,8 V vs ECS sugerido por Akins y sus colaboradores.⁴³ La ocurrencia de la reacción 5a provocaría una menor cantidad de estados excitados tripletes disponibles para la reacción de aniquilación triplete-triplete (ATT, reacción 7). Debido a esta discrepancia ambas teorías son tenidas en cuenta para el mecanismo de ECL propuesto en el **Esquema 14**.

Respecto a las **reacciones 6** y 7, ambas manifiestan las reacciones conocidas de los estados excitados tripletes, "*quenching*" y aniquilación triplete-triplete.⁴⁵ Mientras que las **reacciones 8 y 9** conducen a la formación de cationes radicales desde hidrocarburos

aromáticos en estado triplete. Y por otro lado, la **reacción 9a** propone la formación de cationes a partir del estado singlete. Finalmente, la **reacción 10** indica la reacción de aniquilación entre el anión y catión radical para formar moléculas en estado excitado singlete, las cuales producirán la emisión de luz como lo se demuestra en la **reacción 11**.

$$R + e^{-} \rightarrow R^{-\bullet}$$
(1)
BPO + ne^{-} \rightarrow productos (2)

$R^{-\bullet} + BPO \rightarrow R + BPO^{-}$	(3)
$BPO^{-} \rightarrow C_6H_5CO_2^{-} + C_6H_5CO_2^{\bullet}$	(4)
$R^{\bullet\bullet} + C_6 H_5 CO_2^{\bullet} \rightarrow {}^3R^{\bullet} + C_6 H_5 CO_2^{\bullet}$	(5)
$R^{-\bullet} + C_6 H_5 CO_2^{\bullet} \rightarrow {}^1R^{\bullet} + C_6 H_5 CO_2^{-\bullet}$	(5a)
${}^{3}R^{*} + Q \rightarrow R + Q'$	(6)
${}^{3}R^{*} + {}^{3}R^{*} \rightarrow {}^{1}R^{*} + R$	(7)
${}^{3}R^{*} + BPO \rightarrow R^{+*} + BPO^{-}$	(8)
${}^{3}R^{*} + C_{6}H_{5}CO_{2}^{\bullet} \rightarrow R^{+\bullet} + C_{6}H_{5}CO_{2}^{-}$	(9)
$R + C_6 H_5 CO_2^{\bullet} \rightarrow R^{+\bullet} + C_6 H_5 CO_2^{-\bullet}$	(9a)
$R^{-\bullet} + R^{+\bullet} \rightarrow^{1} R^{*} + R$	(10)
$^{1}R^{*} \rightarrow R + h\nu$	(11)

Esquema 14. Mecanismo de ECL para R y peróxido de benzoilo (BPO), donde R es un hidrocarburo aromático (PAH). $^{42-44}$

FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

Referencias

(1) Faulkner, L. R.; Bard, A. In *Electrochemical Methods–Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons: New York, 1980; 2nd ed., 2000

(2) Weller, A.; Zachariasse, K. The Journal of Chemical Physics 1967, 46, 4984.

(3) Faulkner, L. R.; Tachikawa, H.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1972, 94, 691.

(4) Hoytink, G. J. Discussions of the Faraday Society 1968, 45, 14.

(5) Van Duyne, R. P.; Reilley, C. N. Analytical Chemistry 1972, 44, 142.

(6) Visco, R. E.; Chandross, E. A. *Electrochimica Acta* **1968**, *13*, 1187.

(7) Pighin, A. Canadian Journal of Chemistry 1973, 51, 3467.

(8) Fleet, B.; Kirkbright, G. F.; Pickford, C. J. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 1971, 30, 115.

(9) Weller, A.; Zachariasse, K. Chemical Physics Letters 1971, 10, 197.

(10) Maloy, J. T.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1971, 93, 5968.

(11) Bard, A. J. In *Electrogenerated Chemiluminescence*; Marcel Dekker: New York, 2004.

- (12) Rubinstein, I.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1981, 103, 512.
- (13) White, H. S.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1982, 104, 6891.

(14) Miao, W. Chemical Reviews 2008, 108, 2506.

- (15) Yuan, Y.; Han, S.; Hu, L.; Parveen, S.; Xu, G. Electrochimica Acta 2012, 82, 484.
 - (16) Parveen, S. In *Protocols and Applications*; Springer, 2013.
 - (17) Butler, J.; Henglein, A. Radiation Physics and Chemistry 1980, 15, 603.
 - (18) Miao, W.; Choi, J.-P.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society

2002, *124*, 14478.

- (19) Lai, R. Y.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry A 2003, 107, 3335.
- (20) Hercules, D. M. Science 1964, 145, 808.

(21) Nelsen, S. F.; Landis, R. T. Journal of the American Chemical Society 1973, 95, 5422.

(22) Memming, R. Journal of The Electrochemical Society 1969, 116, 785.

(23) Chandross, E. A.; Sonntag, F. I. Journal of the American Chemical Society **1966**, 88, 1089.

(24) Klaning, U. K.; Sehested, K.; Holcman, J. The Journal of Physical Chemistry 1985, 89, 760.

⁽²⁵⁾ Koppenol, W. H.; Liebman, J. F. The Journal of Physical Chemistry 1984, 88, 99.

⁽²⁶⁾ Schwarz, H. A.; Dodson, R. W. The Journal of Physical Chemistry 1984, 88, 3643.

(27) Juris, A.; Balzani, V.; Barigelletti, F.; Campagna, S.; Belser, P.; von Zelewsky, A. Coordination Chemistry Reviews 1988, 84, 85.

(28) Muzyka, K. Biosensors and Bioelectronics 2014, 54, 393.

(29) Pastore, P.; Badocco, D.; Zanon, F. Electrochimica Acta 2006, 51, 5394.

(30) Zu, Y.; Bard, A. J. Analytical Chemistry 2000, 72, 3223.

(31) Gross, E. M.; Pastore, P.; Wightman, R. M. The Journal of Physical Chemistry B 2001, 105, 8732.

(32) Zheng, H.; Zu, Y. The Journal of Physical Chemistry B 2005, 109, 12049.

(33) Knight, A. W.; Greenway, G. M. The Analyst 1996, 121.

(34) Leland, J. K.; Powell, M. J. Journal of The Electrochemical Society 1990, 137, 3127.

(35) Du, Y.; Wang, E. Journal of Separation Science 2007, 30, 875.

(36) Anderson, J. E.; Webb, S. R.; Fischer, R. L.; Kester, K. M.; Brown, B. L. Appl. Spectrosc. 2001, 55, 684.

(37) Fähnrich, K. A.; Pravda, M.; Guilbault, G. G. Talanta 2001, 54, 531.

(38) Gerardi, R. D.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W. Analytica Chimica Acta 1999, 378, 1.

(39) Knight, A. W. TrAC Trends in Analytical Chemistry 1999, 18, 47.

(40) Lee, W.-Y. Mikrochim Acta 1997, 127, 19.

(41) Noffsinger, J. B.; Danielson, N. D. Analytical Chemistry 1987, 59, 865.

(42) Lai, R. Y.; Fleming, J. J.; Merner, B. L.; Vermeij, R. J.; Bodwell, G. J.; Bard, A. J. *The Journal of Physical Chemistry A* 2003, 108, 376.

(43) Akins, D. L.; Birke, R. L. Chemical Physics Letters 1974, 29, 428.

(44) Santa Cruz, T. D.; Akins, D. L.; Birke, R. L. Journal of the American Chemical Society 1976, 98, 1677.

(45) Berlman, I. B. In Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules; Academic Press: New York, 1971.



CIONA

318LIDTECA

4.1. Estado del conocimiento

Fundamentalmente un instrumento que posea la capacidad de producir y detectar la señal de electroquimioluminiscencia (ECL) está compuesto de dos módulos instrumentales, uno de ellos consta de una unidad electroquímica y el otro de una unidad espectrofotométrica. En general, la unidad electroquímica está integrada por una celda electroquímica, electrodos, un potenciostato y un generador de funciones (que puede estar integrado al potenciostato). El módulo espectrofotométrico se encarga de medir la luz emitida y consta básicamente de una caja negra, un monocromador, elementos ópticos, amplificadores de señales y un detector de fotones. De acuerdo a este esquema general, se pueden plantear diferentes diseños instrumentales dependiendo de la información requerida de la emisión. Los principales parámetros a tener en cuenta antes de proyectar cualquier diseño instrumental son el intervalo espectral, la sensibilidad a la luz, el tiempo de respuesta y el tiempo de acumulación máxima del detector.

En este Capítulo se presenta el diseño instrumental para generar y detectar señales de ECL existentes en otros laboratorios y que sirvieron como modelos para el armado y montaje de nuestros equipos. Esos sistemas de detección serán descriptos y analizados con detalle. Luego, se describirá el diseño y el armado del equipamiento experimental de generación y detección de ECL desarrollo en esta Tesis en la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). También, se detallará la calibración y optimización del funcionamiento del nuevo equipamiento mediante la utilización de moléculas testigo o modelo cuyas propiedades electroquímicas, fotofísicas y de ECL son conocidas en bibliografia.

4.2. Instrumentos para ECL desarrollados en otros laboratorios

Para realizar experimentos de ECL existen distintos diseños experimentales que permiten estudiar el fenómeno de emisión desde diferentes puntos de vista. En general se utilizan tres esquemas que se clasifican de acuerdo al tipo de detector de luz que utiliza el montaje. A continuación, se describirán cada uno de ellos:

Sistema PMT-ECL (Figura 4). La unidad electroquímica de este arreglo experimental está formada por un potenciostato (ECOCHEMIE, Holland) conectado a una celda electroquímica ubicada dentro de una caja negra, en la cual existe un tubo fotomultiplicador (PMT) posicionado en frente de la superficie emisora de luz del electrodo de trabajo, como unidad espectrofotométrica o de detección de luz. A su vez este PMT trabaja con un voltaje de 750 V suministrado por una fuente externa de alto voltaje.



Figura 4. *Sistema PMT-ECL*. Diseño experimental para detectar señal de ECL en el laboratorio del Dr. A. Bard en Austin (TX, USA).¹

El diseño experimental mencionado permite medir intensidades de ECL en un intervalo aproximado de 200-1000 nm (intervalo de detección para un PMT). Sin embargo, este tipo de detectores no discrimina la intensidad de luz recibida en función de su longitud de onda. No obstante, el hecho de que pueda ser ubicado a unos pocos centímetros de la superficie emisora lo convierte en un dispositivo muy sensible, tal que permite detectar emisiones de luz muy débiles.

Además de estos componentes principales también existen otros dispositivos electrónicos secundarios que forman parte del equipamiento experimental. Debido a que la

intensidad de emisión puede variar varios órdenes de magnitud es necesario controlar adecuadamente la relación señal/ruido del PMT, especialmente para intensidades de emisión relativamente pequeñas. Para ello, se utiliza un multímetro de bajo ruido, el cual permite filtrar y amplificar la señal recibida desde el PMT y luego, enviarla como una segunda señal al potenciostato (la primer señal es la corriente eléctrica) para ser digitalizada junto con la señal de corriente. También, la caja negra que contiene a la celda y el PMT se encuentra completamente aislada de fuentes luminosas externas para asegurar la detección de señales experimentales enmascaradas en el ruido propio del PMT.

Como se mencionó al comienzo de este capítulo, un instrumento para detectar señal de ECL consta de dos módulos fundamentales, uno electroquímico y el otro espectrofotométrico. Por consiguiente, la obtención simultánea tanto de la corriente eléctrica como de la intensidad de ECL pone en evidencia la dependencia de la intensidad de ECL respecto del potencial aplicado (voltamperometría cíclica: VC) y del tiempo (cronoamperometría: crono). Un gráfico que muestra simultáneamente los valores de corriente y las intensidades de fotocorriente en función del potencial aplicado o del tiempo representa una curva corriente/luz.

La Figura 5 presenta dos ejemplos típicos de curvas corriente/luz obtenidas mediante la disposición experimental: *PMT-ECL*. En la Figura 2a se representa en línea de color rojo la respuesta voltamperométrica de $Ru(bpy)_3^{+2}$ en presencia de TPrA como correactante y la línea azul la correspondiente señal de ECL para dicho sistema. Este tipo de experimento es útil para el analizar el mecanismo de producción de la señal de ECL. En la Figura 2b se representa con línea de color rojo la corriente obtenida al aplicar sucesivos saltos de potencial en función del tiempo (respuesta cronoamperométrica) para Ru(bpy)₃⁺² en presencia de TPrA como correactante y la línea azul corresponde a la señal de ECL producida. Este tipo de experimento es útil para el análisis mecanístico de producción de señal ECL y en técnicas analíticas.

61



Figura 5. a) Respuesta de ECL típica en función del potencial aplicado obtenida durante un voltamaperograma cíclico (v: 100 mV/s) para $Ru(bpy)_3^{+2}$ y TPrA en ACN. b) Respuesta de ECL en función del tiempo obtenida a partir de experimentos de cronoamperometría (amplitud del pulso de potencial: 0,1 s) en el mismo sistema.

Sistema CCD-ECL (Figura 6). A diferencia del equipamiento descripto anteriormente que utiliza un PMT como detector de ECL, este esquema utiliza un dispositivo de carga acoplada (CCD) enfriado con nitrógeno líquido hasta temperaturas por debajo de los -100 °C, debido a que el ruido electrónico del CCD aumenta fuertemente con la temperatura. El sistema CCD-ECL permite obtener un espectro de ECL, ya que el CCD es ubicado a la salida de un espectrómetro de rejilla (grating spectrometer) que funciona como un prisma, separando linealmente la intensidad de luz emitida en diferentes

longitudes de onda.² Al igual que la disposición *PMT-ECL*, en este caso el programa de potencial aplicado para obtener la señal de ECL puede ser provisto por un potenciostato.

Como se mencionó en el párrafo precedente, este diseño experimental permite adquirir un espectro de ECL acumulando simultáneamente todas las longitudes de onda. Este método permite registrar emisiones de muy corta duración si la intensidad de luz es suficiente. Debido a la alta sensibilidad que presenta los CCD, se debe trabajar en habitaciones oscuras para evitar la presencia de fotones extraños y ajenos al sistema de estudio que suelen aparecer como picos extraños (*spikes*) en el espectro de ECL obtenido. Los valores de intensidad de la luz obtenidos a partir de un CCD son expresados en unidades arbitrarias (U.A.) y en función del número de células fotoeléctricas o píxeles que posea el CCD. Para convertir el número de píxeles en unidades de distancia como la longitud de una onda electromagnética (nm) se utiliza un espectro estándar, por ejemplo el obtenido a partir de una lámpara de Hg. Para ello, se usan los cuatros emisiones características del Hg (94, 115, 189 y 211 nm). En la

Figura 7 se muestra un espectro de ECL típico obtenido con un CCD.



Figura 6. Sistema CCD-ECL. Diseño experimental para detectar señal de ECL en el laboratorio del Dr. A. Bard en Austin (TX, USA).¹

En resumen, los dos diseños experimentales descriptos con anterioridad, CCD-ECL y PMT-ECL, proveen información complementaria para entender el comportamiento de especies ECL electroquímicamente activas. Habitualmente, primero se recurre al sistema

PMT-ECL para observar la presencia del fenómeno electroquimioluminiscente debido a su alta sensibilidad para optimizar la intensidad de emisión, mediante la elección del máximo potencial aplicado, velocidad de barrido y/o sucesivos saltos de potencial. En general, el barrido de potencial (VC) se utiliza solo en el caso de que la emisión sea estable en el tiempo, de lo contrario se usan saltos de potencial consecutivos (crono). Seguidamente, se puede registrar un espectro de ECL mediante un CCD (sistema *CCD-ECL*).



Figura 7. Espectro de ECL para $Ru(bpy)_3^{+2}$ 1 mM en ACN (desgasado con Ar) con 0,1M TBAHFF como electrolito soporte, obtenido mediante un CCD. Ancho de pulso: 0.1 seg., mecanismo de ECL: aniquilación de iones.³

Sistema PD-ECL (Figura 8). Este diseño experimental utiliza como detector un fotodiodo (PD) y permite realizar experimentos de ECL en compuestos que poseen

capacidad de producir señal ECL de gran intensidad. Básicamente, el sistema *PD-ECL* es muy similar al sistema *PMT-ECL*.⁴ Por ejemplo en la caracterización de dispositivos orgánicos de emisión de luz (*OLED*), que poseen la capacidad de generar señal ECL de alta intensidad y de gran área, se prefiere utilizar para su caracterización PD en lugar de un PMT para evitar la saturación de la señal. Otro aspecto que diferencia a este sistema es el significativo cambio que sufre la caja negra y el soporte que sostiene el electrodo de trabajo. Al igual que en los sistemas anteriores un potenciostato es la unidad principal de la estación electroquímica que permite obtener las correspondientes curvas corriente/luz en estado sólido.



Figura 8. Sistema PD-ECL. Diseño experimental para detectar señal de ECL en estado sólido del laboratorio del Dr. A. Bard en Austin (TX, USA).¹

4.2.1. Sistema con múltiples detectores y monocromador

Algunos laboratorios han desarrollado sistemas de detección de ECL más complejos que tienen las formas de detección presentadas anteriormente en un único esquema instrumental. Por ejemplo, el equipamiento desarrollado en el laboratorio del Dr. S. Zanarini¹ permite realizar los siguientes experimentos:

- Obtener un espectro de ECL (intervalo espectral: 200-1000 nm).
- Medir curvas corriente/luz mediante estudios de voltamprometría cíclica y cronoamperometría.
- Detectar fotocorrientes en un amplio intervalo de intensidades (nA-mA).

Por lo tanto, el equipamiento del Dr Zanarini permite no solo obtener las curvas corriente/luz mediante estudios de voltametría cíclica y cronoamperometría, sino también, obtener espectros de ECL en un amplio intervalo espectral. En general, los principales componentes son los siguientes:

- Un monocromador dual (Mod. Spectra-Pro 2300i Acton Research)
- Un Sistema de detección "PD-ECL" formado por unfotodiodo de silicio como detector para ECL en estado sólido (Mod. SI 440 Acton research, intervalo de detección: 400-1100 nm)
- Un Sistema de detección "PMT-ECL" formado por unfotomultiplicador (Mod. PD 471 Acton research; con una fuente de alto voltaje, voltaje máximo de 1250 V, intervalo de detección 300-1100 nm)
- Un modulo de control (Mod. Spectra Hub Acton)
- Un preamplificador de corriente (Mod. 181 Princeton)

La presencia de dos detectores permite medir intensidades de emisión muy débiles (PMT) y muy intensas (PD). La elección de cada uno de ellos se controla mediante un software adecuado. En la **Figura 9** se muestra el esquema general de los componentes espectroscópicos y electroquímicos del equipamiento experimental mencionado anteriormente.¹

El monocromador tiene un slit de entrada y dos slits de salida, la amplitud de todos ellos se controla mediante tornillos micrométricos, cuya apertura máxima es de 5 mm. La celda electroquímica (celda ECL en la **Figura 9**) se ubica dentro de una caja negra, la cual está centrada con el slit de entrada del monocromador. En cada uno de los slits de salida se encuentran ubicados los dos detectores mencionados anteriormente (PMT y PD). Una interface electrónica, denominada Spectra hub, controla los parámetros del monocromador

y el PMT de alto voltaje. Finalmente el amplificador de corriente es una tarjeta electrónica de bajo ruido electrónico que permite obtener una buena relación señal/ruido en un intervalo amplio de fotocorrientes. La sensibilidad de este dispositivo es del orden de 10^{-9} - 10^{-4} A/V con un nivel de ruido de aproximadamente 10^{-12} A.



Figura 9. Esquema general de un equipamiento para ECL.

En resumen, este diseño experimental mide no sólo intensidades de ECL en función del tiempo y el potencial aplicado (curvas corriente/luz), cuando el monocromador está ausente (posición en 0 nm), sino también espectros de ECL mediante el uso del monocromador. Sin embargo, esta configuración tiene la desventaja que para adquirir un espectro de ECL necesita un tiempo considerablemente mayor (del orden de varios segundos) que el necesario para adquirir un espectro con un espectrómetro de rejilla acoplado a un detector CCD. Esto es debido a que el monocromador necesita hacer un

67

barrido en longitud de onda para tomar el espectro, sumando el tiempo de integración de la señal para cada longitud de onda, mientras que el espectrómetro de rejilla refleja todo el espectro ya resuelto sobre el área de detección del detector CCD y en único tiempo integra toda la señal.

4.3. Celda electroquímica y electrodos

Otro componente importante, que demanda un cierto diseño de acuerdo a la configuración instrumental para la detección de la señal de ECL, es la celda electroquímica. Un diseño típico es una celda convencional de vidrio con forma cilíndrica, la cual está compuesta por tres electrodos: electrodo de trabajo (W), contraelectrodo (Ct) y electrodo de referencia (R) (**Figura 10**). Respecto al electrodo de referencia, se utiliza un alambre de Ag (quasi electrodo de referencia) para electrolitos orgánicos y los clásicos referencias -Ag/ClAg y Calomel (ECS)— para electrolitos acuosos.⁵

Generalmente, como electrodo de trabajo se utilizan electrodos de metales nobles, tal como Pt y Au, y carbono vítreo entre otros y un alambre de Pt de gran área superficial (aproximadamente entre 5-10 veces el área del electrodo de trabajo) como electrodo auxiliar. Este tipo de celda cilíndrica pose una base que no permite el paso de luz apropiadamente para su detección y exige que la geometría del electrodo de trabajo sea en forma de "L". Esta geometría permite exponer directamente la superficie del electrodo hacia el monocromador o PMT, ubicado en frente de la celda (**Figura 15**). La construcción de este tipo de electrodos en forma de "L" es difícil de realizar, se requiere la asistencia de un técnico en vitroplastía con experiencia en el manejo para embutir metales en vidrio.



Figura 10. Celda electroquímica convencional de tres electrodos para ECL. La superficie del electrodo de trabajo (en forma de "L") se ubica hacia el detector (CCD o PMT).

Por otra parte la celda electroquímica que se muestra en la **Figura 10** es el tipo de celda más usada en la mayoría de los experimentos de ECL relacionados a los aspectos básicos y mecanísticos de la ECL. Sin embargo, la escasa reproducibilidad que se obtiene en las medidas experimentales, alrededor de un 50%, la convierte en una celda no apta para fines analíticos. A pesar de ello, existen varias celdas electroquímicas no convencionales que se adaptan a ciertas consideraciones especiales. Este tipo de celdas pueden ser de vidrio o teflón, este último material se prefiere cuando se utilizan solventes orgánicos, y de diversas formas, cuadradas o triangulares, también existen celdas para alto vacío, celdas de flujo, etc. En la **Figura 11** se muestran algunas de las celdas electroquímicas no convencionales que se encuentran en la literatura.^{6,7}



Figura 11.Celdas electroquímicas no convencionales para ECL.¹ a) Celda de vidrio cuadrada con un block de teflón para sujetar los electrodos. b) Celda para alto vacío. c) Celda de flujo.

4.4 Diseño y desarrollo del sistema de detección para ECL en la UNRC

La idea básica impulsora fue construir un instrumento lo más simple posible que permitiera desarrollar todos los experimentos de ECL típicos con los recursos disponibles para llevar adelante esta Tesis. Para ello, se necesitó tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Registrar curvas de la señal de ECL en función del tiempo y/o en función del potencial durante experimentos de cronoamperometría y/o voltametría cíclica, respectivamente.
- Detección de fotocorrientes en un amplio intervalo de intensidades (nA-mA).
- Diseñar una celda electroquímica que permita no sólo estudiar sistemas ECL en un medio acuoso y/o en uno orgánico, sino también utilizar distintas superficies como electrodo de trabajo.
- Adquirir espectros de ECL (intervalo espectral 300-850 nm).

A partir de los diseños experimentales mostrados anteriormente se observó que algunos aspectos necesitaban ser mejorados principalmente para fines analíticos. Según se describió más arriba, la celda electroquímica de vidrio en forma de cilindro y el electrodo de Pt en forma de "L" (**Figura 10**) presentaban algunos inconvenientes para una adecuada reproducibilidad en la señal de ECL. Dado que el estudio de los aspectos básicos y mecanísticos de la emisión de ECL solo necesita una visión semicualitativa de los datos experimentales, en general una estimación del orden de magnitud de la intensidad de ECL medida es suficiente. Por el contrario, para fines analíticos se necesita conocer con exactitud la magnitud de la intensidad de ECL y a su vez que sea lo más reproducible posible tras sucesivos experimentos.

Considerando que en esta Tesis, entre otros estudios, se necesitó realizar una adecuada comparación de la eficiencia de ECL entre distintos electrodos de trabajo para una mejor detección de glifosato, se realizaron muchos esfuerzos y modificaciones del diseño experimental original para mantener constante la superficie del electrodo de trabajo y mejorar significativamente la reproducibilidad de las medidas experimentales.

Teniendo en cuenta lo mencionado, se decidió desarrollar un sistema de detección para la señal de ECL del tipo *PMT-ECL*, para obtener las curvas de luz (señal de ECL) en función del potencial y del tiempo. Mientras que para obtener los espectros de ECL, se trabajó en la adaptación de un fluorómetro ya existente en el laboratorio. A continuación, se presenta el primer diseño instrumental del tipo *PMT-ECL* con el que se realizaron los estudios de ECL iniciales de esta Tesis y luego, se mostrarán las modificaciones realizadas sobre el modelo original con los siguientes objetivos adicionales a los anteriormente mencionados:

- Medidas de ECL cuantitativas (± 5%)
- Utilizar electrodos comerciales, ya sea Pt, Au, Ag, ITO y/oC.

Por último, se describen las adaptaciones que se realizaron en el fluorómetro.

4.3.1 Sistema PMT-ECL en la UNRC

Entre los objetivos de esta Tesis no solo se encuentra el estudio de las propiedades ECL de nuevos materiales sino también, el desarrollo del diseño instrumental. La optimización de los parámetros experimentales permitió encontrar las condiciones de trabajo más convenientes. El compuesto de referencia que se utilizó para probar todo el equipamiento fue el complejo de $Ru(bpy)_3^{+2}$, dado que sus propiedades ECL son adecuadas, estables y bien conocidas en la literatura.⁸ El instrumento ensamblado en el laboratorio de optoelectrónica de la UNRC no es un equipo comercial y está construido por componentes individuales, algunos de los cuales se han conseguido comercialmente mientras que otros se han construido localmente.

El equipamiento desarrollado en Río Cuarto fue del tipo *PMT-ECL* y permite registrar curvas de la señal ECL en función del tiempo y/o en función del potencial durante experimentos de cronoamperometría y/o voltametría cíclica, respectivamente. En la **Figura** 12 se muestra un diagrama con los principales componentes del equipo de detección para ECL.



Figura 12. Diagrama general del equipamiento para ECL en la UNRC.

El diagrama de la **Figura 12** tiene los siguientes componentes principales: un portenciostato, (AUTOLAB o Tq3) como unidad electroquímica, el cual se conecta a la celda ubicada dentro de una caja negra. A su vez la celda electroquímica compuesta por tres electrodos está ubicada en frente o debajo del PMT, ambos componentes se encuentran dentro de la caja negra para evitar todo tipo de interferencias ajenas al sistema de estudio. Finalmente el PMT está conectado a una computadora con un software adecuado y especialmente diseñado para el equipo de ECL, que permite el procesamiento de las señales de ECL.

En la Figura 13 se muestra una fotografía del sistema de detección de ECL. Los componentes 1, 2, 3 y 4 están asociados con la unidad electroquímica. Dentro de la caja negra (componente número 5) se encuentra el soporte para la celda electroquímica montado en un riel que le otorga desplazamiento lineal frente a un fotomultiplicador (PMT, Mod. Hamamatzu H7467-01, Figura 14). A su vez, el PMT el cual está soportado en una torre con desplazamiento en los ejes x e y mediante dos tornillos micrométricos, los que permiten realizar ajustes finos de su posición respecto a la superficie emisora de luz del electrodo de trabajo para maximizar la señal (ver la fotografía de la Figura 15 para más detalle). Además, se encuentra la respectiva fuente de voltaje +5 V del PMT y la interface RS-232C que permite digitalizar los datos experimentales. Por último, el componente número 6 es la PC conectada a través de una interface RS-232C al PMT que digitaliza la señal.

El PMT H7467 (Figura 14) consta de una única y compacta carcasa de metal que aloja los diferentes componentes necesarios para su funcionamiento: el tubo fotomultiplicador, el circuito electrónico de la fuente de alimentación de alto voltaje, el circuito de conteo de fotones, un contador de 20 bits y el microprocesador. El uso de un PMT como detector de la señal luminosa permite medir intensidades de emisión muy débiles. En particular este PMT H7467-01, opera en modo digital o conteo de fotones *(photon counting)* que permite mejorar la relación señal/ruido en comparación con el modo analógico. La transferencia de datos, el tiempo de medición y otros ajustes necesarios son controlados mediante el software, el cual fue especialmente diseñado en nuestro laboratorio, a través de una interface RS-232C.



Figura 13. Fotografía del equipamiento para ECL de la UNRC. Los diferentes componentes son (1) potenciostato; (2) generador de funciones; (3) osciloscopio; (4) generador de funciones; (5) fotomultiplicador y receptáculo de la celda electroquímica; (6) computadora.



Figura 14. Fotomultiplicador (Mod. Hamamatzau H7467-01) utilizado como detector de luz para el equipamiento de ECL.

Como se mencionó anteriormente y según se observa en la **Figura 15**, el PMT y la celda electroquímica se ubican dentro de la caja negra. El PMT se posiciona en frente de la celda a unos pocos milímetros de la superficie del electrodo de trabajo, ya que de esta manera se evitan pérdidas de la señal ECL y la sensibilidad aumenta considerablemente.



Figura 15. Disposición experimental para la celda electroquímica y el PMT dentro de la caja negra.

El diseño de la celda mostrado en la **Figura 16** es similar al que se expuso previamente en la **Figura 10** y también se construyó un electrodo de Pt embebido en un tubo de vidrio con forma de "L". Para la elaboración de este electrodo, el alambre de Pt se inclina con un ángulo de 90° y luego se lo suelda al vidrio, éste también con una inclinación de 90° grados en forma de "L". Esta operación debe realizarse cuidadosamente, tal que el vidrio fundido moje lo suficiente el metal para que al enfriarse ambas superficies permitan consolidar la unión correctamente, sin la formación de burbujas entre ellas. De esta manera, la superficie activa del electrodo queda expuesta y orientada hacia el PMT (**Figura 16**).

Durante los experimentos de ECL la superficie del electrodo de trabajo debe estar completamente sumergida dentro de la solución a estudiar, ya que de lo contrario solo una región del electrodo será la que emitirá luz eficientemente. La distancia óptima entre la pared de la celda y el disco de Pt debería ser entre 3-5 mm. Este valor, obtenido empíricamente, asegura una capa de difusión apropiada y al mismo tiempo limita la reabsorción de luz por las especies en solución, lo cual ocasiona una disminución en la intensidad de ECL.



Figura 16. Celda electroquímica y electrodo de trabajo (W) en forma de "L" para ECL. La celda se construyó en la UNRC y se diseñó adecuadamente para permitir eliminar el O_2 molecular mediante el burbujeo con Ar a través de la válvula de vacío.

El equipo de detección para la señal de ECL descripto arriba fue utilizado en los primeros años del desarrollo de la Tesis. Se utilizó en el estudio de los colorantes láseres BODIPYs descriptos en el Capítulo 6. También, se usó al comienzo de los estudios de detección de GLY (Capítulo 8), en esta instancia se detectó serias falencias en el diseño para ser utilizado en una análisis cuantitativo de la señal ECL. Estas falencias fundamentalmente están asociadas con la configuración y disposición de la celda electroquímica y el detector. Por lo tanto, con el objetivo de mejorar y optimizar el arreglo experimental, tanto de la celda electroquímica como la disposición espacial de ella, se decidió cambiar el diseño de la misma.

El boceto anterior exigía la construcción de electrodos en forma de "L" lo cual resultaba difícil desde el punto de vista experimental, como así también, lograr que la posición del mismo dentro de la celda sea reproducible (**Figura 15** y **16**). Además, de esta manera no resultaba posible la elaboración de electrodos de Au, tal como lo requería la detección de GLY (Capítulo 8). La calidad de la unión vidrio-Au que se requiere alcanzar

es difícil de lograr, debido a que ambos materiales presentan diferentes coeficientes de expansión térmica lo que impide que se unan correctamente al enfriarse.

