

En el siguiente apéndice se describe la preparación del módulo utilizado para registrar voltamperogramas cíclicos a altas velocidades de barrido de potencial. Dicho montaje consta de tres equipos:



Generador de onda PARC 175

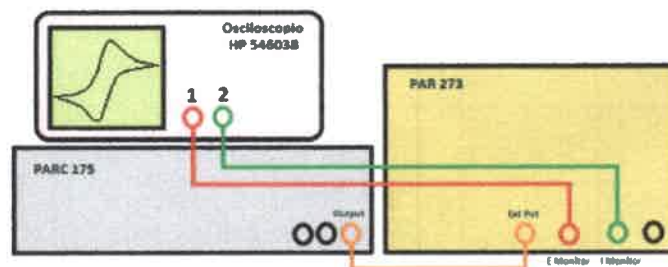


Osciloscopio HP



Potenciostato PAR 273

En este montaje, el generador de onda PARC 175 fue quien proporcionó el programa de potencial aplicado y la velocidad de barrido. El potenciostato PAR 273 aplicó esta información a la celda de trabajo y registró la respuesta en corriente que, luego, fue visualizada en el osciloscopio digital 54603B marca HP de doble canal. De esta manera, el montaje tuvo el siguiente aspecto:



A manera de diagnóstico, se realizó una experiencia electroquímica para verificar el funcionamiento del módulo, utilizando como cupla redox el antraceno, el cual presenta un sistema reversible cuando la velocidad de barrido es mayor a 10000 V s^{-1} , y un sistema irreversible cuando es menor a esta velocidad. Siguiendo las mismas condiciones experimentales propuestas por Howell y Wightman [191] y utilizando el ultramicroelectrodo de fibra de carbono, se obtuvieron resultados similares a los mostrados en la Figura E.2, indicando el correcto funcionamiento del módulo.

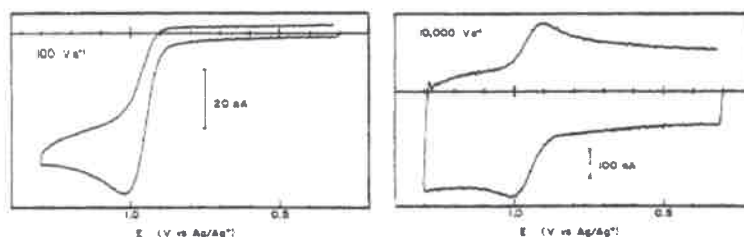


Figura E.2. Voltamperogramas cíclicos obtenidos por Howell y Wightman utilizando un ultramicroelectrodo de platino en la oxidación de antraceno a velocidades de (A) $v = 100$ y (B) 10000 V s^{-1} .

E

MÓDULO DE ALTAS VELOCIDADES DE BARRIDO DE POTENCIAL

A continuación se describe el procedimiento para preparar un electrodo de referencia de Ag/AgCl, el cual, requirió de los siguientes elementos

- pila de 1,5 V
- resistencia de 1 K Ω
- electrodo de Pt
- solución de HCl 0,1 N
- solución de NaCl 3 M
- solución de HNO₃ 3 N
- solución de NH₄OH 3 N

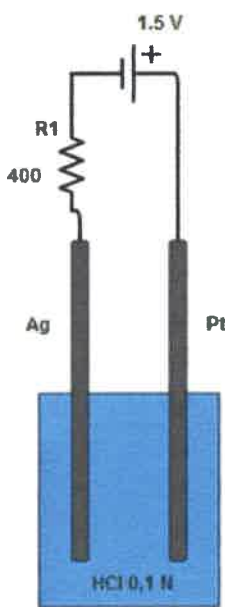


Figura D.1. Esquema de la deposición de AgCl sobre un alambre de Ag.

Inicialmente, se acondicionó el alambre de Ag pasándole un papel de lija fino, hasta obtener una superficie visiblemente limpia. Luego, se sumergió el alambre de Ag en soluciones de NH₄OH 3 N y, luego, HNO₃ 3 N, ambas por 5 minutos.

Luego, se introdujo el alambre de Ag en un vaso de precipitados con solución de HCl 0,1 N y el electrodo de Pt. Se conecta el polo positivo de la pila al alambre de Ag y el polo negativo al electrodo de Pt, el cual, actúa como contra electrodo. La resistencia puede ser conectada tanto al alambre de Ag como al electrodo de Pt, ya que es un circuito en serie (Figura D.1).

Con un tester, se verificó que la corriente que pasaba estuviera entre 1 y 1,5 mA y que la deposición durara al menos 5 minutos o hasta que se vea la deposición sobre la Ag, para asegurarse de obtener un depósito de AgCl adecuado. Luego se enjuagó el alambre de Ag y se llenó el cuerpo del electrodo con solución de NaCl hasta un 95% del volumen total. Finalmente, el electrodo fue puesto en reposo por 12 horas. Pasado este tiempo, se midió su potencial frente a otro electrodo de Ag/AgCl, siendo la diferencia de potencial siempre cercana a 0 V.

El electrodo de Ag/Ag⁺ fue mucho más sencillo de preparar y de realizar su mantenimiento. Dado que éste sólo se compone de un cuerpo de vidrio y un tapón de teflon que sostiene un alambre de Ag, sólo es necesario mantener dicho alambre limpio y cambiar de vez en cuando la solución electrolítica incorporada en el cuerpo de vidrio. Dicha solución contiene AgNO₃ 10 mM más 0,1 M del electrolito soporte utilizado, disueltos en el solvente de trabajo.

D

ELECTRODOS DE Ag/AgCl y Ag/Ag⁺

A continuación se describe el procedimiento utilizado para preparar un electrodo de referencia de calomel saturado acuoso.

Para ello, se utilizaron los siguientes elementos:

- cuerpo de vidrio con alambre de Pt (2 cm aprox. de largo) soldado en el extremo
- mercurio
- cloruro de mercurio (I), Hg_2Cl_2
- solución sobresaturada de KCl
- nitrato de potasio, KNO_3
- agar agar

Se preparó una solución de contenía agar agar al 3 % y KNO_3 1 M, la cual, fue disuelta en un baño de agua caliente hasta obtener la consistencia (gelatinosa) del agar y poder llenar el desprendimiento lateral del cuerpo de vidrio, como se muestra en la Figura C.1

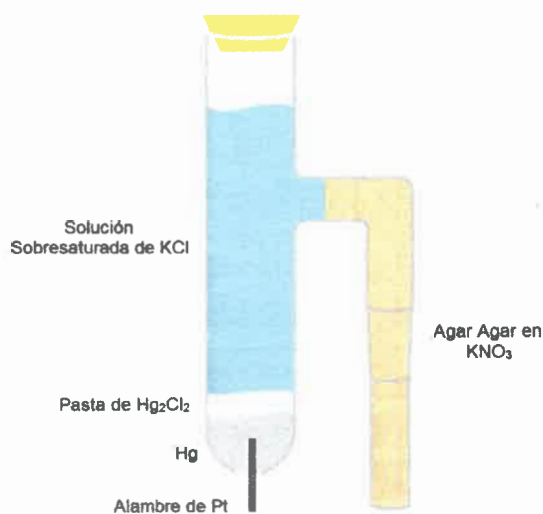


Figura C.1. Representación de un electrodo de referencia de calomel saturado acuoso.

Cuando el agar está sólido, se introdujo una cantidad suficiente de mercurio en el cuerpo central del electrodo para que cubriera el alambre de platino. Luego, se depositó una pasta de cloruro de mercurio (preparada en una proporción 3:1 de $\text{H}_2\text{O}:\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ aproximadamente) y, finalmente, se llenó el resto del electrodo con una solución sobresaturada de KCl. Posteriormente, el electrodo fue puesto en reposo durante 12 horas y luego se midió su potencial respecto a un electrodo de Ag/AgCl , el cual, siempre estuvo alrededor de 0,03 V. Dicho valor está cercano al informado en la literatura [100].

C

ELECTRODO DE CALOMEL SATURADO (ECS)

A continuación se describe la metodología utilizada para la determinación del área electroquímica y el factor de rugosidad (ρ) de los electrodos de oro policristalinos.

La determinación del área electroquímica de los electrodos de oro es un procedimiento rutinario que se empleó para obtener reproducibilidad tanto en las mediciones de VC como en las modificaciones de los electrodos. Para llevar a cabo esta determinación, se registró un voltamperograma cíclico en una solución de H_2SO_4 0,5 M con un electrodo de oro a una determinada velocidad de barrido de potencial y en una ventana de potencial en donde se puede ver claramente la formación de los óxidos de oro, los cuales, para un electrodo de oro policristalino, se manifiestan como 3 picos de oxidación consecutivos, como lo muestra la Figura B.1.

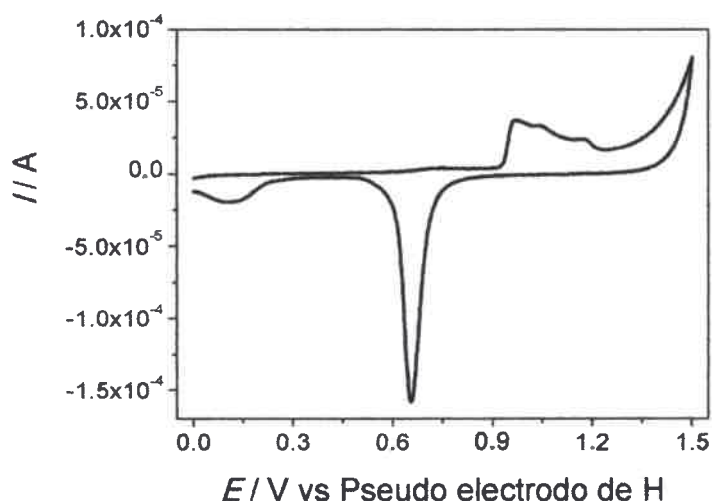


Figura B.1. Voltamperograma cíclico de un electrodo de oro policristalino registrado en una solución de H_2SO_4 0,5 M. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

La Figura B.1 también muestra un pico catódico agudo, el cual, corresponde a la reducción de todos los óxidos de oro formados durante el barrido anódico. La carga de este pico catódico puede ser directamente relacionada con la monocapa de oxígeno quimisorbida sobre la superficie del electrodo que, a su vez, está asociada con el área del electrodo. Así, se asume una relación 1:1 de oxígeno/átomo de oro, la cual, teóricamente, consume $420 \mu\text{C cm}^{-2}$ para reducir completamente la monocapa de oxígeno de la superficie de un electrodo de oro policristalino [155, 190].

De esta manera, determinando el área del pico catódico y dividiéndola por la velocidad de barrido del voltamperograma cíclico se obtuvo la carga de este pico. Luego, dividiendo dicha carga por la carga teórica determinada para estos electrodos, se conoció el área electroquímica de un electrodo de oro policristalino.

Finalmente, a través de la relación entre el área geométrica y el área electroquímica se determinó el factor de rugosidad (ρ) del electrodo [155].

$$\rho = \frac{\text{área geométrica}}{\text{área electroquímica}} \quad (\text{B.1})$$

B

DETERMINACIÓN DEL ÁREA DEL ELECTRODO

DE ORO

A través de la cronoamperometría y, utilizando como cupla redox el ferroceno en acetonitrilo, se determinó el área electroquímica del electrodo de carbono vítreo. El uso del ferroceno como cupla redox se fundamenta en el hecho de que es bien conocida en la literatura tanto el número de electrones intercambiados en el proceso de electrodo, como el valor de su coeficiente de difusión en este medio [189].

Experimentalmente, se utilizó una solución de ferroceno 1×10^{-3} M en acetonitrilo más HFFTBA 0,1 M, y luego se registraron transitorios $I-t$, como el que se muestran en la Figura A.1.

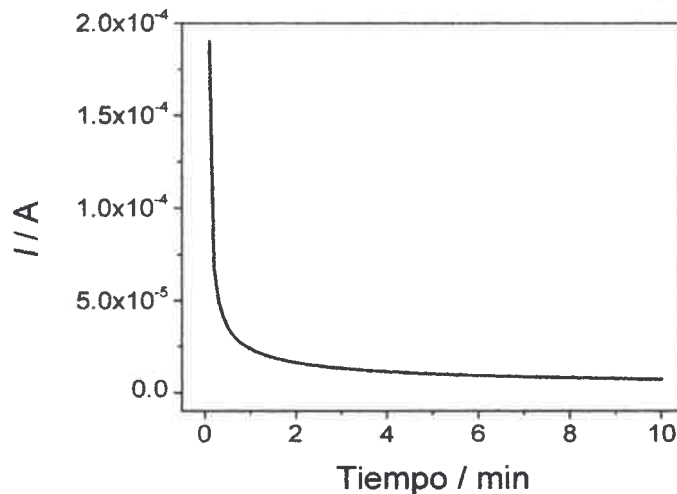


Figura A.1. Registro $I-t$ de una cronoamperometría de una solución de ferroceno 1×10^{-3} M en acetonitrilo más HFFTBA 0,1 M.

Luego, al graficar I en función de $t^{-1/2}$ se obtuvo una relación lineal que está descrita por la ecuación de la cronoamperometría y de la que se puede despejar el valor del área (A [98]):

$$I(t) = \frac{nFAc^*D^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (\text{A.1})$$

$$m = \frac{nFAc^*D^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (\text{A.2})$$

$$A = \frac{\pi^{1/2} \times m}{nFc^*D^{1/2}} \quad (\text{A.3})$$

Los valores de las constantes son las habituales:

- n , número de electrones
- $F = 96484,6$ C
- c^* , concentración de ferroceno
- $D =$, coeficiente de difusión de ferroceno en acetonitrilo
- m , pendiente del gráfico I vs $t^{-1/2}$

A

**DETERMINACIÓN DEL ÁREA DEL ELECTRODO
DE CARBONO VÍTREO**

- [165] Chandler, K. G.; Gender, J. D. y Pletcher, D. *Platinum Metals Rev.* **1997**, *41*, 54-63.
- [166] Koryta, J.; Dvorak, J. y Kavan, L., *Principles of Electrochemistry*; Wiley: New York, 1987.
- [167] Lansden, J. A.; Clarkson, R. J.; Neely, W. C.; Cole, R. J. y Kirksey, J. W. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1974**, *57*, 1392-1396.
- [168] De Levie, R., *How to Use Excel in Analytical Chemistry and in General Scientific Data Analysis*; Cambridge University Press: Cambridge, 2001.
- [169] El-Daly, S. A.; El-Hallag, I. S.; Ebeed, E. M. y Ghoneim, M. M. *Chin. J. Chem.* **2009**, *27*, 241-247.
- [170] Wang, J. y Hou, T. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 3505-3519.
- [171] Sazou, D. y Kokkinidis, G. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 397-403.
- [172] Silverstein, R. M.; W., F. X.; Kiemle, D. y L., B. D. en *Spectrometry Identification of Organic Compounds*; Wiley: New York, 2011; cap. Ultraviolet Spectrometry.
- [173] Pavia, D. L.; Lampman, G. M. y Kriz, G. S. en *Introduction to Spectroscopy*; Saunders College Publishing: Boston, 1996; cap. Ultraviolet Spectroscopy.
- [174] Goicoechea, H. C. y Olivieri, A. C., *La Calibración en Química Analítica*; Ed. UNL: Santa Fe, 2007.
- [175] Izutsu, K., *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*; Wiley: New York, 2009.
- [176] Bard, A. J. *Pure Appl. Chem.* **1971**, *25*, 379-394.
- [177] Hammerich, O. y Lund, H., *Organic Electrochemistry*; Marcel Dekker: New York, 2001.
- [178] Wightman, R. M. y Wipf, D. O. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 64-70.
- [179] Oldham, K. B. y Myland, J. C. *Electrochim. Acta.* **2011**, *56*, 10612-10625.
- [180] Parker, V. D. *Acta Chem. Scand.* **1998**, *52*, 154-159.
- [181] Andreieux, C. P.; Nadjo, L. y Saveant, J. M. *J. Electroanal. Chem.* **1970**, *26*, 147-186.
- [182] Wopschall, R. H. y Shain, I. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1535-1542.
- [183] Sereno, R.; Tesis doctoral: Universidad Nacional de Río Cuarto, 1972.
- [184] Bryant, M. A. y Crooks, R. M. *Langmuir.* **1993**, *9*, 385-387.
- [185] Shervedani, R. K. y Bagherzadeh, M. *Electrochim. Acta.* **2008**, *53*, 6293-6303.
- [186] Silva, M. M. S.; Cavalcanti, I. T.; Barroso, M. F.; Sales, M. G. y Dutra, R. F. *J. Chem. Sci.* **2010**, *122*, 911-917.
- [187] Protsalio, L. V. y Fawcett, W. R. *Langmuir.* **2002**, *18*, 8933-8941.
- [188] Wirde, M. y Gelius, U. *Langmuir.* **1999**, *15*, 6370-6378.
- [189] Wang, Y.; Rogers, E. I. y Compton, R. G. *J. Electroanal. Chem.* **2010**, *648*, 15-19.
- [190] Hoogvliet, J. C.; Dijksman, M.; Kamp, B. y van Bennekom, W. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2016-2021.
- [191] Howell, J. O. y Wightman, R. M. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 3915-3918.

- [141] Mokrani, C.; Fattison, J.; Guérente, L. y Labbe, P. *Langmuir*. **2005**, *21*, 4400-4409.
- [142] Love, J. C.; Wolfe, D. B.; Haasch, R.; Chabynec, M. L.; Paul, K. E.; Whitesides, G. M. y Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2597-2609.
- [143] Bain, C. D. y Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 506-512.
- [144] Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554.
- [145] Calvante, J. J.; López-Peréz, G.; Ramírez, P.; Fernández, H.; Zon, M. A.; Mulder, W. H. y Andreu, R. *J. Ame. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6476-6486.
- [146] Deering, A. L.; Van Lue, S. M. y Kandel, S. A. *Langmuir*. **2005**, *21*, 10260-10263.
- [147] Schreiber, F. J. *Phys.: condens. Matter*. **2004**, *16*, R881-R887.
- [148] Ramírez, P.; Andreu, R.; Calvante, J. J.; Calzado, C. J. y López-Pérez, G. J. *Electroanal. Chem.* **2005**, *582*, 179-190.
- [149] Munimbazi, C. y Bullerman, L. B. en *Mycotoxin Protocols*; Humana Press: New York, 2001; cap. - Chromatographic Method for the Determination of the Mycotoxin Moniliformin in Corn.
- [150] Fumero, M. V.; Reynoso, M. M. y Chulze, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *199*, 86-92.
- [151] Munkvold, G. P.; Logrieco, A.; Moretti, A.; Ferracanea, R. y Ritieni, A. *Food. Addit. Contam.* **2009**, *26*, 388-394.
- [152] Leslie, J. F.; Summerell, B. A. y Bullock, S., *The Fusarium Laboratory Manual*; Willey-Blackwell: New York, 2006.
- [153] Shchukin, E. D.; Vidensky, I. V. y Petrova, I. V. *J. Mater. Sci.* **1995**, *30*, 3111-3114.
- [154] Nuñez, M., *Progress on Electrochemistry Research*; Nova Publishers: New York, 2005.
- [155] Beden, B.; Léger, J.-M. y Lamy, C. en *Modern Aspects of Electrochemistry, Vol 22*; Springer: New York, 1992; cap. Electrocatalytic Oxidation of Oxygenated Aliphatic Organic Compounds at Nobel Metal Electrode.
- [156] Trasatti, S. y Petrii, O. A. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *327*, 353-376.
- [157] Bard, A. J.; Parsons, R. y Jordan, J. en *Electroanalytical Chemistry and Electrochemistry*; Marcel Dekker: New York, 1985; cap. Standard Potential in Aqueous Solution.
- [158] Weinberg, N. L. y Weinberg, H. R. *Chem. Rev.* **1968**, *68*, 449-523.
- [159] Savéant, J. M. en *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry*; Wiley: New York, 2006; cap. Coupling of Electrode Electron Transfers with Homogeneous Chemical Reactions.
- [160] Garay, F. y Lovric, M. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *518*, 91-102.
- [161] O´Dea, J. J.; Osteryoung, J. y Osteryoung, R. A. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 695-701.
- [162] Xu, J.; Chen, Q. y Swain, G. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3146-3154.
- [163] Li, Q.; Batchelo-McAuley, C. y Compton, R. G. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114*, 7423-7428.
- [164] Capon, A. y Parsons, R. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1973**, *44*, 239-254.

- [119] Perone, S. P. y Zipper, J. J. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 452-458.
- [120] Osteryoung, J. G. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *222*, 69-100.
- [121] *Application Note E-4. A Review of Techniques for Electrochemical Analysis*; Princeton Applied Research: Tennessee, 2010.
- [122] Bard, A. J. *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 1125-1128.
- [123] Osteryoung, J. G. y Osteryoung, R. A. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 101A-110A.
- [124] Barker, G. C. en *Advances in Polarography*; Pergamon Press: New York, 1960; cap. Some Possible Developments in A.C. Polarography.
- [125] Osteryoung, J. y O'Dea, J. en *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances*; Taylor & Francis: Florida, 1987; cap. Square-Wave Voltammetry.
- [126] Mirceski, V.; Kosmorsky-Lovric, S. y Lovric, M., *Square-wave voltammetry*; Springer: New York, 2007.
- [127] *Application Note S-7. Square wave voltammetry*; Princeton Applied Research: Tennessee, 2010.
- [128] Bard, A. J. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 302-304.
- [129] Snell, K. D. y Keenan, A. G. *Chem. Soc. Rev.* **1979**, *8*, 259-282.
- [130] Durst, R. A.; Baummer, A. J.; Murray, R. W.; Buck, R. P. y Andrieux, C. P. *Pure App. Chem.* **1997**, *69*, 1317-1323.
- [131] Finklea, H. O. en *Electroanalytical Chemistry*; Marcel Dekker: New York, 2003.
- [132] Maza, E. M., *Estudios de electrodos de oro modificados por monocapas autoensambladas de tioles para ser empleados como sensores electroanaliticos en la determinación de antioxidantes naturales*; Tesis doctoral: Universidad Nacional de Río Cuarto, 2013.
- [133] Fujihira, M.; Rubinstein, I. y Rusling, J. F. en *Encyclopedia of Electrochemistry*; Wiley: Weinheim, 2007; cap. Modified Electrodes.
- [134] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G. y Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.
- [135] Daza Millone, M. A., *Monocapas autoorganizadas sobre metales: Adsorción no específica de moléculas bioactivas y su aplicación en el desarrollo de biosensores*; Tesina de Licenciatura: Universidad Nacional de La Plata, 2006.
- [136] Zoski, C. G., *Handbook of Electrochemistry*; Elsevier: New Mexico, 2007.
- [137] Janek, R. P. y Fawcett, W. R. *Langmuir.* **1998**, *14*, 3011-3018.
- [138] Raya, D. G., *Monocapas autoensambladas (SAMs) y nanopartículas metálicas (MPCs) como elementos en la arquitectura de interfases funcionales*; Tesis doctoral: Universidad Nacional de Córdoba, 2009.
- [139] O'Dwyer, C.; Gay, G.; de Lesegno, B. V. y Weiner, J. *Langmuir.* **2004**, *20*, 8172-8182.
- [140] Wang, W.; Lee, T. y Reed, M. A. en *Nanoscale Assembly Techniques*; Springer: New York, 2005; cap. Electronic Transport through Self-Assembled Monolayers.

- [96] Jonsson, M.; Jestoi, M.; Nathanail, A. V.; Kokkonen, U.-M.; Anttila, M.; Koivisto, P.; Karhunen, P. y Peltonen, K. *Food. Chem. Toxicol.* **2013**, *53*, 27-32.
- [97] Morgan, M. K.; Fitzgerald, S. D.; Rottinghaus, G. E.; Bursian, S. J. y Aulerich, R. J. *Vet. Human. Toxicol.* **1999**, *41*, 1-5.
- [98] Bard, A. y Faulkner, L., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2 edición; Wiley: New York, 2001.
- [99] Grimshaw, J., *Electrochemical Reactions and Mechanisms in Organic Chemistry*; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2000.
- [100] Sawyer, D. T.; Sobkowiak, A. y Roberts, J. L., *Electrochemistry for Chemists*, 2nd; Wiley: New York, 1995.
- [101] Borman, S. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 347A-350A.
- [102] Wang, J., *Analytical Electrochemistry*; Wiley: New York, 2006.
- [103] Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. y Gómez, M., *Principios de Análisis Instrumental*; McGraw Hill: New York, 2001.
- [104] Brett, C. M. A. y Oliveira, A. M. B., *Electrochemistry. Principles, Methods, and Applications*; Oxford University Press: New York, 1993.
- [105] Sereno, L. y Chessa, J., *Principios Básicos de Cinética Electroquímica*, Universidad Nacional de Río Cuarto, 2000.
- [106] Oldham, K. B. y Myland, J. C., *Fundamentals of Electrochemical Science*; Academic Press, Inc: California, 1994.
- [107] Bagotsky, V. S., *Fundamentals of Electrochemistry*, 2nd; Wiley: New York, 2006.
- [108] Bockris, J. O. y Reddy, A. K. N., *Electroquímica Moderna*; Reverté, S. A.: Barcelona, 2003; vol. 1.
- [109] Reinmuth, W. H. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 1450-1452.
- [110] Marken, F.; Neudeck, A. y Bond, A. en *Electroanalytical Methods*; Springer Berlin Heidelberg: New York, 2010; cap. Cyclic Voltammetry.
- [111] Mabbott, G. A. *J. Chem. Edu.* **1983**, *60*, 697-702.
- [112] Velasco, J. G., *Métodos Experimentales en Electroquímica*; Cultiva Libros, S. L.: Madrid, 2012; vol. II.
- [113] Velasco, J. G. *Electroanalysis.* **1994**, *6*, 711-724.
- [114] Matsuda, H. y Ayabe, Y. *Elektrochem.* **1955**, *59*, 494-503.
- [115] Nicholson, R. S. y Shain, I. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 706-723.
- [116] Kannangara, D. C. W. y Conway, B. E. J. *Electrochem. Soc.* **1987**, *134*, 894-906.
- [117] Imbeaux, J. C. y Savéant, J. M. *J. Electroanal. Chem.* **1973**, *44*, 169-187.
- [118] Bentley, C. L.; Bond, A. M.; Hollenkamp, A. F.; Mahon, P. J. y Zhang, J. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2073-2081.

- [69] Engelhardt, J. A.; Carlton, W. W. y Tuite, J. F. *Avian. Dis.* **1989**, *33*, 357-360.
- [70] Kubena, L. F.; Harvey, R. B.; Buckley, S. A.; Bailey, R. H. y Rottinghaus, G. E. *Poult. Sci.* **1999**, *78*, 1499-1505.
- [71] Morris, C. M.; Li, Y. C.; Ledoux, D. R.; Bermudez, A. J. y Rottinghaus, G. E. *Poult. Sci.* **1999**, *78*, 1110-1115.
- [72] Harvey, R. B.; Edrington, T. S.; Kubena, L. F.; Rottinghaus, G. E.; Turk, J. R.; Genovese, K. J. y Nisbet, D. J. *J. Food. Protect.* **2001**, *64*, 1780-1784.
- [73] Harvey, R. B.; Edrington, T. S.; Kubena, L. F.; Rottinghaus, G. E.; Turk, J. R.; Genovese, K. J.; Ziprin, R. L. y Nisbet, D. J. *J. Food. Protect.* **2002**, *65*, 373-377.
- [74] Burka, L. T.; Doran, J. y Wilson, B. J. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 79-84.
- [75] Gathercole, P. S.; Thiel, P. G. y Hofmeyr, J. H. *J. Biochem.* **1986**, *233*, 719-723.
- [76] Thiel, P. G. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 483-486.
- [77] Jestoi, M. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 21-49.
- [78] Förster, M. E. C. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **1992**, *47*, 279-281.
- [79] Pirrung, M. C. y Nauhaus, S. K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2592-2593.
- [80] Deruiter, J.; Jacyno, J. M.; Cutler, H. G. y Davis, R. A. *J. Enzym. Inhib.* **1993**, *7*, 249-256.
- [81] Krska, R.; Welzig, E. y Boudra, H. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **2007**, *137*, 241-264.
- [82] Jestoi, M.; Rokka, M.; Rizzo, A. y Peltonen, K. *Aspect. Appl. Biol.* **2003**, *68*, 94-99.
- [83] Mubatanhema, W.; Moss, M. O.; Frank, M. J. y Wilson, D. M. *Mycopathologia* **1999**, *148*, 157-163.
- [84] Shepherd, M. J. y Gilbert, J. *J. Chromatogr. A.* **1986**, *358*, 415-422.
- [85] Munimbazi, C. y Bullerman, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *81*, 999-1004.
- [86] Parich, A.; Boeira, L. S.; Castro, S. P. y Krska, R. *Mycotoxin. Res.* **2003**, *19*, 203-206.
- [87] Sharman, M.; Gilbert, J. y Chelkowski, J. *Food. Addit. Contam.* **1991**, *8*, 459-466.
- [88] Frisvad, J. C. y Thrane, U. *J. Chromatogr. A.* **1987**, *404*, 195-214.
- [89] Filek, G. y Lindner, W. *J. Chromatogr. A.* **1996**, *732*, 291-298.
- [90] Schutt, F.; Nirenberg, H. y Demi, G. *Mycotoxin. Res.* **1998**, *14*, 35-40.
- [91] Gilbert, J.; Startin, J. R.; Parker, I.; Shepherd, M. J.; Mitchell, J. C. y Perkins, M. J. *J. Chromatogr. A.* **1986**, *369*, 408-414.
- [92] Kandler, W.; Nadubinska, M.; Parich, A. y Krska, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 1086-1090.
- [93] Maragos, C. M. *Food. Addit. Contam.* **2004**, *21*, 803-810.
- [94] Sulyok, M.; Berthiller, F.; Krska, R. y Schuhmacher, R. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **2006**, *20*, 2649-2659.
- [95] Sørensen, J. L.; Nielsen, K. F. y Thrane, U. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9764-9768.

- [45] Kupier-Goodman, T. en *Mycotoxins in Grain, Compounds other than Aflatoxin*; Eagan Press: St. Paul, 1994; cap. Prevention of Human Mycotoxicoses through Risk Assessment Risk Management.
- [46] Internacional Agency for Research on Cancer (IARC)., <http://www.iarc.fr> (visitado 2014).
- [47] Levesque, C. A.; Rahe, J. E. y Eaves, D. M. *Can. J. Microbiol.* **1987**, *33*, 354-360.
- [48] Brown, D. W. y Proctor, R. H., *Fusarium, Genomics, Molecular and Cellular Biology*; Caister Academic Press: Norfolk, 2013.
- [49] Link, H. F. *Mag. Ges. Naturf. Freunde* **1809**, 3-42.
- [50] Arias, M. M. D., *Fusarium species infecting soybean roots: frequency, aggressiveness, yield impact and interaction with the soybean cyst nematode*; Tesis doctoral: Universidad Estatal de Iowa, 2012.
- [51] Marasas, W. E. O.; Nelson, P. E. y Toussoun, T. A., *Toxicogenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology*; The Pennsylvania State University Press: Pennsylvania, 1984.
- [52] Aoki, T.; O'Donnell, K. y Geise, D. M. *J. Gen. Plant Pathol.* **2014**, *80*, 189-201.
- [53] Desjardins, A. E., *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology*; APS Press: St. Paul, 2006.
- [54] Gilbert, J.; Woods, S. M. y Kromer, U. *Phytopathology.* **2008**, *98*, 504-508.
- [55] Smith, S. N. *Plant Patho. Bulletin.* **2007**, *16*, 97-120.
- [56] Munimbazi, C. y Bullerman, L. B. *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 999-1004.
- [57] Cole, R. J.; Kirksey, J. W.; Cutler, H. G.; Doupnik, B. L. y Peckham, J. C. *Science.* **1973**, *179*, 1324-1326.
- [58] Springer, J. P.; Clardy, J.; Cole, R. J.; Kirksey, J. W.; Hill, R. K.; Carlson, R. M. e Isidor, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2267-2268.
- [59] Hoffmann, R. W.; Bressel, U.; Gehlhaus, J. y Hauser, H. *Chem. Ber.* **1971**, *104*, 873-885.
- [60] Belluš, D.; Fischer, H.; Greuter, H. y Martin, P. *Helv. Chim. Acta.* **1978**, *65*, 1784-813.
- [61] Scharf, H. D.; Frauenrath, H. y Pinske, W. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 168-182.
- [62] Pineda-Valdes, G. y Bullerman, L. B. *J. Food. Prot.* **2000**, *63*, 1598-1601.
- [63] Franck, B. y Breipohl, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 996-998.
- [64] Apsimon, J. W. en *Mycotoxins in Grains: Compounds other than Aflatoxin*; Eagan Press: New York, 1994; cap. The Biosynthetic Diversity of Secondary Metabolites.
- [65] Knassmüller, S.; Bresgen, N.; Kassie, F.; Mersch-Sundermann, V.; Gelderblom, W.; Zohrer, E. y Eckl, P. M. *Mutat. Res.* **1997**, *391*, 39-48.
- [66] Wehner, F. C.; Marasas, W. F. O. y Thiel, P. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *35*, 659-662.
- [67] Kriek, N. P.; Marasas, W. F.; Steyn, P. S.; van Rensburg, S. J. y Steyn, M. *Food. Cosmet. Toxicol.* **1977**, *15*, 579-587.
- [68] Ledoux, D. R.; Bermudez, A. J.; Rottinghaus, G. E.; Broomhead, J. y Bennett, G. A. *Poult. Sci.* **1995**, *74*, 297-305.

- [21] Molina, P. G.; Zon, M. A. y Fernández, H. J. *Electroanal. Chem.* **2002**, 520, 94-100.
- [22] Molina, P. G.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Indian J. Chem.* **2003**, 42A, 789-796.
- [23] Molina, P. G.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Electroanalysis*. **2008**, 20, 1633-1638.
- [24] Ramírez, E. A.; Zon, M. A.; Ulloa, P. A. J.; Squella, J. A.; Vergara, L. N. y Fernández, H. *Electrochim. Acta.* **2010**, 55, 771-778.
- [25] Zachetti, V. G. L.; Granero, A. M.; Robledo, S. N.; Zon, M. A.; Rosa, C. A. D. y Fernández, H. J. *Braz. Chem. Soc.* **2012**, 23, 1131-1139.
- [26] Moressi, M. B.; Zon, M. A.; Fernández, H.; Rivas, G. y Solís, V. *Electrochem. Commun.* **1999**, 10, 472-476.
- [27] Marchiando, N. C.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Anal. Chim. Acta.* **2005**, 550, 199-203.
- [28] Moressi, M. B.; Andreu, R.; Calvente, J. J.; Fernández, H. y Zon, M. A. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 570, 209-217.
- [29] Ramírez, E. A.; Molina, P. G.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Electroanalysis*. **2005**, 17, 1635-1640.
- [30] Moressi, M. B.; Calvente, J. J.; Fondacabe, R. A.; Fernández, H. y Zon, M. A. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, 605, 118-124.
- [31] Perrotta, P. R.; Vettorazzi, N. R.; Arévalo, F. J.; Granero, A. M.; Chulze, S. N.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Electroanalysis*. **2011**, 23, 1585-1592.
- [32] Arévalo, F. J.; Granero, A. M.; Fernández, H.; Raba, J. y Zon, M. A. *Talanta*. **2011**, 83, 966-973.
- [33] Ramírez, E. A.; Granero, A. M.; Zon, M. A. y Fernández, H. *J. Biosens. Bioelectron.* **2011**, S3, 1-1.
- [34] Perrotta, P. R.; Arévalo, F. J.; Vettorazzi, N. R.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Sensor. Actuat. B.* **2012**, 162, 327-333.
- [35] Negroni, M., *Microbiología Estomatológica*; Ed. Médica Panamericana: Buenos Aires, 2009.
- [36] Hudson, H. J., *Fungal Biology*; Cambridge University Press: Cambridge, 1992.
- [37] Thimmas, B. P. H. *J. Mol. Plant Path.* **2003**, 4, 225-236.
- [38] Soriano, J. M., *Micotoxinas en Alimentos*; Díaz de Santos: Madrid, 2007.
- [39] De Longh, H.; Beerthuis, R. K.; Vles, R. O.; Barrett, C. B. y Ord, W. O. *Biochim. Biophys. Acta.* **1962**, 65, 549-551.
- [40] Asplin, F. D. y Carnaghan, R. B. A. *Vet. Rec.* **1961**, 73, 1215-1219.
- [41] Kale, S. y Bennett, J. W., *Handbook of Applied Mycology: Mycotoxins in Ecological Systems*; Marcel Dekker: New York, 1992.
- [42] Brase, S.; Encinas, A.; Keck, J. y Nising, C. F. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 3902-3990.
- [43] Cameán, C. y Repetto, M., *Toxicología Avanzada*; Díaz de Santos: Madrid, 1997.
- [44] Faustman, E. M. y Omenn, G. S., *Fundamentos de Toxicología*; Mc Graw Hill Interamericana: Madrid, 2005.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bennett, J. W. *Mycopathologia*. **1987**, 100, 3-5.
- [2] Bennett, J. W. y Klich, M. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, 16, 497-516.
- [3] Murphy, P. A.; Hendrich, S.; Landgren, C. y Bryant, C. M. *J. Food. Sci.* **2006**, 71, R51-R65.
- [4] Pitt, J. I. *Australian Mycotoxin Newsletter*. **1996**, 7, 1-8.
- [5] *Manual sobre la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 73*; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO: Roma, 2003.
- [6] Romagnoli, M. S. y Silva, P. S. *Revista Agromensajes. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR)*. **2004**.
- [7] Battilani, P.; Costa, L.; Dossena, A.; Gullino, M.; Marchelli, R.; Galaverna, G.; Pietri, A.; Dall'Asta, C.; Giorni, P.; Spadaro, D. y Gualla, A., *Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants*; European Food Safety Authority (EFAS): Parma, 2008.
- [8] Viñuela, E. *Oficina Regional de la FAO, Santiago de Chile* **2002**.
- [9] *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003*; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO: Roma, 2003.
- [10] Magan, N. y Olsen, M., *Mycotoxins in Food: Detection and Control*; Woodhead Pub: England, **2004**.
- [11] Horwitz, W., *Natural Toxins, in Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC International: Gaithersburg, **2000**.
- [12] Krska, R. y Molinelli, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 145-148.
- [13] Pereira, V.; Fernandes, J. y Cunha, S. *Trends. Food. Sci.Tech.* **2014**, 36, 96-136.
- [14] Berthiller, F.; Schuhmacher, R.; Buttinger, G. y Krska, R. *J. Chromatogr. A.* **2005**, 1062, 209-216.
- [15] Maragos, C. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395, 1205-1213.
- [16] Perrotta, P. R., *Estudios de las propiedades electroanalíticas y desarrollo de dispositivos nanotecnológicos para la cuantificación de ocratoxina A (OTA) en uvas y subproductos*. Tesis doctoral: Universidad Nacional de Río Cuarto, 2012.
- [17] Molina, P. G.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Bol. Soc. Chil Quim.* **1997**, 42, 465-479.
- [18] Molina, P. G.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Can. J. Chem.* **1998**, 76, 576-582.
- [19] Zon, M. A.; Marchiando, N. C. y Fernández, H. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 465, 225-233.
- [20] Molina, P. G.; Zon, M. A. y Fernández, H. *Electroanalysis*. **2000**, 12, 791-798.

métodos cromatográficos, lo que nos muestra el gran desempeño analítico del presente sensor.

Finalmente, fue posible detectar y cuantificar la micotoxina moniliformina en muestras de maíz contaminadas mediante el uso del sensor basado en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de cisteamina. Dada la presencia de algunos interferentes en la muestra, se empleó la metodología de las adiciones estándares, para minimizar el error en la cuantificación y aumentar la sensibilidad del método. La concentración de moniliformina determinada usando el sensor electroquímico, estuvo en muy buen acuerdo con la encontrada usando la metodología de HPLC propuesta por Parich y col. [86], mostrando que, efectivamente, el sensor presenta las cualidades necesarias para llevar a cabo la determinación de moniliformina en muestras reales con una selectividad y sensibilidad considerable.

Es de destacar que todos los parámetros fisicoquímicos y cinéticos determinados durante este trabajo de tesis doctoral son, según nuestro conocimiento, los primeros en ser informados para la micotoxina moniliformina, al igual que el mecanismo de oxidación electroquímica propuesto, las metodologías electroanalíticas para la determinación de moniliformina tanto en solución amortiguadora de fosfato pH 7 y acetonitrilo, el sensor electroquímico basado en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de cisteamina y los coeficientes de extinción molar determinados en acetonitrilo.

Como perspectivas a futuro, sería conveniente realizar estudios que corroboren e identifiquen la presencia de los posibles productos de descomposición del radical electrogenerado en la oxidación electroquímica de moniliformina. Esto puede ser logrado acoplando técnicas como la espectroscopia IR, la resonancia magnética nuclear (RMN), etc. a los experimentos de electrólisis a potencial controlado, que pueden identificar los productos generados durante el proceso de oxidación. También, suponiendo que uno de los subproductos generados es el ácido acético, es posible realizar una segunda electrólisis que permita electrooxidar este ácido mediante la reacción de Kolbe y así, identificar y cuantificar su presencia.

Por otro lado, se podría implementar la metodología propuesta usando el sensor electroquímico basado en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de cisteamina en otras matrices de interés, como soja, trigo, cebada, centeno y arroz, las cuales son propensas a la contaminación con moniliformina y son materias primas de exportación importantes en la Argentina. También, se podría implementar un biosensor que aumente la sensibilidad y especificidad para la detección de moniliformina en matrices reales y que se pueda usar directamente en la muestra. Sin embargo, hay que tener en cuenta que obtener un sistema biológico que detecte moniliformina no es una tarea sencilla, ya que su pequeño tamaño molecular dificulta este procedimiento.



El desarrollo de esta tesis doctoral fue llevado a cabo en dos grandes partes. Una de ellas comprendió el estudio del mecanismo de oxidación electroquímica de la micotoxina moniliformina, el que, se llevó a cabo tanto en diferentes medios como sobre diferentes superficies de electrodos y utilizando diferentes técnicas electroquímicas. La otra parte consistió en el desarrollo de un sensor electroquímico capaz de detectar y cuantificar moniliformina en muestras reales. Ambas partes enmarcan diferentes objetivos específicos que permiten lograr el cumplimiento del objetivo general de esta tesis.

El estudio del mecanismo de oxidación electroquímica de moniliformina se inició en un medio acuoso a diferentes valores de pH utilizando diferentes materiales de electrodos, como carbono vítreo, carbono pirolítico altamente orientado, oro y platino. Los resultados obtenidos mostraron que la oxidación de moniliformina no se vio afectada significativamente por el cambio del valor del pH ni se observó un efecto electrocatalítico por parte de algún material de electrodo. Estos resultados permitieron continuar los estudios mecanísticos de moniliformina en un medio no acuoso, como el acetonitrilo y, utilizando, un electrodo de carbono vítreo como electrodo de trabajo.

En acetonitrilo, se pudieron determinar parámetros fisicoquímicos, como el coeficiente de difusión y el número de electrones involucrados en la transferencia electrónica. Además, se concluyó que la oxidación electroquímica de moniliformina es una reacción del tipo $Q_1E_1Q_2$ (química–electroquímica–química), en donde la primera reacción química Q_1 es, posiblemente, un equilibrio de protonación de moniliformina previo a la oxidación electroquímica E_1 , la cual genera un radical que, posiblemente, se descomponga en dos subproductos no electroactivos (reacción Q_2). Los parámetros cinéticos y termodinámicos de las reacciones anteriores fueron determinados mediante la parametrización del modelo de reacción anterior, a través del software DigiSim, del cual, se obtuvieron voltamperogramas cíclicos teóricos que coincidieron en buen acuerdo con los obtenidos experimentalmente.

Por otro lado, se determinó que la reacción electroquímica de moniliformina en acetonitrilo presenta un control mixto (difusión-adsorción), lo que determina que sus propiedades superficiales dependerán de su concentración. Así, a bajas concentraciones de moniliformina, la reacción estará controlada mayoritariamente por la adsorción y, a concentraciones altas, el control será, principalmente, difusional. Esto permitió obtener una curva de calibración de moniliformina en medio no acuoso con un límite de detección del orden de los nanogramos, ya que las propiedades de adsorción presentes a estas concentraciones favorecieron la cuantificación de la micotoxina.

A través de la modificación de electrodos de oro con monocapas autoensambladas de cisteamina (Au–CA), se logró desarrollar un sensor electroquímico para la detección y cuantificación de moniliformina. La respuesta electroquímica de moniliformina sobre estas superficies modificadas se vio favorecida respecto a lo visto con carbono vítreo desnudo, ya que su potencial de pico se desplazó hacia zonas menos anódicas, facilitando su detección y disminuyendo los posibles interferentes que se pueden descargar en zonas de mayor potenciales. Este desplazamiento se vio favorecido por la interacción electrostática entre la carga positiva del grupo amino del tiol con la carga negativa de moniliformina presente a pH 4. Además, la pre–concentración se favoreció mediante la agitación, a diferentes intervalos de tiempo, hasta obtener la máxima señal en el menor tiempo posible. El límite de detección obtenido es casi 400 veces menor a los informados en la literatura para la determinación de moniliformina por

8

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

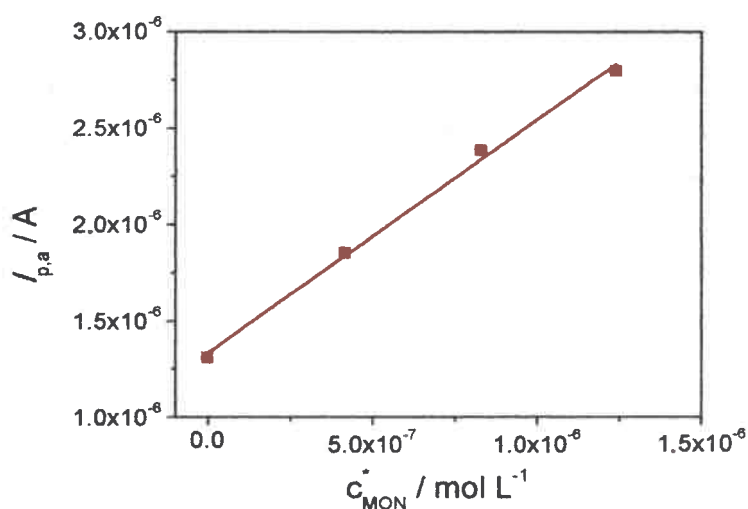


Figura 7.8. Corriente de pico en función de los agregados de solución estándar de MON realizados sobre la muestra M1 en SAC pH 4 utilizando el sensor Au-CA. $r = 0,9948$.

Los resultados obtenidos arrojaron un valor de concentración de MON en la muestra de maíz de $26,8 \pm 0,1$ ppm. Este valor es muy similar al determinado por HPLC, lo cual nos indica que el sensor Au-CA ha tenido un buen desempeño y ha podido detectar la micotoxina moniliformina en una muestra real de maíz. Estos resultados también permiten reconocer la selectividad por parte del sensor Au-CA, el cual mostró un gran desempeño analítico.

7.3.2. Sensor Au-CA

Para la determinación de MON en muestras reales utilizando el sensor Au-CA, se prepararon soluciones similares a las utilizadas con el electrodo de carbono vítreo desnudo y luego se registraron los correspondientes voltamperogramas cíclicos de cada solución. Dichas soluciones fueron diluciones al 10% de los extractos B1 y M1 en SAC pH 4.

La Figura 7.7-2, muestra el voltamperograma cíclico de la solución de M1, el cual presenta un pico cerca de los 0.45 V vs Ag/AgCl asignado a la oxidación de MON presente en la muestra. El pequeño corrimiento del potencial de 0,07 V respecto al potencial de MON encontrado en la solución estándar, es atribuido a los efectos de la matriz que, desde un punto de vista analítico, no representan un efecto significativo en la determinación de MON. Por su parte, el pico catódico coincide con el valor de potencial obtenido en la solución estándar de MON, el cual está cerca de los 0 V.

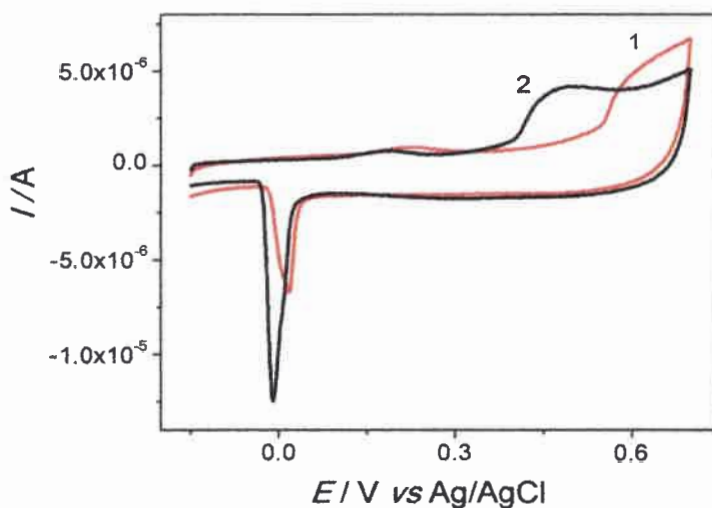


Figura 7.7. Voltamperogramas cíclicos registrados mediante el sensor Au-CA a la (1) solución B1 y (2) solución M1, ambas a 10% en SAC. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Respecto al voltamperograma registrado en la solución de B1, mostrado en la Figura 7.7-1, se observa un pequeño pico pobremente definido cerca de los 0,63 V vs Ag/AgCl. Este pico puede ser atribuido a la descarga electroquímica de algún interferente, ya que se encuentra a un potencial más anódico respecto del encontrado para MON en las soluciones estándares. A pesar de haber utilizado una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX) en la extracción de MON, algunos compuestos similares en forma y tamaño pudieron quedar al finalizar la extracción y descargarse en una zona de potencial similar a la de MON.

A la luz de estos resultados, es necesario aplicar una metodología que permita minimizar aún más los efectos de la matriz. Es por esto que se utilizó el método de las adiciones estándar para medir las muestras de MON en los extractos. Así, se preparó una solución al 5% de M1 en SAC pH 4 y se realizaron tres niveles de agregados de estándar de MON. La relación de la $I_{p,a}$ en función de los agregados de MON se muestra en la Figura 7.8.

preparada a partir del reactivo comercial. Si bien el voltamperograma cíclico de M1 presenta mayor corriente de pico respecto a B1, no se podría realizar una cuantificación adecuada, ya que la misma señal aparece en la solución ausente de MON.

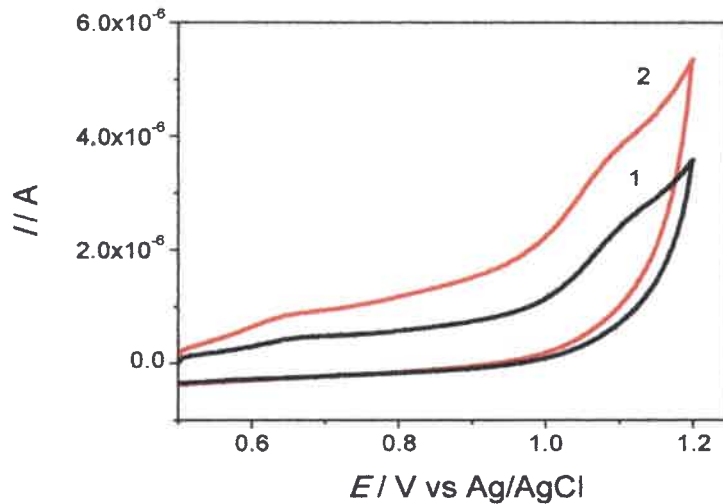


Figura 7.5. Voltamperogramas cíclicos de (1) B1 y (2) M1 en SAC al 10% registrados con un electrodo de carbono vítreo desnudo.

En base a estos resultados, se procedió a realizar una adición estándar a tres niveles de concentración (Figura 7.6). El resultado obtenido, fue un valor de concentración de MON en la muestra de $16,5 \pm 0,3$ ppm.

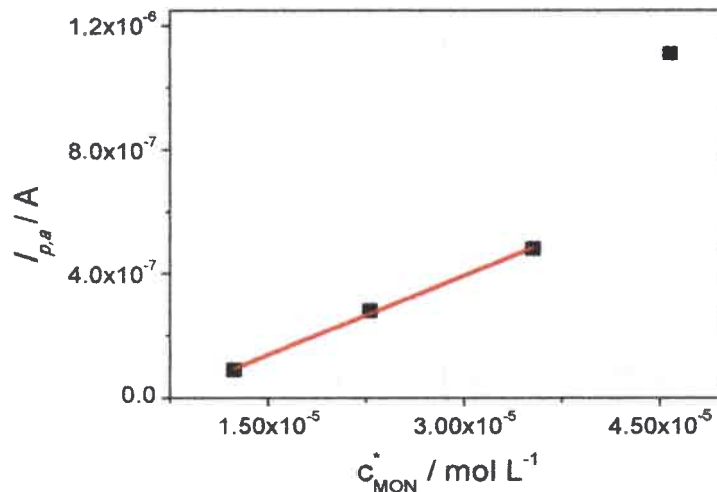


Figura 7.6. Adición estándar a las solución de M1 a tres niveles de concentración. $r = 0,9971$.

Este valor es menor respecto al valor determinado por HPLC, lo que muestra la poca sensibilidad y selectividad del electrodo de carbono vítreo desnudo para la cuantificación de MON en una muestra real.

MON en el extracto M1. La diferencia en los máximos de absorción se puede atribuir a los efectos de la matriz propios de las muestras reales.

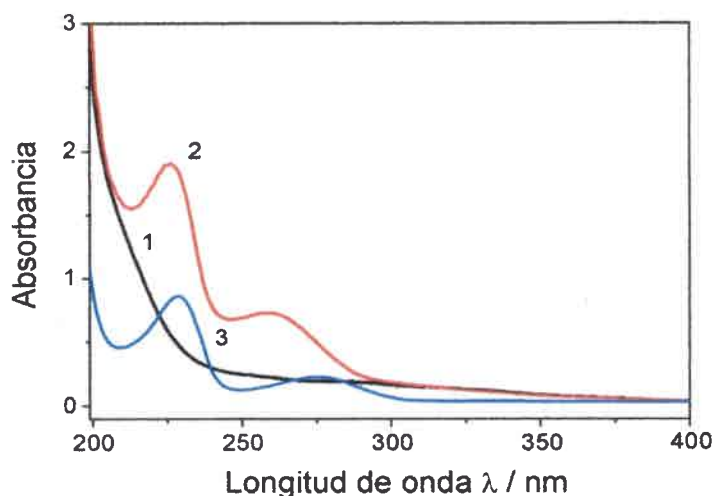


Figura 7.4. Espectros UV-Vis de (1) B1, (2) M2 y (3) solución estándar de MON $8,3 \times 10^{-5}$ M en SAF.

A partir del espectro UV-Vis de M1, se puede determinar un valor aproximado de la cantidad de MON presente en la muestra sólo si se considera que la banda de absorción cercana a los $\lambda = 226$ nm corresponde en, su gran mayoría, a la presencia de MON. Así, un valor de $31,4 \pm 0,1$ ppm fue encontrado. Este valor es mayor que el determinado por HPLC, probablemente, debido a los interferentes de la muestra que absorben en la misma región que MON.

7.3. Determinación electroquímica de MON

La determinación electroquímica de MON en la muestra real se llevó a cabo utilizando, inicialmente, el electrodo de carbono vítreo desnudo y luego el sensor Au-CA. La experiencia con el electrodo de carbono vítreo se realizó a modo comparativo, ya que éste permitió inferir la selectividad del sensor. Por otro lado, conociendo la concentración de MON en M1, se pudo establecer las características analíticas del sensor para la determinación de la micotoxina.

