



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICA E INGENIERÍA**

**ESTUDIO E IMPLEMENTACIÓN DE DIVERSOS TIPOS DE  
SENSORES QUÍMICOS PARA ANÁLISIS EN ESTADO  
ESTACIONARIO Y FLUJO CONTINUO**

***TESIS QUE PRESENTA:***

**GIAAN ARTURO ALVAREZ ROMERO**

***PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
(QUÍMICA)***

***ASESOR: DRA. MARÍA TERESA RAMÍREZ SILVA***

**JURADO EVALUADOR:**

**DR. PABLO ROGELIO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

**DR. MARIO ALBERTO ROMERO ROMO**

**DRA. MARÍA TERESA RAMÍREZ SILVA**

**DR. CARLOS ANDRÉS GALÁN VIDAL**

**DRA. LAURA GALICIA LUÍS**

**Julio de 2003.**



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DENOMINACION DE LA TESIS

ESTUDIO E IMPLEMENTACION DE DIVERSOS TIPOS DE SENSORES QUIMICOS PARA ANALISIS EN ESTADO ESTACIONARIO Y FLUJO CONTINUO.

En México, D.F. se presentaron a las 11:00 horas del día 23 del mes de JULIO del año 2003 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

- DR. PABLO ROGELIO HERNANDEZ RODRIGUEZ;
- DR. MARIO ALBERTO ROMERO ROMO;
- DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA;
- DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL Y
- DRA. LAURA GALICIA LUIS

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última se reunieron para proceder al Examen de Grado de Doctor en:

CIENCIAS (QUIMICA)

GIAAN ARTURO ALVAREZ ROMERO



quien presentó una tesis producto de una investigación original cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, IV y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

*[Handwritten signature of Gian Arturo Alvarez Romero]*

GIAAN ARTURO ALVAREZ ROMERO  
FIRMA DEL INTERESADO

APROBAR LO

REVISO

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

*[Handwritten signature of Lic. Carmen Llorens Fabregat]*  
LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT  
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

PRESIDENTE

VOCAL

*[Handwritten signature of Dr. Tomas Viveros Garcia]*  
DR. TOMAS VIVEROS GARCIA  
DIRECTOR DE DIVISION

*[Handwritten signature of Dr. Pablo Rogelio Hernandez Rodriguez]*  
DR. PABLO ROGELIO HERNANDEZ RODRIGUEZ

*[Handwritten signature of Dr. Mario Alberto Romero Romo]*  
DR. MARIO ALBERTO ROMERO ROMO

VOCAL

VOCAL

SECRETARIA

*[Handwritten signature of Dra. Maria Teresa Ramirez Silva]*  
DRA. MARIA TERESA RAMIREZ SILVA

*[Handwritten signature of Dr. Carlos Andres Galan Vidal]*  
DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL

*[Handwritten signature of Dra. Laura Galicia Luis]*  
DRA. LAURA GALICIA LUIS

# *DEDICATORIAS*

*Al momento de planear estas dedicatorias tenía la firme intención no hacerlas tan largas como en mis tesis anteriores. Sin embargo, después de un buen rato sentado frente a la hoja en blanco, me parece que no sería justo dejar a la imaginación a aquellas personas que durante todo este tiempo han colaborado conmigo con su apoyo, presencia, amistad y compañerismo en alguna o algunas de las muchas etapas de mi trabajo doctoral.*

*En primer lugar, a Dios, por mantenerme en este camino y confiarme la responsabilidad de la sabiduría*

*A mi Mamá Vivis por el incondicional apoyo y amor que solo un padre puede darle a un hijo.*

*A Lisa y a Ewa por ese gran tramo de vida hemos compartido junto.*

*A toda mi familia, Abue Laurita, Tía Abuela Carmen, mis Tíos Chayo, Gerardo, Pepe, Lili, Rosa, Arce, Pablo, Mark, José Manuel, Linda, Alex, Quique, Huguín, Ma. Elena, Jesús, a mis primos Carmen, Sabás, Michelle, Andy, Rafa, Hersain, Paola, Alex y demás tropa, está por demás decir las razones de la dedicatoria.*

*A los “hermanos y hermanas” que la vida me ha permitido elegir, Inés, Gaby Mana, Mago, Silvita, Compadre, Brother, Claus, Chío, Alma, Jaz, Vero y Toño.*

*A mis amigos Ale, Gaby Valdéz, Gina, Maru, Mary Loo, Damaris, Ara, Juan, Vic, Tere, Alberto, Memo, Jose Luis (con todo y Abuelita), Fran, Tritu, Lety, Paty, Román y Rosendo.*

*A mis compañeros de laboratorio, de la UAMI y a todos los chicos de la licenciatura con los que tuve la oportunidad de convivir y que me soportaron como su maestro y/o como ayudante.*

*Por último, pero no al final, a Rafael Álvarez Oviedo, quien partió de esta vida cuando apenas iniciaba el camino del Doctorado. Mucho de lo logrado es gracias al ejemplo que siempre nos dio a mi Hermana y a mí.*

**GRACIAS YA TODOS QUE DIOS LES BENDIGA**

# **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento muy especial a la **Dra. Ma. Teresa Ramírez Silva** y a la **Dra. Adriana Morales Pérez** por haber confiado en mí para la realización del proyecto de tesis y por haber asesorado el mismo.

Agradezco al **Dr. Alberto Rojas Hernández** por las discusiones de las diferentes partes del trabajo experimental y por su ayuda en el manejo del programa SUPERQUAD.

Agradezco al **Dr. Pablo Rogelio Hernández Rodríguez** por el ISFETmetro proporcionado y la valiosa disposición siempre mostrada.

Agradezco al **Dr. Carlos Domínguez** por los ISFET proporcionados.

Agradezco al **Dr. Carlos Andrés Galán Vidal** por las facilidades otorgadas para el trabajo que se realizó en la Universidad del Estado de Hidalgo.

Agradezco al **Dr. Manuel Eduardo Palomar Pardavé** por sus valiosas sugerencias respecto a los polímeros conductores y por imágenes de AFM proporcionadas.

Agradezco al **Dr. Mario Alberto Romero Romo** por la ayuda en la traducción al inglés de los artículos de investigación que son fruto del trabajo presentado en esta tesis.

Agradezco al **CONACyT** por la beca-crédito otorgada con número de becario **113044** y por el proyecto **35323-E** que financió gran parte de este trabajo.

Agradezco a los Sinodales que han evaluado esta tesis: **Dra. Laura Galicia Luís, Dra. María Teresa Ramírez Silva, Dr. Carlos Andrés Galán Vidal, Dr. Pablo Rogelio Hernández Rodríguez y Dr. Mario Alberto Romero Romo** por el tiempo

dedicado y a sus valiosos comentarios que han mejorado en gran medida la presentación de resultados y conclusiones.

Finalmente, agradezco a la **UAM-I** por permitirme realizar mis estudios en sus instalaciones, y porque gran parte de mi vida ha estado íntimamente ligada a esta institución.

# ÍNDICE GENERAL

• INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
• ANTECEDENTES GENERALES.....	10
• CAPÍTULO 1. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	22
▪ 1.1 Metodología experimental para la primera parte.....	23
• 1.1.1 Reactivos utilizados.....	23
• 1.1.2 Equipo utilizado.....	23
• 1.1.3 Procedimiento experimental.....	24
• 1.2 Metodología experimental para la segunda parte.....	26
• 1.2.1 Reactivos utilizados.....	26
• 1.2.2 Equipo utilizado.....	26
• 1.2.3 Construcción del electrodo <i>composite</i> de configuración cilíndrica para soportar el Ppy-DS <sup>-</sup> .....	27
• 1.2.4 Desarrollo del ISE selectivo al ión DS <sup>-</sup> de configuración cilíndrica.....	27
• 1.2.5 Caracterización del ISE selectivo al ión DS <sup>-</sup> de configuración cilíndrica. Estudios en condiciones batch.....	28
• 1.2.6 Construcción del electrodo <i>composite</i> de configuración tubular para soportar la membrana de Ppy-DS <sup>-</sup> .....	28
• 1.2.7 Desarrollo del ISE selectivo al ión DS <sup>-</sup> de configuración tubular para determinaciones en flujo continuo.....	29
• 1.2.8 Diseño y caracterización del sistema potenciométrico para la determinación en flujo continuo de DS <sup>-</sup> .....	31
• 1.2.9 Optimización de la respuesta en flujo continuo del ISE tubular selectivo a DS <sup>-</sup> usando el método de optimización SIMPLEX.....	32
• 1.3 Metodología experimental para la tercera parte.....	33
• 1.3.1 Reactivos utilizados.....	33
• 1.3.2 Equipo utilizado.....	33
• 1.3.3 Construcción del biosensor y del electrodo auxiliar.....	34
• 1.3.4 Soporte del sistema de detección amperométrico en el sistema FIA.....	34
• 1.3.5 Sistema de análisis integrado para la determinación de β-D-glucosa.....	35
• 1.3.6 Condiciones experimentales y caracterización del sistema de análisis para β-D-glucosa.....	35
• PRIMERA PARTE.....	37
• CAPÍTULO 2. CÁLCULO DE CONSTANTES TERMODINÁMICAS USANDO SENSORES TIPO ISFET.....	38
• 2.1 Antecedentes.....	39
• 2.2 Parámetros analíticos de los sensores ISFET en medio acético glacial.....	43



• 2.3	Cálculo de constantes de disociación total de percloratos de bases protonadas.....	44
• 2.4	Resultados.....	44
• 2.5	Conclusiones.....	46
•	<b>CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE DISOCIACIÓN TOTAL EN ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL USANDO SUPERQUAD.....</b>	<b>47</b>
• 3.1	Antecedentes.....	48
• 3.2	Modelo químico para la determinación de constantes de equilibrio en medio acético glacial.....	49
• 3.3	Resultados.....	51
• 3.3.1	Determinación de constantes de disociación total para piridina, dietilamina y anilina y sus correspondientes percloratos protonados en ácido acético glacial aplicando Kolthoff y SUPERQUAD.....	51
• 3.4	Conclusiones.....	53
•	<b>SEGUNDA PARTE.....</b>	<b>55</b>
•	<b>CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE PIRROL EN PRESENCIA DE DSS SOBRE UN ELECTRODO COMPOSITE GRAFITO-RESINA EPÓXICA.....</b>	<b>56</b>
• 4.1	Antecedentes.....	57
• 4.2	Resultados.....	59
• 4.2.1	Estudio potenciodinámico.....	59
• 4.2.2	Estudio potencioestático.....	65
• 4.2.3	Caracterización mediante AFM.....	70
• 4.3	Conclusiones.....	70
•	<b>CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE ESI A BASE DE POLIPIRROL DOPADO CON DS<sup>-</sup> PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE DS<sup>-</sup> EN BATCH.....</b>	<b>72</b>
• 5.1	Antecedentes.....	73
• 5.2	Resultados.....	75
• 5.2.1	Estudios en batch con la configuración cilíndrica del ISE a DS <sup>-</sup> .....	75
• 5.2.2	Influencia del pH en la respuesta del sensor.....	77
• 5.2.3	Reproducibilidad de la respuesta del ESI.....	78
• 5.2.4	Estudio de la selectividad del ESI.....	79
• 5.3	Conclusiones .....	80
•	<b>CAPÍTULO 6. DESARROLLO DE UN ESI TUBULAR A BASE DE POLIPIRROL DOPADO CON DS<sup>-</sup> PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE DS<sup>-</sup> EN FLUJO CONTINUO.....</b>	<b>81</b>
• 6.1	Antecedentes.....	82

• 6.2 Resultados.....	84
• 6.2.1 Características de la respuesta del sistema de análisis y tiempos de estabilización .....	84
• 6.2.2 Curvas de calibración para el sistema de análisis .....	85
• 6.2.3 Optimización SIMPLEX de la membrana de Ppy-DS-.....	87
• 6.2.4 Tiempo de vida del sensor tubular dentro del sistema FIA.....	91
• 6.3 Conclusiones.....	92
<b>• TERCERA PARTE.....</b>	<b>94</b>
<b>• CAPÍTULO 7. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE <math>\beta</math>-D-GLUCOSA USANDO UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO TUBULAR ACOPLADO A UN SISTEMA FIA.....</b>	<b>95</b>
• 7.1 Antecedentes.....	96
• 7.2 Resultados.....	98
• 7.2.1 Configuración adecuada del sistema amperométrico dentro de FIA .....	98
• 7.2.2 Relación corriente de respuesta – tiempo .....	100
• 7.2.3 Respuesta típica a inyecciones de diferentes concentraciones de $\beta$ -D-glucosa .....	101
• 7.2.4 Tiempo Estudio a diferentes velocidades de flujo del sistema de análisis de $\beta$ -D-glucosa .....	103
• 7.2.5 Efecto de la longitud transversal de la superficie activa del biosensor sobre la respuesta del sistema de análisis de $\beta$ -D-glucosa.....	105
• 7.2.6 Efecto de la fuerza iónica sobre la respuesta del sistema de análisis para $\beta$ -D glucosa.....	108
• 7.2.7 Reproducibilidad y tiempo de vida media del sistema de análisis de $\beta$ -D-glucosa.....	109
• 7.2.8 Determinación de $\beta$ -D-glucosa en sueros comerciales.....	110
• 7.3 Conclusiones .....	113
<b>• CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>115</b>
<b>• PROYECCIONES DEL TRABAJO DE TESIS.....</b>	<b>120</b>
<b>• REFERENCIAS CITADAS.....</b>	<b>123</b>
<b>• ANEXOS.....</b>	<b>131</b>
• Anexo 1. Química de soluciones del ácido acético glacial como solvente. Titulaciones potenciométricas ácido-base y cálculo de constantes de equilibrio en este medio.....	132
• Anexo 2. Características, funcionamiento y construcción de sensores tipo ISFET.....	148
• Anexo 3. Teoría sobre la electropolimerización de polipirrol.....	160

- Anexo 4. Principios del Análisis por Inyección en Flujo.....174
- Anexo 5. Método de optimización SIMPLEX..... 189
- Anexo 6. Límites de detección y coeficientes de selectividad.....194

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

En la actualidad, es innegable la importancia que han adquirido las diferentes disciplinas encargadas de soportar las necesidades y tendencias que plantea el estilo de vida moderna del hombre. No sólo la industria en sus muy diversas vertientes de desarrollo y producción, también la medicina, la biotecnología, la ecología y hasta la industria militar han necesitado de la ciencia para su crecimiento, optimización y solución a problemas que años atrás se pensaban insalvables. Entre otras exigencias, se le ha planteado constantemente a la ciencia (en especial a la química) el desarrollo de sistemas de análisis para identificar, cuantificar y estudiar las características de diversas especies químicas de determinado interés. Tradicionalmente, estos sistemas de análisis deben cumplir con características puntuales e importantes como es: que brinden resultados altamente reproducibles, que sean lo suficientemente sensibles a la especie que se quiere determinar y que sean accesibles en cuanto a costos; con esto se asegura en cierto modo la confiabilidad en cuanto a los resultados a obtener. De esta forma, se han desarrollado sistemas que ahora resultan ampliamente conocidos tales como la cromatografía, espectroscopía, termogravimetría, electroforesis capilar y los electroquímicos, todos con sus diferentes modalidades y principios operativos.

Al paso de la modernidad, se ha incrementado la necesidad de reducir las etapas del proceso de análisis químico, no sólo para cuantificar sino para determinar características íntimas de diversas especies químicas de interés. Lo anterior se justifica si consideramos la reducción de costos que la industria siempre tiene como una prioridad, así como del tiempo de obtención de resultados

que puede ser crítico, por ejemplo, en medicina (determinación urgente de analitos en la sangre o desarrollo de fármacos) o ecología (monitoreo constante de analitos contaminantes o estudio de efectos de los mismo en el medio ambiente). De esta forma, se han planteado características adicionales a los actuales sistemas de análisis químico, tales como: que sean de pequeñas dimensiones, completamente automatizables y capaces de realizar estudios *in situ*; todo esto manteniendo el bajo costo además de hacerlos adecuados para estudios en campo. Esto ha motivado la búsqueda de estrategias para acoplar sistemas de análisis que cumplan con todas las características requeridas.

Considerando todo lo anterior, de entre los sistemas de detección de especies químicas existentes y que además sirven para obtener información termodinámica y cinética de éstas, resaltan por sus características los sensores químicos, que son dispositivos que responden selectivamente a alguna especie química de interés, a través de una interacción y/o reacción química y que transducen esta señal primaria, (que puede ser electroquímica, óptica, másica o térmica) a una señal secundaria que comúnmente es eléctrica.

Los sensores químicos de transducción electroquímica se han vuelto los más desarrollados pues comúnmente su construcción es más simple, por lo que resultan baratos, y se pueden miniaturizar fácilmente (combinándolos con la ingeniería de los chips se pueden llegar a miniaturizar hasta el orden de micras) lo cual resulta en la posibilidad de desarrollar sistemas de detección portátiles. Todo

lo anterior permite que su construcción en masa sea posible (solo por mencionar un ejemplo, tenemos al bien conocido electrodo de vidrio selectivo a ión  $H^+$ ).

Los sensores electroquímicos han encontrado amplia aplicación para la caracterización y cuantificación de diversas especies iónicas de sumo interés. En los laboratorios de investigación son sumamente usados para la determinaciones cuantitativas y como parte integral de equipos de titulación para la determinación de constantes de equilibrio termodinámico así como de potenciales REDOX de algunos compuestos químicos. Fuera de los laboratorios de investigación la característica de los sensores electroquímicos que más se explota es su capacidad de cuantificar especies químicas con precisión y exactitud. En los laboratorios de análisis clínico y en las unidades de cuidados intensivos se usan en estudios de sangre, orina y saliva para la determinación y cuantificación de colesterol, lactato, aminoácidos y cetonas. En las salas de emergencia se han empezado a utilizar para la determinación rápida y precisa de glucosa, sodio, potasio, creatinina, urea, oxígeno, dióxido de carbono, pH, amilasa, paracetamol, salicilato, aspartato, aminotransferasa, triglicéridos y amonio. Para el control de la glucosa en pacientes diabéticos, es muy conocido el uso de dispositivos comerciales para el autodiagnóstico, que también funcionan a base de un biosensor para glucosa. En los procesos biotecnológicos los sensores electroquímicos han encontrado gran aplicación sobre todo dentro de la industria de alimentos y bebidas. Se utilizan para monitorear los cambios de los componentes activos y productos de la fermentación durante la producción de

bebidas alcohólicas y para detectar o cuantificar la presencia de contaminantes o microorganismos no deseables. También se les llega a usar para monitorear las cantidades de sulfatos, xantina, colesterol, glutamato, alcoholes, aminoácidos, sucrosa, fosfato de inosina, glutamina, lactato, glucosa, ácido acético, peróxido de hidrógeno, tirosina, oxalatos, monoaminas y pH. En los últimos años, los sensores electroquímicos han sido utilizados para el monitoreo ambiental, ya sea para mediciones continuas en control diario de ecosistemas, o como parte integral de sistemas de alarma, se usan para detectar y/o cuantificar nitratos, fluoruros, sulfatos, fosfatos, potasio, sodio, calcio, fenoles, urea, pesticidas, fertilizantes, pH y para monitorear en lagos la demanda biológica de oxígeno.

El potencial de las aplicaciones de los sensores electroquímicos no terminan aquí, como se comentó al principio de esta introducción, una de las tendencias de los sistemas de análisis modernos es hacia la automatización. Es previsible, entonces, que la integración de los sensores electroquímicos como sistemas de detección a sistemas de muestreo simples y automatizables, como los sistemas de flujo continuo de líquido, resultaría en el desarrollo de un completo sistema de análisis automatizable capaz de reducir las etapas de análisis químico reduciendo con esto costos y tiempo de análisis, excelente para su aplicación en estudios en campo y capaz de realizar análisis *in situ* y/o *in vivo*. Desde finales de la década de los 70's y hasta actualmente se han propuesto y desarrollado diferentes configuraciones sensor electroquímico-análisis por inyección en flujo (FIA) para el análisis cuantitativo y característico de especies químicas de todo tipo, desde inorgánicas hasta de tipo biológico. Para finalizar, y sólo para resaltar



la importancia que tiene el desarrollo de sensores electroquímicos actualmente, de 1985 a 1989 se publicaron en diferentes revistas de divulgación científica 518 artículos relacionados con este tipo de sensores (desde detección hasta estudio de parámetros químicos de diversas especies), mientras que de 1994 a 1997 la cifra aumentó a 912 lo que justifica en la actualidad su tendencia a aumentar.

Planteado este panorama se justifica que la columna vertebral de este trabajo de investigación sean los sensores electroquímicos, donde se estudian novedosas aplicaciones para los mismos y se proponen configuraciones en flujo continuo para sistemas de análisis cuantitativo de algunas especies químicas. Teniendo en cuenta que en esta tesis se encontrarán estudios muy variados sobre diversos tipos de sensores electroquímicos, con objetivos igualmente diversos, la presente tesis se encuentra dividida en tres grandes partes, esto con el objeto de hacer más clara la comprensión y el raciocinio que lleva al cumplimiento de cada uno de los objetivos particulares que se desarrollan en cada una de ellas.

Antes de discutir el trabajo realizado, en la sección de Antecedentes Generales se hace una descripción general de un sensor químico, sus características y clasificación, y una descripción más en particular para los tipos de sensores químicos que se usarán en la experimentación.

En el capítulo 1 se encuentra toda la metodología experimental utilizada para la realización del trabajo. Después de este capítulo se encuentran las tres partes principales de esta tesis. En la primera parte, que contiene los capítulos 2 y 3, se describe la determinación de constantes termodinámicas de equilibrio de diversas bases y sus derivados en medio de ácido acético glacial usando

diferentes sensores químicos potenciométricos y diferentes técnicas de cálculo. Estos estudios son importantes dado que el método de titulación potenciométrica sigue siendo un método muy utilizado en la industria farmacéutica para estudiar y cuantificar diversos principios activos. En el capítulo 2 se realiza la aplicación de los sensores de transducción potenciométrica del tipo ISFET (*ion sensitive field effect transistor*, transistor de efecto campo sensible a iones) en medio de ácido acético glacial como alternativa a los electrodos de membrana de vidrio para el cálculo de constantes termodinámicas de especies en este medio. Los sensores ISFET han encontrado gran aplicación en medio acuoso, aunque su utilidad en otros medios no ha sido explotada. En el capítulo 3 se usan ISE (*ion selective electrodes*, electrodos selectivos a iones) comerciales con membrana de vidrio selectivos al ión  $H^+$  para determinar mediante titulaciones potenciométricas las constantes de disociación total de bases y de sus percloratos de bases protonadas usando el programa de ajuste estadístico SUPERQUAD, programa que, análogo a los ISFET, ha sido ampliamente usado para cálculos en medio acuoso pero que no se ha explotado su uso en medios diferentes a este.

En la segunda parte, que contiene los capítulos 4 a 6, se presentan los resultados para el desarrollo de un ISE novedoso para el análisis cuantitativo del ión dodecil sulfato, un surfactante muy utilizado en la industria de los cosméticos y productos de limpieza y que además representa actualmente uno de los principales contaminantes del agua. La construcción de este ISE estará basado en soportes *composite* grafito-resina epóxica y la polimerización de polipirrol (Ppy) dopado con los aniones dodecil sulfato ( $DS^-$ ), estrategia que ha sido poco aplicada

a pesar de las ventajas que brindan los polímeros conductores como membranas selectivas a iones. Se plantea también una estrategia para construir el sensor en una configuración tubular para su acoplamiento a un sistema FIA y acoplar un novedoso sistema de análisis para este ión. En el capítulo 4 se presentan los resultados para la caracterización electroquímica de Ppy dopado con el ión  $DS^-$  crecido con técnicas electroquímicas sobre el soporte *composite*. Una vez caracterizado el sistema químico a utilizar como medio de reconocimiento, en el capítulo 5 se presentan las características analíticas del mismo además de la determinación cuantitativa en batch del ión dodecil sulfato con base en la respuesta potenciométrica del sensor construido. En el capítulo 6 se describe el adecuado acoplamiento del ISE anteriormente mencionado a un sistema FIA y se presenta la caracterización analítica del este novedoso sistema de análisis en términos de la detección y cuantificación del ión  $DS^-$ .

En la tercera parte, que contiene el capítulo 7, se describe la construcción de una configuración alternativa a diseños comerciales para el acoplamiento a FIA de un novedoso sistema de detección amperométrico que contiene como electrodo indicador un biosensor (sensor químico que usa una especie biológica como agente de reconocimiento) tipo *composite* para la determinación cuantitativa de  $\beta$ -D- glucosa, analito que tiene una gran importancia en medicina y la industria alimenticia solo por mencionar algunas. La celda amperométrica debe arrojar respuestas confiables y ser mucho más barata que aquellas comerciales, muy caras por la infraestructura necesaria para su construcción. Se reportan los

resultados obtenidos para la caracterización de todo el sistema de análisis y la cuantificación de  $\beta$ -D-glucosa tanto en muestras sintéticas como en muestras reales (sueros glucosados).

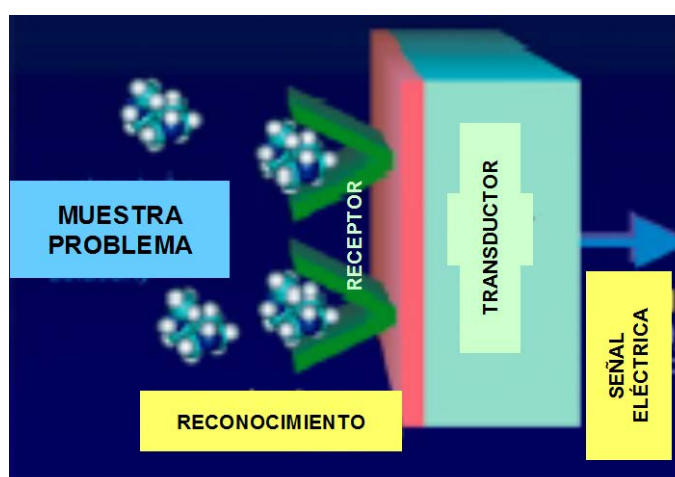
Descrito lo anterior, queda planteada la importancia del objetivo principal de este trabajo de investigación, *que es el de estudiar aplicaciones novedosas de diversos tipos de estos sensores, tanto para caracterizar como para cuantificar diversas especies químicas, así como integrarlos adecuadamente este tipo de sensores a un sistema FIA para realizar análisis cuantitativo de diversas especies químicas.*

Con esto, esperamos que el lector tenga una comprensión clara y lo más sistemática posible de los objetivos, planteamientos, resultados y conclusiones obtenidos en este trabajo.

# **ANTECEDENTES GENERALES**

- **1.1 SENSORES QUÍMICOS.**

Un sensor químico se puede definir como un dispositivo que responde de manera selectiva y cuantitativa a una especie química en particular a través de una reacción química transforma esta información en tiempo real a una señal eléctrica u óptica. En la figura 1, se ilustra el principio de funcionamiento de un sensor químico.



**FIGURA 1.** Funcionamiento de un sensor químico.

La gran ventaja que representan los sensores químicos sobre otros sistemas de detección es la simplificación de el proceso de análisis químico, dadas sus características como son, pequeñas dimensiones (lo que lo hace en la mayoría de las ocasiones portátil), se obtiene respuesta de manera continua, y en general son de bajo costo. Tradicionalmente los pasos del análisis químico son, en relación a la muestra a analizar: muestreo, transportación, tratamiento, separación, reacción, medida, procesamiento de datos, calibración y resultados; dado que con los sensores químicos se tiene un reconocimiento selectivo a la especie química de interés y que con ellos es fácil realizar pruebas de campo, los pasos se

simplifican a solo cinco: reconocimiento, medida, procesamiento de datos, calibración y resultados.

- **1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES QUÍMICOS.**

Existen dos clasificaciones principales para los sensores químicos:

*A. Según el agente de reconocimiento*

- *Quimiosensores*, que cuentan con un agente de reconocimiento químico.
- *Biosensores*, cuyo agente es biológico.

*B. Según el tipo de transducción*

- *Electroquímica*, en la que la señal generada por el reconocimiento puede ser por cambio de conductividad, de potencial o de corriente.
- *Óptica*, en donde se tienen cambios en la transmisión de luz, en su absorción, reflectancia, fluorescencia, refracción o polarización.
- *Másicos*, en donde se tienen variaciones en la masa o en la frecuencia resonante de cristales piezoeléctricos.
- *Térmicos*, donde se tienen variaciones en la temperatura.

- **1.3 SENSORES ELECTROQUÍMICOS POTENCIOMÉTRICOS.**

La potenciometría es una de las técnicas electroanalíticas más simples, siendo tradicionalmente usada para medidas de pH (con el famoso electrodo de membrana de vidrio), aunque también para determinaciones de diversos analitos .

El principio de las mediciones con técnicas potenciométricas está en la medida de un potencial de celda, que vendría a ser la diferencia de potenciales entre el

electrodo indicador (en este caso el sensor electroquímico) y un electrodo de referencia, en condiciones de corriente cero. El potencial de celda medido dependería de la naturaleza y selectividad del sensor electroquímico.

Principalmente se tienen dos técnicas de análisis donde se aplican los sensores electroquímicos potenciométricos:

- a. Potenciometría directa, donde el potencial de celda se relaciona directamente con la actividad o la concentración de la especie química a la que es selectivo el sensor,
- b. Titulación potenciométrica, donde se mide la variación del potencial de celda como función de la adición de algún reactante a la muestra.

Los electrodos selectivos a iones (ISE por sus siglas en inglés) son medias celdas electroquímicas que consisten en una membrana selectiva a iones y una solución interna. En la figura 1 se muestra una representación de esta configuración.

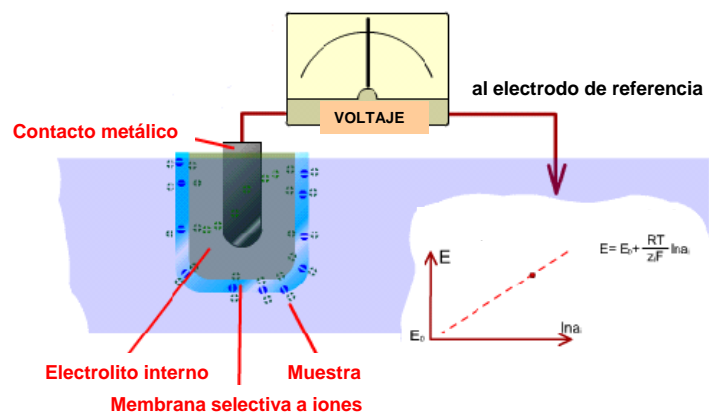


FIGURA 1. Esquema de un electrodo selectivo a iones



En la actualidad también se han desarrollado ISEs de configuración de “estado sólido”, esto es, consisten solo en una membrana selectiva a iones y un contacto sólido. Esta última configuración permite la miniaturización de los ISEs hasta el orden de nanómetros.