El nuevo diseño que incluía las mejoras necesarias para superar las limitaciones descriptas requería un una celda electroquímica completamente diferente y cambiar la posición relativa entre la celda y el PMT. Por lo tanto, se diseñó y construyó una celda de teflón en forma de cilindro con un orificio en su base, en el cual se colocó una ventana circular de cuarzo para permitir la salida de luz por el fondo de la misma, tal como se muestra en la **Figura 17**. Esta modificación permite utilizar electrodos comerciales típicos y evita la engorrosa utilización de electrodos con una inclinación de 90°. Por otra parte, la nueva celda posee una tapa a rosca que permite un acceso fácil al interior de la celda y además, posee un orificio en su centro que garantiza una ubicación fija para el electrodo.



Figura 17. Nuevo instrumento para ECL en la UNRC. **a**) Nueva celda electroquímica de teflón. **b**) Vista inferior de la celda: se observa la ventana de cuarzo y los electrodos permanecen fijos en el nuevo diseño. **c**) El PMT se encuentra debajo de la celda y más próximo al electrodo emisor de luz.

Como consecuencia del nuevo diseño de celda fue necesario modificar la ubicación del fotomultiplicador. El detector de ECL, el cual es el mismo que se usó en el equipamiento original, se ubicó debajo del soporte que sostenía la celda. De este modo, la nueva celda electroquímica tiene algunos beneficios respecto de la celda electroquímica convencional:

- Los electrodos se encuentran fijos respecto de la celda y pueden ser ubicados en el espacio de manera reproducible.
- Se pueden emplear distintos materiales para el electrodo de trabajo: Au, Ag, Pt, C.
- Permite la utilización de electrodos comerciales.

Finalmente, se procedió a validar el nuevo arreglo experimental mediante la utilización del sistema ampliamente estudiado como es el $Ru(bpy)_3^{2+}/TPrA$. En la **Figura 18** se puede visualizar una señal de ECL típica en función del tiempo con su correspondiente respuesta de corriente, luego de aplicar dos saltos consecutivos de potencial entre un E_i : 0 V y un E_f : 1,1 V en el sistema Ru(bpy)_3^{2+}/TPrA. De esta manera se pudo comprobar el correcto funcionamiento del nuevo diseño experimental.





Figura 18. a) y c) Respuesta de corriente (*i*) en función del tiempo para uno y dos saltos de potencial respectivamente. **b)** y **d)** Respuesta de ECL en función del tiempo para uno y dos saltos de potencial respectivamente. Sistema de estudio: $Ru(bpy)_3^{2+}/TPrA(1 \text{ mM}/25 \text{ mM})$ en buffer de fosfato (0,1 M, pH 8). Electrodo de trabajo: Pt (A=0,029 cm²). (Amplitud del pulso de potencial: 0,2 s y 10 s entre cada par de pulsos sucesivos). Tiempo de integración para la señal de ECL: 100 mseg.

79

4.3.2. Equipamiento para ECL: medición de espectros de ECL

Para obtener los respectivos espectros de ECL se utilizó un fluorómetro convencional con algunas modificaciones específicas que se describirán a continuación. Los espectros de ECL se obtuvieron al posicionar la celda electroquímica en un soporte especialmente diseñado que permite ser adaptado al porta muestra de un espectrofluorómetro SPEX Fluoromax Instrument (unidad espectrofotométrica, Figura 19a), el cual mediante su monocromador permite discriminar la intensidad de luz emitida por el electrodo de trabajo en diferentes longitudes de onda y de esta manera poder obtener un espectro de ECL. Dicho soporte se diseñó y construyó en nuestro laboratorio.



Figura 19. Equipamiento para medir espectros de ECL en la UNRC. a) Soporte de la celda electroquímica adaptado a la cavidad oscura del fluorómetro. b) Conexión eléctrica entre el potenciostato (unidad electroquímica) y el fluorómetro (unidad espectrofotométrica).

Posteriormente, se conectó eléctricamente la celda a un potenciostato (unidad electroquímica, **Figura 19b**) mediante el cual se aplican saltos consecutivos de potencial, entre un potencial inicial y un potencial final, que permiten obtener las especies radicalarias necesarias para la consecuente emisión de luz. Durante estos experimentos se tuvo especial cuidado en obstruir toda posible entrada de luz al detector que no provenga de la celda.
DISEÑO INSTRUMENTAL PARA ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA

Finalmente, se procedió a validar la adaptación instrumental realizada en el fluorómetro para poder registrar espectros de ECL. Para ello, se preparó una solución 1 mM de Ru(bpy)₃²⁺ en ACN y 0,1 M TBAHFF como electrolito soporte, se la colocó dentro de la celda electroquímica y se burbujeó con Ar para desoxigenar. Luego, se colocó dicha solución dentro de la celda electroquímica y se la ubicó dentro de la cavidad del fluorómetro con el electrodo de trabajo perfectamente orientado hacia el slit de entrada del monocromador. Una vez conectado el potenciostato (unidad electroquímica) a la celda, se procedió a aplicar sucesivos saltos de potencial entre el potencial de pico para el proceso de oxidación y el primer proceso de reducción de Ru(bpy)₃²⁺. El espectro de ECL resultante para Ru(bpy)₃²⁺ en ACN (**Figura 20**) tiene un máximo de emisión centrado a 610 nm aproximadamente, lo que está en perfecta concordancia con lo reportado en la literatura.^{6,9}



Figura 20. Espectro de ECL para $Ru(bpy)_3^{2+}$ (1 mM) en ACN y 0,1 M TBAPF₆ como electrolito soporte. Mecanismo de ECL: aniquilación de iones.

Referencias

(1) Zanarini, S., Alma Mater Studiorum-Universitá di Bologna, 2007.

(2) McCord, P.; Bard, A. J. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 1991, 318, 91.

(3) Fungo, F.; Wong, K.-T.; Ku, S.-Y.; Hung, Y.-Y.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry B 2005, 109, 3984.

(4) Gao, F. G.; Bard, A. J. Chemistry of Materials 2002, 14, 3465.

(5) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; John Wiley & Sons, Inc.: United States of America, 2001.

(6) Bard, A. J. In *Electrogenerated Chemiluminescence*; Marcel Dekker: New York, 2004.

(7) Parveen, S. In *Electrogenerated Chemiluminescence: Protocols and Applications;* Springer Briefs in Molecular Science: New York, **2013**.

(8) Tokel, N. E.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 1972, 94, 2862.

(9) Wallace, W. L.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry 1979, 83, 1350.

CAPÍTULO 5

ASPECTOS EXPERIMENTALES

ASPECTOS EXPERIMENTALES

5.1. Reactivos

Todos los reactivos químicos utilizados para la síntesis de nanopartículas de carbono fueron adquiridos de proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional. Los precursores moleculares fueron los siguientes: Ácido cítrico (Cicarelli, pro análisis 99,5 %) y N-octadecilamina (Fluka, 90 %). Los solventes usados fueron: etanol (Porta, 96%) y acetona (Biopack, 99,40%), mientras que para la purificación de las mismas se usó Diclorometano (DClMe, Sintorgan grado HPLC) y metanol (Merck, pro análisis 99,8%). En cuanto, al material de relleno de la columna cromatográfica se utilizó sílica gel (Macherey-Nagel Gmbh&Co.KG) con un tamaño de partículas entre 0,040-0,063 mm.

Con respecto a los experimentos electroquímicas los solventes utilizados fueron previamente purificados según se menciona a continuación:tetrahidrofurano (THF, Aldrich-Chemical) fue secado previamente mediante reflujo en presencia de sodio (Na) metálico; acetonitrilo (ACN, Aldrich-Chemical) fue secado durante 24 horas sobre pentóxido de fósforo (P₂O₅), luego se siguió con una destilación y por último, para eliminar los residuos de P₂O₅ se destiló sobre carbonato de potasio (K₂CO₃); benceno (BZ, Aldrich-Chemical) fue secado sobre una columna de alúmina activada; dicloroetano (DCIEt, Aldrich-Chemical) y diclorometano (DCIMe, Aldrich-Chemical) fueron secados sobre tamices moleculares y carbonato de sodio (Na₂CO₃, Aldrich-Chemical). Todos estos procedimientos de purificación y secado se realizaron previamente al uso de los correspondientes solventes. Como electrolito soporte se usó hexafluorfosfato de tetrabutilamonio (TBAPF₆, pureza >99%, Fluka) 0,1 M, el cual fue recristalizado a partir de una mezcla de solventes, H₂O/Etanol (50:50) y luego, secado en estufa al vacío a 80 °C durante 24 horas y guardado en un desecador en ausencia de aire.

La síntesis de Ru(bpy)₃⁺² se llevó a cabo a partir del complejo metálico Ru(bpy)₃Cl₂, (Aldrich-Chemical) y un exceso de perclorato de sodio (NaClO₄, pureza >99%, Fluka). La conversión de Ru(bpy)₃Cl₂ en sales de aniones percloratos se realizó mediante una reacción de desplazamiento de aniones entre los compuestos mencionados anteriormente. Luego, se obtuvo un sólido color naranja, para el cual fue necesario realizar dos recristalizaciones en una mezcla etanol:acetona (5:1). Por último, se secó el sólido puro en estufa al vacío a 80

ASPECTOS EXPERIMENTALES

C°. Cabe aclarar que la necesidad de desplazar los aniones Cl^{-} por aniones ClO_4^{-} es deseable desde el punto de vista electroquímico.

Los compuestos electroquimioluminiscente $-Ru(bpy)_3^{2+}$ y Rubreno- se utilizaron como fueron recibidos desde Aldrich-Chemical y almacenados al vacío en un desecador. La serie de colorantes derivados del núcleo BODIPY (Capítulo 5) no son drogas comerciales y fueron sintetizadas en colaboración con el grupo dirigido por el Prof. Francisco Amat Guerri del Instituto de Química Orgánica, CSIC Madrid, España. Las soluciones de colorantes BODIPY's y Ru(bpy)₃²⁺ fueron preparadas con ACN, mientras que para la solución de Rubreno se utilizó una mezcla de solventes 1:2 ACN/BZ. Las concentraciones de todas las moléculas estudiadas fue aproximadamente 1 mM, salvo que se indique lo contrario en la discusión de cada resultado. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente y las soluciones previamente desgasadas con N₂.

El glifosato (GLY 96%, Aldrich-Chemical) se empleó sin previa purificación y para la preparación de las correspondientes soluciones se utilizó como medio un buffer de fosfato de sodio (pH 8) de calidad analítica, 0,1 M. El agua empleada en todos los experimentos fue de calidad HPLC.

5.2. Electroquímica.

Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en un Potenciostato (AUTOLAB PGSTAT12) controlado con un software electroquímico (GPES 4.9.). En todos los experimentos se empleó una celda electroquímica de tres electrodos. Un electrodo plano de platino (Pt) de $0,029 \text{ cm}^2$ de área, fue utilizado como electrodo de trabajo, el cual fue previamente acondicionado por pulido mecánico con alúmina y colocado en un lavador ultrasónico por 5 minutos, en agua y acetona. Como contraelectrodo se utilizó un alambre de Pt con un área superficial aproximada de 2 cm² y un alambre de Ag como electrodo de pseudo-referencia.

Para el sistema Ru(bpy) $_{3}^{2+}$ /GLY se empleó como electrodos de trabajo, un electrodo de Au desnudo y electrodos de Au modificados con diferentes monocapas autoensambladas

(SAMs) y como electrodo de referencia, un Ag/AgCl (KCl, saturado). Para la formación de las SAMs se utilizó los siguientes alcanotioles: 1-undecanotiol ($HS(CH_2)_{10}CH_3$, UDT), ácido 11-mercapto-undecanoico ($HS(CH_2)_{10}COOH$, MUA) y 11-amino-1-undecanethiol clorhidrato ($HS(CH_2)_{10}NH_2$, AUT). de, y como electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl, saturado).

En cuanto, a la caracterización electroquímica de las CNPs se empleó una celda de tres electrodos. Un electrodo plano de platino (Pt) de 0,029 cm² de área fue utilizado como electrodo de trabajo, el cual se acondicionó previamente por pulido mecánico con alúmina y se lo colocó en un lavador ultrasónico por 5 minutos, en agua y acetona. Como contraelectrodo se utilizó un alambre de Pt con un área superficial aproximada de 2 cm² y un alambre de Ag como electrodo de pseudo-referencia. Se utilizaron las técnicas de Voltamperometría cíclica (VC) y Voltamperometría de Pulso Diferencial (DPV) para llevar a cabo los experimentos correspondientes, en un potenciostato (AUTOLAB PGSTAT12) controlado por software (GPES 4.9.). Las corridas de VC se realizaron a velocidad de barrido de 0,2 V/s mientras que, los parámetros experimentales para la DPV fueron los siguientes: 0,05 V para la altura del pulso de potencial, 60 ms para el ancho del pulso, 200 ms para el período y una velocidad de barrido de 0,02 V/s.

5.3. Espectroscopia

5.3.1. Espectroscopia U.V-Visible

Los espectros UV-visibles se obtuvieron en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett Packard 8453, el cual permite trabajar en un intervalo de longitudes de onda entre 190 y 1100 nm con una resolución de 1 nm. Para la adquisición de los espectros en solución se utilizaron celdas de cuarzo (NSG Precision Cell) con un paso óptico de 10 mm y como solvente, salvo que se indique lo contrario, se utilizó DCIMe.

5.3.2. Espectroscopia de Emisión

Los espectros de fluorescencia fueron medidos en un espectrofluorómetro SPEX Fluoromax Instrument,utilizando celdas de cuarzo (NSG Precision Cell) de 10 mm de paso óptico y empleando DCIMe como solvente. El espectro de emisión fue registrado entre 350 y 800 nm aproximadamente, empleando distintas longitudes de onda de excitación (300, 350, 400, 450 y 500 nm) para explorar el comportamiento del máximo de emisión a cada uno de los valores elegidos.

El rendimiento cuántico de fluorescencia se midió mediante la comparación de las intensidades de emisión integrada y los valores de absorbancia de las CNPs con los de la referencia, 9,10-difenilantraceno (DPA).¹ El DPA (Φ =0,90) fue disuelto en ciclohexano (índice de refracción (η)=1,427) y las CNPs en THF (η =1,408). Todas las soluciones fueron desoxigenadas con Ar₂. Para los cálculos de rendimiento cuántico se siguió la siguiente ecuación:

$$\Phi = \Phi_R \times \frac{I}{I_R} \times \frac{A_R}{A} \times \frac{\eta^2}{\eta_R^2} \qquad (3)$$

Donde Φ es el rendimiento cuántico de fluorescencia, *I* el área de emisión, η el índice de refracción y *A* la densidad óptica. Cabe aclarar que el subíndice *R* hace mención al fluoróforo usado como referencia, cuyo rendimiento cuántico es conocido de la literatura.

5.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (13 C-NMR) se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 300 y AMX 500 MHz con tetrametilsilano (Me₄Si) como estándar interno y cloroformo deuterado (CDCl₃) como solvente. Los desplazamientos químicos son reportados en ppm y referenciados a la frecuencia residual del solvente no deuterado (δ : 77,0 ppm para 13 C).

5.3.4. Espectroscopia electrónica de pérdidas de energía (EELS)

Los espectros de EELS fueron realizados en el laboratorio del Prof. Chacamean en San Antonio, Texas, EE.UU. Dichos espectros se midieron en el modo difracción con un ángulo de colección de 6 mradian aproximadamente .El microscopio electrónico es un JEOL JEM-ARM 200F que opera a 200 kV y está equipado con un espectrómetro Tridiem Gatan.

5.3.5. Espectroscopia de ECL

Los espectros de ECL fueron obtenidos al posicionar la celda electroquímica en un soporte que permite ser adaptado al porta muestra de un espectrofluorómetro SPEX Fluoromax Instrument. Posteriormente, se la conectó eléctricamente a un potenciostato (AUTOLAB PGSTAT12). En estos experimentos, se tuvo especial cuidado en obstruir toda posible entrada de luz al detector que no proviniera del electrodo de trabajo. En la mayoría de las experiencias se usaron dos tiempos de integración del espectrofotómetro, uno de 0,2 s y otro de 0,4 s, con un paso de luz de 4 mm (slit de emisión).

Cabe mencionar, que con el objetivo de calibrar y controlar el funcionamiento del equipamiento con respecto los nuevos sistema de estudio se utilizó como molécula testigo o modelo a $Ru(bpy)_3^{2+}$ (máximo de emisión: 610 nm), cuyas propiedades electroquímicas, fotofísicas y de ECL son conocidas de la literatura.¹ De esta manera, se pudieron conseguir los parámetros experimentales necesarios para la obtención del espectro de ECL en cada una de los sistemas estudiados. Todas las soluciones fueron cuidadosamente desgasadas con nitrógeno o argón de alta pureza y preparadas en THF.

5.4. Detección de ECL

La intensidad de electroquimioluminiscencia fue medida usando un fotomultiplicador (PMT) marca Hamamatzu (H7467-01). La celda electroquímica se posicionó enfrente del PMT, el cual fue montado sobre una caja metálica y conectado a una

PC equipada con un software para el procesamiento de señales de ECL diseñado en nuestro laboratorio. Los tiempos de integración del contador de fotones fueron de 10, 50, 100, 200, 400 y 1000 mseg, según la intensidad de emisión del colorante en estudio. La señal de ECL se generó aplicando pulsos de potencial (0,2 s de amplitud), entre los correspondientes potenciales de oxidación y de reducción para cada colorante. Entre cada par de pulsos se esperó 10 segundos para lograr la estabilización del sistema.

En una primer etapa, y con el objetivo de calibrar y controlar el funcionamiento del nuevo equipamiento se utilizaron moléculas testigo o modelo cuyas propiedades electroquímicas, fotofísicas y de ECL son conocidas en bibliografía. Para ello, se escogió como compuestos testigo a $Ru(bpy)_3^{2+}$ (máximo de emisión: 610 nm), 9,10-difenilantraceno (DPA, máximo de emisión: 410 nm) y Rubreno (máximo de emisión: 563 nm).^{2,3}

Posteriormente, se llevaron a cabo los cálculos correspondientes a las eficiencias o rendimientos cuánticos de ECL (Φ) para cada colorante estudiado. Para ello, se integró la señal de ECL proveniente del fotomultiplicador, *Área de ECL*, y se la dividió por la corriente del ánodo en estado estacionario, *Área de corriente*. En el caso de señales de transientes la relación fue determinada teniendo en cuenta todas las áreas de los picos de ECL y de corriente, durante el tiempo que duró el experimento. Los datos electroquimioluminiscentes obtenidos para cada solución de colorante fueron relacionados con los obtenidos a partir de las soluciones de rubreno en 1:2 ACN/BZ y Ru(bpy)₃²⁺ en ACN, permitiendo así poder calcular eficiencias de ECL relativas a Ru(bpy)₃²⁺ y rubreno, según las **ecuaciones 4** y 5. La eficiencia absoluta ($\Phi_{abs.}$) de ECL para rubreno es 0,029 en 1,2-dimetoxietano (DME),³ mientras que para Ru(bpy)₃²⁺ es igual a 0,05 en ACN a 25 °C.⁴

$$\frac{\text{Área ECL}/\text{Área corriente}}{\text{(Årea ECL}/\text{Área corriente}} * \Phi_{abs}^{Rubreno} = \Phi_{rel.Rubreno}^{i}$$
(4)

ASPECTOS EXPERIMENTALES

$$\frac{\text{Área ECL}}{\text{Área corriente}} * \Phi_{abs}^{Ru(bpy)_{3}^{*2}} = \Phi_{Ru(bpy)_{3}^{*2}}^{i}$$
(5)
Área corriente $P_{Ru(bpy)_{3}^{*2}}$

Los espectros de ECL fueron obtenidos al posicionar la celda electroquímica en un soporte que permite ser adaptado al porta muestra de un espectrofluorómetro SPEX Fluoromax Instrument. Posteriormente, se la conectó eléctricamente a un potenciostato (AUTOLAB PGSTAT12). En este experimento, se tuvo especial cuidado en obstruir toda posible entrada de luz al detector que no proviniera del electrodo de trabajo. En la mayor parte de las medidas experimentales, se usaron dos tiempos de integración del espectrofotómetro, uno de 0,1 s y otro de 0,6 s, con un paso de luz de 4 mm.

Cabe mencionar, que con el objetivo de calibrar y controlar el funcionamiento del equipamiento con respecto al nuevo sistema de estudio, las CNPs se utilizó como molécula testigo o modelo a Ru(bpy)₃²⁺ (máximo de emisión: 610 nm), cuyas propiedades electroquímicas, fotofísicas y de ECL son conocidas de bibliografía.³ De esta manera, se pudieron conseguir los parámetros experimentales necesarios para la obtención de los espectros de ECL en cada una de las fracciones obtenidas. Todas las soluciones fueron cuidadosamente desgasadas con nitrógeno o argón de alta durante 10 minutos para minimizar el efecto quenching del oxígeno molecular.

La intensidad de electroquimioluminiscencia fue medida usando un fotomultiplicador (PMT) marca Hamamatzu (H7467-01). La celda electroquímica se posicionó en frente del PMT, el cual fue montado sobre una caja metálica y conectado a una PC equipada con un software para el procesamiento de señales de ECL diseñado en nuestro laboratorio. El tiempo de integración del contador de fotones fue de 100 mseg, según la intensidad de emisión de las CNPs en estudio. La señal de ECL se generó aplicando sucesivos saltos de potencial entre ciertos valores y con una amplitud convenientemente elegida. Durante la medida, entre cada dos pulsos se esperó 10 segundos para lograr la estabilización del sistema. Luego, a fin de comparar la intensidad de la señal de ECL en ausencia y presencia de correactante, se realizó una experiencia utilizando peróxido de benzoilo (Sigma-Aldrich, 99,5%) como correactante catódico y aplicando al electrodo de trabajo pulsos sucesivos entre 0 V y -3 V.

Referencias

(1) Eaton, D. F. Pure Appl. Chem. 1988, 60, 1107.

Â.

- (2) Maness, K. M.; Terrill, R. H.; Meyer, T. J.; Murray, R. W.; Wightman, R. M. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 10609.
 - (3) Maness, K. M.; Wightman, R. M. J. Electroanal. Chem. 1995, 396, 85.
 - (4) Wallace, W. L.; Bard, A. J. J. Phys. Chem. 1979, 83, 1350.

CAPÍTULO 6

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF₂-DIPIRROMETENOS

6.1. Estado del conocimiento

Desde un punto de vista tecnológico, el desarrollo de nuevas sustancias electroquimioluminiscentes es un área de gran interés debido a que son la materia prima para la construcción de diodos emisores de luz y otros dispositivos fotoelectrónicos.¹⁻⁷ Por otra parte, la ECL es una técnica que presenta importantes ventajas de tipo analítico, puesto que combina la alta sensibilidad de las técnicas fluorescentes con el control que otorgan las técnicas electroquímicas.⁸⁻¹¹ La búsqueda de nuevos compuestos ECL estables y altamente eficientes, ya sean de naturaleza orgánica o inorgánica, es un tema de gran relevancia dentro de la ECL (por ejemplo, marcadores ECL para aplicaciones analíticas, pruebas en inmunoensayos, etc.).

Idealmente, los sistemas moleculares que presentan electroquimioluminiscencia (ECL) deben ser capaces de generar cationes y aniones radicales con las siguientes características: a) ser estables, incluso después de ser expuestos a sucesivos ciclos de potencial y b) tener suficiente energía para producir estados excitados que emitan luz con un alto rendimiento de emisión.^{12,13} Entre los múltiples sistemas moleculares orgánicos ECL se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), tales como rubreno y 9,10-difenilantraceno (DPA) entre otros. Los PAHs, exhiben muchas de las características requeridas para generar ECL, entre ellas, cumplen con el criterio de estabilidad y poseen eficiencias cuánticas de fluorescencia cercanas a la unidad.¹²

Aunque un rendimiento cuántico de fluorescencia elevado es un aspecto clave para la generación eficiente de señales electroquimioluminiscentes, existen solo unos pocos estudios de ECL basados en colorantes disponibles comercialmente con eficiencias de fluorescencia elevadas, como la rodamina B.^{14,15} En general estos estudios han mostrado que la capacidad de estos colorantes para generar ECL es baja debido a la inestabilidad que presentaban los iones radicales como consecuencia de formación de productos secundarios incapaces de producir ECL.¹⁴⁻¹⁶

En 1968, Treibs y Kreuzer sintetizaron una nueva familia de colorantes basada en el núcleo difluoro-boroindaceno o boro-dipirrometeno (BODIPY, Figura 21a) que consiste en dos anillos pirrolidínicos unidos entre sí por un grupo metino y un grupo BF₂.¹⁷ Los

colorantes BODIPY representan una clase importante de moléculas que se caracterizan por poseer fuertes bandas de absorción y emisión en la región visible del espectro electromagnético, una alta fotoestabilidad y un pequeño corrimiento de Stokes.¹⁸⁻²⁰ Sin embargo, el reconocimiento del potencial de estas estructuras por la comunidad científica recién apareció luego de diez años, hacia finales de la década de 1980. Por ejemplo, recién a comienzos de 1990 Boyer y Pavlopoulos propusieron el uso de estos colorantes como materiales láseres.²¹⁻²⁴



Figura 21. a) Estructura molecular del núcleo BODIPIY. b) Estructura molecular del PM 567.

Los colorantes BODIPY muestran eficiencias láser y fotoestabilidades similares o superiores a los derivados de la rodamina, probablemente estos últimos se encuentren entre los colorantes láseres más ampliamente usados. No obstante los colorantes BODIPY, a diferencia de las rodaminas, no forman agregados incluso a concentraciones relativamente altas.²⁵ Debido a estas ventajas sobre los colorantes fluorescentes tradicionales, los complejos BODIPY se han utilizado en la mayoría de las áreas donde se emplean colorantes fluorescentes, como ser: láseres de colorantes, fotosensibilizadores, sondas fluorescentes para bioimágenes in vivo y dispositivos ópticos.^{18,26-31}

Además, se han diseñado derivados del núcleo BODIPY para aplicaciones analíticas, tal como sondas de pH o reconocimiento de distintos aniones y cationes metálicos.³² En la literatura se encuentran numerosos estudios para la determinación de Fe^{+3} , Ca^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , CN, nitroxilos (HNO), aminoácidos fosforilados y otras sondas fluorescentes sensibles y selectivas.^{29,33-39}

Desde el punto de vista de la ECL, el interés por esta familia de colorantes radica en el hecho de que sus propiedades espectroscópicas y electroquímicas dependen de la ubicación y naturaleza de los grupos sustituyentes ubicados en la periferia del núcleo BODIPY.^{32,39-53} A pesar de ello, la mayor parte de la literatura relacionada con los derivados BODIPY se ha centralizado en sus propiedades fotofísicas. Solo unos pocos estudios realizados en los últimos 15 años han investigado las propiedades electroquímicas y ECL de estos compuestos.^{32,40-56}

Lai y Bard se encuentran entre los primeros investigadores que reportaron el estudio de las propiedades fotofíscas, electroquímicas y electroquimioluminiscentes de cinco colorantes BODIPY.⁴⁰ En este conjunto de colorantes se modificó el grupo sustituyente en las posiciones 2, 6 y 8 mientras las posiciones restantes no eran alteradas y en todos los casos los sustituyentes eran grupos alquílicos. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia resultaron ser elevados y cercanos a la unidad debido al alto grado de sustitución y el efecto inductivo de los sustituyentes. Sin embargo, la modificación de los grupos sustituyentes en las posiciones 2, 6 y 8 afectó considerablemente el comportamiento electroquímico y electroquimioluminiscente.

En este sentido, los colorantes que tenían todas las posiciones del núcleo BODIPY (**Figura 21b**) bloqueadas por grupos alquílicos mostraron un comportamiento electroquímico reversible tanto para el proceso de oxidación como para el de reducción y una señal de ECL moderadamente intensa. Mientras que el colorante que tenía átomos de hidrógeno en las posiciones 2, 6 y 8 exhibió procesos de oxidación y reducción irreversibles, con lo cual no se observó una señal de ECL. No obstante, la sustitución de la posición 8 por un grupo metilo permitió estabilizar el anión radical dando lugar a una reducción reversible y a la observación de una pequeña señal de ECL mediante la adición de un correactante catódico. Mediante lo cual Lai y Bard propusieron que la falta de grupos sustituyentes en las posiciones 2 y 6 da lugar a la formación cationes radicales muy reactivos que pueden participar en reacciones químicas homogéneas, como la polimerización oxidativa, provocando la pérdida de la señal de ECL o una **señal** de muy baja intensidad.⁴⁰

Los estudios basados en el comportamiento electroquímico de los colorantes BODIPYs resulta de gran utilidad para conocer sus propiedades redox y encontrar relaciones útiles entre la estructura molecular y la estabilidad de los iones radicales, para que junto con las propiedades ópticas, puedan contribuir al diseño de nuevos colorantes con propiedades específicas y ampliar sus potenciales aplicaciones. En este sentido y con el objetivo de encontrar nuevos colorantes para la producción de ECL se diseñó una serie de moléculas derivadas del núcleo BODIPY (**Figura 22**), en las cuales se introdujo cambios estructurales sistemáticos que permitan la correlación de sus propiedades optoelectrónicas con su estructura molecular.



Figura 22. Estructuras moleculares y acrónimos de los colorantes BODIPY.

Todos los colorantes estudiados son derivados del colorante comercial PM 567, sin embargo la diferencia estructural que existe entre ellos es el grupo sustituyente ubicado en la posición 8 del PM 567 (**Figura 22**). En general, se cambió la capacidad donora-aceptora de electrones del grupo sustituyente y se varió el largo de la cadena carbonada que lo separa del anillo central. El conjunto de colorantes es dividido en dos grupos: en uno de ellos el



sustituyente en la posición 8 (de color azul en la Figura 22) se encuentra separado del anillo central por una cadena saturada de átomos de carbono mientras que en el otro, el sustituyente (color rojo en la Figura 22) se halla distanciado por un grupo conjugado, en este caso un anillo benceno. Para evaluar el potencial de ECL en los colorantes elegidos se realizaron estudios de absorción y emisión de luz para conocer sus propiedades fotofísicas y estudios de voltamperometría cíclica para evaluar sus propiedades redox. El análisis conjunto de los resultados obtenidos permitió establecer una relación entre sus propiedades optoelectrónicas y los parámetros estructurales modificados.

6.2. Caracterización espectroscópica: Fotofísica de los colorantes BODIPY

Como ya se mencionó, los colorantes BODIPY se caracterizan por absorber luz en la región visible del espectro electromagnético y presentar una emisión de fluorescencia con rendimientos elevados.^{40,57-62} Los perfiles de absorbancia y fluorescencia son agudos y se encuentran ligeramente desplazados entre sí lo que da lugar a un pequeño corrimiento de Stokes. En general, la posición de las bandas de absorción y de fluorescencia es prácticamente independiente de la polaridad del solvente en el que se encuentran disueltos. Este tipo de complejos son estables en el intervalo de pH fisiológico y solamente se descomponen bajo condiciones fuertemente ácidas o básicas.⁵⁷ Finalmente, poseen una gran versatilidad y robustez química como así también una alta estabilidad térmica y fotoquímica, características muy importantes a la hora de elegir materiales para la construcción de dispositivos.^{18,39}

El conocimiento de las propiedades fotofísicas de estos sistemas es importante no solo debido a sus potenciales aplicaciones intrínsecas sino también, en el diseño de nuevos colorantes con propiedades específicas. De hecho, en la literatura existen estudios que han establecido una correlación entre las propiedades fotofísicas y las características láser de muchos de los colorantes BODIPY. Por ejemplo, mediante la variación de la estructura molecular del cromóforo (efecto de grupo sustituyente) y las condiciones del entorno (efecto de solvente, incorporación en materiales sólidos y rígidos, etc).⁵⁸⁻⁶⁴ No obstante, el

objetivo de este estudio está enfocado en encontrar una correlación entre la variación de la estructura molecular y las propiedades optoelectrónicas en general, incluyendo propiedades fotofísicas, electroquímicas y de ECL.