7.3.1. Electrodo de carbono vítreo desnudo

Para llevar a cabo las experiencias con el electrodo de carbono vítreo desnudo, se prepararon soluciones al 10% de B1 y M1 en solución amortiguadora de citrato pH 4 y se registraron los correspondientes voltamperogramas cíclicos.

En la Figura 7.5, se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados a la solución que contenía B1 (curva 1) y M1 (curva 2). Ambos voltamperogramas son muy similares, presentando una pobre señal cerca de los 1,1 V vs Ag/AgCl. El valor de corriente de pico registrado para M1 tiene un valor significativamente menor al que se esperaría para una solución acuosa de MON de concentración similar,

Bajo las mismas condiciones utilizadas para la curva de calibración, se registraron los correspondientes cromatogramas.

Los cromatogramas de las muestras B1 y M1 se muestran en la Figura 7.3-A, en donde es posible observar que B1, tal como se esperaba, no presenta ningún pico cercano a los tiempos de retención de MON, lo que indica que la matriz está libre de MON y que, además, no existe un compuesto que interfiera con la detección de MON. Por otro lado, el cromatograma de M1 (Figura 7.3-A-2) muestra un pico agudo a los 9 minutos de tiempo de retención, difiriendo en 2 minutos con el registrado de una solución estándar de MON. Esta diferencia condujo a realizar co-inyecciones a la muestra M1 con soluciones estándares de MON para verificar que este pico sea producido por la presencia de la micotoxina en la muestra. De tal manera, se hicieron dos co-inyecciones a dos niveles de concentración de MON diferentes a una solución diluida de M1. Tal como lo muestra la Figura 7.3-B, el pico del cromatograma 1, en ausencia de estándar de MON, crece en el mismo tiempo de retención a medida que se realizan la primera (cromatograma 2) y la segunda (cromatograma 3) co-inyecciones de estándar de MON, indicando que, efectivamente, este pico a los 9 minutos de retención en la muestra real M1 corresponde a la micotoxina moniliformina. Este corrimiento en el tiempo de retención puede ser atribuido a los efectos de la matriz ausentes en las soluciones estándar de MON.

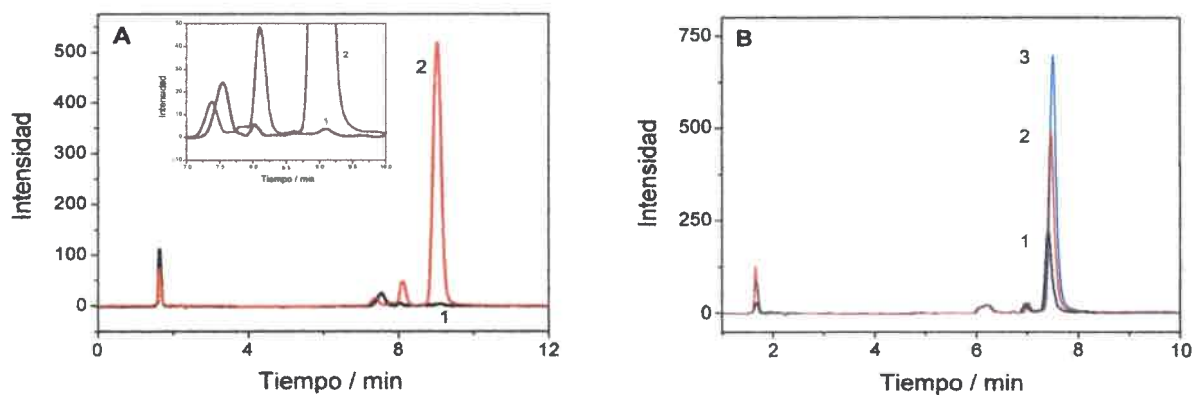


Figura 7.3. (A) Cromatogramas de la muestra (1) B1 y de la muestra (2) M1. (B) Cromatogramas de la muestra (1) M1 diluida y sus (2) primera y (3) segunda co-inyección de estándar de MON.

Habiendo caracterizado el pico de MON en las muestras reales, se pudo cuantificar la cantidad de MON presente en dicha muestra a través de las curvas de calibración mostradas anteriormente. La cantidad de MON determinada para esta muestra fue de $23.0 \pm 0,3$ ppm. Dicho valor será tomado como el valor de referencia de la concentración de MON en la muestra M1.

Por otra parte, la presencia y ausencia de la micotoxina en las muestras M1 y B1, respectivamente, también fue corroborada al registrar espectros UV-Vis a las soluciones obtenidas al final del proceso de extracción. Como lo muestra la Figura 7.4, el espectro de B1 (1) no registra ninguna banda de absorción en todo el intervalo de longitudes de onda medido, infiriendo la ausencia de MON en dicha muestra. Por el contrario, la muestra M1 si registró dos bandas de absorción a $\lambda = 226$ y $\lambda = 259$ nm (espectro 2), muy similares a las observadas en los espectros de MON en SAF pH 7 (espectro 3), infiriendo la presencia de

Como podemos ver en la Figura 7.1, la solución estándar presenta un sólo pico cromatográfico a los 7,9 minutos, el cual es atribuido a la presencia de la micotoxina. Un tiempo de retención similar, de 7 minutos, fue el informado por Krska y col. Este pico presenta una buena resolución, ya que se encuentra totalmente definido y con una simetría adecuada. Además, su tiempo de retención es aceptable dentro de las experiencias cromatográficas. Todo lo anterior permitió aceptar las condiciones de trabajo utilizadas, ya que produjeron resultados satisfactorios.

Habiendo caracterizado el pico cromatográfico de MON, se continuó con el desarrollo de una curva de calibración, preparando soluciones estándares de MON disueltas en la misma fase móvil a concentraciones entre $8,3 \times 10^{-4}$ y $8,3 \times 10^{-9}$ M. Luego de registrar los cromatogramas a cada concentración, se determinó el área de cada pico y se estableció la relación con su respectiva concentración.

Como podemos ver en la Figura 7.2, se obtuvo una curva de calibración con dos porciones lineales, una a bajas concentraciones (Figura 7.1–A) y otra a altas concentraciones (Figura 7.1–B). Las ecuaciones que describen cada curva de calibración se muestran a continuación:

A bajas concentraciones:

$$\text{area} = (9,2 \pm 5,3) \times 10^5 (M^{-1}) c_{MON}^* - (14 \pm 20) \quad (7.1)$$

A altas concentraciones:

$$\text{area} = (100 \pm 15) \times 10^5 (M^{-1}) c_{MON}^* + (0,03 \pm 0,07) \quad (7.2)$$

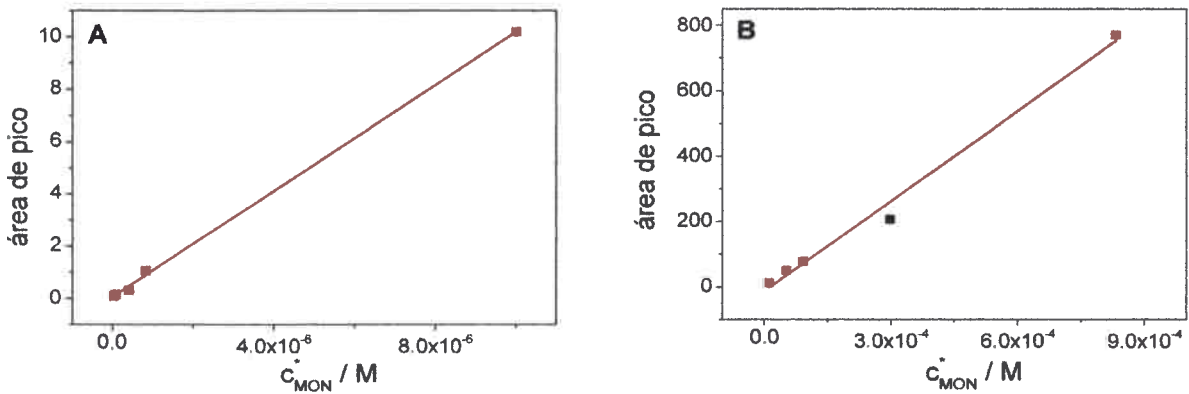


Figura 7.2. Curvas de calibración de MON para la cuantificación de MON por HPLC/UV–Vis en (A) bajas concentraciones, $r = 0,9913$ y (B) altas concentraciones, $r = 0,9871$. $\lambda = 227 \text{ nm}$

El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron determinados utilizando la curva de calibración en bajas concentraciones, los cuales fueron $\text{LOD} = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (1ppb) y $\text{LOQ} = 3,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ (3ppb), para una relación señal–ruido de 3:1 y 10:1, respectivamente.

Teniendo ajustada la metodología para la cuantificación de MON por HPLC, se continuó con la determinación de la micotoxina en las muestras reales. Para ello, se trabajó con dos muestras de maíz, una contaminada con MON (M1) y otra totalmente estéril y ausente de MON (B1), las cuales pertenecen al mismo lote de maíz y se les aplicó el mismo procedimiento de extracción (ver Sección 3.1.6).

7.1. Generalidades

El estudio del mecanismo de descarga electroquímica de MON realizado durante este trabajo, es la base sobre la cual se fundamentó el desarrollo de la técnicas electroanalítica propuesta para la determinación de MON en muestras reales. Si bien se construyó un sensor, basado en electrodos modificados, con las características necesarias para trabajar en muestras reales, también se utilizará un electrodo de carbono vítreo desnudo a efectos comparativos.

La preparación de las muestras de maíz y la posterior extracción de la micotoxina son metodologías que se describieron en la Sección 3.1.6. La cromatografía HPLC es la técnica más empleada para la detección y cuantificación de MON en muestras reales, por lo que fue necesario su uso para comparar la efectividad de la técnica electroanalítica propuesta. Es por esto que primero se describen los resultados obtenidos por HPLC y, luego, se procede a describir aquellos obtenidos por el sensor y el electrodo de carbono vítreo desnudo.

7.2. Determinación de MON por HPLC

Para llevar a cabo la determinación de MON por HPLC, se utilizó la metodología empleada por Krska y col. [86], en la cual, durante el proceso de extracción, se utilizan columnas de extracción en fase sólida de intercambio aniónico fuerte (SPE-SAX), lo que permite obtener extractos más limpios y concentrados de MON. Estas columnas también tienen la ventaja, en los métodos analíticos, de minimizar los interferentes en la muestra, lo que aumenta la sensibilidad y el rendimiento de la cuantificación.

Inicialmente se registró un cromatograma de una solución estándar de MON, disuelta en la misma fase móvil, la cual consta de 10 mL de solución par iónica y 50 mL de ACN aforados a 1 L de agua, para determinar los tiempos de retención y ajustar los parámetros de la corrida, los cuales fueron los mismos que informó Krska y col. (Ver Sección 3.3.3).

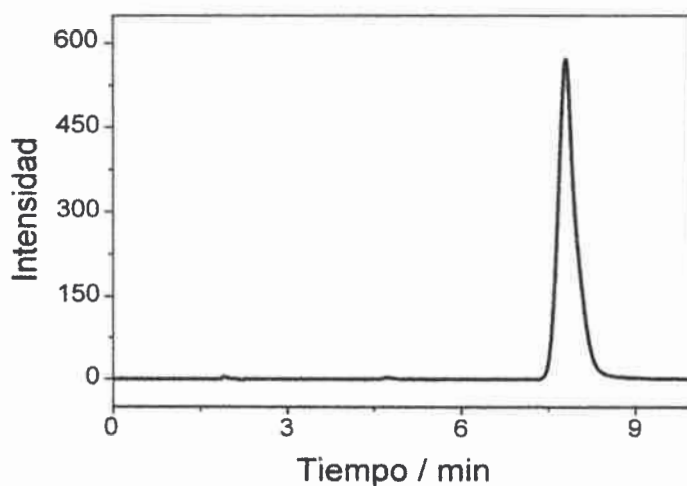


Figura 7.1. Cromatograma de solución estándar de MON 3×10^{-4} M.

7

DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE MON EN MUESTRAS REALES

En este último capítulo se utilizarán las técnicas electroanalíticas propuestas, anteriormente, para la determinación de MON en una muestra de maíz. Se utilizó la cromatografía HPLC a efectos comparativos.

en cuenta que el objetivo principal del sensor es poder detectar y cuantificar MON en muestras reales, el sensor presenta la ventaja, sobre el electrodo desnudo, de poder desplazar la oxidación de MON a potenciales menos positivos, en donde la cantidad de interferentes será menor.

Así, este es, según nuestro conocimiento, el primer sensor electroquímico para la cuantificación de MON. En el capítulo siguiente se probará este sensor para la determinación de MON en muestras reales, lo que, en principio, complementaría el desarrollo de la metodología electroanalítica para la determinación de la micotoxina moniliformina.

En la Figura 6.10 se muestra la curva de calibración obtenida

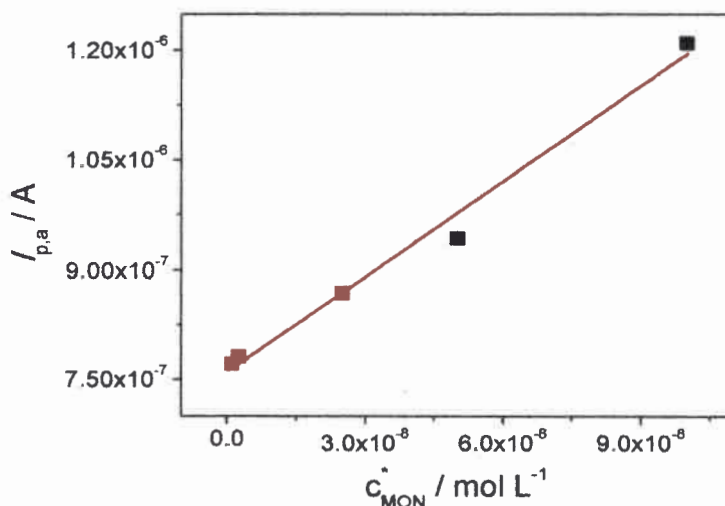


Figura 6.10. Curva de calibración de MON en SAC pH 4 con MAE de Au-CA. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

La curva de calibración está representada por la siguiente ecuación:

$$I_{p,a}(A) = (7,59 \pm 0,14) \times 10^{-7}(A) + 4,35 \pm 0,28(A M^{-1}) \times C_{MON}^*(M) \quad (6.1)$$

El coeficiente de correlación de la curva de calibración fue de $r = 0,9863$ y el límite de detección determinado para una señal:ruido 3:1 fue de $8,3 \times 10^{-10} \text{ M}$ (0,1 ppb).

La repetitividad y la reproducibilidad del sensor fue determinada usando dos concentraciones estándar de MON de 0,3 y 3 ppb. De el ensayo de repetitividad, el cual consistió en registrar tres voltamperogramas cíclicos consecutivos a la misma solución de MON, se obtuvo una desviación estándar relativa (%RDS) de 3,1 % y 3,6 % para cada solución, respectivamente. Por otro lado, el ensayo de reproducibilidad, realizado durante tres días consecutivos, arrojó un % RDS de 3,1 % y 3,0 %, respectivamente. Estos resultados demuestra el buen desempeño del sensor.

Se puede concluir, de manera general, que fue posible de manera satisfactoria la construcción de un sensor basado en MAE de cisteamina para la determinación de MON. A través de la optimización de los parámetros, el sensor mostró un buen desempeño analítico y un buen límite de detección comparado con los informados en la literatura para esta micotoxina. En comparación con las técnicas electroanalíticas previamente descritas, en donde se utilizó un electrodo de carbono vítreo desnudo, tanto en medio acuoso como no acuoso, el sensor presentó mejores características analíticas que las obtenidas con el CV desnudo en medio acuoso (LOD = 180 ppb, pendiente = $0,060 \pm 0,003 \text{ A M}^{-1}$, intervalo = $3 \times 10^{-6} - 5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$), ya que se obtuvo un menor límite de detección, un intervalo de concentraciones más amplio y una mayor sensibilidad. Por otro lado, el límite de detección y la sensibilidad obtenida con el electrodo de carbono vítreo desnudo en medio no acuoso (LOD = 0,001 ppb, pendiente = $(2,43 \pm 0,22) \times 10^3 \text{ A M}^{-1}$) fue mejor que las obtenidas con el sensor electroquímico. Este resultado puede ser atribuido a las características adsorptivas que presenta MON en este medio sobre CV desnudo. Sin embargo, si se tiene

Evaluación del tiempo de acumulación

Habiendo determinado que las condiciones óptimas para la preparación de la monocapa autoensamblada de cisteamina sobre electrodos de oro son: $c_{CA}^* = 2,5 \times 10^{-3}$ M y $t_{mod} = 30$ minutos, se procedió a una nueva evaluación del tiempo de acumulación para determinar posibles efectos de concentración de MON sobre estos parámetros. Para esto, se prepararon soluciones de MON a diferentes concentraciones y se estableció la relación entre los valores de corriente de pico anódicos de cada concentración y el tiempo de acumulación.

Como muestra la Figura 6.9, los resultados obtenidos con la variación de la concentración no mostraron ningún efecto por parte de la concentración de MON, ya que los máximos valores de la corriente de pico anódica se alcanzaron, igualmente, a los 80 minutos de tiempo de acumulación. Este comportamiento puede ser esperado para este tipo de sistemas, en donde la especie electroactiva, MON, es acumulada sobre la superficie del electrodo. Tal acumulación es favorecida por la atracción electrostática entre las cargas positivas de los grupos terminales del tiol y la carga negativa de MON. Por lo tanto, para las determinaciones analíticas, el tiempo de acumulación fue de 80 minutos.

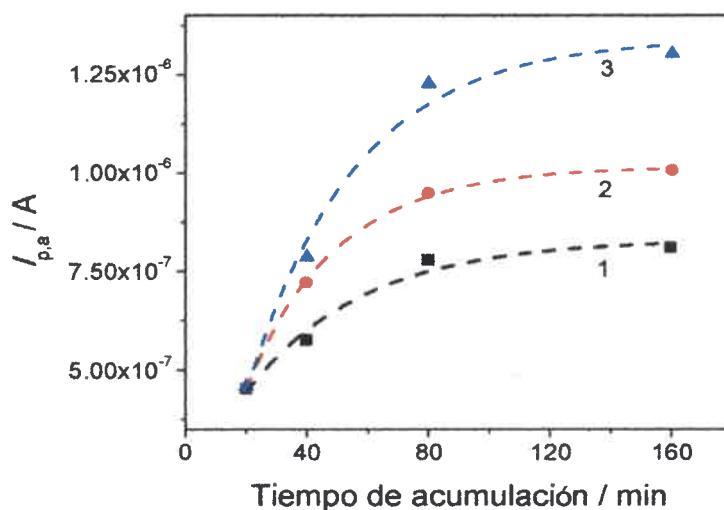


Figura 6.9. Relación de la corriente de pico anódica y el tiempo de acumulación de MON a concentraciones de MON de (1) $c_{MON}^* = 1 \times 10^{-9}$, (2) 5×10^{-8} , (3) 1×10^{-7} M. Las líneas punteadas sólo se trazan para mostrar la tendencia.

6.3.3. Curva de calibración de MON en medio acuoso con MAE de cisteamina

Como etapa final, se procedió a la construcción de una curva de calibración de MON utilizando un electrodo de oro modificado con MAE de cisteamina. Para ello, se prepararon distintas soluciones de MON a diferentes concentraciones en solución amortiguadora de citrato pH 4 y utilizando los electrodos de oro modificados, los que se prepararon utilizando los parámetros previamente ajustados a sus valores óptimos.

Como se mencionó anteriormente, cada monocapa autoensamblada es única y sus parámetros dependerán de las condiciones de trabajo de cada experimento en particular. Es por esto que la concentración de CA puede parecer baja en relación a las concentraciones informadas en algunos trabajos encontrados en la literatura en los que se informa el uso del mismo tiol para formar una MAE [185-187]. Sin embargo, también está en buen acuerdo con otros estudios en donde las mejores condiciones se encontraron a bajas concentraciones de cisteamina [30, 31, 188].

Tiempo de modificación

El tiempo de modificación es un parámetro que está directamente relacionado con la concentración del tiol. Ambos, definen algunas de las propiedades de las monocapas, como la mojabilidad, el orden y la cobertura, entre otros.

El ajuste del tiempo de modificación fue evaluado en un intervalo de 5 a 120 minutos utilizando una concentración constante de cisteamina de $2,5 \times 10^{-3}$ M. La concentración de la solución de MON también fue constante, a un valor de $2,5 \times 10^{-4}$ M preparada en SAC.

Como se muestra en la Figura 6.8, la corriente de pico anódica aumenta inicialmente hasta alcanzar un valor máximo a los 30 minutos, para luego disminuir a medida que transcurre el tiempo. Este comportamiento puede ser explicado si tenemos en cuenta que, a medida que pasa el tiempo de modificación, la monocapa se hace más compacta y ordenada, disminuyendo los posibles modos de transferencia de carga entre MON y la MAE (efecto túnel, permeabilidad, sitios vacantes, etc.).

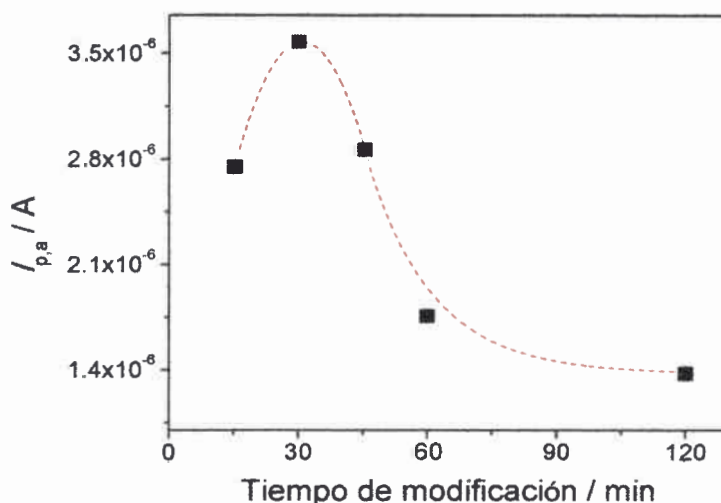


Figura 6.8. Relación entre la corriente de pico anódica en función del tiempo de modificación del electrodo de oro. $c_{MON}^* = 2,5 \times 10^{-4}$ M. La línea roja punteada sólo se traza para mostrar la tendencia.

En otras palabras, si decrecen los defectos en la monocapa aumentará tanto la distancia de tuneleo y la permeabilidad. Un resultado similar fue encontrado por Wirde y col., quienes en tan sólo 5 minutos de modificación alcanzaron una cobertura superficial del 80% del electrodo con tioles de cisteamina [188].

Esto permitió asumir que, al menos, la mitad de los productos generados en el barrido de oxidación, los cuales se acumulan con el tiempo en la monocapa, son reducidos cuando se invierte el sentido del barrido de potencial. A pesar de esto, no es posible hacer una asignación definitiva de cuales son los productos de oxidación que son reducidos.

6.3.2. Ajuste de parámetros para la preparación de las MAE de cisteamina

Debido a que no existe un procedimiento general para la preparación de una MAE, es necesario encontrar las mejores condiciones para cada caso en particular. Tales condiciones dependerán de la metodología empleada. Para este caso, se utilizó la adsorción espontánea de un alcanotiol sobre una superficie de oro desde una solución, por lo que los parámetros que deben ser ajustados son la concentración del tiol y el tiempo de modificación. Así, se comenzó con el ajuste de la concentración del tiol y, posteriormente, el ajuste de el tiempo de modificación, utilizando como constante el tiempo de acumulación de 80 minutos. Finalmente, este tiempo de acumulación fue evaluado bajos los nuevos parámetros de c_{tiol} y t_{mod} .

Concentración del tiol

Para ajustar la concentración del tiol, se prepararon soluciones de cisteamina en etanol en un intervalo de concentración entre $0,5 \times 10^{-3}$ y 8×10^{-3} M a un tiempo de modificación constante. Luego, se registraron los voltamperogramas cíclicos de una solución de MON $2,5 \times 10^{-4}$ M en SAC.

La Figura 6.7 ilustra como la corriente de pico anódica de MON alcanza sus máximos valores cuando la concentración de la cisteamina está entre $0,5$ y 8×10^{-3} M. Por lo tanto, se consideró que el valor de concentración óptimo de CA es de $2,5 \times 10^{-3}$ M.

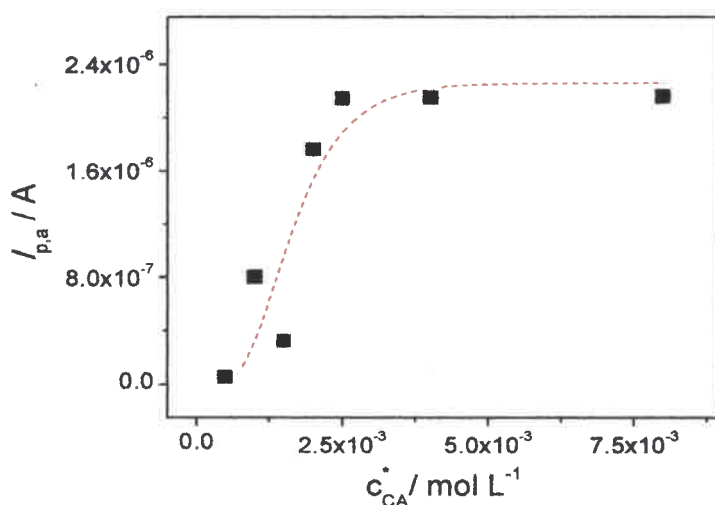


Figura 6.7. Relación entre la corriente de pico anódica en función de la concentración del tiol. $c_{MON}^* = 2,5 \times 10^{-4}$ M. La línea roja punteada sólo se traza para mostrar la tendencia.

anódicos como catódicos, con el tiempo de acumulación se muestran en la Figura 6.5.

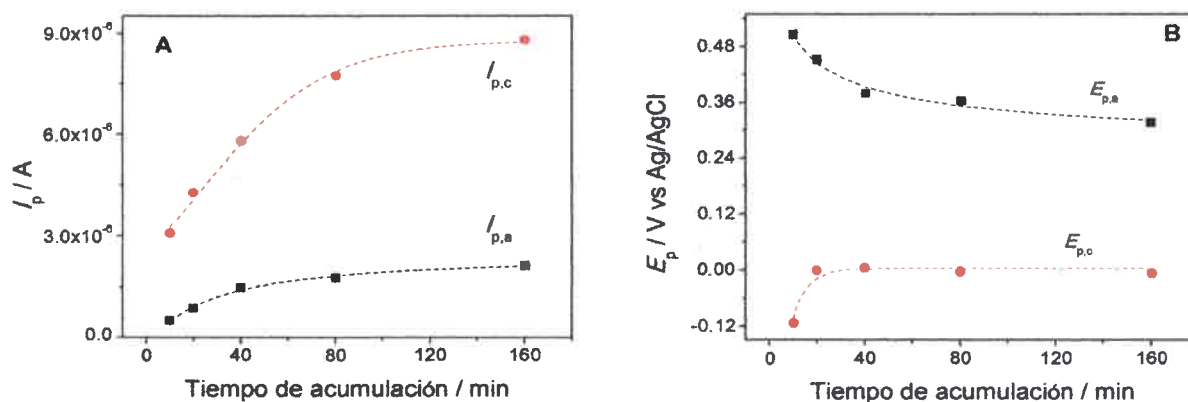


Figura 6.5. Relación entre las (A) corrientes de pico anódica y catódica y (B) potenciales de pico anódico y catódico en función del tiempo de acumulación. $c_{MON}^* = 2,5 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,100$ V s^{-1} . Las líneas punteadas sólo se trazan para mostrar la tendencia.

Como se observa en la Figura 6.5, tanto los valores de las corrientes de pico como los potenciales de pico permanecen prácticamente constantes después de los 80 minutos de tiempo de acumulación, Así, se tomará de aquí en adelante un tiempo de acumulación de 80 minutos, ya que de esta manera se asegura de que se obtendrá el máximo valor de corriente en el menor tiempo posible. Este valor será, posteriormente, evaluado en función del ajuste de los parámetros de formación de la monocapa Au-CA.

Mediante un análisis de las cargas de los picos anódicos y catódicos, se pudo establecer la existencia de una relación lineal entre las cargas de ambos picos a medida que aumenta el tiempo de acumulación. Como se puede ver en la Figura 6.6, existe una relación lineal entre la carga anódica y la carga catódica bajo los siguientes parámetros de correlación: pendiente de $0,57 \pm 0,02$; ordenada de $(9,90 \pm 0,42) \times 10^{-7}$.

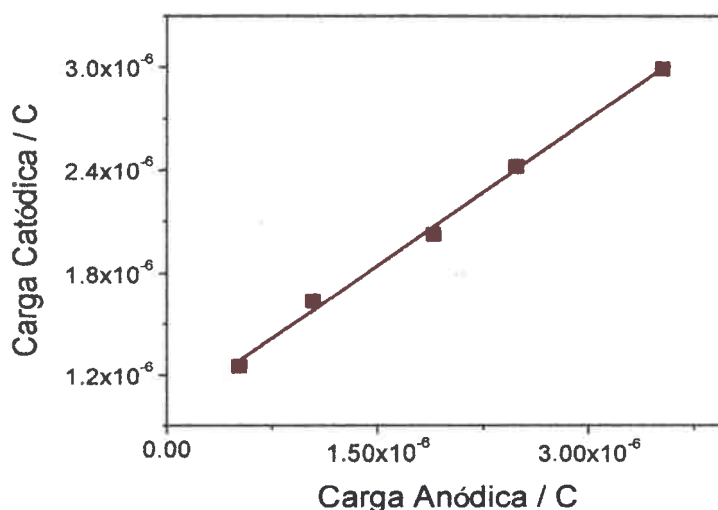


Figura 6.6. Relación de la carga anódica y catódica a diferentes tiempos de acumulación de MON. $c_{MON}^* = 2,5 \times 10^{-4}$ M. $r = 0,9954$.

con MON debido al impedimento estérico generado por sus dos sustituyentes metilos. Caso contrario para el grupo terminal de la monocapa de cisteamina, el cual puede interactuar con MON con mayor libertad. Teniendo en cuenta estos factores y el desempeño de los electrodos, se decidió trabajar en el desarrollo analítico con los electrodos modificados con las monocapas autensambladas de tioles de cisteamina.

6.3. Electrodos de oro modificados con MAE de cisteamina

Habiendo determinado que Au-CA es la mejor monocapa para la determinación de MON, primero se realizó un análisis de los voltamperogramas cíclicos obtenidos a los diferentes tiempos de acumulación, previo al ajuste de los parámetros de la preparación del autoensamblado.

6.3.1. Análisis de la respuesta electroquímica de MON sobre Au-CA

En la Figura 6.4, se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados a 0, 10, 20, 40, 80 y 160 minutos de tiempo de acumulación en una solución de MON en SAC usando el electrodo Au-CA. Allí podemos ver claramente el corrimiento del potencial de pico anódico a zonas menos positivas, al igual que un aumento en la corriente de pico anódica, a medida que transcurre el tiempo de acumulación. Por su parte, el pico catódico sólo muestra un aumento de corriente, ya que su potencial de pico catódico permanece estable con el tiempo.

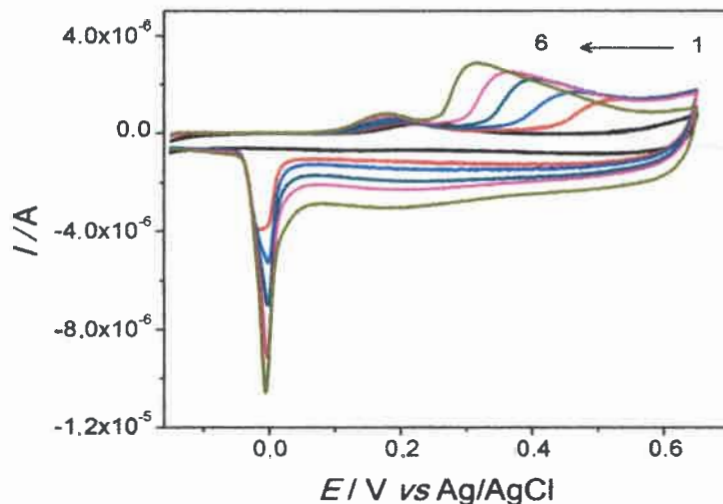


Figura 6.4. Respuesta electroquímica de MON sobre un electrodo de oro Au-CA a tiempos de acumulación de (1) 0, (2) 10, (3) 20, (4) 40, (5) 80 y (6) 160 minutos. $c_{MON}^* = 2,5 \times 10^{-4} M$. $v = 0,100 V s^{-1}$.

El comportamiento observado era predecible si tenemos en cuenta que la metodología empleada es, como su nombre lo indica, un proceso acumulativo. Es decir que si se establecen relaciones entre las $I_{p,a}$, $I_{p,c}$, $E_{p,a}$ y $E_{p,c}$ respecto al tiempo, se obtendrán valores máximos de estas variables que pueden ser considerados como los óptimos. Dichas relaciones entre las corrientes y los potenciales de pico, tanto

agita constantemente la solución de trabajo y cada determinado tiempo se registra un voltamperograma cíclico hasta obtener la mayor señal corriente posible. A este parámetro se le llamó tiempo de acumulación (t_{acu}). Además, pensando en una posible permeabilización de MON en las monocapas, se decidió seguir sólo con los electrodos de oro modificados con cisteamina (Au-CA) y 2-(dietilamino)etanotiol (Au-(2-DAET)).

De esta manera, se repite el mismo experimento antes mencionado bajo las mismas condiciones experimentales, con la diferencia de que esta vez se se agrega la agitación controlada a la solución y se registra voltamperogramas cada 0, 10, 20, 40, 80 y 160 minutos.

En la Figura 6.3 se muestran los resultados obtenidos para los electrodos modificados con CA y con 2-DAET después de 160 minutos de acumulación. En ambos electrodos se puede ver el efecto positivo que se logró utilizando diferentes tiempos de acumulación, mediante la agitación de la solución de trabajo, ya que la descarga electroquímica de MON tuvo un corrimiento catódico de al menos 0,7 V respecto a lo obtenido con el electrodo de oro desnudo sin agitar, sobre el cual, se descargaba cerca de la zona de los óxidos de oro (ver Figura 4.13). Además del pico de oxidación de MON, se produjo otra descarga electroquímica próxima a los 0,25 V, la cual también aparece en la solución amortiguadora en ausencia de MON, lo que nos indica que esta descarga es propia de la solución amortiguadora de citrato, pero que no afecta la respuesta electroquímica de MON. En cuanto al pico de reducción que se observa cerca de los 0 V, se supone que representa la reducción del/os producto/s de la oxidación de MON. Sin embargo no es posible realizar aún una asignación definitiva.

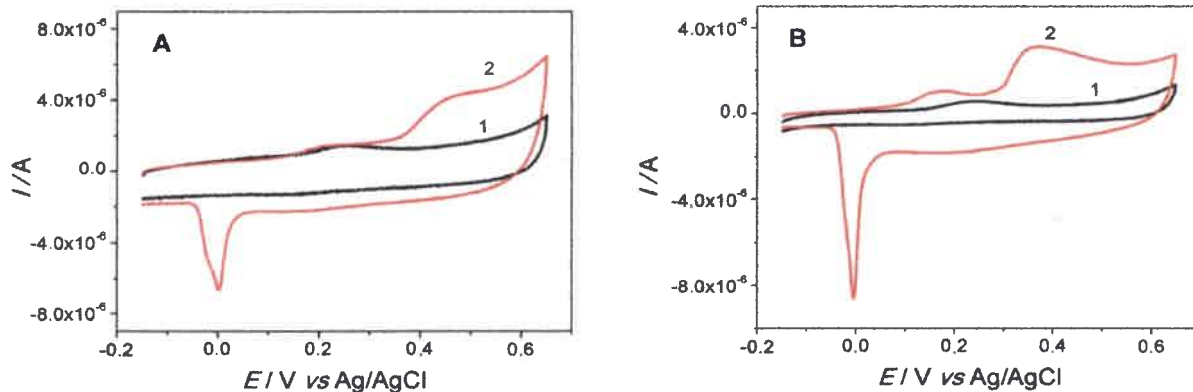


Figura 6.3. Voltamperogramas cíclicos registrados en (1) solución de SAC y (2) solución de MON en SAC sobre electrodos de oro modificados con MAE de (A) cisteamina y (B) 2-(dietilamino)etanotiol. $c_{MON}^* = 2,5 \times 10^{-4}$. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Comparando los resultados obtenidos con los electrodos modificados con CA y 2-DAET, se puede observar una mejor respuesta por parte de la monocapa de cisteamina, la cual produjo un mayor corrimiento del potencial de pico con una mayor corriente, lo que en términos analíticos representa una fuerte ventaja. Esto se puede explicar si se tiene en cuenta las posibles interacciones entre la micotoxina cargada negativamente y el grupo terminal de la monocapa. Si bien ambos grupos pueden protonarse para obtener una carga positiva, la monocapa 2-DAET presenta una mayor dificultad para interactuar

no específicas y los restos de tioles no adsorbidos. Posteriormente, se registraron los voltamperogramas cíclicos con cada uno de los tioles en una solución de MON $2,5 \times 10^{-4}$ M disuelta en SAC. Dichos voltamperogramas fueron registrados hasta un potencial anódico máximo de 0,9 V vs Ag/AgCl, dado que a mayores potenciales es posible desorber la monocapa.

Como se puede ver en la Figura 6.2, MON no se descarga sobre los electrodos modificados con MAE de tioles. Ésto lleva a pensar que la atracción electrostática es muy débil, por lo que se necesita tiempo para que se establezcan las interacciones como se planteó inicialmente. También, si pensamos en los tres diferentes modos que se puede producir una transferencia electrónica a través de una MAE (ver Sección 2.4.1), lo más factible es que la descarga de MON sobre los electrodos modificados se produzca por permeabilización de la monocapa, en donde los electrodos modificados con 4-aminotiofeno y 4-mercaptopiridina pueden tener mayor impedimento, haciendo que la descarga no se produzca. En cambio, para los electrodos modificados con cisteamina y 2-(dietilamino)etanotiol esto no debería ser problema, ya que al ser tioles de cadena corta la permeabilización debería ocurrir.

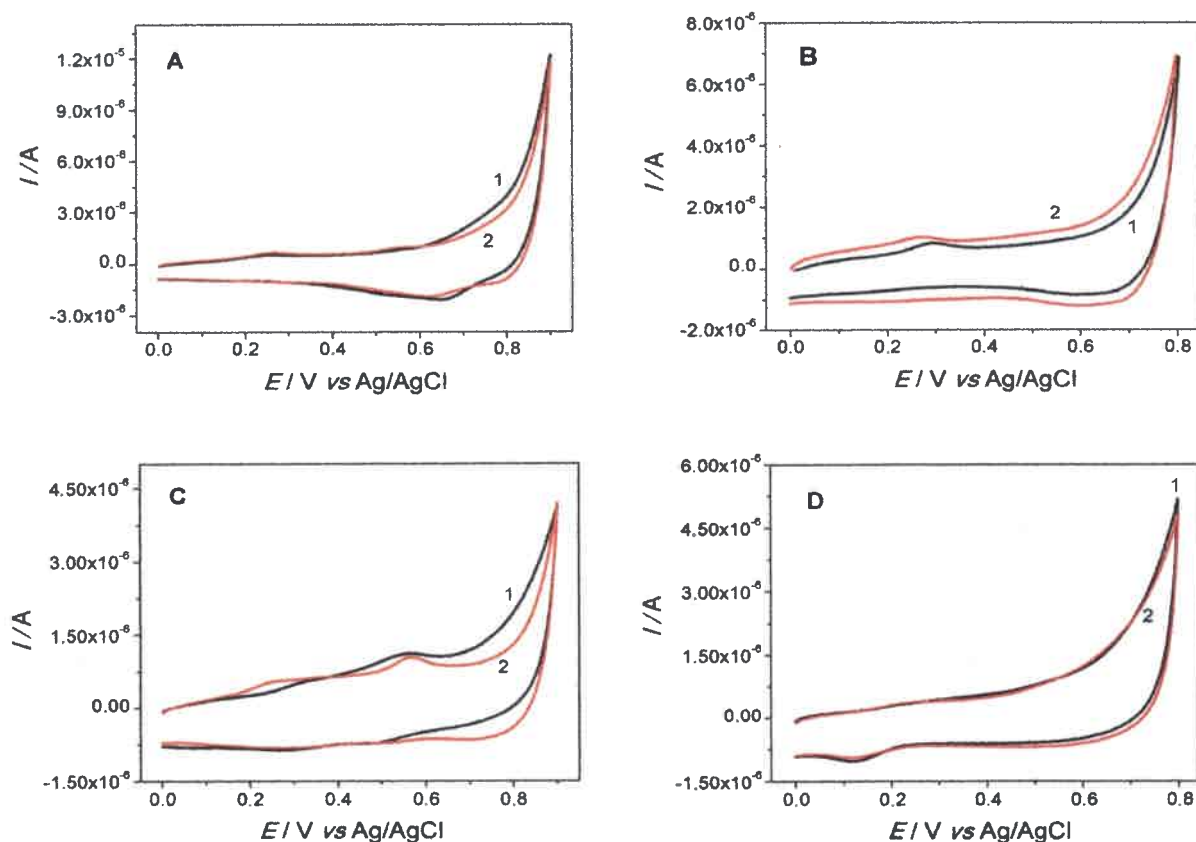


Figura 6.2. Voltamperogramas cíclicos de (1) solución de SAC y (2) solución de MON $2,5 \times 10^{-4}$ M en SAC, usando electrodos de oro modificados con MAE de (A) cisteamina, (B) 2-(dietilamino)etanotiol, (C) 4-aminotiofeno y (D) 4-mercaptopiridina. $c_{MON}^* = 2,5 \times 10^{-4}$. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

En vista de estos resultados, se decidió aplicar una fuerza externa para mejorar la interacción entre la monocapa y MON. Para ello, se utilizó la metodología de medidas acumulativas, esto significa que se

tioles aparece como una alternativa ideal para cumplir con las características requeridas de este caso en particular. A pesar de que existen otras metodologías para la modificación de superficies de electrodos y que pueden proporcionar un sensor con características similares a las requeridas, se utilizó la modificación con MAE, dada su factibilidad experimental y la amplia experiencia del grupo de investigación GEANA en este tema [28, 30, 31].

6.2. Estudios sobre electrodos de oro modificados con MAE

La modificación de los electrodos de oro se llevó a cabo utilizando tioles que pudieran generar cargas positivas en los grupos terminales, que son los grupos que van a interactuar con MON. Los tioles empleados en estas experiencias se muestran a continuación.

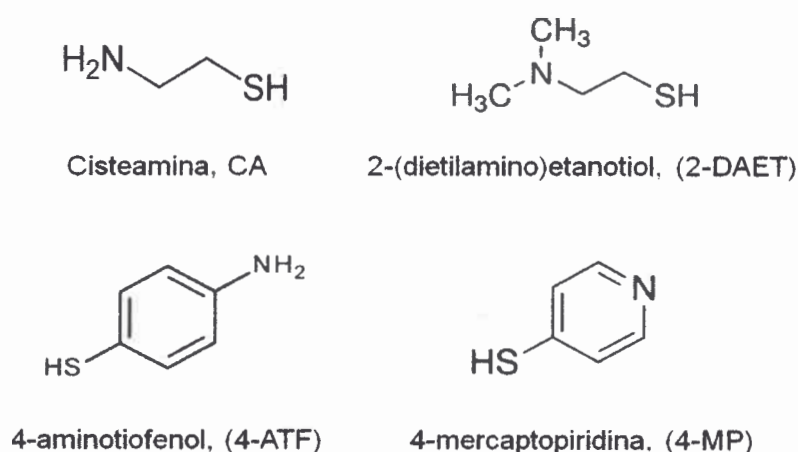


Figura 6.1. Tioles utilizados en la preparación de monocapas autoensambladas sobre electrodos de oro.

En la Figura 6.1, se observa que la característica común entre todos los tioles es la presencia de un grupo terminal amino, excepto la 4-mercaptopiridina que presenta un anillo piridínico, el cual puede cargarse positivamente con un cambio en el pH. Esto permitirá la interacción electrostática entre MON y el grupo terminal del tiol. Dado que el valor de pK_a de estos cuatro tioles está comprendido entre 4,5 y 6,3 [132, 184], se usó como medio de reacción una solución amortiguadora de citrato (SAC) pH 4 para generar la carga positiva que interactuará con la carga negativa de MON que, como se ha visto en los resultados anteriores, está presente a este valor de pH.

Respecto a la parte experimental, los electrodos de oro fueron acondicionados (ver Sección 3.2.2) antes de ser modificados con las soluciones de tioles. Las concentraciones de los tioles (c_{tiol}) y el tiempo de modificación (t_{mod}) fueron parámetros seleccionados a un valor inicial para luego ser ajustados. Los tioles fueron preparados en etanol y la modificación se llevó a cabo en un medio agitado.

Se prepararon soluciones etanólicas de cada tiol a una concentración 5×10^{-3} M y los electrodos se modificaron durante 1 hora a temperatura ambiente y resguardados del contacto directo con la luz. Finalizada la modificación, se lavaron los electrodos con etanol para eliminar todas aquellas adsorciones

6.1. Consideraciones generales

El desarrollo de un sensor para la detección y cuantificación de la micotoxina MON tiene como finalidad proporcionar una metodología alternativa, menos costosa y más eficiente, que aquellas desarrolladas mediante técnicas cromatográficas, que si bien no son las técnicas oficiales para la detección de MON, son las más empleadas. Como se indicó en los capítulos anteriores, fue posible desarrollar curvas de calibración, tanto en medio acuoso neutro como no acuoso, utilizando electrodos desnudos de carbono vítreo, con una sensibilidad y límites de detección aceptables. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las muestras reales en donde se puede encontrar MON tienen generalmente un alto contenido de compuestos orgánicos que podrían actuar como interferentes en su determinación, por lo que es necesario desarrollar una técnica que pueda ser lo suficientemente selectiva para tolerar cierto grado de interferencias y obtener resultados confiables. En este sentido, los electrodos modificados surgen como una alternativa para mejorar el rendimiento analítico en la determinación de MON por las metodologías previamente propuestas.

Para plantear qué tipo de formato de sensor es el más adecuado para la determinación de MON, se debe pensar qué propiedad hace que MON se diferencie de sus posibles homólogos en una muestra real. Entre las propiedades más representativas de MON están su bajo peso molecular y su alta constante de acidez, que permite generar una molécula con una carga negativa cuando ésta se disocia en un amplio intervalo de pH. En una muestra real como maíz, soja o trigo, la gran mayoría de los compuestos orgánicos allí presentes tienen propiedades distintas a las de MON, tiene pesos moleculares más altos y no presentan cargas eléctricas netas en sus estructuras, como por ejemplo, los azúcares, proteínas o los pigmentos. Esto permite considerar al peso molecular o la carga negativa de MON como factores de selectividad frente a los posibles interferentes orgánicos presentes en una muestra real. Ya que las técnicas electroanalíticas por sí solas no contemplan al peso molecular como un factor de selectividad, la carga negativa aparece como la propiedad más interesante para tener en cuenta para el desarrollo de un sensor electroquímico que pueda determinar MON en muestras reales con la suficiente calidad analítica requerida. Además, sabiendo que una de las características principales de las técnicas electroanalíticas es su especificidad por un estado de oxidación en particular, se pretende obtener una metodología lo suficientemente específica que pueda competir con las ya existentes.

Habiendo determinado el uso de la carga negativa de MON como herramienta para el desarrollo del sensor, ahora se debe plantear que tipo de formato se adecua a esta propiedad. Desde un punto de vista electroanalítico, el pico de oxidación de MON se encuentra en una zona anódica en donde existen una gran cantidad de compuestos orgánicos que presentan señales electroquímicas que pueden generar interferencias con la de MON, por lo que es necesario que el sensor permita desplazar la oxidación de MON hacia zonas menos anódicas. Esto se puede lograr mediante una interacción favorable entre el electrodo y MON que facilite la transferencia de carga, como puede ser una interacción electrostática. Así, el sensor debe presentar una carga positiva que permita establecer una interacción electrostática con la carga negativa de MON, lo que reduce los posibles formatos de sensores que pueden ser utilizados.

En vista de lo anterior, la modificación de los electrodos de oro con monocapas autoensambladas de

6

SENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE MON

En este capítulo se describe el desarrollo de un sensor electroquímico utilizando monocapas autoensambladas de tioles sobre electrodos de oro para la determinación de MON.

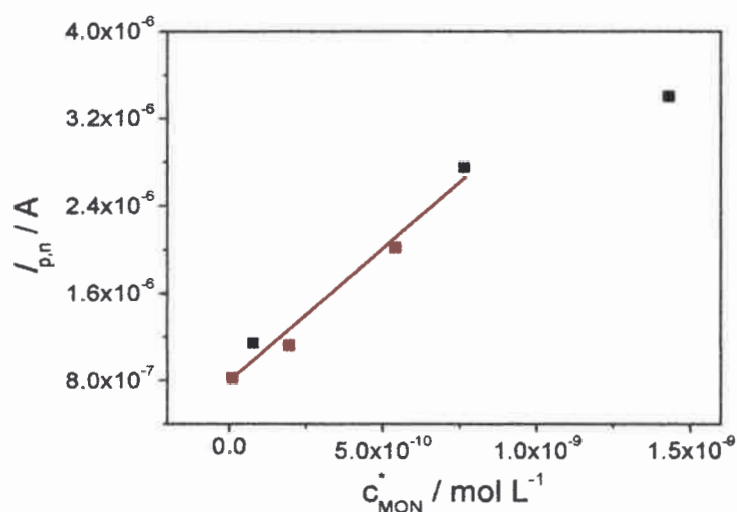


Figura 5.22. Curva de calibración de MON realizada por redisolución adsortiva con VOC. $r = 0,9835$.

Dicha curva de calibración está representada matemáticamente por la siguiente ecuación:

$$I_{p,n} = (7,8 \pm 0,9) \times 10^{-7} (\text{A}) + (2,43 \pm 0,22) \times 10^3 (\text{AM}^{-1}) \times c_{MON}^* (\text{M}) \quad (5.11)$$

El valor del límite de detección (LOD) determinado experimentalmente para una relación señal-ruido de 3:1 fue de 1×10^{-11} M (0,001 ppb). Este límite de detección al igual que la curva de calibración son, según nuestro conocimiento, los primeros resultados electroquímicos informados de esta naturaleza en donde se utiliza una técnica electroquímica para la cuantificación de MON en acetronitrilo. Ciertamente, el uso de la VOC permitió realizar una determinación cuantitativa de la micotoxina con un bajo límite de detección, mostrando ser una importante herramienta analítica alternativa respecto de otras técnicas comúnmente usadas para la determinación de la moniliformina en matrices reales.

ción, lo que permite utilizar dicha propiedad a favor y obtener una alta sensibilidad en la cuantificación de MON. Así, la redisolución adsorptiva junto a la VOC aparecen como una metodología muy apropiada para desarrollar dicho procedimiento analítico, que permita la detección de MON en concentraciones a nivel de trazas. Además, hay que tener en cuenta que las técnicas de redisolución sólo son efectivas cuando una pequeña cantidad del reactivo está adsorbido sobre el electrodo (máximo un 20% del área total del electrodo), ya que en estas condiciones se puede asumir que la concentración en la superficie del electrodo y en la solución tienen una relación lineal [126].

Para llevar a cabo dicha metodología, se utilizó una celda convencional de tres electrodos usando como electrodo de trabajo un electrodo de carbono vítreo. Se prepararon soluciones de MON disueltas en ACN más HFFTBA 0,1 M en un intervalo de concentración entre $1,1 \times 10^{-11}$ a $1,4 \times 10^{-9}$ M. Las condiciones de la voltamperometría de onda cuadrada fueron: $\Delta E_{oc} = 0,050$ V, $\Delta E_s = 0,010$ V y $f = 10$ Hz. Las condiciones de redisolución fueron $t_{acum} = 300$ segundos y $E_{acum} = 0,7$ V.

El procedimiento utilizado consistió en pulir el electrodo de trabajo entre cada medida registrada y, además, registrar un voltamperograma de onda cuadrada en una solución de ACN más HFFTBA 0,1 M en ausencia de MON, para corroborar que no haya MON adsorbida en la superficie del electrodo y luego en presencia de la micotoxina. Así, se registraron voltamperogramas cíclicos de MON en el intervalo de concentración antes mencionado, los cuales se muestran en la Figura 5.21.

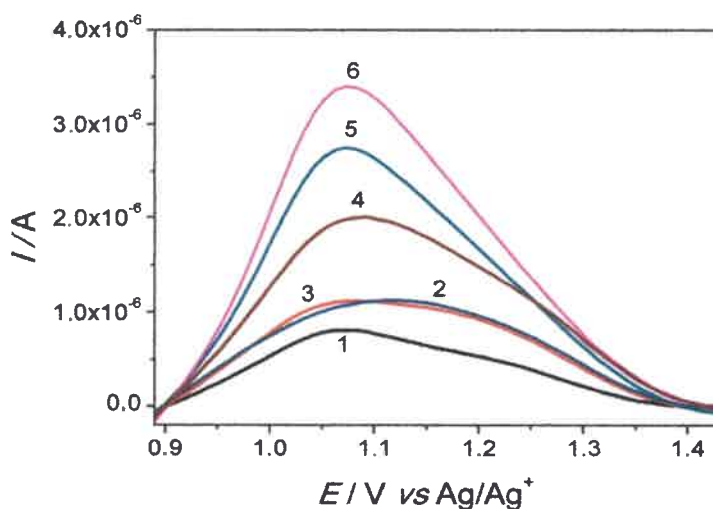


Figura 5.21. Voltamperogramas de onda cuadrada de MON en ACN más HFFTBA 0,1 M a concentraciones de MON (1) $c_{MON}^* = 1,1 \times 10^{-11}$, (2) $7,8 \times 10^{-11}$, (3) $1,9 \times 10^{-10}$, (4) $5,4 \times 10^{-10}$, (5) $7,7 \times 10^{-10}$ y (6) $1,4 \times 10^{-9}$ M.

Tomando el valor promedio de las corrientes netas registradas por triplicado y graficándolas en función de la concentración de MON, se obtuvo una curva de calibración que fue lineal en el intervalo de concentraciones, es decir, entre $1,1 \times 10^{-11}$ a $7,7 \times 10^{-10}$ M (Figura 5.22).

5.7. Determinación de MON en medio no acuoso por VOC

Como se puede apreciar en la Figura 5.19-1, el espectro de MON en un medio no acuoso presenta dos máximos de absorción a $\lambda = 227$ y $\lambda = 277$ nm. Este espectro presenta la misma banda principal de absorción de $\lambda = 227$ nm encontrada en el medio acuoso (Figura 5.19-2) atribuida al grupo α , β -insaturado. Pero difiere en la posición de su segundo máximo de absorción, el cual presenta un corrimiento hipsochrómico de ≈ 20 nm. Dicho corrimiento es debido a que MON pierde parte de la conjugación cuando se encuentra en un medio de poca basicidad como el ACN, lo que concuerda con el modelo teórico propuesto en la Sección 5.5.2, donde posiblemente existe una protonación de MON en este medio.

5.6.2. Determinación de los coeficientes de extinción molar de MON en medio no acuoso

Mediante el registro de espectros UV-Vis a diferentes concentraciones de MON en ACN más HFFT-BA 0,1 M, se construyó una curva de calibración que permitió la determinación de los coeficientes de extinción molar (ϵ) en sus máximos de absorbancia, $\lambda = 227$ y $\lambda = 277$ nm, para MON en el medio no acuoso.