El potencial de membrana, que resulta de la distribución de potenciales eléctricos en las interfases de ambas caras de la membrana selectiva a iones, es la señal analítica importante. Se sabe que el potencial de celda es una contribución del potencial de referencia, del potencial de unión líquida y del potencial de membrana ( $E_m$ ); dado que el primero es independiente de la concentración de especie química a estudiar y que el segundo debe permanecer constante durante las mediciones, el potencial de celda depende primordialmente de las variaciones del potencial de membrana. Para una membrana que es idealmente selectiva al ión  $i$ , el potencial de membrana medido a corriente cero es una medida directa de las correspondientes actividades de este ión en las soluciones en contacto con la solución, en la ecuación A.1 se plantea la relación entre estas:

$$E_m = \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a'_i}{a''_i} \quad (A.1)$$

donde  $a'_i$  se refiere a la actividad del ión  $i$  en la muestra,  $a''_i$  a la actividad del ión  $i$  en la solución de llenado interno del ISE,  $z_i$  a la carga del ión,  $R$  a la constante universal de los gases,  $T$  a la temperatura y  $F$  a la constante de Faraday. Dado que la actividad del ión  $i$  en la solución interna es constante, el potencial de celda ( $E$ ) se puede definir como se muestra en la ecuación A.2:

$$E_m = E_o + S \log a'_i \quad (A.2)$$

donde S es la correspondencia a la pendiente de un gráfico calibración E vs log a'<sub>i</sub>, que en el caso ideal, es idéntica a la pendiente Nernstiana, 59.16 mV/z<sub>i</sub> a 25°C.

En la práctica, se deben considerar contribuciones en la respuesta de potencial debidas a la presencia de especies químicas interferentes. La respuesta real del ISE puede describirse satisfactoriamente a través de la ecuación de Nikolsky-Eisenmann, que se muestra en A.3.

$$E = E_o + S \log \left[ a'_i + \sum_{i \neq k} K_{ik}^{\text{pot}} (a'_k)^{\frac{z_i}{z_k}} \right] \quad (A.3)$$

donde  $K_{ik}^{\text{pot}}$  es llamado *coeficiente de selectividad*,  $z_k$  es la carga del ión interferente  $k$  y  $a_k$  corresponde a la actividad de este ión. El coeficiente de selectividad potenciométrico es una medida de la selectividad del ISE respecto a un ión  $k$  con respecto al ión principal  $i$ . Por ejemplo, un  $K_{ik}^{\text{pot}}=10^{-3}$  significa que la actividad del ión  $k$  tendría que ser mil veces la del ión  $i$  como para que interfiera en la respuesta del ISE.

Los ISE se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de la membrana selectiva a iones:

- a. Electrodo selectivo a iones primarios:
  - Electrodo de membrana de vidrio
  - Electrodo de estado sólido (membranas cristalinas)
  - Electrodo de membrana líquida
    - Electrodo de membrana de intercambio iónico
    - Electrodo de membrana a base de acarreadores neutros

- b. Electroodos selectivos a iones compuestos (membranas múltiples):
  - o Dispositivos de reconocimiento molecular, como selectivos a gases, y electroodos enzimáticos.
- c. Transistores de efecto campo selectivos a iones (ISFET, por sus siglas en inglés):
  - o Son electroodos selectivos híbridos de ISEs y transistores del tipo MOS (metal-óxido-silicio). Dado que se usan este tipo de sensores en parte de este trabajo de tesis, en el anexo 2 se hace una descripción amplia de los fundamentos operacionales del ISFET.

#### • 1.4 **SENSORES ELECTROQUÍMICOS AMPEROMÉTRICOS, BIOSENSORES.**

La amperometría está basada en la medición de una corriente a un potencial fijo en disoluciones que contengan especies REDOX. La corriente medida es el resultado de la oxidación o reducción electroquímica de especie electroactivas después de aplicar el pulso de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. En la figura 2 se muestra un esquema de una celda para mediciones amperométricas.

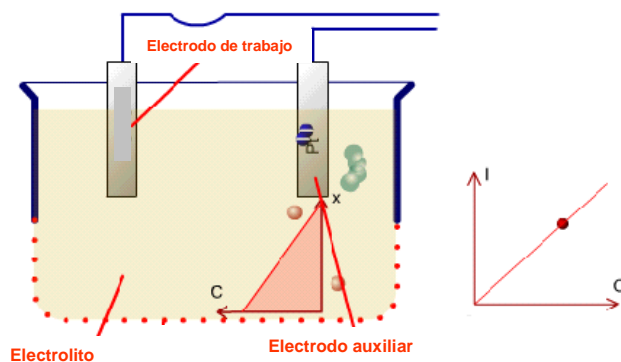


FIGURA 8. Esquema de una celda donde se realizan mediciones amperométricas.

La corriente límite ( $i_l$ ) medida en la oxidación de la especie O bajo condiciones hidrodinámicas controladas puede expresarse como:

$$i_l = nF A m_o c_o \quad (A.4)$$

donde  $n$  es el número de moles de electrones involucrados en el proceso,  $F$  es la constante de Faraday,  $m_o$  es el coeficiente de transporte de masa (que depende de la velocidad de flujo) y  $c_o$  es la concentración de la especie O.

Existen sensores electroquímicos que están basados en respuestas amperométricas a un analito determinado. Una gran cantidad de sensores electroquímicos amperométricos los constituyen los llamados *biosensores amperométricos*. Los biosensores son parte de la familia de los sensores químicos moleculares, en estos se mide la interacción entre la membrana selectiva y el analito, ya sea directamente, o a través de mediadores químicos. Su nombre se inspira en el hecho de que la membrana selectiva emplea biomoléculas, sitios de bioreconocimiento, o análogos de los mismos.

Para disponer de un biosensor que de respuesta adecuada en términos de precisión y exactitud, es necesario tomar en cuenta el componente biológico, el

transductor y sobre todo que la inmovilización del componente biológico sobre el transductor sea eficiente. Entre los componentes biológicos de reconocimiento molecular más empleados en el desarrollo de biosensores se encuentran las enzimas. Para conseguir una buena proximidad entre el agente de reconocimiento y el transductor, además de una buena fijación del primero, se han desarrollado una serie de técnicas de inmovilización; el empleo de una u otra depende del tipo de material biológico. Estas técnicas de inmovilización pueden dividirse en cinco bloques fundamentales: entrecruzamiento químico, enlace covalente, retención a través de una membrana inerte, adsorción física sobre la superficie de un sólido e inmovilización en una matriz polimérica. En los primeros biosensores construidos, la inmovilización superficial del material biológico se llevaba a cabo mediante procesos de vía húmeda, que son laboriosos y de un elevado costo, por lo que resultan procesos de escaso interés tecnológico por su difícil implementación en sistemas de fabricación masiva. Una estrategia novedosa, menos desarrollada, pero que implica un gran potencial por su simplicidad y economía, consiste en inmovilizar el material biológico en *composites* conductores. Un *composite* es la combinación de por lo menos dos componentes diferentes para formar un nuevo material, conservando las propiedades individuales de cada componente. En el caso de los *composites* conductores, estos se encuentran constituidos por dos partes: la fase conductora y la fase aislante o aglomerante; la función de la fase aislante es la de dispersar las partículas de conductor, si se emplea una parafina o aceite mineral se forma una matriz blanda, si se utiliza una resina comercial (epóxica, poliuretano, poliésteres o metacrilato) se forma una matriz rígida.

Los biosensores basados en transductores amperométricos van asociados generalmente a enzimas oxidorreductasas, en el caso particular de esta investigación se desarrollan biosensores de matriz rígida selectivos a  $\beta$ -D-glucosa donde el agente de reconocimiento es la enzima glucosa oxidasa. El principio de funcionamiento de estos biosensores se esquematiza en la figura 3.

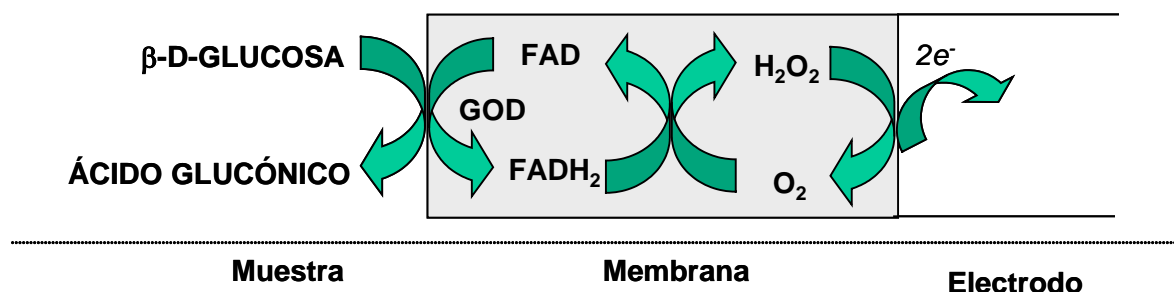


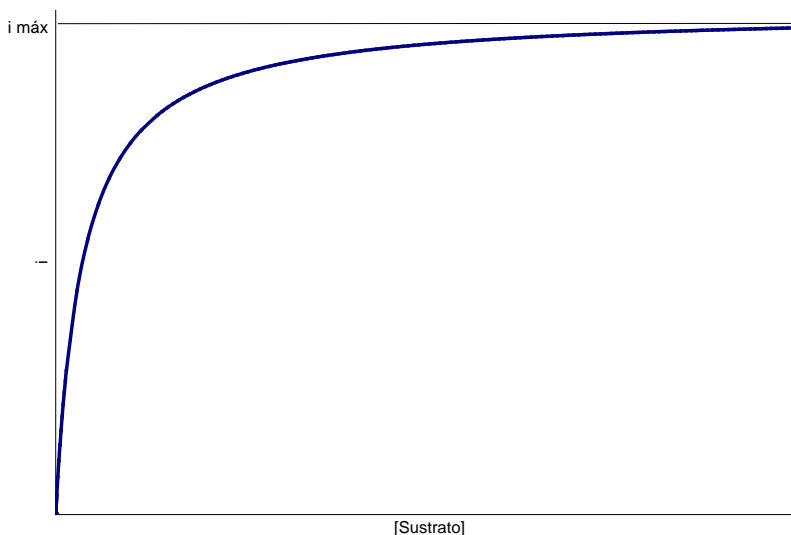
FIGURA 3. Esquema del funcionamiento químico de un biosensor para glucosa.

La  $\beta$ -D-glucosa entra en contacto con el sitio activo de la enzima en la superficie del biosensor, llevándose a cabo la oxidación de la misma para convertirse en ácido glucónico. Al mismo tiempo, el sitio activo de la enzima, que es el flavín-adenín-dinucleótido, pasa de su forma oxidada a su forma reducida. El sitio activo se regenera a partir de la reducción de oxígeno disuelto en la solución formando peróxido de hidrógeno. El potencial que se impone al biosensor es el adecuado para la oxidación del peróxido a oxígeno, se mide entonces la corriente producida durante esta oxidación. Así, la corriente medida será directamente proporcional a la cantidad de  $\beta$ -D-glucosa convertida; con una adecuada curva de calibración se puede relacionar esta cantidad con la cantidad total de  $\beta$ -D-glucosa en el sistema.

La respuesta del biosensor amperométrico está directamente relacionada con la velocidad de reacción catalítica de la enzima, así los perfiles de respuesta de un biosensor de este tipo se pueden relacionar con la ecuación de Michaelis-Menten considerando la velocidad como la corriente medida, en la ecuación A.5 se muestra esta consideración:

$$i = \frac{i_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (A.5)$$

donde  $i$  es la corriente medida,  $i_{\max}$  corresponde a la corriente máxima registrada cuando la totalidad de la enzima se ha saturado con el sustrato  $S$ ,  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten y  $[S]$  es la concentración de sustrato  $S$ . En la figura 4 se presenta entonces la forma típica para una curva de calibración de un biosensor amperométrico.



**FIGURA 4.** Curva de calibración característica para un biosensor de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten

En el caso de los biosensores, la enzima no se encuentra en solución, por lo que se prefiere renombrar la constante como constante aparente de Michaelis-

Menten. El valor de esta constante brinda un parámetro para medir la afinidad de la enzima por el sustrato, mientras más pequeña sea, más afín será la misma.

El biosensor para  $\beta$ -D-glucosa ha sido sin duda alguna uno de los más estudiados y utilizados, sin embargo, dadas su bajo costo y características de alta selectividad y sensibilidad, aún hoy en día se continúan buscando estrategias para su optimización, como el utilizar glucosa oxidasa modificada, estudiar adecuadamente la naturaleza de la activación del oxígeno en la semireacción de oxidación y estudio del microambiente en la enzima inmovilizada.



**CAPÍTULO 1.**

**METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

- **1.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA PRIMERA PARTE**

- **1.1.1 Reactivos utilizados**

Todos los reactivos utilizados son grado analítico marca Merck. Se destila el ácido acético glacial y se encontró por el método de Karl-Fisher una cantidad de agua menor al 0.005%. Se usa ácido perclórico al 72% para preparar una solución 0.1M en ácido acético glacial según recomienda Fritz [1], se añade la cantidad suficiente de ácido perclórico para preparar 500 ml de solución a 150 ml de ácido acético, se mezcla para después agregar 10 ml de anhídrido acético y se afora la solución, se deja reposar por 24 horas. El anhídrido acético reacciona con el agua para formar ácido acético. Posteriormente se usa tri-hidroxi-metil-amino-metano (TRIS) para estandarizar la solución. La titulación se realiza en un vaso adecuado para termostatación. Para la calibración se usa acetato de sodio previamente secado en una estufa a 200°C por 24 hrs. Se usaron piridina y anilina de Merck, y la dietilamina de Sigma, los cuales fueron destilados y almacenados en refrigeración y bajo una atmósfera de nitrógeno para prevenir su oxidación.

- **1.1.2 Equipo utilizado**

Para los experimentos potenciométricos se monta una celda compuesta por un electrodo de referencia comercial de calomelanos saturado Tacussel (XR900) especial para funcionar en medio de ácido acético glacial y ya sea un sensor tipo ISFET (Transistor de efecto campo selectivo a iones, por sus siglas en inglés) proporcionado por el Centro Nacional de Microelectrónica de Barcelona, España o

bien un ISE comercial de membrana de vidrio Tacussel (XG900) selectivo al H<sup>+</sup> y especial para ser usado en medio acético glacial.

Para registrar las lecturas de potencial del ISFET se usa un ISFETmetro proporcionado por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en México D.F.

Las lectura de potencial del electrodo de vidrio comercial se registran usando un potenciómetro de Radiometer Analytical PHM240.

Las titulaciones se llevaron a cabo usando un titulador automático de Tacussel TT-Processeur con el software TTP-2, conectado a una bureta automática de la misma marca.

Todas las operaciones, ajustes estadísticos y construcción de gráficos se realizaron con la ayuda de los programas Excel (Microsoft®) y Mathematica (Wolfram Research®).

### **. 1.1.3 Procedimiento experimental.**

Las titulaciones potenciométricas para la calibración del sistema electródico, tanto ISFET como ISE, fueron llevadas a cabo usando 40 ml de acetato de sodio 0.0279 M en ácido acético glacial y titulado esta base con la solución estandarizada de ácido perclórico. Se mantiene en todo momento la temperatura en  $25 \pm 0.1$  °C. Las curvas de titulación experimentales son comparadas con las curvas teóricas de pH para obtener así la sensibilidad del electrodo selectivo en las zonas ácida y básica dentro del solvente considerado. La calibración se lleva a cabo utilizando el método de Bierdermann y Sillén [2], ajustando los datos experimentales en las ecuaciones:

$$E = E^{\circ}_a + j_a [H_2Ac^+] - j_b [Ac^-] - gpH_2Ac^+ \quad (1.1)$$

$$E = E^{\circ}_b + j_a [H_2Ac^+] - j_b [Ac^-] + gpAc^- \quad (1.2)$$

Para una explicación más detallada del método de calibración utilizado, véase el anexo 1.

En el capítulo 2, con los datos de calibración correspondientes para el ISFET y curvas de titulación con ácido perclórico 0.1 M se hace el cálculo de las constantes de disociación total de las sales de perclorato de piridina (0.031 M) y dietilamina (0.024 M) protonadas usando el método de Kolthoff y Bruckenstein [3].

En el capítulo 3, con los parámetros obtenidos mediante la calibración del ISE comercial y los puntos de las curvas de titulación de las aminas mencionadas en el párrafo anterior a las mismas concentraciones, además de anilina (0.041 M), se usa la metodología de Bruckenstein y Kolthoff [3] para calcular las constantes de disociación total y de sus correspondientes percloratos de bases protonadas. Posteriormente se alimentan los datos de las curvas de titulación experimentales al programa SUPERQUAD y se plantean diferentes modelos químicos para los equilibrios involucrados en la titulación para realizar el ajuste de valores propuestos de constantes de equilibrios; de esta forma se comparan los resultados obtenidos aplicando ambos métodos. Para los resultados obtenidos mediante el método de Bruckenstein y Kolthoff, las incertidumbres se reportan en términos de la desviación estándar con respecto a la media. Para los resultados obtenidos usando SUPERQUAD, se obtiene la media para los resultados arrojados por el programa y se realiza la propagación de la incertidumbre que arroja el ajuste estadístico.

- **1.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA SEGUNDA PARTE**

- **1.2.1 Reactivos utilizados**

Se emplearon dodecilsulfato de sodio (DSS), cloruro de sodio y monómero de pirrol (Py) todos marca Merck. El monómero de pirrol fue purificado por destilación en una atmósfera de nitrógeno. Para construir los electrodos se usa polvo de grafito ultrapuro UNECO S.A. y resina epóxica Araldit-H.R. de CIBA-GEIGY. Todos los reactivos usados son grado analítico. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada.

- **1.2.2 Equipo utilizado.**

Para la electropolimerización potencioestática del polipirrol se utiliza una unidad amperométrica BAS LC-4C, para la electropolimerización potenciodinámica y para el estudio electroquímico de los polímeros formados se usa un potencioestato BAS 100B. Para la electropolimerización de la membrana de polipirrol (Ppy) se refieren los potenciales a un electrodo de referencia de calomel saturado Radiometer y un electrodo de platino como auxiliar.

Para la construcción de los electrodos que sirven de soporte para el Ppy-DS<sup>-</sup> se usan tubos de teflón para la configuración cilíndrica, y rodajas de poli(metacrilato de metilo) para la configuración tubular. Se usan contactos eléctricos y pequeñas placas de cobre.

Para depositar potencioestáticamente el Ppy-DS<sup>-</sup> sobre el soporte tubular, se construye un sistema de flujo continuo usando una bomba peristáltica ISMATEC con tubos de PTFE de 0.7 mm de diámetro externo.

Para construir el sistema FIA se acopla además una válvula de inyección de seis vías.

Las medidas de potencial de celda del sistema potenciométrico se llevan a cabo usando un potenciómetro Mettler Toledo MA235 y un electrodo de referencia Ag/AgCl Orion.

### - 1.2.3 Construcción del electrodo *composite* de configuración cilíndrica para soportar el Ppy-DS<sup>-</sup>.

Se construyen los soportes usando los tubos de teflón y contactos de cobre como se muestra en la figura 1. Se mezclan polvo de grafito con resina epóxica Araldit-H.R. en una proporción 1:1 y se rellenan los soportes, se deja curar la resina a 60° C por 24 horas y se pule la superficie del electrodo construido hasta que la superficie sea homogénea. Posteriormente se lija la superficie de manera que quede lo más homogénea posible.

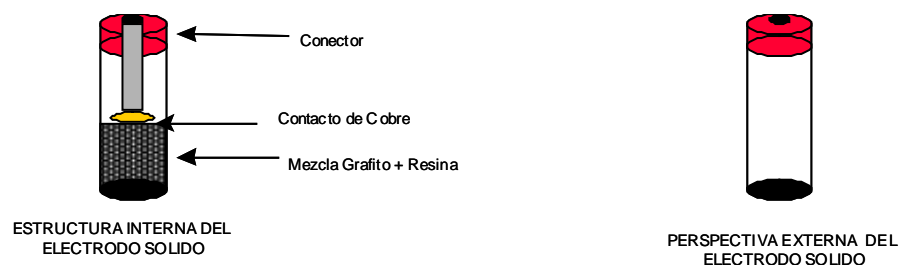


FIGURA 1. Esquema de los electrodos *composite*.

### - 1.2.4 Desarrollo del ISE selectivo al ión DS<sup>-</sup> de configuración cilíndrica.

Para preparar la membrana selectiva se sumerge el soporte *composite* en una solución 0.06 M del monómero de pirrol y  $8.5 \times 10^{-4}$  de DSS y se aplica un

potencial de 925 mV durante 36 minutos. Estas condiciones se escogen para poder comparar este sistema con el de flujo continuo que se describe posteriormente. Una vez crecida la membrana de polipirrol (Ppy) y previo a los estudios potenciométricos se deja activar el electrodo en una solución acuosa de DSS de concentración  $10^{-3}$  M durante 24 hrs.

- **1.2.5 Caracterización del ISE selectivo al ión  $DS^-$  de configuración cilíndrica. Estudios en condiciones batch.**

Las curvas de calibración se realizan midiendo el potencial del sistema electródico sensor-electrodo de referencia a diferentes concentraciones de DSS en un medio de NaCl 0.1 M, para aplicar el ajuste estadístico correspondiente y determinar los parámetros de sensibilidad y límites de detección.

Para estudiar la influencia del pH en la respuesta del electrodo se monitorea el potencial a una concentración fija de  $10^{-3}$  M de DSS y 0.1 M de NaCl variando el pH del medio.

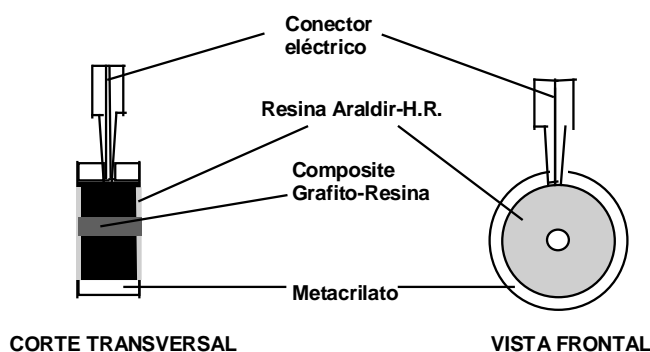
Para determinar los coeficientes de selectividad de los iones inorgánicos estudiados, se registra la respuesta del sensor en un medio de DSS  $10^{-3}$  M y de NaCl 0.1 M variando la concentración de la especie interferente en estudio.

La reproducibilidad se registra midiendo el potencial en varias ocasiones para una misma concentración de DSS  $10^{-3}$  M en NaCl 0.1 M. La reproducibilidad se registra en términos del error relativo respecto a la media de 20 mediciones.

- **1.2.6 Construcción del electrodo *composite* de configuración tubular para soportar la membrana de Ppy- $DS^-$ .**

El soporte *composite* de configuración tubular se construye de acuerdo a la tecnología propuesta por Alegret et al. [4]. Se usan los cilindros de poli-

(metacrilato de metilo) con diámetro de 0.7 cm rellenándolos con una mezcla de grafito y la resina epóxica Araldit-H.R. en una relación 1:1. Posteriormente se deja secar en una estufa a 60°C por 24 horas para que así solidifique el *composite*. Las partes expuestas del *composite* son aisladas con la misma resina epóxica y se deja de nuevo en la estufa para que solidifique el aislante. Una vez hecho esto, se taladra un orificio de 1 mm de diámetro en el centro de una de las caras del *composite* hasta atravesar el mismo, por este orificio pasará la solución en el sistema de flujo continuo. En la figura 1 se presenta un esquema de los soportes utilizados.



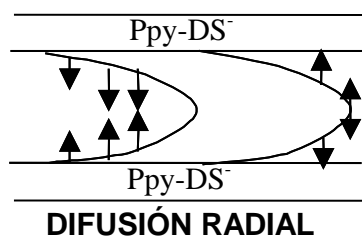
**FIGURA 2. Perspectiva del soporte para la membrana selectiva a DSS.**

### **- 1.2.7 Desarrollo del ISE selectivo al ión $DS^-$ de configuración tubular para determinaciones en flujo continuo.**

Para llevar a cabo el depósito del polímero dopado con los iones  $DS^-$  en las paredes de la luz interna del electrodo tubular descrito en la sección anterior, se aprovechan las características de transporte que se dan en un sistema de flujo continuo donde el número de Reynolds es menor a 2000, y por lo que se tiene

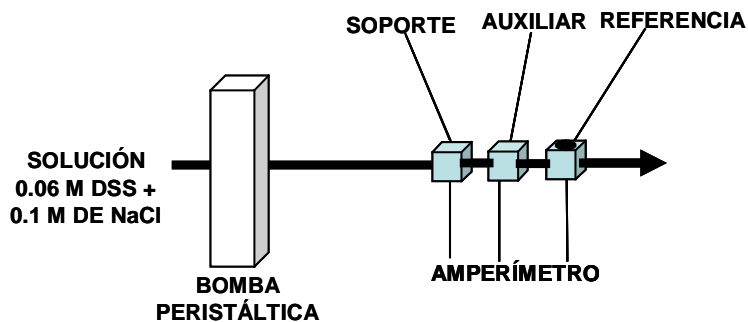


entonces un flujo laminar de régimen convectivo y la difusión radial predominará sobre la axial, como se indica en la figura 3.



**Figura 3. Perfil de difusión que se presenta en las paredes de la luz del soporte *composite* al paso de un fluido a través de él.**

Si se hace pasar una solución de Py y DSS por el electrodo de manera continua, al aplicar el potencial de oxidación suficiente para que inicie la polimerización del polipirrol, se espera que se lleve a cabo *in situ* un depósito homogéneo del polímero en la superficie cilíndrica interna del electrodo tubular. Debe mencionarse que la velocidad del flujo que pasa a través del electrodo no debe ser muy alta pues puede inhibir el crecimiento del polímero dopado, en el caso de este trabajo, la velocidad de flujo utilizada es de  $167 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . En la figura 4 se presenta un esquema del sistema utilizado para la polimerización *in situ* del Ppy-DS<sup>-</sup> sobre el soporte tubular.

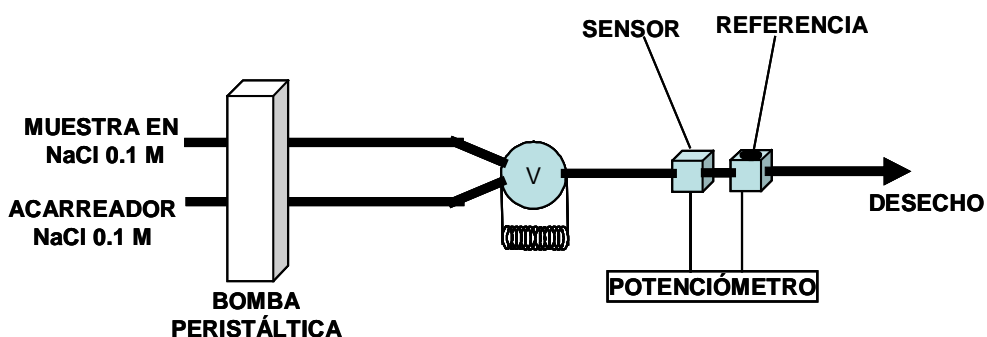


**FIGURA 4. Sistema en flujo continuo utilizado para la polimerización del pirrol en el soporte tubular.**

Las condiciones de electropolimerización se discuten más adelante.

- **1.2.8 Diseño y caracterización del sistema potenciométrico para la determinación en flujo continuo de DS<sup>-</sup>.**

Se acopla el sensor tubular a base de Ppy-DS<sup>-</sup> a la bomba peristáltica para conformar el sistema de análisis FIA con detector potenciométrico tubular que se muestra en la figura 5. Para la inyección dentro el sistema de las muestras a analizar se usa la válvula de seis vías.



**Figura 5. Sistema FIA para la determinación potenciométrica del ion DS<sup>-</sup> usando el sensor tubular.**

Una solución de NaCl 0.1 M se utiliza como acarreador, a una velocidad de flujo constante de 500  $\mu\text{l min}^{-1}$ . La muestra inyectada dentro del sistema tiene un volumen de 77  $\mu\text{l}$  y el volumen de transferencia (desde la válvula de inyección hasta el detector) es de 174  $\mu\text{l}$

El sistema construido es caracterizado inyectando diversas concentraciones de DSS en NaCl 0.1 M, para evitar la interferencia de iones Cl<sup>-</sup> en la respuesta. Se monitorea la respuesta del sensor respecto del tiempo para hacer estudios de estabilidad y tiempos de respuesta. Con la respuesta diferencial entre el potencial de respuesta a las diferentes concentraciones de DSS y el de la línea base, que

corresponde al paso del acarreador, se construyen las curvas de calibración pertinentes.

- **1.2.9 Optimización de la respuesta en flujo continuo del ISE tubular selectivo a  $DS^-$  usando el método de optimización SIMPLEX.**

La optimización del sensor tubular se realiza bajo las condiciones hidrodinámicas descritas en las secciones anteriores. Para aplicar la optimización SIMPLEX para el sistema de análisis, se escoge como variable a optimizar la sensibilidad del sistema en términos de su maximización. Dado que las características del sensor dependen de la adecuada polimerización de la membrana de polipirrol, los parámetros que se toman en cuenta para la optimización son los relacionados con la polimerización electroquímica. Dado lo anterior se escogen como variables a considerar las siguientes: concentración del monómero de pirrol, concentración de DSS, potencial de oxidación impuesto y tiempo de polimerización. Con esto tendremos un SIMPLEX de 5 vértices moviéndose en un espacio de 4 dimensiones. Los límites considerados para las variables antes mencionadas se muestran en la tabla 1 y fueron escogidos considerando el trabajo de Alizadejh et. al. [5] donde se realiza una optimización secuencial de la sensibilidad.

**Tabla 1. Límites considerados para las variables seleccionadas en la optimización SIMPLEX de la sensibilidad del sistema de análisis estudiado.**

[Pirrol] (M)	0.01 - 0.1
[DSS] (mM)	0.1 - 3
Potencial (mV) vs Ag/AgCl	650 - 1200
Tiempo de polimerización (min)	20 - 60

En el anexo 3 se hace una descripción más detallada del método SIMPLEX para lograr la optimización de un sistema.