Por lo tanto, con el fin de evaluar si la generación de ECL es un proceso energéticamente posible se estudiaron las propiedades ópticas de los colorantes BODIPY derivados de PM 567. Para ello se registraron los respectivos espectros de absorción y de fluorescencia a fin de determinar la energía del estado emisivo (E_{0-0}) de cada una de las moléculas estudiadas, el cual conjuntamente con parámetros electroquímicos -en particular el $\Delta E - ($ Tabla determinar 3) permiten la viabilidad del fenómeno electroquimiluminiscente. En términos generales, la forma y la posición de las bandas de absorción y de fluorescencia de los colorantes estudiados son similares a los reportados en la literatura para derivados del colorante PM 567.^{39,40,64,65} En la Figura 23 se muestran las curvas espectrales representativas para la serie de compuestos nombrados genéricamente como PnAc y P3MA. Estas cuatro moléculas --P1Ac, P5Ac, P10Ac y P3MA- poseen en común como un grupo acetiloxi que actúa como aceptor de electrones en la posición 8 del centro BODIPY y difieren en el largo de la cadena saturada que une dicho grupo al núcleo BODIPY. En la Tabla 2 se detallan los parámetros espectroscópicos expresados como máximos de absorción (λ_{abs}), máximos de emisión (λ_{fl}) y los valores de la energía de transición cero-cero $(E_{0,0})$ para todos los compuestos analizados.



Figura 23. Espectros de absorción (--) y de fluorescencia (--) en ACN para la serie PnAc y para P3MA.

En la **Figura 23** se observa que para la molécula P1Ac, tanto la banda de absorción como la de fluorescencia se encuentran desplazadas batocrómicamente con respecto al colorante PM 567. Se observa que a medida que crece la longitud de la cadena carbonada (simbolizada con la letra "n" en la **Figura 22**), desde P3MA, P5Ac hasta P10Ac, los parámetros espectroscópicos detallados en la **Tabla 2** tienden a alcanzar los valores correspondientes de PM 567. Estos resultados experimentales sugieren que el efecto del sustituyente acetiloxi en la posición 8 sobre las propiedades fotofísicas de los derivados del PM 567 se debe a una interacción intramolecular de atracción de electrones por efecto inductivo a través de la cadena no conjugada (**Figura 1**). En este sentido, es de esperar que el efecto de atracción de electrones por parte del grupo acetiloxi sea más importante a medida que la longitud de la cadena no conjugada de unión sea más corta, es decir se encuentre espacialmente más cercano al centro BODIPY. En la **Figura 23** y en la **Tabla 2** se observa que el compuesto P1Ac es el que presenta mayor corrimiento batocrómico del máximo de absorbancia y de fluorescencia, lo cual está en acuerdo con lo visto en bibliografía para compuestos similares.^{25,66}

En consonancia con la descripción anterior, el desplazamiento a menores energías en los máximos de absorción y emisión se hace más débil a medida que la longitud de la cadena carbonada aumenta. En resumen, a partir de los datos expresados en la **Tabla 2** se concluye que la presencia del grupo acetiloxi en la posición 8 del centro BODIPY no modifica considerablemente las propiedades fotofísicas del cromóforo central cuando la cadena hidrocarbonada de enlace es superior a 2-3 unidades de metilenos. En la molécula P3MA la incorporación, al final de la cadena de enlace, de un grupo acriloilo (**Figura 22**) permite unir covalentemente la molécula de colorante con metil metacrilato formando una matriz compolimérica, sin provocar modificaciones importantes en la fotofísica del colorante.⁶⁶ Estos aspectos son esenciales, por ejemplo en el desarrollo de dispositivos optoelectrónicos como detectores ECL o láseres en estado sólido.^{63,64}

Colorante	λ_{ab}	λ_{1}	<i>E</i> ₀₀ (eV)	λ_{ECL}	Φ^1	Φ^2
	nm (eV)	nm (eV)		nm (eV)		
P1Ac	535 (2,31)	553 (2,24)	2,29	571 (2,17)	0,015	0,0269
P3MA	517 (2,4)	527 (2,35)	2,38	542 (2,28)	0,0014	0,0039
P5Ac	516 (2,4)	529 (2,34)	2,37	533 (2,32)	0,813	1,35
P10Ac	516 (2,4)	525 (2,36)	2,39		0,0091	0,0668
P1OH	535(2,31)	557 (2,23)	2,27			
P2CO ₂ H	519 (2,39)	534 (2,32)	2,36		and all all a	
PlArCl	523 (2,37)	532 (2,33)	2,37			
P1Ar3Br	520 (2,38)	527 (2,35)	2,36		Muy bajo	Muy bajo
P1Ar3Ac	521 (2,38)	531 (2,33)			0,0067	0,0153
P1Ar1Ac	521 (2,38)	531 (2,33)		548 (2,26)	0,0228	0,0735
PM 567 ³	514 (2,41)	531 (2,33)	2,37	550 (2,25)		0,009

Tabla 2. Propiedades espectroscópicas

¹Rendimiento cuántico de ECL para cada colorante relativo a Rubreno.

²Rendimiento cuántico de ECL para cada colorante relativo a Ru(bpy)₃²⁺

³Datos espectroscópicos obtenidos de bibliografía.⁴⁰

El colorante P1OH presenta un comportamiento fotofísico similar al mencionado anteriormente para P1Ac (**Tabla 2** y **Figura 24**). El corrimiento a menores energías de los máximos de absorbancia y fluorescencia con respecto al colorante modelo PM 567, también es debido a la incorporación de un grupo aceptor de electrones (-OH) unido por un metileno a la posición 8 del centro BODIPY.

Por otra parte, para el colorante P2CO₂H el máximo de absorción y de emisión de luz presenta ligeros corrimientos con respecto al PM 567 (**Tabla 2** y **Figura 24**), lo cual se asemeja al comportamiento de los colorantes de mayor longitud de cadena de enlace del conjunto PnAc. De acuerdo a lo analizado anteriormente, en este caso el grupo carboxílico

aceptor de electrones ejerce un efecto menor sobre el cromóforo debido a la mayor distancia de separación al anillo central, ya que la cadena de unión tiene dos unidades de metilenos en lugar de una unidad, como en P1Ac y en P1OH.



Figura 24. Espectro de absorción (--) y de fluorescencia (--) en ACN.

Finalmente, se estudió la serie de $P1Ar_nR$ que tienen un grupo p-fenilo como parte de la cadena de unión entre el grupo sustituyente y el núcleo BODIPY. En la **Figura 25** y en la **Tabla 2** se puede observar que los máximos de las bandas de absorción y de

fluorescencia se desplazan hacia valores de energías más bajas con respecto al colorante modelo PM 567. No obstante, dicho corrimiento es menor que los observados para la serie PnAc, donde la cadena de enlace al anillo central del PM 567 es una cadena saturada (**Tabla 2**). Del mismo modo que en los análisis previos, este comportamiento se puede explicar en función de la capacidad aceptora de electrones que tiene los grupos sustituyentes a través de la cadena de unión sobre el núcleo del cromóforo. Por lo tanto, los resultados indican que el efecto inductivo de estos grupos es más débil, ya que se observan menores desplazamientos batocrómicos que los observados en la serie PnAc.

Es importante notar que este comportamiento se manifiesta de manera semejante para los colorantes P1Ar3Br y P1Ar1Cl que poseen sustituyentes con mayor carácter atractor de electrones que el grupo acetiloxi (**Tabla 2**). En el caso de P1Ar3Br, el átomo electronegativo de Br se encuentra más alejado del cromoforo central, provocando menores corrimientos batocrómicos de los máximos de absorción y de fluorescencia en comparación con el P1Ar1Cl. Este efecto es similar al mostrado anteriormente por los colorantes P3MA, P5Ac y P10Ac.



Figura 25. Espectro de absorción (--) y de fluorescencia (--) para la serie P1Ar_n en ACN.

Todos estos resultados sugieren que la presencia del grupo *p*-fenilo en la posición 8 del núcleo BODIPY, no introduce cambios importantes en las propiedades fotofísicas, indicando de esta manera la ausencia de interacciones electrónicas entre los electrones π del centro emisor y el anillo aromático. Posiblemente, el comportamiento observado para el conjunto de colorantes P1Ar_n se deba al efecto estérico que obliga al grupo fenilo rotar con respecto al plano del anillo central del PM 567 impidiendo cualquier interacción posible entre ambos sistemas aromáticos. De hecho, los cálculos de mecánica cuántica reportados en la literatura revelan que el grupo *p*-fenilo se dispone con una configuración casi perpendicular (con un ángulo diedro de 87,9°) respecto al anillo del PM 567.⁶⁷ Esta disposición estructural podría deberse a las restricciones impuestas por los grupos metilos

en las posiciones 1 y 7 del cromóforo central PM 567 (**Figura 21**).⁶⁷ Esta hipótesis está de acuerdo a los estudios reportados por Lai y Bard, en donde se menciona que el núcleo BODIPY, sin grupos sustituyentes en las posiciones 1 y 7, mantiene una conformación casi coplanar con el grupo fenilo ubicado en la posición 8.⁴⁰ En este caso, se logran cambios importantes en las bandas de absorción y de fluorescencia.

6.3. Caracterización electroquímica

Se realizaron estudios electroquímicos con el objetivo de conocer sus propiedades de oxidación-reducción, las cuales a su vez permiten establecer una relación entre la estructura de las moléculas bajo estudio y sus propiedades. De la misma manera, estos estudios permitieron encontrar relaciones entre la estructura y la estabilidad de los iones radicales, que conjuntamente con los estudios espectroscópicos que se describieron previamente pueden contribuir al diseño de nuevos compuestos con propiedades adecuadas para su empleo como colorantes para aplicaciones en ECL.

Los experimentos de voltamperometría cíclica realizados a las moléculas estudiadas permitieron: por un lado, conocer la energía de formación de los cationes y aniones radicales mediante los potenciales de oxidación y reducción respectivamente y por otro lado analizar la estabilidad de los iones radicales formados analizado la reversibilidad del proceso electroquímico en cuestión.

Como se mencionó anteriormente, todos los colorantes estudiados son derivados de la molécula PM 567 (**Figura 21** y **22**), cuya estructura molecular muestra todas las posiciones del núcleo central sustituidas por grupos alquilos. El proceso de oxidación y reducción de esta molécula presenta un comportamiento Nernstiano de un electrón con la formación de iones radicales estables.⁶⁵ Además, en todos los colorantes estudiados, se observó una relación lineal entre la corriente de pico (i_p) y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (ν) . Esto indica que todos los procesos electroquímicos, ya sea de oxidación o

reducción, se controlan por la difusión de los colorantes desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo.⁶⁸

La reversibilidad electroquímica de centros BODIPY depende del tipo de grupos sustituyentes.^{40,44-47,65} Se ha observado que la ausencia de sustitución en las posiciones 1, 2, 3, 5, 6 o 7 (**Figura 21**) causa inestabilidad del catión radical producido durante el proceso de oxidación, mientras que la ausencia de sustitución en la posición 8 causa inestabilidad del anión radical producido durante el proceso de reducción. Estas observaciones se corresponden con la distribución de densidades electrónicas en el núcleo BODIPY.⁶⁵ Por consiguiente, los cationes y aniones radicales derivados del PM 567 son estables, la presencia de grupos sustituyentes en todas las posiciones del centro redox estabilizan los iones radicales impidiendo la formación de dímeros y el ataque de especies nucleofílicas y electrofílicas.

Basado en lo descripto anteriormente, por tratarse de centros BODIPY completamente sustituidos, se espera los iones radicales formados a partir de los colorantes bajo análisis en este estudio sean estables. Sin embargo, los grupos funcionales que sustituyen al núcleo BODIPY pueden afectar sus características electroquímicas. Por lo tanto, se debe considerar que las características electroquímicas propias del grupo sustituyente ubicado en la posición 8 puede alterar la estabilidad de los aniones radicales como consecuencia de reacciones inherentes al mismo. Adicionalmente, se presupone que el carácter donor-aceptor de electrones del grupo sustituyente en la posición 8 afecte sensiblemente la energía de formación del anión radical.

Las **Figura 27-28** muestran los voltamperogramas cíclicos (VCs) para el conjunto de colorantes estudiados (con la estructura molecular de cada colorante inserta), mientras que los parámetros electroquímicos obtenidos a partir de ellos se resumen en la **Tabla 3**.

Al igual que ha sido reportado para otras moléculas que contienen centros BODIPY sustituidos, los VCs muestran que todos los colorantes analizados presentan un proceso de oxidación y reducción monoelectrónico.^{40,65} La serie de colorantes bajo estudio (**Figura** 21), al igual que el compuesto modelo PM 567, poseen todas las posiciones del núcleo

BODIPY bloqueadas. Mientras que en la posición 8 se varía sistemáticamente la capacidad donora y aceptora del grupo sustituyente, las posiciones 1, 2, 3, 5, 6 y 7 permanecen fijas encontrándose sustituidas por grupos alquilos. Específicamente grupos metilos (--CH₃) en las posiciones 1, 3, 5 y 7 y grupos etilos ($-CH_2CH_3$) en las posiciones 2 y 6. Desde este punto de vista se espera la formación de cationes radicales estables durante el proceso de oxidación. En efecto, se puede observar que los procesos de oxidación son en todos los casos electroquímicamente reversibles, indicando que el sustituyente en la posición 8 –sin importar su naturaleza– no afecta la estabilidad del catión radical formado, descartando así la posible oxidación de los grupos sustituyentes empleado en el estudio. Por lo tanto, en la totalidad de los colorantes bajo análisis se puede asignar el proceso de oxidación al núcleo BODIPY.

El carácter aceptor de los grupos sustituyente en la posición 8, al igual de lo que se mostró en las propiedades fotofísicas, también produce un aumento en la energía necesaria para la formación del catión radical o incremento en el potencial de oxidación comprado con el compuesto de referencia PM 567. Por ejemplo, si se analiza la serie P1Ac, P3MA, P5Ac y P10Ac puede observarse que la capacidad aceptora de electrones de los grupos acetiloxi causa un aumento en el potencial de oxidación al cual los colorantes forman el catión radical (**Figura 26**). Asimismo, se advierte que mientras menor es el número de unidades metilenos que separa el centro BODIPY del grupo acetiloxi –P1Ac (1,12 V), P3MA (1,075 V), P5Ac (1,09 V), P10Ac (1,05 V) y PM 567 (1,02 V)– mayor es el potencial de oxidación del colorante.

La pequeña alteración en la tendencia en el caso del colorante P3MA puede deberse a la presencia del doble enlace contiguo al carbonilo, el cual reduce levemente su capacidad aceptora de electrones como es característico en los compuestos carbonílicos α, β -no saturados. Estas observaciones, en conjunto con los datos fostofísicos, refuerzan la idea de que el grupo acetiloxi unido por cadenas alifáticas –no conjugado electrónicamente– con el centro BODIPY en la posición 8, actúa como un atractor de electrones por efecto inductivo. Un efecto similar se observa al comparar el conjunto de moléculas denominadas como PnAc con los colorantes que contienen el grupo acetiloxi unido mediante una cadena

alifática a un grupo fenilo en la posición 8 del centro BODYPY –P1Ar1Ac (1,3 V) y P1Ar3Ac (1,22 V).

Por otra parte, se estudió como se afecta la estabilidad de los aniones radicales con la variación del grupo sustituyente en la posición 8. A diferencia de lo observado para el proceso de oxidación, cuando se analiza el proceso de reducción se observa que la respuesta catódica es sensible a la naturaleza del sustituyente ubicado en la posición 8 (Figura 26-28 y Tabla 3). Lo primero que se observa, es que en general los compuestos más fáciles de reducir -P1OH (-0,89 V) y P1Ac (-0,99V)- comparados con el compuesto modelo PM 567(-1,29 V), son los mismos que presentan los mayores corrimientos hacia menor energía de los máximo de absorción y fluorescencia. Estos resultados refuerzan la idea basada en que la presencia de grupos atractores de electrones no conjugados con el anillo central del colorante BODIPY, atraen electrones por efecto puramente inductivo lo cual se refleja en que el grupo HO-, con mayor poder atractor que el grupo CH₃-C(=O)-O-, posee un menor potencial de reducción. Esta misma tendencia, y en consonancia con los datos espectroscópicos, se observa al analizar de manera general la serie de colorantes sustituidos por grupos acetiloxi: P1Ac, P3MA, P5Ac y P10Ac. En la serie PnAc (Figura 26) el potencial de reducción aumenta a medida que se incrementa el número de metilenos que separa el grupo éster del anillo BODIPY. De la misma manera que fue descripta para el proceso de oxidación, la pequeña alteración en la tendencia para el caso del colorante P3MA puede deberse a la presencia del doble enlace contiguo al carbonilo, el cual reduce levemente su capacidad aceptora de electrones.

Finalmente, el efecto inductivo se hace también evidente al analizar la serie P1Ar_n. En todos los casos los potenciales de reducción –en el intervalo que se extiende desde -0,995 a -1,19 V– son más bajos que el del compuesto modelo PM 567 (-1,29 V). El comportamiento electroquímico de la totalidad de colorantes analizados esta en completa concordancia con los datos espectroscópicos analizados en la sección anterior. En todos los casos se observa una disminución del potencial de reducción a medida que la atracción de electrones por efecto inductivo se hace mayor.



Figura 26. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN con 0,1 M TBAPF₆ como electrolito soporte a $0,2V \text{ s}^{-1}$.



Figura 27. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN con 0,1 M TBAPF₆ como electrolito soporte a $0,2V \text{ s}^{-1}$.

A continuación se discuten brevemente los posibles mecanismos involucrados en la reducción de los colorantes bajo estudio teniendo en cuenta la electroquímica de los grupos funcionales sustituyentes. Por ejemplo, los colorantes P2CO₂H, P1OH y P1Ar1Cl presentaron procesos de reducción irreversibles, sugiriendo que la presencia de ácidos carboxílicos, alcoholes alifáticos y halogenuros de bencilo provocan cierta inestabilidad en los aniones radicales formados durante el proceso de reducción. Por consiguiente, el comportamiento electroquímico observado para colorantes con este tipo de grupos

sustituyentes en la posición 8 del anillo BODIPY, los excluye como posibles candidatos para ser utilizados en la generación de ECL.

En particular, se conoce de literatura que la reducción electroquímica del grupo carbonilo cuando se encuentra como sustituyente en moléculas orgánicas aromáticas o alifáticas, puede generar varios productos según las condiciones de reacción.⁶⁸ En el presente estudio, el mecanismo más probable involucra la deprotonación del ácido con la consecuente reducción de los protones provenientes del ácido para dar hidrogeno gaseoso y el correspondiente anión carboxilato.⁶⁸ Por ejemplo, el ácido acético en solución de ACN y 0,1 M TEAP muestra un pico de reducción irreversible a -2 V vs. ECS.⁶⁸ Luego, la electrólisis a potencial controlado a -2,3 V demuestra que el proceso electroquímico involucrado es la reducción de los protones provenientes del ácido mediante la observación del desprendimiento de hidrogeno gaseoso en el cátodo (**Esquema 15**). Sin embargo, no se observa un segundo pico en la ventana electroquímica del solvente, indicando que los aniones carboxilatos (-COO⁻) que quedan después de la reducción del protón son muy difíciles de reducir.⁶⁸

$$RCO_2H \xrightarrow{le} RCO_2 + 1/2H_2$$

Esquema 15. Reacción heterogénea para la reducción catódica de ácidos carboxílicos en solventes orgánicos.

De similar manera, en los alcoholes la ruptura del enlace C-O mediante la transferencia de electrones desde un cátodo es muy difícil, debido a que el potencial de reducción de dicho enlace es extremadamente negativo para la ventana electroquímica accesible de la mayoría de los solventes orgánicos.⁶⁸ El mecanismo de reducción del compuesto P1OH resulta así difícil de establecer, sobre todo si se tiene en cuenta que se trata de dos ondas de reducción. La elucidación del mecanismo operativo requiere de un estudio más detallado que, por tratarse de una reducción donde el producto de reacción no es un radical estable y por tanto no es de utilidad para fines de ECL, se encuentra fuera del interés en esta Tesis.

Por su parte, el colorante láser P1Ar1Cl presenta un pico de reducción irreversible según se muestra en la **Figura 27**. En este caso, el grupo sustituyente ubicado en la posición 8 del núcleo PM 567 es un halogenuro de bencilo, específicamente cloruro de bencilo. Soho y sus colaboradores sugirieron que el cloruro de bencilo se reduce mediante una transferencia electrónica irreversible de dos electrones para producir el carbanión correspondiente, el cual queda susceptible al ataque nuclefílico de especies activas en solución (**Esquema 16**).

$$C_6H_5CH_2Cl + 2e^- \rightarrow C_6H_5CH_2^- + Cl^-$$

Esquema 16. Reacción heterogénea para la reducción catódica de cloruro de bencilo en solventes orgánicos.

Con respecto al grupo de colorantes que posee una funcionalidad éster separada de la posición 8 del núcleo BODIPY por una cadena saturada: P1Ac, P3MA, P5Ac y P10Ac se observa que la respuesta catódica es diferente (**Figura 26**). En estos casos, se encuentra que la reducción electroquímica es reversible. La reversibilidad para el proceso de reducción, sumado a la ya descripta para el proceso de oxidación del colorante, indica cierta estabilidad de los radicales electrogenerados, lo cual los convierte en potenciales candidatos para la generación de fenómenos de ECL. En lo que respecta a la reducción electroquímica de moléculas que tienen un grupo éster –P1Ac, P3MA, P5Ac, P10Ac, P1Ar1Ac y P1Ar3Ac– en condiciones apróticas, en general proceden vía la producción del anión radical en un intervalo de potenciales comprendido entre -0,95 y -1,25 V (**Esquema 17**) el cual dependiendo de la estabilidad, puede ser oxidado dando como resultado una onda reversible o bien sufrir alguna reacción posterior como puede ser la ruptura para dar el anión y radical alquilo correspondiente.⁶⁸

$$RCO_2R' \xleftarrow{le}{} RCO_2R^{\bullet}$$

Esquema 17. Reacción heterogénea para la reducción catódica de ésteres en solventes orgánicos.

Finalmente se analiza la reducción electroquímica del grupo de moléculas que tiene la posición 8 del núcleo BODIPY ocupada por un grupo *p*-fenilo (**Figura 28**). En este caso se observan respuestas reversibles para el P1Ar1Ac, con alguna complicación que involucra al anión radical lo cual no es deseado desde el punto de vista de la generación de fenómenos electroquimioluminiscentes y como también ocurre para el P1Ar3Br y el P1Ar3Ac. El colorante P1Ar1C1 presenta un proceso de reducción irreversible como se describió previamente para la **Figura 27**.



Figura 28. Voltamperogramas cíclicos de una solución 1 mM de cada colorante en ACN con 0,1 M TBAPF₆ como electrolito soporte a $0.2V \text{ s}^{-1}$.

	E ^{Red}	E ^{0x} _{1/2}	
Colorantes	(V vs. Ag/AgCl)	(V vs. Ag/AgCl)	ΔE^{3}
P1Ac	-0.991	1.12 ¹	2.11
P3MA	-1.225 ¹	1.075 ¹	2.30
P5Ac	- 1.21 ¹	1.091	2.30
P10Ac	-1.26 ¹	1.051	2.31
PIOH	-0.89 ² y -1.59 ²	1.25 ²	
P2CO ₂ H	-1.26^{2}	1.15 ²	
PIArICI	-1.19 ²	1.03 ²	
P1Ar3Br	-1.131	1.15 ¹	2.28
P1Ar3Ac	-1,05 ¹	1,221	2,27
P1Ar1Ac	-0,955 ¹	1,3 ¹	2,25
PM 567 ⁴	-1,29	1,02	2,31

Tabla 3. Propiedades electroquímicas

Proceso reversible, potencial formal.

²Proceso con complicaciones cinéticas homogéneas, potencial de pico.

Todos los potenciales (V) medidos están referidos a un electrodo de referencia: Ag/AgCl.

 ${}^{3}\Delta E = E_{Red} - E_{Ox}$ en valor absoluto.

⁴Datos electroquímicos obtenidos de bibliografía.⁴⁰

Otro de los parámetros de interés en experimentos de ECL es la diferencia entre el potencial o energía del primer pico de oxidación y el primer pico de reducción (ΔE). Para los colorantes estudiados el ΔE varía aproximadamente desde 2,11 hasta 2,31 V. Según se muestra en la **Tabla 3**, el valor de ΔE varía de acuerdo al sustituyente ubicado en la posición 8 del núcleo BODIPY, esto posiblemente implique efectos sobre las propiedades ECL. En este sentido, si se analiza la familia de colorantes sustituidos por grupos del tipo alquil éster –P1Ac (2,11), P3MA (2,30), P5Ac (2,30), P10Ac (2,31)– y se los compara con


COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF2-DIPIRROMETENOS

el compuesto de referencia PM 567 (2,31), se puede decir que el efecto sobre el ΔE se hace evidente solo cuando el grupo –en este caso atractor de electrones– se encuentra muy cerca del anillo BODIPY. Esto está razonablemente de acuerdo con los parámetros espectroscópicos (**Tabla 2**).

6.4. Caracterización electroquimioluminiscente

Como ya ha sido mencionado previamente, una estructura molecular con potencial de generar ECL debe ser capaz de formar especies cargadas estables que permitan un proceso de aniquilación con una energética que sea suficiente para formar estados excitados con capacidad de emitir luz. Teniendo en cuenta esta definición, se puede predecir que todos los colorantes derivados del núcleo BODIPY han mostrado capacidad de emisión de luz. Sin embargo, como se mencionó en la sección de estudios electroquímicos, los colorantes: P1OH, P2CO₂H y P1Ar1Cl muestran un proceso de reducción irreversible. Esto indica que el anión radical formado puede sufrir alguna reacción homogénea y por lo tanto, no vivir lo suficientemente en el tiempo para encontrarse con el catión radical y producir el estado excitado necesario para producir el fenómeno ECL. En concordancia con estas observaciones, cuando se realizaron experimentos de ECL con estos colorantes en ausencia de coreactante no fue posible detectar señal.

Por otra parte, los colorantes: P1Ac, P5Ac, P3MA y P1Ar1Ac poseen las características fotoquímicas necesarias para producir ECL. Además, como se señaló en los fundamentos teóricos de la ECL (Capítulo 3), a partir del cálculo de la magnitud de la entalpía de la reacción de aniquilación de iones, ΔH_{ann} , (ec. 1 en Capítulo 3) se puede evaluar si el proceso de aniquilación de iones es energéticamente suficiente para producir ECL. En las **Tabla 2** y **3** se observa que los valores de ΔE son muy cercanos a los valores de energía del primer estado singlete excitado (E_{0-0}), lo cual predice que la formación directa del estado excitado es un proceso energéticamente deficiente. Es decir, la entalpía (ΔH_{ann}) calculada es menor que la energía (E_s) requerida para formar el estado excitado singlete de más baja energía. Por lo tanto, los colorantes: P1Ac, P5Ac, P3MA y P1Ar1Ac

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF₂-DIPIRROMETENOS

tienen el potencial de producir ECL a través de un mecanismo de aniquilación singletesinglete (ruta-S) y triplete-triplete (ruta-T).^{44-47,65,69}

Para probar experimentalmente la capacidad de generación de ECL en las moléculas: P1Ac, P5Ac, P3MA y P1Ar1Acse obtuvieron los correspondientes espectros de ECL. Para ello se aplicaron sucesivos pulsos de potencial (ancho de pulso de 0,2 s) entre los correspondientes $E_{1/2}$ de oxidación y reducción (**Tabla 3**) en soluciones aproximadamente 1 mM de P1Ac, P5Ac, P3MA y P1Ar1Ac en ACN con 0,1 M de TBAPF₆, como electrolito soporte. La obtención de los espectros (**Figura 29**) demuestra la capacidad ECL de los sistemas estudiados. Con el objetivo de facilitar el análisis en estas figuras se muestran también los espectros de absorción y fluorescencia de cada colorante.

En general, se observó que los espectros de ECL no son simétricos, estos muestran una cola que se extiende hacia longitudes de onda más grandes y los máximo de ECL se encuentran desplazados hacia longitudes de onda más largas (entre 10 y 20 nm) con respecto al máximo de fluorescencia correspondiente a cada colorante (**Tabla 2**). Este es un comportamiento típico en señales de ECL producidas por sistemas orgánicos, cuyo origen está en la naturaleza del mecanismo de generación de luz. Si se analiza el mecanismo de ECL en estos materiales, el paso anterior a la generación del estado excitado emisor de luz implica el choque de dos especies cargadas opuestamente, es común que las fuertes interacciones electrostáticas propicien la formación de excímeros y exciplejos que emiten a menor energía.¹² Además, estos colorantes presentan un corrimiento de Stockes muy pequeño, lo cual produce un efecto de filtro interno como resultado de las altas concentraciones del colorante necesarias para obtener las medidas de ECL. Según se detalla en la **Tabla 2**, el máximo de ECL para el colorante P1Ac se encuentra desplazado batocrómicamente respecto del PM 567 aproximadamente en 20 nm.

118





Figura 29. Espectros de absorción (—), fluorescencia (---) y de ECL (•••) en solución 1 mM de cada colorantes en ACN con 0,1 M TBAHF₆ como electrolito soporte. La amplitud de cada pulso de potencial fue de 0,2 segundos.

Por otra parte, en las moléculas P5Ac, P3MA y P1Ar1Ac el desplazamiento a menores energías en los máximos se hace más débil a medida que la longitud de la cadena carbonada aumenta. Sin embargo, si en un análisis más fino comparamos los corrimientos de los máximos de fluorescencia y de ECL de P5Ac, P3MA y P1Ar1Ac de con respecto a PM 567 so observa un mayor corrimiento hipsocrómico del máximo de ECL a medida que el sustituyente en posición 8 es más voluminoso. Por ejemplo, para P1Ac el corrimiento hacia el rojo del máximo de fluorescencia con respecto a PM 567 es de 22 nm y el corrimiento en el máximo de ECL es de 21 nm; mientras que en P5Ac el corrimiento de fluorescencia es de 2 nm hacia el azul y el corrimiento del máximo de ECL es de 17 nm.

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF2-DIPIRROMETENOS

Estas observaciones podrían indicar que el sustituyente ejerce un efecto sobre la señal ECL distinto que al que ejerce sobre la fluorescencia. Una posibilidad es que el comportamiento esté asociado a un efecto estérico que impide la formación de excimeros y exciplejos. Sin embargo, para probar más fehacientemente esta hipótesis estudios más excautivos, fuera del alcance de esta Tesis, deberían realizarse en una nueva serie de moléculas diseñadas para este fin.



Figura 30. Respuesta cronoamperométrica y de ECL luego de sucesivos pulsos de potencial para una solución 1 mM de P10AC en ACN con 0,1 M TBAPF₆ como electrolito soporte. Electrodo de trabajo: Pt (A=0,0766 cm2). (Amplitud del pulso de potencial: 0,2 segundos y 3 segundos entre cada par de pulsos sucesivos).

Por otra parte, se determinó la eficiencia de ECL (Φ) para los colorantes con capacidad de generación de ECL relativa a rubreno y Ru(bpy)₃²⁺, dos sistemas estándares de eficiencia conocida.¹² Para ello, se comparó el número de fotones emitidos con la carga eléctrica involucrada en la reacción ion-aniquilación según las **ecuaciones 4** y **5** detalladas

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF2-DIPIRROMETENOS

en el Capítulo 5. En la Figura 30 se puede visualizar una señal típica de ECL en función del tiempo con sus correspondientes saltos de corriente, para uno de los colorantes estudiados.

Finalmente, hay que puntualizar que los rendimientos cuánticos obtenidos son del orden esperado para este tipo de sistemas que producen ECL por medio de un mecanismo mixto de aniquilación singlete-singlete y triplete-triplete.^{12,40,44,46,47,65}

6.5. Conclusiones específicas

Se estudiaron las propiedades electroquímicas, fotofísicas y de ECL de diez nuevos derivados del colorante comercial PM 567con diferentes grupos sustituyente ubicado en la posición 8 del núcleo BODIPY. En general, se cambió la capacidad donora-aceptora de electrones del grupo sustituyente y se varió el largo y conjugación del espaciador –cadena alquílica o grupo *p*-fenilo– que lo separa del anillo central. Los estudios demostraron que las propiedades optoelectrónicas están influenciadas por la naturaleza de los sustituyentes en el anillo central. Los estudios fotofísicos mostraron que todos los colorantes son altamente fluorescentes. No obstante, los estudios electroquímicos revelaron que no todas las especies cargadas, producto de la oxidación-reducción, poseen la estabilidad necesaria para la generación de ECL.