En las Figuras 5.20-A y B se presentan las gráficas de absorbancia vs c_{MON}^* obtenidas a $\lambda = 227$ y $\lambda = 277$ nm, respectivamente, utilizando un intervalo de concentraciones de MON de 9×10^{-6} a $3,7 \times 10^{-5}$ M.

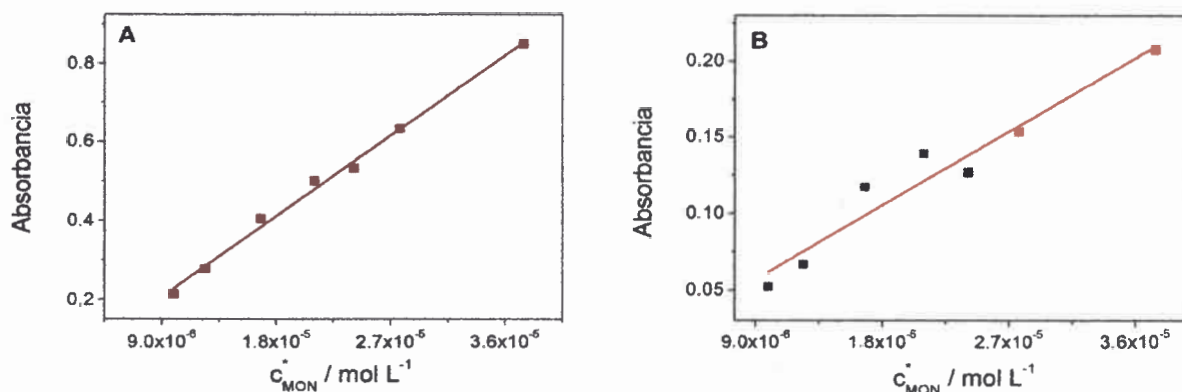


Figura 5.20. Relaciones de la absorbancia obtenidas a (A) $\lambda = 227$ nm y (B) $\lambda = 277$ nm con la concentración de MON. $r = 0,9933$ y $r = 0,9813$ para el gráfico A y B, respectivamente.

Los valores de los coeficientes de extinción molar calculados fueron $\epsilon_{227} = (22,7 \pm 0,8) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{277} = (5,4 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.7. Determinación de MON en medio no acuoso por VOC

Los resultados obtenidos durante el estudio electroquímico de MON usando la voltamperometría de onda cuadrada, permitieron realizar una aproximación a una posible metodología electroanalítica para la cuantificación de esta micotoxina en soluciones de acetonitrilo. Sumado a esto, se encuentra el hecho de que la electro-oxidación de MON a bajas concentraciones está controlada mayormente por la adsor-

el pico catódico complementario del sistema redox de MON comienza a aparecer después de invertir el sentido del barrido de potencial en el experimento voltamperométrico.

Finalmente, los productos P y Z generados en Q_2 (Ecuación 5.8) posiblemente sean ácido acético y CO_2 , respectivamente [63]. Esta suposición está basada en los resultados obtenidos de la electrólisis a potencial controlado (Sección 5.3), donde se observó una desaparición de las bandas de absorción de MON en el espectro UV-Vis de la solución electrolizada, y la propuesta de Franck y col. [63].

Se puede decir que el estudio mecanístico de MON, pudo llevarse a cabo a través de un exhaustivo proceso experimental y complementado por una modelado teórico, los cuales, convergieron de manera satisfactoria en el resultado final. La parametrización también arrojó valores teóricos consistentes y coincidentes con los obtenidos experimentalmente, lo cual indica una muy buena aproximación del modelo propuesto. Esto permite que las reacciones propuestas en el Esquema 1 más la reacción indicada en la ecuación 5.10, correspondiente a la oxidación de MON adsorbida, sean tomadas como el mecanismo más probable por el que MON se oxida electroquímicamente.

5.6. Estudio espectrofotométrico de MON

La espectrofotometría UV-Vis en medio no acuoso se utilizó para complementar las experiencias de electrólisis a potencial controlado, ya mostradas en la Sección 5.3, y para determinar los coeficientes de extinción molar, que según nuestro conocimiento no habían sido informados para este medio.

5.6.1. Análisis de los espectros UV-Vis de MON

Se registraron espectros UV-Vis de MON en solución de ACN más HFFTBA 0,1 M, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La Figura 5.19 muestra el espectro de MON en medio no acuoso como también el de MON en medio acuoso para su adecuada comparación.

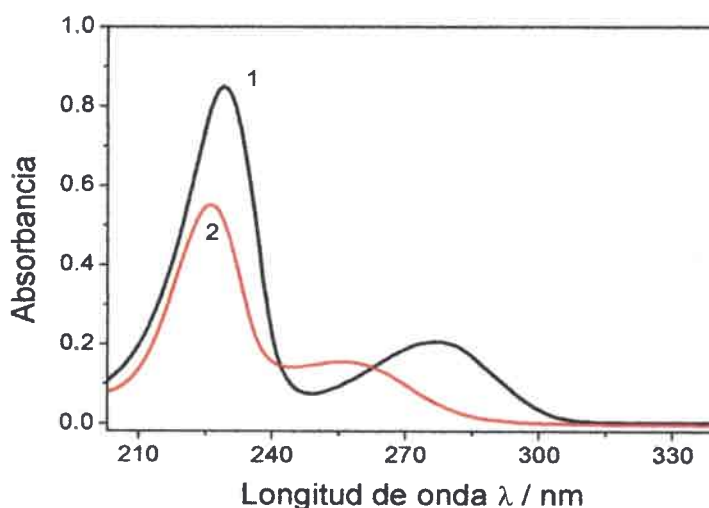


Figura 5.19. Espectros UV-Vis de (1) $MON\ 4 \times 10^{-5}\ M$ en ACN más HFFTBA 0,1 M y (2) $MON\ 2,5 \times 10^{-5}\ M$ en solución amortiguadora de fosfato pH 7.

$10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, excepto para el H^+ , el cual fue de $D_{\text{H}^+} = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ [183] y una constante de velocidad heterogénea de $k_f^0 = (1,3 \pm 0,7) \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$, que se obtuvo durante las primeras aproximaciones del modelado. Los parámetros termodinámicos y cinéticos obtenidos del mejor ajuste se resumen en la Tabla 5.5.

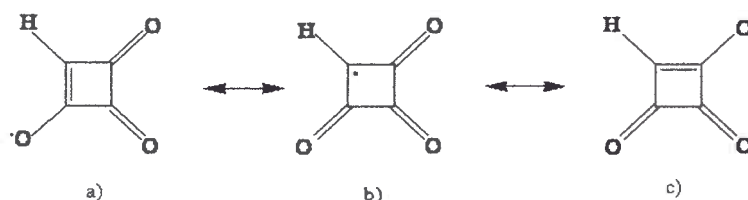
Tabla 5.5. Parámetros teóricos obtenidos durante el modelado del posible mecanismo de reacción electroquímico de MON (Esquema 1).

Parámetro	Valor
E_f^0	$(0,815 \pm 0,003) \text{ V}$
k_f^0	$(1,3 \pm 0,7) \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$
$K(1)$	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$
$k_f(1)$	$(7 \pm 0,3) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$
$K(2)$	$1 \times 10^5 \text{ M}$
$k_f(2)$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^2 \text{ s}^{-1}$

donde (1) y (2) se refieren a las reacciones químicas homogéneas indicadas en las Ecuaciones 5.7 y 5.8, respectivamente.

La constante formal de transferencia electrónica heterogénea, k_f^0 , para la reacción electroquímica, se ajusta en buena forma a la de una cupla redox cuasi-reversibles, como era de esperarse para la electrooxidación de un compuesto carbonílico, que posee una estructura y tamaño similar en un solvente polar no acuoso [175]. El valor de la constante ácida aparente de MON en ACN $K(1)$ (Ecuación 5.6), obtenida del mejor ajuste, es comparable con aquella reportada en la literatura para MON en un medio acuoso, donde se comporta como un ácido bastante fuerte, es decir, $\text{p}K_a$ entre 0 [38, 60]. Es bien conocido que las propiedades de los substratos son disminuidas en los solventes no acuosos de baja basicidad, respecto de agua. [175]. Por otro lado, el valor de la constante de velocidad $k_f(2)$ para la reacción química acoplada Q_2 (Ecuación 5.8), está en buen acuerdo con la aparición del pico catódico a las velocidades de barrido indicadas anteriormente, que corresponden a una reacción química con una cinética no tan rápida.

Por otro lado, es posible suponer que el radical generado durante la oxidación electroquímica de MON, en este medio no acuoso, está estabilizado por resonancia. Las posibles estructuras resonantes se muestran en el Esquema 2.



Esquema 2. Posibles estructuras de resonancia del radical de MON generado en la oxidación electroquímica.

Este fenómeno puede explicar el hecho de que, a relativas bajas velocidades de barrido ($v \sim 50 \text{ V s}^{-1}$),

mostrar el incremento producido por el efecto de adsorción, es decir, los valores Ψ_E determinados a bajas concentraciones de MON serán más altos que los determinados a altas concentraciones y, además, tendrán un incremento debido al efecto de la adsorción. Por su parte, los gráficos teóricos de $E_{p,a}$ vs $\log v$, también fueron lineales en todo el intervalo de velocidades de barrido estudiado y de concentraciones entre $8,3 \times 10^{-6}$ y 3×10^{-3} M, con valores de pendiente entre 0,057 y 0,051 V/década, cercanos tanto a los obtenidos experimentalmente (0,058 y 0,053 V/década) como a los esperados para un mecanismo que intercambia 1 electrón en el proceso electroquímico.

A través de los voltamperogramas cíclicos simulados a altas velocidades de barrido, se establecieron las relaciones entre ΔE_p y la $I_{p,c} / I_{p,a}$ en función de la velocidad de barrido para su posterior comparación con los encontrados experimentalmente.

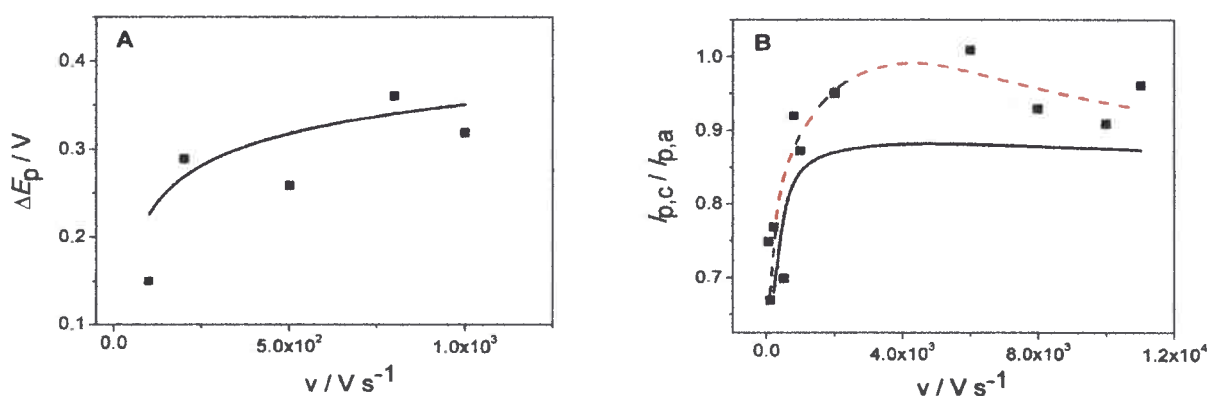


Figura 5.18. (A) Relación de ΔE_p vs v , para los valores determinados teóricamente (línea sólida) y experimentalmente (símbolos). (B) Dependencia entre la $I_{p,c} / I_{p,a}$ vs v para los valores determinados teóricamente (línea sólida) y experimentalmente (símbolos). En ambos casos la concentración de MON fue $8,3 \times 10^{-5}$ M.

Como se puede apreciar, el ΔE_p crece a medida que se aumenta la velocidad de barrido hasta llegar a una diferencia de alrededor de los 0,3 V, tanto para los valores experimentales como para los teóricos, lo que refleja que el comportamiento teórico se asemeja al comportamiento real (Figura 5.18-A). Por su parte, la relación entre la $I_{p,c} / I_{p,a}$ y la velocidad de barrido, exhibe una razonable concordancia entre los valores determinados teóricamente con los experimentales (Figura 5.18-B). Sin embargo, la diferencia que se observa a las velocidades de barrido intermedias, puede ser atribuida a que existe una adsorción del producto de oxidación de MON el cual, es reducido al invertir el barrido de potencial.

En vista de que los criterios de diagnóstico teóricos coincidieron en un alto grado con los obtenidos experimentalmente, se puede suponer que el modelo planteado en el Esquema 1 está muy cercano al mecanismo real, por el cual, MON se descarga electroquímicamente. Por otra parte, el valor de coeficiente de difusión de MON re calculado fue de $4,8 \times 10^{-6}$ cm^2s^{-1} , el cual, será utilizado en la siguiente etapa. Así, en base a estos resultados, se procedió a la determinación de los parámetros del modelo.

Para llevar a cabo la parametrización del modelo, es necesario asumir ciertos parámetros constantes durante todo el proceso. Así, se asumió un coeficiente de transferencia anódico (α) de 0,5 para la reacción de transferencia heterogénea, un coeficiente de difusión de MON y las otras especies de $4,8 \times$

una semejanza casi completa entre ambos voltamperogramas, lo que indica una buena aproximación de las reacciones planteadas. A potenciales más anódicos que el potencial de pico, las corrientes experimentales son más altas que las de los VC simulados, lo que muestra, claramente, la presencia de un componente adicional de la corriente, debida a la oxidación de una cierta cantidad del reactivo débilmente adsorbido sobre la superficie del electrodo [182]. Por otro lado, es necesario enfatizar la dificultad de realizar una apropiada corrección de las corrientes no faradáticas en los voltamperogramas experimentales, principalmente para aquellos registrados a bajas concentraciones de MON, haciendo que el proceso de correlación entre los voltamperogramas experimentales y teóricos sea más complicado. Esta consideración y las observaciones previas llevan a que se deba postular una nueva etapa en el mecanismo que tenga en cuenta la electro-oxidación del reactivo débilmente adsorbido, tal como se expresa a continuación:



Habiendo aceptado el mecanismo de reacción descrito en el Esquema 1, se continuó generando voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido para aplicar los criterios de diagnóstico correspondientes a cada intervalo de velocidades. Así, para voltamperogramas cíclicos teóricos obtenidos a bajas velocidades de barrido, se establecieron las relaciones $E_{p,a}$ vs $\log c_{MON}^*$ y Ψ vs $v^{1/2}$ y se compararon con sus respectivos resultados experimentales.

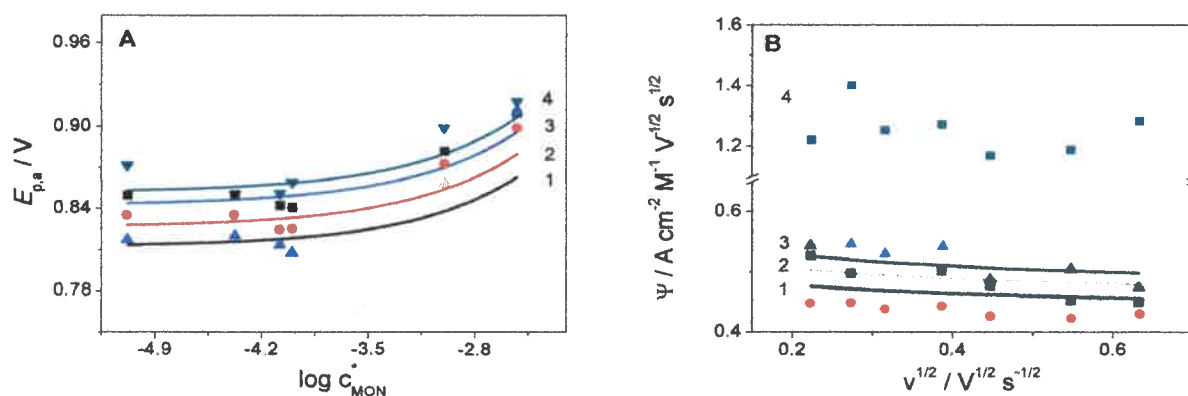


Figura 5.17. (A) Relación de $E_{p,a}$ vs $\log c_{MON}^*$ a las velocidades de barrido de (1) $v = 0,050$; (2) $0,100$; (3) $0,200$ y (4) $0,300 \text{ V s}^{-1}$, obtenidos experimentalmente (símbolos) y teóricamente (línea sólida). (B) Dependencia de la Ψ vs $v^{1/2}$ obtenidos teóricamente (línea sólida) y experimentalmente (símbolos) a concentraciones de MON de (1) 3×10^{-3} , (2) 1×10^{-3} , (3) 1×10^{-4} y (4) $4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Tal como se muestra en la Figura 5.17-A, los valores experimentales de los potenciales de picos anódico a diferentes valores de concentración de MON coinciden en gran medida con los valores teóricos obtenidos en los mismos valores de concentración. En la Figura 5.17-B, se muestra la comparación entre los valores de las funciones corriente teóricas (Ψ_T) y experimentales (Ψ_E), para el mecanismo de reacción indicado previamente, estudiado en un intervalo de velocidad de barrido entre $0,025$ a 4 V s^{-1} . Las tres soluciones de altas concentraciones de MON fueron usadas para confirmar el mecanismo propuesto. Los valores de Ψ_E de una solución de baja concentración ($4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$) también están incluidos para

El mecanismo que presentó el mejor ajuste fue del tipo $Q_1E_1Q_2$, con un valor de varianza de $1,49 \times 10^{-7}$. Las posibles reacciones se describen a continuación:



Esquema 1. Mecanismo de reacción teórico para la descarga electroquímica de MON.

donde el anión MON^- es la micotoxina deprotonada, MON^\bullet es una especie radicalaria de MON, P y Z son los productos no electroactivos de la descomposición del radical y k_f^0 es la constante de velocidad heterogénea.

Tal cual fue determinado por diferentes criterios de diagnóstico aplicados a diferentes voltamperogramas cíclicos experimentales, existe una reacción química (Q_2) posterior a la reacción electroquímica (E_1). Sin embargo, el modelado también sugirió una reacción química (Q_1) previa a la transferencia electrónica, la cual establece el equilibrio de la deprotonación de MON^- . En la Figura 5.16 se muestran los voltamperogramas cíclicos teóricos obtenidos a dos concentraciones diferentes utilizando el Esquema 1 y sus respectivos voltamperogramas cíclicos experimentales.

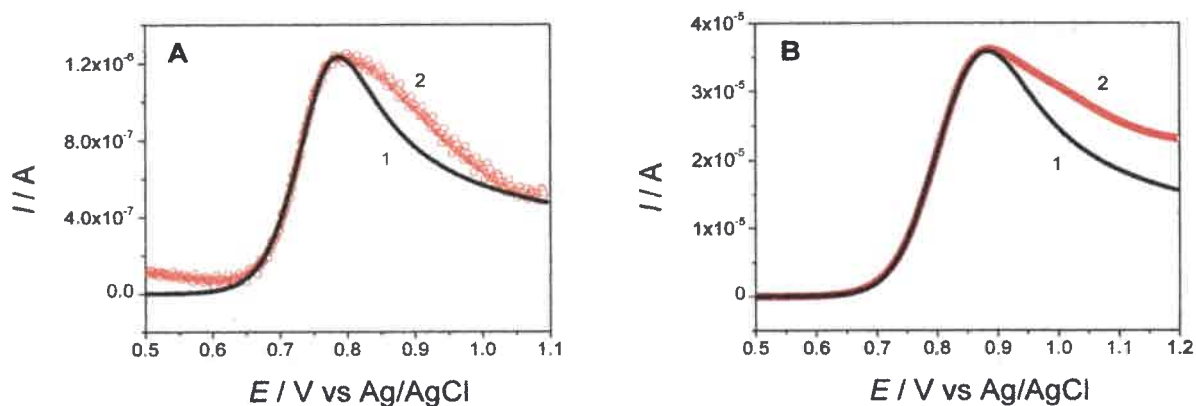


Figura 5.16. Voltamperogramas de barrido lineales (1) teóricos y (2) experimentales de MON a concentraciones de (A) $c_{MON}^* = 1 \times 10^{-4} M$ y (B) $c_{MON}^* = 3 \times 10^{-3} M$. $v = 0,100 V s^{-1}$.

Como se muestra en la Figura 5.16, existe una muy buena concordancia entre el voltamperograma teórico y el experimental en buena parte del intervalo de potencial modelado, incluyendo el valor del potencial de pico. En la primer región del barrido se observa una fuerte coincidencia entre los voltamperogramas teóricos y los experimentales, donde la influencia del proceso cinético es más marcada. En los potenciales siguientes en donde se desarrolla todo el proceso cinético electroquímico, se observa

Tabla 5.4. Características de la reacción electroquímica de MON obtenidas a través de diferentes criterios de diagnóstico.

Característica del mecanismo	Criterio de diagnóstico
Reacción electroquímica del tipo EQ	<ul style="list-style-type: none"> – Perfil de VC sin pico complementario – Relación lineal $E_{p,a}$ vs $\log [I_L - I / I]$ – Relación $I_{p,c} / I_{p,a} \neq 1$
Sistema bajo control mixto	<ul style="list-style-type: none"> – Relación lineal tanto con v como con $v^{1/2}$ – Valor de la función corriente mayores de 1 a concentraciones menores de 1×10^{-4} M
Reacción electroquímica cuasi-reversible	<ul style="list-style-type: none"> – Poca contribución de la corriente inversa en los VOC – Obtención del pico complementario del proceso de oxidación a altas velocidades de barrido – Dependencia de los potenciales de pico con v – Relación $I_{p,c} / I_{p,a} \neq 1$

5.5.2. Simulación de voltamperogramas cíclicos

Mediante el uso del software de simulación y parametrización de los voltamperogramas cíclicos Di-giSim®(Bioanalytical Systems Inc.), se generaron voltamperogramas teóricos y, posteriormente, se aplicaron los mismos criterios de diagnóstico utilizados en los VC experimentales para su comparación. Este software utiliza la simulación digital para generar posibles respuestas voltamperométricas en base a las reacciones y parámetros pre-establecidos, por lo que es necesario conocer de antemano algunos valores experimentales del sistema a modelar. Entre sus características se encuentra que sólo se pueden simular voltamperogramas teóricos de sistemas que están controlados por difusión, limitando el estudio de una gran cantidad de sistemas que no presentan dicha característica. De igual manera este software, en particular, es ampliamente usado en el desarrollo teórico de voltamperogramas cíclicos, ya que presenta una gran aproximación a los sistemas experimentales [179].

Las primeras aproximaciones de los voltamperogramas teóricos fueron realizadas en base a las características y parámetros experimentales antes mencionados y considerando varios mecanismos que involucraban tanto reacciones heterogéneas como homogéneas [98, 180, 181]. Se utilizó el coeficiente de difusión experimental promedio como valor tentativo, ya que éste fue posteriormente re calculado utilizando el modelo que mejor se ajustó con los valores experimentales.

trabaja a concentraciones intermedias.

Los criterios de diagnóstico que involucraron al pico de reducción fueron el ΔE_p e $I_{p,c} / I_{p,a}$ en función de la velocidad de barrido. Estas relaciones serán comparadas a continuación con aquellas equivalentes obtenidas de los voltamperogramas cíclicos simulados.

5.5. Elucidación del mecanismo de reacción electroquímico de MON

En esta sección se recopila toda la información obtenida sobre los parámetros termodinámicos y cinéticos y las características del mecanismo de reacción electroquímico de MON, determinados a través de la aplicación de los diferentes criterios de diagnóstico, para ser comparados con aquellos obtenidos de los voltamperogramas cíclicos que fueron simulados digitalmente y poder elucidar cual podría ser el posible mecanismo de la reacción electroquímica de oxidación de MON.

5.5.1. Resultados experimentales

Durante todo el estudio electroquímico de MON realizado a través de las diferentes técnicas electroquímicas, fue posible la recopilación de información que pudiera dar indicios sobre las características que presenta el mecanismo de oxidación, algunas de ellas se repetían en diferentes medios o sobre diferentes tipos de electrodos y, algunas otras, como los parámetros fisicoquímicos que convergieron en sus valores aun siendo determinados en diferentes condiciones y utilizando diferentes metodologías, permitieron suponer una alta estabilidad de la reacción. Esta estabilidad facilita el estudio del mecanismo y permite proponer una reacción general que se comportará de manera similar bajo cualquier condición.

La reacción se inicia con la respectiva disociación de la sal de sodio de la micotoxina, la cual proporciona la especie aniónica de MON que es oxidada electroquímicamente a un potencial de 0,8 V. Una representación de esta reacción se muestra a continuación:



Los parámetros fisicoquímicos de MON determinados experimentalmente fueron el coeficiente de difusión, coeficiente de recubrimiento y el número de electrones trasferidos en la reacción electroquímica. El valor promedio determinado para el coeficiente de difusión, a través de la ecuación de Kannangara-Conway y la convolución de los voltamperogramas cíclicos, fue de $(4,2 \pm 0,2) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. El coeficiente de recubrimiento promedio para concentraciones de $MON \leq 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, obtenido utilizando la ecuación de Kannangara-Conway, fue de $(0,3 \pm 0,2) \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. El número de electrones, calculado a través de los resultados obtenidos durante la electrólisis a potencial controlado, tuvo un valor de $n = 1$.

Las características determinadas por diferentes criterios de diagnóstico para la reacción electroquímica se resumen en la Tabla 5.4.

en una celda de un sólo cuerpo, a fin de evitar efectos de resistencias no compensadas en la solución cuando se utilizan celdas de dos cuerpos que utilizan el capilar de Luggin-Haber. También, bajo la misma consideración antes mencionada, se utilizó un electrodo de referencia de Ag/Ag^+ para soluciones no acuosas [178]. La solución de trabajo fue una solución de $8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ de MON en ACN más HFFTBA $0,1 \text{ M}$.

Durante el intervalo de velocidades de barrido de 10 a 40 V s^{-1} , se insinúa un pequeño pico de reducción cercano a los $0,45 \text{ V}$, el cual, a partir de los 50 V s^{-1} , tomó un perfil mucho más definido (Figura 5.15-A).

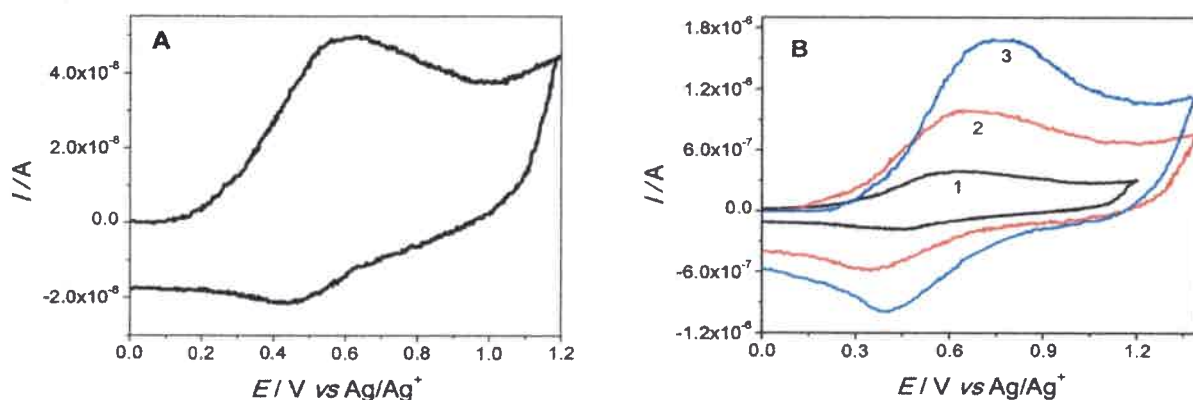


Figura 5.15. Voltamperogramas cíclicos de MON en solución de ACN más HFFTBA $0,1 \text{ M}$ registrados a velocidades de barrido de potencial de (A) 50 V s^{-1} y (B) a (1) 200 , (2) 500 y (3) 800 V s^{-1} . $c_{\text{MON}}^* = 8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$.

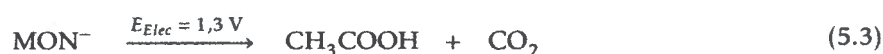
Este pico catódico puede ser atribuido a la reducción del radical electro-generado durante la oxidación de MON, que no es consumido por la reacción química acoplada. De tal manera que, este pico de reducción va obteniendo un perfil mucho más definido y con un aumento en su valor de corriente conforme se va incrementando la velocidad del barrido (Figura 5.15-B), En otras palabras, “se le está ganando a la reacción química acoplada”.

Estos resultados permiten predecir un valor relativamente pequeño de la constante de equilibrio de la reacción química acoplada, ya que a velocidades de barrido $> 50 \text{ V s}^{-1}$, las cuales son consideradas todavía como bajas velocidades, se puede registrar el proceso complementario a la oxidación de MON.

Los criterios de diagnóstico aplicados serán los mismos que se han trabajado durante todo el estudio electroquímico y se sumarán algunos más, en donde se tenga en cuenta las relaciones entre los potenciales y corrientes de los picos anódico y catódico.

El primer criterio de diagnóstico que se puede realizar es sobre la reversibilidad del sistema, que a simple vista se presenta como un sistema cuasi-reversible. ya que sus potenciales de pico, tanto anódico como catódico, no son independientes de la velocidad de barrido. Además, la relación $I_{p,c} / I_{p,a}$ es diferente de 1, como se podría esperar para un sistema cuasi-reversible que tiene una reacción química acoplada relativamente lenta [98]. Por otra parte, la corriente de pico anódica fue lineal tanto con v ($r = 0,9983$) como con $v^{1/2}$ ($r = 0,9911$), lo cual concuerda con el comportamiento del sistema cuando se

Basándose en el análisis cualitativo realizado al espectro UV-Vis de MON en medio acuoso, utilizando las reglas Woodward-Fieser, se puede considerar que la desaparición de las bandas es debida a la pérdida del grupo cromóforo de MON, es decir el grupo α , β -insaturado responsable de la absorción, lo que supone una posible ruptura del anillo alquílico y generación de sub productos no electroactivos ni con grupos capaces de absorber en el espectro UV-Vis. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Franck y Breipohl, quienes sometieron a la micotoxina MON a un proceso de descomposición mediante la adición de un agente oxidación, como el H_2O_2 , obteniendo como productos de esta descomposición ácido acético y CO_2 [63]. Estos productos no son ni electroactivos ni presentan grupos cromóforos, lo que permite asumir que éstos serían los mismos productos obtenidos durante la electrólisis a potencial controlada de MON (Ecuación 5.3).



Finalmente, para determinar el número de electrones involucrados en la EPC de MON, se integraron los transitorios $I - t$ de la primera electrólisis y se obtuvo un valor de carga (Q), a partir del cual y utilizando la Ley de Faraday se determinó un valor de $n = 1,1$. Dicho valor está en total concordancia con aquellos determinados por los diferentes criterios de diagnósticos utilizados a lo largo de este estudio. Por lo tanto, se puede afirmar que la reacción electroquímica de MON es monoelectrónica.

5.4. Voltamperometría cíclica a altas velocidades de barrido

Los estudios realizados mediante la voltamperometría cíclica a altas velocidades de barrido, permitieron determinar otras características y parámetros para proponer un posible mecanismo por el cual se produce la oxidación electroquímica de MON. Dichas consideraciones se realizaron en base a los resultados de los experimentos realizados a lo largo de este trabajo, utilizando diferentes criterios de diagnóstico, los cuales indican la existencia de, al menos, una reacción química acoplada que no permite, en principio, ver el pico complementario del proceso de oxidación. Esta reacción química acoplada puede presentar una constante de formación lo suficientemente grande, que consumiría al producto electro-generado mucho antes de que éste sea involucrado en la reacción electroquímica complementaria, como también, tener una constante de valor intermedio como para que al aumentar la velocidad de barrido del potencial se pueda llevar a cabo la reacción electroquímica completa, anticipándose la reacción homogénea. En este tipo de situaciones, es ideal el uso de la VC a altas velocidades de barrido, ya que ésta permite reducir la escala de tiempo de la voltamperometría en donde prevalecería la reacción heterogénea.

El desarrollo de las experiencias a altas velocidades de barrido implica el uso de equipamientos que se ajusten a las características técnicas requeridas para este experimento, como también, algunas consideraciones experimentales especiales que permitan un correcto desempeño de la técnica. Respecto al equipamiento, se realizó un montaje que permitió el registro de voltamperogramas cíclicos a barridos de potencial entre 10 y 11000 $V s^{-1}$ bajo una resistencia compensada de 90 Ω , utilizando como electrodo de trabajo un ultramicroelectrodo (UME) de fibra de carbono. Todas las experiencias se llevaron a cabo

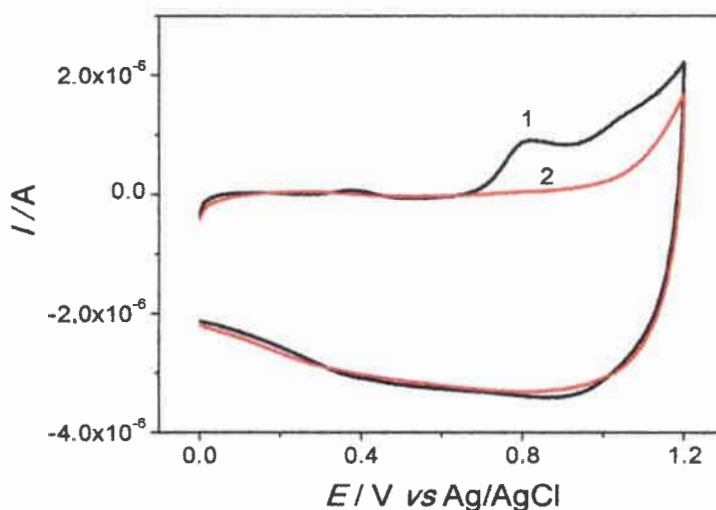


Figura 5.13. Voltamperogramas cíclicos registrados a la solución de MON (1) antes y (2) después de la primera electrolisis a potencial controlado. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

La espectroscopia UV-Vis, se utilizó también para realizar un seguimiento de la EPC de la solución de MON. Así, la Figura 5.14 muestra los espectros registrados antes (espectro 1) y después (espectro 2) de realizar la primera EPC.

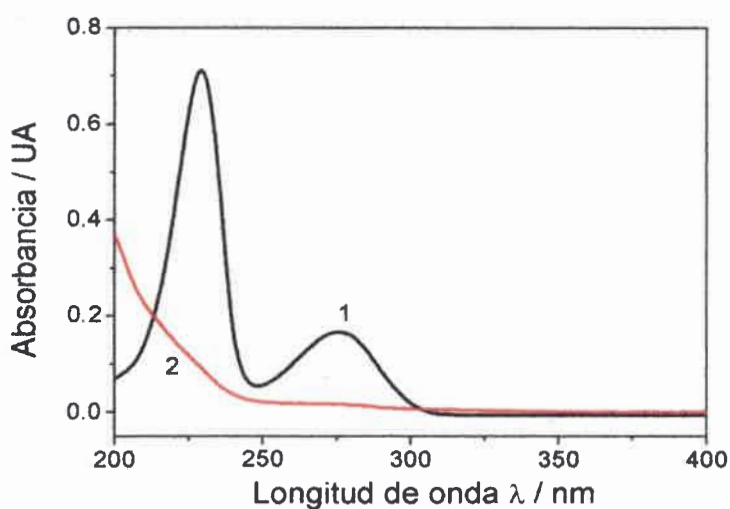


Figura 5.14. Espectros UV-Vis registrados a la solución de MON (1) antes y (2) después de la primera electrolisis a potencial controlado.

Por esta técnicas también fue evidente que durante la primera EPC, se pudo consumir en su gran mayoría las moles presentes de MON, ya que el espectro registrado después de la electrolisis no presenta ninguna de las bandas características de MON en este medio. Este cambio significativo en el espectro de absorción de MON después de la electrolisis, nos brinda información útil sobre el mecanismo electroquímico de MON.

En el transitorio $I - t$ obtenido de la solución de blanco, como era de esperarse, no se obtuvieron corrientes faradáticas propias de un proceso redox, en su lugar, las corrientes obtenidas fueron no faradáticas, propias del cargado de la doble capa eléctrica. Por ello, su corriente cae abruptamente a un valor dado de corriente y permanece constante durante toda la electrólisis (Figura 5.12-1).

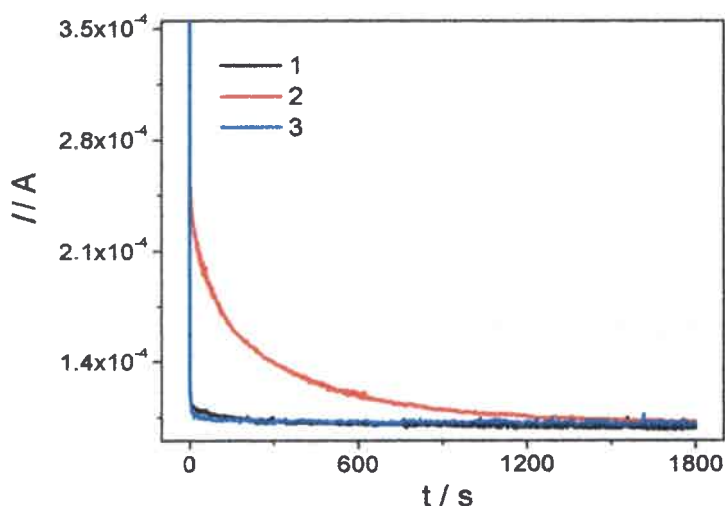


Figura 5.12. Transitorios corriente-tiempo obtenidos durante la EPC de la solución de ACN más HFFTBA 0,1 M en (1) ausencia de MON y en presencia de MON en su (2) primera y (3) electrólisis consecutivas.

Caso contrario ocurre en la primera electrólisis de MON, en donde la corriente faradática observada es debida al proceso de oxidación de MON. Dicho transitorio $I - t$ presenta el perfil característico de un sistema controlado por el transporte de masa, ya que la corriente cae suavemente hasta un consumo parcial o total del reactivo o se haya alcanzado un valor de corriente inferior al 3% del máximo valor de corriente (Figura 5.12-2). Habiendo finalizado la primera electrólisis y su respectivo registro voltamperométrico, se procede a realizar una segunda electrólisis a la misma solución bajo las mismas condiciones, obteniendo el transitorio $I - t$ de la Figura 5.12-3, en donde se aprecia el mismo perfil obtenido que en una solución en ausencia de MON, indicando que la primera electrólisis consumió casi por completo MON.

Los voltamperogramas cíclicos registrados antes y después de cada electrólisis realizada a la solución de MON, sirvieron para corroborar los resultados obtenidos al analizar sus transitorios $I - t$. La Figura 5.13-1 muestra el voltamperograma cíclico registrado antes de la primera electrólisis de MON, el cual tiene la señal electroquímica característica observada en este medio. Finalizada la electrólisis, se registró un voltamperograma cíclico, el cual, no mostró ninguna respuesta electroquímica que pudiera ser atribuida a la descarga de MON, indicando que, efectivamente, pasado los 1800 segundos, MON fue consumida durante la primera electrólisis (Figura 5.13-2).

5.3. Electrólisis a potencial controlado

suficientes como para proponer que la descarga electroquímica de MON sigue un mecanismo del tipo EQ (Electroquímico–Químico).

Por otro lado, el coeficiente de difusión de MON para este medio fue determinado utilizando la misma metodología aplicada en el medio acuoso, la cual consistió en utilizar la ecuación que describe las corrientes límites convolucionadas del barrido directo para la determinación de dicho parámetro, ya que estas corrientes están directamente relacionadas con el proceso de oxidación de MON. De tal manera, se convolucionaron los voltamperogramas cíclicos a distintas velocidades de barrido y se obtuvieron sus respectivas corrientes límites. Así, a partir de los valores de los coeficientes de difusión determinados a cada velocidad, se obtuvo un valor promedio de $4,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, el cual está muy cercano al encontrado por el análisis del Kannangara–Conway de $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$.

5.3. Electrólisis a potencial controlado

Durante todo el estudio electroquímico de MON, se aplicó el criterio de diagnóstico en donde a partir de la relación lineal entre $E_{p,a}$ vs $\log v$, es posible obtener un valor aproximado del número de electrones intercambiados en el proceso electroquímico, el cual para el caso de MON, siempre estuvo cercano de 1. Si bien, el valor obtenido por este criterio es bastante cercano al real, se utilizó la electrólisis a potencial controlado (EPC) para obtener más evidencia que confirme el número de electrones involucrados en la reacción de oxidación de MON.

Desde el punto de vista experimental, la electrólisis requiere de una celda especial, un electrodo de trabajo de gran área y un dispositivo que permita generar una fuerza convectiva en la solución (Ver más detalles en Sección 3.2.1). Particularmente, para este sistema, en donde MON presenta un control mixto, la electrólisis puede ser realizada a valores de concentración intermedios, ya que la transferencia de masa es el proceso principal y quien gobierna al sistema mientras esté en progreso la experiencia, haciendo que los otros procesos sean despreciables. Es por esto que se introduce una fuerza convectiva, a través de un dispositivo externo como un agitador magnético o un electrodo rotatorio, para que el transporte de masa sea el proceso principal.

Se preparó una solución de MON en ACN más HFFTBA 0,1 M a una concentración de $8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ y se registró un voltamperograma cíclico con un electrodo de carbono vítreo previo a la electrólisis. Esto se realizó con el fin de poder establecer el potencial de electrólisis y para poder realizar un control antes y después de la electrólisis. Luego se llevaron a cabo tres electrólisis, de las cuales, una fue realizada en una solución en ausencia de MON, otra en presencia de MON a la concentración antes mencionada y otra inmediatamente después. En los tres casos, el potencial aplicado al electrodo de trabajo fue de 1,3 V por 1800 segundos. Cabe aclarar que, luego de cada electrólisis, se registró un voltamperograma cíclico a la solución con un electrodo de carbono vítreo.

sistemas que presenta una reacción química acoplada a la transferencia de carga inicial [117]. Dichos resultados son consistentes con lo observado en el medio acuoso, donde el resultado obtenido sugirió el mismo comportamiento.

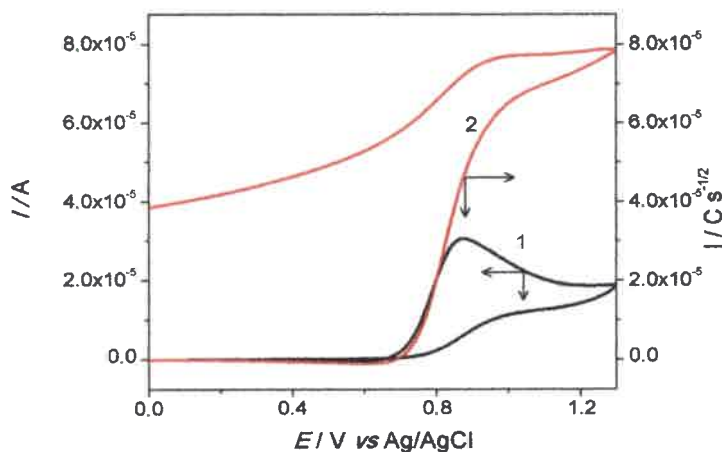


Figura 5.10. Voltamperogramas cíclicos (1) corregido por la sustracción de las corrientes no faradáticas y (2) convolucionado de una solución de MON en ACN. $c_{MON}^* = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

Otro criterio de diagnóstico como es la dependencia del $E_{p,a}$ vs $\log [I_L - I / I]$, que permite conocer más detalles sobre el mecanismo electroquímico de MON. Dicha relación fue evaluada en un intervalo de velocidades entre $0,025$ y $0,100 \text{ V s}^{-1}$ y se obtuvo un valor promedio de pendiente de $-(0,063 \pm 0,003) \text{ V/década}$ (Figura 5.11). Este valor de pendiente es cercano al valor de $0,059/n \text{ V}$ esperado para sistemas electroquímicos con reacciones químicas acopladas sin adsorción del reactivo y con un valor de $n = 1$ [117].

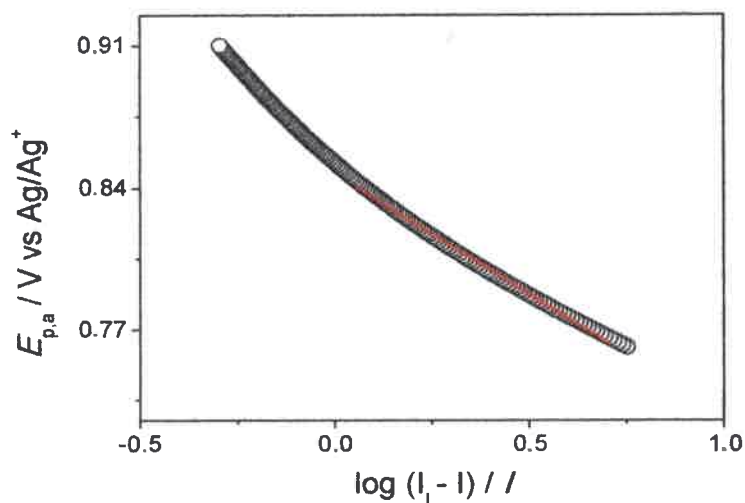


Figura 5.11. Relación entre el $E_{p,a}$ vs $\log [I_L - I / I]$. $c_{MON}^* = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. $r = 0,9921$.

Así, los resultados obtenidos a través de la convolución, tanto en medio acuoso como no acuoso, son

A pesar de no encontrar ningún efecto en la adición del TBA-OH, igualmente se realizó un análisis de la relación $E_{p,a}$ vs $\log v$ y se determinaron los valores de la función corriente para cada adición. Los valores encontrados se resumen en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Parámetros obtenidos de diferentes criterios de diagnóstico a tres concentración de TBA-OH.

c_{MON}^* / M	Pendiente / V ($E_{p,a}$ vs $\log v$)	$E_{p,a} / V$	Ψ	c_{TBA-OH}^* / M
	0,074	0,86	1,45	–
$4,2 \times 10^{-5} M$	0,064	0,85	1,92	$1,9 \times 10^{-6}$
	0,043	0,88	1,89	$4,2 \times 10^{-5}$
	0,047	0,89	1,79	$1,2 \times 10^{-4}$

Con los valores expuestos en la tabla, es posible afirmar que la adición de un agente básico, como el TBA-OH, no introdujo ningún efecto en el desarrollo de la reacción electroquímica de MON, ya que los valores de las pendientes promedio están cerca del valor teórico esperado de $0,06/n$ V, correspondiente a un $n = 1$, el cual, ha sido el mismo valor determinado durante todos los estudios realizados. Por su parte, el valor de la función corriente está en buen acuerdo con el valor de la concentración utilizada en este estudio. Ya que como habíamos mencionado anteriormente, al utilizar una concentración de MON intermedia, el sistema presenta un control mixto y los valores esperados de Ψ son mayores de 1.

Los resultados anteriores nos permiten excluir al hidróxido de tetrabutilamonio en los próximos estudios electroquímicos de MON, ya que este no generaría un cambio significativo que aporte información sobre el mecanismo por el cual MON se descarga electroquímicamente.

5.2. Convolución de voltamperogramas cíclicos

A través de la convolución de los voltamperogramas cíclicos de MON en ACN, se pudo determinar un valor de coeficiente de difusión para MON en este medio no acuoso y algunos detalles más sobre su mecanismo de reacción. Ahora bien, sabiendo que MON presenta un control mixto a valores intermedios de concentración, es pertinente que dichos análisis se realice a valores de concentración de MON mayores a $1 \times 10^{-4} M$, donde el sistema está mayormente controlado por difusión.

Teniendo en cuenta las consideraciones necesarias para realizar un correcto análisis de convolución, se registraron tanto voltamperogramas cíclicos en ausencia como en presencia de MON para su posterior sustracción. Así, se preparó una solución de MON a una concentración $3 \times 10^{-3} M$ en ACN más HFFTBA 0,1 M.

El voltamperograma cíclico al cual se le restó las corrientes no faradáicas y su respectivo voltamperograma convolucionado se muestran en la Figura 5.10. En el voltamperograma cíclico convolucionado, mostrado en la Figura 5.10-2, se puede ver como las corrientes que corresponde al proceso complementario no regresan a cero cuando se invierte el sentido del barrido, característica principal de aquellos

En cuanto a la función corriente, también era de esperar que ésta tuviese valores mayores a 1, ya que al encontrarse a una concentración de MON de valor intermedio el control es mixto y, al parecer, la presencia del TFA-H es indiferente frente al tipo de control que gobierna el proceso electroquímico. Así parece que la adición de un agente ácido, como el ácido trifluoroacético, no produce un cambio significativo en la oxidación electroquímica de MON, por lo que no se tendrá en cuenta para los próximos estudios.

5.1.3. Moniliformina en ACN y en presencia de hidróxido de tetrabutilamonio

Continuando con la idea de reproducir un medio similar al obtenido en el medio acuoso cuando se variaron los valores de pH, se utilizó el hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH) para obtener una solución de carácter básico, en un medio no acuoso como el acetonitrilo, y estudiar el comportamiento de MON en dicho medio.

Para realizar estas experiencias, se preparó una solución de MON $4,2 \times 10^{-5}$ M en ACN más HFFTBA 0,1 M y se adicionaron diferentes alícuotas de TBA-OH, de modo tal que se obtuvieran concentraciones menores, iguales y mayores que la concentración de MON. Se utilizó el mismo procedimiento experimental usado anteriormente, en donde, inicialmente, se registraron voltamperogramas cíclicos a la solución de MON en la ausencia de la base (Figura 5.9-1) y luego a las respectivas adiciones de TBA-OH (Figura 5.9-2, 3 y 4). En este caso, la reacción electroquímica de MON resultó ser indiferente a la presencia de TBA-OH, ya que a pesar de presentarse un corrimiento en el potencial de pico, éste no fue lo suficientemente significativo como para ser tenido en cuenta. Así, también sucedió con la corriente de pico anódica, la cual no varió significativamente. Estos resultados concuerdan con los encontrados en el medio acuoso básico, en donde la respuesta electroquímica de MON a pH 10 no presentó un efecto significativo sobre este medio.

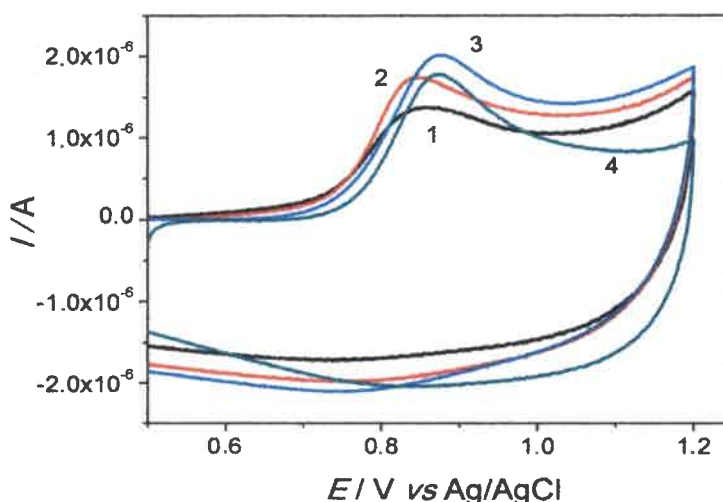


Figura 5.9. Voltamperogramas cíclicos de MON en ACN más HFFTBA 0,1 M con diferentes alícuotas de TBA-OH, (1) $c_{TBA-OH}^* = 0$, (2) $1,9 \times 10^{-6}$, (3) $4,2 \times 10^{-5}$ y (4) $1,2 \times 10^{-4}$ M. $c_{MON}^* = 4,2 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s^{-1} .

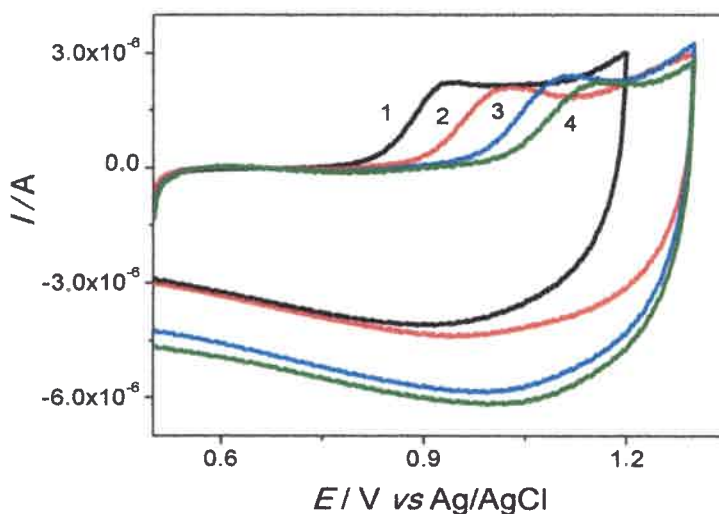


Figura 5.8. Voltamperogramas cíclicos de MON en ACN más HFFTBA 0,1 M a diferentes alicuotas de TFA-H (1) $c_{TFA-H}^* = 0$, (2) $1,6 \times 10^{-3}$, (3) $9,8 \times 10^{-3}$ y (4) $2,3 \times 10^{-2}$ M. $c_{MON}^* = 4,2 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s $^{-1}$.

Los resultados obtenidos mostraron que, a medida que aumenta la concentración de TFA-H, el potencial de pico anódico se desplaza hacia potenciales más anódicos, lo que significa un efecto no favorable para la electro-oxidación de MON. Si bien en el medio no acuoso no es posible obtener las mismas condiciones de acidez que en un medio acuoso, se puede lograr obtener, al menos, un medio en donde la concentración de protones sea suficiente como para lograr que MON interactúe con los protones de una manera similar a como lo haría en medio acuoso. A pesar de esto, el efecto resultó ser contrario a lo observado en el medio acuoso ácido, ya que la reacción de MON, en este caso, no fue favorecida por la presencia de los protones en el medio.

De igual manera se analizó la variación del $E_{p,a}$ vs $\log v$ y se determinó el valor de la función corriente en a tres niveles de concentración de TFA-H, esto con el fin de conocer si la presencia del ácido interfiere de manera significativa en el mecanismo electroquímico de MON.

En la Tabla 5.2 se puede ver como los valores de la pendiente de la relación del $E_{p,a}$ vs $\log v$ para la solución de MON en ausencia y presencia de TFA-H, tienen valores muy cercanos al valor teórico de $0,060/n$ V, lo que indicaría que, a pesar de la presencia del TFA-H, la reacción electroquímica de MON continúa intercambiando 1 electrón.

Tabla 5.2. Parámetros de diferentes criterios de diagnóstico a tres niveles de concentración de TFA-H.

c_{MON}^* / M	Pendiente / V ($E_{p,a}$ vs $\log v$)	$E_{p,a} / V$	Ψ	c_{TFA-H}^* / M
$4,2 \times 10^{-5}$ M	0,050	0,92	1,66	-
	0,044	1,01	1,98	$1,6 \times 10^{-3}$
	0,047	1,10	1,99	$9,8 \times 10^{-3}$
	0,052	1,14	1,74	$2,3 \times 10^{-2}$

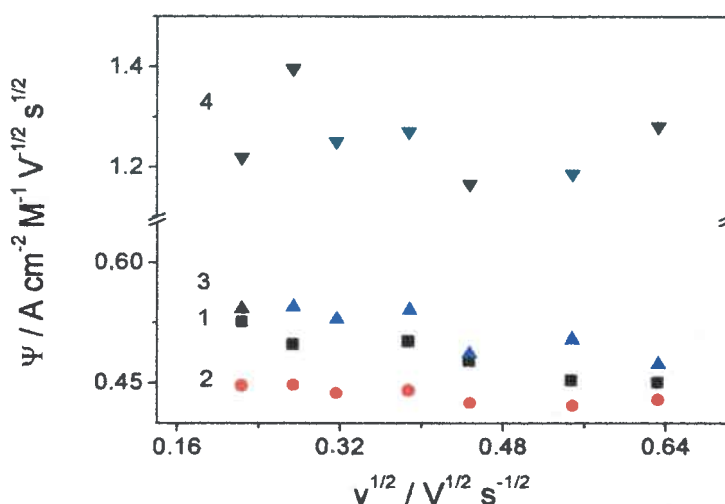


Figura 5.7. Dependencia de la función corriente (Ψ) respecto a $v^{1/2}$ a concentraciones de MON (1) $c_{MON}^* = 3 \times 10^{-3}$, (2) 1×10^{-3} , (3) 1×10^{-4} y (4) $4,2 \times 10^{-5}$ M.