### • 1.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA LA TERCERA PARTE.

#### - 1.3.1 Reactivos utilizados

Para preparar el *biocomposite* se usa polvo de grafito de ultra alta pureza Alfa AESAR, resina epóxica Epotek H77 de Epoxy Technology Inc. y enzima  $\beta$ -D-glucosa oxidasa obtenida a partir de *Aspergillus Níger* de Worthington Biochemical Corporation. Se usa  $\beta$ -D-glucosa, fosfato ácido de sodio, fosfato diácido de sodio y cloruro de sodio todos Merck.

#### - 1.3.2 Equipo utilizado

Para construir el sistema de muestreo se usa una bomba peristáltica ISMATEC, una válvula de inyección OMNIFIT de 6 vías, y tubos de PTFE de 0.7 mm de diámetro interno. Para soportar los electrodos se usan celdas de poli(metacrilato de metilo). Como electrodo de referencia se usa un electrodo Orion Ag/AgCl. Para registrar la respuesta del sistema de detección se usa una unidad

amperométrica BAS LC-4C. El volumen de muestra inyectado en el sistema es de 77  $\mu$ l.

### **- 1.3.3 Construcción del biosensor y del electrodo auxiliar.**

Se usa la misma metodología que se describió en la sección 1.2.6. Se rellena la rodaja con el *biocomposite* resina epóxica-grafito-glucosa oxidasa en una proporción 1:1 de los dos primeros y el equivalente al 5% del peso de ambos corresponde a lo que se añade de la enzima. Se deja curar por 48 horas a 40°C. Se aíslan los extremos expuestos del *biocomposite* con resina epóxica Araldit H.R. y posteriormente se perfora el centro del electrodo haciendo un orificio de 0.7 mm de diámetro

Como electrodo auxiliar se usa un electrodo tubular construido del mismo modo que el biosensor, sólo que el *composite* contiene resina epóxica y polvo de grafito exclusivamente.

### **- 1.3.4 Soporte del sistema de detección amperométrico en el sistema FIA.**

El biosensor construido es soportado dentro del sistema FIA usando un soporte construido con poli-(metacrilato de metilo). El soporte consta de dos partes, las cuales se unen la biosensor a manera de “sandwich” y usando juntas de goma para evitar fugas. El electrodo auxiliar se soporta usando una celda de las mismas características que para el biosensor.

### - 1.3.5 Sistema de análisis integrado para la determinación de $\beta$ -D-glucosa.

En la figura 6 se muestra un esquema del sistema de análisis integrado. Se estudia la influencia en la respuesta de la posición en el sistema de cada uno de los electrodos del sistema amperométrico de detección.

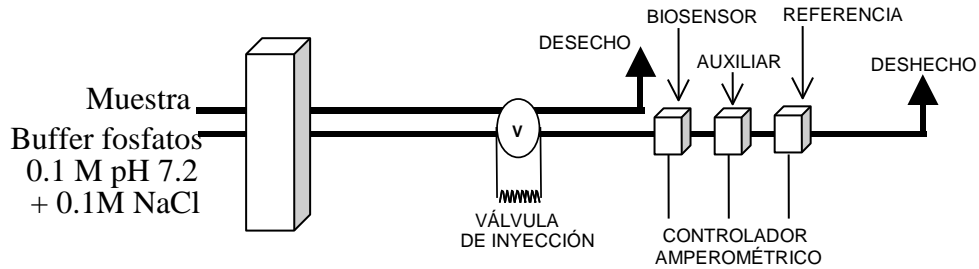


Figura 6. Esquema del sistema de análisis propuesto para la  $\beta$ -D-glucosa.

### -1.3.6 Condiciones experimentales y caracterización del sistema de análisis para $\beta$ -D-glucosa.

Se impone un potencial de 1150 mV, que corresponde al potencial de oxidación del peróxido de hidrógeno, y la sensibilidad del amperímetro se ajusta a 5  $\mu$ A. Una vez contruidos los electrodos de trabajo y auxiliar se prueban diferentes configuraciones dentro del sistema FIA, de modo que se minimice el ruido de la línea base correspondiente a la respuesta en ausencia de  $\beta$ -D-glucosa. Como se aprecia en la figura 2, para la caracterización del sistema se usan dos canales de la bomba peristáltica, uno para inyectar el acarreador que consiste en un amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.2 en NaCl 0.1 M; y el segundo canal se usa para inyectar las muestras de  $\beta$ -D-glucosa al sistema. Se realiza el análisis estadístico de resultados para obtener curvas de calibración y así estudiar la sensibilidad, los límites de detección y el tipo de relación corriente-concentración.

Se realizan pruebas de sensibilidad a diferentes velocidades de flujo del sistema. Se estudian los efectos del área expuesta del biosensor en las características analíticas. Se estudia la reproducibilidad del sistema inyectando varias veces una concentración constante de  $\beta$ -D-glucosa y se reporta en términos del error estadístico relativo. Se determina el tiempo de vida del biosensor respecto a la variación en la sensibilidad del sistema después de un uso continuo por varios días.

# **PRIMERA PARTE**

**ESTUDIOS REALIZADOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE CONSTANTES  
TERMODINÁMICAS DE EQUILIBRIO DE DIVERSAS  
BASES Y SUS DERIVADOS EN MEDIO DE ÁCIDO  
ACÉTICO GLACIAL USANDO DIVERSOS TIPOS DE  
SENSORES QUÍMICOS**



## **CAPÍTULO 2**

# **CÁLCULO DE CONSTANTES TERMODINÁMICAS USANDO SENSORES TIPO ISFET.**

## • 2.1 ANTECEDENTES.

Los ISFET (*ion sensitive field effect transistor*, transistor de efecto campo sensible a iones) nacen de los trabajos en bioingeniería desarrollados por Bergveld y Matsuo [6-9], orientados a utilizar los transistores de efecto campo (*FET*) para medir los potenciales eléctricos en las fibras nerviosas. En su trabajo, Bergveld observó que sus dispositivos respondían a la actividad de los iones  $H^+$  y  $Na^+$ . Este comportamiento no sólo hizo que Bergveld dedicara gran parte de sus investigaciones a entender este fenómeno, sino que incentivó el desarrollo y optimización de este nuevo tipo de sensor químico.

El interés en desarrollar la tecnología ISFET tiene su fundamento en el sistema potenciométrico de los electrodos selectivos a iones (ISE). Desde tiempo atrás se buscaba el modo de mejorar la señal de los electrodos de vidrio selectivos a iones  $H^+$ . Una opción viable resultó en la incorporación al potenciómetro de dispositivos FET integrados a un amplificador operacional. Además, la idea de que el FET podía formar parte integral del sensor en sí mismo estimuló en gran medida la aplicación de la tecnología electrónica para el desarrollo de sensores químicos miniaturizados.

Las primeras investigaciones se centraron en el desarrollo y estudio de ISFET sensibles a la actividad de iones  $H^+$ , descubriéndose que la capa aislante de dióxido de silicio presentaba propiedades de sensibilidad a estos iones; sin embargo, la sensibilidad y el intervalo de detección encontrados distaba mucho de compararse con los del electrodo de membrana de vidrio. Años más tarde, se

realizaron estudios donde se recubría la puerta del sensor con diferentes capas o membranas que presentaban sensibilidad al ión  $H^+$ , algunas de las cuales mostraron mejoras apreciables en la sensibilidad e intervalos de linealidad del ISFET. En la tabla 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos depositando diferentes membranas sensibles al  $H^+$  en la puerta del transistor, sobre la capa del dióxido de silicio.

**TABLA 1. Intervalo de detección y constantes de selectividad de diferentes capas selectivas a iones para ISFET a 25°C**

Ref.	Tipo de membrana	Sensibilidad mV/pH	Intervalo de detección pH	Coeficientes de selectividad $K_{H,Na}$	Coeficientes de selectividad $K_{H,K}$
28	$SiO_2$	30	4 - 7	$\approx 10^{-6}$	$\approx 10^{-5}$
29	$Ta_2O_3$	59	1 - 10	$< 10^{-9}$	$< 10^{-9}$
28	$Si_3N_4$	56	1 - 13	$\approx 10^{-7}$	$\approx 10^{-7}$
28	$Al_2O_3$	56	1 - 13	$\approx 0$	$\approx 0$
28	$Na_2O, Al_2O_3, SiO_2$	56	1 - 6	$\approx 10^{-3}$	$\approx 10^{-4}$
30	Ionóforo OCPH* (37°C)	56	3 - 12	-	-

\* p-octadecylozi-m-chloro-phenylhidrazonmesoxalonitril-3-hidroxi-N-dodecylpicolinamide

Dadas las características de fabricación que presentan los ISFET con capa de  $Si_3N_4$ , se han convertido en los más utilizados y estudiados para medir los cambios del pH en soluciones acuosas, desplazando en algunos casos a los típicos electrodos de membrana de vidrio ya que a comparación de estos últimos, los ISFET no requieren cuidados tan especiales pues muestran una mejor

resistencia al manejo brusco, su almacenamiento es más sencillo (pues no es necesario sumergirlos en alguna solución como los ISE) y sus capacidades de miniaturización los hacen ideales para su acoplamiento en sistemas de muestreo con capacidad de automatización.

Sin embargo, con todas las ventajas mencionadas, estos sensores aún no desplazan de manera importante a los ISE con membrana de vidrio debido a las desventajas que presentan, como es la posibilidad de la existencia de corrientes de fuga en el sensor, el hecho de que en la actualidad no se cuenta aún con electrodos de referencia para aprovechar de forma adecuada la miniaturización (desarrollo de *REFET*, *Transistor de Efecto Campo de Referencia*) y que la construcción es complicada por lo que es necesario contar con infraestructura avanzada en microelectrónica, esto provoca que su costo sea aún elevado.

Aún con las desventajas expuestas, el número de trabajos publicados donde se describen avances en la optimización de estos microsensores va en aumento año con año, lo que augura encontrar en poco tiempo las soluciones adecuadas a las desventajas antes mencionadas; lo anterior impulsaría en gran medida su inclusión formal en los mercados comerciales propiciándose así su construcción en serie (como los transistores convencionales) abaratándose en gran medida el costo del sensor. Si se considera la reducción de costos de los transistores modernos, no es aventurado considerar que consecuentemente se podría llegar a la cristalización de la futurista idea de algunos químicos analíticos: pensar en el ISFET como un microsensor “desechable”. En el Anexo 2 se presenta

una descripción más detallada sobre los principios del funcionamiento y características de fabricación del ISFET.

En la actualidad se han desarrollado y optimizado ISFET para el análisis cuantitativo de diversas especies iónicas en medio acuoso [10-13], sin embargo, su potencial ha sido restringido a estudios en medio acuoso sin explorar sus posibles ventajas para mediciones de pH en solventes no acuosos. Un ejemplo de este tipo de solvente lo representa el ácido acético glacial, que desde hace mucho tiempo es utilizado para nivelar bases que en agua resultarían demasiado débiles para analizar usando técnicas analíticas de titulación. En la industria farmacéutica se siguen utilizando titulaciones potenciométricas en este medio no acuoso para el control de calidad de ciertos principios activos de medicinas, como se puede encontrar en la farmacopea [14]. Si se pueden explotar en medio de ácido acético glacial las ventajas que los ISFET presentan en medio acuoso, se podría proponer un sistema potenciométrico más ventajoso que el tradicionalmente usado para el estudio y cuantificación de diversas especies disueltas en ácido acético glacial.

En un trabajo anterior [15] se describió y caracterizó el funcionamiento de los ISFET en este ácido acético glacial y se comprobó su capacidad como sistema de análisis cuantitativo para bases; en el presente trabajo se aprovechan estos resultados para dar un paso más y explorar la posibilidad de estimar valores para constantes de disociación total de especies.

## • 2.2 PARÁMETROS ANALÍTICOS DE LOS SENSORES ISFET EN MEDIO ACÉTICO GLACIAL.

En estudios anteriores [15] se ha caracterizado el funcionamiento de sensores ISFET de membrana de nitruro de silicio en medio acético glacial. En estos estudios se reportaron tiempos de estabilización del sensor entre 5 y 7 minutos, mientras que el tiempo de respuesta se encontró entre 50 y 70 segundos. Se reporta una deriva constante máxima de 1.4 mV/min lo que sugiere corregir los datos obtenidos considerando este valor. La reproducibilidad de cinco experimentos consecutivos con respecto a los parámetros de calibración se encontró del 5.29% en términos del error relativo, por lo que se sugiere regenerar la membrana de nitruro de silicio usando HF 0.1 M después de al menos tres experimentos. También se encontró que los ISFET resultan excelentes dispositivos para determinaciones cuantitativas de bases en medio acético glacial usando titulaciones potenciométricas de bases con ácido perclórico. Los estudios para la cuantificación de piridina demostraron ser estadísticamente equivalentes a los realizados con ISE de membrana de vidrio comerciales.

Realizando la calibración de los ISFET como se describe en el capítulo 1, se estimaron la sensibilidad y los límites de detección. Se encontró que la sensibilidad aumenta en la zona de pH básico y disminuye en la zona de pH ácido conforme es utilizado en ISFET en diferentes experimentos. A pesar de lo anterior, los límites de detección se mantienen prácticamente constantes, encontrándose que van de pH 4.3 para el mínimo, y 10.4 para el máximo.

- **2.3 CÁLCULO DE CONSTANTES DE DISOCIACIÓN TOTAL DE PERCLORATOS DE BASES PROTONADAS**

Dado que el límite de detección máximo de los ISFET en ácido acético glacial es de un pH de 10.4, considerando el método de Bruckenstein y Kolthoff [3] resultan inadecuados para la determinación de constantes de disociación total de bases en este medio. Aún así, considerando bases donde la constante de disociación total es conocida, se puede hacer el cálculo de las constantes de los percloratos de bases protonadas de acuerdo a la ecuación:

$$E_{B, BHX} = E^{\circ}_{HX} + \frac{RT}{F} \ln K_s - \frac{RT}{F} \ln K_B C_B + \frac{RT}{2F} \ln (K_B C_B + K_{BHX} C_{BHX}) + E_{i,j} \quad (2.1)$$

que se discute más a detalle en el Anexo 1. Así, con los valores de los parámetros de calibración y los datos de los puntos antes del punto de equivalencia de la titulación potenciométrica de la base se puede hacer la estimación.

- **2.4 RESULTADOS**

Las tablas 2 y 3 muestran los resultados para la determinación de las constantes de disociación total para el perclorato de piridina protonada y perclorato de dietilamina protonada, tomando en cuenta el valor de la constante de equilibrio para piridina reportada por Kolthoff y Bruckenstein [16] y el de la constante de equilibrio de dietilamina reportada por Kolling [17]. Estos resultados representan el promedio de siete diferentes determinaciones y el error en términos de la desviación estándar de este número de repeticiones.

**Tabla 2. Constantes de disociación total para el perclorato de piridina protonada obtenidas usando un sensor ISFET.**

$pK_{\text{Piridina}}$	<b>6.10*</b>
$pK_{\text{PirHClO}_4}$	<b>5.45*</b>
ISFET $pK_{\text{PirHClO}_4}$ exp.	$5.44 \pm 0.03$

\* Kolthoff and Bruckenstein no reportan desviación en ninguno de sus resultados.

**Tabla 3. Constantes de disociación total para el perclorato de dietilamina protonada obtenidas usando un sensor ISFET.**

$pK_{\text{Dietilamina}}$	<b>5.55**</b>
$pK_{\text{DietHClO}_4}$	<b>4.59**</b>
ISFET $pK_{\text{DietHClO}_4}$ exp.	$4.56 \pm 0.04$

\*\*Kolling no reporta desviación en sus resultados

Con estos resultados se realiza un análisis estadístico usando la distribución t, considerando varianzas heterogéneas a un nivel de confianza del 95%. De acuerdo a los experimentos realizados, se tiene un total de seis grados de libertad, por lo que la t crítica tiene un valor de 2.36. Tomando los valores de las constantes de disociación total de los percloratos de las bases protonadas estudiadas que se reportan en la literatura como verdaderos, el coeficiente t calculado para  $\text{PirHClO}_4$  es de 0.33 mientras que para  $\text{DietHClO}_4$  resulta de 1.21. Dado que ninguno de estos valores supera a la t crítica se puede decir que no existen diferencias significativas entre los valores de las constantes reportadas en la literatura y los calculados usando el sensor ISFET.



## • 2.5 CONCLUSIONES

La tendencia que se tiene hacia el desarrollo y optimización de los ISFET como sensores químicos potenciométricos justifica su estudio en medios diferentes al agua. Se ha demostrado que a pesar de que los ISFET presentan ciertas limitaciones en cuanto a su uso en medio de ácido acético glacial comparados con los electrodos de vidrio comerciales, se pueden realizar cálculos de constantes de disociación total de bases protonadas con los datos de las constantes de las bases reportados en la literatura que no difieren significativamente de los reportados en la literatura. Esto último, aunado con la capacidad de cuantificar bases en este medio, hacen de este sensor una alternativa para cuantificar bases (como principios activos de medicamentos) y realizar estudios para el cálculo de parámetros termodinámicos de diversas especies químicas.

## **CAPÍTULO 3.**

# **DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE DISOCIACIÓN TOTAL EN ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL USANDO SUPERQUAD**

### • 3.1 ANTECEDENTES.

El método tradicional para la determinación de constantes de disociación total en ácido acético glacial usando titulaciones potenciométricas es el desarrollado por Kolthoff y Bruckenstein [3]. Es de notarse que, casi cuarenta años después de sus experimentos, su método continúa siendo el único usado para la determinación de estos parámetros termodinámicos, a pesar del trabajo de Kolling [17] que desarrolla un método alternativo que no se ha explotado.

En este capítulo se discutirá la propuesta de un nuevo método para la determinación de constantes de equilibrio en este medio, usando el programa SUPERQUAD [18], que ha sido ampliamente utilizado para aplicaciones en soluciones acuosas, aunque no se ha reportado su aplicación para cálculos termodinámicos en medio no acuoso. El principio de funcionamiento de SUPERQUAD consiste en la aplicación reiterada del método de mínimos cuadrados a las diferencias generadas entre los datos potenciométricos experimentales que se alimentan al programa y los teóricos calculados por el mismo programa usando el algoritmo de Marquardt.

De este modo, en este trabajo se lleva a cabo la determinación de constantes de disociación total para piridina, dietilamina y anilina usando el método tradicional planteado por Kolthoff y Bruckenstein [3] y los resultados se comparan con los cálculos obtenidos usando SUPERQUAD. Cabe hacer notar que las constantes de equilibrio para las dos primeras aminas ya se han reportado en la literatura, mientras que no existen registros para las de la anilina.

- **3.2 MODELO QUÍMICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO EN MEDIO ACÉTICO GLACIAL.**

El principio de funcionamiento de SUPERQUAD [18] está basado en la aplicación reiterativa del método de ajuste por mínimos cuadrados a las diferencias generadas entre los datos potenciométricos experimentales y aquellos calculados por el programa usando el algoritmo Marquardt. El punto crucial para la utilidad de SUPERQUAD en el cálculo de constantes termodinámicas de estabilidad es el modelo termodinámico que se le alimenta en términos de los posibles equilibrios de formación que se pueden tener entre las especies químicas que pueden existir en el sistema a analizar, incluyendo la autoprotólisis del solvente. Al programa se le alimentan, pues, los equilibrio de formación conocidos con sus respectivos valores para las constantes de equilibrio en términos logarítmicos y los equilibrios de formación propuestos con valores estimados para las constantes de equilibrio, los cuales serán refinados por SUPERQUAD, se alimentan también el número de iteraciones a llevarse a cabo, los resultados experimentales de la curva de titulación correspondiente, los parámetros de calibración del sistema electroquímico usado y la temperatura de trabajo.

En estudios anteriores, se encuentra que el mejor modelo termodinámico para la estimación de constantes de disociación total de bases (B) y los percloratos de bases protonadas ( $\text{BHClO}_4$ ) es el que se plantea a continuación en las ecuaciones 3.3 a 3.6:



También se encontró mediante el refinamiento de la constante de disociación total de acetato de sodio (cuyo valor es conocido), que para obtener mejores resultados se deben mantener fijos los valores para las constantes de formación del ácido perclórico y de autoprotólisis del ácido acético (los valores usados para el refinamiento son los reportados en la literatura [19]), que corresponden a los equilibrios 3.3 y 3.6, mientras que las constantes para los equilibrios 3.4 y 3.5, que corresponden a las especies de interés, se dejan para refinamiento del programa.

Para comparar los resultados arrojados por SUPERQUAD con aquellos reportados en la literatura y aquellos encontrados usando el método tradicional, se hace necesario replantear por ley de Hess los equilibrios 3.4 y 3.5 para tenerlos en términos de los equilibrios de disociación total, como se muestra en los equilibrios 3.7 y 3.8



### • 3.3 RESULTADOS

- **3.3.1 Determinación de constantes de disociación total para piridina, dietilamina y anilina y sus correspondientes percloratos protonados en ácido acético glacial, aplicando Kolthoff y SUPERQUAD.**

Para aplicar el método de Kolthoff, el potencial registrado para la solución que sólo contiene a la base y los parámetros de calibración del sistema potenciométrico se sustituye en la ecuación 3.9 para calcular la constante de disociación total de la base estudiada:

$$E_B = E^{\circ}_{GC} + \frac{RT}{F} \ln K_s - \frac{RT}{2F} \ln K_B - \frac{RT}{2F} \ln C_B \quad (3.9)$$

Posteriormente, los puntos de la titulación antes del punto de equivalencia son usados para estimar la constante de disociación total para el perclorato de la base protonada que correspondiera.

Para aplicar el programa SUPERQUAD se utilizan los resultados para la calibración del sistema potenciométrico y los de las curvas de titulación experimentales completos; las constantes de disociación total de la base y del perclorato de base protonada son refinadas con el programa.

Con los resultados obtenidos con cualquiera de los dos métodos para diez diferentes experimentos se usa el criterio de Chauvenet [20] para rechazar datos atípicos y posteriormente se calcula la media de los resultados obtenidos. Para los valores encontrados para la piridina y la dietilamina se realiza un estudio de distribución t considerando varianzas heterogéneas a un nivel de confianza del

95% y considerando como valor verdadero el reportado por Bruckenstein y Kolthoff [3]. Posteriormente, los métodos son aplicados para determinar las constantes de equilibrio de la anilina, que no se encontraron reportadas en la literatura.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos comparando, cuando es posible, con los datos reportados por Bruckenstein y Kolthoff [3], y por Kolling [17].

**Tabla 1. Comparación de los valores experimentales y teóricos del pK de las bases estudiadas con aquellos reportados en la literatura, usando análisis de distribución t considerando varianzas heterogéneas (P=0.05) y una t crítica de 2.78 (4 grados de libertad).**

Base	Kolthoff pK <sub>B</sub> [16]	Kolling pK <sub>B</sub> [17]	Media experimental pK <sub>B</sub>	t calculada	Kolthoff pK BHClO <sub>4</sub> [16]	Kolling pK BHClO <sub>4</sub> [17]	Media experimental pK <sub>BHClO<sub>4</sub></sub>	t calculada
<b>Método de Kolthoff</b>								
Piridina	6.10	5.97	6.02 ± 0.06	1.33	5.45		5.27 ± 0.09	2.0
Dietilamina		5.55	5.52 ± 0.04	0.75		4.59	4.52 ± 0.07	1.0
Anilina			7.04 ± 0.10				5.02 ± 0.12	
<b>Método SUPERQUAD</b>								
Piridina	6.10	5.97	5.98 ± 0.02	1.17	5.45		5.47 ± 0.09	2.0
Dietilamina		5.55	5.52 ± 0.02	1.5		4.59	4.48 ± 0.03	2.2
Anilina			6.95 ± 0.06				4.89 ± 0.06	

De acuerdo a los parámetros estadísticos t calculados, se puede decir que no existen diferencias significativas entre los resultados experimentales y los reportados en la literatura.

Los resultados experimentales obtenidos son comparados estadísticamente para comprobar si existen diferencias significativas entre la aplicación del método tradicional para el cálculo de constantes de equilibrio y SUPERQUAD. Para esto

se aplica una prueba de distribución t de dos colas considerando varianzas heterogéneas a un nivel de confianza del 95%, en la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 2. Resultados para el análisis estadístico t (P=0.05) considerando varianzas heterogéneas para comparar las constantes de disociación total para las bases y sus percloratos protonados obtenidos mediante el método de Kolthoff y SUPERQUAD. t crítica es 4.3 (dos grados de libertad).**

Base	t para $pK_B$	t para $pK_{BHClO_4}$
<b>Piridina</b>	1.48	1.08
<b>Dietilamina</b>	1.06	0.34
<b>Anilina</b>	0.77	3.09

De la tabla 2 se observa que los valores t calculados para todos los casos no superan a la t crítica, por lo que se puede decir que ambos métodos arrojan resultados que no difieren significativamente entre sí.

### • 3.4 CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos aplicando SUPERQUAD nos indican que los datos experimentales pueden ser ajustados para refinar las constantes de equilibrio propuestas, aunque por el medio en el que se trabaja, no sea evidente *a priori* como introducir el modelo químico más adecuado para el refinamiento. Después de usar diferentes alternativas se pudo proponer un modelo que arroja resultados muy satisfactorios.

De igual forma, los resultados obtenidos con SUPERQUAD han probado su utilidad para el cálculo de constantes termodinámicas de especies de bases en ácido acético glacial, dado que no se han encontrado diferencias significativas con respecto al método tradicional de Kolthoff. Considerando que con este último



método se requiere calcular un valor para la constante buscada para cada punto de una curva de titulación, SUPERQUAD representa una mejor herramienta pues toma en cuenta sistemas multireaccionantes y hace uso al mismo tiempo de todos los puntos de la titulación para el ajuste estadístico y calculando la incertidumbre en términos de la desviación estándar de los valores refinados.

Los resultados prueban la utilidad de los métodos de ajuste estadístico para el cálculo de constantes termodinámicas en solventes no acuosos, lo que resalta la importancia y la necesidad de abordar este tipo de estudios en estos medios.

# **SEGUNDA PARTE**

**DESARROLLO DE UN ELECTRODO  
SELECTIVO A IONES (ISE) PARA EL  
ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL IÓN DODECIL  
SULFATO Y SU IMPLMETACIÓN EN FIA**

## **CAPÍTULO 4**

### **CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE PIRROL EN PRESENCIA DE DSS SOBRE UN ELECTRODO COMPOSITE GRAFITO- RESINA EPÓXICA**

## • 4.1 ANTECEDENTES

Es indiscutible el amplio interés que se ha desarrollado en torno al estudio de los polímeros conductores dadas sus características electroquímicas, eléctricas y ópticas. Las aplicaciones que ha encontrado su síntesis van desde el desarrollo de dispositivos electrónicos hasta el desarrollo de electrocatalizadores y sensores químicos [21-28]. La polimerización electroquímica ha sido una de las técnicas más importantes para la preparación de los polímeros conductores, especialmente de polipirrol, y desde la primera electropolimerización realizada por Díaz et al. [29] se han realizado numerosas investigaciones para la optimización de esta técnica. Las principales condiciones que pueden afectar los procesos de electropolimerización van desde el tipo de solvente [29], el tipo y concentración de los aniones del electrolito soporte [30,31], pH [32] y corriente-potencial [33]. Aunque la polimerización de polipirrol (Ppy) puede llevarse a cabo tanto en solventes orgánicos (como acetonitrilo) como en agua, Ouyang et al. encontraron que los solventes de número donador bajo son más apropiados [34]. Los aniones del electrolito soporte tienen una influencia muy importante tanto en la conductividad como en algunas características físicas del polímero preparado, como fue demostrado por Salmon et al. en estudios en solventes orgánicos [35] y Li et al. en solventes acuosos [32]. Wernet et al. demostraron que el pH óptimo para la electropolimerización de Ppy se encuentra entre 2 y 4 [33] mientras que Quian et al. encontraron que a pH básico se obtienen polímeros no conductores [36]. Tradicionalmente, la electropolimerización del Ppy se lleva a cabo usando

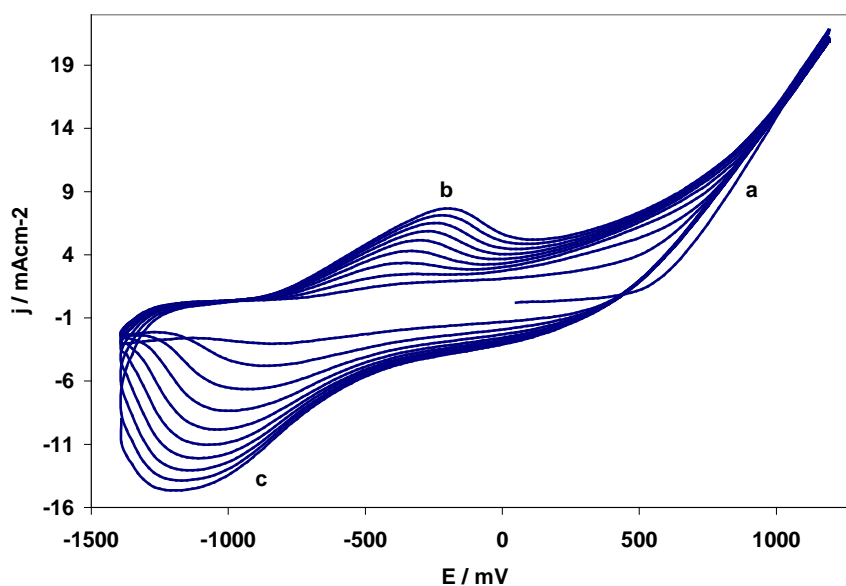
electrodos de trabajo a base de metales inertes tales como el oro o el platino, sin embargo, el gran número de aplicaciones para este polímero conductor ha llevado al estudio de la electropolimerización sobre diferentes sustratos, tales como el aluminio [37], cobre [38], acero [39], ITO [40]; el uso de los electrodos de carbono se restringe a algunos estudios para elucidar los diferentes pasos del mecanismo de polimerización [41]. Dado lo anterior, los electrodos de trabajo metálicos resultan excelentes para soportar el Ppy y estudiar tanto el mecanismo de polimerización como sus características electroquímicas, sin embargo, desde el punto de vista aplicativo están limitados por geometría, configuración y precio. En este sentido, una buena alternativa para la polimerización y soporte del Ppy sería el uso de electrodos de grafito tipo composite, en los cuales se tiene una mezcla de grafito y una resina epóxica, y que a diferencia de los electrodos metálicos pueden manejarse diferentes configuraciones y resultan de menor costo.