Los colorantes P2CO₂H, P1OH y P1Ar1Cl presentaron procesos de reducción irreversibles, sugiriendo que la presencia de ácidos carboxílicos, alcoholes alifáticos y halogenuros de bencilo provocan cierta inestabilidad en los aniones radicales formados durante el proceso de reducción. Por consiguiente, el comportamiento electroquímico observado para colorantes con este tipo de grupos sustituyentes en la posición 8 del anillo BODIPY, los excluye como posibles candidatos para ser utilizados en la generación de ECL. Por otra parte, se evaluó la factibilidad energética de producir ECL a través del análisis y comparación del parámetro ΔE con la energía primer estado singlete excitado. Para los colorantes estudiados el valor de ΔE varía aproximadamente desde 2,11 hasta 2,31 V dependiendo del sustituyente ubicado en la posición 8 del núcleo BODIPY. Se pudo concluir que el efecto sobre el ΔE se hace evidente solo cuando el grupo sustituyente, atractor de electrones, se encuentra muy cerca del anillo BODIPY.

Por último, se demostró la capacidad ECL para los colorantes que poseían las propiedades adecuadas. Se obtuvo, un espectro de ECL de todos los sistemas y se relacionó con estructura de los colorantes BODIPY. Se propuso que el sustituyente en posición 8 ejerce un efecto sobre la señal ECL distinto que al que ejerce sobre la fluorescencia. Una

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF2-DIPIRROMETENOS

posibilidad es que el comportamiento esté asociado a un efecto estérico que impide la formación de excimeros y exciplejos.

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF2-DIPIRROMETENOS

Referencias

(1) Lo, S.-C.; Burn, P. L. Chemical Reviews 2007, 107, 1097.

(2) Hwang, S.-H.; Moorefield, C. N.; Newkome, G. R. Chemical Society Reviews 2008, 37, 2543.

(3) Mitschke, U.; Bauerle, P. Journal of Materials Chemistry 2000, 10, 1471.

(4) Xu, H.; Chen, R.; Sun, Q.; Lai, W.; Su, Q.; Huang, W.; Liu, X. Chemical Society Reviews 2014, 43, 3259.

(5) Li, J.; Liu, D. Journal of Materials Chemistry 2009, 19, 7584.

(6) Farinola, G. M.; Ragni, R. Chemical Society Reviews 2011, 40, 3467.

(7) Li, D.; Zhang, H.; Wang, Y. Chemical Society Reviews 2013, 42, 8416.

(8) Forster, R. J.; Bertoncello, P.; Keyes, T. E. Annu Rev Anal Chem 2009, 2, 359.

(9) Gerardi, R. D.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W. Analytica Chimica Acta 1999, 378, 1.

(10) Knight, A. W. TrAC Trends in Analytical Chemistry 1999, 18, 47.

(11) Fähnrich, K. A.; Pravda, M.; Guilbault, G. G. Talanta 2001, 54, 531.

(12) Bard, A. J. In *Electrogenerated Chemiluminescence*; Marcel Dekker: New York, **2004**.

(13) Parveen, S. In Protocols and Applications; Springer, 2013.

(14) Zhang, C.; Zhou, G.; Zhang, Z.; Aizawa, M. Analytica Chimica Acta 1999, 394, 165.

(15) Spehar-Deleze, A.-M.; Suomi, J.; Jiang, Q.; de Rooij, N.; Koudelka-Hep, M.; Kulmala, S. *Electrochimica Acta* **2006**, *51*, 5438.

(16) Park, S. M.; Bard, A. J. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 1977, 77, 137.

(17) Treibs, A. Ann. Chem. 1968, 718.

(18) Loudet, A.; Burgess, K. Chemical Reviews 2007, 107, 4891.

(19) Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A. New Journal of Chemistry 2007, 31, 496.

(20) Benniston, A. C.; Copley, G. Physical Chemistry Chemical Physics 2009, 11, 4124.

(21) Pavlopoulos, T. G.; Shah, M.; Boyer, J. H. Appl. Opt. 1988, 27, 4998.

(22) Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.-L.; Wolford, L. T.; Boyer, J. H.; Politzer, I. R.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chemistry* **1990**, *1*, 389.

(23) Pavlopoulos, T. G.; Boyer, J. H.; Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.-L. Appl. Opt. 1990, 29, 3885.

(24) Boyer, J. H.; Haag, A. M.; Sathyamoorthi, G.; Soong, M.-L.; Thangaraj, K.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroatom Chemistry* **1993**, *4*, 39.

(25) López Arbeloa, F.; López Arbeloa, T.; López Arbeloa, I.; H. S. Nalwa (Academic Press, S. D., 2001), Ed. 2001.

(26) Gomez-Duran, C. F. A.; Garcia-Moreno, I.; Costela, A.; Martin, V.; Sastre, R.; Banuelos, J.; Lopez Arbeloa, F.; Lopez Arbeloa, I.; Pena-Cabrera, E. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 5103.

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF₂-DIPIRROMETENOS

(27) Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. Angewandte Chemie International Edition 2008, 47, 1184.

(28) Leonardi, M. J.; Topka, M. R.; Dinolfo, P. H. Inorganic Chemistry 2012, 51, 13114.

(29) Rosenthal, J.; Lippard, S. J. Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 5536.

(30) Royzen, M.; Wilson, J. J.; Lippard, S. J. Journal of Inorganic Biochemistry **2013**, 118, 162.

(31) Khatchadourian, A.; Krumova, K.; Boridy, S.; Ngo, A. T.; Maysinger, D.; Cosa, G. *Biochemistry* **2009**, *48*, 5658.

(32) Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Daub, J. Angewandte Chemie International Edition 2001, 40, 385.

(33) Kennedy, D. P.; Kormos, C. M.; Burdette, S. C. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 8578.

(34) Kamiya, M.; Johnsson, K. Analytical Chemistry 2010, 82, 6472.

(35) Ojida, A.; Sakamoto, T.; Inoue, M.-a.; Fujishima, S.-h.; Lippens, G.; Hamachi, I. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 6543.

(36) Zhang, X.; Xiao, Y.; Qian, X. Angewandte Chemie International Edition 2008, 47, 8025.

(37) Cheng, T.; Xu, Y.; Zhang, S.; Zhu, W.; Qian, X.; Duan, L. Journal of the American Chemical Society 2008, 130, 16160.

(38) Huh, J. O.; Do, Y.; Lee, M. H. Organometallics 2008, 27, 1022.

(39) Bañuelos, J.; Lopez Arbeloa, F.; Arbeloa, T.; Martinez, V.; López Arbeloa, I.; Applied Science Innovations Pvt. Ltd.: 2012.

(40) Lai, R. Y.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry B 2003, 107, 5036.

(41) Burghart, A.; Kim, H.; Welch, M. B.; Thoresen, L. H.; Reibenspies, J.; Burgess, K.; Bergström, F.; Johansson, L. B. Å. *The Journal of Organic Chemistry* 1999, 64, 7813.

(42) Beer, G.; Niederalt, C.; Grimme, S.; Daub, J. Angewandte Chemie International Edition 2000, 39, 3252.

(43) Sartin, M. M.; Camerel, F.; Ziessel, R.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry C 2008, 112, 10833.

(44) Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Krüger, R.; Bard, A. J. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 14453.

(45) Nepomnyashchii, A. B.; Cho, S.; Rossky, P. J.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 17550.

(46) Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society2011, 133, 8633.

(47) Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Bard, A. J. Journal of the American Chemical Society 2011, 133, 19498.

(48) Rosenthal, J.; Nepomnyashchii, A. B.; Kozhukh, J.; Bard, A. J.; Lippard, S. J. The Journal of Physical Chemistry C 2011, 115, 17993.

(49) Suk, J.; Omer, K. M.; Bura, T.; Ziessel, R.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry C 2011, 115, 15361.

COLORANTES LÁSERES ORGÁNICOS: BF₂-DIPIRROMETENOS

(50) Gresser, R.; Hummert, M.; Hartmann, H.; Leo, K.; Riede, M. Chemistry – A European Journal 2011, 17, 2939.

(51) Kollmannsberger, M.; Gareis, T.; Heinl, S.; Daub, J.; Breu, J. Angewandte Chemie International Edition in English 1997, 36, 1333.

(52) Chen, J.; Burghart, A.; Derecskei-Kovacs, A.; Burgess, K. The Journal of Organic Chemistry 2000, 65, 2900.

(53) Goze, C.; Ulrich, G.; Mallon, L. J.; Allen, B. D.; Harriman, A.; Ziessel, R. Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 10231.

(54) Krumova, K.; Cosa, G. Journal of the American Chemical Society 2010, 132, 17560.

(55) Benniston, A. C.; Copley, G.; Harriman, A.; Howgego, D.; Harrington, R. W.; Clegg, W. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 2018.

(56) Miomandre, F.; Lépicier, E.; Munteanu, S.; Galangau, O.; Audibert, J. F.; Méallet-Renault, R.; Audebert, P.; Pansu, R. B. ACS Applied Materials & Interfaces 2011, 3, 690.

(57) Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D. *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*; Molecular Probes, **2005**.

(58) Rahn, M. D.; King, T. A. Appl Opt 1995, doi, 10.

(59) Dubois, A.; Canva, M.; Brun, A.; Chaput, F.; Boilot, J.-P. Appl. Opt. 1996, 35, 3193.

(60) Yariv, E.; Schultheiss, S.; Saraidarov, T.; Reisfeld, R. Optical Materials 2001, 16, 29.

(61) Mohammad, A.; Terence, A. K.; Do-Kyeong, K.; Byung Heon, C.; Jongmin, L. Journal of Physics D: Applied Physics 2002, 35, 1473.

(62) Costela, A.; Garcia-Moreno, I.; Sastre, R. Physical Chemistry Chemical Physics 2003, 5, 4745.

(63) Lammi, R. K.; Ambroise, A.; Balasubramanian, T.; Wagner, R. W.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 7579.

(64) Costela, A.; García-Moreno, I.; Gomez, C.; Sastre, R.; Amat-Guerri, F.; Liras, M.; López Arbeloa, F.; Bañuelos Prieto, J.; López Arbeloa, I. *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 7736.

(65) Nepomnyashchii, A. B.; Bard, A. J. Accounts of Chemical Research 2012, 45, 1844.

(66) López Arbeloa, F.; Bañuelos Prieto, J.; López Arbeloa, I.; Costela, A.; García-Moreno, I.; Gómez, C.; Amat-Guerri, F.; Liras, M.; Sastre, R. *Photochemistry and Photobiology* **2003**, *78*, 30.

(67) Prieto, J. B.; Arbeloa, F. L.; Marti; amp; x; nez, V. M.; nez; López, T. A.; Amat-Guerri, F.; Liras, M.; Arbeloa, I. L. Chemical Physics Letters 2004, 385, 29.

(68) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; John Wiley & Sons, Inc.: United States of America, 2001.

(69) Fungo, F.; Wong, K.-T.; Ku, S.-Y.; Hung, Y.-Y.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry B 2005, 109, 3984.

CAPÍTULO 7

NANOPARTÍCULAS DE CARBONO

127

7.1. Estado del conocimiento

La reciente síntesis de nanopartículas fluorescentes formadas exclusivamente por carbono se presenta como una oportunidad más que interesante para disponer de nuevos materiales con distintas aplicaciones.¹⁻¹⁸ Actualmente, la mayoría de los sistemas nanométricos utilizados en aplicaciones electroquimioluminiscentes son derivados de metales preciosos costosos y/o elementos tóxicos.¹⁹⁻²¹ Resulta así que los nanomateriales carbonosos se muestran como una alternativa viable por varias razones: fáciles de sintetizar, económicos, amigables con el ambiente, características fisicoquímicas únicas, buena compatibilidad y baja toxicidad en organismos vivos.^{18,22-24} Estas características han despertado gran interés en las siguientes áreas: biomedicina especialmente en el uso para imágenes celulares (bioimágenes),^{12,25-31} bioanálitica,³²⁻³⁴ conversión de energía,³⁵ fotocatálisis^{1,36,37} y optoelectrónica.^{38,39} Este interés en aplicaciones concretas ha llevado a que en los últimos años haya crecido notablemente el interés de explorar nuevos métodos de síntesis y estudiar sus propiedades.

En la actualidad existen numerosos procedimientos experimentales relativamente simples que permiten obtener nanopartículas de carbono (CNPs) con una amplia variedad de características, tales como: solubilidad en medios acuosos u orgánicos, distintos tamaños y formas, diferentes grupos funcionales superficiales y capacidad de sintonizar las propiedades optoelectrónicas en la región visible del espectro electromagnético.¹⁻¹⁸ Las nanopartículas estudiadas en este trabajo de Tesis, al igual que la mayoría que han sido reportadas en la literatura, muestran ciertas características comunes y un comportamiento optoelectrónico bastante particular y diferente al resto de las nanopartículas conocidas.¹⁸ Por ejemplo:

- Poseen absorción en la región ultravioleta-visible que se extiende hasta la región visible.
- Su máximo de emisión como su intensidad dependen fuertemente de la energía del haz de excitación.

- Son electroquímicamente activas, mostrando capacidades aceptoras y donoras de electrones.
- Son electroquimioluminiscentes.

El carbono al igual que otros elementos como oxígeno, fósforo, nitrógeno, selenio, boro, germanio, entre otros, tiene la capacidad de formar varios alótropos con diferentes propiedades fisicoquímicas.^{40,41} Algunos de estos estados alotrópicos, muestran en su estructura química una única hibridización. Por ejemplo, el diamante presenta una hibridización sp^3 con un salto o brecha de energía (*band gap*) de 5,5 eV que lo convierte en un excelenteaislante. El grafito, está hibridizado sp^2 (en un único plano), posee un band gap nulo y se comporta como un material semiconductor.⁴⁰ Existen también alótropos, como el carbono amorfo, que no tienen una estructura cristalina determinada, cuyos átomos no se encuentran uniformemente hibridizados y posee un band gap controlado por la distribución de pequeños dominios o clústeres con dobles enlaces -C=C- conjugados inmersos en una matriz de carbono saturado.⁴¹

En la literatura se puede encontrar numerosos trabajos científicos relacionados a la obtención y caracterización de las CNPs. Sin embargo, no existe una asociación clara entre las propiedades fisicoquímicas y las características estructurales y morfológicas de las CNPs. A pesar de ello, se encuentran reportadas varias razones que intentan explicar las características optoelectrónicas observadas experimentalmente, como ser: la selección óptica de nanopartículas con diferentes tamaños (efecto cuántico),¹⁸ la presencia de estados superficiales y defectos,⁴² la presencia de grupos superficiales,¹² la pasivación de la superficie,¹⁸ presencia de fluoróforos con distinto grado de conjugación π ,^{43,44} la recombinación de pares hueco-electrón dentro de pequeños clústeres de carbono sp^2 embebidos dentro de una matriz sp^{345} y los sitios zigzag libres con estado fundamental triplete tipo carbeno.⁴⁶

Un reciente estudio ha propuesto que clústeres pequeños con pocos anillos aromáticos están inmersos en una matriz de carbono sp^3 y serían los responsables de las propiedades ópticas –muy similares a las observadas en CNPs– en el óxido de grafeno.⁴⁷

Otros estudios realizados en nanocintas de grafeno asocian este comportamiento a efectos de borde (bordes tipo zigzag o silla y bordes funcionalizados químicamente) y también, a puntos cuánticos activos con comportamiento tipo semiconductor inducido por el confinamiento cuántico.^{45,48}

En consecuencia, todos estos antecedentes dan cuenta de la complejidad del sistema a estudiar. Para abordar su estudio, se sintetizaron CNPs a partir de precursores moleculares empleando uno de los métodos más utilizados^{49,50} y poniendo especial énfasis en el método de purificación. Mediante el método de purificación, basado en una cromatografia en columna con sílica gel, se pretende separar las CNPs por polaridad de sus grupos superficiales. Entonces, teniendo en cuenta que la fase estacionaria –sílica gel– es altamente polar, se presupone que si se utiliza durante la elución una fase móvil con un gradiente de polaridad creciente, las fracciones menos polares o con menos grupos superficiales serán eluídas primero. Por otra parte, las CNPs con mayor proporción de grupos superficiales – mayor polaridad superficial– quedaran más retenidas en la fase estacionaria y serán eluídas en la parte final de la cromatografía, cuando la fase móvil sea lo suficientemente polar. De esta manera, los resultados obtenidos podrían relacionarse adecuadamente con las características químicas superficiales de las CNPs.

La purificación de las CNPs llevó a la obtención de cinco fracciones distintas de nanopartículas. El análisis morfológico, electroquímico, fotofísico Y electroquimioluminiscente arrojó como resultado una gran cantidad de información acerca del sistema sintetizado. Debido a la complejidad de dichos resultados se decidió acotar el estudio a la primera fracción, ya que de las cinco fracciones es la que presentaba menor cantidad de grupos funcionales en su superficie. Esta selección se realiza para evitar posibles contribuciones al comportamiento fisicoquímico de las CNPs desde la presencia de grupos superficiales oxigenados, que puedan presentar algún comportamiento fotofísico y/o electroquímico en particular. El estudio llevado a cabo consiste en la caracterización comportamiento electroquímico, estructural el análisis del fotofísico У V electroquimioluminiscente, para finalmente relacionar su estructura molecular con sus propiedades optoelectrónicas.

7.2. Síntesis de nanopartículas de carbono

Las CNPs estudiadas fueron sintetizadas por pirólisis a 300 °C en presencia de aire de la sal obtenida por reacción entre ácido cítrico y N-octadecilamina.^{44,50}. En el procedimiento de síntesis, primero se prepara el precursor por mezclado de 25 ml de una solución de ácido cítrico (4,8 mmoles) en etanol y 25 ml de otra solución conteniendo N-octadecilamina (5,6 mmoles). La mezcla formada se deja reaccionar bajo agitación por el lapso aproximado de 1 hora para formar citrato de octadecilamonio, un precipitado blanco que se separa y se realizan lavados sucesivos con etanol. Por último, la sal de amonio formada se calcina en presencia de aire a 300 °C durante 2 hs, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. El producto de calcinación fue solubilizado en acetona mediante la ayuda de ultrasonido durante 1 hora. El material carbonoso que permanece insoluble se separa por decantación y el sobrenadante, que contiene las CNPs, se seca en un rotavapor (**Esquema 18**).



N-octadecilamina

Esquema 18. Síntesis de la nanopartículas de carbono

El producto obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando como fase estacionaria sílica gel. La cromatografía se desarrolla empleando diclorometano (DCIMe) y se finaliza empleando un gradiente de solventes (DCIMe-Metanol). Durante el

proceso de purificación se identificaron 5 fracciones de CNPs (numeradas como fracción 1-5). Todas las fracciones presentaron fluorescencia al exponerse a radiación ultravioleta. Cabe mencionar, que las fracciones 1 y 2 fueron eluídas a través de la columna mediante la utilización de DClMe como fase móvil, mientras que las fracciones 3, 4 y 5 necesitaron el agregado creciente de metanol (MeOH 1-10 % V/V). La observación de distintas fracciones indica que el proceso de síntesis puede producir CNPs de distinto tamaño y/o diferentes características químicas en la superficie de la nanopartícula. A pesar de que las cinco fracciones contienen nanopartículas de carbono, se decidió acotar el estudio a la primera de ellasya que se pudo separar e identificar claramente a través de los repetidos ensayos de síntesis.

A fin de evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos y la estabilidad de las partículas a lo largo del tiempo se llevaron a cabo siete procedimientos de síntesis, cada una de ellas seguido de su respectivo protocolo de purificación. Al finalizar la obtención y purificación de las CNPs se procedió a su caracterización.

7.3. Caracterización de las Nanopartículas de Carbón

7.3.1. Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM)

Mediante la Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM) se pudo comprobar la obtención de nanopartículas de carbono (CNPs). En la Figura 31 se muestran las imágenes obtenidas por TEM para las CNPs de la primera fracción. La observación en alta resolución de nanopartículas individuales (HRTEM Figura 31c-e) revela que tienen una amplia distribución tanto en su forma como en su tamaño (en la Figura 32se muestran más imágenes HRTEM de las CNPs). El tamaño promedio fue menor que 50 nm. Una cuidadosa mirada de las imágenes obtenidas en alta resolución (HRTEM Figura 31c-e) permite observar que todas las CNPs están formadas por un el núcleo grafítico hueco rodeado por una capa amorfa.



Figura 31. Imágenes TEM representativas de las CNPs en baja (**a** y **b**) y alta resolución (HRTEM **c-e**). Las fotografías **c** y **d** muestran la distribución de forma y tamaño, mientras que las **d-e**revelan las variaciones para una misma morfología.

La naturaleza cristalina de las nanopartículas se analizó a través de cálculos locales de transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform, FFT*) revelando la falta de orden dentro de la cáscara amorfa y la apariencia de orden cristalino en el núcleo indicado por la presencia de reflexiones (**Figura 33**). El núcleo tiene una estructura hueca de grafito, que puede presentar cierto grado de desorden en el apilamiento. Su espesor varía incluso dentro de la misma nanopartícula, no siendo superior a 35 capas de carbono. El espaciado entre capas es de aproximadamente 3,5 Å, que es cercana a la de los planos (002) de grafito. Dentro de cada morfología se pueden encontrar variaciones, como se muestra en las **Figura 31** y **32**, donde se observan nanopartículas con forma poliédrica, tubos, cebolla, etc.



La capa externa amorfa imita aproximadamente la forma del corazón grafítico con un espesor local variable.



Figura 32. Imágenes HRTEM seleccionadas para mostrar la distribución de forma y tamaño de las CNPs y las variaciones para una misma morfología.



Figura 33. Imagen HRTEM para una CNP. Las fotografías insertadas muestran la densidad espectral en las zonas recuadradas en color blanco.

En general, las nanopartículas sintetizadas presentaron una morfología bastante similar a otros materiales carbonosos reportados en literatura y obtenidos a partir de métodos de síntesis sustancialmente diferentes.⁵¹⁻⁶¹ Por último, se realizaron varios intentos de conseguir una distribución de tamaño complementaria, a la deducida por las **Figura 31** y **Figura 32**, mediante dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) pero todos ellos fracasaron debido a la fuerte fluorescencia de las CNPs.

7.3.2. Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia infrarroja (FTIR) es una técnica muy utilizada en la caracterización de grupos funcionales existentes en la superficie de diversos materiales, por ejemplo materiales carbonosos como ser nanotubos, nanovarillas, grafeno, fullerenos, y también nanopartículas de carbono, entre otros. En primer lugar, se comenzó con el estudio

de los cambios en el espectro IR que acompañan el tratamiento térmico del precursor (sal de amonio formada a partir de ácido cítrico y N-octadecilamina). Para ello se realizó el depósito de una fina capa de la sal de amonio desde una suspensión etanólica sobre una oblea de de silicio, luego se la secó bajo vacío y se procedió a su correspondiente análisis por FTIR. Posteriormente, la capa de precursor se calcinó a 100, 200 y 300°C consecutivamente, durante 2 horas respectivamente.

Después de cada tratamiento térmico, se obtuvieron los respectivos espectros de FTIR que se muestran en la **Figura 34**. Cabe destacar que todos los espectros mostrados en dicha figura son el resultado de haber restado a la señal medida experimentalmente, la correspondiente al sustrato de silicio, corrigiendo luego la línea de base. Dicho tratamiento se realizó con el objetivo de resaltar las absorbancias principales del material carbonoso y eliminar la absorción continua que existe debido a la dispersión (*scattering*) e interferencia producida en la interface silicio/material y la superficie expuesta. Finalmente, se comparó el espectro del material sin purificar con el de la primera fracción obtenida por purificación en columna.

Con respecto al precursor, octadecil-1-citrato de amonio, las bandas de absorción observadas en la **Figura 34** pueden asignarse a los siguientes grupos funcionales: a 720 cm⁻¹ la flexión asimétrica en el plano de los – CH_2 –; a 1110 cm⁻¹ el estiramiento asimétrico (C–C–O) del alcohol terciario; a 1265 cm⁻¹ la flexión asimétrica del enlace C–OH, una banda ancha con múltiples picos que se extiende entre 1300 y 1400 cm⁻¹, la cual puede ser asignada a la flexión dentro y fuera del plano de los metilenos (C–H) y al estiramiento asimétrico del alcohol terciario (C–O); a 1470 cm⁻¹ aparece la deformación del CH₂; entre 1500-1600 cm⁻¹ las flexiones asimétricas y simétricas –NH₃⁺; a 1640 cm⁻¹ la flexión asimétrica del – CO_2^- y por último a 2915 y 2850 cm⁻¹ la flexión asimétrica y simétrica del – CH_2 – respectivamente.

137



Figura 34. Espectro FT-IR de las CNPs purificadas (magenta) y la sal de amonio precursora (negro). Las líneas roja, azul y verde corresponden al precursor tratado a diferentes temperaturas.

El espectro de la sal tratada a 100 °C no muestra cambios significativos con respecto al precursor. Sin embargo, sí se distinguen claras diferencias para la muestra luego del tratamiento a 200 °C. Para ella, se observa una pérdida de las bandas características a los grupos alcoholes terciarios, carboxilatos y amino correspondientes a los iones citrato y octadecilamonio, respectivamente. Al mismo tiempo, aparecen otras bandas a 1700 y 1775 cm⁻¹ con un hombro a 1750 cm⁻¹, las que pueden atribuirse al grupo amida secundaria. Esta observación está de acuerdo con el mecanismo de pirólisis reportado para sales de amonio de ácidos carboxílicos, cuya reacción típica, que ocurre alrededor de los 150 °C, es la formación de amidas.⁶²

El cambio más importante, no solo en el espectro sino también en apariencia visual, ocurre cuando la temperatura de pirólisis alcanza los 300 °C. En este caso, la absorbancia disminuye. Esto puede deberse a dos razones: a la pérdida de material debido al tratamiento térmico y/o a la reducción del coeficiente de extinción. La variación en la masa del precursor después de su calcinación fue de aproximadamente el 10%, una diferencia relativamente pequeña para justificar lo observado. Además de ello, se conoce que en materiales carbonosos insolubles el coeficiente de extinción es muy sensible a la estructura interna del material, como también a pequeños cambios en la morfología y el estado de aglomeración del carbono.⁴⁰

También dicho coeficiente ha sido considerado como una medida del grado de grafitización de la estructura del carbono en muestras de coloración negra, tal como se observa para las CNPs analizadas. En este caso, el coeficiente de extinción aumenta con el incremento de la relación de carbono hibridizado sp^2/sp^3 , como consecuencia del alto contenido de portadores de carga libres en el material carbonoso.⁴¹ Sin embargo, recientemente se ha encontrado que esta atenuación puede ser resultado del aumento del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos, adsorbidos principalmente sobre la superficie de granos de carbono.⁶³

De acuerdo a lo mencionado, la disminución en el coeficiente de extinción observada en la muestra tratada a 300°C, podría asignarse a la grafitización que ocurre en el precursor para generar nanopartículas con un corazón grafitico rodeado por una capa amorfa, tal como se mostró en las imágenes de microscopía TEM. Una confirmación adicional podría haber sido realizada mediante estudios de espectroscopia Raman pero ello no pudo llevarse a cabo debido a la fuerte emisión de fluorescencia que presentan las CNPs, provocando que las bandas típicas D y G no puedan observarse.

Finalmente, el espectro de las nanopartículas purificadas muestra bandas de absorción en la región comprendida entre los 2800-3200 cm⁻¹ las cuales son asignadas al estiramiento del enlace C-H originado a partir de las vibraciones de átomos de carbono en varios estados de hibridización (sp^2 , sp^3 , cíclicos y aromáticos). Tres bandas aparecen a 2960, 2930 y 2855 cm⁻¹, las mismas pueden ser asignadas a las vibraciones de estiramiento en enlaces correspondientes a los grupos -CH₃ sp^3 (asimétrico), en ambos -CH₂- sp^3 (asimétrico), y CH sp^3y -CH₃ sp^3 (simétrico) respectivamente. Cabe mencionar que no se

observó la contribución esperada por parte de enlaces C–H oleofínicos y/o arómáticos a frecuencias más altas que 2975 cm⁻¹.

Las bandas anchas que aparecen a 1710 y 1760 cm⁻¹ son asignadas al estiramiento C=O proveniente de grupos cetonas, lactonas, lactámas e imidas. No se observan señales cerca de 2700–2820 cm⁻¹ debido al estiramiento del enlace C–H de aldehídos, al estiramiento O–H y N–H de ácidos carboxílicos y amidas primarias como secundarias, respectivamente. Tampoco se observan bandas por encima de 1775 cm⁻¹ características de grupos anhídridos o anillos carbonílicos tensionados. Por otra parte, las dos bandas anchas localizadas entre 1560 y 1670 cm⁻¹podrían ser atribuídas al estiramiento sp^2 del C=O en amidas terciarias y al estiramiento C=N en estructuras como oxazimas, oxazolinas, oxazolonas, etc.

Las vibraciones en el intervalo comprendido entre 1425-1480 cm⁻¹ son atribuidas a los modos de flexión asimétrico para $-CH_3 sp^3$ en estructuras tales como $=C-CH_3$ (1440 cm⁻¹), $-C-CH_3$ (1465 cm⁻¹) y $-CH_2 sp^3$. La banda alrededor de 1400 cm⁻¹ puede ser asignada al $-CH sp^2$ en configuración oleofínica y al $-CH_2 sp^2$. La banda ancha centrada en 1370 cm⁻¹ corresponde a la flexión simétrica del $-CH_3 sp^3$ en unidades funcionales como $=C-CH_3, -C-CH_3, y = N-CH_3, -N-CH_3$. Las bandas comprendidas entre 1000 y 1280 cm⁻¹ pueden ser asignadas al estiramiento de los enlaces -C-O- y -C-N- que se encuentran en éteres, epóxidos, ésteres, aminas alifáticas, amidas, etc.

Las absorciones a frecuencias más bajas, desde 700 a 900 cm⁻¹, fueron asignadas al modo de flexión fuera del plano proveniente de los enlaces -C-H y =C-H, estos últimos de intensidad mucho mayor que las bandas provenientes de las vibraciones de estiramiento. Se pudieron identificar bandas características de compuestos aromáticos correspondientes al estiramiento de =C-H a 3060 cm⁻¹ y a los dobles enlaces -C=C- entre 1610 y 1600 cm⁻¹. Por último, cabe acotar que las bandas que aparecen a 1040, 1362 y 1718 cm⁻¹ también han sido observadas en nanopartículas de múltiples capas como las procedentes de fulereno.⁵⁷ En resumen, se puede decir que el espectro IR de las CNPs puede ser descripto en términos

de las absorciones provenientes de cadenas de carbonos alifáticos con algunas funcionalidades de oxígeno y nitrógeno, y con una contribución aromática muy débil.

7.3.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

En general, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) convencional en medios líquidos no es útil para la caracterización estructural de nanomateriales debido al movimiento de rotación en solución y la rápida relajación espín-espín que ocurre en estructuras rígidas. Por lo tanto, es de esperar que un espectro de CNPs en solución no debiera mostrar señal o en su defecto mostrar señales anchas e indefinidas.^{46,61} Sin embargo, en el espectro de ¹³C-RMN de las CNPs en solución de cloroformo deuterado (CDCl₃) mostrado en la **Figura 35**, se observan señales bien definidas a menores desplazamientos (14-32 ppm) correspondientes a carbonos sp^3 alifáticos y no es posible detectar señales provenientes de la muestra a desplazamientos químicos superiores a ~35 ppm. En consecuencia, las señales observadas pueden ser asignadas a especies moleculares solubles y/o funcionalidades en las superficies de las nanopartículas.^{46,61}

Así, los estudios de ¹³C-RMN indicarían por un lado que las moléculas solubles del tipo aromáticas y olefínicas –grupos funcionales que típicamente poseen absorción en el visible y son electroquímicamente activos– no están presentes en la muestra como contaminante. Estos resultados indican que el método de purificación permite la separación de la fracción menos oxidada de CNPs.