Habiendo obtenido un valor de $n = 1$ en el criterio de diagnóstico de $E_{p,a}$ vs $\log v$, aplicado tanto en medio acuoso como no acuoso y, a diferentes concentraciones de MON, es posible dar por cierto dicho valor de electrones, lo que significa que la función corriente para la reacción electroquímica de MON deberá tener valores cercanos a 0,5 cuando el sistema está controlado mayormente por la difusión, es decir, a altas concentraciones de MON. La Figura 5.7 refleja lo anteriormente expuesto, ya que como se observa, Ψ toma valores entre 0,45–0,55 cuando la concentración de MON es alta y valores mayores de 1 cuando la concentración de MON es baja. Este criterio de diagnóstico resultó estar en buen acuerdo con los criterios anteriormente aplicados, los cuales, coincidieron en que la reacción electroquímica de MON presenta un control mixto, el cual, se ve mayormente favorecido por la difusión en altas concentraciones y por la adsorción a bajas concentraciones de MON.

5.1.2. Moniliformina en ACN y en presencia de ácido trifluoroacético

Dando continuidad a los estudios electroquímicos de MON en medio no acuoso, se evaluó la respuesta de MON en presencia de un compuesto orgánico ácido que proporcionará una situación similar a la obtenida en un medio acuoso ácido. Como ácido orgánico se utilizó el ácido trifluoroacético (TFA-H).

Esta experiencia se realizó mediante la preparación de soluciones de MON $4,2 \times 10^{-5}$ M en ACN más HFFTBA 0,1 M y, luego, adicionando distintas alícuotas de TFA-H de tal manera que su concentración final fuera mayor que la concentración de MON, con el objetivo de lograr condiciones similares a las obtenidas cuando se estudió MON en un medio acuoso ácido. El resto de las condiciones experimentales fue el mismo empleado durante las experiencias iniciales de MON en el medio no acuoso.

Primero, se registró un voltamperograma cíclico en la solución de MON sin ningún agregado de TFA-H (Figura 5.8-1). Luego, se adiciona la cantidad de TFA-H suficiente para alcanzar las concentraciones deseadas y se registraron los respectivos voltamperogramas cíclicos (Figuras 5.8-2, 3 y 4).

10^{-6} y 3×10^{-3} M.

Tal como lo muestra la Figura 5.6, la relación $E_{p,a}$ vs $\log c_{MON}^*$ en un intervalo de concentraciones de $8,3 \times 10^{-6}$ y 1×10^{-4} M, muestra ser casi independiente de la concentración con una pendiente cercana a cero. Dicho resultado está de acuerdo con el tipo de sistema presente en este intervalo de concentración, en donde el control es mixto. Caso contrario ocurre a concentraciones mayores de 1×10^{-4} M, en donde se produce un cambio en el valor de la pendiente de 0,050–0,060 V/década. Este fenómeno posiblemente se produce por el cambio en el control del proceso, es decir, pasar de un control mixto a uno controlado mayormente por la difusión.

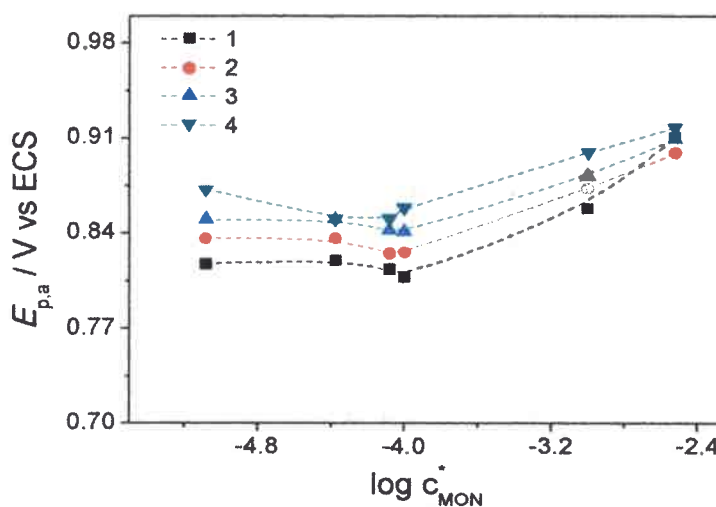


Figura 5.6. Dependencia del $E_{p,a}$ vs $\log c_{MON}^*$ a las velocidades de barrido de: (1) 0,050; (2) 0,100; (3) 0,200 y (4) 0,300 $V s^{-1}$. Las líneas punteadas sólo se trazan para mostrar la tendencia.

Para obtener más evidencia acerca del efecto producido en el control del sistema por el cambio en la concentración de MON, se aplicó otro criterio de diagnóstico que tuviera una relación más directa con la concentración, como lo es la función corriente (Ψ). La función corriente está definida en términos de la corriente de pico, el área del electrodo, la velocidad de barrido y la concentración de la especie redox por:

$$\Psi = \frac{I_{p,a}}{Ac_{MON}^*v^{1/2}} \quad (5.2)$$

Para este caso, se determinó la función corriente utilizando el mismo intervalo de velocidades de barrido y de concentraciones de MON estudiadas previamente.

Los resultados obtenidos a través de la aplicación de este criterio de diagnóstico se muestran en la Figura 5.7, en donde vemos como el valor de la función corriente disminuye a medida que aumenta tanto la velocidad de barrido como la concentración de MON. Además, la función corriente proporcionó información sobre el número de electrones intercambiados en la transferencia electrónica a través de los valores que ésta tome, siendo un valor de Ψ cercano a 0,5 propio de sistemas que intercambian 1 electrón [98].

de las contribuciones de la corriente difusional y la adsorptiva, haciendo posible un análisis por separado de cada componente [116]. De esta manera, es posible determinar un coeficiente de difusión y un coeficiente de recubrimiento en sistemas con control mixto. El desarrollo teórico de dicha metodología está descrito en la Sección 2.3.1.

Análisis de control mixto

Para llevar a cabo este análisis, se prepararon tres soluciones de MON a una concentración de 1×10^{-4} , 1×10^{-3} y 3×10^{-3} M en ACN más HFFTBA 0,1 M.

Assumiendo que la corriente de pico anódica es la suma de la corriente del proceso difusional más la del proceso adsorptivo, la ecuación de Kannangara–Conway proporciona matemáticamente dichas contribuciones:

$$I_p v^{-1/2} = k_1 v^{1/2} + k_2 \quad (5.1)$$

En esta ecuación, los términos k_1 y k_2 se determinan de los valores de la ordenada al origen y la pendiente de los gráficos $I_p v^{-1/2}$ vs $v^{1/2}$ y con ellos el valor de la concentración superficial (Γ_{MON}) y el coeficiente de difusión (D_{MON}), respectivamente. En la Tabla 5.1 se presentan los valores obtenidos para los coeficientes de difusión y los recubrimientos superficiales de MON a distintas concentraciones.

Tabla 5.1. Parámetros obtenidos de las regresiones lineales de $I_{p,a} v^{-1/2} \text{ A}^{-1}$ vs $v^{1/2}$, como así también los valores de D_{MON} y Γ_{MON} determinados a diferentes concentraciones de MON.

$10^3 c_{MON}^*$ M	10^5 Ordenada A $V^{-1/2} s^{1/2} \text{ cm}^{-2}$	-10^5 Pendiente A $V^{-1} s \text{ cm}^{-2}$	r	$10^6 D_{MON}$ $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$	$10^{10} \Gamma_{MON}$ mol cm^{-2}
0,1	$5,85 \pm 0,05$	$1,8 \pm 0,1$	0,9911	5,1	0,2
1	$45,2 \pm 0,6$	5 ± 1	0,9916	2,9	0,5
3	166 ± 3	45 ± 6	0,9913	5,1	4,9

Como se puede observar en la Tabla 5.1, los valores para el recubrimiento superficial de MON corresponden a los valores típicos de una sub-monocapa a concentraciones $\leq 1 \times 10^{-3}$ M, mientras que a valores de concentración de MON mayores (3×10^{-3} M), el recubrimiento se asemeja al de una monocapa [98]. Por otro lado, el valor del coeficiente de difusión se mantuvo casi constante en todas las concentraciones, lo que permite determinar un valor promedio de $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Teniendo en cuenta la existencia del control mixto y su estrecha relación con la concentración de MON, se aplicaron diferentes criterios de diagnóstico a diferentes concentraciones de MON. Uno de los primeros criterios de diagnóstico aplicados fue la variación entre el $E_{p,a}$ y $\log v$, el cual fue lineal en todo el intervalo de concentraciones estudiadas ($8,3 \times 10^{-6}$ y 3×10^{-3} M) con valores de pendientes entre 0,053 y 0,058 V, lo que nos permite asumir, en principio, un número de electrones intercambiados de 1.

Por otra parte, se estudió el cambio del potencial de pico anódico con la concentración de MON. Así, se evaluó este criterio a diferentes velocidades y en un intervalo de concentración de MON entre $8,3 \times$

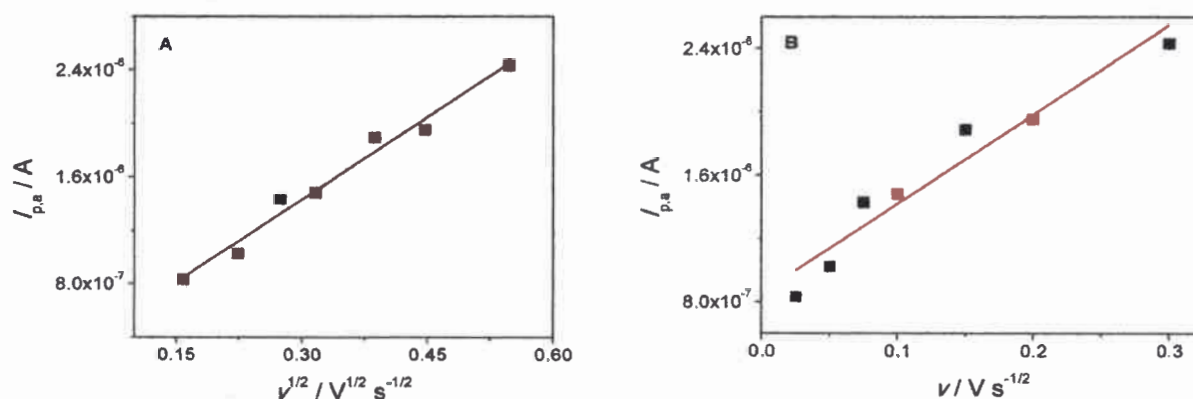


Figura 5.4. Relación de la corriente de pico anódico en función de (A) $v^{1/2}$ ($r = 0,9749$) y (B) v ($r = 0,9235$). $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5} M$.

En vista de estos resultados, se realizó el mismo análisis de las corrientes de pico anódicas en función de la velocidad de barrido pero a una concentración de MON más elevada. Dicha concentración fue de $3 \times 10^{-3} M$. Como se puede ver en la Figura 5.5, la corriente de pico anódica fue lineal con $v^{1/2}$, mientras que con v no se pudo establecer dicha relación.

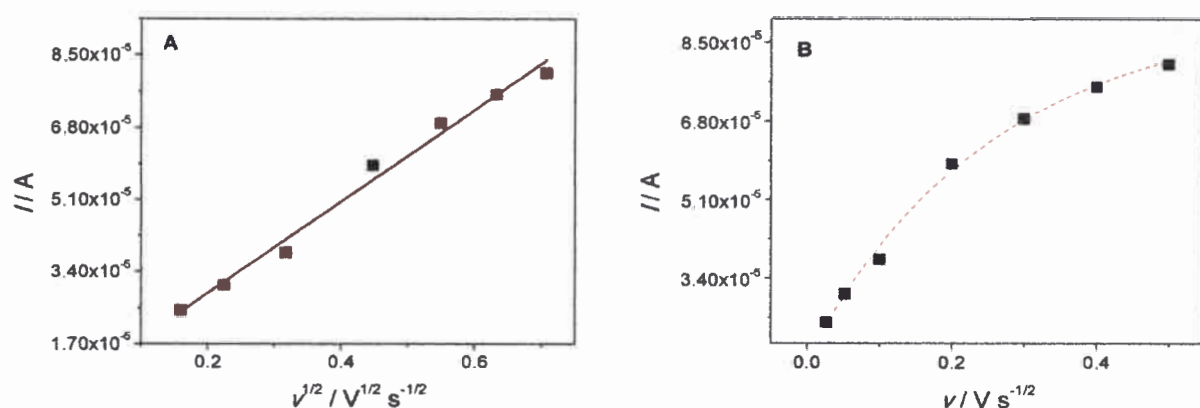


Figura 5.5. Relación de la corriente de pico anódica en función de (A) $v^{1/2}$ ($r = 0,9749$) y (B) v ($r = 0,9235$). $c_{MON}^* = 3 \times 10^{-3} M$.

A la luz de estos resultados, queda en evidencia que el sistema tiene un control mixto, el cual, dependiendo del intervalo de concentración puede ser gobernado mayormente tanto por la difusión como por la adsorción. Así, a bajas concentraciones de MON ($< 8,3 \times 10^{-6} M$) se espera un control mayoritario de la adsorción, a concentraciones intermedias ($8,3 \times 10^{-6} M > c_{MON}^* > 1 \times 10^{-4} M$) un control mixto y a concentraciones altas ($> 1 \times 10^{-4} M$) un control mayoritariamente difusional. Esto permite establecer a qué valores de concentración es necesario trabajar para determinar distintos parámetros característicos del sistema, como por ejemplo, el valor del coeficiente de difusión para MON, el cual, deberá ser determinado a concentraciones mayores de $1 \times 10^{-4} M$, en donde predomina la difusión sobre la adsorción.

Kannangara y Conway propusieron una metodología matemática para poder determinar algunos parámetros en este tipo de sistemas. Ellos propusieron asumir que la corriente de pico es la sumatoria

Al igual que en el medio acuoso, se presentó un sólo pico de oxidación, cercano a los 0,8 V vs Ag/AgCl, el cual, en comparación con la descarga en el medio acuoso, está desplazado casi 0,3 V hacia zonas menos anódicas y con una mejor definición. Este corrimiento del potencial del pico de oxidación es un efecto producido por el solvente, ya que el ACN, como medio aprótico, puede minimizar los efectos producidos por las reacciones químicas acopladas y favorecer la transferencia electrónica [175-177]. Si embargo, no fue posible observar el pico complementario a la reacción de oxidación, indicando la necesidad de realizar experiencias a altas velocidades de barrido para poder llegar a conclusiones definitivas tanto sobre la reversibilidad del sistema como de las posibles reacciones químicas acopladas.

Continuando con los estudios, se analizaron los correspondientes criterios de diagnóstico relacionados con la variación del potencial de pico y de la corriente de pico respecto de la velocidad de barrido. Del análisis de la variación de $E_{p,c}$ vs $\log v$, se obtuvo una relación lineal, en el intervalo de velocidades de barrido estudiadas, con un valor de pendiente de 0,054 V (Figura 5.3). Dicho valor se asemeja al valor teórico esperado de $0,060/n$ V para sistemas en donde el número de electrones intercambiados es de 1. Estos resultados son coincidentes con los determinados en el medio acuoso.

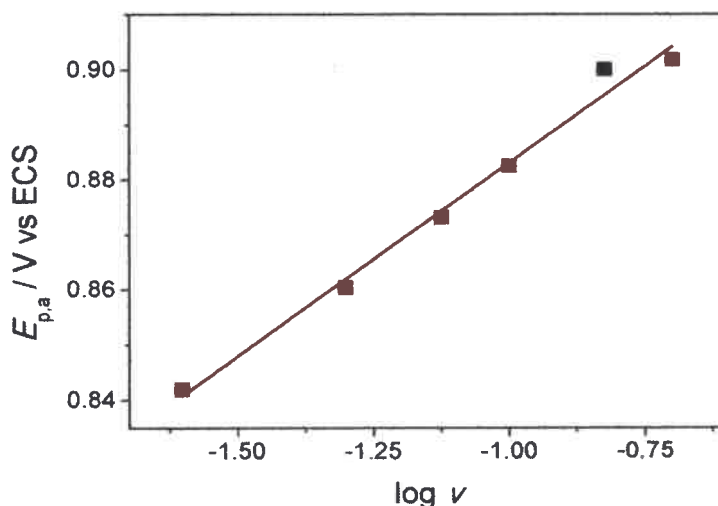


Figura 5.3. Relación entre el potencial de pico anódico y el logaritmo de la velocidad de barrido. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5}$ M.

Respecto al análisis de la corriente de pico anódica con la velocidad de barrido, se obtuvieron resultados diferentes a los vistos en medio acuoso, ya que MON presentó una relación lineal tanto con v como con $v^{1/2}$ (Figura 5.4). Estos resultados indican que la oxidación de MON en el medio no acuoso presenta un control tanto difusional (lineal $I_{p,a}$ vs $v^{1/2}$) como adsorptivo (lineal $I_{p,a}$ vs v), es decir, tiene un control mixto.

Este tipo de sistemas mixtos tiene un tratamiento analítico matemático diferente al normalmente utilizado en aquellos sistemas en donde se encuentra un sólo tipo de contribución.

La Figura 5.1 muestra que en la zona catódica tanto para la solución en ausencia como en presencia de MON no se produce ninguna señal electroquímica. Estos resultados eran de esperarse, ya que el cambio de solvente no produjera un efecto notable en el comportamiento electroquímico de MON.

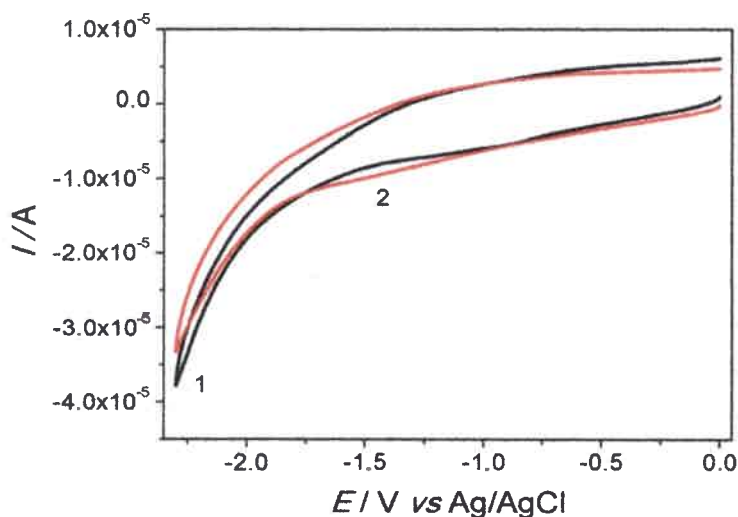


Figura 5.1. Voltamperogramas cíclicos de solución de (1) ACN más HFFTBA 0,1 M y (2) solución de MON en ACN más HFFTBA 0,1 M sobre un electrodo de carbono vítreo registrados en la zona catódica. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

Posteriormente, se realizaron experiencias en la zona anódica bajo las mismas condiciones experimentales antes mencionadas. Los voltamperogramas cíclicos obtenidos se muestran en la Figura 5.2.

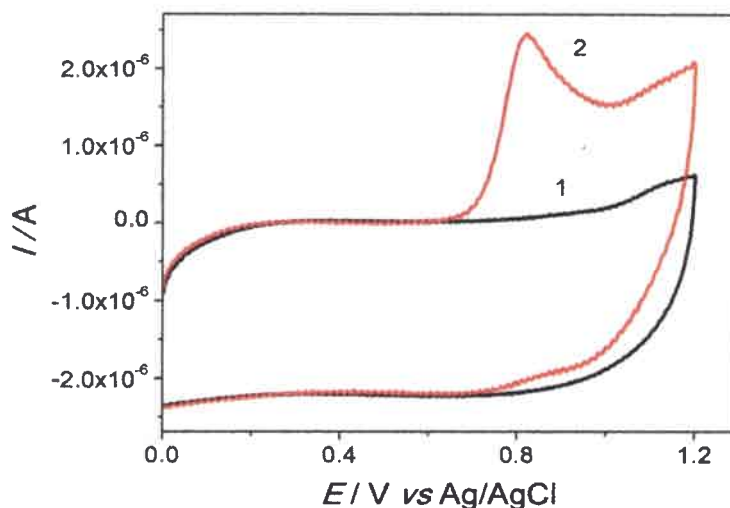


Figura 5.2. Voltamperogramas cíclicos de solución de (1) ACN más HFFTBA 0,1 M y (2) solución de MON en ACN más HFFTBA 0,1 M sobre un electrodo de carbono vítreo registrados en la zona anódica. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

5.1. Comportamiento electroquímico de MON

La continuación del estudio del mecanismo electroquímico de MON en un medio no acuoso, como el acetonitrilo (ACN), fue posible dada la alta polaridad de MON. Este medio proporciona algunas ventajas sobre el no acuoso desde el punto de vista del estudio mecanístico, entre las cuales se pueden mencionar los amplios límites de potencial de trabajo catódicos y anódicos (entre -2,2 a 2 V vs Ag/AgCl) que nos permiten verificar tanto la presencia como ausencia de otras señales electroquímicas que no pudieron ser observadas en el medio acuoso. Por otro lado, el medio no acuoso aprótico ha sido ampliamente usado como un medio ideal para el estudio de los mecanismos electroquímicos de compuestos orgánicos [175-177].

Al igual que en medio acuoso, se inició con los estudios de voltamperometría cíclica y de onda cuadrada. Luego, se estudió el comportamiento electroquímico de MON cuando en el medio se encontraban compuestos como el ácido trifluoroacético (TFA-H) y el hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH), los que proporcionarían el medio ácido y básico, respectivamente, en un solvente no acuoso, semejante al cambio de pH en el solvente acuoso. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de voltamperometría cíclica a altas velocidades de barrido para complementar los estudios mecanísticos de MON. Se incluyó, además, un estudio de electrólisis a potencial controlado, el cual proporcionó información más detallada sobre el número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica. Por otra parte, como complemento de los estudios electroquímicos, se utilizó la espectroscopía UV-Vis, la cual fue utilizada para corroborar los resultados obtenidos en la electrólisis a potencial controlado y para obtener los primeros valores informados de los coeficientes de extinción molar de la micotoxina moniliformina en medio no acuoso.

Para llevar a cabo dichos experimentos, se utilizó como electrolito soporte el HFFTBA a una concentración 0,1 M, que fue previamente tratado para alcanzar las condiciones óptimas requeridas en las experiencias electroquímicas (ver Sección 3.1.4). Durante las primeras experiencias en ACN, se utilizó un electrodo de calomel saturado como electrodo de referencia. Posteriormente, se cambió por un electrodo de Ag/AgCl, debido a que el ECS presentó algunos problemas inherentes a su carácter acuoso. También, en las experiencias finales de este medio, se utilizó un electrodo de referencia de Ag/Ag⁺. Por otro lado, se utilizó el mismo electrodo auxiliar de platino usado en el medio acuoso, el electrodo de carbono vítreo pre-tratado como electrodo de trabajo y una celda de dos cuerpos. Cabe resaltar que, para todas las experiencias electroquímicas, las soluciones fueron desoxigenadas mediante el burbujeo de gas nitrógeno.

5.1.1. Moniliformina en acetonitrilo

Los primeros voltamperogramas cíclicos fueron registrados para una solución de ACN con 0,1 M HFFTBA en ausencia de MON. Luego, se utilizó una solución que contenía MON a una concentración de $8,3 \times 10^{-5}$ M en ACN con 0,1 M HFFTBA. Se estudió nuevamente tanto la zona anódica como la catódica en ambas soluciones.

5

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE MONO EN MEDIO NO ACUOSO

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del estudio electroquímico de MON en medio no acuoso. Estos resultados complementan aquellos realizados en medio acuoso y permiten proponer un posible mecanismo por el cual MON se descarga electroquímicamente. También se describen aquellos estudios espectrofotométricos realizados en este medio.

4.3. Determinación de MON en medio acuoso neutro por VOC

Los resultados obtenidos durante el estudio electroquímico de MON usando la VOC, permitieron realizar una aproximación a una posible metodología electroanalítica para la cuantificación de esta micotoxina en soluciones acuosas neutras. Para ello, se utilizó una celda convencional de tres electrodos, usando como electrodo de trabajo un electrodo de carbono vítreo. Se prepararon soluciones de MON disueltas en solución amortiguadora de fosfato pH 7 en un intervalo de concentración entre 3×10^{-6} a $5,5 \times 10^{-5}$ M. Los parámetros experimentales de la VOC fueron $\Delta E_s = 0,010$ V, $\Delta E_{oc} = 0,050$ V y $f = 25$ Hz.

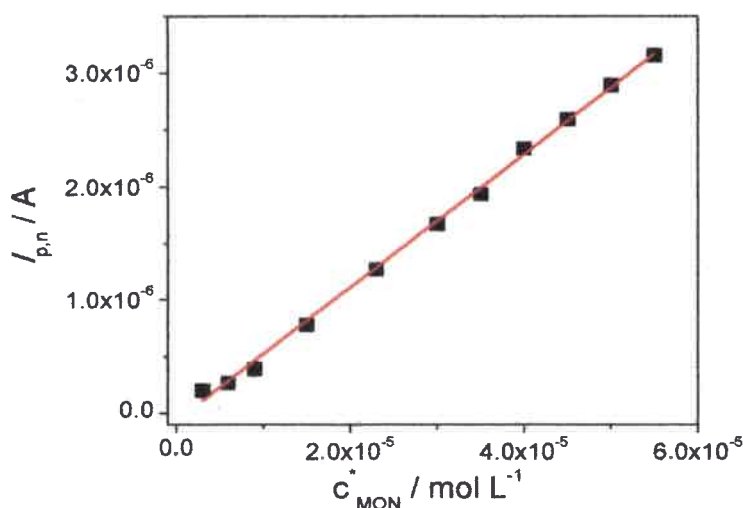


Figura 4.21. Curva de calibración de MON en SAF pH 7 realizada por VOC sobre electrodo de carbono vítreo. $r = 0,9951$.

La Figura 4.21 muestra la relación entre la corriente de pico neta registrada a diferentes valores de concentración de MON. Dicha curva está representada por la siguiente ecuación, aplicando el método de los cuadrados mínimos:

$$I_{p,n} = (-1,1 \pm 0,3) \times 10^{-7} (\text{A}) + (0,060 \pm 0,003) (\text{A M}^{-1}) \times c_{MON}^* (\text{M}) \quad (4.4)$$

El límite de detección determinado para una señal:ruido de 3:1 [174] fue de $1,5 \times 10^{-6}$ M (180 ppb). Esta curva de calibración sería, según nuestro conocimiento, la primera obtenida para la determinación electroquímica de la micotoxina moniliformina.

- Banda entre 210–230 nm ($\epsilon \approx 10000$) debida a transición $\pi \rightarrow \pi^*$
- Banda entre 300–330 nm ($\epsilon \approx 100$) debida a transición $n \rightarrow \pi^*$

Esta asignación se encuentra en buen acuerdo con los espectros experimentales de MON registrados tanto en la solución amortiguadora de pH 7 como pH 10 (espectros 2 y 3 de la Figura 4.18). Esto se debe a que el equilibrio de disociación de MON en ambos medios es casi el mismo, es decir, el grupo enolato está presente en la estructura de MON. Mientras que para el medio ácido, si bien el espectro presenta las dos bandas de absorción propuestas por Woodward–Fieser, el equilibrio de disociación es diferente y hace que los máximos de absorción se corran hacia el azul (efecto hipsocrómico), ya que al estar el pH por debajo del valor de pK_a , el grupo enolato se protona y disminuyen el número de electrones no enlazantes produciendo dicho corrimiento [172, 173].

Estos resultados afirman la hipótesis planteada sobre las diferencias en las corrientes de pico y los potenciales de pico entre en los voltamperogramas cíclicos registrados en medio ácido y neutro a la misma concentración. Allí, el medio ácido produjo una mayor corriente de pico y menor potencial de pico encontrados en medio neutro, atribuido a la protonación del grupo enolato que permite que haya mayor cantidad de MON susceptible de ser oxidada.

4.2.2. Determinación de los coeficientes de extinción molar de MON en medio neutro

Mediante el registro de los espectros UV-Vis a diferentes concentraciones de MON en SAF pH 7, se construyó una curva de calibración que permitió la determinación de los coeficientes de extinción molar (ϵ) en sus máximos de absorbancia, $\lambda = 227$ y $\lambda = 258$ nm. En la Figura 4.20-A y B se presentan las gráficas de absorbancia registradas a $\lambda = 227$ y $\lambda = 258$ nm utilizando un intervalo de concentración de MON de 8×10^{-6} a $4,5 \times 10^{-5}$ M.

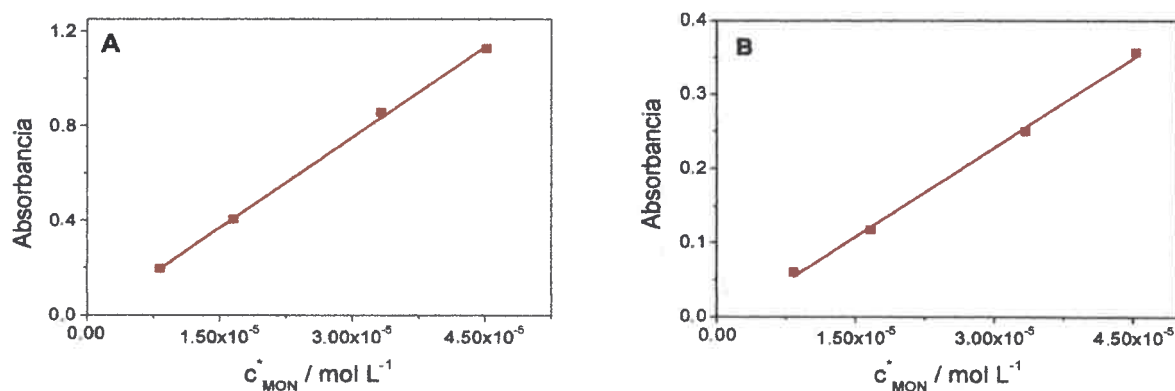


Figura 4.20. Relaciones de la absorbancia registrada a (A) $\lambda = 227$ nm y (B) $\lambda = 258$ nm con la concentración de MON. $r = 0,9991$ y $r = 0,9987$ respectivamente.

Los valores de los coeficientes de extinción molar calculados fueron $\epsilon_{227} = (25,5 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{258} = (8,1 \pm 0,3) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

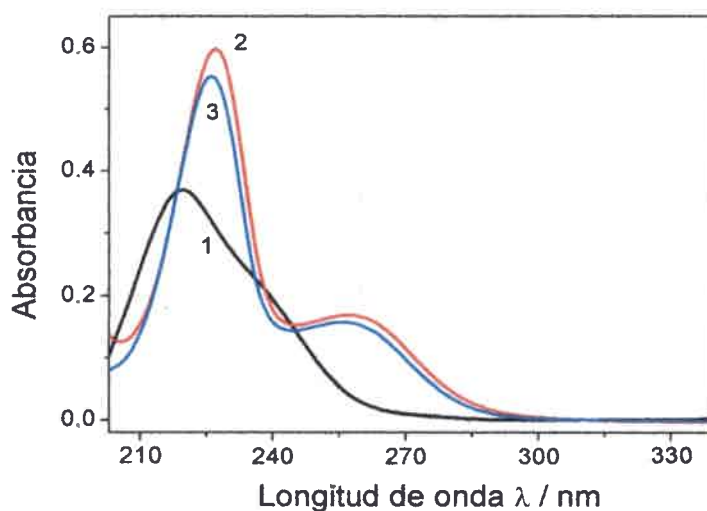


Figura 4.18. Espectros de absorción UV-Vis de MON en (1) HClO_4 1 M, (2) SAF pH 7 y (3) SAA pH 10. $c_{\text{MON}}^* = 2,5 \times 10^{-5}$ M.

Como se observa en la Figura 4.18, los espectros registrados en SAF y SAA presentan perfiles bastante similares entre sí, con dos máximos de absorbancia a $\lambda = 227$ y $\lambda = 258$ nm. En la solución de HClO_4 1 M, MON presenta un espectro muy diferente al visto en los dos medios anteriores, con un sólo máximo de absorbancia a $\lambda = 220$ nm y un pequeño hombro a $\lambda = 238$ nm. Estos cambios en los espectros pueden relacionarse a los diferentes equilibrios que presenta MON en cada medio.

Para entender un poco más acerca de los espectros de absorbancia de MON, podemos recurrir a un análisis cualitativo a través de la asignación de bandas propuesta por Woodward-Fieser [172, 173]. Para ello, debemos identificar los grupos cromóforos de la micotoxina, los sustituyentes en los cromóforos y el medio en que se encuentra.

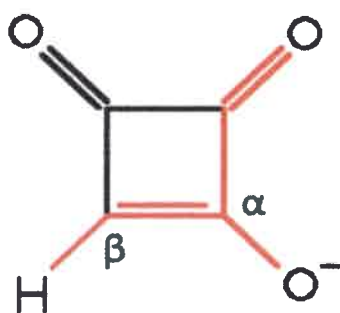


Figura 4.19. Estructura de MON en donde se resalta con rojo el grupo cromóforo α, β -insaturado y su sustituyente $-\text{OH}$ en el carbono α .

La Figura 4.19 muestra que el grupo cromóforo principal de MON es una cetona α, β -insaturada, con un sustituyente $-\text{OH}$ en el carbono α . Este grupo, según las reglas de Woodward-Fieser, presenta las siguientes bandas de absorción debidas a ciertas transiciones en particular.

Tabla 4.1. Valores de corrientes límites convolucionadas a distintas velocidades de barrido y su respectivo valor de coeficientes de difusión determinados por la Ecuación 4.3.

Velocidad de barrido, v $V s^{-1}$	Corriente límite, I_L $C s^{-1/2}$	Coefficiente de difusión, D_{MON}^* $cm^2 s^{-1}$
0,025	$7,54 \times 10^{-6}$	$4,84 \times 10^{-5}$
0,050	$8,01 \times 10^{-6}$	$5,44 \times 10^{-5}$
0,075	$8,21 \times 10^{-6}$	$5,72 \times 10^{-5}$

Así, el valor aproximado del coeficiente de difusión de MON en un medio acuoso neutro fue de $(5,3 \pm 0,4) \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$. Teniendo en cuenta que el coeficiente de difusión depende de tres factores como el tamaño y forma del soluto, la viscosidad del medio y la temperatura, es razonable esperar un valor de esta magnitud para MON, ya que ésta posee un estructura pequeña y la viscosidad del agua es baja. Si lo comparamos con el valor de coeficiente de difusión de otras compuestos orgánicas de un tamaño similar disueltas en solventes acuosos, encontraremos valores cercanos a los obtenidos para MON. Por ejemplo, valores tanto experimentales como calculados para el ciclohexano y el fenol en un medio acuoso fueron de $(0,95 \pm 0,02) \times 10^{-5}$ y $(1,07 \pm 0,04) \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$, respectivamente [170]. Otro ejemplo aún más cercano es el del ácido escúarico, el cual se diferencia de MON por tener un grupo hidroxilo más en su estructura y que posee un valor de coeficiente de difusión de $1,3 \times 10^{-5} cm^2 s^{-1}$ [171].

4.2. Estudio espectrofotométrico de MON

La espectrofotometría UV-visible fue utilizada como técnica complementaria a los estudios electroquímicos realizados a la micotoxina MON, ya que esta técnica permite obtener parámetros característicos de MON, como las longitudes de onda de sus máximos de absorción (λ_{Max}) y sus coeficientes de extinción molar (ϵ), utilizados para desarrollar metodologías analíticas. Además, a partir de los espectros UV-Vis, es posible obtener información relacionada a la estructura de MON que pueda ser utilizada a la hora de proponer un posible mecanismo por el cual, MON se descargue electroquímicamente.

4.2.1. Análisis de los espectros UV-Vis de MON

Para llevar a cabo estas experiencias, se utilizó la misma metodología empleada durante los estudios electroquímicos en donde se varió el valor del pH del medio, por lo que se prepararon las mismas soluciones de MON en solución de ácido perclórico 1 M, solución amortiguadora de fosfato pH 7 y solución amortiguadora de amoníaco pH 10 a una concentración de MON de $2,5 \times 10^{-5} M$ y se registraron los correspondientes espectros UV-Vis. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente y con una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

4.1. Comportamiento electroquímica de MON

los parámetros fisicoquímicos de MON, como lo es su coeficiente de difusión. Para ello, se usó solamente el barrido directo convolucionado que representa la oxidación electroquímica de MON y que arroja resultados que permiten el cálculo de su coeficiente de difusión. El voltamperograma del barrido directo presenta la forma de una curva polarográfica, que alcanza un estado estacionario cuando el barrido de potencial es lo suficientemente anódico del potencial de pico. La corriente registrada en el estado estacionario será tomada como la corriente límite I_L , la corrientes de los voltamperogramas convolucionados como I y, como es usual, las corrientes de los voltamperogramas cíclicos convolucionados como I .

Para llevar a cabo este análisis, se realizaron voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido y, posteriormente, fueron convolucionados para obtener perfiles $I-E$ como se muestran en la Figura 4.17.

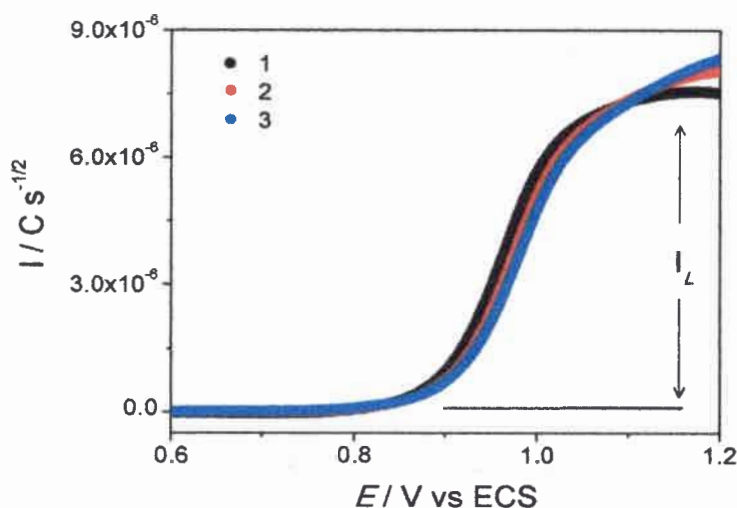


Figura 4.17. Perfiles $I-E$ obtenidos a diferentes velocidades de barrido. (1) 0,025; (2) 0,050 y (3) 0,075 $V s^{-1}$. $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-4} M$.

Como era de esperar, los perfiles de los voltamperogramas convolucionados mostrados en la Figura 4.17 se superponen, ya que al tener las características de curvas polarográficas que alcanzan un estado estacionario, estas son independientes de la velocidad de barrido del potencial. Las ligeras diferencias entre ellos se debe a que no es posible eliminar en un 100% las corrientes no faradáicas de los voltamperogramas cíclicos. Sin embargo, la diferencia entre ellos no es estadísticamente significativa [118, 169] y, por ende, son consideradas para aplicar este criterio de diagnóstico .

A partir de las corrientes límites convolucionadas, determinadas para cada velocidad de barrido, y aplicando la Ecuación 4.3, se determinaron los valores de los coeficientes de difusión, asumiendo $n = 1$.

$$I_L = nFAD_{MON}^{1/2}c_{MON}^* \quad (4.3)$$

donde $F = 96484,60 C mol^{-1}$, $A = 0,07 cm^2$ y $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-7} mol cm^3$. Los valores de las corrientes y los coeficientes de difusión calculados a cada velocidad de barrido se muestran en la Tabla 4.1, considerando $n = 1$.

4.1.4. Convolución de voltamperogramas cíclicos

Mediante la convolución de los voltamperogramas cíclicos obtenidos en medio acuoso neutro empleando el electrodo de carbono vítreo, se pretende obtener información que soporte la hipótesis planteada sobre la posible reacción química homogénea acoplada a la transferencia de carga inicial interpretada en los perfiles de los voltamperogramas cíclicos y de onda cuadrada.

Para adquirir información confiable a través de un análisis de convolución, es necesario trabajar sobre voltamperogramas que sólo contengan información del proceso redox a estudiar. Esto significa que se debe eliminar toda corriente capacitiva o no faradámica del voltamperograma. Para lograr esto, es necesario registrar un VC en una solución ausente de MON en donde está contenida toda la información capacitiva del sistema. Luego, a un VC registrado en presencia de MON se le resta dicho voltamperograma para obtener un registro $I - E$ netamente faradámico, sobre el cual se realizará el procedimiento de convolución. Esta operación de convolución se efectuó utilizando el software GPES 4.9 propio de los potenciostatos AutoLab, que realiza una semi-integración de los voltamperogramas cíclicos a través del algoritmo de Levie [168], el cual fue adaptado por Oldham y Myland [106].

La Figura 4.16 muestra tanto el voltamperograma libre de corrientes no faradámicas como el resultante de la convolución de dicho voltamperograma.

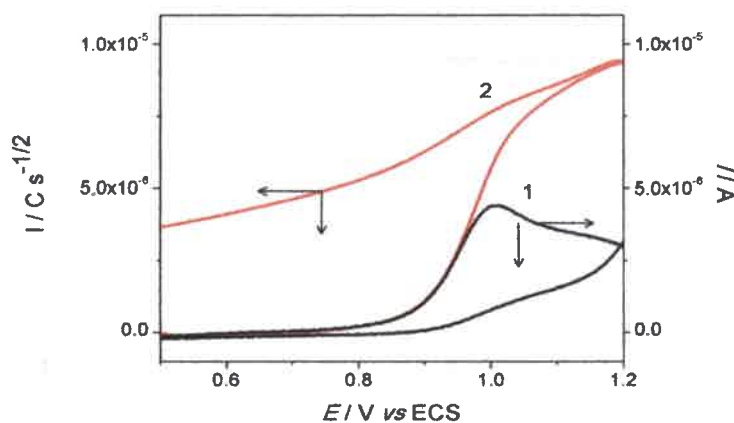


Figura 4.16. Voltamperogramas cíclicos (1) corregido por la sustracción de las corrientes no faradámicas y (2) convolucionado de una solución de MON en SAF. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Tal como se deduce de los tratamientos teóricos de Saveant e Imbeaux, la oxidación electroquímica de MON presenta una complicación cinética homogénea acoplada a la transferencia de carga inicial [117]. Esto se debe a que el barrido inverso convolucionado no coincide con el barrido directo convolucionado y la corriente convolucionada del barrido inverso no retorna a cero en el potencial inicial, característica principal de sistemas con reacciones químicas acopladas. Al presentarse una concordancia entre los resultados de convolución con los observados previamente por VC y VOC, es posible afirmar entonces que, efectivamente, existe una reacción química acoplada en la oxidación electroquímica de MON.

Teniendo en cuenta que el sistema manifiesta un control difusional, de acuerdo a lo visto por VC y VOC, es posible utilizar los voltamperogramas convolucionados para obtener información de alguno de

4.1.3. Moniliformina en medio básico

Para finalizar los estudios a diferentes valores de pH, se utilizó una solución amortiguadora de amoníaco (SAA) de pH 10. Se utilizó como electrodo de trabajo un electrodo de carbono vítreo y una solución de MON $8,3 \times 10^{-5}$ M en SAA de concentración y las mismas condiciones experimentales utilizadas para el medio neutro.

Como era de esperarse, la solución de SAA no presentó ninguna descarga electroquímica significativa tanto en la zona anódica como en la catódica. Mientras que para la solución de MON preparada en SAA sólo se observó un único pico de oxidación cercano a 1 V vs ECS, similar al ya visto tanto en medio neutro como en medio ácido.

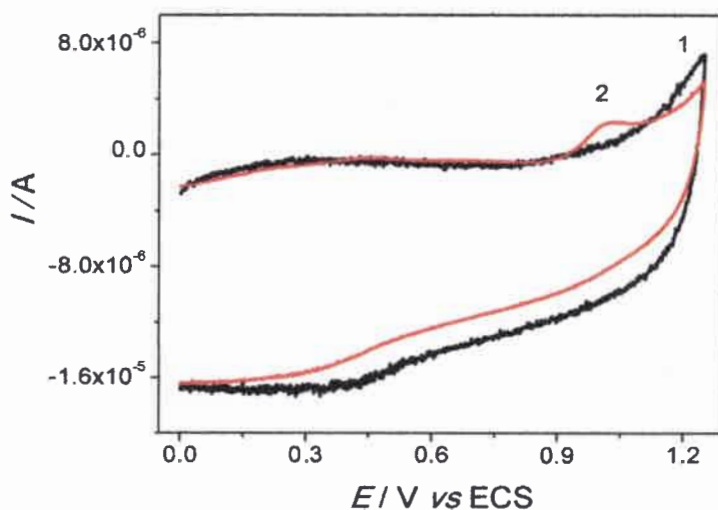


Figura 4.15. Voltamperogramas cíclicos de (1) solución de SAA pH = 10 y (2) solución de MON en SAA sobre el electrodo de carbono vítreo. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s⁻¹.

La Figura 4.15 muestra que la descarga electroquímica de MON en un medio básico no difiere de lo observado en medio neutro. Esto era de esperarse si se considera que el valor de pK_a de MON es tan bajo que a pH superiores de 2, MON presentaría la misma estructura, es decir, su forma de enolato. La única diferencia apreciable entre ambos medios, es el aumento de las corrientes capacitivas propias del cambio de iones presentes en el medio.

Los resultados obtenidos durante el estudio de la respuesta electroquímica de MON a través de diferentes medios de reacción, han mostrado que la señal de oxidación de la micotoxina es repetitiva y estable en varias regiones de pH, lo que refleja la gran estabilidad estructural de la molécula. Su mecanismo difusional tampoco se vio afectado por la variación del medio, lo cual facilita el desarrollo y la aplicación de los criterios de diagnóstico. Por lo tanto, podemos continuar con el estudio del mecanismo de oxidación de MON en medio acuoso neutro y utilizando un electrodo de carbono vítreo, ya que no se encontraron diferencias significativas que sugieran trabajar a otros valores de pH. Además, como ya lo habíamos mencionado, MON se encuentra principalmente en soluciones de pH neutro, por lo que los estudios aquí realizados estarán más acorde con los próximos estudios analíticos.

HClO_4 1 M en ausencia de MON, tanto en la zona anódica como en la zona catódica. En ellos, no se observó ninguna descarga electroquímica significativa que interfiriera con la electro-oxidación ni con la electro-reducción de MON. Luego, se registraron voltamperogramas cíclicos para la solución de MON en medio ácido, tanto en la zona anódica como en la zona catódica, obteniendo un sólo pico de oxidación, similar al observado en el medio neutro pero con una ligera diferencia en las corrientes y los potenciales de pico anódico. Este pico de oxidación también mostró un comportamiento difusional por el criterio de diagnóstico $I_{p,a}$ vs $v^{1/2}$ [98].

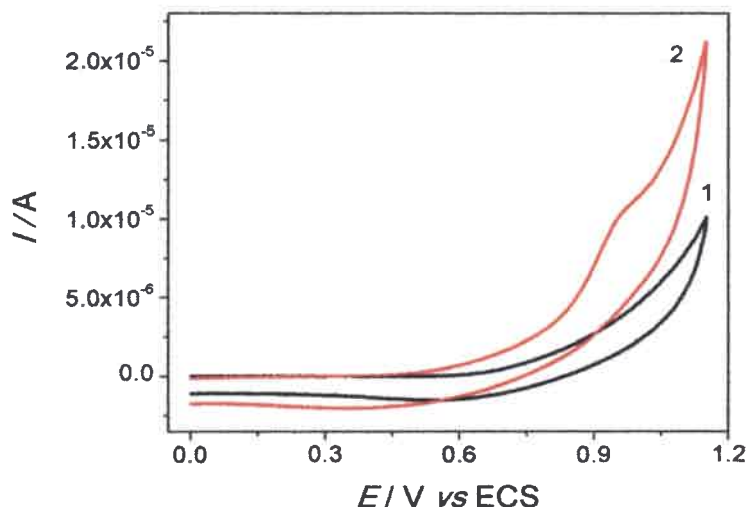


Figura 4.14. Voltamperogramas cíclicos de (1) solución de HClO_4 1 M y (2) solución de MON en HClO_4 1 M sobre un electrodo de carbono vítreo. $c_{\text{MON}}^* = 8,3 \times 10^{-5}$ M. $v = 0,050$ V s $^{-1}$.

Como se muestra en la Figura 4.14, el pico de oxidación de MON se encuentra desplazado 0,15 V respecto del observado en medio neutro y casi con 3 veces más corriente de pico. Estos resultados indican que aún teniendo la misma concentración de MON, en el medio ácido se obtiene una mayor corriente de pico, es decir, que en este medio hay mayor cantidad de MON disponible para ser oxidada que en el medio neutro. Lo que lleva a suponer que la protonación del enolato promueva la disponibilidad de MON susceptible de ser oxidada. Esto puede ser explicado en base a los resultados encontrados por Lansden y col., quienes propusieron que posiblemente MON, en medio acuoso neutro, pueda estar presente como ión enolato y como dímero [167]. En este sentido, al encontrarse MON en un medio ácido, los grupos enolatos se protonan de tal manera que se inhibe la formación del dímero y queda mayor cantidad de MON disponible para ser oxidada. El equilibrio de disociación en medio ácido puede ser planteado de la siguiente manera:



Si bien se obtuvieron resultados satisfactorios en el medio ácido, éstos no fueron lo suficientemente representativos ni en el comportamiento de MON ni en su mecanismo de descarga electroquímica como para continuar con los estudios en este medio. Mas aún sabiendo que MON, generalmente, se encuentra en muestras de pH neutro.

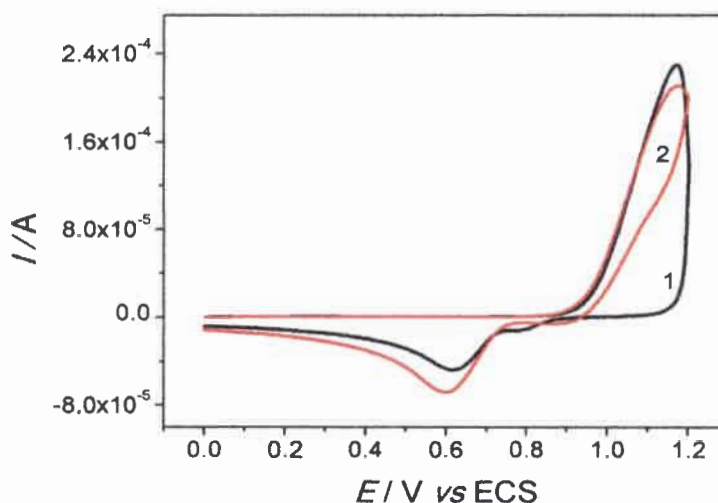


Figura 4.13. Voltamperogramas cíclicos (1) en ausencia y (2) en presencia de MON en SAF sobre un electrodo de oro. $c_{MON}^* = 4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$. $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

Los estudios realizados hasta ahora permitieron determinar que la respuesta electroquímica de MON se basa en la oxidación, posiblemente, del ión enolato, el cual muestra una descarga cerca de 1 V vs ECS, controlada por difusión (dependencia lineal entre las relaciones $I_{p,a}$ vs $v^{1/2}$ y $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$) e intercambiando en este proceso 1 electrón (pendiente cercana a los 0,056 V/n en las relaciones $E_{p,a}$ vs $\log v$). Dicha oxidación posiblemente presente una reacción química acoplada a la transferencia de carga inicial, ya que por VC no es posible ver el pico complementario del proceso de oxidación y por VOC la contribución de la corriente inversa es baja, al menos a las velocidades de barrido y frecuencia estudiadas. Además, es factible inferir que el proceso electroquímico corresponda a un sistema cuasi-reversible, dados los perfiles de los voltamperogramas cíclicos y de onda cuadrada observados a bajas velocidades. Finalmente, se observó también que la respuesta electroquímica de MON no mejoró sobre otro tipo de superficies, haciendo al carbono vítreo, el electrodo más conveniente para el estudio de la oxidación electroquímica de MON.

4.1.2. Moniliformina en medio ácido

Una propiedad fisicoquímica importante de la micotoxina MON es su valor de pK_a , el cual está entre 0 y 1,7, correspondiente a la protonación-desprotonación del grupo enol alojado en el carbono 3 del anillo. Esta propiedad permitió realizar un estudio más amplio sobre el mecanismo de descarga electroquímica de MON. En base a los estudios obtenidos en medio neutro, se plantea el mismo desarrollo experimental sólo que utilizando como único electrodo de trabajo al electrodo de carbono vítreo.

Para llevar a cabo estos estudios, se utilizó un medio de reacción lo suficientemente ácido como para superar el bajo valor de pK_a de la micotoxina. En este caso se utilizó una solución de ácido perclórico 1 M para preparar las soluciones de MON de concentración $8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$. Las condiciones de trabajo fueron las mismas ya mencionadas para el medio acuoso neutro.

Las experiencias en medio ácido se iniciaron registrando voltamperogramas cíclicos en solución de

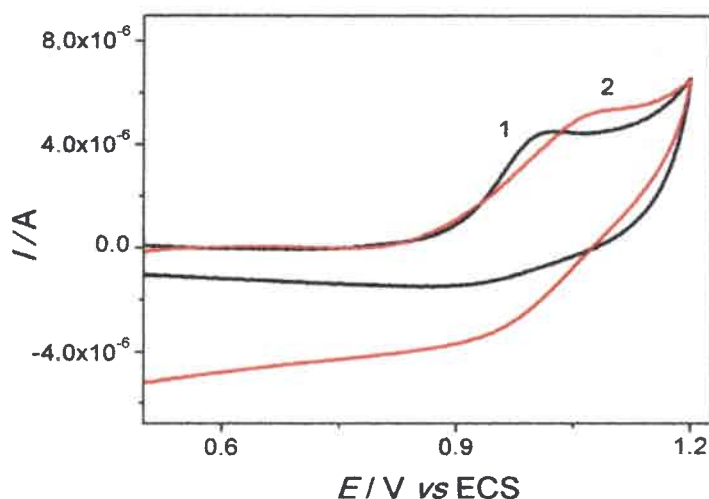


Figura 4.12. Voltamperogramas cíclicos de una solución de MON en SAF sobre un electrodo de (1) carbono vítreo y (2) platino. $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$. $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$.

Como se puede ver en la Figura 4.12, no se observa ningún efecto de catálisis por parte del electrodo de platino, incluso, la oxidación electroquímica es mucho más deficiente, ya que la señal no presenta una buena definición y el potencial de pico está en una zona más anódica en comparación con la respuesta obtenida con el electrodo de carbono vítreo. De esta manera, el electrodo de platino tampoco mostró buen desempeño en la oxidación electroquímica de MON en comparación con el CV, el cual, por ahora, sigue siendo el electrodo de trabajo más adecuado.