Dado que se desarrollan sensores potenciométricos selectivos al ión dodecil sulfato ( $DS^-$ ) usando membranas a base de polipirrol dopado, es conveniente estudiar las características de formación de la misma. Con este propósito, se realiza un estudio electroquímico del crecimiento potencioestático y/o potenciodinámico de Ppy sobre una matriz-composite de grafito y resina epóxica dopado con el anión dodecil sulfato y se compara la morfología de los depósitos obtenidos con los electrodos composite sin polímero mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

## • 4.2 RESULTADOS

### - 4.2.1 Estudio potenciodinámico.

La ventana de potencial de barrido para el crecimiento potenciodinámico de el Ppy-DS<sup>-</sup> es de -1400 a 1200 mV, esta se elige considerando la integridad estructural del composite del electrodo y estudios previos donde se observó que a potenciales de reducción muy altos se degrada el Ppy del electrodo. En la figura 1 se muestran curvas voltamperométricas típicas obtenidas durante la formación potenciodinámica de Ppy en presencia de DS<sup>-</sup> a una concentración  $8.5 \times 10^{-4}$  M.



**FIGURA 1. Voltamograma cíclico para la polimerización de Ppy 0.06 M sobre el composite grafito-resina epóxica en una solución acuosa de DSS  $8.5 \times 10^{-4}$  M. Velocidad: 100mV/s, sentido +, 10 ciclos**

Se puede apreciar que la carga involucrada durante el proceso de oxidación y reducción aumenta con el número de ciclos, comportamiento típico de los procesos de electropolimerización de polímeros conductores. Se pueden apreciar algunos procesos REDOX que conviene discutir. Para el primer ciclo (parte **a** de la

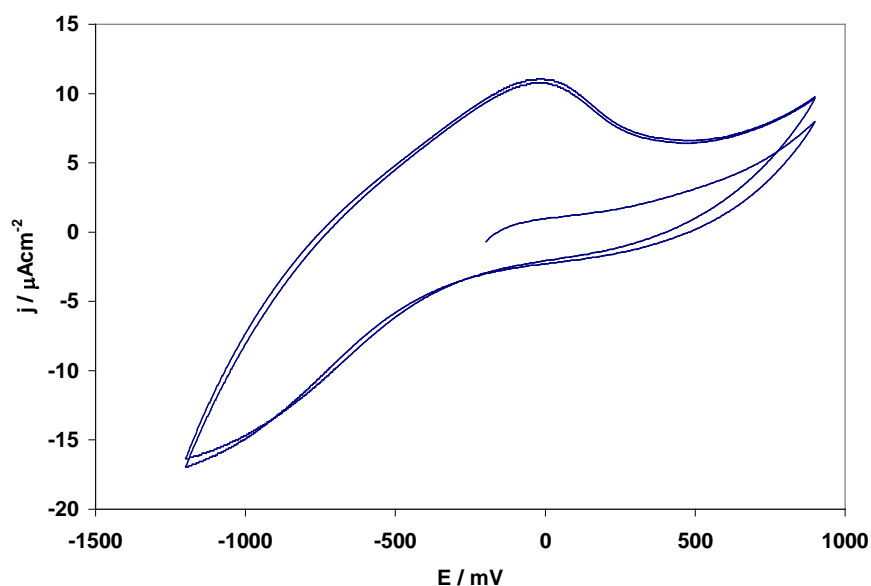
figura 1) se observa un primer proceso de oxidación que comienza a potenciales mayores de 500 mV, este potencial vendría asociado a la oxidación del monómero de pirrol para formar los primeros radicales catiónicos necesarios para llevar a cabo la electropolimerización. Al continuar el barrido de potencial, se aprecia un proceso anódico (parte **b** de la figura 1) que se asocia a la oxidación de los oligómeros que dan lugar al crecimiento del polímero. Es interesante notar también en la figura 1 que no se obtiene la misma carga anódica que catódica de ciclo en ciclo; esto puede deberse a que el proceso catódico (parte **c** de la figura 1) puede ser en realidad un conjunto de procesos acoplados, debidos tal vez a la reducción de oligómeros solubles que son subproductos del proceso de polimerización.

También se observa en la figura 1 que el proceso de polimerización del Ppy-DS<sup>-</sup> es claramente irreversible, ya que siendo un sistema donde se intercambia 1 e<sup>-</sup> la distancia entre el potencial del proceso de oxidación donde la corriente es máxima y el potencial del proceso de reducción donde la corriente es máxima (en valor absoluto) es mayor de 59 mV.

Es de notarse que conforme se realizan los ciclos de potencial en el crecimiento del Ppy-DS<sup>-</sup> los picos de corriente máxima para los procesos anódico y catódico se desplazan a potenciales cada vez más grandes (en valor absoluto); esto puede deberse a que el crecimiento progresivo del polímero sobre la superficie del electrodo composite aumenta gradualmente la resistencia y se debe

proporcionar más energía al sistema para que continúe el proceso de polimerización.

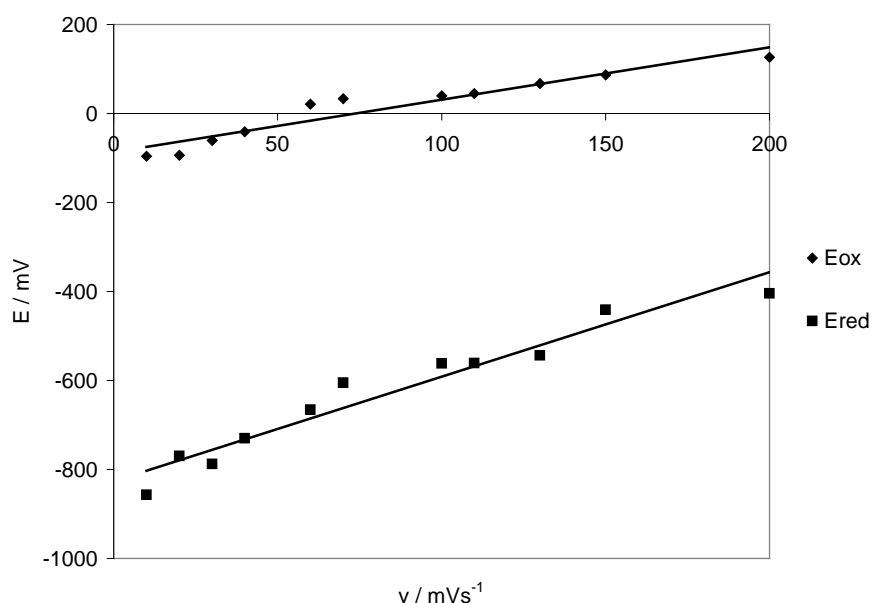
Para comprobar que se tiene al Ppy-DS<sup>-</sup> en la superficie del electrodo al terminar de ciclar el potencial, se realiza una voltamperometría del mismo en electrolito soporte sin Py. En la figura 2 se presenta el voltamperograma correspondiente.



**FIGURA 2. Voltamograma cíclico del polímero crecido en una solución acuosa de DSS  $8.5 \times 10^{-4}$  M. Velocidad: 100mV/s, sentido +, 5 ciclos**

Para evaluar si el polímero crecido sobre el composite presenta electroactividad, se realizan polimerizaciones potenciodinámicas a las mismas condiciones descritas anteriormente pero a diferentes velocidades de barrido de potencial. En la figura 3 se presentan los diferentes potenciales máximos anódico (E<sub>ox</sub>) y catódico (E<sub>red</sub>) registrados en el ciclo 30 de barrido de potencial respecto a la velocidad de barrido.

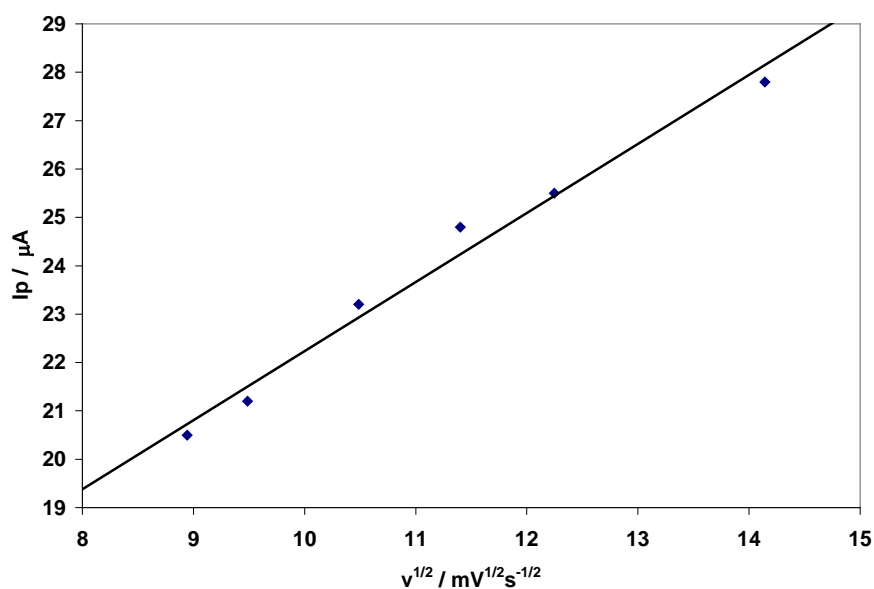




**FIGURA 3. Potenciales máximos anódicos y catódicos vs velocidad de barrido de potencial**

Se observa en la figura 3 un desplazamiento progresivo en ambos potenciales, cumpliéndose el hecho de que al aumentar la velocidad de barrido, se hacen más positivos tanto Eox como Ered; además se observa una tendencia lineal para estas relaciones que es característica de los procesos de crecimiento de polímeros que presentan electroactividad. Es interesante observar que la diferencia Eox-Ered no es constante, recordando la discusión del voltamperograma de la figura 1 esto pudiera deberse a que se tienen procesos acoplados durante el barrido en potenciales catódicos y al momento de variar la velocidad, por ejemplo al aumentarla, no se da tiempo a que se lleven a cabo algunos de estos procesos. También se hace evidente lo que ya se había establecido con anterioridad, el proceso de polimerización de Ppy-DS<sup>-</sup> es irreversible.

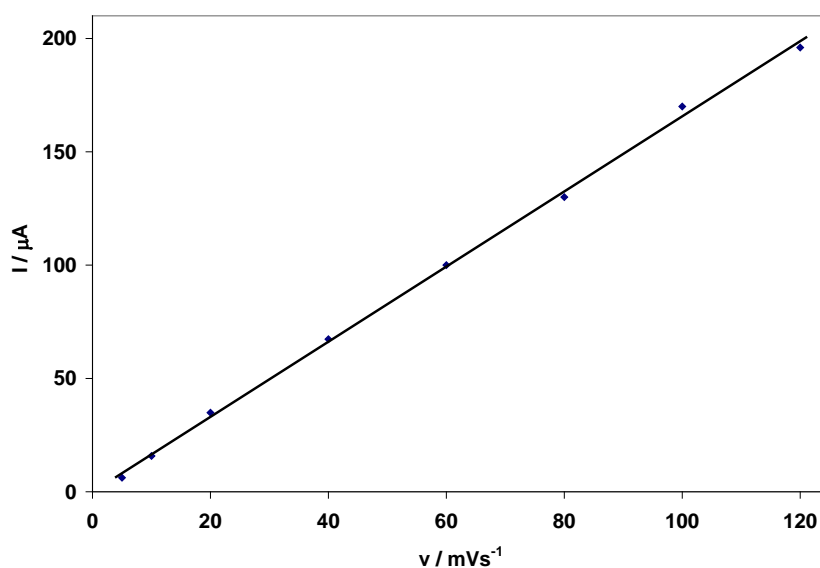
Para comprobar si el proceso de polimerización está limitado por la difusión de las especies electroactivas se realiza una comparación de las corrientes máximas de pico anódico  $I_p$  vs diferentes velocidades de barrido de potencial, la cual se muestra en la figura 4. Observamos una relación proporcional entre  $I_p$  y la raíz cuadrada de  $v$  con una tendencia lineal según la correlación calculada para los puntos ajustados, esto demuestra que el proceso electroquímico está limitado por la difusión.



**FIGURA 4. Corriente máxima de pico anódico vs velocidad de barrido a la un medio**

Para comprobar que el polímero Ppy-DS<sup>-</sup> sigue siendo electroactivo una vez polimerizado sobre la superficie del electrodo composite, se realizan una serie de voltametrías cíclicas en una solución de electrolito soporte (DSS  $8.5 \times 10^{-4}$  M) a diferentes velocidades de barrido de potencial. Se realiza la prueba para el polímero obtenido mediante crecimiento potenciodinámico (ciclado en electrolito

soporte a diferentes potenciales por 5 ciclos). En la figura 5 se presenta la relación entre la corriente máxima del pico anódico registrada en el quinto ciclo y la velocidad barrido de potencial.



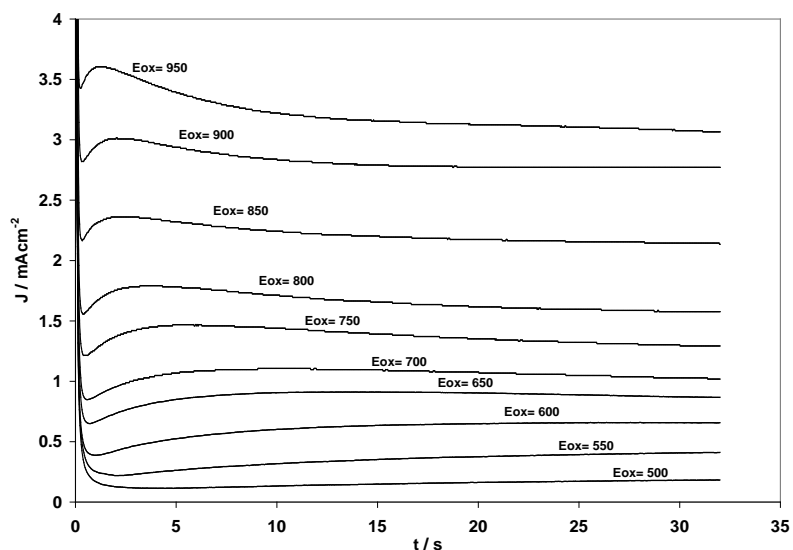
**FIGURA 5. Gráficos de velocidad de barrido vs corriente de máximo del pico anódico de las voltamperometrías correspondientes para Ppy-DS<sup>-</sup> crecido potenciodinamicamente.**

Observamos que a las velocidades estudiadas se tiene una tendencia lineal con la corriente de pico anódico. Realizando el ajuste estadístico por mínimos cuadrados se obtiene la ecuación  $I = 1.66v - 0.105$  con una correlación de 0.994. Esta tendencia lineal que además tiene pendiente positiva, (que indica que la corriente de pico anódico aumenta con la velocidad de barrido de potencial) nos indican una buena estabilidad del Ppy-DS crecido potenciodinamicamente sobre el composite.

#### **- 4.2.2 Estudio potencioestático.**

Habiendo caracterizado el Ppy-DS<sup>-</sup> crecido potenciodinámicamente, ahora se procede a hacer el estudio del crecimiento potencioestático del mismo. Para este efecto, se imponen diferentes potenciales de oxidación. Se eligen potenciales por arriba de 500 mV según el estudio voltamperométrico que se mostró en la figura , donde se observa que por arriba de este potencial es donde se lleva a cabo el proceso de oxidación de los monómeros de Py en sus radicales libres. Se usa el mismo electrolito descrito en la sección 4.2.1.

En la figura 6 se muestran familias de transitorios potencioestáticos de corriente obtenidos durante la formación de Ppy sobre el electrodo composite de grafito en presencia del ion DS<sup>-</sup>. Se puede observar una especie de meseta que se hace evidente al aumentar el potencial de oxidación, esto se asocia a la formación de los núcleos sobre la superficie del electrodo; posteriormente la corriente vuelve a disminuir de una manera progresiva debido a los procesos que van limitando el crecimiento del polímero.



**FIGURA 6. Familia de transitorios potenciostáticos densidad de corriente obtenidos en el sistema composite grafito-resina epóxica/Py 0.06 M en solución acuosa usando como electrolito DSS  $8.5 \times 10^{-4}$**

Dada la evidencia cronoamperométrica obtenida, en este trabajo se propone representar a la densidad de corriente total ( $J_{total}(t)$ ) del proceso de electrodeposición de Ppy sobre el electrodo de composite de grafito, de acuerdo a la metodología propuesta por Palomar-Pardavé y colaboradores [41-43] como la suma de dos contribuciones: un proceso de adsorción ( $J_{ad}(t)$ ) y un proceso de nucleación 3D limitado por la difusión ( $J_{3D-dc}(t)$ ), de acuerdo a la ecuación ( 9):

$$J_{total}(t) = J_{ad}(t) + J_{3D-dc}(t) \quad (9)$$

con

$$J_{ad}(t) = k_1 \exp(-k_2 t) \quad (10)$$

Con  $k_1 = k_2 Q_{ad}$

donde  $Q_{ad}$  es la carga involucrada durante el proceso de adsorción y  $k_2$  es la constante de velocidad de este proceso y

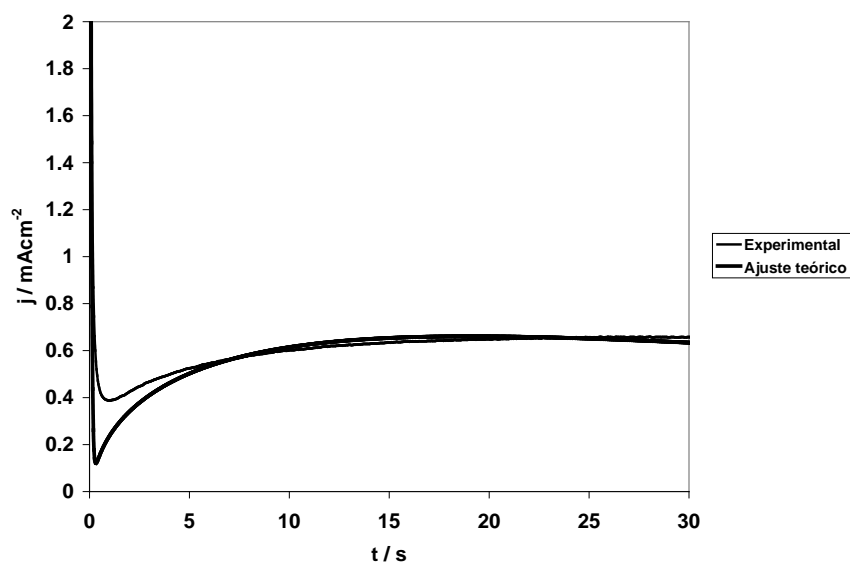
$$J_{3D-dc}(t) = \frac{P_1}{t^{1/2}} \frac{\phi}{\Theta} (1 - \exp[-P_2 t \Theta]) \quad (12)$$

$$\text{con } P_1 = \frac{zFD^{1/2}c}{\pi^{1/2}}, \quad P_2 = \alpha(\pi D)^{1/2} N_0, \quad \phi = 1 - \frac{e^{-At}}{(At)^{1/2}} \int_0^{(At)^{1/2}} e^{-\lambda^2} d\lambda, \quad \Theta = 1 - (1 - e^{-At})/At$$

$$\alpha = 2\pi \left( \frac{2MDc}{\rho} \right)^{1/2}$$

donde  $J$  es la densidad de corriente en función del tiempo ( $t$ ),  $F$  es la constante de Faraday,  $D$ ,  $c$ ,  $M$  y  $\rho$  son el coeficiente de difusión, la concentración, la masa molecular y la densidad de la especie depositada respectivamente,  $A$  es la velocidad de nucleación y  $N_0$  es la densidad numérica de sitios de activación sobre la superficie del substrato.

Realizando el ajuste de la ecuación (9) para los transitorios de corriente experimentales, se observa que el modelo propuesto ajusta de buen modo para potenciales de oxidación menores a 650 mV, en la figura 7 se muestra cómo el modelo propuesto en la ecuación (9) es capaz de describir en forma adecuada la evidencia experimental en el caso del crecimiento de Ppy-DS<sup>-</sup> a un potencial de 600 mV..



**Figura 7. Comparación entre un transitorio potenciotático experimental obtenido en el sistema composite grafito-resina epóxica/ Py 0.06 M con DS<sup>-</sup> 8.5 x 10<sup>-4</sup> al imponer un potencial de a 600 mV, y su correspondiente teórico obtenido por ajuste no lineal de la ecuación (9) a los datos experimentales.**

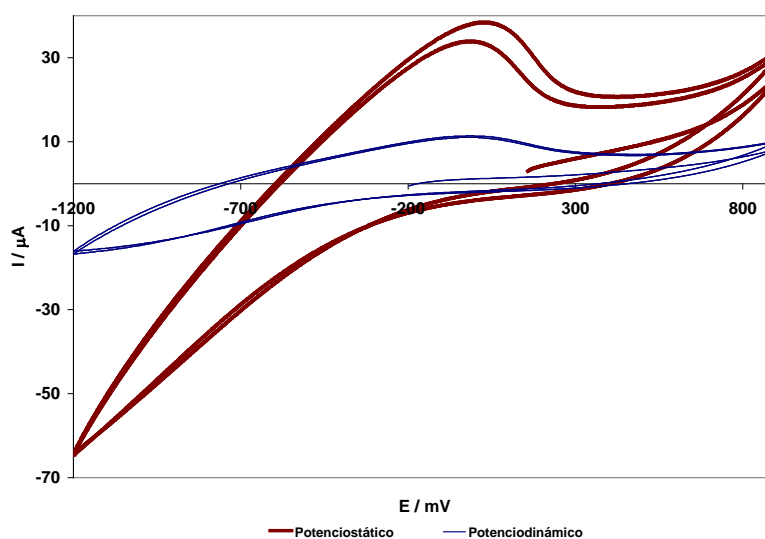
Los transitorios obtenidos a potenciales de oxidación por arriba de 650 mV no se ajustan adecuadamente al modelo propuesto, lo que implica un cambio en el proceso de nucleación al aumentar el potencial impuesto.

Siempre que se realiza un ajuste teórico a datos experimentales, es conveniente reportar los parámetros de ajuste. En la tabla 1 se muestran los parámetros cinéticos de la formación de Ppy-DS<sup>-</sup>, para diferentes potenciales, conforme el modelo propuesto en la ecuación (9).

**Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos durante la formación potencioestática de Ppy obtenidos mediante ajuste no lineal de la ecuación (9) a los datos experimentales.**

<b>E / mV</b>	<b>a / s<sup>-1</sup></b>	<b>b / mAcm<sup>-2</sup></b>	<b>c / s<sup>-1</sup></b>	<b>k1 / mAcm<sup>-2</sup></b>	<b>k2 / s<sup>-1</sup></b>
550	18.79	2.84 x 10 <sup>-3</sup>	4.59 x 10 <sup>-2</sup>	5.58 x 10 <sup>-3</sup>	10.33
600	6.88	4.11 x 10 <sup>-2</sup>	6.63 x 10 <sup>-2</sup>	1.08 x 10 <sup>-2</sup>	20.83
650	147.28	4.70 x 10 <sup>-3</sup>	0.10	4.21 x 10 <sup>-3</sup>	6.79

Para evidenciar las diferencias entre el crecimiento potencioestático y el crecimiento potenciodinámico, se realiza la curva voltamperométrica del polímero previamente crecido imponiendo un potencial de 900 mV y se compara con la curva obtenida durante el crecimiento potenciodinámico. En la figura 8 se presentan los voltamperogramas comparados.



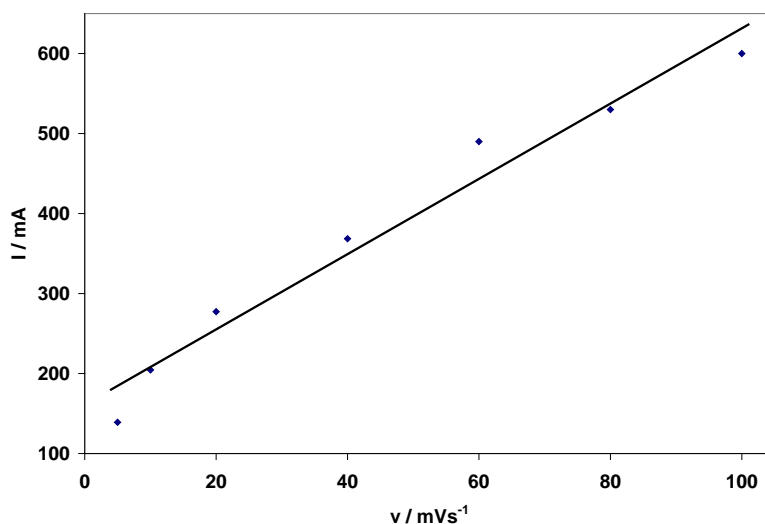
**FIGURA 8. Voltamograma cíclico en una solución acuosa de DSS  $8.5 \times 10^{-4}$  M para Ppy crecido potencioestáticamente y potenciodinamicamente sobre el composite grafito-resina epóxica. Velocidad: 100 mV/s, sentido +, 2 ciclos**

Aunque en la figura 8 se pueden apreciar los mismos procesos REDOX descritos en la sección 4.2.1, se aprecia un mayor carga en el caso del Ppy crecido potencioestáticamente, lo que podría indicar la formación de una película más gruesa que en el caso potenciodinámico. También se observa en el caso potencioestático que el polímero sigue creciendo al aumentar la carga para el



segundo ciclo de barrido de potencial, mientras que en el caso potenciodinámico no es tan notoria la electroactividad del Ppy.

Del mismo modo se analiza la electroactividad del polímero preparado potenciodinamicamente, se realizan voltamperometrías en electrolito soporte libre de Py a diferentes velocidades de barrido en una película de Ppy-DS<sup>-</sup> crecida potencioestáticamente. En la figura 9 se presentan los resultados para la relación velocidad de barrido vs corriente máxima de pico anódico.



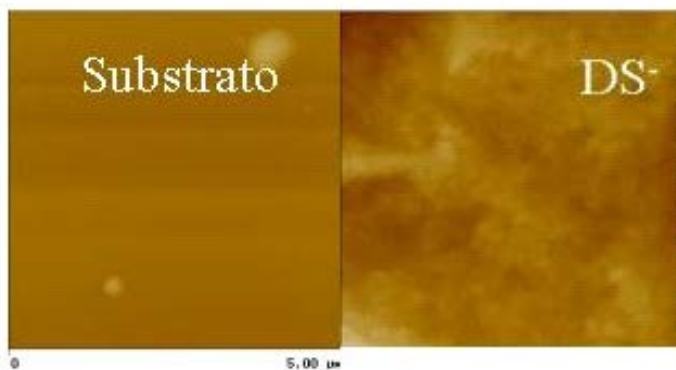
**FIGURA 9. Gráficos de velocidad de barrido vs corriente de máximo del pico anódico de las voltamperometrías correspondientes para Ppy-DS<sup>-</sup> crecido potencioestáticamente.**

Se aprecia una tendencia lineal de la corriente de pico anódico respecto a la velocidad de barrido. Realizando el ajuste por mínimos cuadrados, se obtiene la ecuación  $I = 4.7v + 161.1$  con una correlación de 0.983. Comparando estos resultados con los obtenidos con el polímero crecido de manera potenciodinámica, donde la correlación es mayor y el ajuste lineal se acerca más al origen, se puede

decir que, aunque en ambos se obtienen películas electroactivas, la estabilidad de los polímeros crecidos con esta técnica es mayor comparada con los crecidos potencioestáticamente.

#### - 4.2.3 Caracterización mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

Para corroborar la existencia del polímero Ppy-DS<sup>-</sup> en la superficie del composite, se pueden usar técnicas de AFM. Dado que en lo sucesivo se realizará la polimerización de manera potencioestática, en la figura 10 se muestran imágenes AFM obtenidas de la superficie del electrodo composite de grafito después del proceso de crecimiento de Ppy-DS<sup>-</sup>. Los núcleos formados en presencia de DS<sup>-</sup> son pequeños y homogéneos.



**Figura 10. Imágenes AFM 5 X 5  $\mu\text{m}$  de las superficies del electrodo composite de grafito sin depósito (izquierda) y después de electrodepositar, potencioestáticamente, Ppy a 950 mV durante 30 s.**

#### • 4.3 CONCLUSIONES

Se ha encontrado que las especies químicas se adsorben fácilmente en la superficie del electrodo composite, por lo que no se requiere la aplicación de potenciales demasiado grandes para la formación del Ppy-DS<sup>-</sup>. Los estudios

voltamperométricos para la formación del Ppy-DS<sup>-</sup> muestran un proceso electroquímico irreversible que además está limitado por un proceso difusivo de las especies electroactivas. Los estudios de corriente de pico anódico en función de la velocidad de barrido en electrolito soporte demuestran que el polímero crecido es electroactivo y es estable.

Los estudios para el ajuste de los transitorios de corriente a un proceso de adsorción y un proceso de nucleación 3D arrojan una buena concordancia con aquellos realizados a potenciales por debajo de 650 mV, por arriba de este valor el modelo no se ajusta adecuadamente lo que implica un cambio gradual en los procesos de crecimiento del polímero. La película crecida potencioestáticamente muestra una estabilidad menor que aquella crecida potenciodinámicamente.

En este punto es adecuado resaltar que se realiza el crecimiento potencioestático de Ppy-DS<sup>-</sup> en lo sucesivo para la formación de las membranas selectivas al ión DS<sup>-</sup>, esto a pesar de que en los resultados de este capítulo se demuestra una mejor estabilidad para el polímero crecido potenciodinámicamente. La razón principal es que en, en la literatura, la aplicación de polímeros conductores como membranas selectivas a iones involucra casi siempre crecimiento potencioestático, por el bajo costo que implica esta técnica y porque no se requiere una gran infraestructura para lograrla. Si se piensa en la comercialización de un sensor químico de estas características, cae por su propio peso la razón de preferir esta técnica.

## **CAPÍTULO 5.**

**DESARROLLO DE ISE A BASE DE  
POLIPIRROL DOPADO CON DS<sup>-</sup>  
PARA LA DETERMINACIÓN  
CUANTITATIVA DE DS<sup>-</sup> EN BATCH.**

## • 5.1 ANTECEDENTES

Los surfactantes (del inglés *surfactant: surface-active agent*) corresponden a aquellos productos orgánicos sintéticos que son capaces de humectar, penetrar, emulsificar, dispersar, solubilizar y formar espuma; esto hace que su mayor aplicación se encuentre en el desarrollo de productos detergentes que son los principales constituyentes de productos de limpieza, productos del cuidado del hogar y productos cosméticos. Las propiedades de los surfactantes se deben principalmente a que sus moléculas tienen una parte hidrófoba, la cual tiene afinidad por aceites, grasas, etc; y una parte hidrofílica. Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican en aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos. Dado el amplio interés que los surfactantes iónicos han generado en diferentes procesos industriales así como el creciente problema de contaminación ambiental que representan, se ha motivado en los últimos años el desarrollo de sistemas de detección y cuantificación para estas especies químicas.