En conclusión, el análisis global de los datos espectroscópicos provenientes del espectro FTIR y del espectro ¹³C-RMN permite concluir que las muestras purificadas de CNPs se pueden describir como un material carbonoso con una mezcla de átomos de carbono con hibridación sp^2 y sp^3 , que contienen baja cantidad de grupos funcionales derivados de heteroátomos.

141



Figura 35. Espectro de resonancia magnética nuclear ¹³C-RMN de CNPs registrado en CDCl₃

7.3.4. Espectroscopia electrónica de pérdidas de energía

Por otra parte, se utilizó la espectroscopia electrónica de pérdidas de energía (*EELS: Electron Energy-Loss Spectroscopy*) realizada sobre CNPs individuales (**Figura 36**) como herramienta complementaria para obtener información acerca de su composición química.⁶⁴ El espectro EELS de la **Figura 36b** muestra el borde K (estado 1s) para C a 284 eV y sin otras señales visibles. El borde K para N y el borde K para O deberían aparecer a 400 eV y 532 eV, respectivamente.⁶⁴ El análisis de varios espectros EELS adquiridos en diferentes CNPs individuales no muestra señales claras de nitrógeno aunque una señal muy pequeña de oxígeno puede estar presente. Estos resultados apoyan la idea de que la composición de las CNPs está basada principalmente en carbono, incluida la capa amorfa exterior.



Figura 36. a) Imagen obtenida por HRTEM de una CNP donde se indican las regiones en las que se adquirieron los espectros EELS. b) Espectro EELS de una CNP acotado a la región correspondiente al borde K (estado 1s) para C.

6.3.5. Espectroscopia UV-Visible y de Fluorescencia

A continuación, en la **Figura 37a** se muestra el espectro de absorción de una solución de CNPs purificadas en THF correspondiente a la primera fracción. Se observa que las CNPs presentan una fuerte absorción en la región UV centrada en 5,29 eV (234 nm) con un hombro a 4,08 eV (304 nm, señalizado con una flecha) y se extiende hasta la región visible del espectro. Cuando se aumentó la concentración de las CNPs el hombro localizado a 4,08 eV (304 nm) desaparecía paulatinamente con el aumento de la concentración, pudiendo indicar algún grado de agregación o interacción entre las nanopartículas a concentraciones más altas.

Por otro lado, se llevaron a cabo medidas de fluorescencia estacionaria, cuyos resultados se muestran en la **Figura 37b**. En este caso, las sucesivas curvas espectrales corresponden a la emisión normalizada medida a diferentes longitudes de onda de excitación. Claramente se puede notar que la posición del máximo de emisión depende fuertemente de la energía de excitación, tal cual se observa para otros nanomateriales carbonosos.¹⁸ La energía del máximo de emisión se mueve hacia el rojo del espectro

electromagnético desde 3,01 eV (411 nm) hasta 2,06 eV (600 nm) cuando la solución es excitada con energías desde 3,1 eV (400 nm) hasta 2,1 eV (575 nm), provocando un notable corrimiento de 0,95 eV (189 nm). Asimismo, se calculó el rendimiento cuántico de emisión de las CNPs relativo a una solución de 9,10-difenilantraceno (DPA) en acetonitrilo (λ_{exc} = 355 nm) obteniéndose un valor del 12% (para más detalle sobre el cálculo matemático ver Capítulo 5) lo cual está de acuerdo a lo reportado para otras nanopartículas de carbono.^{42,44,65}



Figura 37. a) Espectro de absorción UV-visible de las CNPs en THF a 25 °C. b) Espectros de fluorescencia normalizada de las CNPs en solución de THF a 25 °C con incremento de la longitud de onda de excitación progresivamente desde 3 eV (400 nm) hasta 2,1 eV (575 nm) cada 25 nm.

En la **Figura 38** se grafica la energía, expresada en eV, del máximo de emisión y su correspondiente intensidad en función de la energía de excitación. Ambos parámetros cambian abruptamente su tendencia después de que la solución de CNPs fue excitada a 3,46 eV (358 nm). Esto podría estar indicando la existencia de dos mecanismos fotoquímicos

diferentes. El comportamiento espectroscópico sugiere que la fluorescencia de las CNPs está compuesta por una emisión dual, tal como se ha observado a partir de experimentos dependientes de la temperatura en otras nanopartículas de carbono.⁵⁰ Del mismo modo, Yu y sus colaboradores propusieron que la fotoemisión dual de la luz observada en puntos de carbono (nanoestructuras de aproximadamente 6 nm) fue debido a la presencia de un núcleo carbonoso y fluoróforos moleculares en la superficie.⁶⁶

En el valor de energía de 3,46 eV, representado por una línea a rayas en la Figura **38**, se observa un cambio en la tendencia tanto del máximo de emisión como de su intensidad, lo cual podría estar asociado a un estado operativo principal o a un *band gap*. Mientras que los estados con energías por debajo de 3,46 eV podrían estar vinculados a estados superficiales de las CNPs.⁶⁷ Además, se observó que el ancho de pico (medido a la mitad de la intensidad máxima de emisión, *FWHM*) también depende de la energía de excitación. El *FWHM* disminuye su valor paulatinamente desde 0,82 eV (130 nm) hasta 0,42 eV (89 nm) cuando las CNPs fueron irradiadas en el intervalo que se extiende desde 3,8 eV (325nm) hasta 2,75 eV (450 nm) respectivamente. Esto podría indicar que la emisión con un *FWHM* más estrecho a valores de energías bajas podría estar asociado con dominios sp^2 aislados (o trampas).^{66,68}

El comportamiento fotofísico observado es similar al reportado en otros estudios de nanopartículas de carbono publicados en la literatura.¹⁸ Como se mencionó anteriormente a modo de introducción, las características espectrales de las CNPs han sido atribuidas a diferentes mecanismos. Entre ellos, H. Zheng y sus colaboradores reportaron que las nanopartículas de carbono en su forma reducida son capaces de emitir luz en la región azul, mientras que las partículas más oxidadas lo hacen en la porción que se extiende desde el verde hasta el rojo del espectro electromagnético.⁶⁵ De acuerdo a ello, la emisión de luz azul observada en la CNPs estudiadas en esta Tesis, indicaría que las mismas se encuentran en su forma reducida, es decir con muy pocos grupos funcionales oxidados. Esta observación coincide con lo observado en la caracterización por FTIR y por EELS, y a su vez está en concordancia con el método de purificación empleado, ya que en principio la

primera fracción eluída a través de la columna cromatográfica correspondería a la porción menos oxidada de la muestra.



Figura 38. Gráfico de la energía del pico de máxima emisión y su correspondiente intensidad en función de la energía del haz de excitación.

Por otra parte, las imágenes TEM de las **Figura 31** y **32** revelaron que las CNPs sintetizadas son heterogéneas en tamaño y forma. Esto podría sugerir que la selectividad óptica observada podría deberse a los diferentes tamaños y formas de las nanopartículas. Sin embargo, esta interpretación no está soportada por los antecedentes en el área ya que existen estudios de CNPs con diferentes tamaños (desde ~1 a 60 nm), monodispersas,⁶⁹ o polidispersas con distribuciones de tamaños pequeñas o grandes,^{9,26,29,38,44,65,69} con diferentes formas y morfología (esferas, discos y cebollas),^{45,4915}con superficies de características fisicoquímicas diferentes (hidrofílicas, hidrofóbicas, funcionalizadas, no funcionalizadas)^{15,70,71} y todas ellas presentan en general un comportamiento fotofísico similar al observado en la **Figura 37**. En consecuencia, se propone que las CNPs deben

tener alguna característica común que es la responsable de regular sus propiedades optoelectrónicas independientemente de su forma, tamaño y superficie química.⁶⁷

De la observación de las **Figura 31** y **32** una de las características que las nanopartículas tienen en común es su composición: un centro grafitico rodeado por una capa amorfa. La estructura química del carbono amorfo es aun hoy desconocida y motivo de controversia, no obstante ha podido identificarse un modelo estructural para este material. Este modelo, denominado modelo de Robertson,⁴⁰ postula que el carbón amorfo (a-C:H) consiste de dominios sp^2 -o clústeres- embebidos en una matriz enlazada sp^3 , indicando que las propiedades ópticas estarían definidas por los sitios sp^2 , mientras que los sitios sp^3 controlarían las propiedades mecánicas. Los dominios sp^2 , ricos en electrones- π , están formados por dobles enlaces conjugados en cadenas de diferente longitud y estructuras poliaromáticas, cuya distribución espacial y tamaño depende de la cantidad de átomos de carbono sp^2 .

Otros estudios sobre películas de carbono amorfo muestran que poseen un comportamiento espectroscópico similar al observado en la **Figura 37** para las CNPs.⁷² Tanto en este trabajo como en trabajos anteriores del grupo, se propone que la fluorescencia de materiales de a-C:H tiene lugar a través de estados π - π * confinados espacialmente que cuando se excitan generan pares hueco-electrón localizados. Tanto la variación del tamaño como del entorno local de estos dominios sp^2 , producen cambios en la eficiencia y la energía de emisión del proceso de recombinación hueco-electrón. De esta manera en clústeres relativamente grandes, los estados π - π * están deslocalizados y la recombinación no-radiativa predomina entre ellos, mientras que en los más pequeños ocurre la recombinación radiativa con la consecuente emisión de luz.⁷²⁻⁷⁷ Para las transiciones ópticas dentro de los clústeres sp^2 , el confinamiento de los pares hueco-electrón observado se manifiesta como un efecto de resonancia que puede ser estimado en el espectro de excitación de la muestra.^{72,73,77}

147



Figura 39. a) Espectros de excitación de las CNPs en THF a 25 °C, a cada uno de los máximos de emisión según la Figura 7b. La figura insertada representa el espectro de absorción de las CNPs en THF (igual que Figura 7a), el cual también se encuentra superpuesto sobre los espectros de excitación (curva roja). b) Espectros de excitación normalizados de la banda de menor energía, obtenidos a tres longitudes de emisión diferentes: l: 2,94 eV (422 nm) II: 2,80 eV (442 nm) y III: 2,19 eV (567 nm).

En la Figura 39a se presentan los espectros de excitación de las CNPs, medidos según los máximos de emisión mostrados en la Figura 37b. Cabe recordar que un espectro de fluorescencia representa la distribución espectral de la luz emitida, mientras que uno de excitación, da información acerca de la eficiencia de emisión de luz para un estado en particular. Por un lado, el espectro de excitación de la Figura 39a tiene dos bandas bien definidas. Una aparece a 4,6 eV (270 nm) con un hombro a 4,05 eV (306 nm) y la otra a 3,44 eV (360 nm). Ambas indican que existen algunos estados con mayor capacidad de emisión que otros. Por otro lado, se observa que la posición de la banda a 4,6 eV (270 nm) no es sensible a la energía de emisión, según puede observarse en la Figura 39a, mientras que la banda que aparece a longitudes de onda más alta sí varía con la energía de emisión (Figura 39b). En este último caso, se eligieron tres valores de longitudes de onda de

emisión y luego se registraron los correspondientes espectros de excitación para observar el cambio con mayor detalle.

En base a la morfología de las CNPs sintetizadas (diferentes tamaños y formas, pero todas ellas compuestas por un corazón cristalino recubierto por una capa de a-C:H) y los antecedentes mencionados más arriba,^{72,73,77} el comportamiento que puede observarse en la **Figura 39b** tiene un efecto de resonancia en la banda de menor energía. En consecuencia, se podría asociar el comportamiento fotoemisivo de las CNPs a la capa de a-C:H, la cual es común en todas ellas. Según este modelo basado en materiales de a-C:H, la fotoexcitación tendría lugar dentro de los dominios o clústeres sp^2 y el confinamiento espacial ocurre a través de los pares hueco-electrón existentes dentro de ellos.⁷²⁻⁷⁷

Probablemente existan dos tipos de clústeres sp^2 , unos que se encuentran lo suficientemente cerca entre sí como para que se dé interacción entre ellos y otros que están lo suficientemente lejos entre sí para que se comporten como independientes. Aquellos dominios sp^2 que interactúan entre sí pueden producir cargas fotoestimuladas y transferencia de energía entre ellos, definiendo de esta manera la principal característica óptica observada en las CNPs. A partir del correspondiente espectro de absorción (**Figura 37a**) y el gráfico de la **Figura 38** (valor de energía de emisión señalada en línea a rayas) se logró estimar un *band gap* de aproximadamente 3,5 eV. Mientras tanto, los clústeres aislados (denominados trampas) podrían estar asociados a la emisión observada a energías más bajas, según se muestra a través de la **Figura 38**.

7.3.6. Caracterización electroquímica

A fin de obtener información acerca de la estructura electrónica, la posición de borde de banda y la energía de band gap, el proceso de transferencia de carga en la interface electrodo-solución y la estabilidad de las especies generadas por oxidación y reducción de las CNPs, se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica (VC) y de pulso diferencial (DPV) para la primera fracción de CNPs. Por un lado, los estudios de VC no

149

mostraron procesos electroquímicos claros. Sin embargo, a través de la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) se pudo diferenciar los procesos faradaicos de los capacitivos.

Teniendo en cuenta que las CNPs no fueron demasiado solubles en DClEt, se utilizó THF como solvente para los experimentos electroquímicos. La elección de este solvente permitió ampliar la ventana electroquímica del electrolito hacia potenciales más negativos (hasta -3 V vs. ECS para un electrodo de Platino en 0,1 M de TBAHFF, después de varios procesos de purificación). También se intentó obtener soluciones más concentradas a fin de observar con mayor claridad el comportamiento redox de las nanopartículas.



Figura 40. Voltamperograma cíclico para la primera fracción de CNPs en THF y 0,1 M de TBAHFF como electrolito soporte a 0,04 V.s⁻¹. La señal electroquímica a 0 V corresponde a la cupla Fc/Fc^+ , la que se utilizó como referencia interna.

Los resultados de VC no mostraron una buena resolución en comparación con los voltamperogramas de pulso diferencial (DPVs). Como es sabido, esta última técnica es más sensible y permite diferenciar la corriente farádica de la capacitiva. Para el sistema bajo estudio esta consideración experimental fue muy importante. Ya que como se observa en el VC de la **Figura 40** las CNPs en solución presentaron una elevada corriente capacitiva impidiendo la adecuada observación de los sucesivos picos totalmente reversibles, que se manifiestan en la **Figura 41** de manera mucho más clara. A pesar de ello, cuando se realizaron barridos de potencial en el intervalo de velocidades comprendido entre 25 y 200 mV/s, el VC permitió obtener una correlación lineal entre el primer pico de corriente y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Estas medidas experimentales permitieron concluir que los procesos observados están controlados por la difusión de las CNPs hacia la superficie del electrodo de trabajo (Pt), descartando cualquier adsorción de las mismas sobre el metal.

Por lo tanto, las nanopartículas sintetizadas son activas electroquímicamente y exhiben ondas discretas de reducción en la región de potenciales negativos. Con una mejor resolución, las DPV de la misma solución (**Figura 41**) muestran cinco ondas de reducción sucesivas y su complementaria oxidación, todas ellas con la forma típica de procesos reversibles. Estos resultados indican que las CNPs pueden formar especies cargadas negativamente con buena estabilidad a los siguientes potenciales: -1,43 V, -1,65 V, -1,95 V, -2,12 V y -2,61 V versus la cupla ferroceno/ferrocinio (Fc/Fc⁺) colocada en solución como referencia interna y cuya respuesta redox aparece a 0,0 V.

En la literatura, la electroquímica de nanopartículas metálicas (de Pt, Au, Ag, etc.) se encuentra ampliamente estudiada. Su comportamiento redox puede ser divido en dos grandes grupos: uno que corresponde a la reactividad electroquímica del corazón metálico en sí mismo y el otro, a la capa orgánica funcionalizada que actúa como centro redox. El primero de estos grupos a su vez se subdivide en tres categorías, según el tamaño del corazón metálico: *bulk-continuum, cargado cuantizado de doble capa* y *similar a molécula* (*molecular-like*).⁷⁸ De esta manera el paso desde partículas grandes a más pequeñas,

involucra una transición desde el comportamiento *bulk continuum* hacia el *cargado cuantizado de doble capa*.



Figura 41. Voltamperogramas de pulso diferencial para la primera fracción de CNPs en THF y 0,1 M de TBAHFF como electrolito soporte a $0,02 \text{ V.s}^{-1}$. La señal electroquímica a 0 V corresponde a la cupla Fc/Fc⁺, la que se utilizó como referencia interna.La amplitud de modulación fue de 0,04995 V y el tiempo de integración de 0,1 segundo.

Así, para partículas muy grandes el comportamiento electroquímico se manifiesta a través de señales de corriente capacitiva controladas por el transporte de masa del mismo material hacia la superficie del electrodo, cuyas características electroquímicas no son observables (*bulk-continuum*). En cambio, nanopartículas de tamaño intermedio y monodispersas son caracterizadas por un *cargado cuantizado de la doble capa* y dicho comportamiento puede observarse como una serie de picos sucesivos, regularmente espaciados que corresponden a transferencias electrónicas de un único electrón. El
espaciamiento entre picos (ΔV) está regulado por la capacitancia de cada uno de los clústeres (C_{CLU}) de acuerdo a la siguiente relación $\Delta V=e/C_{CLU}$, siendo e la carga del electrón. Por último, las partículas más pequeñas (por debajo de los 5 nm aproximadamente, dependiendo del material y la composición del capping) exhiben un comportamiento tipo molecular (*molecule-like*).

La transición del *cargado cuantizado de doble capa* al tipo molecular sugiere la aparición de un salto de energía, lo que comúnmente se conoce como brecha de banda o *band gap*. Esta cantidad experimental puede ser determinada mediante la diferencia entre los potenciales electroquímicos correspondientes al primer pico de oxidación y de reducción. Por otra parte, la electroquímica para el segundo grupo de nanopartículas metálicas está controlada por los grupos redox unidos a su superficie.

A pesar de que hay mucho estudios de síntesis de nanopartículas de carbono basadas en métodos electroquímicos,^{22,49,78-80} hay pocos reportes que describan sus propiedades redox.⁸¹ En general, las CNPs podrían comportarse electroquímicamente según los cuatros posibles mecanismos descriptos anteriormente para nanopartículas metálicas, incluyendo el comportamiento regulado por grupos redox activos presentes en su superficie (como quinonas, lactonas, éteres, epóxidos, ésteres, aminas alifáticas, amidas, etc.) También, se sabe que se pueden comportar como excelentes donores y fuertes aceptores de electrones.^{18,81,82}

De esta manera, los DPVs de la **Figura 41** muestran que el corazón de las nanopartículas puede sufrir algún proceso de cargado. Además, se observa una región sin señales voltamperométricas comprendida entre el primer pico de reducción y el límite anódico del solvente (THF), asemejándose ello al *band gap* observado para nanopartículas metálicas pequeñas.⁷⁸ Por lo tanto, estas características nos permiten excluir la posibilidad de asociar el comportamiento mostrado por las CNPs al tipo *bulk continuum* debido a la presencia de señales electroquímicas bien definidas o también, al efecto del *cargado cuantizado de doble capa*, donde no se ha podido medir la existencia de un *band gap*

electroquímico. Sobretodo esta última característica permite asociar dicho comportamiento al *molecule-like*.⁷⁸

El primer proceso de reducción (-1,42 V) que aparece en el DPV de la Figura 41 puede ser asignado a la posición del orbital molecular de menor energía desocupado (LUMO).⁸³ Luego, a partir del gap ótipo (~3,5 eV) determinado en la caracterización fotoquímica, fue posible estimar la posición del orbital molecular de mayor energía ocupado (HOMO). El potencial del HOMO fue de 2,08 V versus Fc/Fc⁺, el cual se encuentra fuera de la ventana electroquímica para la mezcla solvente/electrolito en la que las CNPs resultaron totalmente solubles. Esta complicación experimental para estudiar el proceso de oxidación de las CNPs no permitió calcular un valor de *band gap* a partir de medidas electroquímicas y posteriormente compararlo con el obtenido desde medidas fotofísicas. Además no se debe descartar la presencia de algunos grupos funcionales redox en la superficie de las nanopartículas como también, algunas trampas superficiales que puedan exhibir alguna respuesta electroquímica.

Sin embargo, el patrón electroquímico observado en la **Figura 41**: dos dobletes separados con una diferencia entre los picos red1-red2 y red3-red4 de 0,20 V aproximadamente y con una separación entre dobletes de ~ 0,30 V, está de acuerdo con la típica electroquímica *molecule-like*. Este espaciamiento regular entre los picos de corriente es característico de transferencias electrónicas consecutivas que involucran un solo electrón y puede ser asociado a la presencia de orbitales moleculares bien definidos.

Como se mencionó previamente, existen antecedentes que dicho comportamiento depende fuertemente del tamaño y la polidispersidad de las nanopartículas. Es más, un comportamiento bastante similar al mostrado por las CNPs fue reportado en la literatura para partículas metálicas pequeñas y monodispersas.⁷⁸ Sin embargo, como se muestra a través de las imágenes TEM (**Figura 31** y **32**), las CNPs sintetizadas muestran una clara polidispersidad en cuanto al tamaño y la forma de las mismas. Entonces, en este caso, el comportamiento electroquímico observado no puede ser interpretado en función del tamaño y la forma geométrica del material. Sino más bien, podría deberse a alguna estructura

NANOPARTÍCULAS DE CARBONO

común presente en todas las nanopartículas independientemente de su forma o tamaño. Esta estructura común en todas ellas es la capa de carbono amorfo (a-C:H) que rodea al corazón de la nanopartícula. Esta suposición estaría de acuerdo con las conclusiones alcanzadas a partir de los resultados fotofísicos en la sección previa.

En consecuencia, los estudios electroquímicos soportan la hipótesis de que clústeres pequeños, compuestos de unos pocos anillos aromáticos estén presentes en la capa de a-C:H y sean los responsables de las propiedades ópticas y eléctricas de las CNPs. De manera similar estudios realizados en materiales derivados del grafeno sugieren que las propiedades optoelectrónicas son originadas a partir de fragmentos sp^2 embebidos en una matriz bidimensional de carbono saturado (con gaps ópticos entre 0.9-5.8 eV) y a efectos de borde por parte de anillos aromáticos.⁸⁴

7.3.7. Caracterización electroquimioluminiscente

Debido a la naturaleza de la ECL (Capítulo 3), la producción de ECL es un fenómeno de emisión de luz que involucra la superficie de las CNPs. Desde el punto de vista de la técnica, la ECL se convierte en una herramienta muy valiosa para el análisis de las propiedades optoelectrónicas observadas, ya que nos permite correlacionar las características ópticas y electroquímicas de las CNPs con su estructura. Para ello es de fundamental importancia contar con el espectro de emisión ECL de la primera fracción.

Sin embargo, dada la baja señal obtenida durante los experimentos, resultó sumamente dificultoso obtener dichas medidas. Consecuentemente, se trabajó intensamente en la optimización de las condiciones experimentales y la adaptación del equipamiento existente, lo que permitió finalmente concretar la determinación. Es importante mencionar, que una labor adicional fue contar con un solvente en excelentes condiciones de pureza, ya que como se mencionó en los estudios electroquímicos fue necesario incrementar la concentración de las CNPs para observar con mayor claridad las señales voltamperométricas. Cualquier impureza en cantidades de trazas o vestigios de humedad

presentes en el solvente ocasionaba grandes inconvenientes para la formación de las especies reductoras.

Como se mencionó en la sección precedente, el potencial correspondiente al HOMO de las CNPs tiene un valor de aproximadamente 2,08 V versus Fc/Fc⁺, el cual se encuentra fuera de la ventana electroquímica del solvente. En consecuencia, para estudiar las propiedades ECL se necesita utilizar un correactante catódico. Cuando esta sustancia es reducida electroquímicamente produce especies altamente oxidantes que pueden reaccionar con las CNPs con carga negativa generadas sobre la superficie del electrodo. Desafortunadamente, no existen muchos correactantes catódicos solubles en THF, por ello y teniendo en cuenta todos los requisitos experimentales, se eligió el peróxido de benzoilo (BPO). En el **Esquema 19** se muestra el mecanismo propuesto para la generación de ECL a partir de las CNPs utilizando BPO como correactante catódico.

$$CNP + e^{-} \rightarrow CNP^{\bullet-}$$
(1)

$$CNP^{\bullet-} + BPO \to CNP + BPO^{\bullet-}$$
(2)

$$BPO^{\bullet-} \rightarrow C_6H_5CO_2^{-} + C_6H_5CO_2^{\bullet}$$
(3)

$$CNP^{\bullet-} + C_6H_5CO_2^{\bullet-} \rightarrow CNP^{\bullet} + C_6H_5CO_2^{-} \qquad (4)$$

$$CNP^* \rightarrow CNP + hv$$
 (5)

Esquema 19. Mecanismo de ECL para las CNPs y peróxido de benzoilo (BPO).

Luego, se procedió a medir el correspondiente espectro de ECL, habiendo probado previamente la capacidad ECL de nuestro sistema mediante el uso de un fotomultiplicador. Es importante recordar que para producir un espectro de ECL es necesario conectar la celda electroquímica a un potenciostato (unidad electroquímica) y a un fluorómetro (unidad espectrofotométrica) simultáneamente. Al mismo tiempo, se requiere alinear ópticamente el

electrodo de trabajo, sobre el que se produce el fenómeno ECL, dentro del flurómetro. La unidad electroquímica permitirá producir las especies radicalarias, tanto del correactante como de las nanopartículas, necesarias para el evento ECL y la unidad espectro fotométrica permitirá registrar la señal de ECL, en forma de luz, en función de la longitud de onda.

En la **Figura 42** se muestra el correspondiente espectro de las CNPs en solución de THF en presencia del correactante. Dicho experimento se llevó a cabo mediante sucesivos saltos de potencial entre 0 y -3V versus Fc/Fc^+ , con un tiempo de espera de dos segundos a cada potencial. La radiación emitida fue captada y medida mediante un fluorómetro, con un tiempo de integración de 0,2 segundos y una apertura de ranura de emisión de 4 mm.



Figura 42. Espectro de ECL de las CNPs en solución de THF con 0,1 M de TBAHFF y 10 mM de BPO.

Para el experimento en ausencia de BPO no se observó señal, lo cual indica que el proceso de ECL necesita la aniquilación de las partículas cargadas negativamente y los radicales oxidantes del correactante. Como se mencionó más arriba, para conseguir una intensidad de luz detectable fue necesario aplicar saltos de potencial más allá del segundo proceso redox observado (-2,61 V). Esto sugiere que el primer estado redox de las CNPs no es activo para el proceso de ECL. Por su parte, la reducción de BPO (ec. 3 Esquema 19) produce aniones radicales que rápidamente se descomponen en la cupla anión/radical benzoato ($C_6H_5CO_2^{\circ}/C_6H_5CO_2^{-}$), la cual actúa como correactante. Si tenemos en cuenta que el potencial al cual aparece el primer pico de reducción es de -1,42 V y el potencial redox para la cupla $C_6H_5CO_2^{\circ}/C_6H_5CO_2^{-}$ es mayor a +1,5 V vs. ECS,⁸⁵ se podría pensar que la energía involucrada en la reacción de aniquilación no es suficiente para excitar las CNPs que tienen un *band gap* de 3,5 eV.

Por otro lado, puede resultar muy útil comparar el comportamiento ECL con las propiedades ópticas de las nanopartículas. En la **Figura 42** se observa que el máximo de emisión de ECL aparece a 2,35 eV, el cual estaría 1,15 eV corrido hacia el rojo si se lo compara con el máximo de fluorescencia según la **Figura 38**. Este corrimiento batocrómico es relativamente grande si se lo compara con otros materiales electroquimioluminiscentes en consecuencia, no solamente debe estar asociado a la energía insuficiente de la reacción de aniquilación sino también, a la distribución espacial de estados emisores en las CNPs. Debido a la naturaleza del mecanismo de ECL, se esperaría que la reacción de aniquilación corrida hacia el rojo, a los estados selectivamente excitados en la capa de a-C:H, mientras quela emisión desplazada hacia el azul se puede asignar al corazón grafítico tipo fullereno.

En función de los resultados obtenidos y los antecedentes bibliográficos mencionados con anterioridad, se postula el siguiente modelo para explicar la relación entre las características estructurales y el comportamiento optoelectrónico observado en las CNPs. La presencia de pequeños clústeres, compuestos por unos pocos anillos arómaticos, presentes en la capa de carbono amorfo que rodea al corazón grafitico de la nanopartícula (evidencia experimental observada en las imágenes TEM de las **Figura 31** y **32**), podrían

ser los responsables de las propiedades ópticas y eléctricas exhibidas por las CNPs. Además, sus características electroquimioluminiscentes soporta dicha suposición, ya que la naturaleza del mecanismo ECL permite suponer que la reacción de aniquilación ocurre a nivel superficial, pudiendo involucrar de esta forma estados excitados provenientes de estos anillos aromáticos presentes en la capa de a-C:H.

7.4. Conclusiones específicas

Se diseñó un procedimiento sintético sencillo que incluye la purificación de CNPs insolubles en agua con mínimas cantidades de grupos funcionales superficiales. Las CNPs obtenidas se estudiaron y caracterizaron por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia de pérdida de energía (EELS), resonancia magnética nuclear (¹³C-RMN), espectroscopia de infrarrojo (IR), UV-visible y de fluorescencia, electroquímica y ECL. Las CNPs obtenidas son polidispersas en relación a su forma y tamaño. Las CNPs están constituidas por un núcleo grafítico rodeado por una capa amorfa de espesor variable.

La naturaleza de las propiedades electro-ópticas se estudió y se correlacionó con las características morfológicas y químicas del material. Para las nanopartículas sintetizadas, los resultados mostraron que el comportamiento optoelectrónico no se puede asociar a efectos de confinamiento cuántico relacionados al tamaño y la forma de las nanopartículas. Teniendo presente que las CNPs sintetizadas están constituidas por un núcleo grafítico rodeado por una capa amorfa, ésta última según el trabajo realizado en esta Tesis, parece jugar un papel importante en la determinación de las propiedades optoelectrónicas de las nanopartículas. Para ayudar a responder a las preguntas que quedan abiertas en el campo se deberían realizar trabajos focalizados en la cáscara externa amorfa de las nanopartículas.

160

Referencias

(1) Li, H.; He, X.; Kang, Z.; Huang, H.; Liu, Y.; Liu, J.; Lian, S.; Tsang, C. H. A.; Yang, X.; Lee, S.-T. Angewandte Chemie International Edition 2010, 49, 4430.

(2) Li, H.; Ming, H.; Liu, Y.; Yu, H.; He, X.; Huang, H.; Pan, K.; Kang, Z.; Lee, S.-T. New Journal of Chemistry 2011, 35, 2666.

(3) Zhang, B.; Liu, C.-y.; Liu, Y. European Journal of Inorganic Chemistry 2010, 2010, 4411.

(4) Zhang, J.; Shen, W.; Pan, D.; Zhang, Z.; Fang, Y.; Wu, M. New Journal of Chemistry 2010, 34, 591.

(5) Wang, F.; Kreiter, M.; He, B.; Pang, S.; Liu, C.-y. Chemical Communications 2010, 46, 3309.

(6) Wang, F.; Pang, S.; Wang, L.; Li, Q.; Kreiter, M.; Liu, C.-y. Chemistry of Materials 2010, 22, 4528.

(7) Wang, F.; Xie, Z.; Zhang, H.; Liu, C.-y.; Zhang, Y.-g. Advanced Functional Materials 2011, 21, 1027.

(8) Ray, S. C.; Saha, A.; Jana, N. R.; Sarkar, R. The Journal of Physical Chemistry C 2009, 113, 18546.

(9) Liu, H.; Ye, T.; Mao, C. Angewandte Chemie International Edition 2007, 46, 6473.

(10) Yang, Y.; Cui, J.; Zheng, M.; Hu, C.; Tan, S.; Xiao, Y.; Yang, Q.; Liu, Y. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 380.

(11) Yang, Z.-C.; Li, X.; Wang, J. Carbon 2011, 49, 5207.

(12) Fang, Y.; Guo, S.; Li, D.; Zhu, C.; Ren, W.; Dong, S.; Wang, E. ACS Nano **2012**, *6*, 400.