Electrodo de oro

Para finalizar el estudio de la descarga electroquímica de MON sobre diferentes tipos de electrodos, se utilizó otro electrodo en base a un metal noble como lo es el electrodo de oro. En este caso, se empleó un electrodo de oro policristalino, previamente activado (ver Sección 3.2.2) en una solución de MON en SAF a una concentración de $4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$. Como se puede ver en la Figura 4.13, la descarga electroquímica de MON se encuentra dentro de la zona de la formación de los óxidos de oro, lo que no permite realizar un estudio adecuado de la descarga de la toxina sobre esta superficie. Por otro lado, tampoco fue visto un efecto catalítico como se esperaba, ya que la descarga de MON sigue estando a potenciales cercanos a 1 V.

Al igual que con el electrodo de Pt, el electrodo de oro tampoco mostró un buen desempeño en la electro-oxidación de MON, ya que ninguno de ellos mejoró la respuesta de MON ni tampoco exhibieron las características electrocatalíticas esperadas. Así, el electrodo de carbono vítreo sigue siendo el electrodo de trabajo más adecuado para el desarrollo del estudio electroquímico de MON.

En la Figura 4.11-A se puede ver que la respuesta electroquímica de MON sobre este electrodo, resultó ligeramente catalizada, ya que presenta un corrimiento catódico de aproximadamente 50 mV, respecto a los potenciales obtenidos utilizando un electrodo de CV a las mismas frecuencias. Por otra parte, el comportamiento de MON sigue estando controlado por difusión, ya que las corrientes de pico neta fueron lineales con la raíz cuadrada de la frecuencia (Figura 4.11-B) [123].

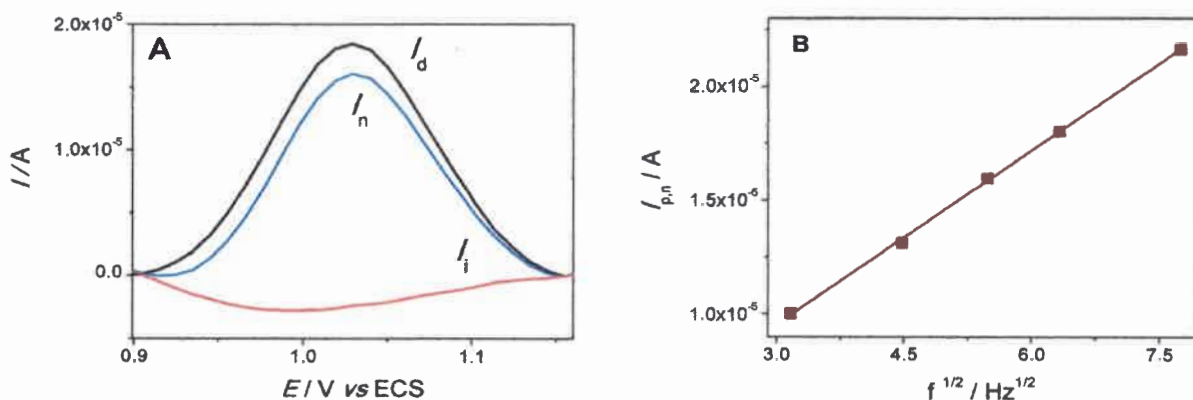


Figura 4.11. (A) Voltamperogramas de onda cuadrada de MON en SAF sobre el electrodo de CPAO. $\Delta E_s = 0,010$ V, $\Delta E_{oc} = 0,050$ V y $f = 40$ Hz. $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-4}$ M. (B) Relación entre $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$. $r = 0,9929$.

En ambos casos, en voltamperometría cíclica como en onda cuadrada, un pequeño corrimiento catódico de los potenciales de pico anódicos fueron observados sobre el electrodo de CPAO respecto al electrodo de CV. Esto se explica, en función de que los electrodos de CPAO tienen un mayor número de defectos en su superficie, lo que se traduce en una superficie más oxidada ó con mayor polaridad [162]. Además, los potenciales de pico en los procesos de oxidación, decrecen con el incremento de los sitios libres en los bordes del plano y, consecuentemente, se podrá ver un aumento en las corrientes de pico mayores que para CV, pero no tan grandes como se esperaría para su tamaño geométrico [163]. A pesar de ésto, los cambios no fueron lo suficientemente significativos como para, desde un punto de vista práctico, utilizar al electrodo de CPAO como electrodo de trabajo en lugar del electrodo de CV.

Electrodo de platino

Continuando con el estudio de la descarga electroquímica de la micotoxina MON sobre otras superficies, se decidió utilizar electrodos en base a metales nobles, como el platino. Este electrodo, al igual que otros electrodos, como el Au, Rh y Pd, han sido empleados como electrodos ideales para reacciones electroquímicas de oxidación de un amplio rango de compuestos orgánicos, debido a sus propiedades electrocatalíticas [164-166].

Para llevar a cabo esta experiencia, se utilizó un electrodo de platino policristalino, previamente activado (ver Sección 3.2.2), el cual fue sumergido en SAF que contenía MON a una concentración de $1,2 \times 10^{-4}$ M. En la Figura 4.12 se compara la respuesta electroquímica de MON sobre Pt y CV.

El análisis de la $I_{p,a}$ vs $v^{1/2}$ (Figura 4.9), también arrojó una dependencia lineal, lo cual indica que la electro-oxidación de MON sobre un electrodo de CPAO está gobernada por difusión, al igual que con el electrodo de CV.

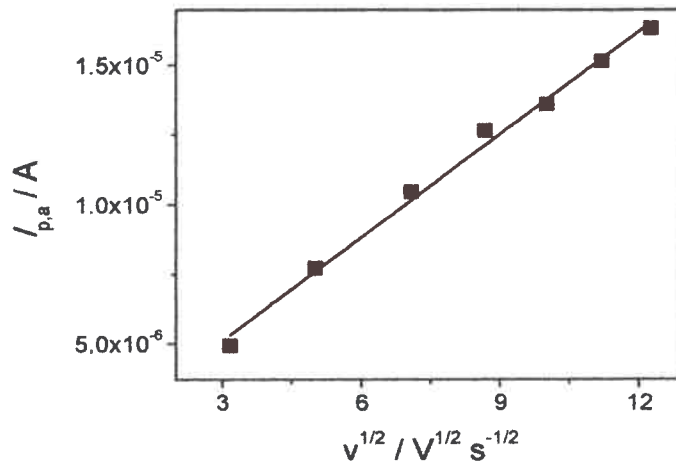


Figura 4.9. Relación entre $I_{p,a}$ vs $v^{1/2}$. $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-4} M$. $r = 0,9927$.

Lo mismo ocurrió con el análisis del potencial de pico anódico y el logaritmo de la velocidad de barrido (Figura 4.10), en donde se encontró, al igual que con CV, que la transferencia electrónica involucra, presumiblemente, 1 electrón, ya que el valor de la pendiente de 0,045 V es un valor relativamente cercano al determinado por literatura de $0,056 V/n$ [98].

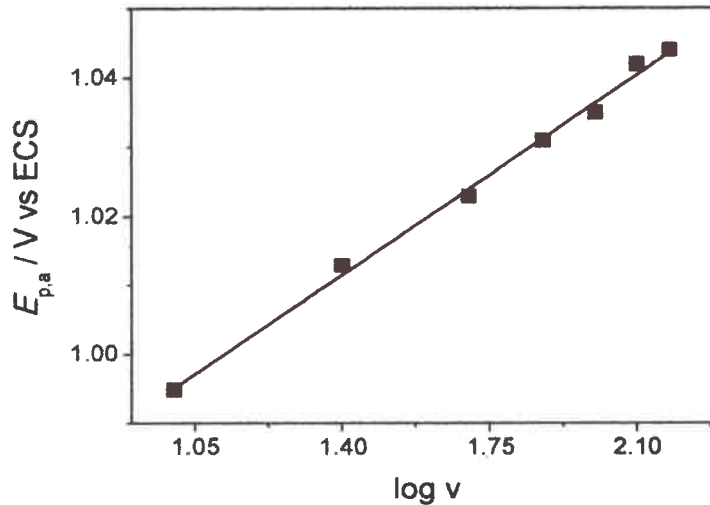


Figura 4.10. Relación del potencial de pico anódico con el logaritmo de la velocidad de barrido. $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-4} M$.

Posteriormente, se realizaron experiencias con VOC usando el electrodo de CPAO usando las mismas soluciones de trabajo.

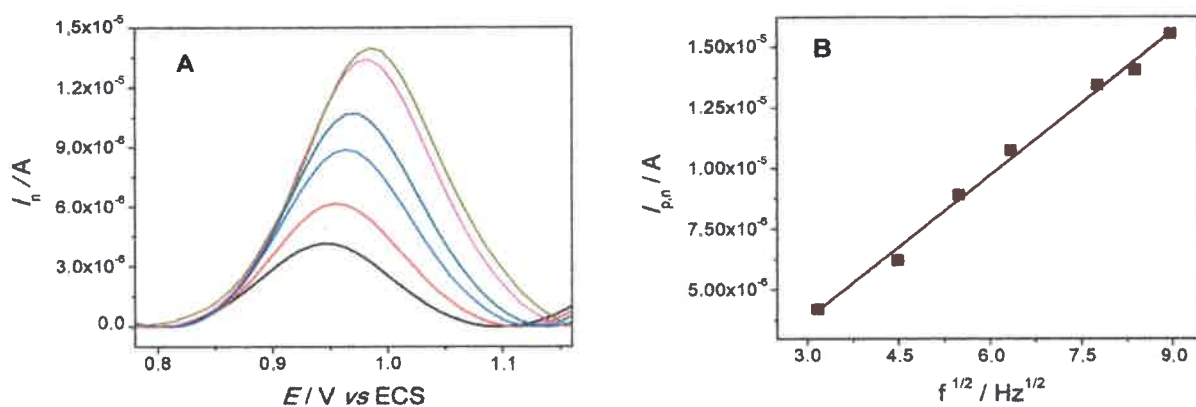


Figura 4.7. (A) Voltamperogramas de onda cuadrada de MON en SAF sobre un electrodo de CV a frecuencias de 10, 20, 30 40, 60 y 70 Hz. (B) Relación $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$, $r = 0,9929$. $\Delta E_s = 0,010$ V, $\Delta E_{oc} = 0,050$ V. $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-4}$ M.

Carbono pirolítico altamente orientado

Con el fin de observar posibles efectos catalíticos que promuevan la oxidación de MON a potenciales menos anódicos, se realizaron experiencias sobre otro tipo de electrodos; entre ellos, se utilizó un electrodo de carbono pirolítico altamente orientado (CPAO).

Primero, se registraron voltamperogramas cíclicos en SAF, en ausencia de MON, a diferentes velocidades de barrido, tanto en la zona catódica como anódica, obteniendo voltamperogramas cíclicos sin respuestas electroquímicas. A continuación, se repitió el mismo experimento con la solución de MON en SAF, donde los resultados obtenidos fueron similares a los descritos previamente con el electrodo de CV, osea, un pico de oxidación a un potencial cercano a 1 V vs ECS (Figura 4.8).

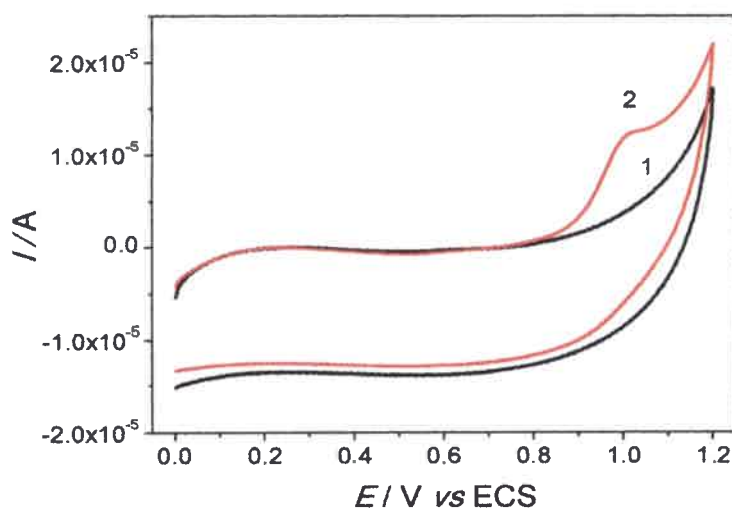


Figura 4.8. Voltamperogramas cíclicos en la zona anódica de (1) SAF y (2) solución de MON en SAF con CPAO como electrodo de trabajo. $c_{MON}^* = 1,2 \times 10^{-4}$ M. $v = 0,025$ V s^{-1} .

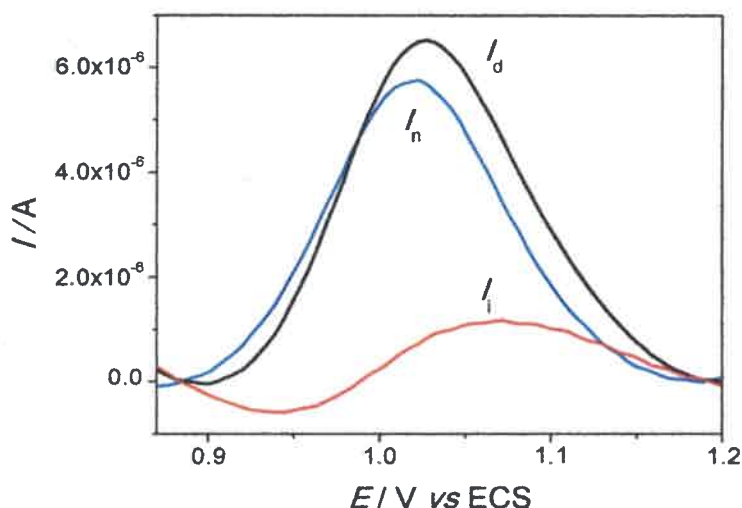


Figura 4.6. Voltamperogramas de onda cuadrada de MON en solución de SAF registrados sobre un electrodo de carbono vítreo. $\Delta E_s = 0,010$ V, $\Delta E_{oc} = 0,050$ V y $f = 40$ Hz. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5}$ M.

Un análisis de los perfiles de los voltamperogramas anteriores, indica que la mayor contribución a la corriente neta está dada por la corriente directa, esto quiere decir que el proceso inverso, es decir la posible reducción del radical, es despreciable, permitiendo inferir que ocurre una reacción química posterior a la transferencia de carga, la cual ya había sido inferida de los resultados de VC.

La ausencia de una señal complementaria al proceso inicial, es criterio de diagnóstico para sistemas tanto cuasi-reversibles como irreversibles, sin embargo para éste caso, aun no es posible hacer una referencia acertada sobre qué tipo de sistema presenta la oxidación de MON, ya que para descartar alguno de estos sistemas, al menos se deberían realizar experiencias electroquímicas a mayores velocidades de barrido. No obstante, es posible hacer una aproximación cualitativa comparando los perfiles de los voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos experimentalmente con los reportados en la literatura por Lovric y col. y Osteryoung y col., en donde para sistemas cuasi-reversibles existe una contribución de la componente inversa en la corriente neta que dependerá del parámetro cinético de la reacción acoplada. Mientras que para sistemas irreversibles, no existe una contribución por parte de la corriente inversa, es decir, la corriente neta es la corriente directa y sus valores serán negativos en todo el intervalo de potencial estudiado [126, 160, 161]. Por lo tanto, se puede suponer una posible cuasi-reversibilidad de la oxidación de MON, ya que existe una mínima contribución de la corriente inversa en la corriente neta.

Continuando con los criterios de diagnóstico de la VOC, se realizó un seguimiento de los cambios de la corriente neta frente a una variación de la frecuencia en un intervalo determinado (Figura 4.7-A), en donde se pudo establecer que existe una relación lineal entre la corriente de pico neta $I_{p,n}$ vs $f^{1/2}$ (Figura 4.7-B), típico de sistemas controlados por difusión [123], característica también observada en los análisis realizados a los voltamperogramas cíclicos.

4.1. Comportamiento electroquímica de MON

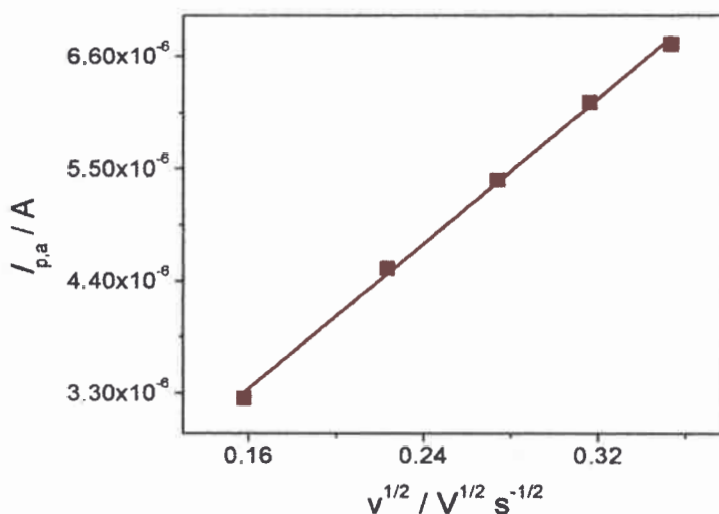


Figura 4.4. Relación de la corriente de pico anódica con la velocidad de barrido.

Por otra parte, un gráfico del $E_{p,a}$ vs $\log v$ (Figura 4.5) fue lineal, con una pendiente de $0,065 \pm 0,001$ V / década.

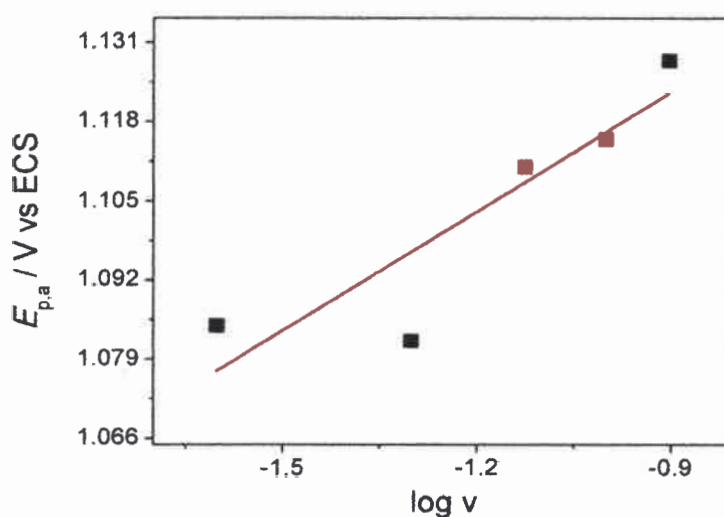


Figura 4.5. Relación del potencial de pico anódico con el logaritmo de la velocidad de barrido.

Otro criterio de diagnóstico empleado fue la determinación de la diferencia entre $E_{p,a} - E_{p/2}$, del cual se obtuvo un valor de $0,061 \pm 0,001$ V, similar al descrito en la teoría de $0,056$ V/ n , de donde se podría inferir, en principio, y en acuerdo con el valor resultado del gráfico $E_{p,a}$ vs $\log v$, que el número de electrones involucrados en el proceso de electrodo sería $n = 1$ [98].

Los estudios continuaron con el uso de la voltametría de onda cuadrada. Inicialmente, se evaluó la respuesta electroquímica de MON en un intervalo de frecuencias comprendido entre 10 y 500 Hz. La Figura 4.6 muestra los tres registros de corriente, corriente directa (I_d), corriente inversa (I_i) y corriente neta (I_n), obtenidos por VOC de una solución de MON $8,3 \times 10^{-5}$ M en solución de SAF.

Los anteriores resultados muestran que dentro de todo el intervalo de potencial estudiado y bajo las condiciones antes mencionadas, la única señal obtenida es una descarga electroquímica de oxidación a un potencial muy anódico. Ésto, desde el punto de vista estructural de MON es coherente, ya que los únicos grupos funcionales susceptibles a las reacciones electroquímicas son los carbonilos, la insaturación entre los carbonos C3 y C4 y el enolato, de los cuales, la reducción del alqueno por sí sola no es electroquímicamente factible y la óxido-reducción de las cetonas esta a potenciales por encima de 2 y -2 V vs SCE respectivamente, lo que deja al enolato como único grupo factible de ser electroquímicamente oxidado [99, 158].

Otra característica importante de la respuesta electroquímica de MON, fue la ausencia del pico correspondiente a la reducción del probable radical electrogenerado cuando se invirtió el sentido del barrido de potencial, insinuando que posiblemente exista una reacción química homogénea posterior a la transferencia electrónica inicial [159]. Esta hipótesis tuvo mayor aceptación cuando los resultados de las voltamperimetrías registradas en un intervalo de velocidades de entre $0,005$ y 3 V s^{-1} , arrojó que los resultados obtenidos fueron los mismos, un sólo pico de oxidación cercano a los $1,1$ V vs ECS, indicando que, posiblemente, la reacción química acoplada tiene una constante de velocidad lo suficientemente grande, para estas velocidades, que consume el producto electrogenerado antes de que sea reducido. Mas adelante se darán a conocer otros estudios concernientes a este proceso.

Se llevó a cabo la implementación de los criterios de diagnóstico mas importantes a los voltamperogramas obtenidos. Estos consisten en registrar VC a diferentes velocidades de barrido (Figura 4.3) y luego establecer cual es la relación entre la velocidad de barrido y la corriente de pico como también el potencial de pico anódico.

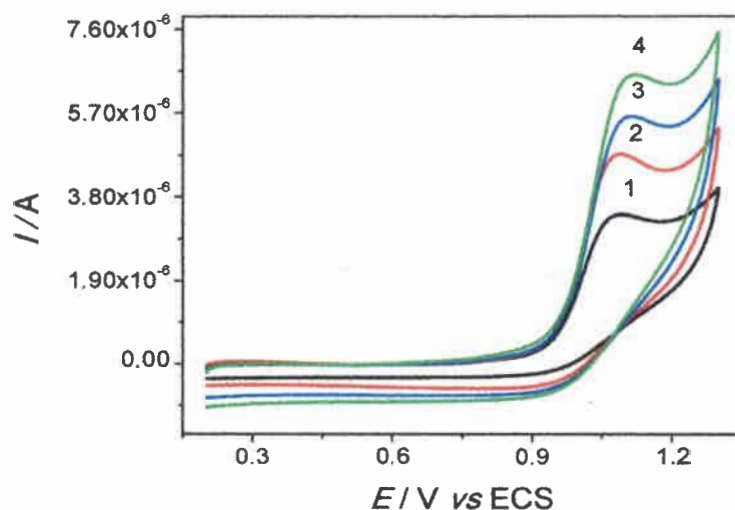


Figura 4.3. Voltamperogramas cíclicos de MON en SAF a diferentes velocidades de barrido. (1) $0,025$; (2) $0,050$; (3) $0,075$ y (4) $0,100$ V s^{-1} . $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5}$ M.

Como se muestra en la Figura 4.4, existe una relación lineal entre la $I_{p,a}$ vs $v^{1/2}$ ($r = 0,9978$), lo que indica que el sistema está controlado por difusión [98].

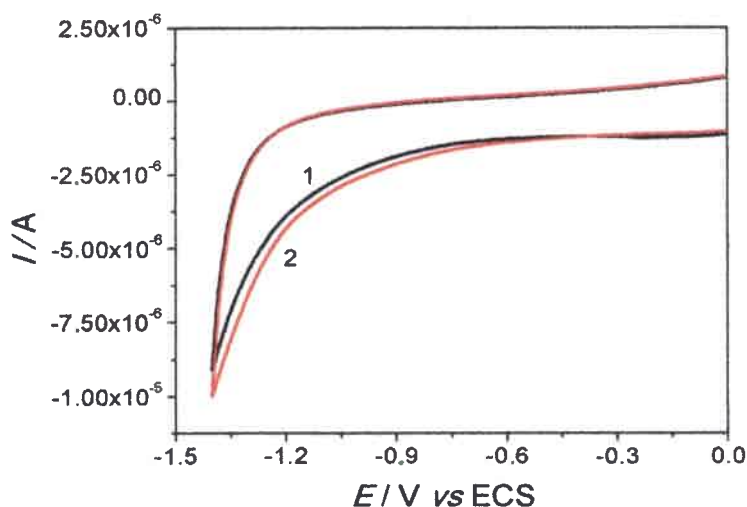


Figura 4.1. Voltamperogramas cíclicos en la zona catódica de la solución de (1) SAF y (2) MON en SAF. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Con respecto a la zona anódica, la solución de SAF no presenta ninguna respuesta electroquímica significativa (Figura 4.2-1), mientras que la solución de SAF que contenía MON, presentó un pico de oxidación cercano a 1,1 V vs ECS (Figura 4.2-2), el cual, puede ser atribuido a la descarga anódica del enolato de MON.

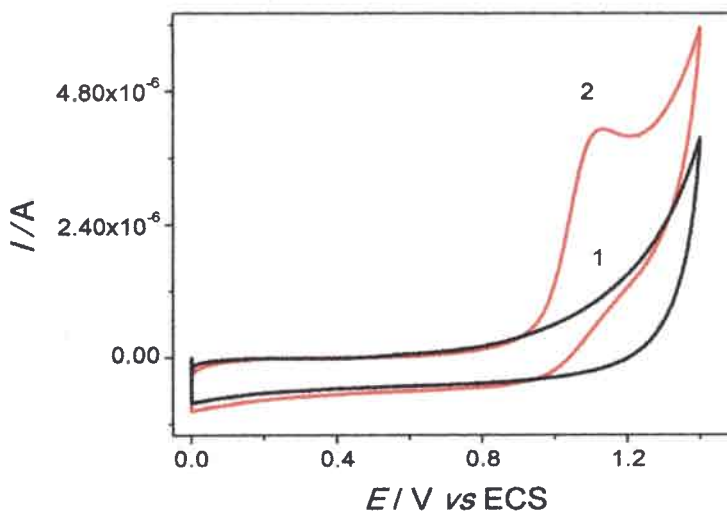
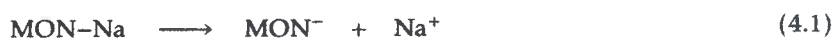


Figura 4.2. Voltamperogramas cíclicos en la zona anódica de la solución de (1) SAF y (2) MON en SAF. $c_{MON}^* = 8,3 \times 10^{-5} M$. $v = 0,050 V s^{-1}$.

Se asume que el grupo enolato se forma como consecuencia de la alta solubilidad de MON, como sal de sodio, en medio acuoso, disociación que puede ser planteada de la siguiente manera:



4.1. Comportamiento electroquímica de MON

Los primeros estudios sobre la respuesta electroquímica de MON se llevaron a cabo en medio acuoso neutro y sobre un electrodo de carbono vítreo empleando las voltamperometrías cíclica y de onda cuadrada. Esto permitió obtener un panorama general del comportamiento electroquímico de la micotoxina, sobre el cual se plantearon posteriores experiencias a diferentes valores de pH y sobre diferentes superficie del electrodo. Las experiencias a diferentes pH se realizaron preparando las soluciones de trabajo en soluciones reguladores de pH 7 y pH 10 para los medios neutro y básico y, ácido perclórico 1 M para el medio ácido. Por otro lado, también se utilizaron electrodos como platino (Pt) y carbono pirolítico altamente orientado (CPAO). Finalmente, por VOC se construyó una curva de calibración de MON en medio acuoso neutro sobre un electrodo de carbono vítreo, la cual según nuestro conocimiento, es la primera metodología electroanalítica para la cuantificación de MON.

4.1.1. Moniliformina en medio neutro

Mediante el uso de la voltamperometría cíclica, se dieron inicio a los estudios electroquímicos de MON. Para ello, se utilizó una celda de tres electrodos, electrodos de carbono vítreo, CPAO, platino y oro como electrodos de trabajo (pre-tratamientos mencionados en el Sección 3.2.2), un electrodo de platino de gran área como electrodo auxiliar y un electrodo de calomel saturado acuoso como electrodo de referencia. La solución de trabajo se preparó adicionando una alícuota de la solución patrón de MON en solución amortiguadora de fosfato pH 7 hasta obtener una concentración de $8,3 \times 10^{-5}$ M. Posteriormente, se realizaron experimentos mediante VOC utilizando electrodos de trabajo de CV y CPAO.

Electrodo de carbono vítreo

Los primeros estudios se realizaron sobre el electrodo de carbono vítreo (CV) en una solución amortiguadora de fosfato pH 7 (SAF) en ausencia de MON, lo que permitió asegurar no tener ninguna respuesta electroquímica por parte del solvente que pudiera interferir con la descarga de MON. Así, los primeros barridos se realizaron en la zona catódica en ausencia y en presencia de MON (Figura 4.1, sin presentar ninguna tipo de respuesta electroquímica hasta valores cercanos a $-1,5$ V vs ECS. Cabe destacar que para el registro de los voltamperogramas cíclicos en estas zonas de potencial, fue necesario un burbujeo de N_2 por más tiempo de lo habitual, a efectos de desoxigenar cuidadosamente la solución.

4

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE MON EN MEDIO ACUOSO

A continuación se discuten los resultados obtenidos durante el estudio electroquímico de MON en medio acuoso y aquellos estudios complementarios logrados por espectrofotometría UV-Vis.

3.3. Equipos

3.3.1. Potenciostatos

Las medidas electroquímicas fueron llevadas a cabo utilizando potenciostatos AutoLab PGSTAT12, PGSTAT101 y Micro–AutoLab PGSTAT 101 (Eco–Chemie, Utrecht, The Netherlands) comandados por el software NOVA 1.11.0, de Metrohm AutoLab. Además, todas las medidas se realizaron a una temperatura aproximada de 25 °C y dentro de una caja de Faraday para evitar señales de ruido indeseadas.

Particularmente, para las experiencias de alta velocidad de barrido de potencial, fue necesario el montaje de un equipo que permitiera llegar a velocidades mayores que los equipos convencionales. Este montaje consta de un generador de onda PARC 175, que proporcionó el programa de potencial aplicado, un potenciostato PAR 273 que aplicó el programa generado con el PARC 175 a la celda de trabajo y registró la respuesta en corriente y, un osciloscopio digital 54603B marca HP de doble canal para visualizar y almacenar los voltamperogramas. Instrucciones más detalladas del equipamiento y la operación del módulo de alta velocidad de barrido están contenidas en el Apéndice E.

3.3.2. Espectrofotómetros

Como técnica complementaria a las experiencias electroquímicas se utilizó la espectrofotometría UV–Vis. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro UV–Vis, Hewlett Parckard, modelo HP8453. Las celdas de cuarzo utilizadas tuvieron 1 cm de paso óptico.

3.3.3. Cromatógrafos

El cromatógrafo utilizado fue un Hewlett Packard HPLC, Serie 1100, con detector UV visible. La metodología empleada para la determinación de MON por HPLC fue la propuesta por Krska y col [86]. Para ello, se utilizó una columna Hypersil C18 (150 x 4,2 mm, 5 μ m; Phenomenex) con una pre–columna ODS–Hypersil (20 x 2,1 mm, 5 μ m; Phenomenex). La velocidad de flujo fue de 1 mL por minuto y un volumen de inyección de 50 μ L. La longitud de onda para la detección fue de 227 nm.

Pt, Hg y solución sobresaturada de KCl, como se indica en la Figura 3.5.

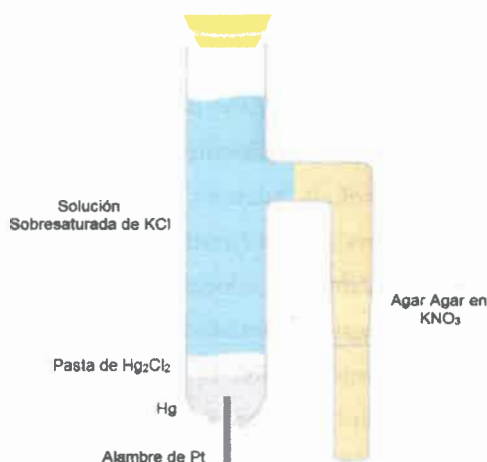


Figura 3.5. Esquema de un electrodo de calomel saturado (ECS).

El desprendimiento lateral es un puente salino formado por una solución de Agar-Agar al 3% en KNO_3 0,1 M, el cual proporciona un contacto eléctrico efectivo entre la solución y el sistema de referencia (más detalles sobre como se prepara este electrodo están en el Apéndice C). Una vez elaborado el electrodo, se deja en reposo durante 24 horas y se mide su potencial con respecto de un electrodo estándar de hidrógeno (ESH). La diferencia de potencial fue de $\approx 0,222$ V vs ESH a 25 °C y mantenido constante durante todos los experimentos [157].

Electrodos de Ag/AgCl y Ag/Ag⁺: ambos electrodos fueron adquiridos de BAS (Bioanalytical Systems Inc.). El electrodo de Ag/AgCl fue utilizado como referencia para las experiencias en medio acuoso y el electrodo de Ag/Ag⁺ en las experiencias en medio no acuoso (ACN). Ambos electrodos constan de un alambre de Ag sumergido en una solución. Dicha solución es NaCl 3 M para el electrodo de Ag/AgCl y ACN + HFFTBA 0,1 M + 10 mM de AgNO_3 para el electrodo de Ag/Ag⁺. Los electrodos tuvieron un seguimiento constante para evitar cambios inesperados en sus potenciales. Véase el Apéndice D para más detalles acerca del armado y mantenimiento de estos electrodos.

Electrodos auxiliares o contraelectrodos (CE)

Varios modelos de electrodos auxiliares fueron usados durante todo el estudio electroquímico realizado a la micotoxina MON. En todo caso, siempre se mantuvo la condición de que sus áreas efectivas fueron casi 200 veces más grande que el área del electrodo de trabajo usado. La forma de dichos electrodos dependía de la celda electroquímica usada. Así, se usaron electrodos en forma de espiral o chapa de platino para todos los experimentos electroquímicos, excepto para la electrólisis a potencial controlado en donde se usó una chapa de acero inoxidable.

electrodo con el sólo pulido tradicional. Cabe destacar que cuando se habla de carbono vítreo (CV), se está hablando de este electrodo pre-tratado.

Electrodo de platino, Pt: algunas medidas fueron realizadas utilizando un electrodo de Pt policristalino. Este electrodo BAS (Bioanalytical Systems Inc.) tiene las mismas características físicas que el electrodo de carbono vítreo, es decir, un disco de Pt de 3 mm de diámetro embebido en un cuerpo de teflón. Su pre-tratamiento consistió en el pulido mecánico de la superficie con alúmina húmeda de 0,3 y 0,05 μm de tamaño de partícula. Luego, se activa electroquímicamente realizando voltamperogramas cíclicos sucesivos del electrodo en una solución de H_2SO_4 0,5 M hasta obtener un voltamperograma típico y estable de un electrodo de Pt en estas condiciones [100].

Electrodo de oro, Au: fueron utilizados electrodos de disco de oro policristalino CH Instrument, Inc. con iguales características a los ya mencionados, un cuerpo de teflón el cual tiene embebido un disco de oro policristalino de 2 mm de diámetro. El pre-tratamiento realizado consistió de un pulido mecánico suave sobre alúmina húmeda de 0,3 y 0,05 μm de tamaño de partícula y posterior lavado con agua. Seguidamente, se sumergieron en solución piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$, 3:1) por 1 minutos y, luego, fueron lavados con abundante agua tridestilada. Finalmente, fueron activados electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica, en soluciones de H_2SO_4 0,5 M, empleando una ventana de potencial comprendida entre -0,2 y 1,7 V *vs* pseudo-ENH, a una velocidad de barrido de 1 V s^{-1} durante 250 ciclos. Este proceso fue repetido tantas veces como fue necesario hasta obtener un voltamperograma cíclico característico de un electrodo de oro limpio, registrado a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ [100]. El área de los electrodos de oro fue determinada a través de la carga catódica del pico de reducción de los óxidos formados en estas condiciones [155]. El valor del área de los electrodos estuvo alrededor de los $0,17 \pm 0,03 \text{ cm}^2$. El factor de rugosidad fue cercano a $5,4 \pm 0,7$ y mantenido constante durante todos los experimentos [156]. EL procedimiento para determinar tanto el área electroquímica como el factor de rugosidad está descrito en el Apéndice B.

Electrodo de carbono pirolítico altamente orientado, CPAO: este electrodo fue obtenido como donación del Dr. R. Compton, Universidad de Oxford. El acondicionamiento de este electrodo fue muy similar al realizado para el electrodo de carbono vítreo. Primero, se pulió mecánicamente sobre una felpa con pasta de diamante, BAS (Bioanalytical Systems Inc.). Posteriormente, se lavó con abundante agua y el solvente del mismo experimento.

Ultramicroelectrodos de fibra de carbono, UME-FC: este electrodo consta de una fibra de carbono embebida en un cuerpo de vidrio, de un diámetro de 11 μm . Su pre-tratamiento consistió de un pulido mecánico sobre una lija de granulometría ultrafina y lavado con abundante agua tridestilada.

Electrodos de referencia, ER

Electrodo de calomel saturado, ECS: se construyó un ECS, el cual consta de un compartimiento principal y un desprendimiento lateral. En el compartimiento principal se encuentra una pasta de Hg_2Cl_2 ,

Celda electroquímica para bajos volúmenes o microcelda

Para poder realizar experiencias a altas concentraciones de MON, del orden de 1×10^{-3} M, fue necesario el uso de una microcelda que permitieran usar bajos volúmenes de solución de trabajo (Figura 3.4).

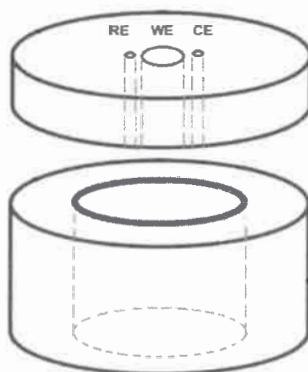


Figura 3.4. Esquema de una microcelda.

Esta celda está hecha de teflón para que se pueda trabajar tanto con soluciones acuosas como no acuosas. Su único compartimiento contiene el electrodo de trabajo, un alambre de Pt en forma de espiral como contra electrodo y un alambre de Ag como pseudo referencia. El volumen de trabajo es de $\approx 200 \mu\text{L}$.

3.2.2. Electrodos

Electrodos de diferente naturaleza fueron utilizados durante el estudio electroquímico de MON. Los electrodos de trabajo fueron sometidos a un pre-tratamiento acorde a su naturaleza y al experimento a realizar. Los electrodos auxiliares y de referencia fueron acondicionados cada cierto período de tiempo.

Electrodos de trabajo (ET)

Electrodo de carbono vítreo, CV: gran parte de los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo con un electrodo de carbono vítreo, BAS (Bioanalytical Systems Inc.). Este electrodo consta de un cuerpo cilíndrico de teflón, de 3,5 cm de largo, el cual tiene inserto un disco de carbono vítreo, de aproximadamente 3 mm de diámetro. Su área, determinada electroquímicamente fue de $0,089 \text{ cm}^2$ (el procedimiento está descrito en el Apéndice A). El pre-tratamiento realizado antes de cada medida consistió en un pulido mecánico sobre una felpa con alúmina húmeda de 0,3 y $0,05 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula. Seguidamente, se lavó con abundante agua y se sonicó por 30 segundos para retirar restos de alúmina. Finalmente, se realizaron barridos de potencial consecutivos en un intervalo de potencial entre 0,3 y 1,5 V a $0,050 \text{ V s}^{-1}$ durante 5 ciclos en una solución de SAC, SAF, SAA o ACN más HFFTBA 0,1 M, según fue el caso. Al realizar éste último procedimiento, luego del acondicionamiento regular con alúmina, se obtuvo un óptimo electrodo de carbono vítreo pre-tratado, el cual, está en mejores condiciones que un

tiene una salida lateral para la desoxigenación y para realizar el muestreo de la solución durante la electrólisis.

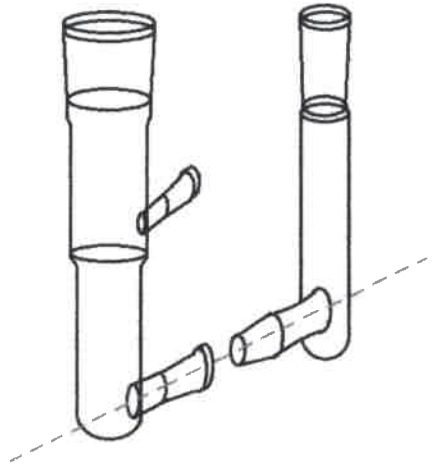


Figura 3.2. Esquema de celda electroquímica de dos compartimientos utilizada para la electrólisis a potencial controlado.

Celdas electroquímicas de un sólo compartimiento

Las celdas de un sólo compartimiento se usaron para las experiencias llevadas a cabo con los electrodos de oro modificados con las MAE. Estas celdas, BAS (Bioanalytical Systems Inc.), permiten el uso de los tres electrodos en el mismo compartimiento, sujetados mediante una tapa de teflón propia de la misma marca (Figura 3.3). Además, su fondo plano permite el uso de magnetos para sistemas agitados. Su volumen de trabajo mínimo es de 3 mL.



Figura 3.3. Esquema de una celda de un compartimiento marca BAS.

3.2. Materiales

3.2. Materiales

3.2.1. Celdas electroquímicas

Varios modelos de celdas electroquímicas fueron empleados durante los estudios básicos y las determinaciones electroanalíticas de MON. Se usaron tanto celdas de dos compartimientos como de uno sólo y, para los estudios a altas concentraciones, se utilizaron microceldas.

Celdas electroquímicas de dos compartimientos

Para las experiencias de voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría de onda cuadrada (VOC) se utilizaron celdas de vidrio de dos cuerpos, como se muestra en la Figura 3.1. El compartimiento más grande se utiliza como celda de trabajo, ya que es donde se ubica el electrodo de trabajo y el contra electrodo, los cuales se encuentran enfrentados y a la misma altura que el capilar de Luggin que proviene del otro compartimiento. Tanto el electrodo de trabajo como el contraelectrodo se encuentran sujetos a una tapa de teflón. Esta tapa también posee un orificio por donde ingresa una manguera de teflón y otro que sirve como salida del gas circulante. El otro compartimiento se deja para el electrodo de referencia. Ambos cuerpos están unidos mediante un capilar de *Luggin-Haber*, el cual impide, en gran parte, el paso de algún tipo de residuo proveniente del electrodo de referencia, sin contribuir significativamente a la resistencia de la solución [153, 154].

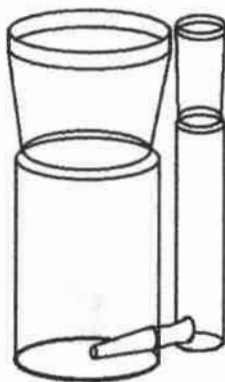


Figura 3.1. Esquema de una celda electroquímica de dos compartimientos.

Celda electroquímica de dos cuerpos para electrólisis a potencial controlado

La celda utilizada para electrólisis a potencial controlado es una celda convencional de vidrio de dos cuerpos, fabricada especialmente para ser adaptada al dispositivo del electrodo rotatorio Autolab RDE (Figura 3.2). El compartimiento principal tiene un volumen de trabajo de 5 mL y, allí, se encuentran tanto el electrodo de trabajo rotatorio como el pseudo referencia (alambre de Ag). En el segundo compartimiento está el contra electrodo. En medio de la unión esmerilada entre los dos compartimientos se coloca papel de fibra de vidrio, el cual permite el paso de la solución, pero retarda la difusión de las especies generadas en el contra electrodo hacia el compartimiento del electrodo de trabajo. Además,

3.1.6. Muestras reales

La determinación de MON en muestras reales se llevó a cabo utilizando muestras de maíz provistas por el grupo de la Dra. Sofía Chulze, Departamento de Microbiología e Inmunología, FCEFQyN, UNRC, las cuales fueron preparadas de la siguiente manera:

Como sustrato se utilizó maíz amarillo entero para la producción de la micotoxina MON inoculado con la cepa *Fusarium temperatum* RCFT914 [150]. El sustrato se preparó colocando 50 g de maíz esterilizado mediante irradiación gamma (1200 krads) en un erlenmeyer estéril de 250 mL e hidratado a un 40% de humedad con agua destilada estéril [151]. Se realizó una suspensión de conidios de cada cepa proveniente de un cultivo monospórico de 7 días de crecimiento en AHC (agar hojas de clavel) o SNA (*spezieller nährstoffarmer agar*) [152], y se inoculó el sustrato. Las muestras se incubaron durante 28 días, a 25°C en la oscuridad. Luego del periodo de incubación, las muestras se secaron a 60°C por dos horas en estufa de aire forzado y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento. El maíz seco se molió hasta obtener partículas finas, y se procedió a la extracción de la toxinas según cada metodología.

Además de la muestra de maíz contaminada con MON, otra muestra de maíz amarillo del mismo lote y esterilizado bajo las mismas condiciones, fue pulverizado y utilizado como control negativo, ya que esta muestra está libre de la toxina.

La preparación de las muestras reales se realizó siguiendo la metodología propuesta por Krska y col. [86]. Para ello, se utilizaron las dos muestras de maíz antes mencionadas, las cuales se les llamó M1 a la muestra de maíz contaminada "ex profeso" y B1 a la muestra control negativo. El procedimiento que se describe a continuación fue realizado tanto a la muestra M1 como a B1:

A 10 gr de la muestra de maíz, previamente molidos, se le realizó una extracción con una mezcla de solvente ACN/H₂O (84:16) mediante agitación constante por 30 minutos. Pasado este tiempo, se filtraron las soluciones con papel Whatman de alta retención y se llevaron a rota-evaporación (50 °C, 300–40 mbar) hasta evaporar todo el ACN. Una vez evaporado el ACN de las muestras originales, las muestras fueron re-suspendidas dos veces con 2 mL de metanol y pasadas a través de las columnas SAX (columnas de intercambio aniónico fuerte), previamente acondicionadas mediante la adición de 2 mL de metanol, 2 mL de agua y 2 mL de ácido fosfórico 0,1 M. Luego de que las muestras fueron pasadas por las columnas, dichas columnas fueron lavadas con 2 mL de ácido fosfórico 0,1 M y 2 mL de agua. Finalmente, MON fue extraída de la columna como el par iónico MON-tetrabutilamonio mediante la adición de 2 mL de una solución par iónica/agua 1:1. La solución par iónica fue preparada con 50 mL al 20% de hidróxido de tetrabutilamonio más 100 mL de fosfato diácido de sodio 1,1 M, ajustando luego el pH a 7. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de 8 °C.

do a 10 mL con el solvente para obtener una solución de concentración $8,3 \times 10^{-4}$ M. Dichas soluciones fueron almacenadas a 4 °C y protegidas del contacto directo con la luz. A partir de estas soluciones, se prepararon diariamente las soluciones de trabajo a diferentes concentraciones y en distintos medios.

Para el caso de los estudios realizados en medios acuosos, se prepararon soluciones de trabajo tanto en agua como en soluciones amortiguadoras de diferentes valores de pH. Las soluciones amortiguadoras fueron de citrato (SAC) pH 4, de fosfato (SAF) pH 7 y de amoníaco (SAA) pH 10, todos Merck p.a. Debido a que son soluciones con marca registrada, no es posible conocer su concentración. El agua utilizada para preparar las soluciones patrón y de trabajo fue de calidad Milli-Q ($\approx 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25 °C).

Para el medio no acuoso, las soluciones de trabajo fueron preparadas siempre en ACN más el electrolito soporte. Para algunos estudios, se adicionaron otras sustancias como ácido trifluoroacético (TFA-H) e hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH).

3.1.4. Electrolitos soporte

En todas las experiencias electroquímicas se utilizó como electrolito soporte para el medio no acuoso el hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (HFFTBA), Fluka. El HFFTBA fue secado previamente en una estufa de vacío durante 24 horas a 60 °C. Luego, se almacenó en condiciones de vacío y ambiente seco en un desecador. La concentración utilizada fue 0,1 M.

En las soluciones de trabajo preparadas con soluciones amortiguadoras no es necesario la adición de un electrolito soporte, ya que en éstas satisfacen las condiciones de fuerza iónica y de relación de concentración electrolito/cupla redox (> 100) necesarias para ser un electrolito soporte ideal [104].

3.1.5. Tioles

Para la modificación de los electrodos de oro con monocapas autoensambladas, se utilizaron los siguientes tioles (Tabla 3.1), adquiridos de Sigma-Aldrich:

Tabla 3.1. Tioles empleados para la preparación de las MAEs sobre los electrodos de oro.

Nombre	Fórmula	PM / g mol ⁻¹
Cisteamina (CA)	SH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	77,15
2-(dietilamino)etanotiol (2-DAET)	SH-(CH ₂) ₂ -N(CH ₂ -CH ₃) ₂	169,72
4-mercaptopiridina (4-MP)	SH-C ₅ H ₄ N	111,17
4-aminotiofenol (4-ATF)	SH-C ₆ H ₄ -NH ₂	125,19

Dada las propiedades higroscópicas de los tioles, éstos fueron guardados en condiciones de vacío y ambiente seco. Las soluciones de tiol fueron preparadas diariamente en EtOH, Sintorgan, grado HPLC, a diferentes concentraciones y almacenadas durante la modificación en recipientes de color ámbar.

Una de las principales características experimentales de las técnicas electroquímicas, es la sensibilidad a la detección de sistemas redox ajenos al sistema de interés, los cuales, en la mayoría de los casos, interfieren durante el desarrollo de un estudio electroquímico. Esto implica que las experiencias electroquímicas sean realizadas bajo altos estándares de limpieza para poder obtener resultados confiables y reproducibles. Bajo esta premisa, los reactivos y materiales aquí mencionados fueron utilizados en su más alto grado de pureza y en las mejores condiciones de limpieza posible. Además, durante la mayoría de las experiencias electroquímicas, las soluciones de trabajo fueron desoxigenadas con nitrógeno o argón de alta pureza y las celdas electroquímicas fueron mantenidas bajo atmósfera inerte.

3.1. Reactivos

3.1.1. Moniliformina

La micotoxina moniliformina (MON) fue adquirida como la sal de sodio de *Fusarium proliferatum*. Su presentación es 1 mg de un polvo amarillo con un 98% de pureza y que debe ser almacenado entre 2–8 °C y protegido de la luz directa. Cuenta con una solubilidad en agua de 9,8–10,2 mg / mL. Su estabilidad como sólido puro es de 3 años y en solución acuosa es de al menos 6 meses [149].

3.1.2. Solventes

Los solventes utilizados en los experimentos electroquímicos fueron acetonitrilo (ACN) y etanol (EtOH), ambos Sintorgan, grado HPLC. El ACN, usado para llevar a cabo todas las medidas en medio no acuoso, tuvo un tratamiento previo a las medidas electroquímicas y preparación de las soluciones patrones, el cual consistió en un proceso de secado mediante tamices moleculares. Los tamices moleculares de, 3 Å, Merck, fueron lavados con agua tridestilada y, posteriormente, secados primero en estufa a 100 °C y luego en una mufla a 300 °C por 72 horas. Luego, se colocaron en un recipiente perfectamente limpio y se adicionó el ACN. El recipiente fue sellado herméticamente y puesto en reposo durante 48 horas, previo a la utilización del ACN. Bajo estas condiciones, se realizaron voltamperogramas cíclicos del blanco, utilizando un electrodo de carbono vítreo como electrodo de trabajo, una chapa de Pt de gran área como contraelectrodo y, como electrolito soporte, hexafluorofosfato de tetrabutilamonio 0,1 M. Se obtuvieron límites anódicos y catódico de potencial, frente al electrodo de Ag/Ag⁺, de 1,5 y –2 V, respectivamente, a una velocidad de barrido de 0,1 V s⁻¹.

Por su parte, los solventes utilizados, tanto para la preparación de las muestras reales de MON como para las medidas cromatográficas, fueron ACN y metanol (MetOH), Sintorgan, grado HPLC. En ambos procedimientos, también se usaron otras sustancias como, fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), hidróxido de tetrabutilamonio (TBA–OH) y ácido fosfórico (H₃PO₄), todos Merck p.a.

3.1.3. Soluciones

Para las experiencias electroquímicas se prepararon soluciones patrones de MON, tanto en medio acuoso como no acuoso. En ambos casos, las soluciones se prepararon tomando 1 mg de MON y diluyen-

3

ASPECTOS EXPERIMENTALES

Descripción de los materiales y procedimientos más relevantes del desarrollo experimental llevado a cabo en el estudio electroquímico básico, la preparación de los electrodos de oro modificados con MAE de tioles y su aplicación para la detección de moniliformina en muestras reales.

ción consiste en la inmersión de un sustrato en una solución etanólica o acuosa de tiol durante determinado tiempo, que pueden ser horas o días [144, 147].

- c) **Electrodeposición:** esta metodología permite la deposición de una monocapa de manera controlada y con un alto nivel de reproducibilidad. Consiste en la aplicación de un potencial al sustrato inmerso en la solución de tiol por un determinado tiempo. La cantidad de tiol depositado es una función del tiempo durante el cual se aplica el potencial [104, 148].

Existe poca información que relacione la impureza del tiol con el proceso de formación de una monocapa. Se conoce que las impurezas de un tiol son compuestos disulfuros que se producen por procesos de oxidación, pero que estos productos no impiden o alteran la formación de la monocapa. De igual manera, algunos autores informan procedimientos de purificación como la recristalización o la destilación [142].

Solvente de deposición

El solvente más usado para la preparación de una MAE de tiol es el etanol. La elección de este solvente, hasta ahora, no tiene una justificación basada en el desempeño para formar una monocapa, si no, más bien, en hechos meramente prácticos como su débil olor, su baja toxicidad y su disponibilidad en la forma más pura. La elección del solvente se hace crítica cuando se pretende formar MAE mixtas, ya que la formación de la monocapa está en función del solvente, como también de la composición de la solución de modificación [143].

Concentración del tiol y tiempo de deposición

Estos dos parámetros están inversamente relacionados: bajas concentraciones de tiol requieren de largos tiempos de deposición y viceversa. Como se dijo anteriormente, la densidad calculada para una monocapa es de $4,63 \times 10^{14}$ cadenas cm^{-2} , lo que significa que la concentración mínima de tiol para formar una monocapa es $1 \mu\text{M}$. Pero a este nivel de concentración, las monocapas presentan muchos defectos y problemas en el autoensamblado, por lo que experimentalmente se usan concentraciones de tiol desde 1 mM y tiempos de al menos 12 o 18 horas de modificación [144].

Otras consideraciones

Existen otros aspectos experimentales menos críticos o influyentes en la preparación de las MAE de tioles, los cuales pueden ser igualmente considerados para el buen desarrollo del autoensamblado. Uno de ellos es el contenido de oxígeno en la solución de deposición, el cual, al ser eliminado de la solución mediante el burbujeo de un gas inerte y manteniendo, además, una atmósfera inerte durante el período de deposición, mejora el autoensamblado y su reproducibilidad. También se recomienda que durante el período de deposición, la solución no esté en contacto con la luz y la temperatura esté alrededor de los $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Todas las consideraciones anteriores se realizan a fin de evitar la oxidación de los tioles, ya que muchos de ellos son fotosensibles, higroscópicos o tienen bajo punto de fusión [134, 136, 144].

En base a las consideraciones previas, a continuación se puede enunciar las metodologías empleadas para la preparación de una MAE de tioles sobre electrodos de oro:

- a) **Deposición espontánea por fase de vapor:** este procedimiento se realiza mediante la deposición de tioles en ultra alto vacío (UHV) o a presión ambiente, a altas temperaturas, para la obtención de monocapas densamente empaquetadas [145, 146].
- b) **Deposición espontánea por fase líquida:** es la metodología más empleada para la formación de MAE de tioles, dada su simpleza experimental y los buenos resultados obtenidos. Esta deposi-

aumentará la conductividad respecto de las cadenas alquílicas saturadas [140].

Sin embargo, Mokrani y col., determinaron que también existe otro tipo de procesos por los que se puede dar la transferencia de carga a través de una MAE. A partir de estos estudios, realizados con MAE de (3-mercaptopropil) sulfonato, propusieron que la transferencia de carga puede producirse por: el efecto túnel ampliamente estudiado; efecto de membrana, dado por la permeabilidad y difusión de las especies redox a través de la monocapa; o por huecos o defectos en la monocapa que permite una transferencia directa entre la especie redox y la superficie del electrodo [141] (Figura 2.29).