La técnica que se usa con mayor frecuencia para determinar surfactantes iónicos es la titulación en dos fases [44,45], pero en vista de las desventajas que presenta, se ha buscado el desarrollo de otras técnicas analíticas alternativas basadas en la espectroscopia [46,47], cromatografía de capa fina [48], conductimetría [49] y electroforesis capilar [50]. Otra estrategia la representan los electrodos selectivos a surfactantes iónicos, que resaltan por su economía y su

eficiencia comparada con los sistemas de detección mencionados anteriormente [51-53].

Los electrodos selectivos a surfactantes más desarrollados e investigados son los potenciométricos construidos a base de membranas de PVC [54-56] (en los cuales se inmoviliza en la matriz de PVC un par iónico del surfactante a determinar junto con otro de carga contraria y se usa una solución interna de cierta concentración del surfactante a determinar) aunque siguen presentando ciertas desventajas como son en algunos casos, baja estabilidad de la respuesta, interferencia de ciertos iones inorgánicos y limitaciones estructurales para ser acoplados a sistemas automatizados de análisis.

Se han propuesto diversas alternativas para el mejoramiento de los sensores potenciométricos de PVC, tales como el uso de polímeros conductores dopados con diversos aniones. El polipirrol (Ppy) es uno de los polímeros conductores más frecuentemente usados para este propósito, dado que presenta alta conductividad y estabilidad [57]. El polipirrol se puede formar por métodos electroquímicos a través de la oxidación del monómero de pirrol en radicales catiónicos, los cuales atraen electrostáticamente a los aniones dopantes induciendo con esto la formación de “cavidades” apropiadas para ellos. Este fenómeno crea una restricción conformacional restringiendo la interferencia de otros aniones [58] que pudieran estar presentes evitando la difusión de los mismos dentro del polímero. Los electrodos selectivos a base de membranas de polipirrol se han construido desde hace 15 años, para detectar cloruros [59,60], persulfatos [60], pH [61,62], percloratos [63] y nitratos [60,64].

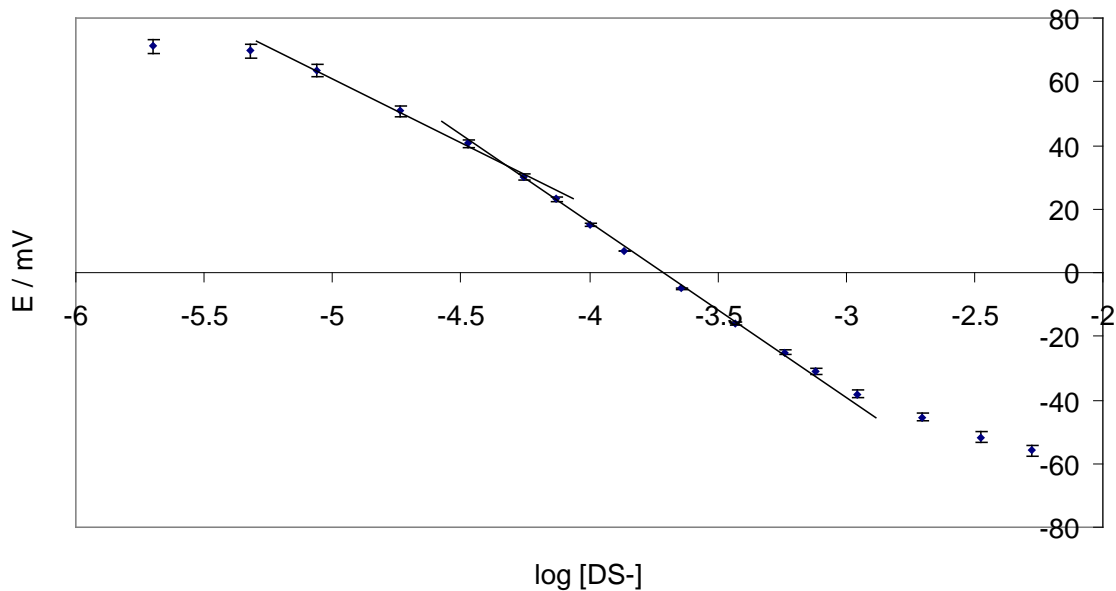
Estudios recientes han mejorado la respuesta de los electrodos a base de membranas de PVC inmovilizando en la matriz polipirrol dopado con el surfactante aniónico [65-68].

Dadas las ventajas que presentan las membranas formadas con polipirrol para sensores potenciométricos, en este capítulo se describe la construcción y caracterización de un ISE selectivo al ión dodecil sulfato ( $DS^-$ ) a través de una membrana de polipirrol formada electroquímicamente y dopada con este mismo anión. Para soportar la película polimérica se usa un electrodo composite grafito-resina epóxica de configuración cilíndrica. El composite puede prepararse para formar diferentes configuraciones por lo que representa una solución al problemas de configuración del sensor.

## • 5.2 RESULTADOS

### - 5.2.1 Estudios en batch con la configuración cilíndrica del ISE a $DS^-$

Se realizan las curvas de calibración correspondientes, en la figura 1 se presenta un promedio de 5 diferentes curvas de calibración.



**Figura 1. Curva de calibración característica para la determinación de DS<sup>-</sup> en batch con el electrodo de configuración cilíndrica.**

Se aprecian dos diferentes zonas de comportamiento Nernstiano a las concentraciones estudiadas. Cabe resaltar que los electrodos con matriz de PVC con par iónico como medio de reconocimiento no exhiben este cambio en la sensibilidad [55,68], mientras que el electrodo de PVC construido por Alizadejh et. al. [67] el cual contiene en lugar del par iónico polipirrol dopado con DS<sup>-</sup> presenta claramente este comportamiento. Se presume que esto se debe a la presencia de diferentes especies premicelares que se imprimen en la membrana de polipirrol, por lo que el sensor respondería de manera diferente a cada especie. Como esta característica no la presentan los electrodos de PVC convencionales, no se observa dicho cambio. El análisis estadístico por mínimos cuadrados de los puntos que ajustan a una recta para la zona a bajas concentraciones muestra una sensibilidad de aproximadamente  $39.43 \pm 0.34$  mV, límites de linealidad que van



de  $1.2 \times 10^{-5}$  M hasta  $5.01 \times 10^{-5}$  M y un límite de detección de  $8.9 \times 10^{-6}$  M; mientras que para la zona de altas concentraciones se tiene una sensibilidad de  $54.49 \pm 0.95$  mV y límites de linealidad que van de  $5.01 \times 10^{-5}$  M hasta  $1.25 \times 10^{-3}$ . El máximo límite de linealidad se presenta cerca de la concentración micelar crítica (CMC) reportada para el DSS en NaCl 0.1 M ( $\log \text{CMC} = -2.60$ ) [69]. La caracterización estadística nos confirma la capacidad sensora del polímero dopado.

Comparando los resultados obtenidos con experimentos de caracterización realizados a otros tipos de sensores potenciométricos a  $\text{DS}^-$  encontramos una buena concordancia entre ellos. La tabla 1 muestra la comparación de algunas características analíticas entre diferentes sensores reportados en la literatura, y el que se ha desarrollado en este trabajo.

**Tabla1. Comparación de la respuesta de diferentes ISE selectivos al ión  $\text{DS}^-$  .**

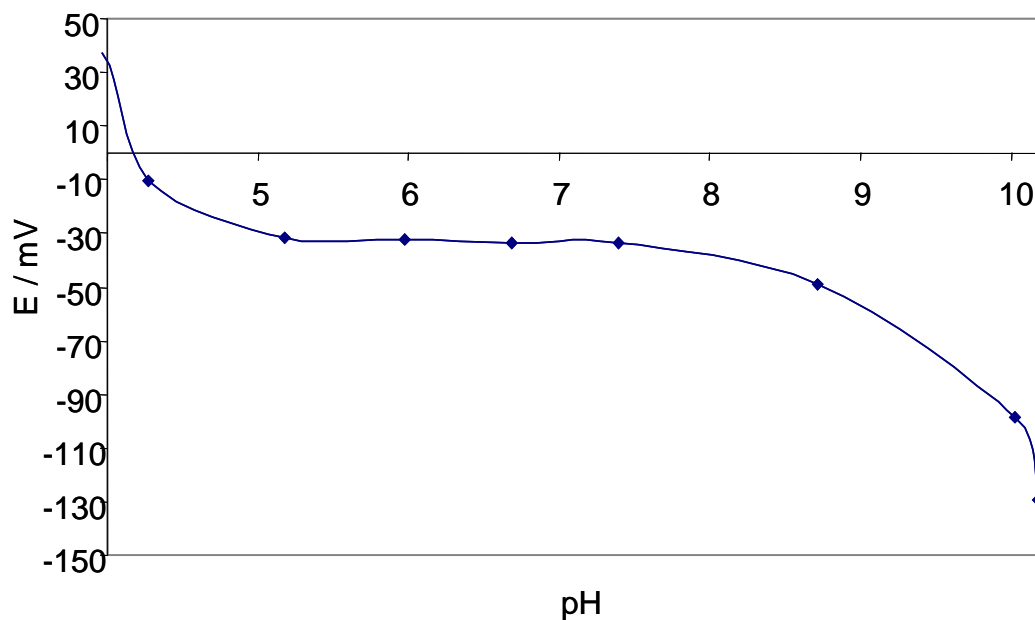
<b>Electrodo</b>	<b>Sensibilidad (mV/década <math>[\text{DS}^-]</math> (M)</b>	<b>Límite de detección <math>[\text{DS}^-]</math> (M)</b>
High Sense Tenside (Metrohm) [54]	75	$5 \times 10^{-6}$
PVC-TEGO-SDS [55]	58.9	$9 \times 10^{-7}$
CHEMFET [56]	51.2	$4.4 \times 10^{-7}$
Ppy*- $\text{DS}^-$ -PVC [67]	57.5	$5 \times 10^{-6}$
Ppy- $\text{DS}^-$ soportado en composite (este trabajo)	54.5	$2 \times 10^{-6}$

\* polipirrol

### **- 5.2.2 Influencia del pH en la respuesta del sensor**

Para determinar el intervalo de pH en el cual se puede obtener una respuesta confiable con el ISE construido a base de Ppy- $\text{DS}^-$ , se registra la

respuesta del mismo a una concentración constante de  $DS^-$  ( $10^{-3}$  M) en NaCl 0.1 M. Los resultados se presentan en la figura 3.



**Figura 3. Efecto del pH en la respuesta del ISE a una concentración de  $DS^- 10^{-3}$  M.**

Resulta claro que el ISE presenta una respuesta adecuada en un intervalo de pH que va de 5 a 8, valores que son muy cercanos a aquellos reportados por Alizadejh [67] en su electrodo de PVC-Ppy- $DS^-$ . Fuera de este intervalo, la respuesta presenta cambios muy drásticos en el potencial registrado, debido a la protonación del ión  $DS^-$  a pH ácidos, a la degradación del polímero y/o a la competencia de iones  $OH^-$  en medio básico.

### **- 5.2.3 Reproducibilidad de la respuesta del ISE.**

Se realizaron estudios de reproducibilidad de la respuesta del sensor construido, para lo cual se monitorea el potencial de respuesta en 20 diferentes mediciones de una concentración constante de  $DS^- 10^{-3}$  M en NaCl 0.1 M. El análisis estadístico reporta una reproducibilidad del 98.42% en términos del error

relativo respecto a la media calculada, lo cual resulta bastante satisfactorio para el funcionamiento del sensor.

#### - 5.2.4 Estudio de la selectividad del ISE.

Se han realizado estudios para determinar la selectividad del sensor respecto a diferentes aniones inorgánicos. Se evalúan los coeficientes de selectividad usando el método de mezcla de soluciones (mixed solution method), donde se mide la respuesta del sensor en soluciones a diversas concentraciones de los diferentes aniones estudiados y mezclados con DSS a una concentración  $10^{-3}$  M y NaCl 0.1 M; los resultados se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2. Coeficientes de selectividad  $K_{DS, X^-}$  para varios aniones interferentes  $X^-$ . (a) Dodecilsulfonato, (b) para-toluensulfonato, (c) Octil sulfato, (d) 1-octano sulfonato**

$X^-$	$K_{DS, X^-}$	$X^-$	$K_{DS, X^-}$
$NO_3^-$	$9.3 \times 10^{-4}$	$ClO_4^-$	$2.26 \times 10^{-3}$
$Br^-$	$7.34 \times 10^{-4}$	$H_2PO_4^-$	$1.2 \times 10^{-2}$
$F^-$	$8.54 \times 10^{-4}$	DBS <sup>-</sup> (a)	$1.62 \times 10^{-2}$
$CH_3COO^-$	$3.70 \times 10^{-3}$	p-TS <sup>-</sup> (b)	$3.26 \times 10^{-2}$
$CN^-$	0.279	OS <sup>-</sup> (c)	$3.5 \times 10^{-2}$
$NO_2^-$	$1.15 \times 10^{-3}$	1-OS <sup>-</sup> (d)	$2.42 \times 10^{-2}$

Se aprecia una excelente selectividad del sensor al ion  $DS^-$  respecto a los aniones estudiados, incluso contra otro tipo de surfactantes aniónicos, solo el ión cianuro presenta un valor considerable para el coeficiente de selectividad, debido posiblemente a una considerable interacción entre el nitrógeno de esta molécula y los protones de la superficie del polímero conductor.

### • 5.3 CONCLUSIONES

El sensor desarrollado presenta ventajas propias respecto al uso de polímeros conductores dopados. Se encuentran características analíticas que los hacen equivalentes en cuanto a utilidad a los otros sensores desarrollados e incluso respecto a los comerciales.

Además de lo anterior, se encuentran otras ventajas de este tipo de sensores sobre los comúnmente contruidos de PVC las cuales serían [70]:

- Dado que la construcción del sensor no está basada en el uso de un par iónico como medio de reconocimiento, el deterioro asociado a la disolución del par iónico no es considerado.
- Dada la impresión molecular dejada por el ión  $DS^-$  en el polímero, la formación de micelas se descarta a concentraciones por arriba de la concentración micelar crítica (CMC), lo que implicaría la pérdida del compuesto de reconocimiento de la matriz de PVC.
- Los electrodos comerciales de PVC no pueden adaptarse de manera sencilla a sistemas en flujo continuo, dada su construcción y configuración siendo la mayoría electrodos con solución interna.
- Mientras que en los electrodos comerciales de PVC la degradación de la matriz implica el adquirir uno nuevo, el soporte *composite* puede ser utilizado varias veces lijando la superficie y polimerizando de nuevo la membrana polimérica dopada.

## **CAPÍTULO 6**

# **DESARROLLO DE UN ISE TUBULAR A BASE DE POLIPIRROL DOPADO CON DS<sup>-</sup> PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE DS<sup>-</sup> EN FLUJO CONTINUO**

## • 6.1 ANTECEDENTES

La utilización de ESI para mediciones potenciométricas y de biosensores para mediciones amperométricas dentro de sistemas en flujo continuo, como el Análisis por Inyección en flujo (FIA por sus siglas en inglés) ha cobrado gran importancia con la modernización de los sistemas de análisis automatizados [71,72] dada la capacidad de miniaturización del sistema de detección, lo cual le proporciona grandes ventajas al sistema de análisis, como el poder aplicarlo fácilmente a estudios de campo. En el anexo 4 se presenta una descripción detallada de los principios de funcionamiento del sistema FIA.

Para el acoplamiento de ESI a FIA se han probado diferentes configuraciones las cuales se pueden dividir en configuraciones convencionales y configuraciones tubulares. Dentro de las primeras, la más representativa es la *disposición en cascada* propuesta por Ruzicka [73], en la que se utiliza una celda de flujo donde el ESI se encuentra soportado sobre el electrodo de referencia. Las configuraciones convencionales presentan ciertas desventajas, como evaporación, poca reproducibilidad, ruido de fondo, alteraciones hidrodinámicas con un régimen turbulento, no permiten el análisis multiparamétrico, etc. Estas deficiencias se ven superadas con las configuraciones tubulares (flow-through-electrodes), que fueron propuestas por Müller [74] y que son dispositivos tubulares de las mismas dimensiones que los tubos conductores de los flujos, con las paredes actuando como membranas sensoras.

Esta configuración ha servido para implementar diversos tipos de sensores potenciométricos en sistemas FIA y determinar cuantitativamente diversas especies iónicas de interés [75,76]. Aun así, para el caso específico de la determinación en flujo continuo de surfactantes iónicos se han desarrollado pocas estrategias para construir sistemas de análisis FIA-sensor potenciométrico que puedan llevar a cabo este tipo de estudios. La mejor ha sido la desarrollada por Martínez Barrachina et. al. [77] donde se coloca en un soporte tubular de grafito una membrana de PVC para inmovilizar en su matriz un par iónico integrado por el surfactante de interés y otro de carga contraria; esta especie brinda la selectividad requerida.

Basados en estas estrategias y en el sensor desarrollado y caracterizado en el capítulo anterior, se desarrollan sensores tubulares que sean selectivos al ion  $DS^-$  pero basados en el soporte de una membrana de polipirrol (Ppy) dopada con aniones  $DS^-$ . A partir de este objetivo, se plantea una estrategia para el depósito electroquímico del polímero conductor sobre el sustrato utilizado, que corresponde a un *composite* de grafito-resina epóxica, y que se construye en una configuración para acoplar luego este electrodo tubular a un sistema FIA. Dado que el mecanismo de polimerización depende de variables que resultan interdependientes entre sí, no resulta adecuado considerar un método estructurado de optimización experimental, donde una de las variables cambia mientras las otras se mantienen constantes. En su lugar, la optimización del sensor se lleva a cabo usando el método SIMPLEX, el cual es alimentado con las

variables que a nuestro juicio son las más importantes que pueden afectar las características del polímero formado y que se usará como membrana selectiva.

## • 6.2 RESULTADOS

### - 6.2.1 Características de la respuesta del sistema de análisis y tiempos de estabilización.

Para establecer el comportamiento del sistema analítico propuesto, es necesario establecer en primera instancia los tiempos de respuesta y estabilización del mismo. Realizando el seguimiento del potencial obtenido con respecto al tiempo al paso de acarreador por el sistema, se observa que se obtiene una línea base estable después de un periodo de 19 minutos. En la figura 1 se muestran el comportamiento del potencial de respuesta al inyectar diversas concentraciones crecientes de DSS.

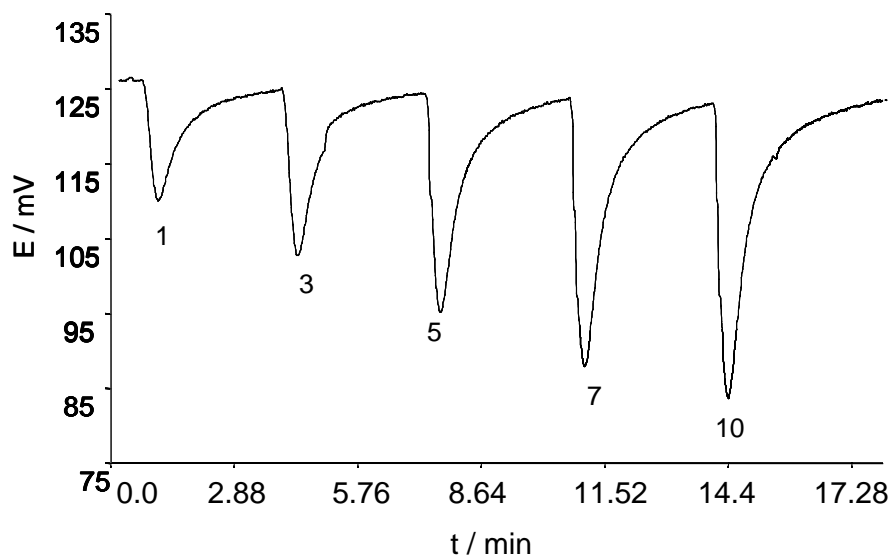


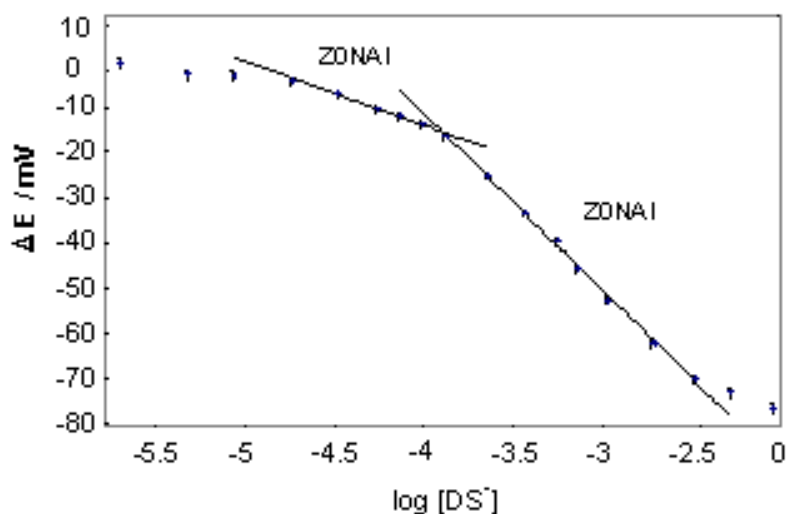
Figura 1. Variación temporal (t) del potencial (E) del sistema de análisis contruido para varias concentraciones de DSS. En número se indican las concentraciones correspondientes (mM). Velocidad de flujo:  $500 \mu\text{L min}^{-1}$



El gráfico presentado en la figura 1 se denomina comúnmente fiagrama. La forma del fiagrama obtenido muestra que en el sistema de análisis se tiene un régimen de transporte de flujo difusivo-convectivo al pasar la muestra por el detector, que son las características deseables para un sistema de estas características. Lo anterior se corrobora al evaluar la longitud de caudal (L) respecto a la velocidad de flujo (q) (para mayor detalle véase el anexo 4), donde se obtiene un valor de 60 cm.min/ml que se encuentra dentro del intervalo para considerar un régimen de transporte difusivo-convectivo. También se puede obtener el tiempo mínimo de estabilización de la línea base después de que la muestra termina de pasar por el detector, el cual resulta de entre 2 y 4 minutos dependiendo de la concentración de DSS inyectada. La respuesta analítica del sistema ( $\Delta E$ ) será la diferencia entre el potencial mínimo de respuesta al pasar la muestra por el detector y el potencial de línea base.

- **6.2.2 Curvas de calibración para el sistema de análisis.**

En la figura 2 se presenta el gráfico de  $\Delta E$  vs.  $\log [DS^-]$  que resulta del promedio de 6 experimentos realizados consecutivamente.



**Figura 2. Respuesta Analítica del sistema de análisis ( $\Delta E$ ) en función de la concentración de  $DS^-$ . Las líneas rectas corresponden al ajuste lineal de los puntos en las dos diferentes zonas presentadas (Zona I y II).**

En la figura 2, se pueden apreciar dos zonas diferentes donde los puntos experimentales presentan una tendencia lineal (zona I y II). Se observa el mismo comportamiento que para los sensores cilíndricos usados para las determinaciones de  $DS^-$  en sistemas batch que se describieron en el capítulo anterior. El máximo límite de linealidad (Zona II) se presenta cerca de la concentración micelar crítica (CMC) reportada para el DSS en NaCl 0.1 M ( $\log CMC = -2.60$ ) [78]. La sensibilidad del sensor tubular se obtiene por el análisis de regresión por mínimos cuadrados del intervalo lineal, que en ambos casos corresponde a un comportamiento lineal:

$$E = E_0 + S \log [DS^-]$$

donde  $E$ ,  $E_0$ ,  $S$  y  $[DS^-]$  son, la respuesta Analítica del sistema ( $\Delta E$ ), la ordenada, la sensibilidad y la concentración del analito ( $DS^-$ ) respectivamente. El límite de detección se estima de las curvas de calibración según se describe en el Anexo 6.

### 6.2.3 Optimización SIMPLEX de la membrana de Ppy-DS

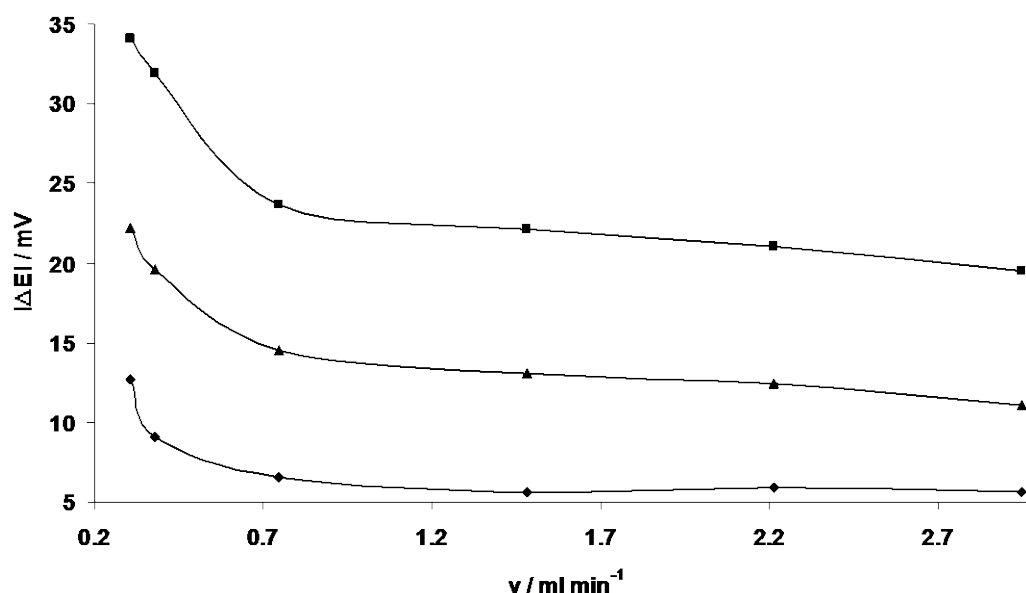
La tabla 1 muestra los resultados para los datos experimentales sugeridos por el SIMPLEX durante la optimización de la sensibilidad del sistema respecto a la zona II descrita en las curvas de calibración obtenidas en la sección 6.2.2. Las últimas líneas de datos de la tabla indican las condiciones donde se logra la maximización de la sensibilidad, es decir, donde las variables de prueba permanecen prácticamente invariantes.

Tabla 1. Optimización SIMPLEX de la sensibilidad del sistema de análisis para DS.

Ensayo	[Py] (M)	[DSS] (mM)	Eox (mV)	Tiempo (min)	Sensibilidad (mV/[DSS] década)	Correlación
1	0.1	0.1	1200	60	27.95	0.9976
2	0.01	2	650	20	24.29	0.9976
3	0.05	1	900	40	28.38	0.9982
4	0.08	3	700	25	23.82	0.9976
5	0.007	1	800	30	28.90	0.9986
6	0.108	0.55	1150	58	24.69	0.9978
7	0.076	0.4	1080	57	29.81	0.9991
8	0.035	1.64	775	29	28.21	0.9972
9	0.049	0.1	1046	49	30.79	0.9968
10	0.043	1.01	893	38	29.44	0.9979
11	0.065	0.71	1003	46	31.82	0.9989
12	0.06	1.34	892	38	31.81	0.9977
13	0.064	1.97	809	32	33.76	0.9996
14	0.06	0.79	976	44	35.62	0.9984
15	0.061	0.82	952	40	35.84	0.9982
16	0.06	0.84	890	35	35.71	0.9976
17	0.058	0.84	921	37	36.35	0.9987
18	0.063	0.83	923	35	36.42	0.9982
19	0.06	0.85	925	36	36.44	0.9989

Los resultados sugieren que para obtener la sensibilidad óptima para el sistema de análisis se deben cumplir el siguiente conjunto de condiciones:

concentración de monómero de pirrol  $0.060 \pm 0.002$  M, concentración de DSS  $0.810 \pm 0.021$  mM, potencial de oxidación  $920.7 \pm 3.4$  mV y tiempo de oxidación  $36 \pm 0.6$  min. Es importante mencionar que el tiempo óptimo de oxidación concuerda con aquel reportado por Hutchins et al. [79] donde se desarrollan sensores a base de Ppy para diferentes aniones, aunque la concentración de monómero de pirrol difiere de aquel reportado por Alizadejh et. al. [67] en el desarrollo del sensor de PVC con Ppy-DS<sup>-</sup>. La máxima sensibilidad encontrada resulta  $36.40 \pm 0.03$  mV/década [DS<sup>-</sup>], que corresponde a aproximadamente la mitad de la esperada (alrededor de 60 mV/década [DS<sup>-</sup>]) respecto al comportamiento Nernstiano de un sensor de estas características. Comparando con los resultados para el sensor construido para estudios en batch descrito en el capítulo anterior, se observa el mismo fenómeno. Una explicación plausible para esta diferencia puede ser el hecho de que al terminar de pasar la muestra por el detector, aún no se han alcanzado las condiciones para el equilibrio, posiblemente debido a la velocidad de flujo utilizada y a la lenta difusión del ión DS<sup>-</sup> a través de la membrana polimérica dado el gran tamaño de la molécula. En batch se obtiene una sensibilidad mucho más alta pues se permite en todo momento al sistema alcanzar las condiciones para el equilibrio. Para corroborar esta hipótesis se realiza el seguimiento de la respuesta del sensor a inyecciones de una misma concentración de DS<sup>-</sup> a diferentes velocidades de flujo del sistema FIA. En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos para diferentes concentraciones estudiadas.



**Figura 7. Comparación de la respuesta diferencial de potencial ( $\Delta E$ ) a diferentes velocidades de flujo a una concentración fija de DSS.: ( $\blacktriangledown$ )  $3 \times 10^{-4}$  M, ( $\blacktriangle$ )  $1.43 \times 10^{-3}$  M, ( $\blacksquare$ )  $3 \times 10^{-3}$  M**

Como se esperaba, en la figura 3 se observa que a medida que aumenta la velocidad de flujo del sistema, la respuesta disminuye. Este fenómeno es muy marcado a velocidades bajas, a velocidades más altas tiende a estabilizarse la respuesta pues el bloque de muestra pasa demasiado rápido por el detector y solo la cantidad de analito que alcanza a difundir es prácticamente constante. Con este estudio se corrobora la hipótesis formulada con anterioridad.