(13) Xu, Z.-Q.; Yang, L.-Y.; Fan, X.-Y.; Jin, J.-C.; Mei, J.; Peng, W.; Jiang, F.-L.; Xiao, Q.; Liu, Y. Carbon 2014, 66, 351.

(14) Rahy, A.; Zhou, C.; Zheng, J.; Park, S. Y.; Kim, M. J.; Jang, I.; Cho, S. J.; Yang, D. J. Carbon 2012, 50, 1298.

(15) Li, X.; Wang, H.; Shimizu, Y.; Pyatenko, A.; Kawaguchi, K.; Koshizaki, N. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 932.

(16) Yao, S.; Hu, Y.; Li, G. Carbon 2014, 66, 77.

(17) Guo, Y.; Wang, Z.; Shao, H.; Jiang, X. Carbon 2013, 52, 583.

(18) Baker, S. N.; Baker, G. A. Angewandte Chemie International Edition 2010, 49, 6726.

(19) Miao, W. Chemical Reviews 2008, 108, 2506.

(20) Forster, R. J.; Bertoncello, P.; Keyes, T. E. Annu Rev Anal Chem 2009, 2:359-85., 10.1146/annurev.

(21) Parveen, S. In Protocols and Applications; Springer 2013.

(22) Zhao, Q.-L.; Zhang, Z.-L.; Huang, B.-H.; Peng, J.; Zhang, M.; Pang, D.-W. Chemical Communications 2008, 5116.

(23) Li, Q.; Ohulchanskyy, T. Y.; Liu, R.; Koynov, K.; Wu, D.; Best, A.; Kumar, R.; Bonoiu, A.; Prasad, P. N. *The Journal of Physical Chemistry C* 2010, *114*, 12062.

(24) Pelley, J. L.; Daar, A. S.; Saner, M. A. Toxicological Sciences 2009, 112, 276.

(25) Fan, R.-J.; Sun, Q.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Lu, A.-H. Carbon 2014, 71, 87.

(26) Liu, C.; Zhang, P.; Tian, F.; Li, W.; Li, F.; Liu, W. Journal of Materials Chemistry 2011, 21, 13163.

(27) Chang, C.-C.; Hsieh, M.-C.; Lin, J.-C.; Chang, T.-C. *Biomaterials* **2012**, *33*, 897.

(28) Oh, W. K.; Yoon, H.; Jang, J. Biomaterials 2010, 31, 1342.

(29) Hu, L.; Sun, Y.; Li, S.; Wang, X.; Hu, K.; Wang, L.; Liang, X.-j.; Wu, Y. Carbon 2014, 67, 508.

(30) Ong, L. C.; Ang, L. Y.; Alonso, S.; Zhang, Y. Biomaterials 2014, 35, 2987.

(31) Zhu, A.; Qu, Q.; Shao, X.; Kong, B.; Tian, Y. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 7185.

(32) Kim, D.; Pikhitsa, P. V.; Yang, H.; Choi, M. Nanotechnology.2011, 22, 485501. doi: 10.1088/0957.

(33) Shi, W.; Wang, Q.; Long, Y.; Cheng, Z.; Chen, S.; Zheng, H.; Huang, Y. Chemical Communications 2011, 47, 6695.

(34) Selvan, S. T.; Tan, T. T. Y.; Yi, D. K.; Jana, N. R. Langmuir 2009, 26, 11631.

(35) Erokhin, A. V.; Lokteva, E. S.; Yermakov, A. Y.; Boukhvalov, D. W.; Maslakov, K. I.; Golubina, E. V.; Uimin, M. A. Carbon 2014, 74, 291.

(36) Yu, B. Y.; Kwak, S.-Y. Journal of Materials Chemistry 2012, 22, 8345.

(37) Zhuo, S.; Shao, M.; Lee, S.-T. ACS Nano 2012, 6, 1059.

(38) Wang, F.; Chen, Y.-h.; Liu, C.-y.; Ma, D.-g. Chemical Communications 2011, 47, 3502.

(39) Guo, X.; Wang, C.-F.; Yu, Z.-Y.; Chen, L.; Chen, S. Chemical Communications 2012, 48, 2692.

(40) Robertson, J. Materials Science and Engineering: R: Reports 2002, 37, 129.

(41) Falcao, E. H. L.; Wudl, F. Journal of Chemical Technology & Biotechnolog y2007, 82, 524.

(42) Hu, S.-L.; Niu, K.-Y.; Sun, J.; Yang, J.; Zhao, N.-Q.; Du, X.-W. Journal of Materials Chemistry 2009, 19, 484.

(43) Mao, X.-J.; Zheng, H.-Z.; Long, Y.-J.; Du, J.; Hao, J.-Y.; Wang, L.-L.; Zhou, D.-B. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2010, 75, 553.

(44) Bourlinos, A. B.; Zbořil, R.; Petr, J.; Bakandritsos, A.; Krysmann, M.; Giannelis, E. P. Chemistry of Materials **2012**, 24, 6.

(45) Srivastava, S.; Gajbhiye, N. S. ChemPhysChem 2011, 12, 2624.

(46) Pan, D.; Zhang, J.; Li, Z.; Wu, M. Advanced Materials 2010, 22, 734.

(47) Pan, D.; Zhang, J.; Li, Z.; Wu, C.; Yan, X.; Wu, M. Chemical Communications 2010, 46, 3681.

(48) Liu, R.; Wu, D.; Feng, X.; Müllen, K. Journal of the American Chemical Society 2011, 133, 15221.

(49) Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P. Small 2008, 4, 455.

162



(50) Krysmann, M. J.; Kelarakis, A.; Dallas, P.; Giannelis, E. P. Journal of the American Chemical Society 2011, 134, 747.

(51) Sano, N.; Wang, H.; Chhowalla, M.; Alexandrou, I.; Amaratunga, G. A. J. Nature, 414, 506.

(52) Kuznetsov, V. L.; Chuvilin, A. L.; Butenko, Y. V.; Mal'kov, I. Y.; Titov, V. M. Chemical Physics Letters 1994, 222, 343.

(53) de Heer, W. A.; Ugarte, D. Chemical Physics Letters 1993, 207, 480.

(54) Ugarte, D. Nature 1992, 359, 707.

(55) Hu, S.; Guo, Y.; Liu, W.; Bai, P.; Sun, J.; Cao, S. Journal of Physics and Chemistry of Solids 2011, 72, 749.

(56) Chen, X. H.; Yang, H. S.; Wu, G. T.; Wang, M.; Deng, F. M.; Zhang, X. B.; Peng, J. C.; Li, W. Z. *Journal of Crystal Growth* **2000**, *218*, 57.

(57) Mordkovich, V. Z. Chemistry of Materials 2000, 12, 2813.

(58) Vander Wal, R. L.; Choi, M. Y. Carbon 1999, 37, 231.

(59) Vander Wal, R. L.; Tomasek, A. J.; Ticich, T. M. Nano Letters 2003, 3, 223.

(60) Gorelik, T.; Urban, S.; Falk, F.; Kaiser, U.; Glatzel, U. Chemical Physics Letters 2003, 373, 642.

(61) Du, A. B.; Liu, X. G.; Fu, D. J.; Han, P. D.; Xu, B. S. Fuel 2007, 86, 294.

(62) Moldoveanu, S. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; Elsevier: **2010**; 28, 471.

(63) Jäger, C.; Huisken, F.; Mutschke, H.; Henning, T.; Poppitz, W.; Voicu, I. Carbon 2007, 45, 2981.

(64) Egerton, R. F.; Springer US: 2011.

(65) Zheng, H.; Wang, Q.; Long, Y.; Zhang, H.; Huang, X.; Zhu, R. Chemical Communications 2011, 47, 10650.

(66) Yu, P.; Wen, X.; Toh, Y.-R.; Tang, J. The Journal of Physical Chemistry C 2012, 116, 25552.

(67) Marzari, G.; Morales, G. M.; Moreno, M. S.; Garcia-Gutierrez, D. I.; Fungo, F. Nanoscale 2013, 5, 7977.

(68) Chien, C.-T.; Li, S.-S.; Lai, W.-J.; Yeh, Y.-C.; Chen, H.-A.; Chen, I. S.; Chen, L.-C.; Chen, K.-H.; Nemoto, T.; Isoda, S.; Chen, M.; Fujita, T.; Eda, G.; Yamaguchi, H.; Chhowalla, M.; Chen, C.-W. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 6662.

(69) Zhang, S.; He, Q.; Li, R.; Wang, Q.; Hu, Z.; Liu, X.; Chang, X. *Materials Letters* 2011, 65, 2371.

(70) Zhu, H.; Wang, X.; Li, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Yang, X. Chemical Communications 2009, 5118.

(71) Peng, H.; Travas-Sejdic, J. Chemistry of Materials 2009, 21, 5563.

(72) Füle, M.; Tóth, S.; Veres, M.; Pócsik, I.; Koós, M. Diamond and Related Materials 2005, 14, 1041.

(73) Füle, M.; Budai, J.; Tóth, S.; Veres, M.; Koós, M. Journal of Non-Crystalline Solids 2006, 352, 1340.

(74) Koós, M.; Füle, M.; Veres, M.; Tóth, S.; Pócsik, I. Journal of Non-Crystalline Solids 2002, 299–302, Part 2, 852.

(75) Veres, M.; Füle, M.; Tóth, S.; Koós, M.; Pócsik, I.; Kokavecz, J.; Tóth, Z.; Radnóczi, G. Journal of Non-Crystalline Solids 2005, 351, 981.

(76) Demichelis, F.; Schreiter, S.; Tagliaferro, A. Physical Review B 1995, 51, 2143.

(77) Heitz, T.; Godet, C.; Bourée, J. E.; Drévillon, B.; Conde, J. P. *Physical Review B* 1999, *60*, 6045.

(78) Murray, R. W. Chemical Reviews 2008, 108, 2688.

(79) Zheng, L.; Chi, Y.; Dong, Y.; Lin, J.; Wang, B. Journal of the American Chemical Society 2009, 131, 4564.

(80) Lu, J.; Yang, J.-x.; Wang, J.; Lim, A.; Wang, S.; Loh, K. P. ACS Nano 2009, 3, 2367.

(81) Zhou, J.; Booker, C.; Li, R.; Zhou, X.; Sham, T.-K.; Sun, X.; Ding, Z. Journal of the American Chemical Society 2007, 129, 744.

(82) Wang, X.; Cao, L.; Lu, F.; Meziani, M. J.; Li, H.; Qi, G.; Zhou, B.; Harruff, B. A.; Kermarrec, F.; Sun, Y.-P. Chemical Communications 2009, 3774.

(83) Cardona, C. M.; Li, W.; Kaifer, A. E.; Stockdale, D.; Bazan, G. C. Advanced Materials 2011, 23, 2367.

(84) Eda, G.; Lin, Y.-Y.; Mattevi, C.; Yamaguchi, H.; Chen, H.-A.; Chen, I. S.; Chen, C.-W.; Chhowalla, M. Advanced Materials 2010, 22, 505.

(85) Bard, A. J. In *Electrogenerated Chemiluminescence*; Marcel Dekker: New York, 2004.

CAPÍTULO 8

DETECCIÓN DE GLIFOSATO POR ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA SOBRE AUTOENSAMBLADOS EN ORO

8.1. Estado del conocimiento

El proceso de intensificación productiva de las últimas décadas, que acompañó a los cambios de contexto socio-económico a nivel mundial y en particular en nuestro país, conjuntamente con el crecimiento poblacional, produjo un incremento notable de la producción de granos. Su continuidad puede conducir a alteraciones ambientales de magnitud global, no sólo sobre la calidad de vida de la población rural y consumidores en general, sino también sobre los procesos físico-biológicos de mediano y largo plazo que desarrollan los distintos ecosistemas de nuestro planeta.¹

El creciente aumento de la producción agropecuaria conjuntamente con el progreso tecnológico exponencial conlleva la creciente incorporación de plaguicidas, siendo los herbicidas los que ocupan la parte mayoritaria del volumen comercializado. Ellos reemplazaron el uso de la energía mecánica por la química para el control de malezas indeseables siendo aplicados en las plantas o en los suelos y acompañaron la introducción de soja transgénica cultivada bajo siembra directa, cuya adopción masiva transformó al glifosato en el herbicida más utilizado y fuente de controversias actuales sobre su potencial toxicidad para humanos y animales, y contaminación ambiental.² Los factores más importantes en el transporte de los herbicidas hacia los cuerpos de agua naturales son la dispersión aérea por los vientos, la volatilización y el arrastre por aguas de lluvia y riego, que causan daños o efectos adversos a los organismos acuáticos, lo cual constituye un problema ambiental importante en las últimas décadas.³

Como se mencionó, entre los agroquímicos de más amplio uso a nivel mundial se encuentra el glifosato [N-(fosfonometil) glicina]. Otros compuestos sumamente difundidos son el paraquat, que es considerado el segundo producto agroquímico más vendido, las triazinas, entre ellas la sustancia activa más usada es la atrazina y el metolaclor. En Argentina, el glifosato también ocupa el primer lugar entre los herbicidas más usados, le siguen el acetoclor, la atrazina y el ácido 2,4 D en función de los volúmenes de importación anuales de sus principios activos, según se informa desde la Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos (CNIA).³

El glifosato (GLY) es un herbicida no selectivo, postemergente, sistémico y de amplio espectro, se adsorbe fuertemente a la superficie de las arcillas y a la materia orgánica presente en los suelos, por lo que a pesar de ser muy soluble, tiene reducida movilidad.¹ No obstante, las condiciones climáticas y los tipos de suelos definen las posibilidades de lixiviación, pudiendo así alcanzar las fuentes de aguas subterráneas. Desde los años noventa, este producto abarcó uno de los mercados más grande en la industria de los herbicidas debido a su amplio uso en la agricultura y jardinería ornamental.⁴

El GLY fue sintetizado y patentado por la compañía Monsanto, empresa que descubrió por primera vez su uso potencial como un herbicida en 1970 por el Dr. John E. Franz, y hasta 1974 fue introducido como producto comercial con el nombre de *Round-up*.³ En la actualidad, esta compañía es el principal distribuidor del GLY, junto con semillas transgénicas resistentes a este herbicida. El éxito comercial del GLY como herbicida altamente efectivo ha impulsado varios estudios sobre su comportamiento y persistencia en los cuerpos de agua y suelo, con el fin de desarrollar un método analítico robusto para su seguimiento en el medio ambiente.

En Argentina, el herbicida GLY se utiliza extensivamente en la agricultura conjuntamente con otros agroquímicos. A modo de ejemplo, se utilizan más de ochenta millones de kilogramos por año de GLY.³ Por lo tanto, el seguimiento a niveles residuales de varios productos agrícolas en el suelo, en la atmósfera, en aguas superficiales y subterráneas ha atraído una considerable atención debido al posible peligro para la salud humana y el ambiente. En este marco, el Poder Ejecutivo Nacional en el año 2009 crea una Comisión Nacional de Investigación de productos agroquímicos para determinar su impacto en la salud y en el medio ambiente.³

La aparición de los herbicidas en el medio ambiente debido a su creciente utilización indiscriminada ha llevado a que los organismos internacionales oficiales establezcan normas para regular sus concentraciones máximas en el suelo, en el agua y en los alimentos. En función de ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (EPA), recomienda como límite tolerable para agua

potable una concentración de 0,7 mg/L.⁵ En nuestro país la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación constituye un valor guía $\leq 0,3$ mg/L, expresado como sal de glifosato isopropilamina.¹ Dadas las características fisicoquímicas del GLY —muy polar y anfótero, no volátil, carece de fluoróforos— el desarrollo de métodos que permitan su detección representa un desafío analítico.

Actualmente, la mayoría de los métodos de extracción o separación utilizados se basan en la cromatografía gaseosa (GC) y en la cromatografía líquida (LC), en los cuales se requieren tratamientos de purificación de las muestras y procedimientos de derivatización química para aumentar la sensibilidad en la detección.^{6,7} El método estándar aceptado para la determinación de GLY en agua potable utiliza Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con derivatización química post-columna y detección por fluorescencia.³ Este método alcanza un límite de detección en la solución de trabajo de 0,005 mg/L. Sin embargo, el tratamiento de derivatización química post-columna conlleva a un insumo grande de tiempo que hace a esta metodología poco viable para un uso masivo y generalizado.

Por otra parte, es posible la determinación de GLY utilizando HPLC con detección directa sin derivatización química post-columna utilizando un detector UV a 195-200 nm. En este caso, debido al bajo coeficiente de extinción molar del GLY, la respuesta instrumental en este sistema es baja alcanzándose un límite de detección (~200mg/L) superior al recomendado por la EPA. También, se puede utilizar un detector de masas (HPLC-MS), que por monitoreo en modo de ion selectivo (SIM) permite cuantificar concentraciones del orden de 0,001 mg/L. Sin embargo, en este caso el equipamiento es de alto costo haciendo difícil su utilización generalizada.^{6,7} Por ejemplo, en nuestro país en la provincia de Buenos Aires, particularmente en INTA Balcarce se dispone de un único equipamiento HPLC-MS para la detección de GLY y ácido aminometilfosfónico (AMPA). Por lo anteriormente expuesto, hay una creciente necesidad de encontrar métodos de análisis capaces de proporcionar una detección rápida, sensible, făcil y fiable del GLYen bajas concentraciones y a pequeños costos.

169

8.2. Glifosato

8.2.1. Generalidades

El glifosato (GLY, **Figura 43**) es un ácido orgánico débil formado por una molécula del aminoácido natural glicina y otra de fosfonometilo, unido como sustituyente de uno de lo hidrógenos del grupo amino secundario. El nombre sistemático (IUPAC) es *N*-(fosfonometil) glicina mientras que el nombre común de glifosato se debe a una contracción de los términos *gli*(glicina), *-fosfo* y *-ato* (prefijo con el que se designa a la base conjugada de un ácido). Físicamente se presenta como un polvo cristalino de color blanco e inodoro con un peso molecular de 169,07 g/mol, tiene una presión de vapor muy baja, es muy soluble en agua y prácticamente insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Por otro lado, desde el punto de vista de su bioquímica, el GLY actúa inhibiendo la enzima responsable de la formación de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano, en las plantas. Su degradación en el medio ambiente ocurre bajo condiciones biológicas y su principal metabolito es el ácido aminometilfosfónico (AMPA).¹



Figura 43. Estructura molecular del Glifosato

Debido a la presencia de grupos ácidos (ácido carboxílico y ácido fosfórico) y básicos (grupo amino secundario) en la molécula, el GLY es un compuesto muy polar y anfótero, que puede formar diversos compuestos iónicos en función del pH del medio. Los valores de pK_a^8 son $pK_1<2$, pK_2 2,441, pK_3 5,518 y pK_4 10,083 en función de ellos el GLY se encuentra normalmente en forma iónica (generalmente presenta carga negativa en casi toda la escala de pH, aunque puede presentar carga positiva a pH<2), a excepción de un intervalo muy pequeño de pH, en medio ácido, en el que se encuentra en forma neutra con

tiempo definido, mata el 50% de la población evaluada. La DL_{50} se expresa en miligramos de producto por kilogramos de peso del animal.²

Al respecto, la EPA, ha establecido que el GLY y sus sales son compuestos moderadamente tóxicos, asignándole la Categoría de Toxicidad III, por sus daños oculares. La DL_{50} es de 4900 a 5000 mg/kg de peso vivo. Mientras tanto, la OMS considera baja la toxicidad que puede causar el GLY, la DL_{50} oral de GLY puro en ratas es 4230 mg/kg, mientras que el fabricante (Monsanto) cita una DL_{50} de 5600 mg/kg. En cuanto a las formas de exposición, la toxicidad del GLY puro y la de las fórmulas compuestas son más altas por exposición dérmica o inhalatoria, que por la ingestión. En los seres humanos, los síntomas son diversos e incluyen desde náuseas y mareos, irritaciones dérmicas y oculares hasta destrucción de glóbulos rojos y daño o falla renal.²

8.2.3. Legislación sobre la presencia de GLY en el medio ambiente

La presencia de plaguicidas en el medio ambiente, debido al uso indiscriminado y sus efectos tóxicos mencionados con anterioridad han llevado a los organismos oficiales a establecer límites para regular sus concentraciones máximas en alimentos y aguas, especialmente las superficiales y subterráneas, las cuales se utilizan en el abastecimiento para consumo humano.² En la **Tabla 4** se registran los límites permisibles de GLY establecidos por algunas organizaciones mundiales en varios tipos de agua. También, se menciona el límite establecido en Argentina por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina.³

Tipo de muestra	CWQG, ¹⁰ Canadá, mg/L	EC, ¹¹ Unión Europea, mg/L	EPA, ⁹ Estados Unidos, mg/L	Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Argentina ³
Agua Potable	0.8	0.28	0,7	≤ 0,3

Tabla 4. Límites permisibles de glifosato por algunas organizaciones mundiales.⁹⁻¹¹

8.2.4. Formulaciones

El GLY fue sintetizado y patentado por la compañía Monsanto en 1974 y, actualmente, es el principio activo de muchos productos comerciales. Este compuesto se comercializa en la forma de concentrados solubles de la sal de isopropilamina de *N*-(fosfonometil) glicina, en los cuales se integran el GLY y los ingredientes inertes requeridos para cada tipo de formulación comercial.³ La sal de isopropilamina se utiliza como herbicida para controlar las malezas de hoja ancha y hierbas de muchos tipos de cultivo, tanto en la agricultura como en la jardinería.³

El GLY también se comercializa como sal sódica y sal de amonio de N-(fosfonometil) glicina, las cuales se usan para modificar el crecimiento de la planta y acelerar la maduración de los frutos. Bajo una gran variedad de nombres, el herbicida GLY se comercializa en todo el mundo ya sea en forma líquida, sólida o en pastillas, llegando a ser el plaguicida más utilizado en el sector agrícola y el segundo en sectores no agrícolas.³

8.2.5. Potencial de la Electroquimioluminiscencia en la Detección de Glifosato

En este sentido, la ECL basada en complejos solubles y estables en agua como lo es el $Ru(bpy)_3^{2+}$ o sus derivados, se ha convertido en un importante método de detección y de gran alcance en técnicas como la HPLC y electroforesis capilar (EC),^{12,13} debido a su alta sensibilidad y sencillez instrumental. La elección de $Ru(bpy)_3^{2+}$ y/o sus derivados es debido

a sus excelentes propiedades químicas, electroquímicas y fotoquímicas en solución acuosa y en presencia de oxígeno.¹⁴⁻¹⁹ Sin embargo, uno de los problemas de este sistema es que la ventana de potencial del agua es pequeña comparada con solventes apróticos.

De esta manera, resulta difícil generar catódicamente un intermediario oxidante adecuado para la generación de ECL. Una posibilidad ante esta adversidad, es la de disponer de una especie soluble en agua capaz de formar un intermediario altamente reductor por reacción con $Ru(bpy)_3^{3+}$. Este tipo de especies se conocen con el nombre de correactantes de ECL. En general, los mecanismos de reacción para los sistemas ECL que utilizan correactantes suelen ser más complicados que los mecanismos basados en la aniquilación de iones de carga opuesta generados electroquímicamente. En el **Esquema 21** se muestra el mecanismo general de producción ECL a través de un correactante anódico.

 $R - e^{-} \rightarrow R^{*+} \\ C - e^{-} \rightarrow C^{*+} \\ e^{*+} + C \rightarrow R + C^{*+} \\ C^{*+} \rightarrow C^{*}_{red} \\ C^{*+}_{red} + R \rightarrow R^{*-} + P \\ e^{*+} + R^{*-} \rightarrow R^{*} + R \\ R^{*+} + C^{*}_{red} \rightarrow R^{*} + P \\ e^{*+} + C^{*}_{red} \rightarrow R^{*} + P \\ e^{*+} + C^{*+}_{red} \rightarrow R^{*+} + P \\ e^{*+} + C^{*+}_{red} \rightarrow R^{*+}_{red} \rightarrow R^{*+}_{red}$

Esquema 21. Mecanismo general de sistema ECL con correactante anódico

Las sucesivas reacciones que tienen lugar entre el compuesto emisor de ECL (R) y el correactante (C) se pueden agrupar de la siguiente manera (**Esquema 21**): (a) reacciones redox sobre la superficie del electrodo, (b) reacciones químicas homogéneas, (c) formación

del estado excitado, el cual puede ocurrir mediante dos vías de reacción: la clásica aniquilación de iones o la vía que involucra intermediarios ($C \neq_{red}$) tales como radicales formados a partir de la descomposición de correactante oxidado.

Uno de los correactantes más usados son los derivados de aminas alifáticas (aminas primarias, secundarias y terciarias), las cuales son capaces de reaccionar con $Ru(bpy)_3^{3^+}$ para generar ($Ru(bpy)_3^{2^+}$)* produciendo emisión de luz, que puede ser cuantificada.^{17,20,21}A modo de ejemplo, el mecanismo de reacción para el sistema $Ru(bpy)_3^{+2}/Tripropilamina$ (TPrA) ha sido extensamente estudiado y descripto por muchos autores dado que presenta la mayor eficiencia de ECL y actualmente constituye la base en los equipos comerciales de ECL.^{17,19,20,22,23}

Como se mencionó en la introducción, en la Argentina se utiliza más de ochenta millones de kilogramos de glifosato (GLY) por año.³ Si se tienen en cuenta los posibles efectos nocivos y tóxicos del glifosato y sus derivados,1,3 y la extensiva utilización en la agricultura como en la jardinería ornamental, se hace evidente la importancia de su detección y cuantificación. Actualmente para obtener límites de detección del orden de los sugeridos para agua potable,⁹⁻¹¹ la mayoría de los métodos desarrollados requieren procedimientos de derivatización química. Por lo tanto, el desarrollo de técnicas de detección de GLY que permitan la detección directa sin modificaciones químicas previas que insuman mucho tiempo de análisis es de gran interés y representa un desafío analítico.

En este marco, para utilizar la ECL como técnica analítica de GLY, este debería tener la capacidad de producir el fenómeno ECL. Como GLY es una molécula no fluorescente se descarta su utilización como colorante ECL emisor de luz. Sin embargo, si analizamos la estructura molecular de GLY mostrada en la **Figura 43** se observa que presenta un grupo amino secundario, lo cual le otorga el potencial de ser utilizado en la generación de ECL como correactante permitiendo luego, su cuantificación sin modificación química. En el **Esquema 22** se muestra las reacciones que podrían tener lugar entre un emisor de ECL $-Ru(bpy)_3^{2+}$ y un correactante anódico -GLY, siguiendo la generalidad del **Esquema 21** mencionado anteriormente. La letra "P" del mismo modo

hace referencia a posibles productos secundarios provenientes de la descomposición del correactante, en este caso la descomposición de una amina secundaria.

$$\begin{array}{l} \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*2} \to \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*3} + e^{-} \\ \operatorname{GLY} \to \operatorname{GLY}^{*+} + e^{-} & \delta \end{array} \right\} (a) \\ \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*3} + \operatorname{GLY} \to \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*2} + \operatorname{GLY}^{*+} \right\} (b) \\ \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*3} + \operatorname{GLY}^{*+} \to \left(\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*2} \right)^{*} + P \right\} (c) \\ \left(\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*2} \right)^{*} \to \operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_{3}^{*2} + \operatorname{hv} \right\} (d)$$

Esquema 22. Mecanismo general de ECL entre Ru(bpy)₃+2 y GLY

En el **Esquema 22** se resumen tentativamente las sucesivas reacciones que podrían ocurrir entre $Ru(bpy)_3^{+2}$ y GLY. Las mismas pueden agruparse de la misma manera que en el **Esquema 21**: (a) reacciones redox sobre la superficie del electrodo, (b) reacciones químicas homogéneas, (c) formación del estado excitado y (d) emisión de luz. Finalmente, la cantidad de luz emitida es proporcional a la concentración de $Ru(bpy)_3^{2+}$ y GLY.

Entonces, en primer lugar se evaluó la posibilidad de utilizar el sistema $Ru(bpy)_3^{2+}/GLY$ como sistema ECL, para la detección y cuantificación de GLY. Por un lado, se realizaron experimentos de voltamperometría cíclica que permitieron conocer el comportamiento redox, en solución de buffer de fosfato (PBS) pH 8, de la molécula de $Ru(bpy)_3^{2+}$ y la de GLY. Una vez encontrados los potenciales redox para ambas especies y a fin de probar la detección de GLY en presencia de $Ru(bpy)_3^{2+}$, se realizaron experimentos de cronoamperometría sobre electrodos de Pt y Au. En segundo lugar, se procedió a la cuantificación de GLY mediante la realización de curvas de calibración sobre ambos electrodos de trabajo.

Finalmente, con el objetivo de optimizar el método de detección, se modificaron electrodos de Au mediante monocapas autoensambladas (SAMs). Para ello se prepararon mezclas de tioles alifáticos de igual longitud de cadena pero con diferentes grupos terminales. Se emplearon tres tioles que poseían los siguientes grupos terminales: un grupo metilo ($-CH_3$), un grupo ácido carboxílico (-COOH) y un grupo amino ($-NH_2$).

Dependiendo del pH del buffer la molécula de GLY como los grupos terminales, ácidos y básicos de las SAMs, presentaban diferentes cargas netas. Esto permitió estudiar posibles interacciones del tipo electrostático entre la molécula de GLY y los grupos terminales, logrando así una mayor selectividad y especificidad en el método de detección propuesto. A continuación, se muestran los estudios realizados para probar y desarrollar un método de detección ECL de GLY utilizando $Ru(bpy)_3^{+2}$ como especie emisora de luz y GLY como correactante.

8.3. Detección cuantitativa de GLY con electrodos desnudos

8.3.1. Caracterización electroquímica del sistema $Ru(bpy)_3^{+2}/GLY$

En solución acuosa, el voltamperograma de $Ru(bpy)_3^{+2}$ muestra una onda de oxidación reversible de un electrón (monoelectrónica) a 1.1 V vs. Ag/AgCl.²⁴ Por otra parte el Ru(bpy)_3⁺² también se puede reducir, sin embargo este proceso redox no es posible en solución acuosa dado que se encuentra a potenciales más allá de la ventana electroquímica del solvente. Generalmente, el Ru(bpy)_3⁺² se utiliza como especie emisora de ECL en presencia de correactantes anódicos. Es conocido que la generación de ECL en presencia de una amina como correactante requiere la oxidación de la misma, ya sea por un electrodo o por la especie Ru(bpy)_3⁺³ electrogenerada, para formar un catión radical que participará en la formación del estado excitado y la posterior emisión de luz.^{17,19,20,25} El **Esquema 21** precedente detalla de manera general las sucesivas reacciones que ocurren entre la especie emisora de luz, como por ejemplo Ru(bpy)_3⁺², y un correactante anódico, como por ejemplo una amina alifática.

En este trabajo de Tesis se utilizó como medio de reacción, una solución acuosa de buffer de fosfato (PBS) pH 8 formada a partir de la disolución de las siguientes sales de fosfato: K₂HPO₄ y NaH₂PO₄. La intensidad de la señal de ECL depende del pH cuando se utilizan aminas alifáticas como correactante, también se conoce que un pH 7,5-8 es un valor óptimo donde se alcanza la intensidad máxima de la señal de ECL.^{17,19,24,26} De la misma manera que para otros sistemas, previo a comenzar con los estudios ECL se realizaron experimentos electroquímicos para analizar el comportamiento redox de las especies individuales involucradas en la generación de ECL. En la **Figura 44** se resumen los voltamperogramas cíclicos (VCs) que se recogieron tanto para Ru(bpy)₃⁺² como para GLY sobre electrodos de Pt y Au.