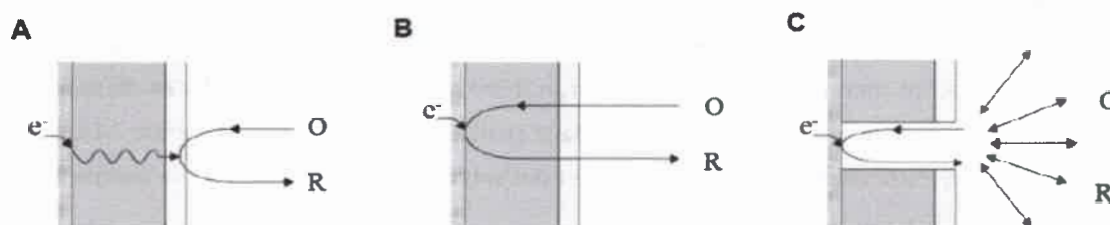


Figura 2.29. Representación de los posibles modelos de transferencia de carga a través de una monocapa autoensamblada para un sistema redox simple. (A) Efecto túnel, (B) efecto de membrana y (C) huecos.

Todos estos modelos pueden variar dependiendo de la longitud de la cadena carbonada o del tipo de grupo terminal que conforme el tiol.

Métodos de preparación de monocapas autoensambladas de tioles

Existen diversas metodologías para la preparación de un electrodo modificado con MAE de tioles. Estos procesos pueden ser tanto mecánicos, químicos como electroquímicos. No obstante, en el primer paso para la obtención de una monocapa de excelentes características y alta reproducibilidad, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos:

Limpieza de la superficie: La fuerte afinidad del azufre por el oro implica que el material que está débilmente adsorbido sobre la superficie puede ser fácilmente desplazado cuando se produce el autoensamblado. Es por esto que, en muchos casos, no es necesario llevar a cabo procedimientos de limpieza o simplemente, un leve pulido será suficiente. A pesar de esto, se han desarrollado varios métodos de limpieza para asegurar el buen ensamblado de un monocapa. Cuando se trata de electrodos de oro monocristalinos, se ha informado el uso de "sputtering" al vacío, calentamiento de la superficie, inmersión en soluciones altamente oxidantes o exposición a radiación UV en presencia de argón, oxígeno u ozono. Para electrodos policristalinos, los procedimientos de limpieza son mucho más rápidos y sencillos, entre ellos está sonicar el electrodo en un solvente orgánico, sumergirlo en una solución altamente oxidante como lo es la solución piraña (H_2SO_4 / H_2O_2 , 3:1) o, simplemente realizar voltamperogramas cíclicos sucesivos en una solución de H_2SO_4 diluida ($\approx 0,5 M$) hasta obtener un voltamperograma típico de este electrodo en una solución ácida [102, 131].

Pureza del tiol

están completamente extendidas en una conformación en donde la mayoría de las cadenas tiene una conformación *all-trans*. Las inclinaciones de la cadena pueden variar desde los 30° y el valor de β estará cercano a 50° para alcanotioles en oro [134, 138]. Estos datos concuerdan con el empaquetamiento hexagonal $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$, donde las cadenas alquílicas están separadas entre sí unos $0,4995 \text{ nm}$, lo que significa un área por cadena alquílica de $0,216 \text{ nm}^2/\text{cm}^2$, es decir, una densidad de $4,63 \times 10^{14} \text{ cadenas cm}^{-2}$ [133].

Por su parte, las MAE preparadas sobre electrodos policristalinos presentan otro tipo de estructura, ya que la poca uniformidad de estas superficies lleva a que las monocapas estén más propensas a presentar más defectos. Los electrodos policristalinos presentan una variedad de pequeños dominios de diferentes caras y bordes cristalinos. La superficie como tal se compone de una capa continua de islas contiguas o granos diferentes, por lo que el comportamiento de un electrodo de este tipo representa un promedio que corresponde a los diferentes sitios y planos cristalinos.

Una monocapa autoensamblada de tiol formada sobre un electrodo de oro policristalino presenta dos regiones características: una región densamente empaquetada y otra que contiene defectos como bordes de grano, bordes de dominio, islas vacantes, sitios colapsados, huecos o defectos estructurales [139] (Figura 2.28).

Cabe aclarar que los defectos en una monocapa son causados por factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Es por esto que no se puede atribuir de forma directa la deformación de una monocapa a la naturaleza del electrodo o al tipo de tiol empleado ya que, en ello, existen otros factores como la limpieza del sustrato, la pureza del tiol o el método de preparación (extrínsecos), como también, la propia naturaleza de las MAE como sistema dinámico de comportamiento complejo (intrínsecos).

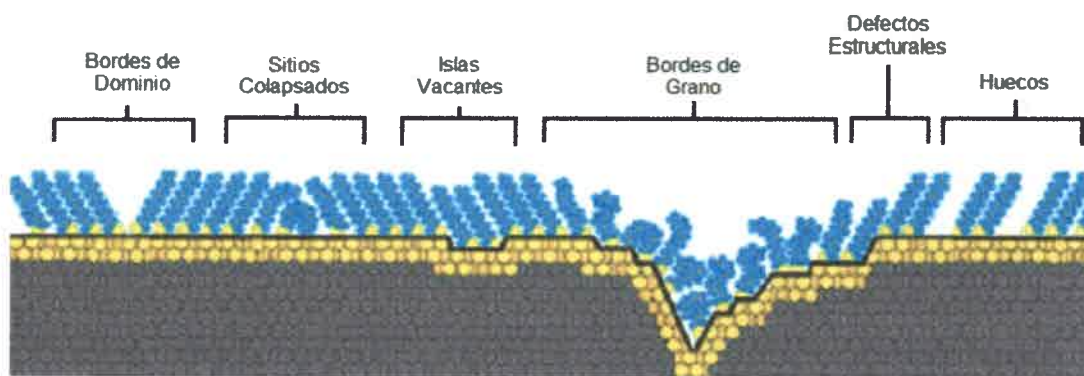


Figura 2.28. Representación esquemática de algunos de los defectos encontrados en una MAE formada sobre sustratos de oro policristalinos [134].

Procesos de electrodo sobre monocapas autoensambladas de tioles

La transferencia electrónica a través de una MAE está dada principalmente por efecto túnel, que se da cuando el nivel de Fermi del metal está dentro del gran *gap* que existe entre los orbitales HOMO-LUMO del alcanotiol ($>8 \text{ eV}$). Si la cadena carbonada presenta insaturaciones, éstas podrán solapar sus orbitales π a través de toda la conjugación y crear una deslocalización del estado electrónico que

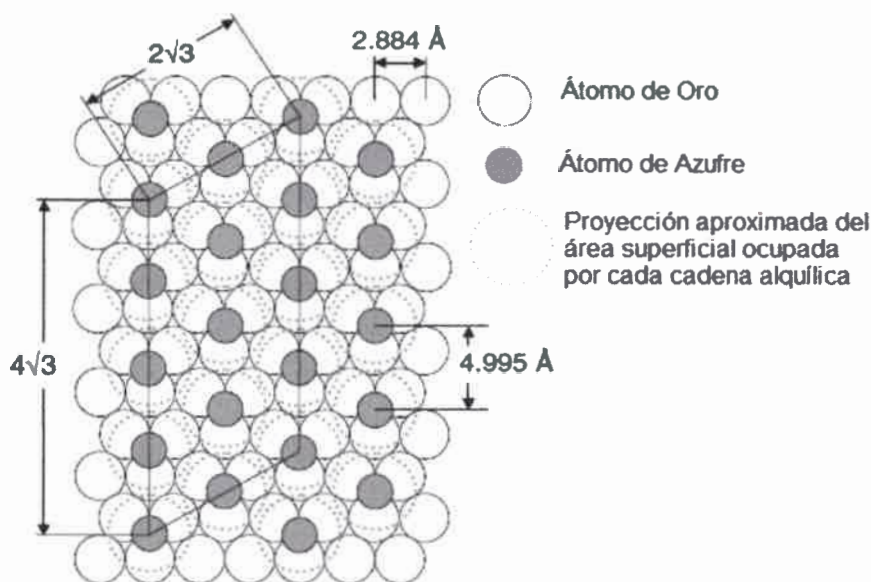


Figura 2.26. Diagrama de una MAE de alcanotiol sobre Au(111) con un recubrimiento máximo. Modelo estructural de la capa mostrando una celda unidad $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ y la distancia entre los átomos de Au y S.

Otra forma de entender la estructura de una MAE es usando el modelo de *Cadena Simple*, el cual describe la organización promedio de las cadenas organosulfuradas sobre la superficie. Este modelo describe la orientación de las moléculas de una MAE bajo dos parámetros: el ángulo de inclinación de la cadena carbonada respecto de la superficie (α) y el ángulo de rotación sobre el eje de la cadena carbonada (β) (Figura 2.27–A).

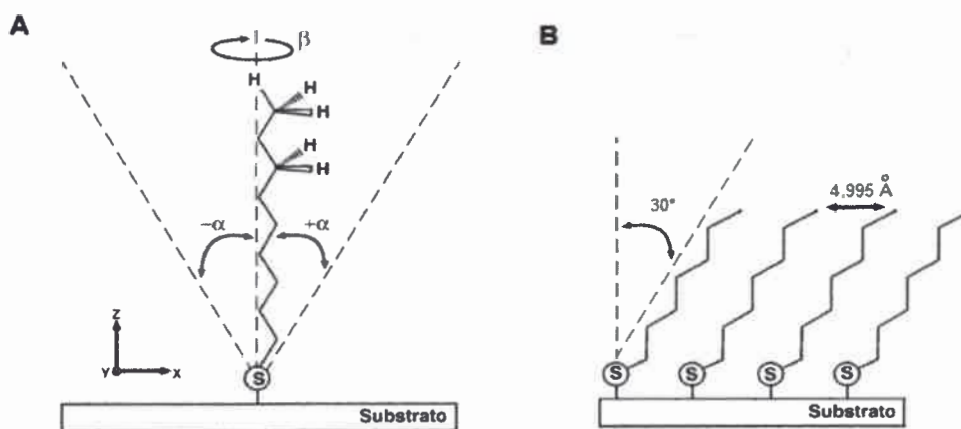


Figura 2.27. (A) Esquema de modelo de Cadena Simple para un alcanotiol sobre una superficie de oro. (B) Vista lateral de una MAE en donde se esquematiza la distancia entre las cadenas tioladas y el ángulo al cual se conforman.

En las MAE, las cadenas de tioles alcanzan una estructura cuasi-cristalina, en donde las cadenas

Debe observarse que, en la relación propuesta, la especie que se adsorbe sobre el oro es un alcanotiolato y que la principal fuerza impulsora es la fortaleza del enlace Au–S que se forma [135].

Características estructurales

El modelo de monocapa autoensamblada más utilizado deriva de la adsorción de alcanotioles sobre la superficie de electrodos de Au. Como se mencionó anteriormente, la interacción Au–tiol permite obtener estructuras altamente ordenadas, orientadas y empaquetadas. Sin embargo, factores como la longitud de la cadena carbonada, la naturaleza de los grupos terminales o el tipo de oro (policristalino o monocristalino), determinarán si una monocapa presenta sitios defectuosos, secciones colapsadas o huecos (pinholes) (Figura 2.25).

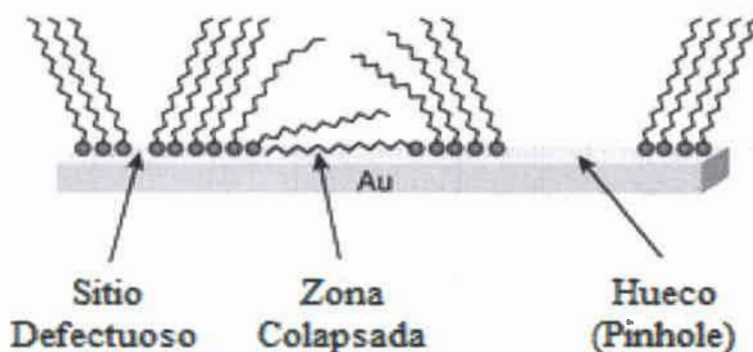


Figura 2.25. Representación de los defectos más comunes en las monocapas autoensambladas.

Dependiendo de la longitud del alcanotiol utilizado, se obtienen características estructurales diferentes. A medida que la longitud de la cadena se hace más pequeña, aumenta el desorden estructural y la densidad de empaquetamiento y el recubrimiento superficial se hace menor. Pero no sólo los grupos espaciadores afectan la estructura de una monocapa, los grupos terminales, que pueden ser grupos funcionales como $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, presentan interacciones entre ellos mismos, lo que resulta en un factor que afecta el ordenamiento y empaquetamiento de la monocapa. Así, cadenas carbonadas cortas con grupos funcionales voluminosos formarán monocapas menos densas y poco ordenadas.

Un factor importante en la estructura de una monocapa es la cristalinidad del oro. En el caso del Au(111), un gran número de estudios estructurales prueban que, sobre tales superficies, los alcanotioles forman una monocapa altamente ordenada y densamente empaquetada con las cadenas carbonadas orientadas en paralelo entre sí, con una inclinación de aproximadamente 30° respecto a los átomos de Au subyacentes. La estructura formada corresponde a un empaquetamiento hexagonal representado por $(\sqrt{3} \times \sqrt{3}) R 30^\circ$, donde 30° representa dicho ángulo de inclinación promedio y que la distancia tiol–tiol es $\sqrt{3}$ veces mayor que la distancia Au–Au. Aunque también hay evidencia que confirma que la organización adopta un orden secundario que corresponde a una super-red $c(4 \times 2)$ (Figura 2.26) [104, 136, 137].

como las ópticas.

Los "grupos terminales" son aquellos grupos funcionales que se encuentran en contacto con la solución, determinando en gran medida las propiedades superficiales de la monocapa. Es por esto que, dependiendo de la funcionalidad que se desee dar a la monocapa, se determinará que grupo funcional es el más indicado, ya que pueden ser desde grupos alquilo hasta grupos funcionales como haluros, alcoholes, aminas, carboxilos, etc. [132-134].

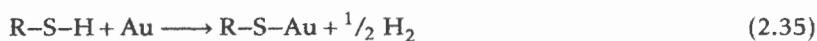
Desde sus comienzos en 1940, las monocapas autoensambladas han sido objeto de estudio y su interés ha crecido notablemente. En general, estos estudios han tenido dos objetivos fundamentales: estudiar la transferencia electrónica heterogénea a través de una interfase bloqueada por la monocapa, es decir, transferencia de electrones por efecto túnel, y el de diseñar electrodos modificados que actúen como sensores y/o base para biosensores en aplicaciones electroanalíticas. Este último se basa en que los electrodos modificados con MAE permiten controlar y estructurar la interfase sólido-líquido pudiendo aumentar la selectividad y sensibilidad y disminuir tanto los tiempos de respuesta como los sobrepotenciales. Este resultado se produce al bloquear el acceso directo de sustancias a la superficie del electrodo, inhibiendo algunos procesos pero promoviendo otros, lo que permite el estudio de reacciones electroquímicas que presentan sistemas adsorbidos [133].

Electrodos modificados con monocapas autoensambladas de tioles

La preparación de monocapas autoensambladas usando precursores organosulfurados (tioles, disulfuros o sulfuros) ha sido la metodología más estudiada para la modificación de los electrodos. Las primeras modificaciones basadas en organosulfurados pueden ser atribuidas a Allara y Nuzza, aunque los primeros reportes sobre esta metodología fueron realizados por otros grupos, entre ellos el de Whitesides y col. [131]. Sin embargo, a pesar de la capacidad de estos compuestos para formar monocapas sobre una gran variedad de sustratos, el sustrato de oro es el más empleado y más estudiado. Esto puede ser explicado dada la fuerte y espontánea unión que se da entre el oro y los tioles, la cual tiene una energía aproximada entre 40 a 50 kcal/mol. Otras razones que hacen al oro un sustrato ideal para la preparación de las MAE son: la facilidad con la que se pueden obtener sustratos en base de oro, ser un metal que no se oxida fácilmente a temperaturas por debajo de su punto de fusión (1064 °C), la compatibilidad con material biológico como las células y la facilidad con que se puede obtener dicha monocapa, ya que la simple inmersión de una superficie de oro en una solución de un compuesto organosulfurado, permitirá la formación instantánea de una monocapa de tioles.

Reacción de formación

La reacción de los alcanotioles puede ser considerada una adsorción oxidativa del enlace S-H a la superficie del oro, seguida de una eliminación reductiva del hidrógeno. Cuando se usa una superficie de oro limpia, el hidrógeno del grupo mercaptano se separa probablemente como una molécula de H₂:



2.4.1. Electrodo modificado con monocapas autoensambladas

Las monocapas autoensambladas (MAE) son una simple capa de moléculas empaquetadas y bien orientadas unidas a una superficie de manera espontánea. Una representación gráfica de una MAE se muestra en la Figura 2.24, la cual consiste de moléculas con grupos terminales, espaciadores y de anclaje fácilmente identificables, las cuales, están alineadas perfectamente sobre una superficie [131].

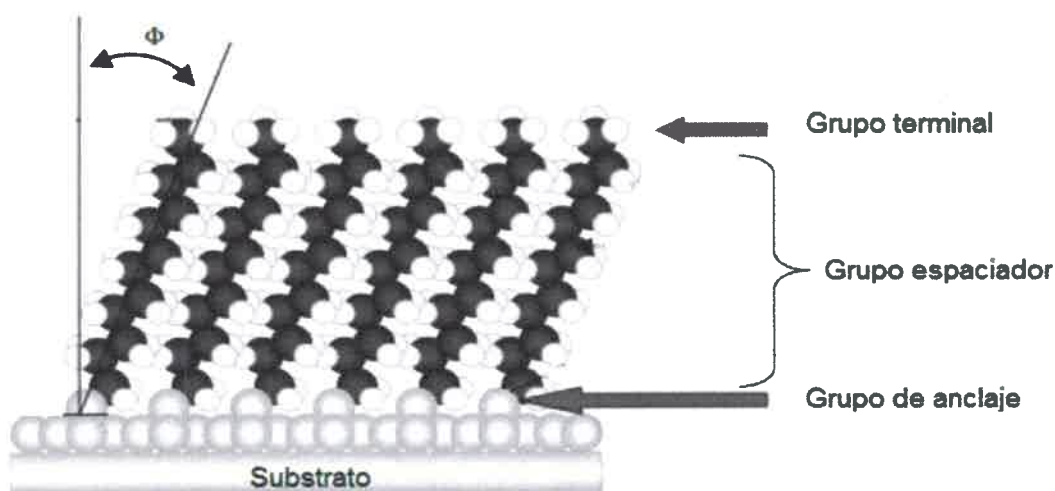


Figura 2.24. Representación de una monocapa autoensamblada ideal soportada sobre un sustrato.

La estructura de una MAE puede dividirse en dos tipos de sistemas organizados: los que se organizan en un sistema homogéneo y los que se organizan en un sistema heterogéneo. Entre los sistemas homogéneos tenemos la preparación de MAE sobre electrodos de gota de mercurio u otro metal líquido. Para los sistemas heterogéneos están las MAE de tioles sobre soportes de oro. También, las MAE se pueden identificar dependiendo del tipo de adsorción, en donde se encuentran las MAE que se formaron a través de la unión covalentemente uno a uno de cada molécula o las que fueron polimerizadas sobre el sustrato.

Existen numerosas opciones de sustratos para la preparación de una MAE. Desde una amplia variedad de metales como el Au, Ag, Pt, Pd, Cu y Hg, semiconductores como GaAs (III-V), InP, CdSe (II-VI) o ZnSe (II-VI), hasta óxidos de TI, Ba, Ca o Cu.

Por su parte, los grupos de anclaje son grupos funcionales que tiene una afinidad específica por un sustrato. Existe una amplia variedad de grupos de anclaje que se pueden unir específicamente sobre metales, óxidos de metales o semiconductores. No obstante, las MAE en base a tioles son las más estudiadas, ya que este grupo de anclaje presenta una gran afinidad por los metales nobles, lo cual permite generar estructuras definidas, compactas y bien orientadas.

Los "grupos espaciadores" que, por lo general, son cadenas alifáticas, constituyen la base estructural de una monocapa, la cual se organiza en base a las fuerzas laterales que existen entre ellos. Éstas, proveen un espesor bien definido, actúan como barrea y alteran tanto las propiedades de conductividad

das sobre su superficie, se ha producido un rápido desarrollo de esta metodología en el transcurrir de los años [129, 130]. Dichos avances, se han desarrollado tanto en las técnicas para la modificación de las superficies como en las metodologías que permiten inmovilizar diferentes sustratos sobre distintas superficies.

Los métodos utilizados para la preparación de electrodos modificados, pueden ser descritos de forma general o específica [129]

Métodos generales:

- Silanización
- Adsorción
- Recubrimiento de polímeros
- Reacciones sobre electrodos de carbono

Métodos específicos

- Superficies unidas covalentemente
- Recubrimientos adsorbidos
- Electrodos recubiertos de polímeros

Una vez que el electrodo ha sido modificado por cualquiera de los métodos antes mencionados, se debe saber si la superficie fue realmente modificada y saber, además, cuales son las nuevas propiedades y la estructura de esta nueva capa. Debido a que el material depositado está en cantidades muy pequeñas, es necesario emplear técnicas analíticas muy sensibles, tales como las técnicas electroquímicas o espectroscópicas. Pero, sin duda alguna, las técnicas de microscopía electrónica (AFM, STM, SEM etc.) son las ideales para determinar tanto la naturaleza como las propiedades de dichos depósitos.

Por otra parte, los electrodos modificados han sido utilizados en una gran variedad de áreas y bajo diferentes propósitos. En electrocatálisis, se estudia la modificación de electrodos de bajo costo (por ejemplo, de carbón) con monocapas que puedan catalizar la oxidación de hidrocarburos a CO_2 para las celdas de combustibles. En electroquimioluminiscencia, el desarrollo de pantallas ha llevado a que se construyan electrodos modificados con polímeros capaces de emitir luz, o cambiar de color, cuando éstos son reducidos u oxidados. En fotoelectroquímica, la superficie de los electrodos de una celda solar son modificados para prevenir la fotocorrosión a medida que la celda está trabajando. En electroanalítica, la modificación de los electrodos se realiza con el fin de poder dar, en cierta manera, una selectividad y actividad catalítica extra sobre algún sustrato en particular, como lo es el caso de la detección de oxígeno en la sangre a través de técnicas electroquímicas, en donde el electrodo está modificado con una pequeñísima capa de polietileno que restringe el acceso de moléculas más grandes que el oxígeno hacia la superficie del electrodo [128, 129].

En la Figura 2.23, se observa como la relación $\Delta\Psi_{p,n}/nW_{1/2}$ es prácticamente independiente de ΔE_e en el intervalo estudiado y que el valor $n\Delta E_{OC} = 50$ mV es el óptimo. Así, para un sistema electroquímico que involucre 1 electrón en su transferencia electrónica, los parámetros de onda cuadrada con mejor sensibilidad y resolución serán $\Delta E_{OC} = 50$ mV y $\Delta E_{OC} = 10$ mV.

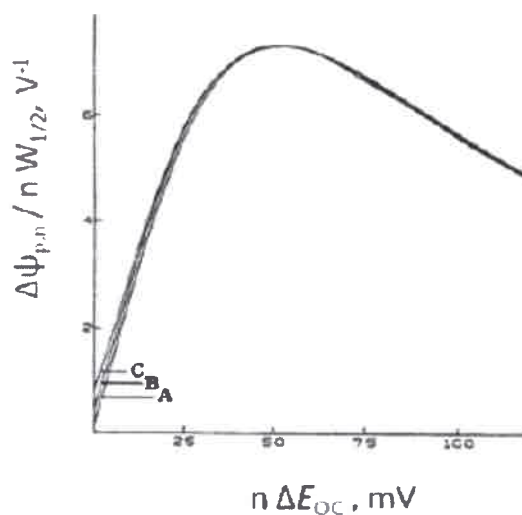


Figura 2.23. Relación entre la corriente de pico neta normalizada y ΔE_{OC} para $\Delta E_e = (A) 2,5 (B) 10$ y $(C) 25$ mV.

La voltamperometría de onda cuadrada, al igual que la voltamperometría cíclica, puede ser utilizada para el estudio de los diversos mecanismos electroquímicos que tienen lugar durante un proceso redox. Los criterios de diagnóstico y los parámetros de cada sistema desarrollados para la VOC, fueron propuestos por Osteryoung & O'Dea en 1987 los cuales siguen en vigencia [125].

2.4. Electrodo modificado

Cuando un electrodo de cualquier naturaleza es introducido en una solución acuosa, la superficie del electrodo es inmediatamente cubierta por una capa de moléculas de agua. Sin embargo, la solución puede contener impurezas que se pueden adsorber también a la superficie del electrodo, cambiando así sus propiedades electroquímicas. Por ejemplo, una impureza adsorbida sobre el electrodo, hace que la corriente observada durante un dado proceso electroquímico sea mucho menor a la esperada, debido a que la impureza bloquea el acceso a la superficie. Este fenómeno llevó al estudio de las nuevas propiedades de los electrodos con sustratos adheridos a su superficie. Así, la modificación de la superficie de los electrodos se ha estudiado por diferentes métodos, ya sea adsorbiendo, recubriendo o uniendo moléculas covalentemente. Esta modificación deliberada de los electrodos ha llevado a la obtención de electrodos con nuevas propiedades, los cuales han sido la base de los nuevos dispositivos electroquímicos [128].

Desde 1975, cuando Murray y col. introdujeron por primera vez el término *Electrodos químicamente modificados*, para describir formalmente aquellos electrodos que tienen distintas moléculas inmoviliza-

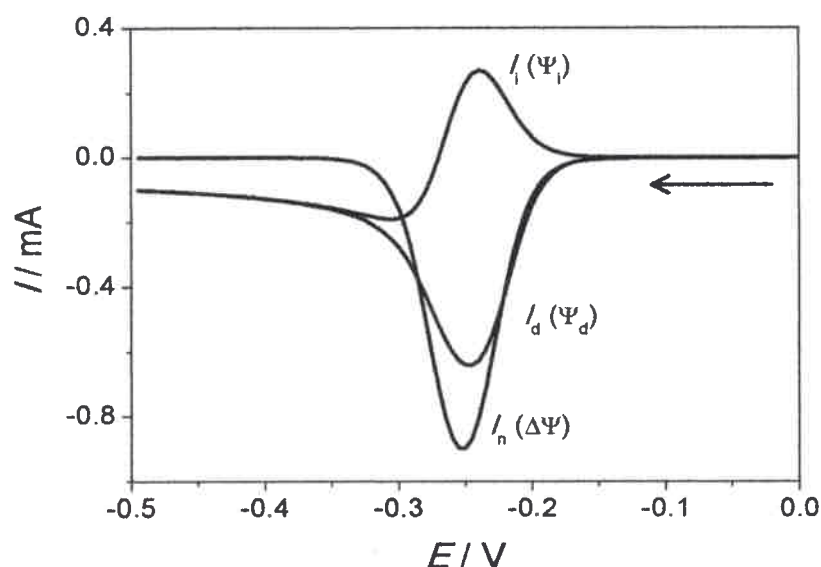


Figura 2.22. Voltamperograma de onda cuadrada de una reacción electroquímica simple con sus corrientes directa (I_d), inversa (I_i) y neta (I_n).

Por medio de la VOC es posible realizar experimentos mucho más rápidos que cuando se utilizan las técnicas de pulso normal o pulso diferencial, las cuales, utilizan velocidades de barrido entre $0,001$ a $0,010 \text{ V s}^{-1}$. De esta manera, experimentos que pueden durar alrededor de 3 minutos utilizando VPD, con la VOC sólo llevará algunos segundos. La velocidad de barrido (v) en la VOC, puede ser expresada de la siguiente manera [127]:

$$v = \frac{\Delta E_s}{\tau} \quad (2.33)$$

Por ejemplo, si se tuviera un $\Delta E_s = 0,002 \text{ V}$ y un $\tau = 0,01 \text{ s}$, la velocidad de barrido sería de $0,2 \text{ V s}^{-1}$. Sin embargo desde un punto de vista experimentalmente, el término τ no es muy usado para expresar la cantidad de ondas que pasan en un período de tiempo. El término que se usa es la frecuencia (f) que, como se mencionó anteriormente, equivale a $1/\tau$; por lo que la ecuación 2.33 puede ser escrita de la siguiente manera:

$$v = \Delta E_s f \quad (2.34)$$

Los valores normales de frecuencia están comprendidos entre 1 a 120 Hz, lo que hace que esta técnica sea, al menos, 100 veces más rápida que otras técnicas de pulso.

Un parámetro importante en las técnicas de pulso, es el ancho del pico a la altura media ($W_{1/2}$), el cual tiene un valor de $0,091/n \text{ V}$ para pequeños valores de ΔE_{OC} . El ancho de pico aumenta a medida que aumenta la amplitud; no obstante, la función que describe esta dependencia es complicada. Sin embargo, para optimizar la respuesta de la corriente neta, parece razonable maximizar la cantidad $W_{1/2}$ ($\Delta \Psi_{p,n}/nW_{1/2}$), la cual, en términos analíticos, está relacionada a la sensibilidad por la resolución.

drada se aplicara sobre un barrido de escalera más que sobre un barrido de potencial lineal lento. Sus resultados fueron comparables a los obtenidos por Baker en el modo de estado estacionario [125].

Interpretación de un voltamperograma de onda cuadrada

Actualmente, la técnica de VOC se realiza bajo el desarrollo propuesto por Osteryoung, que está basada en el trabajo original de Ramaley & Krause [125], el cual consiste en una onda cuadrada de amplitud, ΔE_{OC} , superpuesta sobre un barrido de escalera de amplitud ΔE_e , donde un período completo de la onda cuadrada ocurre para cada período, τ , del barrido de escalera. Así, el ancho de pulso o tiempo de pulso, igual a $\tau/2$ se designa como t_p y la frecuencia, igual a $1/\tau$, como f (Figura 2.21).

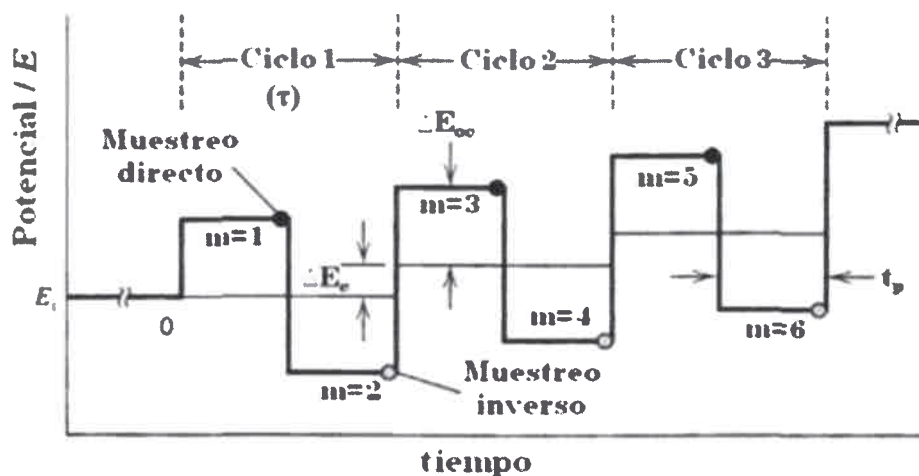


Figura 2.21. Esquema de los saltos de potencial aplicados en un experimento de voltamperometría de onda cuadrada.

La medición de la corriente se realiza dos veces durante cada ciclo de la onda cuadrada, una vez al final del pulso directo (corriente directa, I_d) y otra vez al final del pulso inverso (corriente inversa, I_i). Esto, con el fin de poder discriminar las corrientes faradaicas de las no faradaicas. Luego, una tercera corriente (corriente neta, I_n) es obtenida al hacer la diferencia entre la corriente directa y la corriente inversa. Por lo tanto, en un experimento de voltamperometría de onda cuadrada se obtendrá tres registros que muestran las corrientes directa, la inversa y la neta en función del potencial de barrido de la escalera aplicado (Figura 2.22).

Para describir la respuesta en corriente en un experimento de VOC para un sistema simple, es necesario normalizar los valores de las corrientes en términos de una función (Ψ):

$$I = \frac{nFAD^{1/2}c^*}{(\pi t_p)^{1/2}} \Psi_{(\Delta E_{OC}, \Delta E_e)} \quad (2.32)$$

donde n , F , A , D y c^* son las constantes ya conocidas y $\Psi_{(\Delta E_{OC}, \Delta E_e)}$ es la función corriente normalizada, que está relacionada con la forma cualitativa de la onda voltamperométrica la que dependerá del sistema electroquímico en estudio [126].

2.3.3. Técnicas de pulso

Dentro de las técnicas de voltamperometrías de pulsos, se encuentran la voltamperometría de pulso normal (VPN), de pulso diferencial (VPD) y la voltamperometría de onda cuadrada (VOC). Estas técnicas, están basadas en lo que se llama la cronoamperometría, que es la medida de la corriente como una función del tiempo, después de ser aplicado un pulso de potencial al electrodo de trabajo (Figura 2.20)[123].

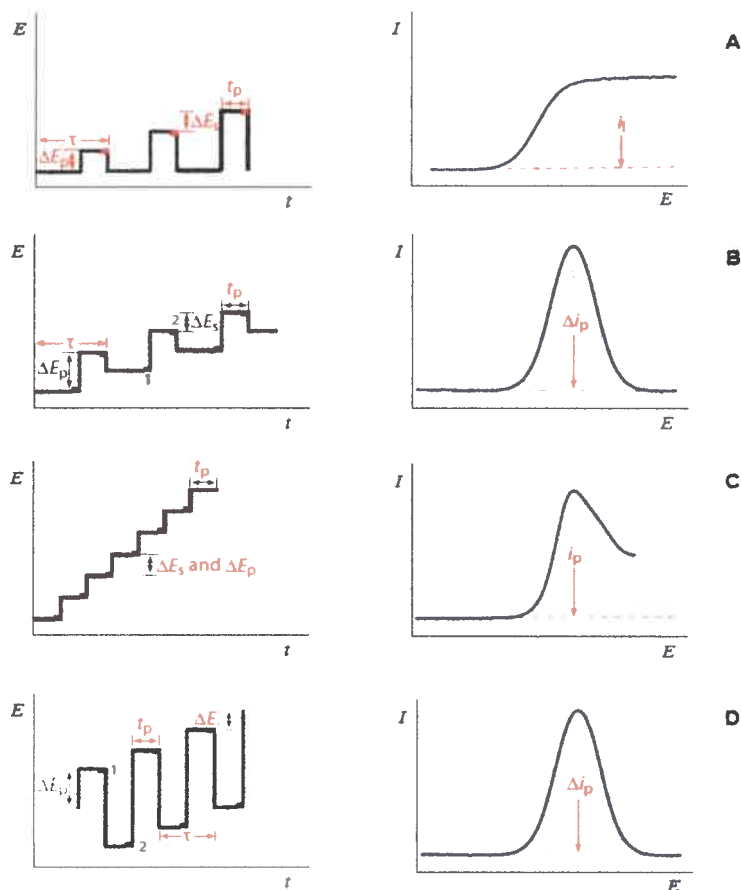


Figura 2.20. Descripción de diferentes técnicas de voltamperometrías de pulso, (A) Voltamperometría de pulso normal, (B) Voltamperometría de pulso diferencial, (C) Voltamperometría de salto de escalera y (D) Voltamperometría de onda cuadrada.

Voltamperometría de onda cuadrada

La voltamperometría de onda cuadrada, tuvo sus inicios alrededor del año 1952, cuando Barker & Jenkins desarrollaron las primeras técnicas voltamperométricas que emplean cambios de potencial en pulsos repetitivos. En 1960, Barker G. señaló que era posible evitar los inconvenientes de las corrientes capacitivas en la voltamperometría lineal, si se empleaba un barrido de escalera o tipo *staircase* y se registraba la corriente al final de cada salto, donde dichas corrientes decaen a un valor prácticamente despreciable [124]. Alentados por esta idea, Ramaley & Krause en 1969, propusieron que la onda cua-

Esto nos indica que, si se desea disminuir el tiempo de una electrólisis, debemos hacer que p sea lo más grande posible. Esto, experimentalmente, se puede lograr variando la relación área del electrodo-volumen de solución, aumentando la agitación, etc [122].

En la práctica, antes de llevar a cabo una electrólisis, es necesario registrar un voltamperograma cíclico para determinar el potencial en donde la especie a estudiar se transforme, casi por completo, en un producto de una reacción electroquímica de oxidación o reducción. Es decir, si se considera una reducción electroquímica reversible, $O + e \rightleftharpoons R$, es necesario seleccionar, a través de un VC, un potencial lo suficientemente catódico que transforme toda la especie O en la especie R . Dicho esto, la Figura 2.19-A, que representaría un VC de la reducción de una cupla redox simple, muestra que utilizando un potencial de electrólisis de $-0,5$ V se cumpliría las condiciones antes mencionadas.

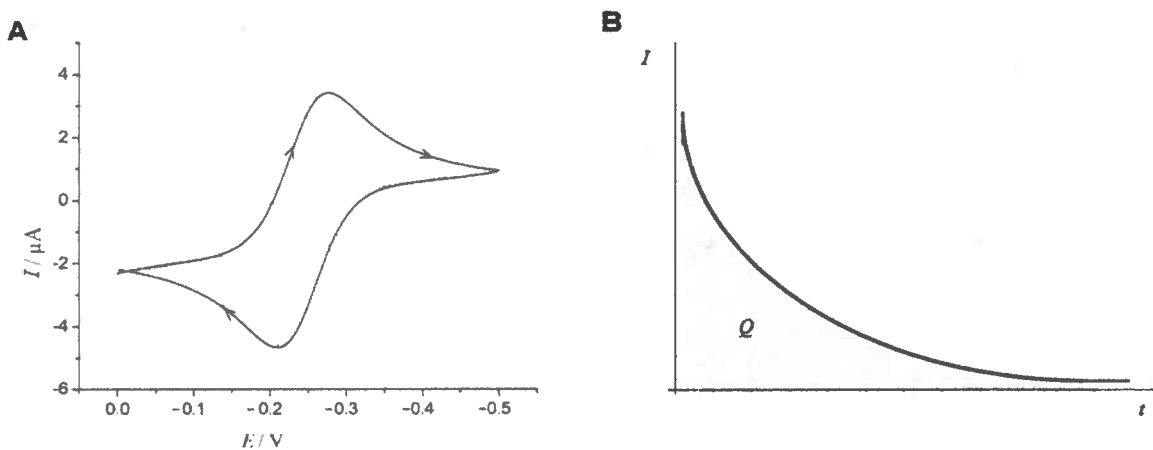


Figura 2.19. (A) Voltamperograma cíclico de una cupla redox reversible simple. (B) Transitorio corriente-tiempo de una electrólisis a potencial controlado.

La respuesta obtenida, al aplicar un potencial constante de -0.5 V durante un tiempo dado, será una gráfica del tipo $I - t$ como la de la Figura 2.19-B. Esta gráfica nos permite obtener el valor de la carga (Q) registrada durante la electrólisis, mediante la integración del área bajo la curva:

$$Q = \int I(t) dt \quad (2.30)$$

Al ser una reacción simple, podemos aplicar la ley de Faraday, la cual establece que, la cantidad de carga producida durante una electrólisis es directamente proporcional a la cantidad, en moles, de la sustancia electrolizada. Es por esto que la corriente decaerá exponencialmente hasta que la especie, en este caso O , sea totalmente consumida. Así, sabiendo el valor de Q , se puede determinar o el valor del número de electrones (n) intercambiados durante la reacción electroquímica o el número de moles (m) de la especie O .

$$Q = nFm \quad (2.31)$$

2.3. Técnicas electroquímicas

Electrólisis a potencial controlado

La electrólisis a potencial controlado es una metodología que se rige por los mismos principios mencionados anteriormente, pero que, a diferencia de la cronoamperometría, la transferencia de masa, además de tener un control difusional debido al gradiente de concentración, también tiene una componente convectiva proporcionada por la agitación de la solución o la rotación del electrodo de trabajo. Esta metodología permite impartir grandes cambios electroquímicos dentro de un sistema, entre ellos, la completa oxidación o reducción de una especie o la completa generación de un producto a través de una síntesis electroquímica.

Un experimento de este tipo se lleva a cabo en una celda de tres compartimientos, donde los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar están separados por una placa frita que permite la conductividad eléctrica entre los electrodos pero no permite el paso de productos indeseados hacia el electrodo de trabajo. Algunas veces, es posible utilizar celdas de dos compartimientos, siempre y cuando el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar estén separados por un material como el indicado previamente.

Si a una reacción simple se le aplica un potencial lo suficientemente alto para que la velocidad de reacción esté controlada por la transferencia de masa desde el seno de la solución hacia la superficie del electrodo, la corriente registrada decaerá según la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_0 e^{-pt} \quad (2.26)$$

donde $I(t)$ es la corriente a un tiempo t , I_0 es la corriente inicial y p es una función del tamaño del electrodo, volumen de la solución, geometría de la celda y de la velocidad de la transferencia de masa.

Para un sistema Nernstiano, p está dado por la siguiente ecuación:

$$p = DA/\delta V \quad (2.27)$$

donde D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, A es el área del electrodo, V es el volumen total de la solución y δ es el espesor de la capa de difusión. La dependencia de p sobre estas variables es compleja y depende de las condiciones experimentales en cada caso. Por lo que una forma más simple de expresar p es:

$$p = f(A, 1/V, m) \quad (2.28)$$

donde m es la constante de transferencia de masa.

No existe una completa proporcionalidad entre p y A , pero se puede estimar el tiempo que puede tardar una electrólisis completa, a través de p , cuando la corriente a decaído hasta el 0,1% de su valor inicial, así:

$$t = 6,9/p \quad (2.29)$$

donde p puede ser calculado a través de la Ecuación 2.26.

[102].

Experimentalmente, la amperometría se realiza aplicando al electrodo de trabajo un cambio de potencial instantáneo a un valor constante en el tiempo y registrando la corriente resultante del proceso de oxidación o reducción de la especie en estudio. Así, la técnica consiste en cambiar el potencial desde un valor inicial (E_0), en el cual no ocurren procesos faradaicos, hasta un valor final (E_f) donde la concentración de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo es cero (Figuras 2.18-A, B), logrando así el máximo gradiente de concentración. Luego, la respuesta será un transitorio corriente/tiempo ($I-t$) como el que se muestra en la Figura 2.18-C.

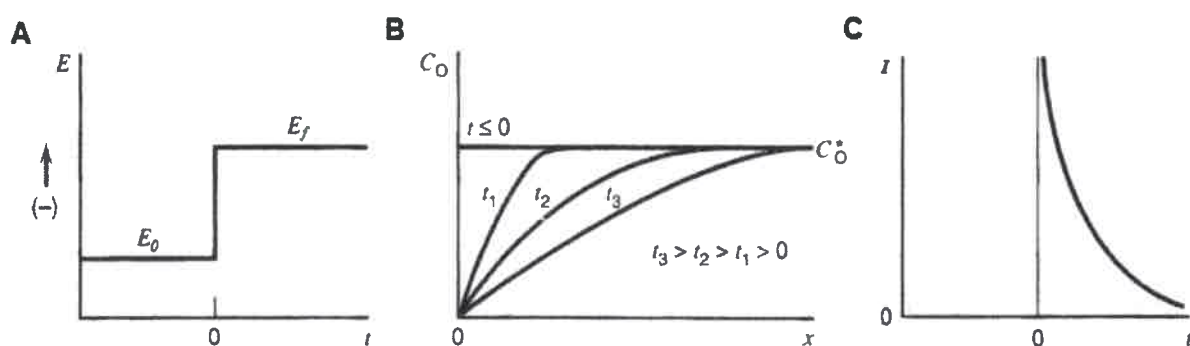


Figura 2.18. (A) Programa de potencial aplicado. (B) Perfil de la concentración en función del tiempo. (C) Respuesta corriente/tiempo en una cronoamperometría.

Dentro de la amperometría, existen diferentes técnicas que difieren en el procedimiento experimental, pero que se rigen por los mismo principios generales. Entre ellas están la cronoamperometría y la electrólisis a potencial controlado.

Cronoamperometría

Esta técnica, consiste en la aplicación del programa de potencial de la Figura 2.18-A, a un electrodo de trabajo estacionario y soluciones sin agitar. Como el transporte de masa bajo estas condiciones es sólo por difusión, la curva corriente-tiempo refleja los cambios en la concentración del analito en las vecindades del electrodo de trabajo. Esto involucra una gradual expansión de la capa de difusión asociada con la disminución de concentración y, así, decrece la pendiente del perfil de concentración con el tiempo (Figura 2.18-B). El decaimiento de la corriente (sobre un electrodo plano) con el tiempo, está dado por la ecuación de Cottrell:

$$I(t) = \frac{nFAc^*D^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad (2.25)$$

donde n , F , A , c^* , D y t ya han sido definidos habitualmente.

En general, la cronoamperometría se usa para la determinación de los coeficientes de difusión de las especies electroactivas, el número de electrones de una reacción redox o el área de un electrodo.

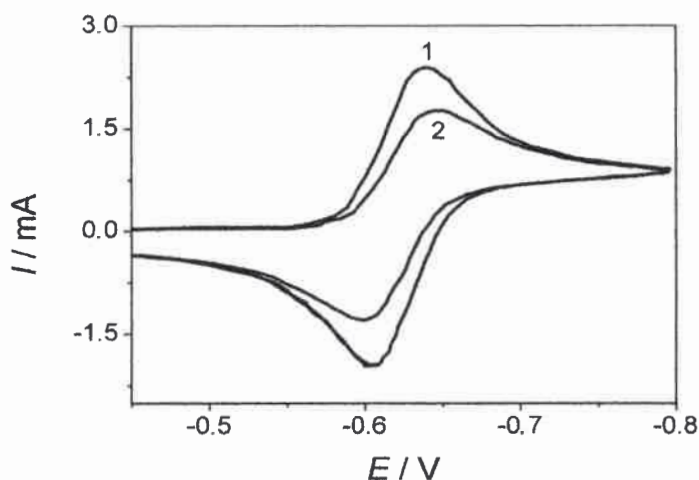


Figura 2.16. Voltamperogramas cíclicos de una cupla redox reversible realizados por un sistema digital que registra la corriente a un (1) 25% y (2) 100% del salto del potencial.

Para un sistema irreversible, Osteryoung observó un ajuste más cercano entre los voltamperogramas cíclicos registrados analógicamente con aquellos obtenidos digitalmente usando un registro de corriente al 50% del salto del potencial aplicado (Figura 2.17).

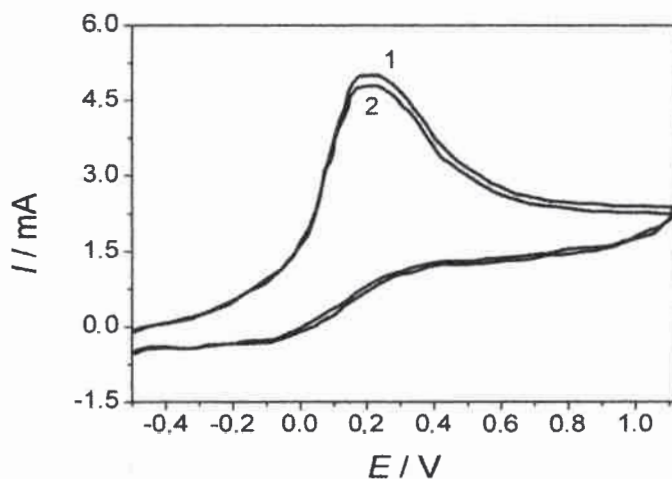


Figura 2.17. Voltamperogramas cíclicos de una cupla redox irreversible realizados por un sistema digital que registra la corriente a un (1) 50% y (2) 100% del salto del potencial.

2.3.2. Técnicas amperométricas

En un estudio electroquímico, es igual de importante conocer los parámetros cinéticos y termodinámicos de una cupla redox, como las concentraciones de las especies que conforman dicha cupla. Estas concentraciones, pueden ser conocidas mediante experimentos en donde la corriente generada sea independiente del potencial aplicado y la transferencia de masa esté controlada por difusión, de tal manera que la corriente sea directamente proporcional a la concentración de la especie redox ($I = kc$)

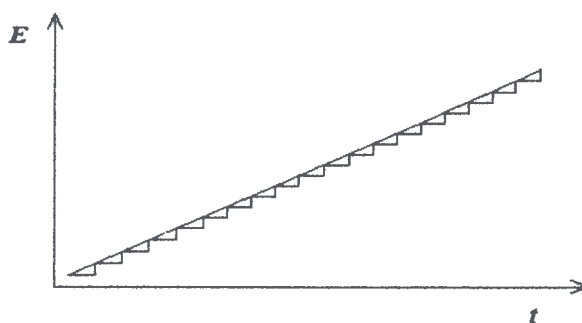


Figura 2.14. Comparación entre una señal analógica y una digital (staircase).

Cuando una onda de potencial generada de manera digital es usada para un experimento de voltamperometría cíclica, la técnica se llama voltamperometría cíclica de saltos de escalera o *staircase*. Muchos electroquímicos estuvieron preocupados de que las teorías desarrolladas por Nicholson y Shain no pudieran ser aplicadas a este tipo de ondas. Sin embargo, experimentadores como Perone [119] o como Osteryoung [120], mostraron que si se realiza un muestreo de corriente en puntos apropiados de los saltos, es de esperar que los resultados concuerden con los obtenidos por Nicholson y Shain [121]. Como se muestra en la Figura 2.15, es posible tomar registros de la corriente a un 25%, 50%, 75% y 100% del tiempo del salto del potencial (los saltos deben tener todos la misma amplitud).

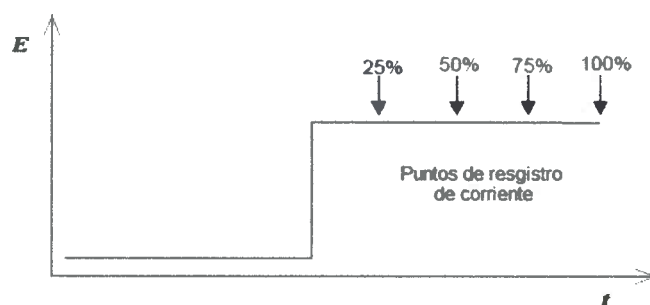


Figura 2.15. Esquema del registros de corriente durante un salto de potencial de un voltamperograma cíclico de salto de escalera.

Osteryoung demostró que para una cupla reversible, si se utiliza un muestreo de corriente al 25% del salto, es posible obtener resultados similares a los obtenidos usando un sistema analógico (Figura 2.16). Sin embargo, esto es cierto si se utiliza un salto de potencial igual o menor de 0,008 V [120].

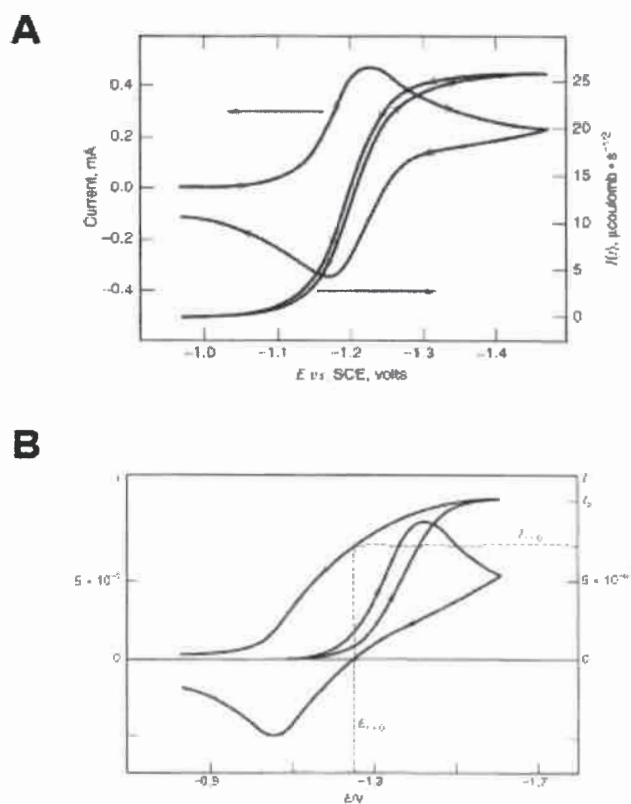


Figura 2.13. Voltamperogramas cíclicos experimental y convolucionado de (A) una cupla redox reversible y (B) una cupla redox cuasi-reversible.

Algunas consideraciones experimentales en la voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es una de las técnicas más empleada para estudiar la respuesta química de un sistema cuando este es perturbado eléctricamente. Es por ello que existen numerosos equipos instrumentales que permiten llevar a cabo este tipo de experiencias. Entre ellos, se definen dos grupos que se diferencian entre sí en la forma de cómo es aplicado el programa de potencial y cómo se toma el registro de corriente. Así, se puede decir que están los equipos analógicos y los digitales. Esta diferencia fue marcada por un antes y un después de que Nicholson y Shain propusieran todos aquellos estudios sobre los mecanismos de reacción electroquímica, ya que dichos estudios fueron realizados inicialmente utilizando equipos analógicos y los estudios siguientes fueron realizados con equipos digitales. La diferencia radica en que la onda de potencial generada digitalmente está compuesta por unos pequeños y discretos saltos en forma de escalera (*staircase*), mientras que en la onda analógica los saltos son casi imperceptibles (Figura 2.14).

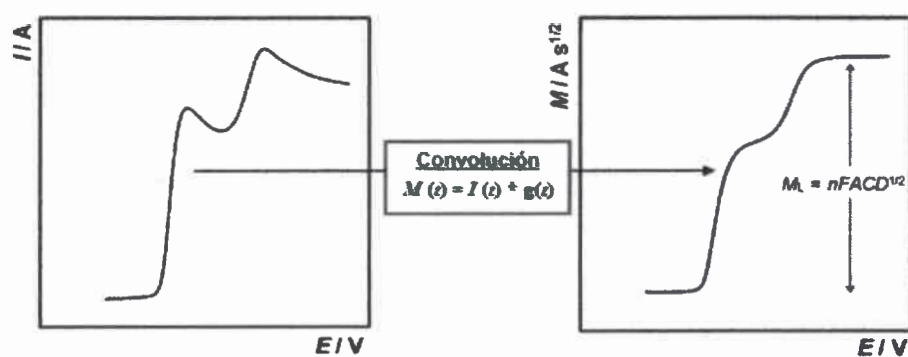


Figura 2.12. Representación de la convolución de un voltamperograma cíclico. El signo * representa la operación de convolución.

A partir de las corrientes experimentales ($I(t)$) obtenidas en un voltamperograma cíclico común, se obtendrán corrientes convolucionadas ($I(t)$), las cuales están representadas por la siguiente ecuación:

$$I(t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{I(u)}{(t-u)^{1/2}} du \quad (2.22)$$

donde $I(u)$ representa la transformación convolutiva de las corrientes experimentales $I(t)$ a través de una función particular u .

Luego, si el sistema está controlado por difusión y $c_O(0, t) = 0$, el valor máximo de corriente convolucionada estará dado por la siguiente ecuación:

$$I_L = nFAD_0^{1/2} c_0^* \quad (2.23)$$

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

Ahora bien, si la transferencia electrónica obedece a la ley de Nernst, se obtendrá la siguiente ecuación:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_L - I(t)}{I(t)} \quad (2.24)$$

donde $E_{1/2} = E^0 + (RT/nF) \ln(D_R/D_O)^{1/2}$. De esta ecuación, es posible establecer una relación lineal entre E vs $\log[(I_L - I(t))/I(t)]$, en donde la ordenada al origen proporcionará el $E_{1/2}$ y la pendiente ($0,059 / nV$ a $25^\circ C$) el número de electrones, n .