Aunque la optimización del sistema de análisis se lleva a cabo considerando sólo los puntos para la zona II de las curvas de calibración, es conveniente evaluar los otros parámetros analíticos que se obtienen al analizar la zona I después de la optimización. La tabla 2 muestra los valores para los parámetros evaluados a las condiciones de sensibilidad óptima de la zona II.

**Tabla 2. Parámetros analíticos para el sistema analítico optimizado.**

<b>Parámetro analítico</b>	<b>Valor</b>
Sensibilidad / mV/década $[\text{DS}^-]^{-1}$ zona I	$15.11 \pm 0.11$
Sensibilidad / mV/década $[\text{DS}^-]^{-1}$ zona II	$36.40 \pm 0.03$
Intervalo lineal (zona I) $[\text{DS}^-] / \text{M}$	$1.58 \times 10^{-5} - 1.12 \times 10^{-4}$
Intervalo lineal (zona II) $[\text{DS}^-] / \text{M}$	$1.26 \times 10^{-4} - 3.88 \times 10^{-3}$
Límite de detección $[\text{DS}^-] / \text{M}$	$1.50 \times 10^{-5}$

La sensibilidad obtenida para la zona I en el sistema optimizado es de alrededor de 15 mV/década  $[\text{DS}^-]$ , que no corresponde a la máxima registrada al realizar los ensayos sugeridos por el método SIMPLEX. Esto demuestra que la optimización de un parámetro analítico no implica necesariamente la optimización de los demás parámetros. Aún así, la sensibilidad a bajas concentraciones de  $\text{DS}^-$  (zona I) después de la optimización se acerca a la máxima registrada. También se

observa que los límites de detección se mantienen prácticamente invariantes en todos los ensayos experimentales realizados.

#### - 6.2.4 Tiempo de vida del sensor tubular dentro del sistema FIA.

Se realizaron estudios de calibración consecutivos con un mismo sensor registrando la sensibilidad (S) en función del tiempo, la figura 4 muestra el gráfico representativo para este estudio.

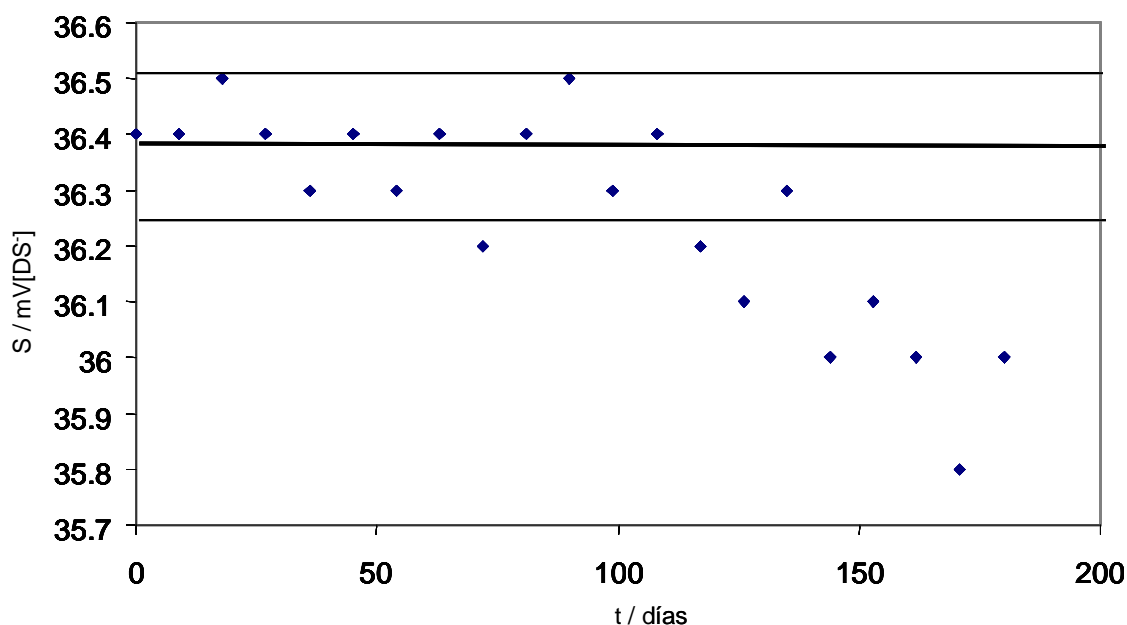


Figura 4. Gráfico de la sensibilidad del sistema de análisis como función del tiempo.

Se realiza el estudio estadístico de estas mediciones para calcular la media y los intervalos de confianza al 95%, se observa un valor estable y confiable para la sensibilidad por lo menos tres meses de uso, después del cual el valor empieza a decrecer lentamente. Considerando que el análisis se realiza en flujo continuo donde se espera que las condiciones de mecánica del flujo degraden el polímero

dopado, el tiempo de vida del sensor tubular resulta bastante satisfactorio, aunque podría variar dependiendo de la velocidad de flujo utilizada.

### • 6.3 CONCLUSIONES

Se ha descrito la construcción de un sistema de análisis en flujo continuo para el ión  $DS^-$  basado en el desarrollo de un sensor tubular donde se soporta una membrana de Ppy dopada con  $DS^-$ . La membrana de polipirrol es polimerizada electroquímicamente *in situ* sobre un soporte *composite*.

A diferencia de los sensores potenciométricos comerciales para determinar surfactantes aniónicos, el sensor tubular propuesto supera las restricciones en cuanto a configuración y problemas en cuanto a cambios en la hidrodinámica del flujo que pasa a través de éste. Sólo los electrodos tubulares construidos a base de membranas de PVC soportadas pueden superar estas limitaciones dentro de un sistema FIA [77]; sin embargo, el soportar la membrana en el *composite* conductor es laborioso comparado con la electropolimerización *in situ* que se realiza en este trabajo además que se obtiene mejor soporte. Otro hecho que vale la pena mencionar es que en el trabajo de Martínez-Barrachina et. al. [77] es necesario implementar una etapa previa de preconcentración de los surfactantes antes de pasar por el detector, mientras que el sistema que se ha descrito en este trabajo es capaz de realizar mediciones directas.

Los resultados mostrados resultan prometedores para la aplicación de este sistema de análisis para  $DS^-$  dada su simplicidad en cuanto a construcción y la accesible polimerización de la membrana sensora lo que abarata costos desde el



punto de vista comercial, además de la capacidad de realizar análisis *in situ* y de ser automatizado.

# **TERCERA PARTE**

CONSTRUCCIÓN DE UNA ADECUADA  
CONFIGURACIÓN PARA EL ACOPLAMIENTO  
A FIA DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN  
AMPEROMÉTRICO PARA LA  
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE  $\beta$ -D-  
GLUCOSA

## **CAPÍTULO 7**

# **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE $\beta$ -D-GLUCOSA USANDO UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO TUBULAR ACOPLADO A UN SISTEMA FIA**

## • 7.1 ANTECEDENTES

Ya se ha mencionado en capítulos anteriores que debido al constante desarrollo de las investigaciones industriales y científicas se ha exigido la instrumentación de sistemas de detección que sean accesibles para el analista, capaces de realizar estudios *in situ*, que sean automatizables y de bajo costo. Se ha planteado también que el uso de sensores químicos como sistemas de detección, integrados a sistemas de muestreo como el Análisis por Inyección en Flujo (FIA por sus siglas en inglés) han resultado prometedores para satisfacer los requerimientos del análisis químico moderno [80-82].

Por su importancia biológica, clínica y alimenticia, la  $\beta$ -D-glucosa resulta uno de los analitos a los que se han dedicado mayores esfuerzos para su detección y cuantificación [83]. Los biosensores químicos típicos para la determinación de  $\beta$ -D-glucosa usan la enzima glucosa oxidasa como agente biológico de reconocimiento [84] y la respuesta analítica se obtiene midiendo la corriente producida a potencial impuesto debido a la oxidación del peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática.

En la actualidad existen biosensores comerciales para la determinación de  $\beta$ -D-glucosa en muestras de alimentos y bebidas, además de versiones miniaturizadas para estudios clínicos y de control periódico de  $\beta$ -D-glucosa en sangre. A pesar de los avances actuales, estos dispositivos presentan ciertos problemas; los biosensores usados en la industria presentan pérdida progresiva de la enzima  $\beta$ -D-glucosa oxidasa en poco tiempo [84], en tanto que los

miniaturizados presentan una vida de almacenamiento pre-uso corta (unos cuantos meses) y sólo pueden ser utilizados una vez [84]. Aunado a esto último, se encuentra el problema del acoplamiento del biosensor amperométrico a sistemas de muestreo automatizable, dado que no es sencillo desarrollar un adecuado soporte y configuración del sistema amperométrico dentro del sistema en flujo continuo. Para resolver los problemas estructurales del biosensor para  $\beta$ -D-glucosa se han planteado diferentes formas de inmovilizar a la enzima sobre el transductor eléctrico, que van desde el entrecruzamiento químico [85], inducción de enlace covalente [85], retención a través de una membrana inerte [85], adsorción física sobre la superficie de un sólido [85], uso de tecnología sol-gel [86], hasta la inmovilización dentro de una matriz polimérica; esta última encontrando un gran campo de aplicación y estudio en años recientes [87-90]. Algunas de estas técnicas, sin embargo, presentan desventajas que van desde la inactivación de la enzima hasta inestabilidad en la respuesta analítica obtenida.

Una estrategia que ha demostrado superar muchos de estas limitaciones es la inmovilización a base de *biocomposites*, donde se inmoviliza la enzima dentro de una matriz que contiene un agente conductor y un agente aglomerante. Los primeros *biocomposites* desarrollados usaban aceites vegetales como agentes aglomerantes [91-94]. Aunque se obtuvieron resultados satisfactorios, la integridad del biocomposite resultó muy inestable, por lo que esta forma de inmovilización no encontró gran desarrollo. Algún tiempo después, se desarrollaron los *biocomposites* de matriz rígida, donde el agente aglomerante es un polímero

sólido [95,96]. Este nuevo tipo de *biocomposites* no sólo resuelve el problema de la integridad del biocomposite, sino demostró que la matriz rígida estabiliza la estructura de la enzima prolongando así la vida media del biosensor, además de que se pueden construir en infinidad de configuraciones geométricas.

En cuanto al acoplamiento del sistema de detección a sistemas de muestreo no segmentados, se han realizado estudios donde se han propuesto diversas estrategias de acoplamiento, como lo demuestran los trabajos de Fang et. al. [97], Gooding et. al. [98], Lapierre et al. [99] y Palmesano et. al. [100]. No obstante, estas celdas presentan un cierto grado de complejidad en cuanto a su construcción, además de que por la infraestructura utilizada, resultan de alto costo.

En el trabajo que se presenta se plantea aprovechar las ventajas de los *biocomposites* de matriz rígida para construir biosensores selectivos a  $\beta$ -D-glucosa de configuración tubular, propuesta por primera vez por Miller [101], que superen las limitaciones de los dispositivos existentes y acoplarlos de manera adecuada a un sistema FIA de modo que se obtenga una configuración de fácil construcción, que presente buena respuesta analítica y que sea de bajo costo comparada con otros sistemas desarrollados, para de este modo construir un novedoso sistema de análisis para determinar  $\beta$ -D-glucosa.

## • 7.2 RESULTADOS

### - 7.2.1 Configuración adecuada del sistema amperométrico dentro de FIA.

En la literatura se sugiere colocar el sistema amperométrico dentro de FIA en el siguiente orden: primero el biosensor, después el electrodo auxiliar y al final el

electrodo de referencia. Se prueba la respuesta del sistema, en términos del ruido instrumental y de la deriva encontrada, a diferentes distancias entre el biosensor y el electrodo auxiliar. El ruido experimental se considera como el promedio de las fluctuaciones máximas de la corriente en sentido positivo y negativo. La velocidad del flujo en todo momento es de 841  $\mu\text{l}/\text{min}$ . En la tabla 1 se resumen los resultados encontrados para las tres distancias estudiadas.

**TABLA 1. Comparación del ruido y deriva presentados por el sistema de análisis de  $\beta$ -D-glucosa para diferentes distancias del biosensor y el electrodo auxiliar.**

Distancia entre electrodos (cm)	Ruido experimental ( $\mu\text{A}$ )	Deriva ( $\mu\text{A}/\text{min}$ )
22	Línea base muy inestable	Negativa, no determinable
5	$\pm 0.49$	-0.34
$\approx 0$	$\pm 0.1$	-0.22

Los parámetros estudiados mejoran mientras más cerca estén el biosensor y el electrodo auxiliar, por lo que se decide unir ambos electrodos. Esto se logra uniendo los dos electrodos y al mismo tiempo aislándolos entre sí usando una capa de resina epóxica Araldit-H.R. La unión de los electrodos y el diseño final del sistema de análisis de  $\beta$ -D-glucosa se muestra en la figura 1.

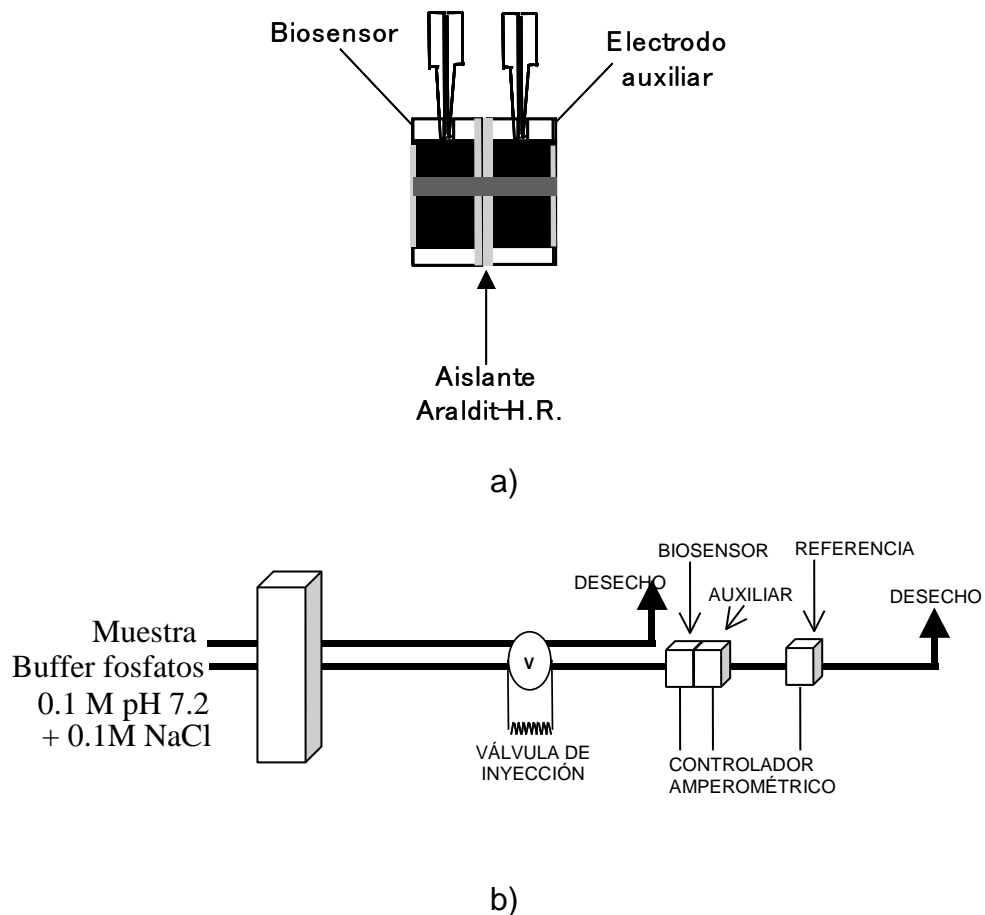


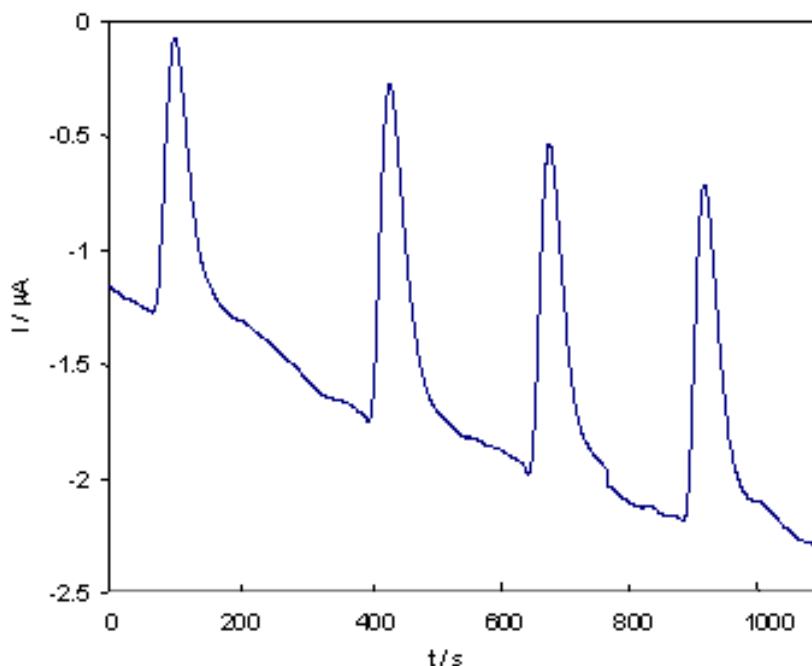
Figura 1. a) Acoplamiento del biosensor con el electrodo auxiliar. b) Mejor configuración encontrada para el sistema de análisis de  $\beta$ -D-glucosa

### - 7.2.2 Relación corriente de respuesta – tiempo.

Se monitorean los cambios de corriente con respecto al tiempo para conocer y caracterizar el tipo de respuesta analítica del sistema de análisis. En la figura 2 se presenta un fiagrama característico para la respuesta del sistema de análisis a  $\beta$ -D-glucosa. Los perfiles de los picos de respuesta indican un régimen laminar para el flujo, controlado por procesos difusivos y convectivos, lo que es deseable en un sistema FIA para poder obtener resultados reproducibles, al



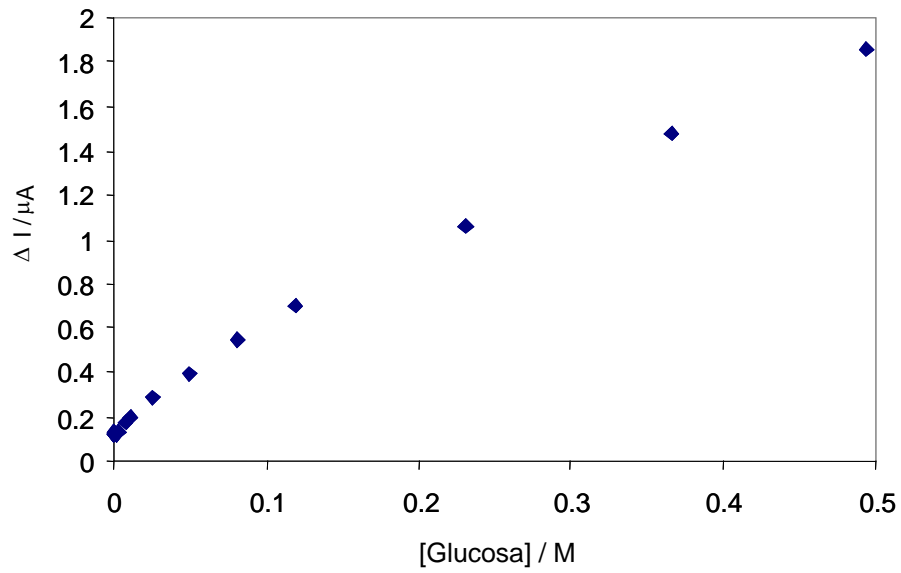
evaluar la longitud de caudal respecto a la velocidad de flujo (véase Anexo 4) se obtiene un valor de  $55 \text{ cm}\cdot\text{min}\cdot\text{ml}^{-1}$  lo que corrobora esta afirmación.



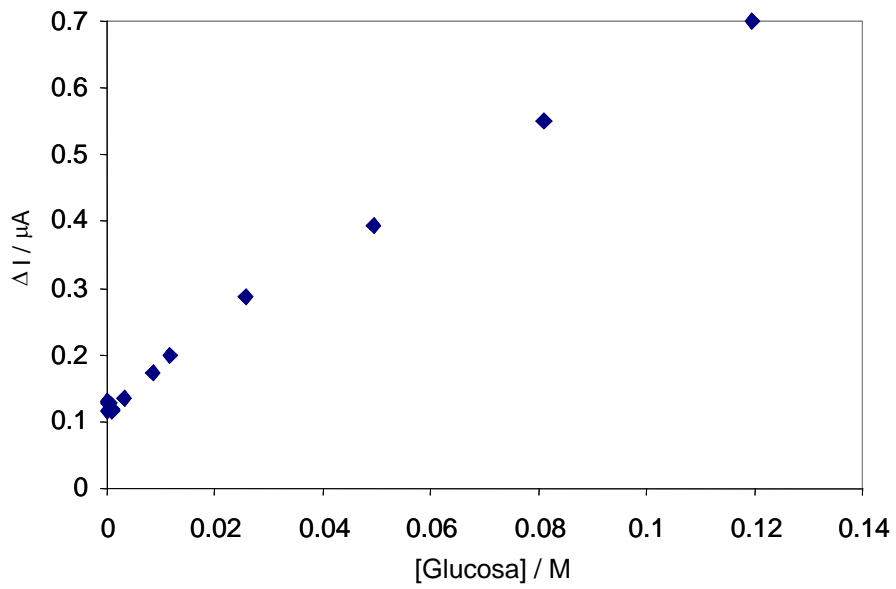
**Figura 2. Diagrama típico para el sistema de análisis desarrollado para la determinación de  $\beta$ -D-glucosa.**

### **- 7.2.3 Respuesta típica a inyecciones de diferentes concentraciones de $\beta$ -D-glucosa.**

Se inyectan al sistema diferentes concentraciones de  $\beta$ -D-glucosa para construir las curvas de calibración características para el sistema de análisis. En la figura 3 se presenta el promedio generado por cinco curvas de calibración típicas para diferentes concentraciones de  $\beta$ -D-glucosa inyectada. La velocidad de flujo usada es de  $841 \mu\text{l}/\text{min}$ .



a)



b)

**Figura 3. Curvas de concentración típicas del sistema de biosensor-FIA a una velocidad de flujo de 841  $\mu\text{l}/\text{min}$ . a) curva completa. b) Curva con escala más pequeña para observar concentraciones más bajas.**

El ajuste por mínimos cuadrados de los puntos adecuados de la curva de calibración muestra una correlación de 0.9953 con una ecuación lineal  $\Delta I = (2.76 \pm 0.12)[\text{Glucosa}] + (0.28 \pm 0.04)$ , que evidencia la relación lineal esperada entre la concentración de  $\beta$ -D glucosa y la respuesta en términos de la corriente diferencial. Con esto se puede decir que la sensibilidad del sistema es de  $2.76 \pm 0.12 \mu\text{A M}^{-1}$ , el límite de detección se encuentra en  $5.6 \times 10^{-3} \text{ M}$  de  $\beta$ -D glucosa y un intervalo de linealidad de  $7.8 \times 10^{-3} \text{ M}$  hasta  $0.5 \text{ M}$  de  $\beta$ -D glucosa.

Es importante establecer que se inyectaron concentraciones de hasta  $1 \text{ M}$  del analito sin que se observara la saturación enzimática del bioensensor, por lo que en realidad el límite máximo de respuesta pueda estar arriba de esta concentración. Este último hecho es muy relevante, dado que los estudios para determinar  $\beta$ -D glucosa en batch usando este tipo de biosensores composite muestran saturación enzimática a partir de una concentración de  $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ , esto parece indicar que existe una fuerte interdependencia entre la cinética enzimática y la velocidad del flujo del sistema.

#### **- 7.2.4 Estudio a diferentes velocidades de flujo del sistema de análisis de $\beta$ -D-glucosa.**

Se estudia la relación de los parámetros analíticos del sistema de análisis con relación a la velocidad del flujo impuesta. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos.

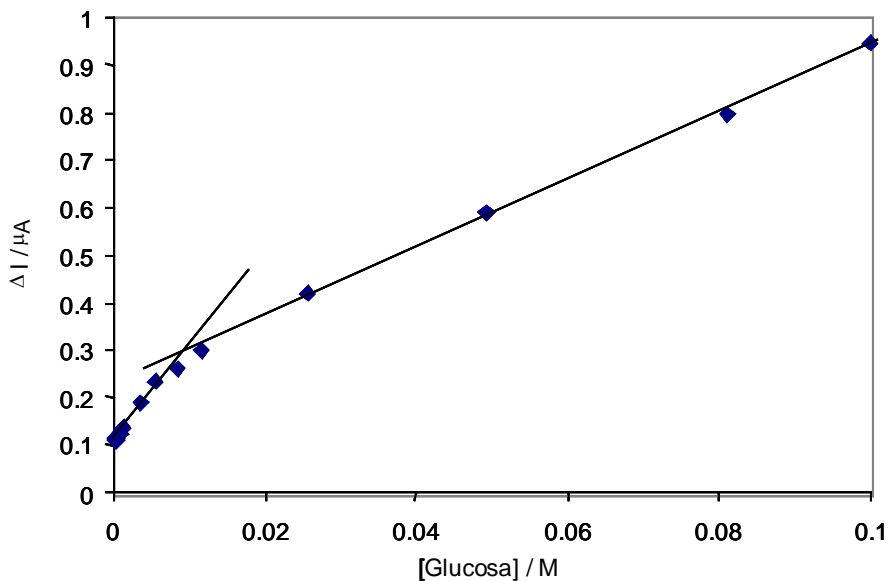
**TABLA 2. Resultados obtenidos a diferentes velocidades de flujo. (\* Se encuentra una reproducibilidad del sistema por arriba del 10% en términos del error estadístico relativo.**

Velocidad de flujo ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Tiempo de respuesta (s)	Límite de detección (M)	Sensibilidad ( $\mu\text{AM}^{-1}$ ) [ $\beta$ -D-glucosa]
242	60	Poco reproduc.*	Poco reproduc.*
541	35	$3.9 \times 10^{-3}$	3.27
841	24	$6 \times 10^{-3}$	2.52
1040	13	0.011	2.11

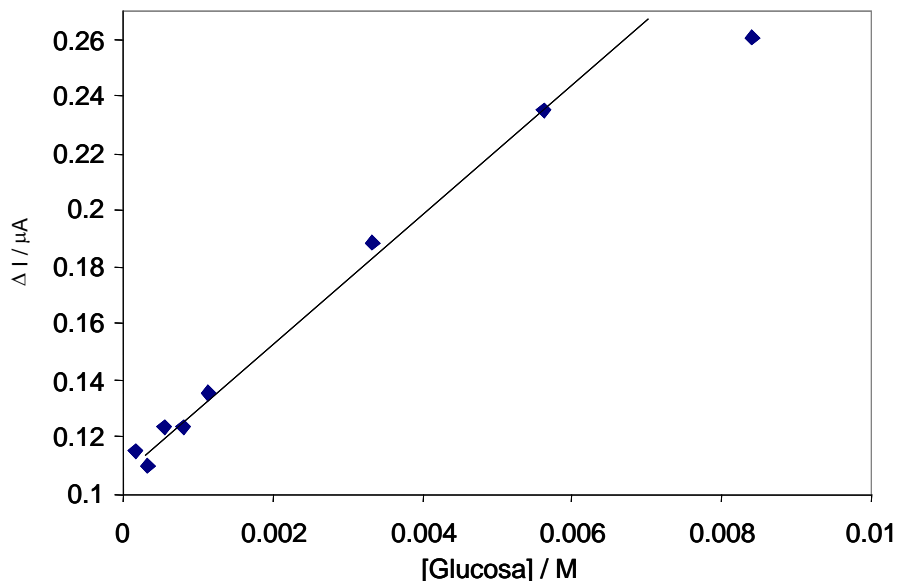
Se observa que a velocidades muy bajas se obtienen resultados con una reproducibilidad por arriba del 10% en términos del error estadístico relativo, lo cual hace inapropiado el sistema para estudios cuantitativos. Además de lo anterior, los perfiles de respuesta en el fiagrama muestran un flujo regido exclusivamente por mecanismos difusivos, lo cual no es recomendable para los perfiles de respuesta de FIA. La respuesta mejora a velocidades más altas, aunque al aumentar la velocidad también aumenta el límite de detección y disminuye la sensibilidad, pues la muestra puede pasar demasiado rápido por el detector. Dentro de las velocidades estudiadas se determina que se obtienen mejores resultados a  $541 \mu\text{l}/\text{min}$ , por lo que se utiliza esta velocidad en los estudios posteriores.

**- 7.2.5 Efecto de la longitud transversal de la superficie activa del biosensor sobre la respuesta del sistema de análisis de  $\beta$ -D-glucosa.**

Con el fin de disminuir el límite de detección mínimo encontrado, se construye un biosensor de tal forma que se dobla el área de la superficie activa. Se construyen las curvas de calibración correspondientes para el sistema de análisis a diferentes concentraciones de  $\beta$ -D-glucosa. En la figura 4 se muestra el promedio para 5 curvas de calibración representativas para el sistema.



a)



b)

**Figura 4. Curvas de calibración típicas del sistema de biosensor-FIA a una velocidad de flujo de 541  $\mu\text{l}/\text{min}$ . A) curva completa. B) Curva con escala más pequeña para observar concentraciones más bajas.**

Se observa que disminuye el límite de detección a bajas concentraciones en un orden de 10 veces a comparación de los primeros sistemas estudiados, además de un aumento en la sensibilidad del sistema. Se observan además, dos diferentes zonas donde la relación corriente-concentración tiene una tendencia lineal, pero con diferentes pendientes. Se realiza el ajuste lineal por mínimos cuadrados de ambas zonas obteniéndose la ecuación  $\Delta I = (18.35 \pm 0.09)[\text{Glucosa}] + (0.12 \pm 0.01)$  para la zona de bajas concentraciones, mientras que para las concentraciones más altas se obtiene  $\Delta I = (6.93 \pm 0.09)[\text{Glucosa}] + (0.23 \pm 0.02)$ ; los parámetros analíticos para este sistema de análisis de  $\beta$ -D-glucosa se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3. Resultados estadísticos para el ajuste lineal por mínimos cuadrados de los datos concentración de  $\beta$ -D-glucosa vs corriente diferencial de respuesta.**

	<b>Correlación (promedio)</b>	<b>Límite de detección (M)</b>	<b>Intervalo de linearidad (M)</b>	<b>Sensibilidad (<math>\mu\text{AM}^{-1}</math>) [<math>\beta</math>-D-glucosa]</b>
<b>Bajas concentraciones</b>	0.9936	$4.5 \times 10^{-4}$	$5.1 \times 10^{-4}$ – $9.6 \times 10^{-3}$	$18.35 \pm 0.09$
<b>Altas concentraciones</b>	0.9951	0.010	0.012 - > 1	$6.93 \pm 0.09$

Es relevante mencionar que, una vez más, no se observa saturación enzimática cuando concentraciones de hasta 1 M del analito son inyectadas en el sistema, lo que apunta a que el sistema puede ser útil para el análisis directo de muestras concentradas de  $\beta$ -D-glucosa sin la necesidad de realizar alguna etapa previa como la dilución de las mismas.