El VC que se muestra en la Figura 44a representa la oxidación electroquímica de Ru(bpy)₃⁺² en presencia de un electrodo de Pt, en ella se distingue una onda de oxidación reversible con un $E_p = 1,1$ V, lo que concuerda perfectamente con la respuesta conocida de soluciones concentradas de Ru(bpy)₃⁺² (≥ 1 mM) en solución acuosa.^{17,24} Dicha respuesta se encuentra superpuesta al VC obtenido en ausencia de $Ru(bpy)_3^{+2}$ (curva a rayas), es decir una solución de PBS pH 8 (blanco). La curva a rayas muestra que la ventana electroquímica del buffer se extiende entre 0 V y 1,4 V, no mostrando señal de corriente faradaica en la región de oxidación de Ru(bpy)₃⁺² (~1,1 V), sin embargo se observa un rápido incremento de la corriente anódica más allá de 1,2-1,3 V lo que se atribuye principalmente a la oxidación del agua. En la Figura 44b se muestran los VCs obtenidos sobre un electrodo de Pt en presencia y ausencia -curva a rayas- de GLY. En el VC correspondiente no se distingue una respuesta redox clara por parte de las moléculas de GLY en solución, ya que la corriente del VC se asemeja a la del blanco. Esto indica que la oxidación de GLY en estas condiciones ocurre a potenciales cercanos al corte de la ventana electroquímica del electrolito en forma irreversible con formación de cationes radicales inestables. Este resultado esa en concordancia con estudios previos de aminas alquílicas.^{21,24}





Figura 44. Voltamperogramas cíclicos de $Ru(bpy)_3^{+2}$ (1 mM) en solución de PBS pH 8 sobre un electrodo de a) Pt y uno de c) Au. Voltamperogramas cíclicos de GLY (0,3 mM y 0,5 mM) en PBS pH 8 sobre un electrodo de b) Pt y uno de d) Au. En todos los casos se encuentra superpuesto el voltamperograma cíclico correspondiente a la solución de PBS pH 8 en ausencia de ambos analitos (--). Todos los voltamperogramas cíclicos se registraron a 0.1 V s⁻¹.

Respecto al comportamiento redox de $Ru(bpy)_3^{+2}$ y GLY sobre un electrodo de trabajo de Au, las **Figura 44c** y **44d** muestran los VCs obtenidos en cada caso. En ausencia de $Ru(bpy)_3^{+2}$ y GLY (curva a rayas) la respuesta voltamperómetrica que se observa corresponde a la oxidación/reducción de la capa de óxido que se forma sobre la superficie del oro.²⁷ De la misma manera, todos los electrodos de metales nobles a potenciales suficientemente positivos, forman una capa de óxido estable en solución acuosa con una estequiometría bien definida, la cual puede ser usada para estimar el área superficial electroquímicamente accesible de un electrodo.²⁸

El crecimiento de la capa de óxido sobre la superficie de oro comienza aproximadamente a 0,6 V, potencial a partir del cual la corriente anódica empieza a crecer rápidamente a medida que la cobertura del óxido sobre la superficie aumenta y alcanza su valor máximo alrededor de 0,9 V, cuando se ha producido la formación completa de la capa de óxido. Luego, la corriente anódica decae y vuelve a aumentar rápidamente en la zona de la descarga del agua. Durante el barrido de potencial inverso, la reducción del óxido superficial aparece a 0,39 V aproximadamente. En la **Figura 44c**, el VC que corresponde a la solución de Ru(bpy)₃⁺² muestra un leve aumento de la corriente anódica alrededor de 1,1 V (señalizado con una flecha) en comparación al VC para la solución de PBS en ausencia de Ru(bpy)₃⁺², indicando la posible oxidación irreversible de la especie electroactiva. La densidad de corriente anódica es mucho menor a la observada sobre Pt, lo cual puede ser atribuido a un efecto de pasivación (envenenamiento) de la superficie del Au en esta región de potencial.²⁸

De igual forma que sobre Pt, la descarga electroquímica de GLY sobre Au, tal cual se muestra en la **Figura 44d**, no es evidente. La formación del catión radical por oxidación directa de GLY en la ventana electroquímica de PBS pH 8 tal vez, podría ocurrir en muy bajas concentraciones. Tal como se ha observado para otras aminas alifáticas,¹⁷ se espera entonces que este proceso de electrodo no contribuya al mecanismo global de ECL. No obstante, la generación de ECL puede ocurrir mediante la formación del catión radical en solución a partir del Ru(bpy)₃⁺³ electrogenerado, según se detalló en las reacciones (d) de los **Esquema 21** y **22**.

8.3.2. Capacidad ECL para el sistema $Ru(bpy)_3^{+2}/GLY$

A continuación, se determinó si el GLY se podría utilizar como correactante en presencia de Pt y Au como electrodos de trabajo. Para ello se estudió la respuesta de ECL del sistema $Ru(bpy)_3^{2+}/GLY$ mediante experimentos de cronoamperometría. Durante los experimentos de ECL a menudo se utilizan saltos de potencial consecutivos –en lugar de barridos del potencial– entre los potenciales a los cuales ocurre el proceso redox.

Generalmente para establecer los potenciales a los cuales se efectuará el salto de potencial se procede de la siguiente manera: por un lado existe una región de potencial previo al proceso de oxidación donde no existe corriente faradaica, luego la elección de E_i (**Figura 44a** y **44c**) será en esta región. Por otro lado, a valores de potencial más positivos la cinética para la reacción de oxidación de Ru(bpy)₃²⁺ es tan rápida que el Ru(bpy)₃²⁺ no puede coexistir con el electrodo y su concentración superficial tiende a ser nula, es decir tan rápido Ru(bpy)₃²⁺ difunda hacia el electrodo, éste se oxida.²⁰ Normalmente, el E_f se ubica en esta región de potencial donde la respuesta en corriente es máxima y se encuentra limitada por la difusión de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo.²⁸



Figura 45. Diagrama de saltos de potencial aplicados.

En concreto, el programa de potencial que se usó en nuestro caso consistió de un salto de potencial entre un $E_i = 0V$ ($\tau_i = 0,1$ seg.), donde no se observa ningún proceso

181

faradaico, y un $E_f = 1,1$ V ($\tau_I = 0,1$ seg.), potencial al cual comienza a oxidarse el Ru(bpy)₃²⁺ (Figura 44a y 44c). En la Figura 45 se muestra el programa de potencial utilizado.

En primer lugar, se evalúo la respuesta de ECL de una solución de PBS conteniendo $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2^+}(1\,\mathrm{mM})$ en ausencia de GLY sobre un electrodo de Pt, luego de aplicar un salto de potencial ($E_i = 0V - E_f = 1, 1 V$). Los resultados se muestran en la **Figura 46a**, en la cual se observa que a pesar de la ausencia de GLY, se advierte una respuesta de ECL (I_{ECL}). Es bien conocido que $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{3^+}$ generado sobre el electrodo durante el pulso de potencial, en estas condiciones puede reaccionar con los iones oxhidrilos y producir una señal de ECL.¹⁷ Este mecanismo de operación se hace importante en soluciones acuosas con valores de pH superiores a 9.^{17,21}

En segundo lugar, se estudió la respuesta de ECL en una solución de $Ru(bpy)_3^{2^+}$, de igual concentración que la anterior (1 mM), en presencia de GLY a distintas concentraciones. La señal de ECL que se observa en la **Figura 46b** permite demostrar que el GLY tiene la capacidad de generar señal ECL, ya que se observa claramente la producción de una señal de mayor intensidad que la observada en la **Figura 46a**. Por otra parte, si se incrementa la concentración de GLY con respecto a la utilizada en la **Figura 46b** se observa un consecuente aumento en la señal de ECL (**Figura 46c**). Esto último demuestra que el sistema Ru(bpy)_3²⁺/GLY es sensible a la concentración de GLY, ya que a medida que se adiciona una mayor cantidad de GLY la respuesta de ECL aumenta.

A fin de comparar los resultados obtenidos de manera cuantitativa, se procedió a integrar la señal de ECL en función del tiempo para el salto de potencial en los tres casos estudiados. Así se observa, que la integral de la señal de ECL obtenida en la solución de $Ru(bpy)_3^{2+}$ sin GLY fue de un 4,26% respecto a la integral calculada para una solución de $Ru(bpy)_3^{2+}$ en presencia de GLY en una concentración 25 µM. Finalmente, al agregar una mayor cantidad 100 µM de GLY, la integral de la señal de ECL aumentó un 59,08% con respecto a la obtenida en la solución con menor concentración de GLY.

De este modo, se comprueba que el GLY es capaz de actuar como correactante en presencia de $Ru(bpy)_3^{2+}$, no solo porque es capaz de producir una intensidad de ECL

apreciable sino también, porque la señal de ECL es sensible a la concentración de GLY en solución, tal como se ha observado para otras aminas alifáticas utilizadas como correactantes, entre ellas el GLY pero en presencia de un electrodo de carbono vítreo.^{17,19,24}



Figura 46. Intensidad de ECL vs. tiempo para un salto de potencial sobre un electrodo de Pt, entre un $E_i = 0$ V y un $E_f = 1,1$ V. **a)** Ru(bpy)₃⁺² (1 mM, la misma para los tres casos) **b)** Ru(bpy)₃⁺²+GLY (25 μ M) **c)** Ru(bpy)₃⁺²+GLY (100 μ M).

Sin embargo, cuando se aplica más de un salto de potencial, los resultados experimentales que se muestran más adelante en la **Figura 47**, revelan un rápido decaimiento de la señal de ECL en función del tiempo. La respuesta de ECL en función del tiempo, obtenida luego de la aplicación de varios saltos de potencial consecutivos con un tiempo de espera entre cada salto de 10 segundos, se midió en una solución de Ru(bpy)₃⁺² con una concentración de GLY 50 μ M. En este caso la intensidad de ECL, I_{ECL} medida como la máxima intensidad obtenida para un salto de potencial, para el segundo salto de potencial solo es del 16% respecto del primero. Por otra parte, el tiempo de vida media de la señal ECL, medido como el ancho de pico a I_{ECL}/2, en el segundo salto realizado es de 40 ms mientras que para el primero es de 80 ms.

En la literatura, ha sido reportado que la oxidación de aminas sobre electrodos de Pt se encuentra fuertemente inhibida debido a la formación de óxidos sobre la superficie metálica, lo cual conlleva a una disminución en la respuesta de ECL cuando se emplean aminas como correactantes.³⁰



Figura 47. Intensidad de ECL en función del tiempo para el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}/\text{GLY}$ (1 mM/50 μ M) en 0,1 M PBS (pH 8) sobre un a) electrodo de Pt y un b) electrodo de Au. Las figuras insertadas corresponden a la respuesta de ECL para el segundo salto de potencial (para el cálculo de tiempo de vida medio).

Las dificultades mencionadas con anterioridad hacen que, al menos sobre un electrodo de Pt, la detección de GLY sea inviable o muy poco práctica. Los investigadores Zu y Bard encontraron que la eficiencia de ECL para el sistema $Ru(bpy)_3^{2+}/TPrA$ en medio acuoso es mayor sobre un electrodo de Au que sobre un electrodo de Pt.³⁰ Teniendo en cuenta este antecedente, se estudió la respuesta ECL para $Ru(bpy)_3^{2+}/GLY$ sobre un electrodo de Au (**Figura 48**), bajo las mismas condiciones experimentales descriptas



previamente para Pt. El salto de potencial se realizó entre 0 V y 1.1V, según la descarga electroquímica de $Ru(bpy)_3^{2+}$ tanto en Au como en Pt (Figura 44a y 2c).

En la **Figura 48** se muestra la señal de ECL que surgió al aplicar un pulso de potencial sobre un electrodo de oro en una solución de $Ru(bpy)_3^{+2}$ sin GLY (**Figura 48a**) y con distintas concentraciones de herbicida (**Figura 48b** y **Figura 48c**). En primer lugar y del mismo modo que sobre Pt, se observó una intensidad de ECL apreciable para el sistema $Ru(bpy)_3^{+2}/GLY$ cuando se usa un electrodo de Au como electrodo de trabajo. A su vez, la señal de ECL medida aumenta en función del incremento de la concentración de GLY indicando de esta manera su utilidad como correactante. El área calculada para la señal de ECL en presencia de una concentración de GLY 25 μ M, es un 75,8% mayor que el área obtenida para una solución de Ru(bpy)_3⁺² en ausencia de GLY. Mientras que el área calculada para la señal de ECL en solución de GLY 100 μ M es un 83% mayor que sin GLY.

De la misma manera que para un electrodo de Pt, cuando se evaluó la respuesta ECL al aplicar sucesivos saltos de potencial sobre un electrodo de Au en una solución acuosa de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ en presencia de GLY 50 μ M, se observó que la intensidad de ECL decaía en función del tiempo con cada nuevo salto de potencial. A pesar de ello, como se observa en **Figura 47b**, existe una mejora de la I_{ECL} con el tiempo en comparación con Pt. En el caso del electrodo de Au, la integral sobre la señal ECL para el segundo salto aplicado es aproximadamente el 39% de la observada en el primero. Por otra parte, también se aprecia que el tiempo de vida media de la señal mejora considerablemente, siendo en este caso de 140 ms para el segundo salto de potencial. Sin embargo, y al igual que en el caso de Pt, se observa una rápida degradación de la señal electroquímica con el número de ciclos aplicados.



Figura 48. Intensidad de ECL vs. tiempo para un salto de potencial entre un $E_i = 0$ V y un $E_f = 0,9$ V en presencia de un electrodo de Au. **a**) Ru(bpy)₃⁺² (1 mM en 0,1 M PBS (pH 8) en los tres casos) **b**) Ru(bpy)₃⁺²+GLY (25 μ M) **c**) Ru(bpy)₃⁺²+GLY (100 μ M)

Por otra parte, del análisis ECL se observa que la señal de ECL se hace detectable cuando se aplica un potencial cercano al de oxidación del $Ru(bpy)_3^{+2}$ (**Figura 49**), lo que sugiere que no es necesaria la oxidación electroquímica de GLY para la formar el estado excitado de $Ru(bpy)_3^{+2}$. Este comportamiento está de acuerdo con lo propuesto por los estudios de ECL con GLY y correactantes derivados de otras aminas alifáticas realizados por Jin y sus colaboradores sobre un electrodo de carbono vítreo.²⁴

Las aminas alquílicas terciarias se oxidan a potenciales menores que las aminas primarias debido al efecto de estabilización que ejercen los grupos alquílicos sobre el catión radical. Así, por ejemplo, cuando se utiliza TPrA como correactante en presencia de $Ru(bpy)_3^{+2}$, se observa que la oxidación electroquímica de la TPrA genera cationes radicales a un potencial menor que el potencial de oxidación de $Ru(bpy)_3^{+2}$. El mecanismo de ECL propuesto para este caso postula que los cationes radicales de la TPrA son capaces de iniciar el proceso.^{17,19,20} Por otra parte, si se utiliza una amina alquílica primaria no se

observa la oxidación electroquímica dentro de la ventana electroquímica del agua. En este caso el mecanismo propuesto sugiere que la ECL es iniciada por $Ru(bpy)_3^{+3,24}$



Figura 49. Voltamperograma y la correspondiente respuesta de ECL para $Ru(bpy)_3^{+2}$ (1 mM) en 0,1 M PBS (pH8)a 0,1 V s⁻¹ y en presencia de GLY (100 μ M).

En el caso de GLY, que tiene en su estructura una amina secundaria y que sus cadenas alquílicas están sustituidas por dos grupos atractores de electrones que desestabilizan al catión radical (**Figura 43**), es de esperar que posea un potencial de oxidación similar al de aminas primarias. Efectivamente su oxidación ocurre a un potencial mayor que el potencial de oxidación de $Ru(bpy)_3^{+2}$ (**Figura 44b** yFigura 44d), por lo tanto es posible que la generación de ECL se inicie a partir de cationes radicales del GLY formados en solución mediante el $Ru(bpy)_3^{+3}$ electrogenerado. En función de lo observado

experimentalmente y de lo encontrado en la literatura^{17,19,24} se propone para el sistema $Ru(bpy)_3^{+2}/GLY$ el mecanismo de generación de ECL detallado en siguiente esquema.

$$Ru(bpy)_{3}^{+2} \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{+3} + e^{-} \qquad (1)$$

$$Ru(bpy)_{3}^{+3} + HOOC - H_{2}C - NH - CH_{2} - PO_{3}H_{2} \rightarrow HOOC - H_{2}C - NH^{*+} - CH_{2} - PO_{3}H_{2} + Ru(bpy)_{3}^{+2} \qquad (2)$$

$$HOOC - H_{2}C - NH^{*+} - CH_{2} - PO_{3}H_{2} \rightarrow HOOC - HC^{*} - NH - CH_{2} - PO_{3}H_{2} + H^{+} \qquad (3)$$

$$Ru(bpy)_{3}^{+3} + HOOC - HC^{*} - NH - CH_{2} - PO_{3}H_{2} \rightarrow (Ru(bpy)_{3}^{+2})^{*} + P \qquad (4)$$

$$(Ru(bpy)_{3}^{+2})^{*} \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{+2} + hv \qquad (5)$$

Esquema 23. Mecanismo propuesto de ECL entre $Ru(bpy)_3^{+2}$ y GLY.

El GLY (HOOC-H₂C-NH-CH₂-PO₃H₂) se oxida en presencia del Ru(bpy)₃⁺³ electrogenerado sobre el electrodo (**reacción 1 Esquema 23**) para producir cationes radicales HOOC-H₂C-NH⁺⁺-CH₂-PO₃H₂ en solución según la **reacción 2**. Inmediatamente formado HOOC-H₂C-NH⁺⁺-CH₂-PO₃H₂se desprotona (PBS pH 8) para formar el radical intermediario altamente reductor HOOC-HC⁺-NH⁺-CH₂-PO₃H₂según la **reacción 3** del **Esquema 23**. Luego, estos radicales deprotonados pueden reducir el Ru(bpy)₃⁺³ a Ru(bpy)₃⁺² en estado excitado, (Ru(bpy)₃⁺²)^{*}, como se muestra en la **reacción 4**. Y finalmente se produce la emisión de luz a partir de (Ru(bpy)₃⁺²)^{*} (**reacción 5** del **Esquema 23**).

8.3.3. Determinación cuantitativa de GLY

Finalmente, para analizar la factibilidad del sistema ECL $Ru(bpy)_3^{2+}/GLY$ en la determinación cuantitativa de GLY, se construyeron curvas de calibración con ambos electrodos estudiados —Pt y Au— (Figura 50). Para la obtención de las mismas se utilizó un
intervalo de concentraciones que se extiende desde 0 μ M hasta 100 μ M de GLY, mientras que la concentración de Ru(bpy)₃²⁺ fue de 1mM y se mantuvo constante en todas las soluciones preparadas. Se aplicó un programa de potencial que consistía de tres pulsos de potencial como el mostrado previamente en la **Figura 45**. Luego se integró la señal de ECL para cada salto de potencial y se obtuvo un valor promedio, dicho valor es el que se registra en las curvas de calibración de la **Figura 50**. A su vez, cada experimento a una dada concentración de GLY se llevó a cabo por duplicado.



Figura 50. Curvas de calibración de GLY: a) con un electrodo de Pt y b) con un electrodo de Au.

Las ecuaciones de cada regresión lineal se describen en la **Tabla 5**. A partir de las curvas experimentales, se puede observar un incremento de aproximadamente 2 órdenes de magnitud en la señal de ECL cuando se utiliza Au en lugar de Pt como electrodo de trabajo en la celda electroquímica. Estos resultados experimentales claramente muestran que para el sistema $Ru(bpy)_3^{2+}/GLY$ el material del electrodo de trabajo tiene efecto sobre el proceso de ECL, lo cual no resulta extraño ya que también ha sido observado para otras aminas alifáticas usadas como correactantes ECL en presencia de $Ru(bpy)_3^{2+}.^{17,19,30}$

189

Tabla 5. Curvas de calibración y parámetros analíticos para la determinación de GLY en agua.

Electrodo	Ecuación de la regresión ^a	r ^b	LOD ^c (µM/L)	LOQ ^d (µM/L)
Pt	$y=(7\pm3) \ge 10^5 x + (1\pm3) \ge 10^7 (n=6)$	0.49305	94,02	286,65
Au	$y=(1,3\pm0,3) \times 10^{3}x + (3\pm1) \times 10^{4} (n=6)$	0.84205	53,39	162,78

^ay: Área de ECL; x: concentración del analito (GLY, μ M/L). Cada dato es presentado con su respectiva desviación estándar (±SD).

^b Coeficiente de correlación

^c Límite de detección

^dLímite de cuantificación

8.4. Detección cuantitativa de GLY con electrodos modificados

8.4.1. Detección cuantitativa de GLY en un electrodo de Au modificado: Au/SAM-CH3

En primer lugar, se modificó la superficie de un electrodo de Au mediante la adsorción de moléculas de l-undecanotiol (HS(CH₂)₁₀CH₃, UDT). El UDT fue seleccionado teniendo en cuenta que, al no poseer grupos ionizable, es de esperar que las SAMs (SAM-CH₃) formadas sobre el electrodo de trabajo no posean una carga neta al pH de trabajo. Las SAMs fueron ensambladas por adsorción espontánea desde una solución 1 mM preparada en etanol absoluto. El electrodo de Au se dejó sumergido entre 12 y 18 hs en la solución que contenía el compuesto organosulfurado.

Este procedimiento es ampliamente utilizado y tiene su origen en los primeros estudios con monocapas autoensambladas, los detalles experimentales son el resultado de una combinación de estudios diseñados para optimizar la reproducibilidad y estabilidad de la SAM.³⁰ Una vez transcurrido el tiempo de adsorción, se enjuagó cuidadosamente el electrodo con etanol absoluto y luego con una solución de buffer (PBS pH 8). De esta manera, el electrodo modificado —denominado como Au/SAM-CH₃— se encuentra listo para ser utilizado. A continuación, se evaluó la respuesta electroquímica del electrodo Au/SAM-CH₃en el mismo PBS pH 8 que se usó anteriormente para las medidas experimentales con los electrodos desnudos de Pt y Au.

Como era de esperar, la SAM-CH₃ bloquea efectivamente la oxidación/reducción de la superficie de Au ya que no se observa la formación del óxido superficial alrededor de 0,9 V, como lo revela la comparación entre las **Figura 51a** yFigura 51b. De la misma manera que se ha observado para otros alcanotioles, el UDT se ensambla sobre la superficie del Au mediante interacciones Au-tiolato.³¹⁻³³

La Figura 51c muestra la respuesta voltamperométrica del $Ru(bpy)_3^{2+}$ en solución de PBS pH 8 sobre el electrodo modificado (Au/SAM-CH₃). El correspondiente VC presenta una onda de oxidación reversible con un potencial de pico (E_p) centrado en 1,1 V, lo que concuerda perfectamente con la respuesta típica de esta especie electroactiva en solución acuosa sobre un electrodo de carbono vítreo.²⁴ A diferencia de lo observado anteriormente para el electrodo de Au desnudo (Figura 44c), en el VC para el electrodo de Au/SAM-CH₃ se puede observar claramente la oxidación electroquímica del Ru(bpy)₃²⁺. Esta observación sugiere un efecto protector por parte de la SAM-CH₃ sobre la superficie de Au, impidiendo de esta manera la formación de los óxidos superficiales y permitiendo en consecuencia la oxidación electroquímica del Ru(bpy)₃²⁺.

A fin de evaluar la utilización de GLY como correactante con el electrodo modificado se prueba la respuesta ECL del Ru(bpy)₃²⁺ en presencia de dos concentraciones distintas de GLY sobre el electrodo Au/SAM-CH₃. Para ello, se realiza un salto de potencial entre un $E_i = 0$ V y un $E_f = 0.9$ V, cuya duración es de 0,1 segundo ($\tau_i = 0,1$), en soluciones de Ru(bpy)₃²⁺ en ausencia y presencia de distintas concentraciones de GLY.



Figura 51. Comportamiento electroquímico de una solución de PBS pH 8 en a) electrodo de Au desnudo y b) electrodo de oro modificado: Au/SAM-CH₃. c) Voltamperograma cíclico para una solución de Ru(bpy)₃⁺² (1 mM) en solución de PBS pH 8 sobre el electrodo Au/SAM-CH₃. El voltamperograma a rayas (---) representa la respuesta de una solución de PBS pH 8 en ausencia de la especie electroactiva.

Cabe destacar que a diferencia del procedimiento utilizado con los electrodos desnudos, el pulso de potencial no se realiza al E_p correspondiente a la onda de oxidación de Ru(bpy)₃²⁺ (**Figura 51c**). Esto se debe a que por encima de 0,8 V($E \ge 0,8$ V), tal como se muestra en el VC de la **Figura 51b**, la densidad de corriente aumenta considerablemente, lo cual puede estar indicando que la SAM-CH₃comienza a oxidarse y desorberse desde la superficie de Au.³⁴ Entonces, se usará como E_f para el pulso de potencial un valor de 0,9 V, valor que representaría una situación de compromiso entre la estabilidad de la SAM-CH₃sobre la superficie del Au y un valor de potencial lo más cercano a 1,1 V donde ocurre la descarga electroquímica de Ru(bpy)₃²⁺, lo que aseguraría una respuesta de ECL máxima.



Figura 52. Intensidad de ECL vs. tiempo para un salto de potencial entre un $E_i = 0$ V y $E_f = 0.9$ V sobre un electrodo de Au modificado: Au/SAM-CH₃. **a)** Ru(bpy)₃⁺² (1 mM en los tres casos) **b)** Ru(bpy)₃⁺² + GLY (25 μ M) **c)** Ru(bpy)₃⁺² + GLY (100 μ M).

En la **Figura 52**, puede observarse que la señal de ECL aumenta en magnitud a medida que la concentración de GLY en solución es mayor. Consecuentemente, la integral de la señal de ECL (área de ECL) para la solución más concentrada de GLY es un 76,8% mayor que la integral de la señal de ECL en la solución más diluida de GLY y a su vez un 99,2% superior que el área de ECL en ausencia de GLY. En la **Figura 52**, y al igual que en las **Figura 46** y **48**, la concentración de Ru(bpy)₃²⁺ se mantuvo constante en 1 mM. En consecuencia, se puede concluir que la molécula de GLY, de la misma manera que ya se observó para los electrodos de Pt y Au sin modificar, puede actuar como correactante en presencia de Ru(bpy)₃²⁺ como emisor de ECL cuando se utiliza un electrodo de Au/SAM-CH₃.

Para probar la estabilidad de la señal de ECL en el sistema Ru(bpy)₃2+/GLY sobre un electrodo de Au/SAM-CH₃ se realiza –al igual que para los electrodos desnudos– saltos

de potencial sucesivos en una solución de PBS pH 8 que contiene ambos analitos, $Ru(bpy)_3^{2+}$ y GLY en una concentración de 1 mM y 50 µM respectivamente. A modo de comparación, en la **Figura 53** se presentan las repuestas de ECL en función del tiempo para ambos electrodos de Au, modificado con SAM-CH₃ y sin modificar (igual al de la **Figura 47b**). Los resultados experimentales revelan una sustancial mejoría en dos aspectos fundamentales: a) estabilidad de la señal ECL en el tiempo, donde la I_{ECL}(valor máximo de intensidad para un salto de potencial), para el segundo pico es del 75% con respecto al primero; b) tiempo de vida media de la señal (medido como el ancho de pico a I_{ECL}/2 para el segundo salto de potencial) el cual en este caso es de 1170 ms, un orden de magnitud mayor que en el caso de Au sin modificar.



Figura 53. Intensidad de ECL en función del tiempo para el sistema Ru(bpy)₃⁺²/GLY (1 mM/50 μ M) en 0,1 M PBS (pH 8) sobre un a) electrodo de Au desnudo y un b) electrodo de Au modificado:Au/SAM-CH₃. Las figuras insertadas corresponden a la respuesta de ECL para el segundo salto de potencial (para cálculo tiempo de vida medio).

Por lo tanto, el electrodo de Au/SAM-CH₃ mejora considerablemente, de manera cualitativa y cuantitativa, la respuesta de ECL para la detección de GLY. No obstante, la/s causa/s de esta mejora en la calidad de la señal ECL sobre Au-UDT puede/n ser de distinto tipo y origen: a) estabilización de la superficie con el consecuente bloqueo o desplazamiento de la formación de óxidos a mayores potenciales; b) la aparición de una barrera física para la adsorción de posibles productos de oxidación provenientes principalmente del GLY, una amina secundaria; c) un efecto de pre-concentración del glifosato dentro de la monocapa autoensamblada y/o d) la separación física entre la especie emisora y la superficie metálica del electrodo, evitando de esta manera un posible efecto de inhibición (*quenching*).

Finalmente, se estudia si existe una correlación lineal entre la señal de ECL y la concentración de GLY cuando se usa el electrodo de Au/SAM-CH₃. Para ello se construye una curva de calibración bajo las mismas condiciones experimentales que se usaron para Pt y Au desnudo, a excepción de que en el caso del electrodo Au/SAM-CH₃ el E_f de cada salto de potencial fue de 0,9 V en lugar de 1,1 V. Durante los experimentos, la concentración de Ru(bpy)₃²⁺ permaneció constante y solo se cambió la concentración de GLY de manera tal que el intervalo se extendiera desde 1 µM hasta 100 µM. La curva experimental obtenida para el electrodo de Au/SAM-CH₃ (Figura 54b) mejora considerablemente respecto a la obtenida con el electrodo de Au sin modificar (Figura 54a), que se muestra nuevamente para lograr una mejor comparación entre los resultados experimentales. La ecuación de la regresión lineal para el electrodo de Au/SAM-CH₃ se describe en la Tabla 6.

Cuando se utiliza el electrodo de Au modificado, la detección analítica no solo resulta más sensible (valor de pendiente más alto), sino que también la reproducibilidad en la señal de ECL, para dos medidas consecutivas en una solución de GLY de una dada concentración, es mayor que en los casos anteriores y el factor de correlación momentoproducto (r) es más próximo a 1 que cuando se utilizó el Au desnudo, infiriendo que los puntos experimentales se ajustan mejor a una línea recta.



Figura 54. Curvas de calibración de GLY: **a**) con un electrodo de Au desnudo; **b**) con un electrodo de Au modificado $-Au/SAM-CH_3$ -.

La **Tabla 6** resume los parámetros estadísticos para las curvas de trabajo y sus correspondientes límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs). Se entiende como límite de detección (LOD), la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. En la definición moderna, el LOD se calcula en función del desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco $(s_0)^{35}$ y los coeficientes de Student para v grados de libertad y un 95 % de nivel de confianza, $t_{0,05,v}$. De este modo, el LOD está dado por:

LOD:
$$t_{0,05;m-2} \ge s_0$$
 (1)

Definición que ha sido adoptada por la IUPAC³⁶ e ISO.³⁷ En la práctica, dado que *m* (número de réplicas) es un número relativamente grande, el valor de $(2 \ge t_{0,05;m-2})$ tiende a 3,3 por lo que una ecuación aproximada para el límite de detección es:

LOD:
$$3,3 s_0$$
 (2)

196

Los programas de análisis de datos comerciales –tal como Origin Pro 8 que se utilizó para el análisis y confección de todas las curvas de calibración que se muestran en esta Tesis permiten efectuar una regresión por cuadrados mínimos para un conjunto de datos experimentales. Conjuntamente con ello, estos programas proveen los parámetros necesarios para el cálculo de s_0 y finalmente, calcular el LOD según la **ec. (2)**.

Por su parte, el límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración cuantificable de manera confiable. Este parámetro se considera como la concentración correspondiente a 10 veces la desviación estándar del blanco, con lo cual:

$$LOQ: 10 s_0 \tag{3}$$

De este modo, la desviación estándar relativa (SDR) para una concentración igual al LOQ es del 10%, valor que se estima convencionalmente como la máxima SDR aceptable para cuantificar un analito en una muestra real.

Electrodo	Ecuación de la regresión ^a	r ^b	LOD ^c (µM/L)	LOQ ^d (µM/L)
Au	$y=(1,3\pm0,3) \times 10^{3}x + (3\pm1) \times 10^{4} (n=6)$	0,84205	53,39	162,78
Au/SAM-CH ₃	$y=(1,38\pm0,08) \times 10^{6}x + (2,5\pm0,5) \times 10^{7}$ (n= 6)	0,98246	8,43	25,69

Tabla 6. Curvas de calibración y parámetros analíticos para la determinación de GLY en agua.

^ay: Área de ECL; x: concentración del analito (GLY, μ M/L). Cada dato es presentado con su respectiva desviación estándar (±SD).

^b Coeficiente de correlación

^c Límite de detección

^dLímite de cuantificación

La ecuación de regresión lineal para cada uno de los electrodos de Au, modificado y sin modificar, arroja un valor para la pendiente que es cuatro órdenes de magnitud superior en el electrodo Au/SAM-CH₃ con respecto al electrodo de Au desnudo. Esto indica que la detección de GLY, en el intervalo de concentraciones propuesto, es considerablemente más

sensible cuando se emplea el electrodo de Au modificado. Ambos parámetros, pendiente y ordenada al origen, con sus respectivas desviaciones estándar se detallan en la **Tabla 6**.