Otro criterio de diagnóstico que ofrece la convolución es la determinación de la reversibilidad de una cupla redox. Esto se logra comparando el camino que toma el barrido inverso respecto al barrido directo del voltamperograma convolucionado. Así, si el barrido inverso se superpone con el barrido directo cuando la corriente regresa a cero, se puede decir que es un sistema reversible (Figura 2.13-A). No obstante, si el barrido inverso no coincide con el barrido directo, es posible que la cupla redox sea cuasi-reversible (Figura 2.13-B) [98].

Sistemas con control mixto: difusión-adsorción

En un sistema de control mixto, se puede asumir que el control de la reacción electroquímica está limitada tanto por el proceso difusional como por el proceso superficial sobre el electrodo. Así, es posible asumir que la corriente de pico es la suma de los componentes de ambos procesos, pudiendo establecer la siguiente ecuación:

$$I_p = k_1 v + k_2 v^{1/2} \quad (2.20)$$

donde el primer término ($k_1 v$) está referido al proceso superficial y el segundo término ($k_2 v^{1/2}$) al proceso difusional. Los valores de las constantes de proporcionalidad son, $k_1 = 9,60 \times 10^5 n^2 \Gamma$ y $k_2 = 2,96 \times 10^5 n^2 D^* c^*$.

La ecuación 2.20 puede ser re escrita de la siguiente manera:

$$I_p v^{-1/2} = k_1 v^{1/2} + k_2 \quad (2.21)$$

Se puede establecer entonces que, un gráfico de $I_p v^{-1/2}$ vs $v^{1/2}$ será lineal y proporcionará la contribución individual de cada componente. El coeficiente de difusión y el coeficiente de recubrimiento se pueden calcular a partir de los valores de la ordenada al origen y la pendiente, respectivamente [116].

Convolución de voltamperogramas cíclicos

La convolución de voltamperogramas cíclicos es un tratamiento matemático que se aplica a los voltamperogramas cíclicos de sistemas con control difusional (curvas $I - E$) para ser transformados en voltamperogramas de estado estacionario, los cuales presentan ventajas en el procesamiento de datos. Las principales ventajas que presenta esta metodología están relacionadas con el estudio del mecanismo de reacción de una cupla redox. Esto se debe a que, mediante un análisis de convolución, es posible utilizar toda la información contenida en una curva $I - E$ y no sólo aquella porción en cercanías al potencial de pico [117]. Por otra parte, los sistemas convolucionados son independientes de la velocidad de barrido, por lo que sus respuestas darán corrientes límites (I_L) en lugar de corrientes de pico (I_p) (Figura 2.12) que son menos sensibles tanto a las cinéticas heterogéneas de transferencia electrónica lentas como a los altos niveles de resistencia no compensados, permitiendo conocer con mayor precisión parámetros como el coeficiente de difusión (D), concentraciones de los reactivos en el seno de la solución (c^*) y el número de electrones intercambiados en el proceso electroquímico (n) [118].

recubrimiento (Γ / mol cm⁻²).

La corriente de pico para este sistemas estará dada por la siguiente ecuación:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_O^* \quad (2.17)$$

donde Γ_O^* es la concentración de la especie O adsorbida sobre el electrodo.

Como podemos ver, en este caso la I_p es lineal con v y no con $v^{1/2}$, como en el caso difusional. Además, esta proporcionalidad de I_p vs v es la misma observada para corrientes puramente capacitivas, lo que permite hacer ciertos tratamientos de adsorción en términos de pseudocapacitancia [98].

El potencial de pico está dado por:

$$E_p = E^{0'} - \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \left(\frac{b_O}{b_R} \right) = E_{ads}^{0'} \quad (2.18)$$

Para sistemas reversibles que cumplen las condiciones de una isoterma de Langmuir, el $E_{p,a} = E_{p,c}$, por lo que el perfil del pico catódico será la imagen especular del pico anódico (Figura 2.11).

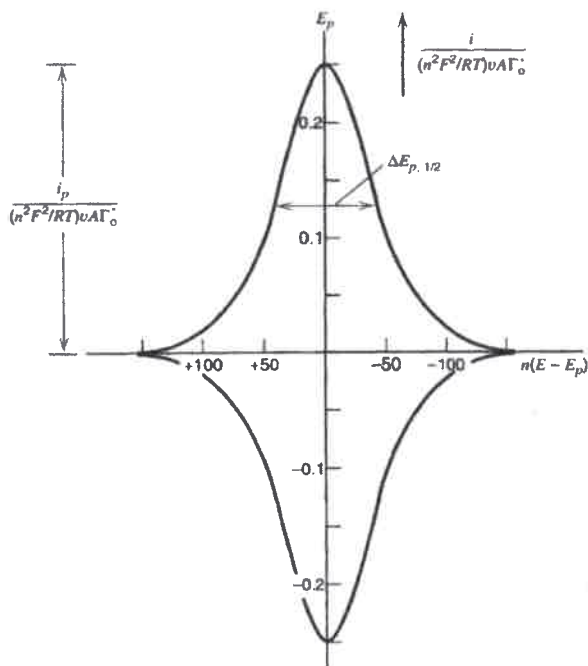


Figura 2.11. Voltamperograma cíclico de la reducción y la posterior oxidación de una especie adsorbida sobre la superficie del electrodo.

La ecuación que describe el ancho del pico a su altura media es:

$$\Delta E_{p,1/2} = 3,53 \frac{RT}{nF} = \frac{0,091}{n} V \quad \text{a } 25^\circ \text{C} \quad (2.19)$$

cuasi-reversible o totalmente irreversible según su valor de Λ o según la velocidad de barrido utilizada, ya que a velocidades bajas (tiempos largos) el sistema tiende a la reversibilidad, mientras que a altas velocidades (tiempos cortos) se observa un comportamiento del tipo irreversible. Tanto las ecuaciones como los criterios de diagnóstico para sistemas cuasi-reversibles, fueron desarrollados, en su mayoría, por Matsuda y Ayabe [98, 114], quienes también sugirieron los siguientes límites para sistemas cuasi-reversibles (Tabla 2.1):

Tabla 2.1. Zonas límites donde los parámetros Λ y k^0 nos indican el tipo de sistema que gobierna una reacción electroquímica simple. Para los valores de k^0 , se toma como base que $n = 1$, $\alpha = 0,5$, $T = 25$ °C y $D = 1 \times 10^{-5}$ cm^2s^{-1} .

Tipo de sistema	Valores límites de Λ	Valores límites de k^0
Reversible	$\Lambda \geq 15$	$k^0 \geq 0,3 v^{1/2} \text{ cm s}^{-1}$
Cuasi-reversible	$15 \geq \Lambda \geq 10^{-2(1+\alpha)}$	$0,3 v^{1/2} \geq k^0 \geq 2 \times 10^{-5} v^{1/2} \text{ cm s}^{-1}$
Irreversible	$\Lambda \leq 10^{-2(1+\alpha)}$	$k^0 \leq 2 \times 10^{-5} v^{1/2} \text{ cm s}^{-1}$

En sistemas más complejos, por ejemplo, aquellos que incluyen reacciones químicas homogéneas acopladas al proceso de transferencia de carga, la respuesta electroquímica difiere con respecto a la de un sistema simple. Los criterios de diagnóstico utilizados para su caracterización se basan, por lo general, en las variaciones de E_p e I_p con respecto a la concentración de sustancias electroactivas en el seno de la solución y a la velocidad de barrido, la relación $I_{p,c}/I_{p,a}$, etc., que adoptan características propias según el mecanismo particular de que se trate. Los criterios de diagnóstico utilizados para estos tipos de procesos son los desarrollados por Nicholson y Shain [115].

Tal lo mostrado, todo el tratamiento de datos de los sistemas considerados se basa en la suposición de que las reacciones electroquímicas están controladas por procesos difusionales, lo que hace menos complejo su tratamiento matemático. No obstante, algunas veces el sistema puede estar controlado por la adsorción tanto del reactivo como del o de los producto/s electrogenerado/s o, inclusive, puede tener un control mixto, es decir, difusión-adsorción.

Sistemas controlados por adsorción

Siguiendo con el mismo esquema general de reacción (Ecuación 2.1), se puede considerar que la respuesta electroquímica de esta reacción se puede ver afectada significativamente tanto por la adsorción de la especie O y/o R . Los I_p , E_p y $\Delta E_{p,1/2}$ (ancho del pico a su altura media) obtenidos estarán determinados por las complicaciones cinéticas adicionales que pueda tener el sistema, así como por su grado de reversibilidad.

Abordando entonces, el caso más simple que se puede presentar: un cupla redox simple, reversible, en donde tanto la especie O como la R se adsorben sobre la superficie del electrodo. En este caso, la corriente total no es controlada por difusión, sino que está limitada por la cantidad de material adsorbido. A la cantidad de materia adsorbida se le conoce como concentración superficial o coeficiente de

Otra forma para deducir los valores de k^0 es a través de las ecuaciones deducidas por Gokhshtein y J. González Velasco [112, 113]. Gokhshtein [113] propuso que mediante la ecuación 2.12, de diferentes experimentos realizados a diferentes velocidades de barrido, una gráfica $\ln I_p$ vs $E_p - E^{0'}$ (asumiendo que se conoce $E^{0'}$) daría un valor aproximado de k^0 tomando el valor de la ordenada al origen y un valor para $-anF/RT$ con el valor de la pendiente.

$$I_p = 0,227FAc_0^*k^0 e^{-af(E_p - E^{0'})} \quad (2.12)$$

Velasco [112] propone la ecuación 2.13, en donde sólo se necesita conocer los valores de $E_p - E^{0'}$ para un valor determinado de velocidad. Así, a una temperatura de 25 °C, tendremos:

$$k^0 = 1,1 \left(\frac{D_0 v}{E_p - E^{0'}} \right)^{1/2} \quad (2.13)$$

Sistemas cuasi-reversibles

Para sistemas cuasi-reversibles, se dice que el proceso está controlado tanto por la transferencia de carga como por el transporte de masa ya que ambas son del mismo orden de magnitud ($10^{-1} > k^0 > 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$). La ecuación de una reacción general para este tipo de sistemas puede ser escrita como $O + ne \xrightleftharpoons[k_b]{k_f} R$ y su voltamperograma tendría un perfil como el que se muestra en la Figura 2.10-2. Por otro lado, su forma también dependerá del valor que tome el parámetro $\Lambda = k^0 / \sqrt{\pi a D}$ (donde $a = nFv / RT$), de modo tal que si este parámetro aumenta, el proceso tenderá a ser un sistema del tipo reversible y, por el contrario, cuando el valor disminuye, el sistema será del tipo irreversible. En otras palabras, un sistema cuasi-reversible presentará una mayor separación de picos comparado con un sistema reversible [102].

La ecuación que describe la corriente de pico de un sistema cuasi-reversible es:

$$I_p = I_{p(rev)} K_{(\Lambda, \alpha)} \quad (2.14)$$

donde la $I_{p(rev)}$ es el valor de la corriente del sistema reversible y el parámetro $K_{(\Lambda, \alpha)}$ depende de Λ y α . En este caso la I_p no es proporcional a $v^{1/2}$.

El potencial de pico está dada por la siguiente ecuación:

$$E_p - E_{1/2} = -\Xi_{(\Lambda, \alpha)} \left(\frac{RT}{nF} \right) = -0,026 \Xi_{(\Lambda, \alpha)} V \quad \text{a } 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (2.15)$$

donde el parámetro $\Xi_{(\Lambda, \alpha)}$ también depende de Λ y α .

Para el potencial de medio pico, su ecuación es:

$$E_{p/2} - E_p = \Delta_{(\Lambda, \alpha)} \left(\frac{RT}{nF} \right) = 0,026 \Delta_{(\Lambda, \alpha)} V \quad \text{a } 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (2.16)$$

donde el parámetro $\Delta_{(\Lambda, \alpha)}$ igualmente depende de Λ y α .

Los parámetros $K_{(\Lambda, \alpha)}$, $\Xi_{(\Lambda, \alpha)}$ y $\Delta_{(\Lambda, \alpha)}$ están ajustados a valores característicos de Λ en procesos reversibles e irreversible puros. Por lo que un sistema puede mostrar un comportamiento reversibles,

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm \frac{0,028}{n} V \quad \text{a } 25^\circ \text{C} \quad (2.8)$$

siendo $E_{1/2}$ el potencial de media onda polarográfico.

Sistemas irreversibles

Los sistemas irreversibles simples se caracterizan por el hecho de que la cinética del proceso de transferencia de carga es lenta comparada con la velocidad de flujo de transferencia de materia. Para este caso, la ecuación de reducción $O + ne \longrightarrow R$ se corresponde con un voltamperograma que tendrá un perfil como el que se muestra en la Figura 2.10-3.

A simple vista, vemos una pobre definición de los picos tanto de reducción como de oxidación y una disminución en las corrientes de pico de ambos procesos respecto al sistema reversible. Este comportamiento es típico de sistemas irreversibles. En algunos casos, cuando el pico de retorno no es observado, el sistema se denomina totalmente irreversible. Debido a la baja velocidad en la transferencia de carga, los potenciales de pico están alejados del potencial formal de la cupla, no obstante, tal separación de picos puede ser compensada por un apropiado cambio en la velocidad de barrido. Para sistemas irreversibles, el potencial de pico se desplaza conforme se cambia la velocidad de barrido [102]:

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n F} \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (2.9)$$

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

Otro criterio de diagnóstico para sistemas irreversibles, está dado en que los potenciales de pico son función de la velocidad de barrido y que su corrimiento, en sentido negativo, será $1,15RT/\alpha n F$ o $0,030/\alpha n$ V por cada incremento de diez veces en la velocidad de barrido [98]. Además, una relación lineal entre el E_p con el $\ln v$, nos permite deducir los valores que puede tomar k^0 a partir de su ordenada al origen, ya que de la pendiente se pueden estimar los valores de α y n . Esto es posible, siempre y cuando se conozca el $E^{0'}$ y D . El valor absoluto de la diferencia entre el potencial de pico y el potencial de pico medio, también se utiliza como criterio de diagnóstico, el cual, para sistemas irreversibles, está dado por:

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{1,857RT}{\alpha n F} = \frac{0,048}{\alpha n} V \quad \text{a } 25^\circ \text{C} \quad (2.10)$$

Respecto a la corriente de pico catódica (en un proceso de reducción simple), la corriente está dada por la siguiente expresión:

$$I_{p,c} = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n)^{1/2} A D_o^{1/2} c_o^* v^{1/2} \quad (2.11)$$

La relación de la $I_{p,c}$ con la concentración también será lineal, como para los sistemas reversibles, pero tendrá menos amplitud, lo cual depende del valor de α . Asumiendo un $\alpha = 0,5$ tendremos que la corriente de pico de un proceso irreversible será cerca del 80% de la corriente de pico de un sistemas reversible [102].

transferencia de carga, por lo que se utiliza también como un criterio de diagnóstico.

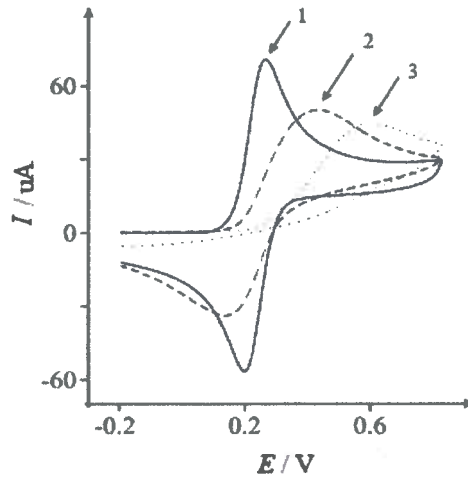


Figura 2.10. Voltamperogramas cíclicos para un sistema (1) reversible, (2) cuasi-reversible e (3) irreversible.

Para esta reacción de reducción difusional, la corriente de pico catódica es descrita por la ecuación de Randles-Sevcik [98]:

$$I_{p,c} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} c_o^* v^{1/2} \quad (2.5)$$

donde n es el número de electrones intercambiados por la especie O , A es el área del electrodo en cm^2 , c_o^* es la concentración de O en el seno de la solución en mol cm^{-3} , D_o es el coeficiente de difusión de O en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ y v es la velocidad de barrido de potencial en V s^{-1} .

A partir de esta ecuación, es posible deducir el coeficiente de difusión de la especie redox si se establece gráficamente una relación lineal entre la $I_{p,c}$ vs $v^{1/2}$. Esta relación será lineal en todo el intervalo de velocidades asignado y del valor de su pendiente se determinará el D_o . También, la linealidad lograda servirá como criterio para confirmar que el sistema está controlado por difusión [102].

Los valores de los potenciales de pico, que son independientes de la velocidad de barrido, son otros parámetros utilizados para obtener criterios de diagnóstico. El potencial de pico está relacionado con el potencial formal ($E^{0'}$) de la cupla redox, por lo que para un sistema reversible simple, el $E^{0'}$ estará centrado entre el $E_{p,c}$ y el $E_{p,a}$:

$$E^{0'} = \frac{E_{p,c} + E_{p,a}}{2} \quad (2.6)$$

Por otro lado, la separación entre los picos catódico y anódico, en un sistema reversible simple, es:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0,059}{n} V \quad (2.7)$$

donde el número de electrones, n , se puede inferir a partir de la diferencia entre dichos potenciales.

Otro criterio obtenido de los potenciales de pico, son los potenciales de medio pico ($E_{p/2}$), donde la corriente es la mitad de la corriente de pico:

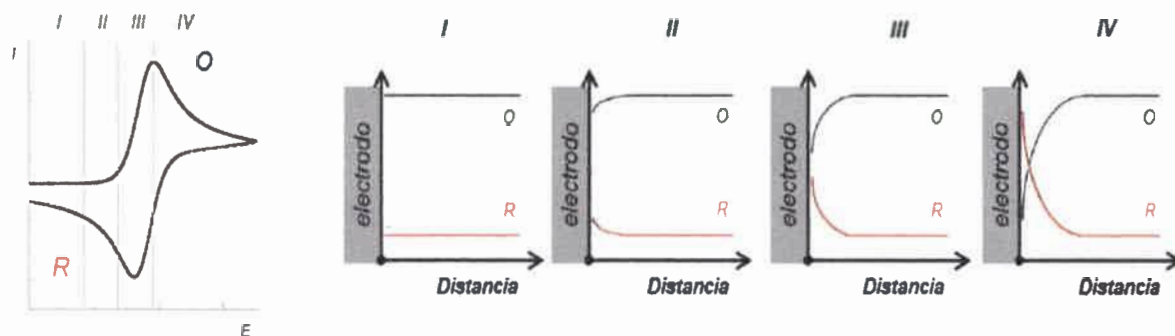


Figura 2.9. Perfiles concentración–distancia cerca de la superficie del electrodo durante un proceso redox en diferentes estadios.

Podemos diferenciar, entonces, 4 estadios diferentes durante el proceso. En el estadio (I) las concentraciones de las especies redox son constantes durante los primeros valores de potencial. Durante los estadios (II y III), el potencial aplicado se acerca al potencial formal ($E^{0'}$) de la cupla redox y la concentración de la especie O en las cercanías del electrodo disminuye, lo que produce un aumento en el flujo de esta especie desde el seno de la solución y la formación de una especie R. En el estadio (IV), el potencial aplicado sobrepasó el $E^{0'}$ llevando, como consecuencia, a que la concentración de O en la superficie del electrodo tienda a cero. De esta manera, se alcanza un punto máximo tanto en el gradiente de concentración de la especie O como en la corriente registrada. Si el potencial sigue aumentando, la corriente cae como consecuencia del incremento en el espesor de la capa de difusión. Esta disminución de la corriente se produce según una variación inversa en la raíz cuadrada del tiempo, tal como lo predice la ecuación de Cottrell [98].

La información experimental que se obtiene a partir de un voltamperograma cíclico son las corrientes de pico (I_p) y los potenciales de pico (E_p) tanto anódicos como catódicos. A partir de ellos y para obtener mayor información acerca de la especie electroactiva y su proceso redox, es necesario aplicar ciertos criterios de diagnóstico que están sujetos a la reversibilidad/irreversibilidad del proceso redox y considerar la morfología de los voltamperogramas cíclicos. En este sentido, podemos encontrar sistemas reversibles, irreversibles y cuasi-reversibles.

Sistemas reversibles

Retomando nuevamente la reacción simple $O + e^- \rightleftharpoons R$, asumiendo que el sistema está controlado por difusión y que sólo la especie O está presente inicialmente. Así, los sistemas reversibles simples se caracterizan por el hecho de que la cinética del proceso de transferencia de carga es más rápida que la velocidad de flujo de transferencia de materia, por lo que su voltamperograma tendrá la forma que se muestra en la Figura 2.10–1. Uno de los primeros criterios de reversibilidad que pueden ser aplicados, ya que puede ser observado a simple vista, es la relación entre la corriente de pico anódica y la corriente de pico catódica ($I_{p,a}/I_{p,c}$), la cual debe ser uno y debe ser independiente de la velocidad de barrido. Cabe destacar que esta relación es altamente sensible a las complicaciones cinéticas posteriores a la

Experimentalmente, la VC consiste en variar (barrer) linealmente el potencial de un electrodo de trabajo (en una solución sin agitación) usando una función triangular. En otras palabras, se comienza el barrido desde un potencial inicial (E_i), donde no ocurre reacción faradaica, hasta un potencial final (E_f), conocido también como potencial de corte (E_c) en donde el sentido del barrido del potencial es invertido hasta llegar al valor inicial de potencial. Dependiendo del tipo de estudio a realizar, es posible realizar uno o múltiples ciclos sucesivos (Figura 2.7). El sentido del barrido puede ser iniciado en cualquier dirección (anódica o catódica) y el valor de su pendiente, conocido como *velocidad de barrido* (v), también puede ser modificado.

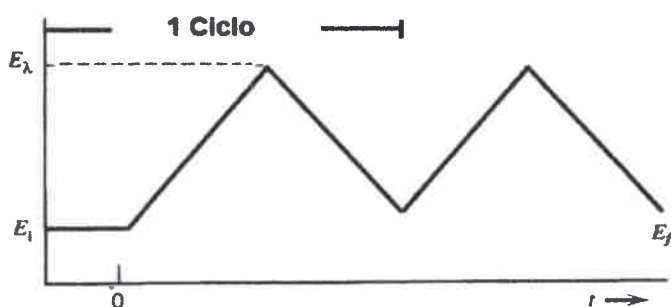


Figura 2.7. Función de perturbación en un experimento de voltamperometría cíclica.

Como respuesta a la perturbación en potencial, se obtiene un registro de la corriente generada, la que se gráfica en función del potencial aplicado, obteniendo así lo que se conoce como *voltamperograma cíclico* (Figura 2.8).

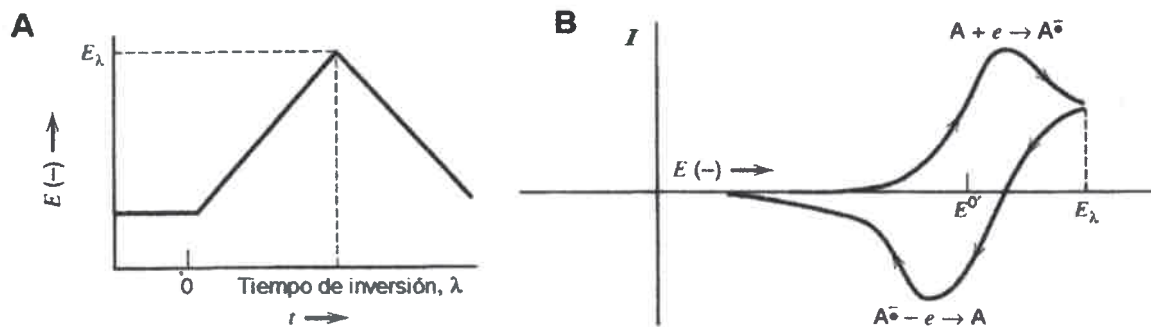


Figura 2.8. (A) Programa de barrido de potencial. (B) Voltamperograma cíclico resultante.

Interpretación de un voltamperograma cíclico

Los voltamperogramas son relaciones $I-E$ que muestran, generalmente, un pico de corriente cuando se lleva a cabo un proceso redox. La forma del voltamperograma cíclico, se debe a los perfiles de concentración de los componentes de la cupla redox que tienen lugar sobre la superficie del electrodo. Esta relación se muestra en la Figura 2.9, donde se observan los perfiles de concentración en función de la distancia, perpendiculares a la superficie del electrodo, cuando se aplica un barrido de potencial.

2.3. Técnicas electroquímicas

Técnicas galvanostáticas: son aquellas en donde se aplica controladamente un flujo de corriente constante y se observa la respuesta del potencial. Experimentalmente, también se le conoce como *técnicas cronopotenciométricas*. Esta técnica es usada, por ejemplo, para medir la solvatación de los electrones en solventes apróticos o para la medición del espesor de un film metálico [98].

Técnicas potencioestáticas: son las técnicas en donde se aplica una perturbación eléctrica en potencial a través de una función perfectamente conocida en el tiempo y se obtiene una respuesta en corriente eléctrica. Las técnicas potencioestáticas se usan para el estudio de compuestos que tengan propiedades redox, es decir, que puedan ser oxidados o reducidos [102].

A continuación, se describen las técnicas electroquímicas empleadas durante el desarrollo experimental de este trabajo, como la voltamperometría cíclica (VC) y la convolución de los voltamperogramas, la voltamperometría de onda cuadrada (VOC) y la electrólisis a potencial controlado.

2.3.1. Técnicas voltamperométricas

El comportamiento electroquímico de un sistema puede ser estudiado mediante la aplicación de un programa de potencial y registrando la corriente durante un tiempo determinado. Se dice entonces que la voltamperometría es el estudio de un sistema electroquímico sobre un electrodo en un medio no agitado bajo parámetros como el potencial, la corriente y el tiempo [109]. La voltamperometría es muy utilizada, principalmente, como herramienta para la dilucidación de los mecanismos de reacción en los procesos electroquímicos en diferentes medios, procesos de adsorción sobre superficies, mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados y para medir la concentración de especies químicas en solución [110]. Las técnicas voltamperométricas se distinguen entre sí según el tipo de variación de potencial aplicado al electrodo de trabajo.

Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (VC) es la técnica más usada para los primeros estudios electroquímicos de un sistema, ya que permite obtener información tanto cualitativa como cuantitativa. Su ventaja frente a otras técnicas, radica en la rápida obtención de parámetros como los potenciales redox de las especies electroactivas y una evaluación de los efectos del medio de reacción sobre los procesos redox [102, 111]. Otros parámetros que se pueden obtener mediante la VC son:

- Reversibilidad o irreversibilidad de una cupla redox
- Número de electrones transferidos en el proceso
- Constantes de velocidad
- Constantes de equilibrio
- Mecanismos de reacción
- Coeficientes de difusión

2.3. Técnicas electroquímicas

El desarrollo de un experimento electroquímico implica que ciertas variables permanezcan constantes o controladas, mientras se observa como las otras variables evolucionan según las características del sistema. En electroquímica, las variables utilizadas son la corriente (I), el potencial (E) y el tiempo (t). Desde un punto de vista experimental, los experimentos electroquímicos pueden ser visualizados, al igual que un experimento espectrofotométrico, en términos de como un sistema responde a una perturbación. En este sentido, podemos perturbar una celda electroquímica mediante una función de excitación (por ejemplo, saltos de potencial) y medir su respuesta (por ejemplo, la variación de la corriente con el tiempo), manteniendo fija las otras variables del sistema (Figura 2.6).

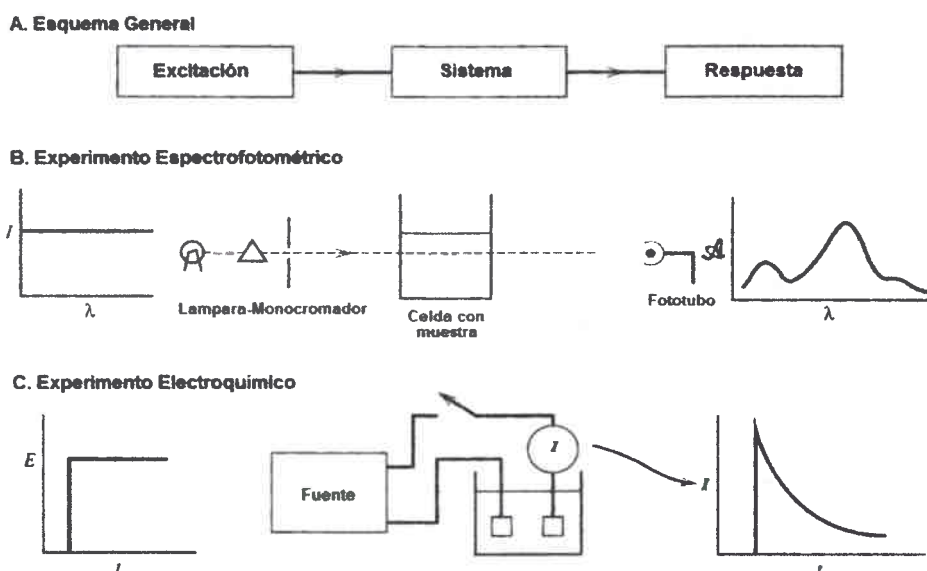


Figura 2.6. (A) Esquema general de la respuesta de un sistema a una perturbación. (B) Esquema de un experimento espectrofotométrico. (C) Esquema de un experimento electroquímico [98].

Según la dependencia con el tiempo, los experimentos electroquímicos pueden ser clasificados en dos grandes grupos, estacionarios y no estacionarios.

Estado estacionario: es un estado del sistema en donde sus variables, como I , E y la concentración del analito (c^*) no dependen de la variable tiempo (t).

Estado no estacionario: es cuando a un sistema se le aplica un determinado estímulo o una perturbación, ya sea en forma periódica o transitoria, durante un cierto periodo de tiempo. Según sea la naturaleza y la duración de la perturbación, el sistema retorna al equilibrio o evoluciona a un nuevo estado estacionario.

También, es posible hacer una clasificación de las técnicas electroquímicas dependiendo del tipo de control que se aplique sobre el sistema, de modo que podemos obtener técnicas galvanostáticos y técnicas potencioestáticos.

1. **Reversibilidad termodinámica:** un proceso es termodinámicamente reversible cuando un cambio infinitesimal en su fuerza directriz hace que el proceso progrese en esa dirección. Un cambio reversible entre dos estados presupone una serie continua de estados de equilibrio, cuya sucesión involucra un intervalo de tiempo infinito. Cabe aclarar que si un proceso electroquímico es químicamente reversible, puede o no, ser reversible en sentido termodinámico.
2. **Reversibilidad química:** supongamos que en la superficie del electrodo, se está llevando a cabo un proceso en donde una especie O se transforma a una especie R mediante la adición de electrones (e^-) por parte del electrodo, así:



Ahora bien, si invertimos la polarización del electrodo, de modo que los electrones ahora fluyan hacia el electrodo, es decir, el proceso inverso al anterior, tendremos que la especie R se transformará en la especie O por la pérdida de los electrones, así:



donde n indica el número de electrones intercambiados en la reacción electroquímica.

De esta manera, podemos decir que el proceso de electrodo es químicamente reversible, ya que fue posible invertir el sentido de la reacción conforme se invirtió el sentido en que fluían los electrones. Por otra parte, si al cambiar el sentido del flujo de los electrones la reacción procede de manera diferente a lo esperado, se puede decir que el sistema es químicamente irreversible.

3. **Reversibilidad práctica:** el término reversibilidad práctica, también conocido como reversibilidad experimental, no es un concepto absoluto. En verdad, conforma un ajuste entre teorías, operadores y experiencias. Como los procesos reales ocurren en tiempos finitos, no podemos describirlos como reversibles en un estricto sentido termodinámico. No obstante, experimentalmente es posible operar en condiciones tales que podamos aplicar las ecuaciones y leyes de la termodinámica con un mínimo de errores, de tal modo que bajo estas circunstancias sea posible considerar al proceso como reversible o irreversible [106]. Electroquímicamente hablando, la palabra reversible significa que el sistema en la superficie del electrodo está en equilibrio y es posible aplicar la ecuación de Nernst a cualquier potencial. Si tomamos la reacción 2.1, tendremos:

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O(0, t)}{C_R(0, t)} \quad (2.4)$$

donde $E^{0'}$ es el potencial formal de la cupla, n es el número de electrones, RT/F vale 0,02569 V a 25 °C y $C_O(0, t)$ y $C_R(0, t)$ son las concentraciones de las especies O y R en la superficie del electrodo a cualquier tiempo. Además, debemos suponer que la reacción tiene una cinética de electrodo rápida de modo tal que los parámetros cinéticos intrínsecos del sistema no están involucrados, lo que simplifica su tratamiento matemático.

que las especies difunden depende de la diferencia de concentración entre las dos regiones. Esta relación está descrita en la primera Ley de Fick [104] (Figura 2.5-B).

3. **Convección:** también conocida como movimiento hidrodinámico, se da cuando el movimiento de una especie está determinado por el movimiento que sufre la solución. Por lo que es posible establecer dos tipos de convección (Figura 2.5-C):

Convección forzada: resulta de la acción deliberada del experimentador, es decir, cuando se impone una fuerza externa a la solución, como la agitación, el desoxigenado o el uso de electrodos rotatorios o celdas de flujo.

Convección natural: la convección natural, en general un movimiento no deseado, surge como consecuencia de gradientes de densidad causados a su vez por gradientes de temperatura o concentración. Los experimentos electroquímicos generalmente son diseñados de manera tal de minimizar la convección natural [106].

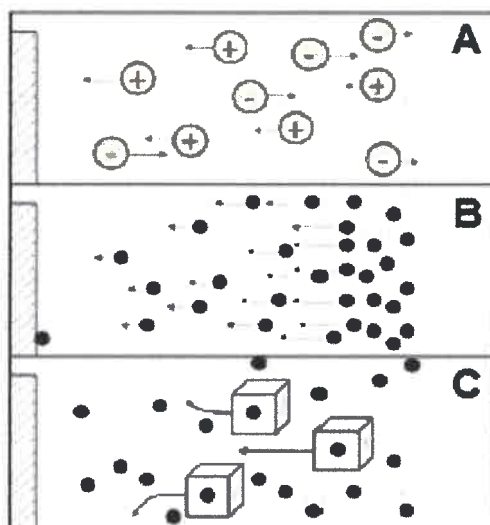


Figura 2.5. Esquema de los diferentes modos de transporte de masa. migración (A), difusión (B) y convección (C).

2.2.6. Reversibilidad en procesos electroquímicos

En electroquímica, con frecuencia, se emplean los conceptos de “proceso reversible” y/o “proceso irreversible” para identificar, de algún modo, los procesos que tienen lugar en el electrodo de trabajo en un experimento electroquímico. El concepto de reversibilidad es importante al tratar los procesos reales termodinámicamente. Así, el concepto de equilibrio involucra la idea de que un proceso se puede mover en cualquiera de las dos direcciones opuestas a partir de la posición de equilibrio. Desafortunadamente, el término “reversible” opera sobre significados sesgadamente relacionados en la literatura electroquímica, tres de los cuales se distinguen a continuación [98].

1. Transferencia de masa, es decir, la transferencia de la especie O desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo.
2. Transferencia electrónica o transferencia de carga heterogénea.
3. Reacciones químicas precedentes o posteriores a la transferencia electrónica.
4. Otras reacciones de superficie, tales como adsorción, desorción o cristalización (electrodeposición).

La constante de velocidad de alguno de los procesos como, por ejemplo, la transferencia de carga o la adsorción, depende del potencial aplicado [98].

Para una reacción electroquímica simple, los únicos pasos que intervienen en el proceso de electrodo son la transferencia de masa del analito hacia el electrodo, la transferencia electrónica entre el electrodo y el analito (especie que no se adsorbe) y la posterior transferencia de masa del producto electrogenerado hacia el seno de la solución. Para mecanismo más complicados, es posible observar reacciones homogéneas acoplados a la transferencia de carga, reacciones paralelas, protonaciones o modificación de la superficie del electrodo por adsorción del producto o del mismo reactivo. En todos los casos, cuando se alcanza el estado estacionario las velocidades de todos los pasos de reacción son iguales.

Por otro lado, la velocidad global de proceso puede ser controlada tanto por difusión como por control activado. Un sistema controlado por difusión se da cuando la velocidad de reacción está limitada por la velocidad de transferencia del material desde el seno de la solución a la superficie del electrodo. Además, cuando la velocidad está determinada por la transferencia de carga, se dice entonces que el sistema tiene un control activado. Dependiendo de la escala de tiempo en que se realice el experimento, es posible estudiar ambos procesos separadamente y determinar los parámetros característicos de cada uno de ellos.

2.2.5. Fenómenos de transporte de masa

Como se mencionó anteriormente, en un proceso faradaico la corriente está directamente relacionada con la cantidad de materia que llega a la superficie del electrodo. Pero la corriente también se puede relacionar con la velocidad de una reacción, por lo que directamente implica hablar de como el material, que se encuentra en algún punto de la solución, se transporta hacia la superficie del electrodo. Así, se pueden describir tres modos de transferencia de masa: migración, difusión y convección.

1. **Migración:** es el movimiento de un cuerpo cargado bajo la influencia de un campo eléctrico. Aquellos cuerpos cargados positivamente se desplazarán hacia el electrodo negativo y los cuerpos negativos en el sentido contrario [108]. La dirección del movimiento de dichos cuerpos será paralelo al campo eléctrico aplicado (Figura 2.5-A).
2. **Difusión:** es el movimiento de una especie neutra o cargada bajo la influencia de un gradiente de potencial químico, es decir, un gradiente de actividad o concentración. La especie en cuestión se trasladará desde la región de mayor concentración a la de menor concentración. La velocidad con

2.2.4. Procesos de electrodo

En un sistema electroquímico, en la interface electrodos/solución, se produce un movimiento de cargas que responden a dos tipos de procesos. Por lo general, estos dos procesos están presentes en una reacción electroquímica, pero dependiendo del tipo de perturbación o del tipo de respuesta, uno de ellos tendrá mayor importancia. Ellos son:

Procesos faradaicos. Este tipo de procesos responde a la Ley de Faraday, la cual establece que la magnitud del cambio químico causado por el flujo de corriente es proporcional a la cantidad de carga que pasa a través de la interface. De esta manera, en una celda electroquímica tanto las reacciones de oxidación (ánodo) como de reducción (cátodo) están gobernadas bajo esta ley.

Procesos no faradaicos. Tal como su nombre lo indica, en este tipo de procesos la ley de Faraday no se cumple, ya que no se produce una transferencia de electrones a través de la interface. En lugar de ello, los fenómenos como la adsorción y/o desorción de especies, solvente, etc, cambian la estructura de la interface electrodo/solución a medida que cambia el potencial de electrodo o la composición de la solución. En general, los procesos no faradaicos están asociados a corrientes capacitivas, de adsorción o relacionadas con fenómenos de superficie (pseudocapacitivas) [98].

Factores que afectan la velocidad de la reacción del electrodo

Consideremos la reacción 2.1 descrita anteriormente. En ella, podemos asignar que O sea una especie oxidada y que R sea su forma reducida, ambas presentes en la solución. En esta reacción, podemos decir que la velocidad de reacción estará gobernada por la velocidad de algunos de los siguientes procesos (Figura 2.4):

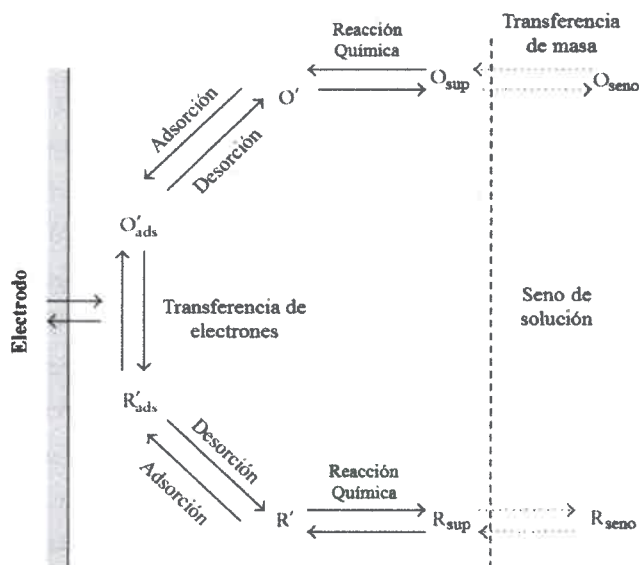


Figura 2.4. Diagrama general de los procesos que se llevan a cabo durante un proceso de electrodo.

para llevar a cabo una reacción) y celdas galvánicas (aquellas que mediante una reacción producen electricidad) [106]. Las celdas de dos electrodos son el modelo de celda más simplificado que existe, ya que sólo utiliza dos electrodos, un electrodo de trabajo (ET) y un electrodo de referencia/auxiliar (ER/CE) que cumple una doble función (Figura 2.3-A). Otro tipo de celda que usualmente se emplea cuando es necesario controlar el potencial del electrodo de trabajo, es la celda de tres electrodos. En ella, se introduce un electrodo auxiliar (CE) por el cual fluirá la corriente generada por la diferencia de potencial que se aplica entre el electrodo de trabajo (ET) y el electrodo de referencia (ER) (Figura 2.3-B) [107].

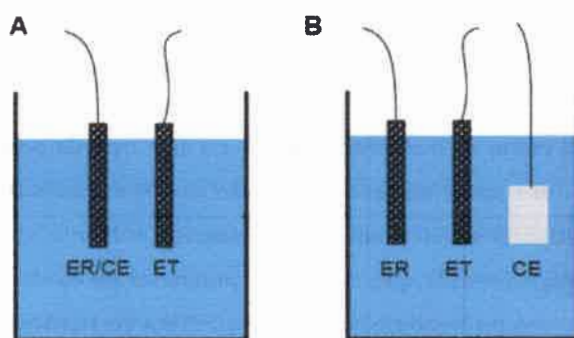


Figura 2.3. Descripción gráfica de una celda con dos (A) y tres electrodos (B).

Existen varios factores a considerar para la optimización de una celda electroquímica. Entre ellos se encuentra el volumen, que puede variar desde los 10 μL de solución (microceldas) hasta varios mL (celda en escala molar). De igual manera, la corriente que fluirá por la celda estará dentro de un intervalo que va desde los submicroamperes hasta los amperes. La resistencia específica de la celda puede estar comprendida entre los 2 $\Omega\text{-cm}$, que correspondería a una solución de HCl 1M, y los $10^5 \Omega\text{-cm}$, correspondiente a una solución 0,1 de acetato de sodio en ácido acético glacial [100].

Respecto a los electrodos, cada uno de ellos cumple una función determinada dentro del proceso electroquímico que se lleva a cabo en la celda. El electrodo de trabajo (ET), es un electrodo de material inerte, como el Pt, Pd, Au, o carbono (vítreo o grafito) y es donde se producen los fenómenos electroquímicos de interés. El electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE) igualmente está constituido por un material inerte, pero con la particularidad que su tamaño tiene que ser aproximadamente 200 veces mayor que el electrodo de trabajo. Esto se debe a que, en este electrodo, se generan las reacciones opuestas a las del electrodo de trabajo, por lo que la densidad de corriente que allí circula debe ser casi nula, para que la corriente total de la celda esté dada por los procesos que se generan sólo en el electrodo de trabajo [105]. El electrodo de referencia (ER) es un electrodo que proporciona un potencial conocido, constante y completamente insensible a la composición de la solución de estudio. Dentro de sus características ideales, el electrodo debe contener una cupla redox reversible y que obedezca a la ecuación de Nernst, presentar un potencial que sea constante con el tiempo y presentar poca histéresis con los cambios de temperaturas. Si bien no se conocen electrodos completamente ideales, algunos de ellos se aproximan bastante a esa situación [103].

Desde un punto de vista energético y termodinámico, para que se de una reacción electroquímica de oxidación o reducción, la FI o electrodo y la FII o analito en solución deberán tener una correspondencia entre sus niveles de energía para favorecer la transferencia de electrones desde el nivel de Fermi del electrodo hacia los últimos orbitales de valencia del analito en solución (FII) y viceversa. Esto se puede lograr mediante la aplicación de un potencial externo lo suficientemente negativo (reducción) o positivo (oxidación) sobre el electrodo y así poder controlar tanto la dirección como la extensión de una reacción electroquímica.

2.2.2. Variables electroquímicas

Para estudiar el comportamiento electroquímico de un sistema en condiciones potencioestáticas, se perturban las condiciones iniciales del sistema a través de ciertas funciones eléctricas aplicadas a la celda electroquímica, que constituyen las variables controladas, mientras se registra la respuesta del sistema, luego de aplicar los cambios controlados de dichos parámetros. Como ejemplo, es posible aplicar un salto o pulso de potencial a un electrodo en una celda electrolítica, para luego registrar la variación de la corriente o la carga en función del tiempo [98]. La Figura 2.2 muestra las variables que pueden ser controladas en un sistema electroquímico.

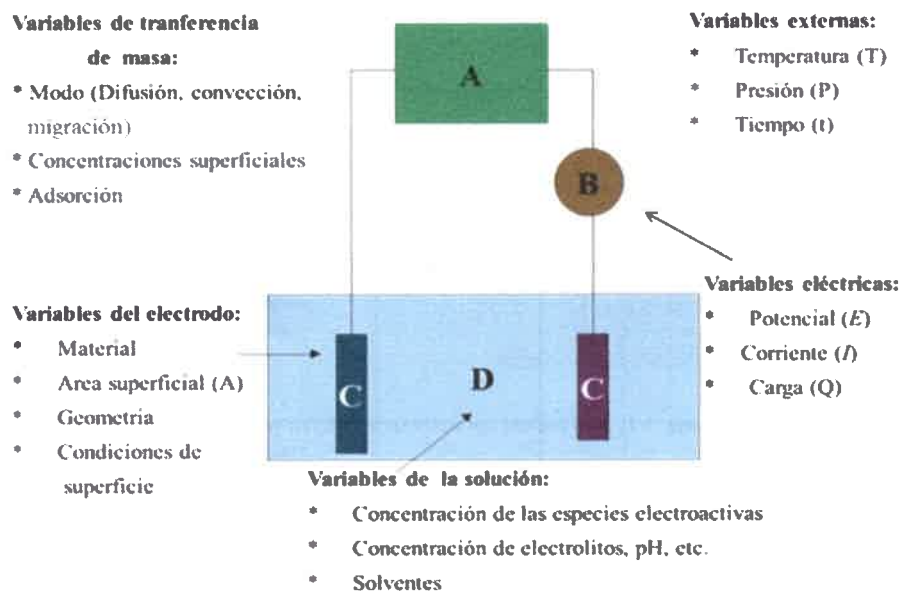


Figura 2.2. Variables que afectan la velocidad de una reacción de electrodo. A) Fuente de potencial, B) Microamperímetro, C) Electrodo, D) Solución electrolítica.

2.2.3. Celdas electroquímicas

Las celdas son una parte fundamental del desarrollo experimental electroquímico, ya que en ellas se puede observar la interacción entre dos interfaces de distinta naturaleza. En términos generales, una celda electroquímica es un sistema donde dos electrodos están separados al menos por una fase electrolítica y se pueden clasificar en dos tipos: celdas electrolíticas (aquellas que consumen electricidad

2.2. Sistemas electroquímicos

2.2.1. Fundamentos

En un sistema electroquímico se pueden diferenciar, al menos, dos fases (FI y FII), de igual o diferente naturaleza, que interactúan entre sí. Generalmente, una de las fases (FI) es un metal o semiconductor (electrodo) y la otra es un líquido (FII) que contiene el sustrato a estudiar. Para este tipo de sistemas (heterogéneo) es necesario mantener la electroneutralidad, por lo que deben ocurrir, al menos, dos hemireacciones de transferencia de carga en direcciones opuestas. Si se aplica una diferencia de potencial externa entre dos electrodos sumergidos en una solución electrolítica, en uno de los electrodos se favorece una dada reacción de oxidación o reducción, mientras que en el otro electrodo ocurre el proceso inverso. En ambos electrodos las interfaces sólido/líquido o líquido/líquido experimentan una distribución de cargas diferente a la del seno de la solución [105]. Conformado así el sistema electroquímico, es evidente que su caracterización cuantitativa pueda realizarse con aquellas variables propias de cualquier sistema fisicoquímico (concentración, temperatura, pH, etc.) más las variables adicionales propias de un sistema eléctrico, como el potencial y el flujo.

Potencial eléctrico: En general para que haya un flujo de cargas a través de la interface debe existir una diferencia de potencial eléctrico (E) definido como $\Delta E_{I-II} = (E_{FI} - E_{FII})$ y cuyo valor debe ser suficiente para superar la barrera energética del sistema (Figura 2.1).

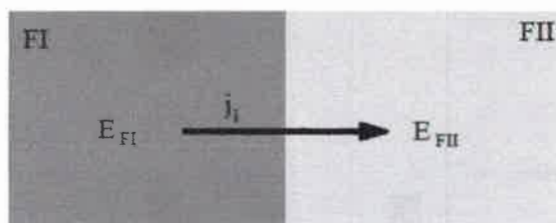


Figura 2.1. Diagrama de interface electroquímica

Flujo eléctrico: Otra característica importante es la velocidad con que las cargas atraviesan la interface. Así, el número de cargas eléctricas que, en la unidad de tiempo, cruzan la unidad de área de la interface se le conoce como flujo eléctrico (J_i).

La naturaleza del flujo eléctrico y el sentido del mismo dependerá de las propiedades intrínsecas del sistema fisicoquímico y de la diferencia de potencial eléctrico. El tipo de sistema electroquímico que se describió anteriormente, tendrá una corriente eléctrica (I) que puede fluir desde el electrodo (FI) a la solución (FII), produciendo en ésta un fenómeno de reducción, o bien desde la solución al electrodo ocurriendo en FII una oxidación [105]. De esta manera, la siguiente reacción representa tanto la oxidación como la reducción dependiendo de la dirección del flujo de los electrones.



2.1. Introducción

La electroquímica es la rama de la química que se ocupa de relacionar los efectos eléctricos con los químicos. Gran parte de este campo, estudia los cambios químicos causados por el paso de una corriente eléctrica o la producción de energía eléctrica mediante reacciones químicas [98]. Dicha corriente eléctrica, es representada por los electrones que fluyen entre el ánodo y cátodo de una celda electroquímica, en donde el proceso que se lleva a cabo, utiliza al electrón como reactivo para oxidar o reducir, evitando, así, el uso de agentes químicos externos [99]. Los fenómenos que se dan en la celda electroquímica fueron estudiados por Michael Faraday y otros investigadores Europeos, quienes dilucidaron sus principios básicos y las relaciones cuantitativas (corriente, potencial, carga, conductancia, capacitancia) que existen entre ellos antes de que se descubriera el electrón y se desarrollara la termodinámica [100]. A partir de estos conceptos, la electroquímica ha sido empleada para la caracterización de materiales, la síntesis de compuestos, la generación de energía y como herramienta analítica para la cuantificación de analitos, tanto orgánicos como inorgánicos. Esta última, conocida como electroanalítica, tuvo su mayor desarrollo a partir de la implementación de las técnicas de pulso o de barrido y del uso de electrodos de área muy pequeña (ultramicroelectrodos) [101]. En sí, esta técnica relaciona cantidades eléctricas como corriente, potencial o carga con propiedades químicas de una especie en particular.

El uso de medidas eléctricas con fines analíticos, ha encontrado una gran cantidad de aplicaciones en campos como el monitoreo ambiental, el control de calidad a nivel industrial y el análisis de compuestos biomédicos [102]. En términos generales, los métodos electroanalíticos tienen algunas ventajas frente a otro tipo de procedimientos analíticos, como la especificidad en los estados de oxidación de un mismo compuesto, los bajos costos de operación, etc [103]. Sin embargo, para utilizar la electroquímica como herramienta analítica, es necesario comprender de antemano aquellas reacciones que se llevan a cabo en la superficie del electrodo, por lo que experimentalmente es necesario disminuir aquellos factores ajenos al sistema en estudio y obtener así condiciones apropiadas de reproducibilidad. Por ejemplo, al adicionar un electrolito inerte a una concentración de aproximadamente 200 veces mayor que la del analito en estudio, se puede lograr que en el sistema electroquímico el efecto de la migración sea despreciable, la región interfacial esté lo más cerca posible de la superficie del electrodo y se disminuya la resistencia eléctrica en la solución. Es por esto que un estudio completo de las reacciones sobre el electrodo requiere de la determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos, los cuales son posibles de determinar mediante el uso de métodos de estado estacionario, de barrido lineal o cíclico, de saltos o pulsos de potencial o de impedancia [104].

Así, este capítulo comprende los conceptos fundamentales teóricos más necesarios respecto a los sistemas electroquímicos en sí y las técnicas empleadas para su estudio. También, se describirán los fundamentos por los cuales se rige la modificación de electrodos de oro con monocapas autoensambladas de tioles, la cual fue propuesta como metodología electroanalítica para la cuantificación de moniliformina en muestras reales.

2

CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Este capítulo corresponde a la descripción de los fundamentos teóricos de las técnicas electroquímicas y aquellas otras metodologías empleadas para el estudio de moniliformina.

analíticas capaces de detectarla y/o cuantificarla, surgen como herramientas de gran utilidad, ya que al menos ser capaces de detectarla es una metodología de prevención. De tal manera, esta tesis doctoral se desarrolló con el objetivo de generar nuevos conocimientos acerca de la micotoxina moniliformina que sirvan, o al menos contribuyan, al entendimiento y conocimiento de este metabolito que, hasta ahora, ha sido poco estudiado. Así, todos los resultados que serán mencionados a lo largo de este trabajo, corresponden a estudios realizados sobre las propiedades químicas de MON, especialmente, sus propiedades electroquímicas. Estas propiedades son únicas de MON, lo que permitió utilizarlas para el desarrollo de técnicas electroanalíticas, que hasta ahora y según nuestro conocimiento, no han sido informadas.

1.5. Hipótesis de trabajo

El presente trabajo de tesis doctoral se desarrolló bajo la hipótesis de que MON fuera electroquímicamente activa, es decir, que sufriera reacciones electroquímicas de óxido-reducción dentro de un intervalo de potencial accesible. En este sentido y teniendo en cuenta la estructura de la micotoxina, se planteó como hipótesis principal la factible oxidación electroquímica de MON debido a la presencia del grupo enolato en su estructura. Dicha oxidación sería estudiada tanto en medio acuoso como no acuoso y sobre diferentes superficies de electrodos.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio electroquímico de MON, se plantearían las posibles metodologías electroanalíticas para su detección tanto en muestras comerciales como reales. Estas metodologías se basarían en que, si la hipótesis principal se cumple, es decir, moniliformina es susceptible de sufrir reacciones electroquímicas, se podrían emplear electrodos con superficies modificadas que permitieran favorecer dichas reacciones electroquímicas a bajos valores de potencial, donde se minimizarían posibles respuestas electroquímicas por parte de otras moléculas presentes como interferentes en las muestras reales.

1.4. Moniliformina

Tabla 1.4. Diferentes métodos para la determinación de MON.