Aún con estos resultados tan prometedores, debe mencionarse también que el sistema propuesto puede mejorarse aún más considerando la optimización de otros parámetros, como el volumen de la muestra inyectada.

### - 7.2.6 Efecto de la fuerza iónica sobre la respuesta del sistema de análisis para $\beta$ -D glucosa.

Para evaluar el efecto de la fuerza iónica en la respuesta del sistema de análisis se construyen diversas curvas de calibración variando la concentración de NaCl usada para las muestras patrón y para el acarreador. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos variando la concentración de NaCl desde  $1 \times 10^{-4}$  M hasta 2 M.

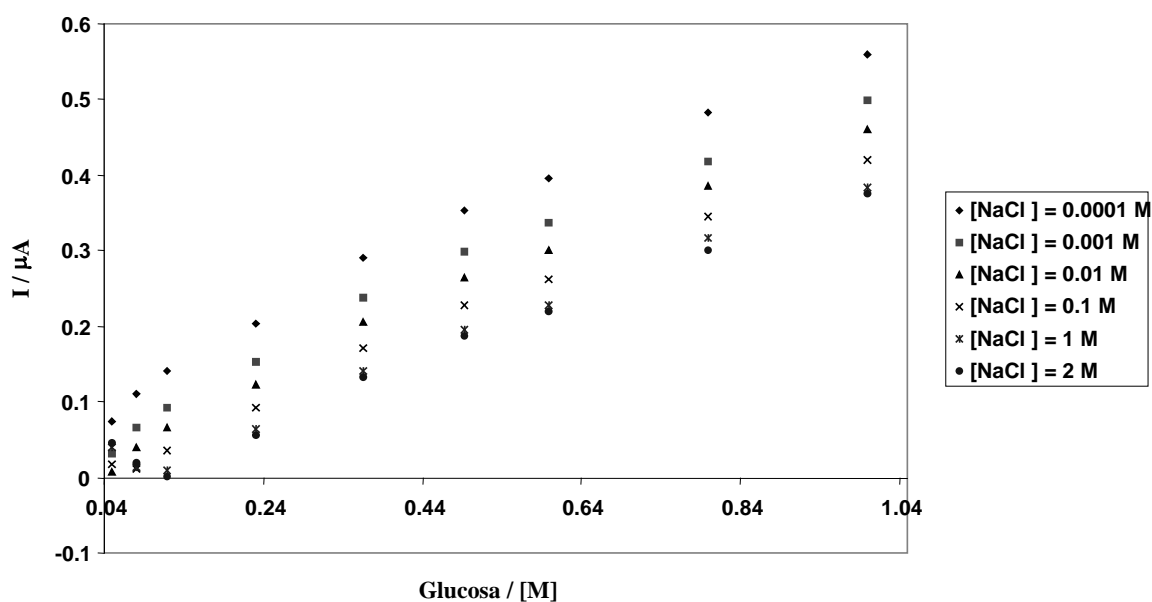


Figura 5. Efecto de la fuerza iónica impuesta por el electrolito soporte (en muestras patrón y acarreador) en el sistema de análisis  $\beta$ -D-glucosa.

Se puede observar que la relación entre la corriente de respuesta y la fuerza iónica impuesta de la solución que pasa por el sistema es inversamente proporcional, lo que refleja un decremento en la sensibilidad del sistema de análisis. Con esto se demuestra que no es recomendable inyectar muestras a una fuerza iónica diferente de aquella en el acarreador, para evitar interferencias en la

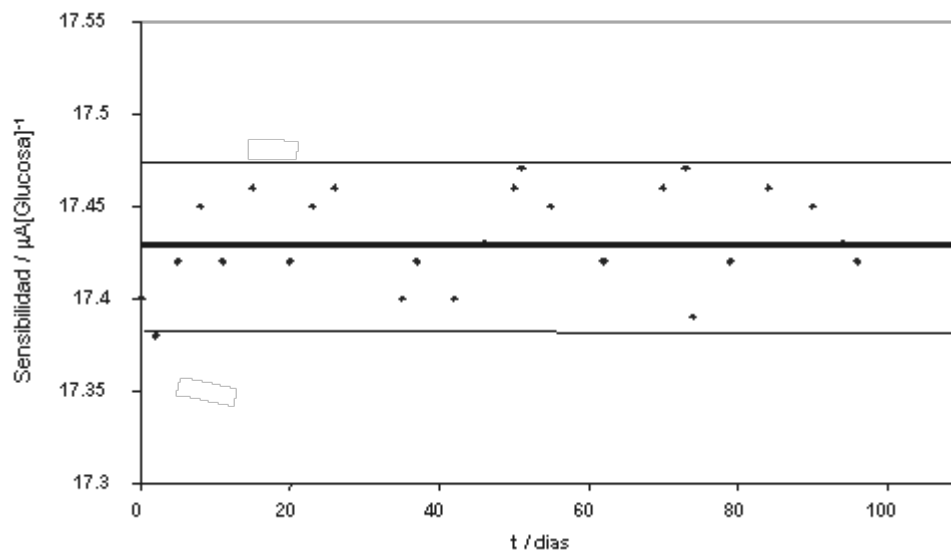


respuesta que resultarían del cambio súbito de la fuerza iónica en el ambiente del fluido que pasa por el sistema de detección. Esto también sugiere que para el análisis de muestras reales se debe implementar una etapa previa donde se imponga la fuerza iónica de la misma para que sea equiparable a la del acarreador.

#### **- 7.2.7 Reproducibilidad y tiempo de vida media del sistema de análisis de $\beta$ -D-glucosa.**

Se obtiene la reproducibilidad del sistema en términos de la desviación estándar relativa, realizando inyecciones sucesivas de  $\beta$ -D-glucosa a una concentración fija 0.02 M. Para una población de 30 inyecciones se obtiene una reproducibilidad respecto a la corriente de respuesta de 97.1 % en términos del error relativo.

Se evalúa el tiempo de vida media del sistema de detección haciendo un seguimiento de la sensibilidad a concentraciones bajas de  $\beta$ -D-glucosa con respecto al tiempo de uso y se realiza el estudio estadístico para calcular la media y los intervalos de confianza al 95%. En la figura 6 se presenta un gráfico representativo para el comportamiento observado.



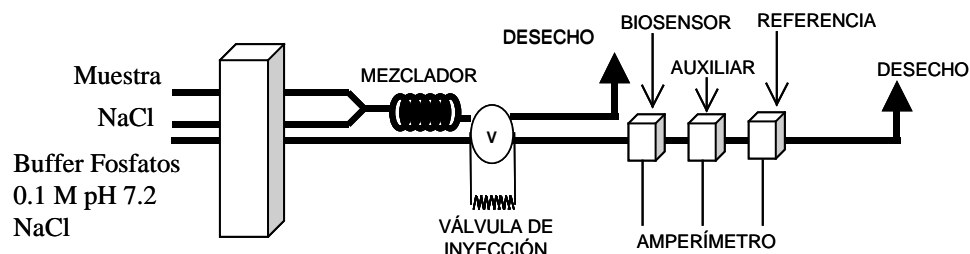
**Figura 6. Estimación de la vida media del sistema de detección, en términos de sensibilidad vs tiempo**

Se puede observar que, a tres meses de uso continuo, el sistema de análisis, sigue teniendo una sensibilidad adecuada y se tiene entonces que el tiempo de vida es superior a este tiempo.

### **- 7.2.8 Determinación de $\beta$ -D-glucosa en sueros comerciales.**

Para comprobar la utilidad de este sistema en muestras reales se determinó la cantidad de  $\beta$ -D-glucosa en diferentes sueros glucosados comerciales. Dado que en el mercado se encuentran sueros que contienen solo  $\beta$ -D-glucosa y otros que contienen, además, diferentes electrolitos, se modifica la configuración del sistema de análisis para lograr imponer una fuerza iónica constante. Se realiza una mezcla de la solución problema previo a la inyección al sistema de análisis, usando una unión tipo T donde se une el caudal de la solución problema y una solución de NaCl que servirá para imponer la fuerza iónica de la muestra que pasará por el sistema. Para asegurar una mezcla homogénea se hace pasar la

solución por una espiral de 200 cm de longitud antes de llegar a la válvula de inyección. La configuración del sistema se muestra en la figura 7.



**FIGURA 7. Sistema de análisis para la determinación de glucosa en sueros comerciales. Las concentraciones de NaCl dependen del suero a estudiar.**

Para los sueros que no contienen electrolitos se hace necesario añadir algún electrolito soporte para mejorar la conductividad del medio, dado que el sistema de detección es amperométrico. Se mezcla entonces la muestra a inyectar con una solución auxiliar que contiene NaCl 0.2 M y buffer de fosfatos 0.2 M, mientras que el acarreador es NaCl 0.1 M. Estas condiciones permiten asegurar que una vez que la muestra a sido mezclada con las solución auxiliar, se tendrán las mismas condiciones que la solución de acarreador.

Para los sueros que contienen electrolitos, se debe imponer la fuerza iónica del sistema, esto se logra mezclando la solución problema con una solución concentrada de NaCl. En este caso la muestra a inyectar se mezcla con una solución auxiliar de NaCl 2 M y 0.2 M del buffer de fosfatos, mientras que el acarreador contiene NaCl 1 M. De este modo se asegura mantener una fuerza iónica impuesta y condiciones semejantes a aquellas del acarreador. En la tabla 4 se presentan los resultados para el análisis de varios sueros comerciales, considerando para la estadística una población de 7 inyecciones por suero.

Tabla 4. Resultados para la determinación cuantitativa de  $\beta$ -D-glucosa en sueros orales comerciales.

MARCA DE SUERO Y LABORATORIO DE ORIGEN	CARACTERÍSTICAS DEL SUERO	CANTIDAD REPORTADA $\beta$ -D-GLUCOSA (g)/100 ml DE SOLUCIÓN	VALOR OBTENIDO SISTEMA DE ANÁLISIS (g)
<b>Hidraplus (Baxter)</b>	Oral con electrolitos	5	4.98 $\pm$ 0.05
<b>Electrolic (Pisa)</b>	Oral con electrolitos	5	4.92 $\pm$ 0.08
<b>ABB1063A (Baxter)</b>	Intravenoso con NaCl 0.9%	5	4.97 $\pm$ 0.07
<b>ABB4963 (Baxter)</b>	Peritoneal con electrolitos	1.5	1.47 $\pm$ 0.04
<b>Dextrabbot al 5% (Abbott)</b>	Intravenoso sin electrolitos	5	4.93 $\pm$ 0.08
<b>Dextrabbot al 10% (Abbott)</b>	Intravenoso sin electrolitos	10	10.09 $\pm$ 0.16
<b>DX 5 (Pisa)</b>	Intravenoso sin electrolitos	5	5.05 $\pm$ 0.05
<b>DX 50</b>	Intravenoso sin electrolitos	50	49.6 $\pm$ 1.2

Como se observa en la tabla 4, el sistema de análisis propuesto arroja resultados bastante satisfactorios que muestran concordancia con los valores reportados para  $\beta$ -D-glucosa en los sueros comerciales estudiados.

### • 7.3 CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un sistema para el análisis de  $\beta$ -D-glucosa en flujo continuo, basado en biosensores de matriz rígida y de configuración tubular acoplado a un sistema FIA. Se ha propuesto una configuración adecuada para el sistema amperométrico de detección donde se obtiene una línea base que muestra bajo ruido y una deriva constante. Se ha demostrado que la velocidad de flujo del sistema está íntimamente relacionada con la cinética enzimática del biosensor. La respuesta del sistema es linealmente proporcional a la concentración de  $\beta$ -D-glucosa, encontrándose un intervalo de linealidad que va de  $5.1 \times 10^{-4}$  hasta arriba de 1 M sin que se presente la saturación enzimática del biosensor, contrario a lo que se observa en el comportamiento de los biosensores utilizados en sistemas batch; donde para biosensores del mismo tipo utilizado en este trabajo se presenta alrededor de  $10^{-3}$  M de  $\beta$ -D-glucosa.

El trabajo expuesto demuestra que al incrementar la superficie activa del biosensor sus características analíticas mejoran. Se ha demostrado también que la fuerza iónica del medio tiene influencia directa en la respuesta del sistema, siendo esta relación inversamente proporcional. La reproducibilidad del sistema usando las condiciones óptimas encontradas resulta del 97.1 % respecto al error relativo, con un tiempo de vida mayor a 3 meses en uso continuo; características que son bastante aceptables para un biosensor trabajando en estas condiciones. Se realiza la determinación de  $\beta$ -D-glucosa contenida en diferentes sueros comerciales, agregando una etapa de mezclado para la muestra problema

imponiendo así la fuerza iónica, los resultados obtenidos están de acuerdo con los datos reportados por el laboratorio de origen.

Estos resultados demuestran la utilidad del sistema desarrollado para aplicarse en otros tipos de muestras, donde el sistema amperométrico de detección propuesto resulta mas barato que los comerciales, lo que hace que el sistema completo sea accesible y capaz de brindar resultados bastante confiables.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

A lo largo de esta tesis se han planteado diversas aplicaciones novedosas para sensores químicos de diferentes clases.

Dentro de la primera parte se han planteado los principios operacionales generales de los sensores ISFET (con membrana de nitruro de silicio) en medio de ácido acético glacial. Con esto, se han realizado cálculos de constantes termodinámicas de especies básicas disueltas en medio acético glacial mediante titulaciones potenciométricas con el ISFET como sensor de potencial. Se encontraron valores para las constantes de disociación total de los percloratos protonados de piridina y dietilamina que no difieren significativamente de los reportados en la literatura. Estos resultados son prometedores en cuanto a la explotación de los sensores ISFET para su uso en medios no acuosos que incluyen el cálculo de parámetro termodinámicos dentro de los mismos, así como la posibilidad de usar un mismo sensor para estudios en diferentes solventes. Del mismo modo, usando electrodos de membrana de vidrio para uso en medio de ácido acético glacial, se ha propuesto una metodología diferente a la tradicional para la determinación de constantes de equilibrio en este medio. Se ha planteado el uso del programa SUPERQUAD para el ajuste de los resultados experimentales a un modelo químico propuesto en base los equilibrios involucrados en la titulación ácido-base, cabe recalcar que según la bibliografía consultada éste programa no ha sido utilizado para cálculos en medios no acuosos. Los resultados obtenidos para el ajuste de experimentos con piridina y dietilamina arrojan constantes de estabilidad que no difieren significativamente con los reportados en la literatura, por lo que el método se aplicó con éxito para la determinación de las constantes



de las especies de anilina en medio acético glacial. Después de casi 50 años en que el método tradicional ha sido el único aplicado para cálculos de constantes termodinámicas en ácido acético glacial, se lograron resultados muy satisfactorios con la metodología planteada con SUPERQUAD, lo que abre las puertas a considerar esta nueva herramienta que incluso podría ser superior a la tradicional en cuanto a la estadística del tratamiento de los datos experimentales.

En la segunda parte, se ha implementado el desarrollo de un sensor químico potenciométrico para la determinación cuantitativa del surfactante dodecil sulfato de sodio. Para desarrollarlo se aprovechan las ventajas de la electropolimerización de polipirrol dopado, el cuál se ha comprobado que funciona como membrana selectiva a iones. Se desarrolló un sensor de estas características usando como electrodo de trabajo un composite grafito-resina epóxica que presenta ventajas sobre los sustratos metálicos comúnmente usados para crecer al polímero. Para tener un mejor entendimiento de la membrana a utilizar, se establecieron las características del crecimiento electroquímico de polipirrol (Ppy) y los factores que pueden afectar el mismo. Se caracterizó entonces el polímero de Ppy dopado con el ión dodecil sulfato ( $DS^-$ ), realizándose estudios voltamperométricos se determinó un proceso de REDOX irreversible y limitado por la difusión mientras que el ajuste teórico de la polimerización potencioestática confirma que para potenciales por abajo de 650 mV vs ECS este crecimiento está regido por un proceso de nucleación 3D limitado por la difusión. Se comprobó que para ambas técnicas de electropolimerización se obtienen polímero estables, aunque la técnica voltamperométrica parece más estable. Se

describió entonces una configuración cilíndrica para el sensor con membrana Ppy-DS<sup>-</sup> y se caracterizó en sistemas estacionarios (batch), encontrándose características que lo hacen comparable con los sensores a base de PVC disponibles comercialmente, y a otros tipos de sensores reportados en la literatura. Así, se propone su aplicación para determinaciones en flujo continuo usando un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA), por lo que se discuten las características de un sistema de estas características. Se desarrolla una metodología para construir un sensor de configuración tubular para acoplarse al sistema FIA, realizando una electropolimerización *in situ* sobre el soporte. Las condiciones de electropolimerización fueron optimizadas respecto a la maximización de la sensibilidad usando el algoritmo SIMPLEX. El sistema de análisis integrado presenta resultados satisfactorios y prometedores considerando que existen reportadas pocas alternativas para la determinación de DS<sup>-</sup> en continuo.

En la tercera parte se ha realizado la determinación en continuo de  $\beta$ -D-glucosa oxidasa construyendo biosensores composite a base de glucosa oxidasa y de configuración tubular. Se ha propuesto una novedosa celda amperométrica que brinda resultados bastante satisfactorios para el análisis del analito en cuanto a reproducibilidad, sensibilidad y tiempo de vida. Con el sistema construido se han realizado las determinaciones de  $\beta$ -D-glucosa oxidasa presente en electrolitos glucosados obteniendo resultados que coinciden con la cantidad reportada por los fabricantes.

En este trabajo solo se han explotado algunas de las múltiples aplicaciones que se les pueden dar a los diversos tipos de sensores químicos, que seguirán teniendo por mucho un lugar predominante en las técnicas de análisis químico dada su sencillez, versatilidad y bajo costo; y cuya construcción y aplicación tienen como límite la imaginación del analista.

# **PROYECCIONES DEL TRABAJO DE TESIS**

Lejos de terminar una investigación, los resultados que se han presentado obligan a plantear otras posibilidades de aplicación para los estudios realizados, su optimización y nuevas vertientes que podrían generar un tema de investigación adicional.

Dentro de la primera parte de la tesis, en el caso del ácido acético glacial como solvente las posibilidades de explotación son bastas dado que, como se ha explicado en los capítulos correspondientes, las estrategias de estudio son las mismas desde hace casi 50 años. El uso de sensores de nueva generación como los ISFET para determinaciones de parámetros termodinámicos así como de medida del pH es un campo prácticamente virgen en este sentido. De manera particular para el trabajo presentado, queda pendiente el desarrollo de una estrategia para el cálculo de constantes de basicidad de especies básicas en el sistema así como estudios para determinar la interacción entre la membrana de nitruro de silicio y el ácido acético glacial y de esta forma entender de manera más clara el mecanismo de respuesta del sensor. Para el cálculo de constantes termodinámicas con SUPERQUAD, está por demás mencionar la utilidad de esta metodología para el análisis de otras especies básicas fuera de las reportadas en el trabajo, que comúnmente se usan en industrias como la farmacéutica.

En cuanto a la segunda parte, solo el uso del sustrato composite grafito - resina epóxica para crecer el polipirrol (Ppy) dopado con el ión dodecil sulfato ( $DS^-$ ) requiere de estudios adicionales para entender adecuadamente el crecimiento del polímero conductor. En el caso del desarrollo del sistema de análisis de  $DS^-$  en flujo continuo, queda pendiente el optimizar los parámetros

relacionados con el sistema de muestreo para intentar mejorar la sensibilidad del sistema, así como su aplicación en sistemas problema reales donde pudieran tener que plantearse alternativas al diseño para superar inconvenientes como interferentes o sustancias que degraden el polímero.

Dentro de la tercera parte, la configuración de la celda amperométrica para la determinación de  $\beta$ -D-glucosa puede mejorarse, quedando pendiente proponer una forma de construir un electrodo de referencia tubular para tener dentro de la misma configuración a todo el sistema electródico. El desarrollo de electrodos de pseudoreferencia podría ser una solución a este respecto. De igual forma que para el sistema potenciométrico para determinar  $DS^-$ , los parámetros del sistema de muestreo deben ser optimizados para obtener una mejora en los de por si buenos resultados alcanzados con el sistema propuesto. También se debe plantear la aplicación del sistema en otro tipo de sistemas reales, como muestras de alimentos o de suero sanguíneo, considerando alternativas para el sistema y analizar el acoplamiento de sistemas de pretratamiento de la muestra en el mismo sistema de análisis.

## **REFERENCIAS CITADAS**

- [1] J. S. Fritz, *Acid-Base Titrations in Nonaqueous Solutions*. G. F. Smith Chemical Co. Columbia Univ, 1952
- [2] G. Biedermann y L. J. Sillén, *Ark. Kemi*, **5**, 425 (1953)
- [3] S. Bruckenstein y I. M. Kolthoff, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2974 (1956)
- [4] S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, E. Martínez-Fábregas, *Analyst*, **114**, 1575, (1989)
- [5] N. Alizadejh, M. Mahmodian, *Electroanalysis*, **12**, 510, (2000)
- [6] P. Bergveld, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-17**, 70 (1970)
- [7] P. Bergveld, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-19**, 342 (1972)
- [8] T. Matsuo, K. D. Wise, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-21**, 485 (1974)
- [9] A. Baldi i Coll, *Estudi y caracterització de l'Éfecte de la llum i la temperatura sobre dispositius tipus ISFET*, Tesis de Ingeniería, Universidad Politécnica de Cataluña, (1996)
- [10] N. Jaffreznic-Renault, A. Senillou, C. Martelet, K. Wan, J. M. Chovelén, *Sens. Actuators B.*, **59**, 154 (1999)
- [11] R. Milka, I. Dumazer, M. Gamoudi, R. Lamartine, H. Ben Ouada, N. Jaffreznic-Renault, G. Guillaud, *Anal. Chim. Acta*, , **354**, 283 (1997)
- [12] Elizabeth A. Moschou, Nikolas A. Chaniotakis, *Anal. Chim. Acta*, **445**, 183, (2001)
- [13] J. Sánchez, M. del Valle, *Talanta* , **54**, 893, (2001)
- [14] USP24-NF19, United States Pharmacopeial Convention, Inc., official from January 1,2000



- [15] G. A. Álvarez, *Cálculo de parámetros termodinámicos en ácido acético glacial usando ISE e ISFET*, Tesis de Maestría, UAMI (2000)
- [16] I. M. Kolthoff y S. Bruckenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1 (1957)
- [17] O. W. Kolling, *Anal. Chem.*, **48**, 1221 (1976)
- [18] P. Gans, A. Sabatina, A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 19, 1995 (1985)
- [19] Popovich O, Tomkins R (1981) *Nonaqueous solution chemistry* John Wiley & Sons.
- [20] J. N. Miller, J. C. Miller, J. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* 4th Edition Prentice Hall (2001)
- [21] P.N. Bartlett, J.M. Cooper, *J. Electroanal. Chem.*, **1**, 363, (1993)
- [22] W. Schuhmann, *Mikrochim. Acta*, **1**, 121, (1995)
- [23] M. Trojanowicz, T.K. Krawczyk, *Mikrochim. Acta*, **121**, 167, (1995)
- [24] S. Cosnier, *Electroanalysis*, **9**, 894, (1997)
- [25] Vladislava M. Jovanovic, Ljiljana Marckicevic, Slavka Stankovic, Rade Stankovic, Momir S. Jovanovic, *Electroanalysis*, **7**, 574, (1995)
- [26] S. K. Jeong, B. G. Lee, K. J. Kim, *Bull. Korean Chem Soc.*, **16**, 553, (1995)
- [27] D. Tsamouras, E. Dalas, S. Sakkopulous, E. Vitoratos, *Phys. Scripta*, **48**, 512, (1993)
- [28] N. Alizadeh, M. Mahmodian, *Electroanalysis*, **12**, 510, (2000)
- [29] A. F. Díaz, K. K. Kanazawa, G. P. Gardini, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 635, (1979)

- [30] R. Y. Quian, J. J. Qui, *Polym. J.*, **19**, 157, (1987)
- [31] Y. Li, Y. Fan, *Synth. Met.*, **79**, 225, (1996)
- [32] Y. Li, J. Yang, *J. Polym. Sci.*, **65**, 2739, (1997)
- [33] W. Wernet, M. Monkenbusch, G. Wegner, *Mol. Cryst. Liq. Cryst*, **118**, 193, (1995)
- [34] Y. F. Li, *J. Electroanal. Chem.*, **433**, 181, (1997)
- [35] J. Y. Ouyang, Y. F. Li, *Polymer*, **38**, 1971, (1997)
- [36] R. Y. Quian, Q. B. Pei, Z. T. Huang, *Makromol. Chem.*, **192**, 1263, (1991)
- [37] K. M. Cheung, D. Bloor, G. C. Stevens, *Polymer*, **29**, 1709, (1988)
- [38] J. Prejza, I. Lundstrom, J. E. Dubois, *J. Electrochem. Soc.*, **129**, 1685, (1982)
- [39] W. Su, J. O. Iroh, *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, 417, (1996)
- [40] S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Sabouraud, *Chem. Soc. Rev.*, **29**, 283, (2000)
- [41] L. H. Mendoza-Huizar, J. Robles, M. Palomar-Pardavé, *J. Electroanal. Chem.* **521**, 95, (2002)
- [42] L. H. Mendoza-Huizar, J. Robles, M. Palomar-Pardavé *J. Electroanal. Chem.*  
In press.
- [43] C. Ramírez, E. M. Arce, M. Romero-Romo and M. Palomar-Pardavé. *Solid State Ionics. Sometido.*

- [44] V.W. Reid, G. F. Longman, E. Heineth, *Tenside*, **4**, 292, (1967)
- [45] Z.P. Li, M. J. Rosen, *Anal. Chem.*, **53**, 1516, (1981)
- [46] H. Koenig, E. Waldorf, Fresenius' Z., *Anal. Chem.*, **189**, 177, (1978)
- [47] H. Liu, P. K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta* , **288**, 237, (1994)
- [48] M. Y. Ye, R. G. Walkup, K. D. Hill, *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 4087, (1994)
- [49] J. Kawase, H. Veno, K. Tsuji, *J. Chromatogr.*, **267**, 133, (1984)
- [50] S. Chen, D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **65**, 2770, (1993)
- [51] J. D. R. Thomas, *Anal. Chim. Acta*, **180**, 289, (1986)
- [52] W. Szczepaniak, *Analyst* , **115**, 1451, (1990)
- [53] C. Baillartger, A. A. Mayaffre, M. Turmine, P. Letellier, H. Suquet, *Electrochim. Acta*, **39**, 813, (1994)
- [54] R. D. Gallegos, *Analyst*, **118**, 1137, (1993)
- [55] M. Gerlache, Z. Sentürk, J. C. Viré, J. M. Kauffmann, *Anal. Chim. Acta*, **349**, 59, (1997)
- [56] S. Martínez-Barrachina, J. Alonso, L. Matia, R. Prats, M. del Valle, **71**, 3684, (1999)
- [57] L. F. Waren, D. P. Anderson, *J. Electrochem. Soc.*, **134**, 101, (1987)
- [58] V. M. Jovanovic, A. Dekanski, G. Vlajnic, M. S. Jovanovich, *Electroanalysis*, **9**, 564, (1997)

- [59] S. Dong, Z. Sun, Z. Lu, *Analyst*, **113**.1525, (1988)
- [60] V. M. Jovanovic, L. Marckicevic, S. Stankovic, R. Stankovic, M. S. Jovanovic, *Electroanalysis*, **7**, 574, (1995)
- [61] S. K. Jeong, B. G. Lee, K. J. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **16**, 553, (1995)
- [62] D. Tsamouras, E. Dalas, S. Sakkopulous, E. Vitoratos, *Phys. Scripta*, **48**, (2000)
- [63] Z. Lu, Z. Sun, S. Dong, *Electroanalysis*, **1**, 271, (1989)
- [64] R. S. Hutchins, L. G. Bachas, *Anal. Chem.*, **67**, 1654, (1995)
- [65] N. Alizadejh, H. Gharibi, M. Shamsipur, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 730, (1995)
- [66] M. Shamsipur, N. Alizadejh, H. Gharibi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 311, (1995)
- [67] N. Alizadejh, M. Mahmodian, *Electroanalysis*, **12**, 510, (2000)
- [68] R. Xu, D. M. Bloor, *Langmuir*, **16**, 9555, (2000)
- [69] Milton J R (2<sup>nd</sup>. Edition) *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Willey & Sons, New York (1989)
- [70] N. Alizadeh, H. Khodaei-Tazekendi, *Sensors an Actuators B*, **75**, 5 (2001)
- [71] Rusicka J., Hansen E., Zagatto, E. A., *Anal. Chim. Acta*, **88**, 1 (1977)
- [72] Rusicka J., Hansen E., Zagatto, E. A., *Anal. Chim. Acta*, **88**, 16 (1977)
- [73] Ruzicka J., Hansen E., *“Flow Injection Analysis”*, 2<sup>nd</sup> Edition, Ed. Wiley Interscience (1988)

- [74] Muller H., *Anal. Chem. Symp. Series*, **8**, 279 (1981)
- [75] J. Alonso, “*Diseño y construcción de detectores potenciométricos para FIA*”, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona (1987)
- [76] A. Florido Perez, *Construcción de detectores potenciométricos de diversas configuraciones*”, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona (1987)
- [77] S. Martínez-Barrachina, J. Alonso, L. Matia, R. Prats, M. Del Valle, *Anal. Chem.* **71**, 3684, (1999)
- [78] Milton J R (2<sup>nd</sup>. Edition) *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Willey & Sons, New York (1989)
- [79] R. S. Hutchins, L. G. Bachas, *Anal. Chem.*, **67**, 1654, (1995)
- [80] J. Janata, M. Josowicz, *Anal. Chem.* **70**, 12 (1998).
- [81] NATO Advanced Research Workshop Meeting Report, *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 243 (1998).
- [82] J. Wang, *Anal. Chem.*, **71**, 328R (1999)
- [83] E. Magner, *Analyst*, **123**, 1967 (1998)
- [84] H. H. Weetall, *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 237 (1999)
- [85] P. E. Carr, L. D. Bowers, *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry* Wiley Interscience, New York (1980)
- [86] X. Wu, Martin M. F. Choi, D. Xiao, *Analyst*, **125**, 157 (2000)
- [87] S. Martinoia, N. Rosso, M. Grattarola, L. Lorenzelli, B. Margesin, Mario Zen, *Biosensors & Bioelectronics*, **16**, 1043 (2001)

- [88] S. Cosnier, C. Gondran, Jean-Christophe Watelet, *Electroanalysis*, **11**, 906 (2000)
- [89] M. Yasuzawa, T. Nieda, T. Hirano, A. Kunugi, *Sensors and Actuators B*, **66**, 77 (2000)
- [90] P. C. Pandey , G. Singh, *Talanta*, **55**, 773 (2001)
- [91] J. Lindquist, *J. Electroanal. Chem.*, **52**, 37 (1974)
- [92] R. J. Nowak, Joyal C. L., Weber D. C., *J. Electroanal. Chem.*, **143**, 413 (1983)
- [93] D. N. Danielson, J. Wangsa, M. A. Targove, *Anal. Chem.*, **61**, 2585 (1989)
- [94] J. E. Anderson, D. E. Tallman, *Anal. Chem.*, **48**, 209 (1976)
- [95] S. Alegret, F. Céspedes, E. Martínez-Fábregas, D. Martorell, A. Morales, E. Centelles, J. Muñoz, *Biosensors & Bioelectronics*, **11**, 35 (1996)
- [96] J. Svorc, S. Miertus, J. Katrlík, M. Stred'ansky, *Anal. Chem.*, **69**, 2086 (1997)
- [97] Q. Fang, X. T. Shi, Y. Sun, Z. Fang, *Anal. Chem.*, **69**, 3570 (1997).
- [98] J. Gooding, E. Hall, *Anal. Chem.*, **70**, 3131 (1998).
- [99] A. Lapierre, R. Olsina, J. Raba, *Anal. Chem.*, **70**, 3679 (1998)
- [100] F. Palmisano, M. Quinto, R. Rizzi, P. G. Zambonin, *Analyst*, **126**, 866 (2001)
- [101] H. Muller, *Anal. Chem. Symp Series*, **8**, 279 (1981)

# **ANEXOS**

# **ANEXO 1. QUÍMICA DE SOLUCIONES DEL ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL COMO SOLVENTE. TITULACIONES POTENCIOMÉTRICAS ÁCIDO-BASE Y CÁLCULO DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO EN ESTE MEDIO.**

- **A1.1 ANTECEDENTES [1].**

A partir de 1884 el ácido acético glacial empieza a ser utilizado como solvente por Raoult como parte de sus mediciones crioscópicas en soluciones de compuestos orgánicos, desde entonces se ha diversificado el estudio del comportamiento de especies en este medio para estudiar características que en agua serían difíciles de apreciar. En la actualidad, es ampliamente usado dentro del análisis farmacéutico para el estudio y cuantificación de diversos principios activos de medicinas como el carbacol, cloroquinona, cocaína, codeína, lidocaína, y piperazina entre otros [2].