La reproducibilidad en la señal de ECL se examinó por duplicado en todas las concentraciones de GLY estudiadas y consecuentemente resultó tener mayor repitibilidad la curva de trabajo para el electrodo de Au/SAM-CH₃. También, el coeficiente de correlación (*r*) para la recta de regresión se encuentra más próximo a 1 en el electrodo de Au/SAM-CH₃, infiriendo que los puntos experimentales se ajustan mejor a una línea recta para el electrodo de Au modificado. Por último, el LOD para GLY en Au/SAM-CH₃ y en Au desnudo fue de 8,34 y 53,39 μ M/L respectivamente. Si se expresa el LOD en unidades de mg/L se obtiene los siguientes valores: 1,41 mg/L para Au/SAM-CH₃ y 9,03 mg/L para Au desnudo (considerando un peso molecular de 169,07 g/mol).

Algunos organismos internacionales y nacionales han establecidos valores límites en relación a la presencia de GLY en agua potable: la US EPA⁹ y la CWQG de Canadá¹⁰ establecen un valor de 0,7 mg/L y 0,8 mg/L respectivamente, la Unión Europea fija un valor de 1×10^{-4} mg/L,11 mientras que la OMS considera no necesario un valor guía para GLY pero sí para AMPA, su principal derivado, y establece para este último un valor de 0,9 mg/L.³ En nuestro país la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación sugiere un valor guía ≤0,3 mg/L, expresado como sal de glifosato de isopropilamina.¹

En comparación con estos valores, el LOD obtenido para Au/SAM-CH₃ indica que el método de detección de GLY, bajo las condiciones experimentales mencionadas previamente, permite detectar GLY en concentraciones superiores a las establecidas por la reglamentación nacional e internacional vigente. En este sentido, a continuación se presentarán modificaciones en las condiciones experimentales referentes al cambio del alcanotiol utilizado para la modificación del electrodo de Au con el objetivo de disminuir el límite de detección y optimizar el método de detección.

8.4.2. Detección cuantitativa de GLY en electrodos de Au modificados: Au/SAM-CH₃ | COOH y Au/SAM-CH₃ | NH₂

El empleo de monocapas autoensambladas (SAMs) permite diseñar electrodos con propiedades superficiales controlables de manera efectiva y a su vez, se ha convertido en una de las técnicas más populares para crear superficies funcionales bien definidas.^{32,33} Las ventajas de las SAMs sobre sustratos de oro y plata son variadas e incluyen: simplicidad en el método de preparación, versatilidad, estabilidad, reproducibilidad y la posibilidad de introducir diferentes funcionalidades químicas con un alto nivel de ordenamiento molecular unidimensional.^{32,33}

La habilidad para controlar y manipular las propiedades superficiales de electrodos metálicos mediante la utilización de SAMs puede conducir a una variedad de efectos interesantes, tales como el mejoramiento de la selectibilidad, sensibilidad y reproducibilidad. Finalmente, las SAMs también ofrecen una alternativa conveniente para la preparación de superficies con propiedades diseñadas previamente para el reconocimiento de analitos. En la literatura se encuentran varios reportes donde se usan SAMs para mejorar la selectividad y/o sensibilidad del electrodo de Au en numerosas aplicaciones electroanalíticas.³¹⁻³³ La variación de la estructura del grupo terminal en el adsorbato (tioles) permite por ejemplo: el estudio de transferencias electrónicas de largo alcance, la inmovilización de proteínas y otras macromoléculas, simulación de interfaces biológicas, etc.^{31,32}

La utilización de grupos polares con una carga neta pero electroinactivos ha demostrado que gobierna la respuesta redox de especies cargadas electroactivas en solución, mediante la interacción electrostática entre ellos.³⁸ Numerosos estudios revelan que la transferencia electrónica de especies electroactivas con una carga neta, como $Fe(CN)_6^{-3}$ y Ru(NH₃)₆⁺², en un electrodo de Au modificado con SAMs con grupos terminales amino cargados positivamente (11-amino-1-undecanethiol clorhidrato: AUT), puede explicarse en función de una absorción electrostática selectiva de la especie

electroactiva a través de la monocapa, lo cual estaría controlado por la naturaleza de las interacciones electrostáticas establecidas en la interface SAM-solución.³⁸

El siguiente esquema muestra de manera simplificada el comportamiento regular esperado en término de las interacciones electrostáticas, repulsivas y atractivas, entre especies redox con una carga neta en solución y los grupos terminales ionizables de SAMs sobre un electrodo de Au.³⁹



Esquema 24. Modelo simplificado para explicar la transferencia electrónica de especies cargadas en solución a través de SAMs de alcanotioles con una carga neta.³⁹

El modelo general que se muestra en el **Esquema 24** ilustra por un lado, las interacciones repulsivas entre analitos electroactivos con una carga de igual signo que la SAM. Y por otro lado, las interacciones del tipo atractivas cuando el analito en solución tiene una carga opuesta a la de la SAM.

En función de los antecedentes bibliográficos mencionados anteriormente y teniendo en cuenta que el analito de nuestros interés —GLY— bajo las condiciones utilizadas posee una carga neta negativa de 2 unidades (Esquema 20) se espera que mediante la utilización de SAMs cargadas positiva y negativamente se pueda lograr una

mayor selectividad y especificidad en la detección en función de posibles interacciones del tipo electrostático entre el analito y los grupos terminales de la SAMs.

Para ello, se escogieron dos alcanotioles de igual longitud de cadena que el 1undecanotiol ($HS(CH_2)_{10}CH_3$, UDT) utilizado anteriormente pero con diferente grupo terminal. A diferencia del UDT, el cual tiene un grupo metilo (--CH₃) no ionizable en uno de los extremos de su cadena carbonada, los dos alcanotioles escogidos tienen grupos terminales ionizables. Uno de ellos tiene un grupo ácido carboxílico: el ácido 11-mercaptoundecanoico ($HS(CH_2)_{10}COOH$, MUA) y el otro posee un grupo amino terminal: 11amino-1-undecanethiol clorhidrato ($HS(CH_2)_{10}NH_2$, AUT).

Las SAMs que se prepararon a partir de estos tioles son SAMs binarias o mixtas. Las monocapas binarias autoensambladas (SAMs) están formadas por dos alcanotioles diferentes y resultan de gran utilidad en el diseño de las propiedades superficiales de electrodos metálicos eligiendo adecuadamente el tipo y la relación de ambos tioles. En nuestro caso las SAMs binarias están formadas por la mezcla de UDT y MUA (SAM-CH₃ | COOH) por un lado y por otro, por UDT y AUT (SAM-CH₃ | NH₂). El método que se utilizó para la modificación de los electrodos de Au es la coadsorción desde una solución que contiene a ambos alcanotioles. La concentración de cada tiol fue de 0,5 mM aproximadamente, tal que la concentración final de la solución con fuese de l mM. Una vez que ambos tioles fueron perfectamente disueltos en etanol absoluto se procedió a sumergir el electrodo de Au perfectamente limpio durante 15-17 horas aproximadamente, asegurando de esta forma que las SAMs formadas sean lo suficientemente ordenadas, compactas y reproducibles.^{31,33}

Se utilizará la siguiente nomenclatura para nombrar a cada uno de los electrodos: Au/SAM-CH₃ | COOH para el sustrato que fue modificado mediante SAMs binaria de CH₃ | COOH, y Au/SAM-CH₃ | NH₂ para el que fue modificado con SAM-CH₃ | NH₂. Además de los electrodos modificados con SAMs binarias se modificaron electrodos con cada uno de los tioles por separado, es decir se modificó un electrodo de Au con SAMs de

MUA (SAM-COOH) y otro electrodo con SAMs de AUT (SAM-NH₂), ambos en ausencia de UDT (SAM-CH₃).

A continuación se muestran las curvas de calibración obtenidas para la detección de GLY en presencia de $Ru(bpy)_3^{+2}$ como emisor de ECL con los nuevos electrodos modificados. Es importante notar, que las condiciones experimentales fueron exactamente las mismas que se usó previamente para los electrodos restantes: Au desnudo y Au/SAM-CH₃. En las **Figura 55** yFigura 56 se muestran las curvas de trabajo con electrodos de Au modificados con SAMs binarias y con SAMs de un solo alcanotiol.

El análisis cualitativo entre las curvas experimentales de la **Figura 54b** y de la **Figura 55**, da indicios que la detección de GLY con un electrodo de Au/SAM-CH₃ | COOH mejoró considerablemente en relación a la obtenida con las SAMs de un solo alcanotiol: Au/SAM-CH₃ y Au/SAM-COOH. Siendo mejor la modificación del electrodo mediante la coadsorción de dos alcanotioles con diferentes funcionalidades. De esta forma, no solo se puede lograr una modulación de las interacciones con las especies cargadas en solución, sino que también permite la formación de SAMs más ordenadas, compactas y reproducibles como se ha observado para otras mezcla de tioles alifáticos.^{31,33,40,41}

La correlación lineal entre la señal de ECL y la concentración de GLY, cuando se emplea el electrodo Au/SAM-CH₃ | COOH, parece mejorar en todo el intervalo de concentraciones (0 μ M hasta 100 μ M de GLY). Luego, el análisis cuantitativo a través de los parámetros obtenidos a partir del análisis de la regresión para cada curva de trabajo (**Tabla 7**) revela que efectivamente los datos experimentales se ajustan mejor a una línea recta para el electrodo de Au/SAM-CH₃ | COOH, ya que el coeficiente de correlación (*r*) aumenta en relación al obtenido con Au/SAM-CH₃, aproximándose a la unidad (*r*= 0,995). El valor de la pendiente disminuye aproximadamente 3 órdenes de magnitud con el electrodo Au/SAM-CH₃ | COOH. Sin embargo, el mejor ajuste de los datos experimentales a la recta de la regresión permite compensar esta disminución y lograr en consecuencia un menor límite de detección (LOD).



Figura 55. Curvas de calibración de GLY: **a**) con un electrodo de Au/SAM-COOH y **b**) con un electrodo de Au modificado —Au/SAM-CH₃ | COOH—.

El LOD es inversamente proporcional al valor de la pendiente de la recta de la regresión y depende directamente del cuadrado de la desviación $-(y_i-\hat{y})$ — de los datos experimentales (y_i) respecto de los obtenidos a partir de la ecuación de la recta de regresión. Esto condujo a una disminución en el LOD, haciendo posible detectar concentraciones de GLY de 0,22 mg/L (o lo que es igual a 1,32 μ M/L, **Tabla** 7). Si se compara este límite de detección con los límites establecidos por organismos nacionales e internaciones (EPA: 0,7 mg/L y en Argentina: $\leq 0,3$ mg/L) el electrodo Au/SAM-CH₃ [COOH permite detectar niveles de GLY por debajo de los establecidos por la reglamentación vigente a nivel nacional y mundial.

Por otra parte, la utilización de SAMs con grupos amino ($-NH_2$) terminales se han usado para modelar una superficie con carga negativa. Teniendo en cuenta que el pK_a de AUT posee un valor de 7.5, para una solución con una fuerza iónica 0.1 M, se puede

estimar que al pH de trabajo – pH 8– y una fuerza iónica de 0,4 M aproximadamente en la solución de PBS, una fracción importante de grupos amino terminales se encontrarían cargados positivamente.³⁹ Los grupos –NH₂, al igual que los grupos –COOH en las SAMs que contienen MUA, quedan expuestos hacia la solución pudiendo interactuar de manera preferencial con ambas especies cargadas Ru(bpy)₃⁺² y GLY.



Figura 56. Curvas de calibración de GLY: **a**) con un electrodo de Au/SAM-NH₂ y **b**) con un electrodo de Au modificado $-Au/SAM-CH_3 | NH_2 -$.

En la **Figura 56** y en la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos cuando la detección de GLY se realiza con electrodos de Au modificados: Au/SAM-NH₂ y Au/SAM-CH₃ | NH₂. En este caso, del análisis de los datos se observa que los electrodos modificados con SAM-NH₂ y SAM-CH₃ | NH₂ poseen peor desempeño analítico que los alcanzados con Au/SAM-CH₃ | COOH y Au/SAM-CH₃. La detección pierde sensibilidad

con ambos electrodos en presencia de SAMs- NH_2 , lo cual se ve reflejado en el valor más bajo de pendiente cuando se comparan los parámetros experimentales de las rectas obtenidas de cada regresión, tal como se muestra en la **Tabla** 7.

Electrodo	Ecuación de la regresión ^a	r ^b	LOD ^e (µM/L)	LOQ ^d (µM/L)
Au/SAM-CH ₃	$y=(1,38\pm0,08) \times 10^{6}x + (2,6\pm0,5) \times 10^{7} (n=6)$	0,98246	8,43	25,69
Au/SAM- CH3 COOH	$y=(2,07\pm0,02) \times 10^{3}x + (7,8\pm0,1)$ $\times 10^{4}$ (n= 6)	0,9995	1,32	4,01
Au/SAM-COOH	$y=(7,6\pm0,4) \ge 10^4 x + (3,9\pm0,2) \ge 10^4 (n=6)$	0,9861	7,60	23,18
Au/SAM-CH ₃ NH ₂	$y=(6,34\pm0,07) \times 10^2 x + (1,09\pm0,04) \times 10^5 (n=6)$	0,9411	15,94	48,59
Au/SAM-NH ₂	$y=(1,2\pm0,1) \ge 10^3 x + (9,2\pm0,5) \ge 10^4 (n=6)$	0,9661	62,93	191,85

Tabla 7. Curvas de calibración y parámetros analíticos para la determinación de GLY en agua

^a y: Área de ECL; x: concentración del analito (GLY, μ M/L). Cada dato es presentado con su respectiva desviación estándar (±SD).

^b Coeficiente de correlación

^c Límite de detección

^dLímite de cuantificación

En particular para el electrodo de Au/SAM-CH₃ NH₂, los puntos graficados (**Figura 56b**) no siguen una relacion lineal con la concentracion, lo cual se ve reflejado en el coeficiente de correlación relativamente bajo (*r*: 0,9661). Además, después de la realización de varias curvas de trabajo para un mismo electrodo modificado con SAM-CH₃ NH₂ se notó perdida de reproducibilidad. En la literatura científica se encuentra información que dejar ver que la calidad de los autoensamblados de SAMs-NH₂ es más difícil de controlar.⁴² Esta dificultad se atribuye a una concentración de oxígeno relativamente alta y no esperada dentro de SAMs-NH₂. La cantidad de oxígeno presente en este tipo de SAMs ha sido cuantificada mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X

(XPS) y atribuida a la presencia de contaminantes oxigenados, como moléculas de agua que se pueden unir firmemente a los grupos amino terminales, existentes en la solución de tiol que se usó para preparar las SAMs.⁴²

En función de los antecedentes bibliográficos mencionados en el párrafo anterior y en perspectiva de la detección de GLY, la presencia de oxígeno dentro de las SAMs-NH₂ y SAMs-CH₃ | NH₂ no solo podría afectar la calidad de las SAMs sino también desfavorecer la generación de ECL, ya que es conocido la inhibición de los estados excitados de Ru(bpy)₃⁺² en presencia de oxígeno disuelto.^{19,20}

En resumen, la mejoría lograda en la detección cuantitativa de GLY podría ser interpretado en base a las interacciones entre las especies cargadas presentes en solución - $Ru(bpy)_3^{+2}$ y GLY- y los electrodos modificados. Como se mencionó, las SAMs binarias o simples con grupos -COOH y -NH2 se ensamblan espontáneamente mediante uniones Autiolato sobre la superficie del Au y los grupos terminales quedan expuestos hacia la solución permitiendo su interacción con los iones disueltos. Particularmente, el grupo -COOH es conocido por su capacidad de acomplejar iones metálicos.⁴³ Además, el grupo ácido carboxílico terminal se encuentra disociado en solución acuosa a pH superiores a 4-5,⁴³ haciendo que la superficie del electrodo tenga una carga fija negativa. Por su parte, en los electrodos modificados con el grupo $-NH_2$ al pH de trabajo, prevalece un cargado positivo. Cabe destacar, que a pH 8 el complejo emisor de luz $-Ru(bpy)_3^{+2}$ posee carga positiva y el analito -GLY- tiene carga negativa. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que el electrodo modificado Au/SAM-CH₃ COOH (cargado negativamente) fue el que presentó mejor performance analítica, podemos proponer que las ventajas observadas (menor LOD y mayor linealidad) están asociadas a un fenómeno de interacción electrostáticas entre el Ru(bpy)₃⁺² y el electrodo modificado Au/SAM-CH₃ COOH que posee un cargado de signo contrario. Desde este punto de vista, en el mecanismo de detección de GLY con electrodos modificados parece que prevalece la interacción de Ru(bpy)₃⁺² en lugar del analito GLY. Sin embargo, para alcanzar una conclusión final, es necesario realizar experimentos que evalúen otros aspectos relacionados con la naturaleza de cada electrodo modificado, estos

206

estudios están fuera del alcance de este trabajo de Tesis y quedan proyectados para trabajos futuros.

8.5. Conclusiones específicas

Se probó el potencial de la ECL en el desarrollo de técnicas de detección de herbicidas que en su estructura posean grupos con capacidad de funcionar como cooreactantes de complejos de rutenio. Para ello se realizó un estudio sistemático sobre la desarrollo de una técnica de detección de glifosato, un herbicida de uso generalizado en la Argentina que tiene gran importancia económica y ambiental para el país. Primero se trabajó en el armado y desarrollo del equipamiento necesario para realizar medidas de ECL, es importante mencionar que al momento de comenzar esta tesis doctoral no existía en Argentina laboratorios con esta capacidad instalada. Luego se evaluó la viabilidad de generación de ECL utilizando el GLY como coreactante de Ru(bpy)₃⁺² en una celda de tres electrodos utilizando platino y oro como electrodos de trabajo. Los experimentos y análisis de resultados mostraron que existía correlación entre la señal ECL y la concentración de GLY demostrando la viabilidad de la técnica. Sin embargo, a causa de la formación de óxidos sobre la superficie del electrodo la señal ECL carece de estabilidad y sensibilidad necesaria para detectar los niveles de GLY estipulados como contaminante por las normativas vigentes.

En una segunda etapa, se trabajó especialmente en el perfeccionamiento de la técnica. Para ello se modificaron electrodos de oro con monocapas autoensambladas de tioles con distintos grupos terminales (-CH₃, -COOH y-NH₂).Se utilizó esta estrategia de trabajo con la idea de evitar la formación de óxidos superficiales sobre superficies de metales nobles como el Au y a su vez, explorar interacciones específicas entre la superficie del electrodo y los analitos en solución para lograr una mayor sensibilidad y selectividad en la técnica.

Consecuentemente, se encontró que los electrodos de oro modificados con SAMs binarias de CH₃ | COOH tienen el mejor desempeño analítico. Este electrodo —Au/SAM-CH₃ | COOH— tiene un LOD de 0,22 mg/L de GLY, el cual es un valor de detección que permite detectar niveles de GLY por debajo de los establecidos por la reglamentación vigente a nivel nacional y mundial. La mejora observada en este electrodo fue atribuido a

un efecto de preconcentración de la especie emisora de luz ECL, mediante interacción electrostática entre la SAM-CH₃ | COOH, cargada negativamente a pH 8, y el $Ru(bpy)_3^{+2}$.

El principio de detección basado en la ECL, a diferencia de otros métodos utilizados, permite la detección de GLY sin previa modificación química. Esto último evita grandes esfuerzos en tiempo y dinero durante el proceso de análisis. Por otra parte, por ser un sistema óptico de detección, es muy eficiente y barato, a través de lo cual se podría procesar grandes cantidades de muestras para disponer de mayor cantidad de datos que ayuden a un diagnóstico más preciso sobre la sustentabilidad del desarrollo agropecuario en relación con la biodiversidad y el desarrollo humano. Estudios tendientes a ampliar la utilización de la ECL en la detección del metabolito principal de degradación biológica de GLY (AMPA) y otros herbicidas quedan proyectados a futuro.



Referencias

(1) Comisión de la Universidad Nacional del Litoral (Pcia. Santa Fe, Argentina); Informe acerca del grado de toxicidad del Glifosato, 2010.

(2) Agudelo Herrera, M.; (Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química: Bucaramanga), 2011.

(3) Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos-CONICET; Evaluación de la Información Científica Vinculada al Glifosato en su Incidencia sobre la Salud Humana y el Ambiente, **2009**, Decreto 21/2009.

(4) Salomon, K. In División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, Estados Unidos, 2005.

(5) EPA: American Public Heath Association; Vol. Método oficial AOAC 2000.05 (2000)-Método EPA547 (1990)-Método AOAC 991.08 (1993).

(6) Martínez Vidal, J. L.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Journal of Chromatography A 2009, 1216, 6767.

(7) Liang, H. C.; Hay, M. T.; Drake Meneghetti, A. M. Water Environment Research 2012, 84, 1979.

(8) Albers, C. N.; Banta, G. T.; Hansen, P. E.; Jacobsen, O. S. Environmental Pollution 2009, 157, 2865.

(9) EPA. Draft for Review only Public Health Goal for Glyphosate in Drinking Water. Pesticide and Environmental Toxicology Branch. Office of Environmental Health Hazard Assessment. California Environmental Protection Agency; **2006**.

(10) CWQG. Canadian Water Quality Guidelines for Glyphosate for the Protection of Aquatic Life. Canadian Environmental Quality Guidelines. CanadianCouncil of Ministers of the Environment; 2012

(11) EC European Commission. *Glyphosate 6511/VI/99-final 21 January 2002*. Health and Consumer Protection Directorate-General Directorate E – Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. E1 - Plant health. **2002**. Disponible en URL: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_en.pdf.

(12) Su, M.; Wei, W.; Liu, S. Analytica Chimica Acta 2011, 704, 16.

(13) Muzyka, E. N.; Rozhitskii, N. N. JAnal Chem 2010, 65, 550.

(14) Wallace, W. L.; Bard, A. J. The Journal of Physical Chemistry 1979, 83, 1350.

(15) Chen, X.-m.; Su, B.-y.; Song, X.-h.; Chen, Q.-a.; Chen, X.; Wang, X.-r. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 665.

(16) Gerardi, R. D.; Barnett, N. W.; Lewis, S. W. Analytica Chimica Acta 1999, 378, 1.

(17) Miao, W. Chemical Reviews 2008, 108, 2506.

(18) Yuan, B.; Huang, J.; Sun, J.; You, T. *Electrophoresis* 2009, *30*, 479.

(19) Parveen, S. In *Protocols and Applications*; Springer, 2013.

(20) Bard, A. J. In *Electrogenerated Chemiluminescence*; Marcel Dekker: New York, 2004.

(21) Pastore, P.; Badocco, D.; Zanon, F. Electrochimica Acta 2006, 51, 5394.

210

(22) Forster, R. J.; Bertoncello, P.; Keyes, T. E. Annual Review of Analytical Chemistry 2009, 2, 359.

(23) Yuan, Y.; Han, S.; Hu, L.; Parveen, S.; Xu, G. Electrochimica Acta 2012, 82, 484.

(24) Jin, J.; Takahashi, F.; Kaneko, T.; Nakamura, T. *Electrochimica Acta* 2010, 55, 5532.

(25) Knight, A. W. TrAC Trends in Analytical Chemistry 1999, 18, 47.

(26) Leland, J. K.; Powell, M. J. Journal of The Electrochemical Society 1990, 137, 3127.

(27) Trasatti, S.; Petrii, O. A.; Pure Appl. Chem. 1991, 63, 711

(28) Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; John Wiley & Sons, Inc.: United States of America, 2001.

(29) Oesch, U.; Janata, J. *Electrochimica Acta* **1983**, *28*, 1247.

(30) Zu, Y.; Bard, A. J. Analytical Chemistry 2000, 72, 3223.

(31) Love, J. C.; Estroff La Fau - Kriebel, J. K.; Kriebel Jk Fau - Nuzzo, R. G.; Nuzzo Rg Fau - Whitesides, G. M.; Whitesides, G. M.

(32) Zerbetto, F. Adv Mater 2013, 25, 449.

(33) Choi, I.; WS, Y. ChemPhysChem 2013, 14, 55.

(34) Kakiuchi, T.; Iida, M.; Gon, N.; Hobara, D.; Imabayashi, S.-i.; Niki, K. Langmuir 2001, 17, 1599.

(35) Olivieri, A. *Regresión lineal en química analítica*, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, **2011**.

(36) Currie, L. Pure Appl. Chem. 1995, 67, 1699.

(37) Wilrich, P. *ISO/DIS 11843-1,2* 1995.

(38) Campiña, J. M.; Martins, A.; Silva, F. The Journal of Physical Chemistry C 2007, 111, 5351.

(39) Degefa, T. H.; Schön, P.; Bongard, D.; Walder, L. Journal of Electroanalytical Chemistry 2004, 574, 49.

(40) Doneux, T.; De Decker, Y. Langmuir 2009, 25, 2199.

(41) Arya, S. K.; Solanki, P. R.; Datta, M.; Malhotra, B. D. Biosens Bioelectron 2009, 24, 2810.

(42) Baio, J. E.; Weidner, T.; Brison, J.; Graham, D. J.; Gamble, L. J.; Castner, D. G. Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena 2009, 172, 2.

(43) Freire, R. S.; Kubota, L. T. *Electrochimica Acta* 2004, 49, 3795.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES GENERALES Y CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

214

9.1. Conclusiones Generales

En el presente trabajo de Tesis se consolidó una técnica de estudio que no estaba desarrollada con anterioridad en el lugar de trabajo. Para ello, se diseñó y montó todo el equipamiento necesario para la generación y detección de la electroquimioluminiscencia (ECL). Mediante este equipamiento experimental no solo se estudiaron sistemas electroquimioluminiscentes de diferente naturaleza sino que también, se desarrolló una aplicación analítica de la ECL con un impacto relevante para nuestra región y país.

Por otra parte, el avance de esta tesis se basó en tres líneas diferentes claramente identificables, dos de ellas estuvieron relacionadas con el estudio y desarrollo de nuevos materiales con capacidad ECL (clasificados como moleculares y nanopartículas) y la otra estuvo asociada a una aplicación analítica de la ECL. Específicamente, la detección de un herbicida de amplio uso en nuestro país y en el mundo.

9.2. Conclusiones específicas

9.2.1. Colorantes BODIPY

Por un lado con respecto al conjunto de colorantes BODIPYs, todos ellos derivados del colorante comercial PM 567 pero con distintas variaciones en la estructura química del grupo sustituyente en la posición 8 del núcleo central, se logró demostrar que principalmente el comportamiento electroquímico y electroquimioluminiscente está influenciado por la capacidad —donora o atractora de electrones— y por la distancia a la que se encuentra el sustituyente en la posición 8 del el núcleo central. Demostrando de este modo, que la variación de las características estructurales de estos colorantes, específicamente la modificación del grupo sustituyente ubicado en la posición 8, permite modular sus propiedades redox y en consecuencia sus propiedades de ECL. Estos estudios generaron conocimiento que permite diseñar estructuras con propiedades mejoradas y demuestran que estas estructuras tienen potencial para su posible uso como marcadores ECL con propiedades específicas y en dispositivos optoelectrónicos.

9.2.2. Nanopartículas de carbono

Por otra parte se estudió un sistema de diferente naturaleza al mencionado anteriormente, en particular nanopartículas de carbono (CNPs), con el objetivo de aportar entendimiento a sus inusuales propiedades electroópticas que actualmente son tema de discusion en la bibliografía del área. Con este objetivo se seleccionó una vía de síntesis sencilla y económica, que consistió básicamente en la calcinación a 300 °C de una sal de amonio formada a partir de precursores orgánicos (N-octadecilamina y ácido cítrico). Dicho método y conjuntamente con el procedimiento de purificación cromatográfica permitió obtener CNPs de diferentes formas y tamaños con una bajo contenido de grupos funcionales, lo cual simplifico el sistema a estudiar.

Seguidamente dada la complejidad del sistema se realizó una caracterización exhaustiva del mismo mediante la aplicación de diferentes técnicas, tales como microscopia de transmisión de electrones (TEM), espectroscopia de pérdida de energía (EELS), resonancia magnética nuclear (¹³C-RMN) y espectroscopia de infrarrojo (IR). En conjunto, todas ellas revelaron que las CNPs están constituidas por un núcleo grafítico rodeado por una capa amorfa de espesor variable. Tanto el interior como la capa exterior de carbono amorfo, se pueden describir como un material carbonoso con una mezcla de átomos de carbono con hibridación sp^2 y sp^3 , que contienen baja cantidad de grupos funcionales derivados de heteroátomos, tal como se esperaba a partir del método de purificación propuesto.

También se indagó sobre el comportamiento fotofísico, electroquímico y electroquimiluminiscente de las CNPs. Los resultados permitieron deducir que el comportamiento optoelectrónico no se puede asociar a efectos de confinamiento cuántico relacionado al tamaño y la forma de las nanopartículas, tal como se ha observado en otros sistemas reportados en la literatura. En este caso, todas las nanopartículas comparten una característica común, la capa de carbono amorfo, y según el trabajo desarrollado durante esta tesis, esta particularidad común en todas ellas parece jugar un papel importante en la determinación de sus propiedades optoelectrónicas. Sin embargo, algunas inquietudes

quedan sin responder dentro del alcance de esta tesis. Esto abre algunas proyecciones futuras focalizados en la cáscara externa amorfa de las nanopartículas.

A su vez, la obtención de nuevos nanomateriales, tal como nanopartículas de basadas en nitruro de carbono, mediante métodos de síntesis y purificación similares podrían arrojar un mayor entendimiento tantos de las características estructurales y morfológicas como el comportamiento optoelectrónico y la correlación entre ambos, en estos tipos de sistemas nanométricos basados en carbono.

En resumen, se estudió dos sistemas electroquimioluminiscentes de distinta naturaleza que permitió demostrar el alcance de la ECL como herramienta de caracterización para correlacionar las características estructurales de ambos sistemas estudiados, colorantes derivados del núcleo BODIPY y nanopartículas de carbono, con su comportamiento optoelectrónico y explorar su potencial uso en aplicaciones ECL.

9.2.3. Desarrollo de una aplicación analítica: Detección de glifosato

Para finalizar se desarrolló una aplicación analítica de la ECL fundamentada en el potencial que presenta la técnica para la detección de herbicidas que en su estructura posean grupos con capacidad de funcionar como correactantes de complejos de rutenio. Para ello se realizó un estudio sistemático sobre la desarrollo de una técnica de detección de glifosato, un herbicida de uso generalizado en la Argentina que tiene gran importancia económica y ambiental para el país. Se utilizó el mecanismo de correactantes ECL en presencia de Ru(bpy)₃⁺², un complejo organometálico electroquimioluminiscente que presenta elevada sensibilidad para el desarrollo de aplicaciones analíticas.

Los resultados demostraron la posibilidad de generar ECL utilizando el GLY como coreactante de $Ru(bpy)_3^{+2}$ y además, revelaron que existía una correlación lineal entre la señal de ECL y la concentración de GLY demostrando la viabilidad de la técnica. Sin

embargo, a causa de la formación de óxidos sobre la superficie del electrodo la señal ECL carece de la estabilidad y sensibilidad necesaria para detectar los niveles de GLY establecidos por las normativas vigentes.

En función de ello, se trabajó intensamente en la optimización del método de detección para lo cual se usó electrodos de Au modificados con SAMs que poseían diferentes grupos terminales, con y sin carga. Los resultados logrados permitieron concluir que el electrodo modificado con SAMs binarias de CH_3 COOH exhibía el mejor desempeño analítico y permitió disminuir considerablemente el límite de detección de la técnica. En consecuencia el mejoramiento de ciertos parámetros experimentales, como la superficie del electrodo de trabajo, permitió desarrollar un método para detectar GLY sin previa modificación química. Asimismo se podría proyectar la utilización futura de la ECL en la detección de otros contaminantes, tal como AMPA (metabolito principal de degradación biológica de GLY), atrazina y otros herbicidas.

"La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella, y quizás, algún día, un descubrimiento como el radio pueda beneficiar a toda la humanidad."

Marie Curie