Metodología	Límite de detección (LOD) / ppb	Referencia
HPLC UV-Vis	39	Parich y col. [86]
	25	Munimbazi y col. [85]
HPLC Fluorescencia	20	Filek y col. [89]
TLC	50	Schütt y col. [90]
LC-Ms/Ms	10	Jestoi y col. [82]
	20	Sulyok y col. [94]
HPLC-(HILIC) UV-Vis	48	Sørensen y col. [95]
GC-Ms	5	Gilbert y col. [91]
IC	120	Kandler y col. [92]
Electroforesis capilar	100	Maragos [93]

1.4.6. Legislación

A pesar de la evidencia de la alta toxicidad que presenta MON, tanto en plantas como animales, y su alta ocurrencia a nivel mundial, no existe, hasta ahora, reglamentación o legislación comercial respecto de MON. Sólo se conoce de algunos trabajos que han informado valores de concentración de MON que podrían ser un riesgo tanto para animales como humanos. Uno de estos estudios realizado por Ledoux y col. estimó el valor máximo de concentración de MON al que podrían ser expuestas las aves de corral [68]. Los resultados mostraron un incremento elevado en la mortalidad de las aves cuando la concentración de MON excedía las 200 ppm. No obstante, con valores cercanos a 50 ppm, las aves presentaban problemas cardíacos. Por otra parte, un estudio determinó el valor de la dosis letal media (LD₅₀) para ratones, empleando la directriz OECD 423 (Organización para la Cooperación y el Desarrollo, siglas en inglés) [96]. Los estudios permitieron determinar que la LD₅₀ para MON es de 25 mg/kg B.W. (peso corporal, siglas en inglés), clasificándola dentro de la categoría 2 en la GHS (Sistema mundialmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos, siglas en inglés) y comparando su LD₅₀ con el de otras micotoxinas de *Fusarium* como la T-2 o HT-2. Además se informa que, clínicamente, la intoxicación aguda con MON presenta síntomas como debilidad muscular, dificultad respiratoria y daño al músculo cardíaco, confirmando, así, que el corazón es el órgano más afectado por la intoxicación aguda con MON. Un estudio similar realizado con el visón (*Mutela Vison*) también encontró los mismos síntomas presentados por los ratones y una LD₅₀ entre 2,2 y 2,8 mg/kg B.W., revelando que los visones son los mamíferos, hasta ahora, más susceptibles a una intoxicación aguda con MON [97].

Como se ha expuesto hasta ahora, la problemática existente en torno a las micotoxinas es amplia y requiere la participación de muchas áreas del conocimiento para hacer frente a este problema, especialmente, cuando se trata de toxinas como la moniliformina. La falta de estudios que confirmen sus propiedades toxicogénicas, su toxicocinética o su participación como agente tóxico en algunas enfermedades, conlleva a que MON sea tratada como una toxina altamente riesgosa, razón por la cual, técnicas

MON también ha mostrado interferencia con el metabolismo de los carbohidratos por inhibición de la transcetolasa y aldoreductasa [74, 80]. Igualmente, puede inducir oxidaciones nocivas en mioblastos, posiblemente, por inhibición de la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa [77].

1.4.5. Métodos analíticos

La determinación de MON es muy diferente al de otro tipo de micotoxinas, ya que esta presenta un bajo peso molecular, una alta polaridad y una acidez relativamente alta, lo que ha llevado a desarrollar métodos específicos para su extracción, purificación de las muestras y técnicas de separaciones cromatográficas [7, 81]. Se cree, también, que la naturaleza iónica de MON ha hecho difícil el análisis en cuanto al desarrollo de un método robusto que pudiera aplicarse a un gran número de muestras y que fuera fiable para dar altas y consistentes recuperaciones.

Debido a su alta solubilidad en agua, la extracción de MON desde las matrices reales no es simple, ya que existe una gran cantidad de impurezas que también son solubles en agua, por lo que varios métodos de limpieza resultan ser necesarios. Es por esto que se utilizan mezclas de solventes para su extracción, siendo las mezclas de acetonitrilo y/o metanol en agua las más utilizadas [56, 82, 83]. Para ser más eficiente y selectiva la extracción de MON de las muestras reales, Shepherd y Gilbert [84] utilizaron el hidróxido de *n*-tetrabutilamonio (TBAOH) como agente formador de par-iónico, mejorando así su extracción. Otros autores en lugar de utilizar el TBAOH, utilizaron el sulfato ácido de *n*-tetrabutilamonio (TBAHSO₄) logrando resultados similares [85]. Otros métodos de extracción utilizan las columnas de intercambio aniónico fuerte (SAX) en fase solida (SPE) [86], columnas C18-SPE [85] o una combinación de las dos [87].

Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para la detección y cuantificación de MON, principalmente, la cromatografía HPLC acoplada a detectores como UV-Vis o de fluorescencia [86, 88, 89]. Columnas C18 como fase estacionarias y mezclas de agua con solventes orgánicos y agentes par iónicos como fase móvil son las condiciones más usuales en este tipo de determinaciones. Otro tipo de cromatografías, como la cromatografía en capa delgada (TLC) [90], cromatografía líquida con detección de masas (LC-Ms/Ms) [82], cromatografía gaseosa con detección de masa (GC-MS) [91] o la cromatografía iónica [92] también han sido usadas para la detección de MON. También existen métodos de detección no cromatográficos como la electroforesis capilar [93]. En la Tabla 1.4 se resumen algunos valores de límites de detección (LD) informados para MON mediante las técnicas antes mencionadas.

inhibe reversiblemente la piruvato deshidrogenasa. El ciclo del ácido cítrico sería el menos afectado por MON, permitiendo una formación parcial del α -cetoglutarato quien se incorporará en uno de los pasos de oxidación [76] (Figura 1.4).

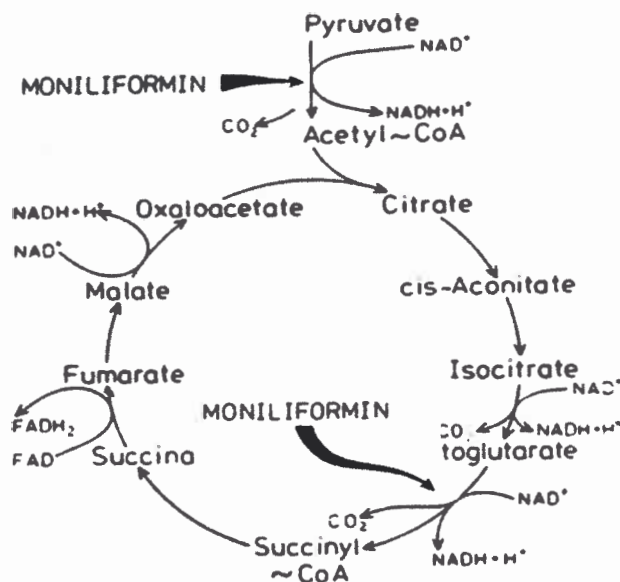
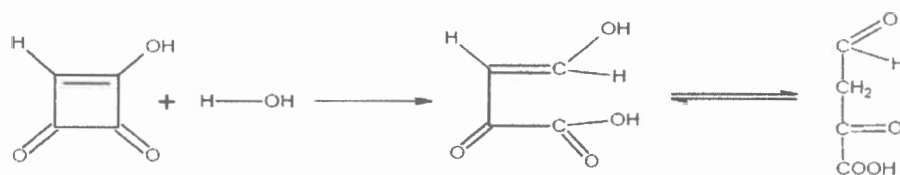
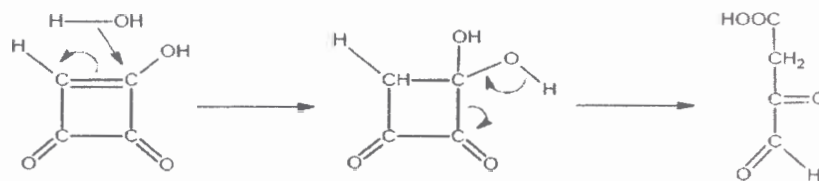


Figura 1.4. Mecanismo de acción tóxica de MON propuesto por Burka y col. y Gathercole y col.

Otros estudios revelaron que MON inhibe los sitios activos directos de la α -cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato descarboxilasa y acetohidroxiácido sintetasa, compitiendo con el piruvato por los mismos sitios de unión [77]. Esto se muestra en la Figura 1.5, donde una molécula de agua, al interactuar con MON de dos formas diferentes (Esquemas 1 y 2), rompe su forma cíclica y forma un oxaloacetaldehído que, estructuralmente, es muy similar al piruvato y a intermediarios presentes en la oxidación del α -cetoglutarato [78], compitiendo como se mencionó anteriormente [79].



Esquema 1



Esquema 2

Figura 1.5. Mecanismo de acción tóxica de MON propuesto por Foster.

1.4.2. Biosíntesis

MON es producida biológicamente a través de la ruta del acetato. Frank y Breipohl [63] y Apsimon [64] propusieron una biosíntesis para la formación de MON (Figura 1.3), en donde dos malonil-CoA se unen mediante una condensación para formar el 1,3-ciclobutadieno. Este intermediario es sometido a una oxidación enzimática, produciendo tres formas tautoméricas que finalmente son reducidas a MON.

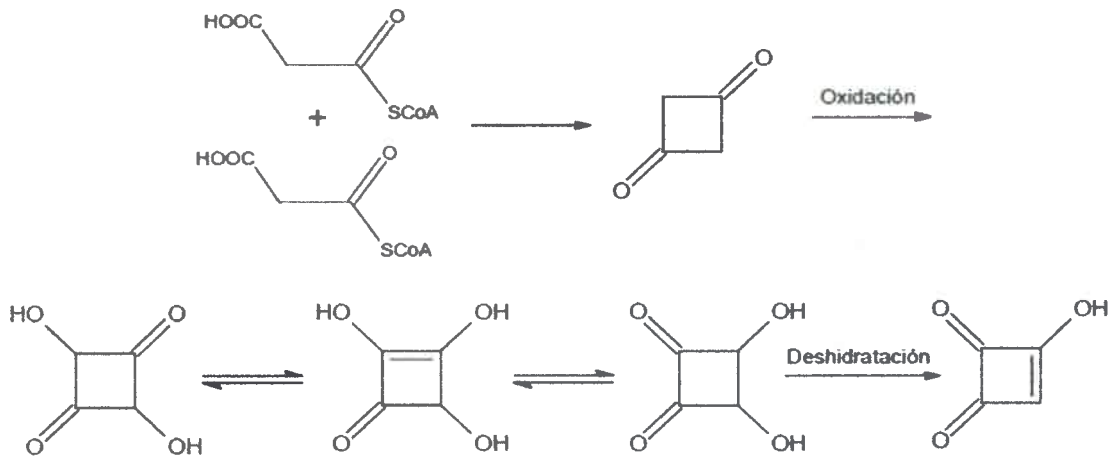


Figura 1.3. Biosíntesis de MON de acuerdo con Frank-Breipohl y Apsimon.

1.4.3. Toxicidad

Basados en los resultados obtenidos del Test de Ames, es posible que MON no presente actividad carcinogénica y/o mutagénica en humanos [65, 66], pero en animales sí existe evidencia sobre sus efectos tóxicos. Se conoce que la contaminación aguda con MON en animales genera debilitamiento muscular, dificultad respiratoria y degeneración del miocardio, entre otras [7]. Varios autores, como Kriek y col. [67] y Ledoux y col. [68] coincidieron en sus resultados. Ambos observaron cambios en la histopatología de órganos como riñones, pulmones y páncreas, seguido de coma y, finalmente, la muerte. Otras investigaciones demostraron que algunas micotoxinas, entre ellas MON, tienen una mayor toxicidad cuando se trabaja con alimentos infectados naturalmente que con aquellos infectados artificialmente [69], lo que supone la presencia de otros metabolitos secundarios aun no identificados. Pero, de igual manera, se presentan los mismos síntomas, aún usando diferentes animales de estudio [70-73].

1.4.4. Toxicocinética

Actualmente, la información sobre la toxicocinética de MON (absorción, distribución, metabolismo y excreción), ya sea *in vitro* o *in vivo*, es limitada. Algunos estudios sobre los posibles riesgos asociados con la ingestión de alimentos contaminados con esta micotoxina y sus posibles mecanismos toxicocinéticos ya han sido informados. Respecto al mecanismo de acción toxico de MON, Burka y col. [74] y Gathercole y col. [75] concluyeron que MON inhibe tanto la incorporación del piruvato en el ciclo del ácido tricarboxílico (CAT) como la oxidación del α -cetoglutarato, que es un intermediario en el CAT. Además,

1.4. Moniliformina

Moniliformina (MON) (3-Hidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona o ácido semiescuárico) es una micotoxina producida por al menos 30 especies de hongos del género *Fusarium*, siendo la especie *Fusarium proliferatum* su principal productor [56]. MON fue aislada por primera vez en 1973 de un cultivo de maíz proveniente de Nigeria, al cual se le detectó erróneamente una colonia de *Fusarium moniliforme*, derivando de allí su nombre [57]. Posteriormente, Munimbazi y Bullermann demostraron que MON provenía de la especie *Fusarium proliferatum* [56]. Su estructura química (Figura 1.2) fue caracterizada en 1974 por Springer y col. [58] como la sal de sodio o de potasio del ácido semiescuárico, previamente informado por Hoffmann y col. [59].

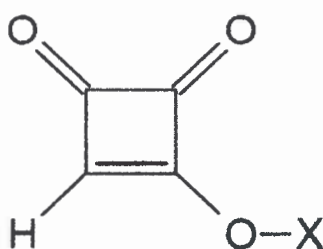


Figura 1.2. Estructura química de moniliformina. $X = H, Na$ o K .

1.4.1. Propiedades químicas

En la literatura se informa que la forma ácida de MON presenta un pK_a entre $0,0 \pm 0,05$ [60] y $1,7$ [61], considerándose así un ácido relativamente fuerte. Por otro lado, la estabilidad de MON fue estudiada a diferentes valores de temperatura y acidez. Dichos estudios, mostraron que MON es estable hasta valores cercanos a los $100\text{ }^\circ\text{C}$ y que, a medida que se aumenta el valor del pH desde 4 hasta 10, su estabilidad disminuye [62]. Otro estudio informó que cuando MON se encuentra en medios oxidantes, ésta se descompone para formar dióxido de carbono y ácido acético [63].

Algunas de las propiedades químicas de MON se presentan en la Tabla 1.3 [7]:

Tabla 1.3. Algunas propiedades químicas de moniliformina.

Propiedades	Valores
Formula empírica (ácido libre)	$H_2C_4O_3$
Peso molecular	98 g/mol
Coefficiente de extinción molar (ϵ) en agua	$19900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ a 270 nm $5400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ a 258 nm
Punto de fusión (ácido libre)	$158\text{ }^\circ\text{C}$
pK_a	$0,00 \pm 0,05$ a $1,7$

codifican proteínas y poseen intrones en la secuencia genómica, sectores que albergan la mayor variabilidad. Las porciones de exón de las secuencias están, por lo general, conservadas, lo que permite usar cebadores comunes para amplificar la secuencia de interés a partir de un número de diferentes especies. Las secuencias de diversas cepas se analizan con un software para crear árboles filogenéticos. Los patrones de ramificación se utilizan para inferir eventos de especiación y, en algunos casos, la época en que ocurrieron estos eventos.

1.3.2. Ciclo de vida

Las estructuras de reproducción sexual en los hongos se asocian generalmente con la aparición de condiciones desfavorables, como el invierno, al sequía o estrés nutricional. Estas estructuras son el resultado de la re-combinación genética entre dos cepas parentales y, por lo tanto, también desempeñan un papel fundamental en el aumento de la diversidad genética en el ciclo de la vida del hongo, que le permite la adaptación a dichas condiciones desfavorables [54].

En los hongos, los propágulos asexuales se producen a lo largo de todo el ciclo de vida. Para la mayoría de los hongos de *Fusarium*, la etapa asexual e hifas se producen continuamente mientras la fuente de alimento está disponible. Se destaca para las especies de *Fusarium* la producción constante y abundante de conidios, tanto macro como microconidios. La característica de forma fusoides de los conidios, la cual dio el nombre al género *Fusarium*, favorece su dispersión por aire y agua. [48].

Por lo general, la especie *Fusarium* está muy extendida en el suelo, las raíces y los tejidos vegetales aéreos, restos vegetales y otros sustratos orgánicos. Es común encontrar estas especies en las regiones tropicales y templadas, aunque también se han encontrado tanto en zonas desérticas como en zonas árticas. La infección de la planta puede ocurrir en cualquiera de sus etapas de desarrollo, desde las semillas de germinación hasta los tejidos vegetales ya maduros y dependerá del tipo de huésped y el tipo de especie [50, 55].

1.3.3. Impacto

Especies de *Fusarium* causan una variedad de enfermedades que afectan a la agricultura y la horticultura en todas partes del mundo. Entre las enfermedades más comunes producidas por *Fusarium* están el marchitamiento vascular, fusariosi de espiga o semilla, pudrimiento del tallo, raíz y corona. Algunas de las especies pueden generar diferentes enfermedades, dependiendo del huésped o de las condiciones ambientales.

En humanos y animales, las enfermedades causadas por *Fusarium* no están relacionadas directamente con el hongo, sino más bien, con el consumo de un producto alimenticio que ha sido colonizado por el hongo y contaminado con una o varias micotoxinas. En particular, el género *Fusarium* es capaz de sintetizar cientos de diferentes micotoxinas, entre las cuales, las más importantes para este género son las fumonisinas, tricotecenos y zearalenona [48].

Fusarium fue realizada por Wollenweber and Reinking en 1935 [50]. En su libro, *Die Fusarien*, los 1000 taxones encontrados fueron organizados en 16 secciones que contienen 65 especies, 55 variedades y 22 formas. Posteriormente, en 1983, Nelson y col. desarrollaron un sistema que estaba dividido en 75 especies, agregando nueva información taxonómica en base a su morfología, características de crecimiento y de reproducción [51]. El sistema de clasificación tuvo su última actualización en el año 2006, cuando se incluyó nueva información sobre la compatibilidad de apareamiento sexual y características moleculares usando variaciones en las secuencias de ADN. Con el advenimiento de las técnicas moleculares, la nueva taxonomía de *Fusarium* se basa en las relaciones filogenéticas delineadas en base al secuenciamiento de varios genes conservados. Actualmente se conocen más de 300 especies [52].

Los miembros de este género se aíslan de plantas o del suelo en regiones frías y cálidas de todo el mundo. Son endófitos y saprófitos, y son conocidos por sus capacidades como patógenos de las plantas. La mayoría de los miembros del género *Fusarium* producen una gran variedad de metabolitos secundarios, que varían mucho en la estructura química [53].

1.3.1. Taxonomía

La taxonomía de *Fusarium* permite identificar especies, entender las relaciones evolutivas entre las especies y facilitar la identificación y caracterización de nuevas especies. Para definir una especie en este género, se emplean tres conceptos: el concepto de especie morfológica, biológica y filogenética. Para nuevas especies, se deben aplicar, al menos, dos de estos enfoques para que la definición sea más robusta. El concepto de especie es un conjunto de caracteres que se utiliza para describir una especie y para diferenciarla de otra. Este concepto, proporciona el marco sobre el qué preguntas con respecto a las especies pueden ser formuladas y contestadas. Cualquier especie dada debe ser descrita por uno o por más de un concepto de especie. Los conceptos de especie son [48]:

Concepto morfológico de especie: en *Fusarium* las características morfológicas principales son la forma y el tamaño de los macroconidios, microconidios y presencia o ausencia de clamidosporas y el tipo y la presencia de células conidiógenas. Otros caracteres secundarios incluyen la morfología de las hifas en el cultivo, la producción y características de los pigmentos producidos, los olores detectables, la tasa de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios. Tradicionalmente, la mayoría de los diagnósticos se han basado, en gran medida, en estos caracteres morfológicos para llevar a cabo las identificaciones.

Concepto biológico de especie: este concepto agrupa individuos que pueden aparearse e intercambiar su información genética y producir descendencia fértil. Dado que este concepto se basa en la producción de los cuerpos fructíferos, es importante tener en cuenta que algunas de las especies no poseen teleomorfos conocidos.

Concepto filogenético de especie: este concepto se basa exclusivamente en las diferencias y similitudes que existen entre las secuencias de uno o varios genes. Por lo general, los genes empleados

- La continuidad o intermitencia de ingestión del alimento contaminado
- El peso del individuo y el estado fisiológico y de salud de éste
- La edad del individuo

Por su parte, la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC; *Internacional Agency for Research on Cancer*) tiene la siguiente clasificación para compuestos carcinógenos o potencialmente carcinógenos para el hombre [46]

- **Grupo 1:** agente carcinogénico en humanos.
- **Grupo 2A:** agente probablemente carcinogénico en humanos. Existe evidencia limitada sobre humanos, pero suficiente en animales.
- **Grupo 2B:** agente posiblemente carcinogénico. La evidencia tanto en humanos como en animales es limitada.
- **Grupo 3:** agente no clasificable como carcinogénico para humanos y no puede incluirse en otro grupo.
- **Grupo 4:** agente probablemente no carcinogénico. La evidencia disponible, tanto en humanos como animales, así lo sugiere.

Según la IARC, algunas micotoxinas son clasificadas de la siguiente manera [46]:

Tabla 1.2. Clasificación de algunas micotoxinas según la IARC.

Micotoxina	Clasificación
Aflatoxina B ₁	1
Aflatoxina M ₁	2B
Ocratoxina A	2B
Fumonisina B ₁	2B
Citrinina	3
Patulina	3
Moniliformina	3
Otras toxinas (Toxina T-2, zearalenona, doxinivalenol, nivalenol y fusarenona X)	3

1.3. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* pertenece a la familia de los Ascomicetes, dentro de la división *Ascomycota* y orden *Hypocreales* y posee especies anamorfás y teleomorfás [47, 48]. El género *Fusarium* fue descrito por primera vez por primera vez por Link en 1809 como *Fusisporium* [49]. Desde su descripción hace 100 años, la taxonomía de *Fusarium* ha ido cambiando. La primera gran clasificación taxonómica de

dos de aminoácidos. Por último, hay una categoría de compuestos no clasificados, dado que tienen un origen mixto, o bien porque no se conoce completamente su origen biosintético.

1.2.2. Ocurrencia

Las micotoxinas aparecen en diferentes variedades de hongos, aunque algunas de ellas son producidas por una sola especie de hongo, pero la mayoría son sintetizadas por más de una especie, como la roquefortina C, producida por 25 especies diferentes de hongos [42]. Entre las especies que más producen micotoxinas están los hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estas especies son saprófitas (especies no patógenas que se alimentan de materia orgánica) y, algunas otras, son patógenos facultativos de plantas.

De la gran variedad de micotoxinas existente, sólo algunas han sido estudiadas con mayor atención debido a su carácter carcinogénico. Entre ellas están: aflatoxina B₁, citrinina, patulina, S-zearalenona, fumonisina B₂, ocratoxina A y ergotamina. Por otro lado, dentro de las "micotoxinas emergentes" (fusaproliferina, beuvericina, eniantina y moniliformina) se sospecha su carácter tóxico y se espera sean estudiadas con más profundidad [13].

Entre los sustratos más apropiados para la biosíntesis de micotoxinas figuran los productos de origen vegetal (cereales y oleaginosas), ricos en proteínas y calorías, que constituyen gran parte de los productos de consumo masivo. El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas pueden ocurrir en los granos, durante el desarrollo de los mismos en la planta, durante su almacenamiento, o en cualquier otra etapa de la cadena alimentaria. Además, es posible encontrar en un mismo producto vegetal varias micotoxinas producidas por un mismo hongo o varias especies de hongos produciendo diferentes toxinas, a lo que se le llama "co-ocurrencia". Este fenómeno puede tener graves consecuencias debido a los efectos tóxicos sinérgicos [42].

1.2.3. Toxicidad

Cuando una intoxicación es causada por sustancias tóxicas de origen fúngico, se denomina micotoxicosis. Esto incluye también ingestión del hongos venenosos, granos, semillas, hojas, tallos, frutos o cualquier otro elemento que estuvo en contacto con un micelio u otra estructura fúngica. Los efectos adversos pueden afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente, al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunológico. Los síntomas causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas [43, 44].

Los principales factores que tienen influencia sobre la toxicidad de las micotoxinas, tanto en humanos como en animales, son [45]:

- La biodisponibilidad y toxicidad de la micotoxina
- Los sinergismos entre ellas
- La cantidad de micotoxina ingerida diariamente en función de la concentración de micotoxina y de la cantidad de alimento ingerido

y algunas otras causan daños en el sistema nervioso central, tanto en humanos como animales. Las intoxicaciones de éstos últimos, asociadas con los alimentos, han sido reconocidas o sospechadas durante muchos años. Sin embargo, la implicancia de las micotoxinas producidas por hongos se reconoció recién a principios de la década de los sesenta, con el descubrimiento de las aflatoxinas [39, 40].

1.2.1. Biosíntesis

La síntesis de las micotoxinas se produce a partir de diferentes precursores provenientes del metabolismo principal y bajo diferentes rutas sintéticas del metabolismo secundario. Sin embargo y a pesar de la diversidad de estructuras químicas en las micotoxinas, las rutas por las cuales pueden ser sintetizadas son pocas. El intermediario más importante en el metabolismo secundario de los hongos es la acetil coenzima A (acetil-CoA). La condensación de acetil-CoA con malonil-CoA lleva a la formación de policétidos o de ácidos grasos. En base a la taxonomía química, los metabolitos secundarios se clasifican en 7 grupos, 3 de los cuales involucran directamente a la acetil-CoA: a) los derivados de los ácidos grasos, b) los terpenos y esteroides, c) los policétidos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Principales micotoxinas agrupadas de acuerdo a su origen biosintético [41].

Categoría Biosintética	Micotoxinas Representativas
Policétidos	
Di-	Moniliformina
Tetra-	Patulina, ácido penicílico
Penta-	Ocratoxinas, citrinina, diplosporina
Hexa-	Maltoricina
Hepta-	Rugulosina, viomelina, viriditoxina, xantogmenina
Octa-	Ergocromos, luteoskirina
Nona-	Citreovorodona, citocalasinas, fumonisinas, zearalenona
Deca-	Aflatoxinas, ácido norsolorínico
Ácido tetramérico	ácido ciclopiazónico, ácido tenuazónico
Péptidos	Ergotamina, fomopsina
Aminoácidos	
Simple	Ácido aspergílico
Modificados	Brevianamida, alcaloides del ergot, roquefortina
Terpenos	
Mono-	Viridicatum toxina
Sesqui-	Tricotecenos
Di-	Paspalina, penitrem, paxilina

Otros grupos comprenden a los metabolitos, en cuyo camino bio-sintético no interviene el acetato (son los derivados de los intermediarios del ciclo de los ácidos tri-carboxílicos) y los metabolitos deriva-

que se puede dar en granos por la presencia de hongos del género *Fusarium*, también se pueden encontrar otro tipo de metabolitos secundarios tóxicos, que debido a su reciente descubrimiento o a su poca comprensión en su rol como micotoxinas no habían sido tenidos en cuenta. A estos metabolitos se les conoce como “micotoxinas emergentes”, entre los cuales se encuentra la moniliformina (MON), sobre la que hasta ahora y, según nuestro conocimiento, ningún estudio ha sido reportado respecto a su comportamiento electroquímico. De tal manera que los estudios y resultados descritos en esta tesis doctoral, resultan ser los primeros sobre MON.

1.2. Micotoxinas

En la naturaleza existe una gran variedad de especies de células, tanto procariotas como eucariotas. Dentro de las células eucariotas están los hongos, que son organismos filamentosos que carecen de clorofila y están formados por una serie de células alineadas, llamadas hifas. Son organismos heterótrofos, es decir, necesitan vivir sobre organismos vivos o muertos y se reproducen por la formación de esporas, que pueden ser tanto sexuales como asexuadas [35, 36]. Durante la fase de crecimiento, los hongos producen gran variedad de metabolitos, tanto primarios como secundarios, que pueden exhibir actividad biológica. Los metabolitos secundarios, como la penicilina o las micotoxinas, son especies químicas no esenciales para el crecimiento del hongo y son un simple producto del metabolismo primario. La función de estos metabolitos no ha sido bien establecida, pero se sabe que, por ejemplo, las micotoxinas pueden ser producidas como mecanismo de defensa o como mecanismo de competición frente a otros microorganismos del mismo entorno. También se cree que ayudan a los hongos parásitos para invadir otros huéspedes [37].

El término *micotoxina*, que deriva de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significa hongo y veneno, respectivamente, son compuestos de bajo peso molecular (≈ 700 Da) que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante su fase estacionaria, siendo a menudo asociada a la diferenciación y la esporulación (Figura 1.1) [38].

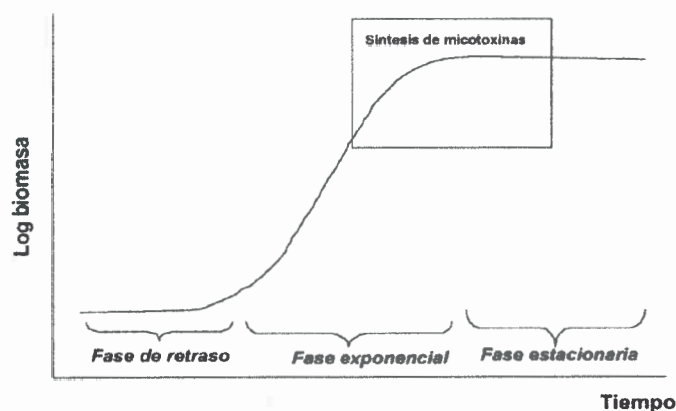


Figura 1.1. Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.

En cuanto a su toxicidad, algunas de estas micotoxinas son carcinogénicas, otras son vasoactivas

por esto que también se han incluido métodos oficiales de muestreo para monitoreos oficiales de niveles de micotoxinas en alimentos, los cuales fueron propuestos durante varias reuniones de la Comunidad Europea (EC, siglas en inglés) entre 2005 y 2006 [12].

En la determinación de las micotoxinas, la mayoría de las metodologías propuestas tienen varias etapas en común: muestreo, homogenización, extracción y limpieza de los interferentes de la matriz, separación y detección, usualmente, mediante técnicas cromatográficas combinadas con diferentes tipos de detectores o métodos inmunoquímicos [13]. Dentro de las detecciones mediante técnicas cromatográficas, la cromatografía HPLC prevalece sobre otras, como la cromatografía gaseosa (GC), la cual, requiere que la muestra sea derivatizada antes de ser analizada [14]. Hasta ahora, son pocos los métodos desarrollados en donde se puedan detectar varias micotoxinas a la vez, ya que las micotoxinas son compuestos con diferentes propiedades químicas y fisicoquímicas, lo que hace que se desarrollen métodos muy específicos para una sola micotoxina o para un grupo de micotoxinas con propiedades muy similares [12]. En cuanto a las técnicas inmunoquímicas, éstas utilizan materiales capaces de unir con una alta especificidad y afinidad a las micotoxinas sobre diferentes dispositivos. Estos dispositivos utilizan dos clases de formatos: aquellos que utilizan anticuerpos para aislar y purificar toxinas (columnas de inmunoafinidad, IAC) y aquellos que usan la interacción entre el anticuerpo y la toxina como método de detección (inmunoensayos) [15].

A su vez, las técnicas electroquímicas también han sido propuestas como metodologías para la detección y cuantificación de un gran número de micotoxinas, tanto en muestras reales (maní, vino, maíz) como a partir de los reactivos comerciales. Estas determinaciones electroanalíticas ofrecen límites de detección comparables con los de las técnicas colorimétricas o frente a detectores UV-Vis en HPLC, sin dejar de lado, en algunos casos, las etapas de extracción previas al análisis [16]. El grupo de investigación GEANA (Grupo de Electroanalítica, Universidad Nacional de Río Cuarto) ha realizado un gran aporte en lo referente a esta temática, publicando sus primeros resultados en 1997 sobre el comportamiento electroquímico de las micotoxinas más representativas del género *Alternaria alternata* [17] y sus constantes de acidez [18]. Más tarde, se informó sobre el estudio electroquímico de otras micotoxinas, como cercosporina (CER), altertoxina I (ATX-I), alternueno, zeralenona (ZEA), deoxinivalenol (DON), ocratoxina A (OTA) y citrinina (CIT) sobre diferentes electrodos de trabajo y utilizando diferentes técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica (VC) y de onda cuadrada (VOC) [19-25]. Estos estudios dieron los fundamentos necesarios para proponer determinaciones electroanalíticas de estas micotoxinas. Es así como se desarrollaron, por ejemplo, metodologías para la determinación de algunas micotoxinas del género *Alternaria alternata* o para cercosporina, utilizando electrodos de pasta de carbono o carbono vítreo, respectivamente [26, 27]. Más tarde, mediante la modificación de electrodos de oro con monocapas autoensambladas de tioles (MAEs), se propuso la cuantificación de la ZEA, CER, ATX-I y OTA [28-31]. Ya en los últimos años, los biosensores e inmunosensores aparecen como una alternativa para modificar los electrodos, confiriéndoles una mayor selectividad frente a su molécula prueba. Así se desarrollaron inmunosensores y biosensores electroquímicos para CIT y OTA [32-34].

Como se ha mencionado, en la mayoría de los estudios se ha enfatizado en las micotoxinas tradicionales, como las aflatoxinas, ocratoxina A y tricotecenos. Sin embargo, en la contaminación más común

en 119 países, de los cuales al menos 99 de ellos tenían a esa fecha reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o en las raciones [9]. Por otro lado, también se encontró un aumento tanto en el número de países que implementaron la norma como en la inclusión de otras micotoxinas y la ampliación del número de alimentos expuestos a estos patógenos. De esta manera, se asegura que el riesgo por intoxicación con micotoxinas sea cada vez menor y se mantenga la seguridad alimentaria. Desde 2001, la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de su Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JEFCA, siglas en inglés), han realizado sesiones exclusivas para incluir o reevaluar información acerca de las micotoxinas, siendo el informe del 2004 el último documento recopilatorio de toda la información concerniente a las micotoxinas, el cual hasta la fecha sigue siendo citado [10]. Por su parte, la *Association of Analytical Communities* (AOAC) y el Comité de Estandarización Europeo (CEN, siglas en Francés) han elaborado un gran número de métodos estándares para el análisis de micotoxinas, los cuales han sido validados por análisis inter-laboratorios. Su última edición, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, fue publicada en el año 2000 con más de 40 métodos validados para la determinación de micotoxinas [10, 11].

No todos los avances en el control de las micotoxinas han sido desarrollados para la detección y cuantificación de éstas. Desde un punto de vista más amplio, la contaminación por micotoxinas también ha sido estudiada desde otros ámbitos que permiten el aseguramiento de la calidad de los alimentos. Tomando como postura, “la prevención es mejor que la cura”, las HACCP (Análisis de peligro y puntos críticos de control, siglas en inglés) han sido implementadas en diferentes procesos, en donde el riesgo por contaminación por micotoxinas está presente. Esta metodología es adoptada debido a dos puntos de vista en particular [10]

- Las micotoxinas son compuestos estables y difíciles de remover una vez formados; en particular, ellos pueden sobrevivir a muchos de los procesos que involucran la preparación de un alimento.
- El análisis de las micotoxinas es complicado y requiere de un alto costo de dinero y tiempo [11].

Es por esto que tomar una postura de prevención es una estrategia apropiada y muy eficaz, si se tiene en cuenta la totalidad de la cadena de producción.

En materia de análisis, se han logrado grandes avances en cuanto se refiere al mejoramiento de las metodologías existentes o la creación de nuevos métodos para la detección y cuantificación de micotoxinas, en donde los bajos niveles de detección alcanzados, la complejidad de las muestras analizadas, la sensibilidad y la selectividad de los métodos han sido, mayormente, desarrollados en los últimos años. Pero no sólo las técnicas de detección o cuantificación son las principales protagonistas; la metodología empleada para realizar el muestreo juega un papel crucial a la hora de obtener resultados confiables frente a una posible contaminación de alimentos con micotoxinas. Esto se debe a que, generalmente, la concentración de micotoxinas en un lote de alimento se estima a partir de la concentración encontrada en una pequeña porción de muestra extraída del lote completo, es decir, la concentración de micotoxinas en todo el lote es asumida como la misma concentración de la muestra. Pero, algunas veces, la concentración de las micotoxinas en la muestra no refleja la concentración del lote, lo que lleva a una mala clasificación del mismo y, por lo tanto, genera riesgos tanto económicos como de salud [10]. Es

1.1. Generalidades

El aseguramiento de la calidad en los alimentos es un tema de gran importancia que constantemente está en desarrollo, sobre todo en esta era moderna, donde los alimentos se ven afectados por la reducción en cantidad y calidad que genera el deterioro microbiano, la contaminación física, química o biológica. Entre la contaminación biológica, tenemos aquella generada por algunas especies de hongos capaces de producir metabolitos tóxicos que pueden ser, en su gran mayoría, perjudiciales para la salud humana y animal. Estos metabolitos secundarios, llamados micotoxinas, son toxinas producidas por ciertos hongos microscópicos y han sido responsables de los mayores episodios epidémicos de envenenamiento en hombres y animales [1, 2]. Cuando los niveles de concentración de estas micotoxinas en alimentos son lo suficientemente altos, los efectos tóxicos producidos pueden ser calificados de agudos (por ejemplo, daños al hígado o deterioro del riñón), crónicos (por ejemplo, cáncer de hígado), mutagénico y teratogénico; y los síntomas resultantes van desde irritación de la piel a la inmunosupresión, defectos de nacimiento, neurotoxicidad y muerte [3].

Hasta ahora, la definición de micotoxinas no está totalmente definida, pero el concepto descrito por Pitt es el más aceptado, el cual describe a las micotoxinas como metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación ó absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar ó causar la muerte de animales (sin excluir las aves) y personas [4]. Esta definición fue adoptada por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), quien, además, considera a las micotoxinas dentro del grupo de los más importantes contaminantes de alimentos, debido a su impacto negativo sobre la salud pública y la seguridad alimentaria, afectando un amplio espectro de productos agrícolas, que incluye cereales, frutos secos, nueces, granos de café y semillas oleaginosas, los cuales son la base de la economía de muchos países en vía de desarrollo [5]. También, se estima que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, incluidos muchos alimentos básicos, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas, generando pérdidas del orden de los 1.000 millones de toneladas al año. Estos valores también fueron informados por Romagnoli y col. [6], indicando que alrededor del 25% de las cosechas anuales están contaminadas con algún tipo de micotoxina y que esos valores pueden ser aún mayores, del orden del 80% e incluso del 100%, y corresponden a aquellas regiones cuyos cultivos estuvieron sometidos a condiciones de estrés hídrico, ataque de insectos ó fueron cosechados y/o almacenados en condiciones inapropiadas. La Comunidad Europea, mediante la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) desarrolló el proyecto CFP/EFSA/CONTAM/2008/01, denominado "Información científica sobre las micotoxinas y sustancias tóxicas naturales de las plantas". Dicho proyecto tuvo como objetivo evaluar los riesgos para la salud humana y animal relacionada con estas sustancias en el futuro cercano. En este informe se realizaron evaluaciones de riesgo, recolección de información tanto de la parte química, toxicocinética y reglamentaria sobre las micotoxinas y las sustancias tóxicas de las plantas [7].

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas, en la década de los sesenta, se han establecido en muchos países reglamentaciones para proteger a los consumidores de los efectos nocivos de las micotoxinas que contaminan los alimentos [8]. Un informe por parte del Instituto Nacional para la Salud Pública y Medio Ambiente Italiano, realizado en 2003, reveló la existencia de reglamentaciones sobre micotoxinas

1

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen los fundamentos generales sobre los cuales se plantearon los objetivos de esta tesis doctoral y la hipótesis de trabajo utilizada.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Aportar datos noveles acerca del mecanismo de descarga electroquímica de la micotoxina moniliformina (MON), producida por, al menos, 30 especies de hongos del género *Fusarium*. Lograr conocimientos vinculados a las propiedades de electrodos nanoestructurados y su aplicación al desarrollo de nuevas técnicas electroanalíticas, más rápidas, sensibles, selectivas y económicas que las actuales en vigencia, para la determinación cuantitativa de esta micotoxina, lo que resultará de interés en áreas de alta demanda, como lo son la de la industria agroalimentaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el mecanismo de descarga electroquímica de la micotoxina MON sobre electrodos de diferentes materiales y aportar datos sobre sus propiedades termodinámicas y cinéticas.
- Estudiar las propiedades superficiales (adsorción) de MON sobre electrodos de distinta naturaleza.
- Estudiar las propiedades de electrodos nano-estructurados, tales como aquellos obtenidos con nanotubos de carbono, nano-partículas de oro y monocapas autoensambladas de tioles.
- Desarrollar nuevas metodologías electroanalíticas para la determinación de esta micotoxina, fundamentalmente, las técnicas voltamperométricas de pulso y de redisolución adsortiva, como alternativa a las actuales en vigencia (técnicas cromatográficas).
- Transferir los conocimientos relacionados con el desarrollo de estas nuevas metodologías analíticas a la determinación cuantitativa y selectiva de MON en matrices naturalmente contaminadas, particularmente, cereales.

5.5.2	Simulación de voltamperogramas cíclicos	105
5.6	Estudio espectrofotométrico de MON	110
5.6.1	Análisis de los espectros UV-Vis de MON	110
5.6.2	Determinación de los coeficientes de extinción molar de MON en medio no acuoso	111
5.7	Determinación de MON en medio no acuoso por VOC	111
6	Sensor electroquímico para la detección de mon	115
6.1	Consideraciones generales	116
6.2	Estudios sobre electrodos de oro modificados con MAE	117
6.3	Electrodos de oro modificados con MAE de cisteamina	120
6.3.1	Análisis de la respuesta electroquímica de MON sobre Au-CA	120
6.3.2	Ajuste de parámetros para la preparación de las MAE de cisteamina	122
6.3.3	Curva de calibración de MON en medio acuoso con MAE de cisteamina	124
7	Determinación electroquímica de mon en muestras reales	127
7.1	Generalidades	128
7.2	Determinación de MON por HPLC	128
7.3	Determinación electroquímica de MON	131
7.3.1	Electrodo de carbono vítreo desnudo	131
7.3.2	Sensor Au-CA	133
8	Conclusiones y perspectivas	135
	Bibliografía	138
A	Determinación del área del electrodo de carbono vítreo	147
B	Determinación del área del electrodo de oro	149
C	Electrodo de calomel saturado (ECS)	151
D	Electrodos de Ag/AgCl y Ag/Ag⁺	153
E	Módulo de altas velocidades de barrido de potencial	155

2.4	Electrodos modificados	46
2.4.1	Electrodos modificados con monocapas autoensambladas	48
3	Aspectos experimentales	57
3.1	Reactivos	58
3.1.1	Moniliformina	58
3.1.2	Solventes	58
3.1.3	Soluciones	58
3.1.4	Electrolitos soporte	59
3.1.5	Tioles	59
3.1.6	Muestras reales	60
3.2	Materiales	61
3.2.1	Celdas electroquímicas	61
3.2.2	Electrodos	63
3.3	Equipos	66
3.3.1	Potenciostatos	66
3.3.2	Espectrofotómetros	66
3.3.3	Cromatógrafos	66
4	Estudio electroquímico de mon en medio acuoso	67
4.1	Comportamiento electroquímica de MON	68
4.1.1	Moniliformina en medio neutro	68
4.1.2	Moniliformina en medio ácido	77
4.1.3	Moniliformina en medio básico	79
4.1.4	Convolución de voltamperogramas cíclicos	80
4.2	Estudio espectrofotométrico de MON	82
4.2.1	Análisis de los espectros UV-Vis de MON	82
4.2.2	Determinación de los coeficientes de extinción molar de MON en medio neutro	84
4.3	Determinación de MON en medio acuoso neutro por VOC	85
5	Estudio electroquímico de mono en medio no acuoso	87
5.1	Comportamiento electroquímico de MON	88
5.1.1	Moniliformina en acetonitrilo	88
5.1.2	Moniliformina en ACN y en presencia de ácido trifluoroacético	94
5.1.3	Moniliformina en ACN y en presencia de hidróxido de tetrabutilamonio	96
5.2	Convolución de voltamperogramas cíclicos	97
5.3	Electrólisis a potencial controlado	99
5.4	Voltamperometría cíclica a altas velocidades de barrido	102
5.5	Elucidación del mecanismo de reacción electroquímico de MON	104
5.5.1	Resultados experimentales	104

CONTENIDO

Objetivos	xiii
1 Introducción	1
1.1 Generalidades	2
1.2 Micotoxinas	5
1.2.1 Biosíntesis	6
1.2.2 Ocurrencia	7
1.2.3 Toxicidad	7
1.3 El género <i>Fusarium</i>	8
1.3.1 Taxonomía	9
1.3.2 Ciclo de vida	10
1.3.3 Impacto	10
1.4 Moniliformina	11
1.4.1 Propiedades químicas	11
1.4.2 Biosíntesis	12
1.4.3 Toxicidad	12
1.4.4 Toxicocinética	12
1.4.5 Métodos analíticos	14
1.4.6 Legislación	15
1.5 Hipótesis de trabajo	16
2 Conceptos y fundamentos teóricos	17
2.1 Introducción	18
2.2 Sistemas electroquímicos	19
2.2.1 Fundamentos	19
2.2.2 Variables electroquímicas	20
2.2.3 Celdas electroquímicas	20
2.2.4 Procesos de electrodo	22
2.2.5 Fenómenos de transporte de masa	23
2.2.6 Reversibilidad en procesos electroquímicos	24
2.3 Técnicas electroquímicas	26
2.3.1 Técnicas voltamperométricas	27
2.3.2 Técnicas amperométricas	39
2.3.3 Técnicas de pulso	43



ABSTRACT

The present doctoral thesis includes the study of the mechanism of electrochemical oxidation of moniliformin (MON) mycotoxin and the development of an electrochemical sensor for its quantification in maize real samples.

To carry out the studies of the electrochemical reaction, different electrochemical techniques, electrodes and reaction media were used. This allowed to apply different diagnostic criteria that led to the elucidation of a possible mechanism by which MON is oxidized electrochemically. Most of the studies were carried out in acetonitrile and using a glassy carbon electrode as the working electrode, since both have great advantages for mechanistic studies.

The results suggest that the MON electrochemical oxidation is a chemical–electrochemical–chemical (CEC) reaction, wherein the rate constant of the coupled chemical reaction following the electron transfer step could be determined by the transient capture equipment available in the Electrochemical lab of the Chemical Department of the Universidad Nacional de Río Cuarto. Moreover, it was found that the electrochemical reaction has a diffusion–adsorption mixed control, in which at low concentrations of MON, adsorption prevails over diffusion and, at high concentrations, the difusión control prevails. Taken this into account, a calibration curve for MON in acetonitrile using a bare glassy carbon electrode and adsorptive stripping methodology was constructed. A highly sensitive electroanalytical technique was obtained with a limit of detection of 0,001 ppb. This low limit of detection was obtained considering that the adsorption process increases tremendously the sensitivity of the technique.

Furthermore, an electrochemical sensor for the detection and quantification of MON based on gold electrodes modified with cysteamine self-assembled monolayers (Au–CA) was developed. The calibration curve constructed with this sensor allowed to obtain a limit of detection of 0,1 ppb and a relative standard deviation lesser than 4% in all concentration range studied. The detection limit of the sensor is almost 400 fold lower than those reported by other authors for the detection of MON using chromatographic methods, showing that the sensor proposed in this thesis have a good analytical performance. It was also possible to determine MON in maize samples contaminated “ex profeso” through the Au–CA sensor. The concentration value of MON determined using the sensor was in very good agreement with the determined by HPLC, which showed the good analytical performance of the sensor.

RESUMEN

La presente tesis doctoral comprende el estudio del mecanismo de oxidación electroquímica de la micotoxina moniliformina (MON) y el desarrollo de un sensor electroquímico como técnica electroanalítica para su cuantificación en muestras reales de maíz.

Los estudios mecanísticos de la reacción electroquímica involucraron tanto el uso de diferentes técnicas electroquímicas, como diferentes superficies de electrodos y diferentes medios de reacción, los cuales permitieron evaluar diferentes criterios de diagnóstico que llevaron a la dilucidación de un probable mecanismo, por el cual MON se oxida electroquímicamente. La mayoría de los estudios se llevaron a cabo en acetonitrilo y utilizando un electrodo de carbono vítreo, dada las ventajas que presentan ambos para estudios de esta naturaleza.

Los resultados obtenidos permitieron proponer que la oxidación electroquímica de MON es una reacción del tipo química–electroquímica–química (QEQ), en donde la reacción química posterior a la transferencia de carga tiene una velocidad de reacción tal que pudo ser determinada con el equipamiento de captura de transitorios disponibles en el laboratorio de Electroquímica del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Río cuarto. Por otra parte, se encontró que la reacción electroquímica presenta un control mixto, difusión–adsorción, en el cual, a bajas concentraciones de MON la adsorción predomina sobre la difusión y, a altas concentraciones, la difusión es quien controla la velocidad. Esta propiedad permitió el desarrollo de una técnica electroanalítica altamente sensible (límite de detección $\approx 0,001$ ppb) para la detección de MON en un medio no acuoso como el acetonitrilo y utilizando un electrodo de carbono vítreo desnudo, ya que al manifestarse el fenómeno de adsorción a bajas concentraciones, se pudo utilizar la metodología de redisolución adsortiva, la cual, aumenta significativamente la sensibilidad de la detección.

Por otro lado, se desarrolló un sensor electroquímico para la detección y cuantificación de MON en base a electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de cisteamina (Au–CA). Con este sensor se construyó una curva de calibración y se obtuvo un límite de detección de 0,1 ppb y una desviación estándar relativa menor al 4% en todo el intervalo de concentraciones estudiado. El límite de detección del sensor es casi 400 veces más bajo que los informados por otros autores para la detección de MON por distintos métodos cromatográficos, lo que demostró las buenas características analíticas del sensor propuesto en esta tesis. Además, fue posible la determinación de MON en muestras de maíz contaminadas “ex profeso” a través del sensor Au–CA. El valor de concentración de MON encontrado utilizando el sensor estuvo en muy buen acuerdo con aquel determinado por HPLC, lo que demostró el buen desempeño analítico del sensor.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y OTROS

Congresos

- Díaz Toro, P. C., Arévalo, F. J., Zon, M. A., Fernández, H.

Poster: ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA MICOTOXINA MONILIFORMINA EN MEDIO ACUOSO

XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Córdoba, Argentina, 2011

- Díaz Toro, P. C., Arévalo, F. J., Zon, M. A., Fernández, H.

Poster: ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA OXIDACIÓN DE MONILIFORMINA EN MEDIO NO ACUOSO

XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Rosario, Argentina, 2013

- Díaz Toro, P. C., Arévalo, F. J., Zon, M. A., Fernández, H.

Presentación Oral: DESARROLLO DE UN SENSOR ELECTROQUÍMICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA MICOTOXINA MONILIFORMINA

XXI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica (SIBAE). La Serena, Chile, 2014

OTROS

- Nelio R. Vettorazzi, María A. Zon, Patricia G. Molina, Adrian M. Granero, Fernando J. Arévalo, Sebastian N. Robledo, Paulo C. Díaz Toro, Cesar H. Díaz Nieto, Héctor Fernández

Capítulo de libro: Métodos de Análisis de Contaminantes

Libro: Métodos de Análisis de Contaminantes

Proyecto RIARTAS, 2014.

LISTA DE ARTÍCULOS

I . Díaz Toro, P. C., Arévalo, F. J., Zon, M. A., Fernández, H.

Studies of the electrochemical behavior of moniliformin mycotoxin and its sensitive determination at pre-treated glassy carbon electrodes in a non-aqueous medium

J. Electroanal. Chem. (2015), 738, 40-46

II . Díaz Toro, P. C., Arévalo, F. J., Zon, M. A., Fernández, H.

Very sensitive electrochemical sensor for moliniformin detection in maize samples

(2015), enviado.

CONTRIBUCIONES

Los artículos I y II son producto de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Dr. Fernández y Dra. Zon,

Reciban de mi parte mis más gratos y profundos agradecimientos por la confianza, apoyo, dedicación, tiempo y cariño brindado durante estos 5 años. Quiero que sepan lo inmensamente agradecido que estoy por haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo sin ni siquiera conocerme y confiando ciegamente en mis capacidades y habilidades. Gracias a ustedes, cumplí uno de mis objetivos personales y me siento totalmente confiado de que todo lo que he aprendido de ustedes me será de gran utilidad en mis nuevos proyectos. Muchas gracias por todo.

Dr. Fernando Arévalo,

Su acompañamiento durante este tiempo fue muy importante para mí, ya que sus enseñanzas y consejos me sirvieron para que no me dispersara ni perdiera de vista los objetivos propuestos. Es por esto que le agradezco sinceramente todo el tiempo y la disposición que me brindó durante todo el desarrollo de mi tesis.

Dra. Patricia Smichowski, Dra. Ana Baruzzi y Dra. Sofía Chulze,

Les agradezco el tiempo y la dedicación que tuvieron durante mi trabajo doctoral. Sus preguntas y acotaciones fueron fundamentales para el desarrollo de mi trabajo. Gracias por el acompañamiento.

Miembros del grupo de Electroanalítica, GEANA,

A todas aquellas personas que formaron parte de este grupo, les agradezco los buenos momentos compartidos en el laboratorio, en especial al Dr. Sebastian Robledo, que siempre me llevó la corriente en cuanto idea se me ocurría.

A los amigos,

Grandes amistades fueron forjadas durante estos 5 años, amistades que perdurarán en el tiempo y a los que les agradezco el acompañamiento durante este tiempo, ya que hicieron más llevadero el día a día con sus constructivas, amenas, culturales, filosóficas e intelectuales charlas a la hora del almuerzo.

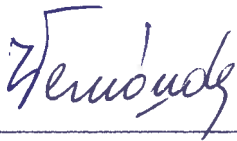
Compañeros becarios,

Gracias por el cariño, el compañerismo y los buenos momentos vividos. Deseándoles los mejores éxitos para sus carreras profesionales y personales.

CONICET y Universidad Nacional de Río Cuarto,

Debo dar un agradecimiento muy especial al CONICET y al Estado Argentino por permitir que yo, como extranjero, accediera a una beca doctoral para financiar mis estudios de posgrado. Gracias a su apoyo, hoy soy un profesional de alto nivel que está dispuesto a insertarse en la industria Argentina y contribuir al desarrollo del país. A la Universidad de Río Cuarto, le agradezco todo el apoyo brindado para que pudiera realizar mis actividades de la mejor manera y hacerme sentir un orgulloso egresado de esta universidad.

DIRECTOR Y CO DIRECTORA DE TESIS



Dr. Héctor Fernández



Dra. María Alicia Zon

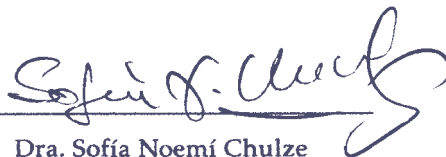
JURADOS DE TESIS



Dra. Patricia Nora Smichowski



Dra. Ana María Baruzzi



Dra. Sofía Noemí Chulze

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Nora Smichowski

Comisión Nacional de Energía Atómica, CNEA. Buenos Aires.

Dra. Ana María Baruzzi

INFIQC, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.

Dra. Sofía Noemí Chulze

Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química

***ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA MICOTOXINA
MONILIFORMINA. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS
ELECTROANALÍTICAS PARA SU CUANTIFICACIÓN***

DIRECTOR: Dr. Héctor Fernández

CO-DIRECTORA: Dra. María Alicia Zon

Tesis presentada por el Qco. Paulo César Díaz Toro a
la Universidad Nacional de Río Cuarto para optar
al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Abril, 2015

7.8889

MFN:
Clasif:
T.926



**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA MICOTOXINA
MONILIFORMINA. DESARROLLO DE
METODOLOGÍAS ELECTROANALÍTICAS PARA SU
CUANTIFICACIÓN**

Qco. Paulo César Díaz Toro



CREER...CREAR...CRECER

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química
Abril, 2015

DIAZ TORO, PAULO CES

Estudio electroquímico

73959

2015

73959