Según la clasificación dada por Brönsted para los diferentes tipos de solventes, el ácido acético glacial vendría a pertenecer a la clase protogénica, por su capacidad de donar protones a las especies disueltas en él. Dada su alta estabilidad y bajo grado de hidratación en condiciones normales de trabajo en un laboratorio, se ha convertido en el solvente protogénico más utilizado para el estudio y determinación de bases en las cuales tiene un efecto nivelador, es decir, todas las bases fuertes disueltas en él tenderán a presentar la misma fuerza. Además de esta característica, el ácido acético glacial presenta una constante



dieléctrica muy baja (6.17 a 25°C, mientras que la del agua es 78.5 a 25°C), lo cual reduce su poder disociante.

Estas características hacen que la química ácido-base en este solvente sea diferente a la que se considera en agua. Aún como solvente protogénico, el ácido acético glacial tendrá ciertas características protofílicas que lo harían aceptar protones de ácidos fuertes y de la autoprotólisis limitada del medio, cuyo equilibrio viene dado por la expresión:



donde HAc representa a la molécula  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_2\text{Ac}^+$  al protón solvatado  $\text{CH}_3\text{COOH}_2^+$ , y  $\text{Ac}^-$  al ion acetato  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ . El valor para  $\text{pK}_s$  más aceptado en la actualidad es 14.45 [1], que está muy cercano al del agua (aunque, como ya se discutió, no significa que sean solventes equivalentes).

Cuando se tiene una base B o un ácido HA disueltos en ácido acético glacial, se presenta un primer proceso llamado *ionización*, donde el soluto interactúa con las moléculas de solvente para formar pares iónicos:



$$K_i^{\text{B}} = \frac{[\text{BH}^+\cdots\text{Ac}^-]_{\text{eq}}}{[\text{B}]_{\text{eq}}} \quad K_i^{\text{HA}} = \frac{[\text{H}_2\text{Ac}^+\cdots\text{A}^-]_{\text{eq}}}{[\text{HA}]_{\text{eq}}} \quad (\text{A.3})$$

El siguiente proceso que se lleva a cabo se denomina *disociación*, donde el par iónico se separa para formar iones libres en solución:



(A.4)

$$K^{HA}_d = \frac{[H_2Ac^+]_{eq}[A^-]_{eq}}{[H_2Ac^+ \cdots A^-]_{eq}} \qquad K^B_d = \frac{[BH^+]_{eq}[Ac^-]_{eq}}{[BH^+ \cdots Ac^-]_{eq}} \qquad (A.5)$$

Ya se ha mencionado que dada la baja constante dieléctrica de este solvente, su poder disociante es pobre, por lo que el proceso de ionización está más favorecido que el de disociación. Los valores de las constantes de equilibrio para los respectivos procesos no son fáciles de determinar experimentalmente, las técnicas de análisis nos generan resultados en términos de una combinación de los dos procesos descritos, llamada *disociación total*:



$$K^B = \frac{[BH^+]_{eq}[Ac^-]_{eq}}{([B]_{eq} + [BH^+ \cdots Ac^-]_{eq})} = \frac{K^B_i K^B_d}{1 + K^B_i}$$

$$K^{HA} = \frac{[H_2Ac^+]_{eq}[A^-]_{eq}}{([HA]_{eq} + [H_2Ac^+ \cdots A^-]_{eq})} = \frac{K^{HA}_i K^{HA}_d}{1 + K^{HA}_i} \qquad (A.7)$$

La fuerza de un ácido o una base vendría dada entonces por el análisis del proceso de disociación total y en consecuencia, de los valores para las constantes de disociación total.

- A1.2 ANÁLISIS TEÓRICO CUANTITATIVO DE LA VALORACIÓN DE UNA BASE CON ÁCIDO PERCLÓRICO USANDO ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL COMO SOLVENTE.**

La principal metodología para el análisis de bases en ácido acético glacial es la titulación potenciométrica usando ácido perclórico como titulante, dado que es el ácido más fuerte en este medio ( $pK_{HA} = 4.87$ ).

A pesar que desde 1927 Conant, Hall y Werner [3-5] realizan titulaciones potenciométricas de bases y acetatos metálicos usando ácido acético glacial como solvente, no fue sino hasta 1957 cuando, después de realizar el cálculo espectrofotométrico de constantes de equilibrio de diferentes ácidos y bases en ácido acético glacial, Kolthoff y Bruckenstein [6] desarrollaron el tratamiento teórico cuantitativo de la neutralización de bases con ácido perclórico en el solvente ya mencionado. Con los datos de las constantes de equilibrio obtenidos [7], demostraron la validez de sus cálculos teóricos comparados con los datos experimentales; este análisis marca la partida del cálculo de constantes de equilibrio a partir de mediciones potenciométricas. A pesar de que en los años subsecuentes, algunos investigadores como Shkodin, Karkuzaki y Zadornichoya [8-10] cuestionaron el trabajo de Kolthoff y Bruckenstein, poco a poco se fue consolidando éste gracias al seguimiento de numerosos investigadores como Schwarzenbach y Stensby [11], Tanaka y Nagakura [12], Wegmann y Simon [13], y más recientemente Barbosa, Cortina y Rosés [14,15].

A continuación se presenta el desarrollo de las ecuaciones encontradas por Kolthoff y Bruckenstein [6] de forma detallada, las cuales se aplicarán para la construcción de las curvas de titulación teóricas de este trabajo.

- **A1.2.1 [H<sub>2</sub>Ac<sup>+</sup>] de una solución de base B. Sistema B/HAc.**

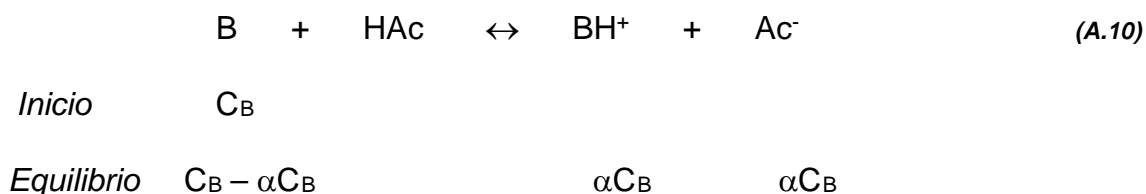
De la expresión para la constante de disociación total de una base en ácido acético glacial:

$$K_B = \frac{[BH^+][Ac^-]}{C_B} = \frac{K_B^i K_B^d}{1 + K_B^i} \quad (A.8)$$

donde

$$C_B = [B] + [BH^+Ac^-] \quad (A.9)$$

Realizando el análisis de concentraciones al equilibrio y utilizando el equilibrio de disociación total se tiene:



Tomando en cuenta que

$$\alpha C_B = [Ac^-] \quad (A.11)$$

de manera que la expresión de la constante de disociación total queda como:

$$K_B = \frac{[Ac^-]^2}{C_B - [Ac^-]} \quad (A.12)$$

como la base es débil en ácido acético,  $C_B \gg [Ac^-]$ :

$$K_B = \frac{[Ac^-]^2}{C_B} \quad (A.13)$$

despejando  $[Ac^-]$ :

$$[Ac^-] = \sqrt{C_B K_B} \quad (A.14)$$

De la autoprotólisis del ácido acético se tiene:



cuya constante de equilibrio (*constante de autoprotólisis*  $K_s$ ) viene dada por:

$$K_s = [H_2Ac^+] [Ac^-] \quad (A.16)$$

Despejando  $[Ac^-]$  de la ecuación A.16, sustituyendo en la A.14 y reorganizando se obtiene:

$$[\text{H}_2\text{Ac}^+] = \frac{K_s}{\sqrt{C_B K_B}} \quad (\text{A.17})$$

donde finalmente se obtiene el pH (sabiendo que  $\text{pH} = -\log[\text{H}_2\text{Ac}^+]$ ) de una solución de B en ácido acético.

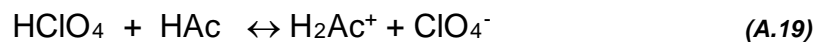
- **A1.2.2  $[\text{H}_2\text{Ac}^+]$  en soluciones de base y perclorato de base protonada.**

**Sistema B/HClO<sub>4</sub>/HAc.**

Antes del punto de equivalencia, los equilibrios de disociación total a considerarse y sus respectivas expresiones para la constante de equilibrio son los siguientes:



cuya expresión para la constante está dada por la ecuación A.8,



$$K_{\text{HClO}_4} = \frac{[\text{H}_2\text{Ac}^+][\text{ClO}_4^-]}{C_{\text{HClO}_4}} \quad (\text{A.20})$$

donde

$$C_{\text{HClO}_4} = [\text{HClO}_4] + [\text{H}_2\text{Ac}^+ \dots \text{ClO}_4^-] \quad (\text{A.21})$$



$$K_{\text{BHClO}_4} = \frac{[\text{BH}^+][\text{ClO}_4^-]}{C_{\text{BHClO}_4}} \quad (\text{A.23})$$

donde

$$C_{\text{BHClO}_4} = [\text{BHClO}_4] + [\text{BH}^+ \dots \text{ClO}_4^-] \quad (\text{A.24})$$

Sin embargo, el equilibrio importante en la presencia de BHClO<sub>4</sub> es la siguiente reacción de formación:



$$K_f^{\text{BHClO}_4} = \frac{C_{\text{BHClO}_4}}{C_B C_{\text{HClO}_4}} \quad (\text{A.26})$$

Utilizando la ley de Hess para obtener  $K_f^{\text{HClO}_4}$  a partir de las ecuaciones A.8, A.16, A.20 y A.23 se obtiene la siguiente expresión:

$$K_f^{\text{BHClO}_4} = \frac{K_B K_{\text{HClO}_4}}{K_{\text{BHClO}_4} K_s} \quad (\text{A.27})$$

Ahora, del principio de electroneutralidad se tiene:

$$[\text{BH}^+] + [\text{H}_2\text{Ac}^+] = [\text{Ac}^-] + [\text{ClO}_4^-] \quad (\text{A.28})$$

Despejando  $[\text{Ac}^-]$  de la ecuación A.16 y sustituyendo en la A.8:

$$[\text{BH}^+] = \frac{K_B C_B [\text{H}_2\text{Ac}^+]}{K_s} \quad (\text{A.29})$$

sustituyendo la ecuación A.29 en la A.23:

$$K_{\text{BHClO}_4} = \frac{[\text{H}_2\text{Ac}^+] K_B C_B [\text{ClO}_4^-]}{C_{\text{BHClO}_4} K_s} \quad (\text{A.30})$$

Despejando de la ecuación anterior  $[\text{ClO}_4^-]$ ,  $[\text{Ac}^-]$  de la ecuación A.16, sustituyendo estas expresiones junto con la A.29 en la A.28 y reorganizando se obtiene:

$$[\text{H}_2\text{Ac}^+] = \left( \frac{K_s \left( 1 + \frac{C_{\text{BHClO}_4} K_{\text{BHClO}_4}}{K_B C_B} \right)}{\left( \frac{K_B C_B}{K_s} + 1 \right)} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.31})$$

A menos que la base a titular sea tan débil que no pudiera ser titulada en ácido acético glacial, se cumple que:

$$\frac{K_B C_B}{K_s} \gg 1 \quad (\text{A.32})$$

Considerando esto para la ecuación A.31 y reorganizando una vez más, se obtiene:

$$[H_2Ac^+] = \frac{K_s \sqrt{[K_B C_B + K_{BHClO_4} C_{BHClO_4}]}}{K_B C_B} \quad (\text{A.33})$$

la cual es la expresión que describe los cambios de pH antes de alcanzar el punto de equivalencia.

En general, es suficiente despreciar la disociación de la base, la de la sal, y la solvólisis de la sal respecto de las concentraciones totales, y asumir que  $C_B$  y  $C_{BHClO_4}$  representan las cantidades estequiométricas, es decir, asumir que la reacción A.25 es bastante cuantitativa.

- **A1.2.3  $[H_2Ac^+]$  en soluciones de la sal pura (punto de equivalencia).**

**Sistema  $BHClO_4/HAc$**

En este punto para la mayoría de las bases se cumple que

$$K_B C_B \ll K_{BHClO_4} C_{BHClO_4},$$

pues si la reacción es cuantitativa, la cantidad de base presente en el sistema tenderá a 0.

Rearreglando adecuadamente la ecuación A.8 y considerando lo anterior se obtiene:

$$[H_2Ac^+] = \left( \frac{K_s^2 K_{BHClO_4} C_{BHClO_4}}{K_B^2 C_B^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.34})$$

Despreciando la disociación de las especies en solución  $C_B = C_{\text{HClO}_4}$ , sustituyendo esto en la ecuación A.26, despejando  $C_B^2$ , tomando A.27 y sustituyendo en la A.34:

$$[\text{H}_2\text{Ac}^+] = \left( \frac{K_s K_{\text{HClO}_4}}{K_B} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.35})$$

que nos describe el pH en el punto de equivalencia. Es importante observar que según la ecuación A.35 el pH en el punto de equivalencia es independiente de las concentraciones de base y ácido.

- **A1.2.4  $[\text{H}_2\text{Ac}^+]$  en mezclas de sal y ácido perclórico en exceso. Sistema  $\text{HClO}_4/\text{BHClO}_4/\text{HAc}$ .**

Después de alcanzado el punto de equivalencia, es conveniente expresar  $[\text{H}_2\text{Ac}^+]$  en términos de  $C_{\text{HClO}_4}$  y  $C_{\text{BHClO}_4}$ .

Despejando  $C_B$  de la ecuación A.26 y sustituyendo usando la ecuación A.27, se obtiene:

$$C_B = \frac{K_s K_{\text{BHClO}_4} C_{\text{BHClO}_4}}{K_{\text{HClO}_4} K_B C_{\text{HClO}_4}} \quad (\text{A.36})$$

Sustituyendo la ecuación A.36 en la A.31 y reduciendo:

$$[\text{H}_2\text{Ac}^+] = \left( \frac{K_s + K_{\text{HClO}_4} C_{\text{HClO}_4}}{1 + \left( \frac{K_{\text{BHClO}_4} C_{\text{BHClO}_4}}{K_{\text{HClO}_4} C_{\text{HClO}_4}} \right)} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.37})$$

Cuando se tiene suficiente ácido en exceso (concentración alta) en el sistema  $K_{\text{HClO}_4} C_{\text{HClO}_4} \gg K_s$ , por lo que la ecuación A.37 se puede simplificar a:

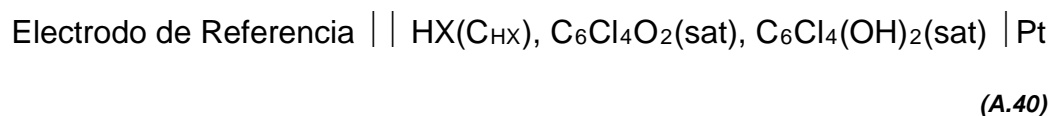


$$[\text{H}_2\text{Ac}^+] = \frac{K_{\text{HClO}_4} C_{\text{HClO}_4}}{(K_{\text{HClO}_4} C_{\text{HClO}_4} + K_{\text{BHClO}_4} C_{\text{BHClO}_4})^{\frac{1}{2}}} \quad (\text{A.38})$$

- A1.3 METODOLOGÍA TRADICIONAL PARA LA ESTIMACIÓN DE CONSTANTES DE DISOCIACIÓN TOTAL DE BASES Y PERCLORATOS DE BASES PROTONADAS.**

Con base en los estudios realizados por Conant y colaboradores [20, 21], Kolthoff y Bruckenstein [7] usaron un electrodo de cloroanilo, un electrodo de calomel modificado como referencia; los valores que obtuvieron para la determinación espectrofotométrica de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [6] y piridina [6] sirvieron para desarrollar y plantear los principios teóricos de la potenciometría ácido-base en soluciones de ácido acético glacial, los cuales se presentarán a continuación.

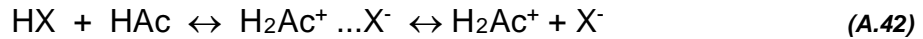
Usando la siguiente celda:



HX corresponde a cualquier ácido, se determina la relación:

$$E_{\text{HX}} = E^{\circ}_{\text{HX}} + \frac{RT}{F} \ln a_{\text{H}^+} + E_{\text{l,j}} \quad (\text{A.41})$$

donde  $E_{\text{HX}}$  es el potencial medido por la celda,  $E^{\circ}_{\text{HX}}$  es el potencial estándar de la misma,  $a_{\text{H}^+}$  es la actividad del protón solvatado y  $E_{\text{l,j}}$  al potencial de unión líquida; este último desconocido pero asumido como constante. Considerando el siguiente equilibrio para el ácido HX:



se tiene que la constante de disociación total para el mismo es:

$$K_{\text{HX}} = \frac{a_{\text{H}_2\text{Ac}^+} a_{\text{X}^-}}{a_{\text{HX}} + a_{\text{H}_2\text{Ac}^+ \dots \text{X}^-}} \quad (\text{A.43})$$

Considerando que la concentración estequiométrica del ácido  $C_{\text{HX}} = a_{\text{HX}} + a_{\text{H}_2\text{Ac}^+ \dots \text{X}^-}$  y que  $a_{\text{H}_2\text{Ac}^+} = a_{\text{X}^-}$  se tiene que:

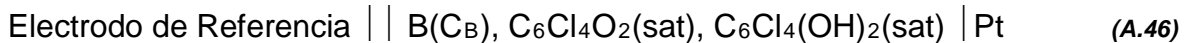
$$a_{\text{H}_2\text{Ac}^+} = \sqrt{K_{\text{HX}} C_{\text{HX}}} \quad (\text{A.44})$$

Combinando las ecuaciones 1.41 y 1.44 se obtiene una ecuación más útil:

$$E_{\text{HX}} = E^{\circ}_{\text{HX}} + \frac{RT}{F} \ln K_{\text{HX}} + \frac{RT}{2F} \ln C_{\text{HX}} + E_{\text{i,j}} \quad (\text{A.45})$$

la cual relaciona el potencial de celda con la concentración del ácido y la constante de disociación total del mismo, de este modo, si se conoce el potencial estándar del sistema, se puede conocer en consecuencia el valor de  $K_{\text{HX}}$ .

Del mismo modo, para bases se usa la celda:



y sabiendo que la constante de autoprotólisis es:

$$K_{\text{s}} = a_{\text{H}_2\text{Ac}^+} a_{\text{Ac}^-} \quad (\text{A.47})$$

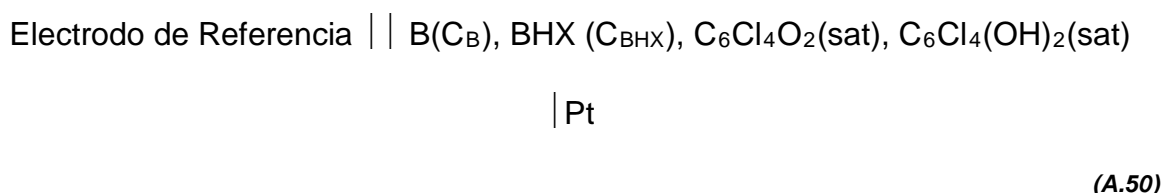
y que la constante de disociación total de la base es:

$$K_{\text{B}} = \frac{a_{\text{BH}^+} a_{\text{Ac}^-}}{C_{\text{B}}} \quad (\text{A.48})$$

de una manera análoga a la obtención de la ecuación A.45, se obtiene la expresión:

$$E_B = E^{\circ}_{HX} + \frac{RT}{F} \ln K_s - \frac{RT}{2F} \ln K_B - \frac{RT}{2F} \ln C_B + E_{l,j} \quad (A.49)$$

Para obtener la expresión de un sistema conteniendo una base y una sal con un catión en común usan la siguiente celda:



Y conociendo las ecuaciones A.47, A.48 y

$$K_{\text{BHClO}_4} = \frac{a_{\text{BH}^+} a_{\text{ClO}_4^-}}{C_{\text{BHClO}_4}} \quad (A.51)$$

se llega a la expresión:

$$E_{B, \text{BHX}} = E^{\circ}_{HX} + \frac{RT}{F} \ln K_s - \frac{RT}{F} \ln K_B C_B + \frac{RT}{2F} \ln (K_B C_B + K_{\text{BHX}} C_{\text{BHX}}) + E_{l,j} \quad (A.52)$$

Usando las expresiones anteriores, Kolthoff y Bruckenstein fueron capaces de calcular las constantes de disociación total de una amplia variedad de ácidos, bases y sales obteniendo una gran concordancia con los resultados obtenidos espectrofotométricamente.

- ### A1.4 MÉTODO DE CALIBRACIÓN DE BIEDERMANN Y SILLEN APLICADO A MEDIO ACÉTICO GLACIAL

Siendo el ácido acético glacial un solvente de baja constante dieléctrica y por tanto de una alta resistencia, la capacidad amortiguadora en este medio es pobre y la calibración de los sensores potenciométricos por el método normal para

solventes de alta constante dieléctrica, como el agua o el metanol, resulta en datos poco precisos.

En 1953, Biedermann [22] desarrolla un método para la calibración de sistemas potenciométricos alternativo al uso de patrones. En 1976 Kolling [23] utiliza por primera vez este método de calibración para sistemas cuyo solvente es ácido acético glacial.

Según la ecuación de Nernst, la relación entre el potencial de celda  $E$  y la actividad del ion  $H_2Ac^+$  está dada por:

$$E = E^{\circ}_a + j_a [H_2Ac^+] - j_b [Ac^-] - gpH_2Ac^+ \quad (A.53)$$

donde  $E^{\circ}_a$  corresponde al potencial estándar en medio ácido,  $g$  a la constante de Nernst cuyo valor a  $25^{\circ}C$  es 59.16, y  $E_j$  es el potencial de unión líquida que estará dado por:

$$E_j = j_a [H_2Ac^+] - j_b [Ac^-] \quad (A.54)$$

donde  $j_a$  y  $j_b$  son constantes de proporcionalidad respecto a  $[H_2Ac^+]$  y a  $[Ac^-]$ .

Por otro lado, la relación entre el potencial de celda  $E$  y la actividad del ion  $Ac^-$  viene dada por:

$$E = E^{\circ}_b + E_j + gpAc^- \quad (A.55)$$

donde  $E^{\circ}_b$  es el potencial estándar en medio básico.

Si se está en un medio lo suficientemente básico, como lo sería la primera parte de una valoración de una base fuerte con un ácido fuerte, de la ecuación A.54 podemos despreciar  $j_a [H_2Ac^+]$ , por lo que la ecuación A.55 toma la forma:

$$E = E^{\circ}_b - j_b [Ac^-] + gpAc^- \quad (A.56)$$

reordenando se obtiene:

$$E - g\text{pAc}^- = E^\circ_b - j_b [\text{Ac}^-] \quad (\text{A.57})$$

La representación gráfica de  $E + g\text{pAc}^-$  contra  $[\text{Ac}^-]$  en la ecuación 1.57 nos proporcionaría los valores de  $E^\circ_b$  y de  $j_b$  en términos de la ordenada al origen y la pendiente de la recta respectivamente.

De forma análoga, en medio ácido se puede despreciar  $j_b [\text{Ac}^-]$  de la ecuación A.54 y reorganizando la A.53 se obtiene:

$$E + g\text{pH}_2\text{Ac}^+ = E^\circ_a + j_a [\text{H}_2\text{Ac}^+] \quad (\text{A.58})$$

de donde se pueden obtener los valores de  $E^\circ_a$  y  $j_a$ . En una titulación ácido base las concentraciones de los iones  $\text{H}_2\text{Ac}^+$  y  $\text{Ac}^-$  según se discutió en la sección A.2.

Considerando que de la ecuación A.16 se tiene que

$$\text{pK}_s = \text{pH}_2\text{Ac}^+ + \text{pAc}^- \quad (\text{A.59})$$

y considerando las ecuaciones A.53 y A.55 se puede demostrar que:

$$\text{pK}_s = (E^\circ_a - E^\circ_b)/g \quad (\text{A.60})$$

la cual relaciona los potenciales estándar en medio ácido y básico con la constante de autoprotólisis del solvente.

Como ya se ha mencionado, el método de calibración anterior es el más utilizado para valoraciones en medio no acuoso, sin embargo, presenta limitaciones desde el punto de vista estadístico. Para realizar el ajuste de los datos a la mejor línea recta se usa el método de mínimos cuadrados, el cual establece que si  $y$  es una función lineal de una variable independiente  $x$ , la posición más probable de una recta  $y = a + bx$  es tal que la suma de los cuadrados de las

desviaciones de todos los puntos  $(x_i, y_i)$  respecto de la línea es un mínimo; las desviaciones se miden en la dirección del eje  $y$ . Esto hace que se consideren los datos  $x$  libres de error (o errores insignificantes) y que el error en  $y$  debe ser independiente del valor de  $x$ . Con suficiente razón, en las ecuaciones 1.57 y 1.58 donde la variable dependiente correspondería a  $E - gpAc^-$  y a  $E + gpH_2Ac^+$  y la variable independiente a  $[Ac^-]$  y a  $[H_2Ac^+]$ , se puede dudar de la independencia de esta última variable además de que el error en  $y$  depende en cierto modo del valor de  $x$ . Lo anterior hace sospechar sobre qué tan representativos son los datos obtenidos mediante el ajuste a las ecuaciones discutidas.

Por esto y con base en resultados obtenidos en investigaciones anteriores se usa el método de Biederman y Sillén sin considerar simplificación de la ecuación A.53 y los datos experimentales son ajustados de manera no lineal.

## • **A1.5 REFERENCIAS**

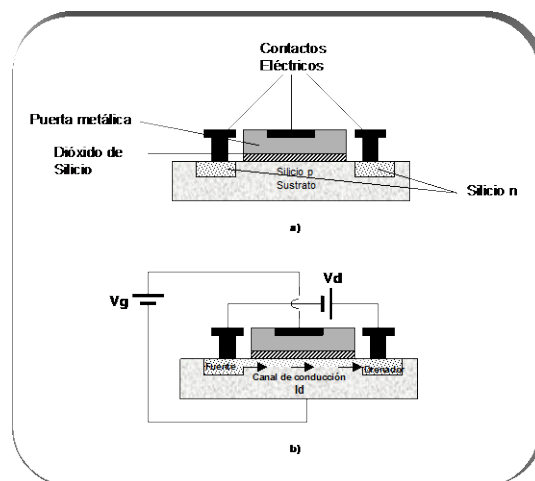
- [1] Popovich O, Tomkins R (1981) *Nonaqueous solution chemistry* John Wiley & Sons.
- [2] USP24-NF19, United States Pharmacopeial Convention, Inc., official from January 1,2000
- [3] N. F. Hall y J. B. Conant, *J. Am. Chem. Soc.* **49**, 3047 (1927)
- [4] J. B. Conant y N. F. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* **49**, 3062 (1927)
- [5] N. F. Hall y T. H. Werner, *J. Am. Chem. Soc.* **50**, 2367 (1927)
- [6] I. M. Kolthoff y S. Bruckenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1 (1957)
- [7] S. Bruckenstein y I. M. Kolthoff, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2974 (1956)

- [12] A. M. Shkodin, N. A. Izmailov y L. I. Karkuzaki, *Ukr. Khim. Zh.* **27**, 155 (1961)
- [13] A. M. Shkodin y L. I. Karkuzaki, *Ukr. Khim. Zh.* **33**, 2795 (1959)
- [14] A. M. Shkodin y L. P. Zadornichova, *Izv. Vysshykh Uchebn. Zavedenii, Khim i Khim. Teknol. Zh.* **7**, 568 (1964)
- [15] G. Schwarzenbach y P. Stenby, *Helv. Chim. Acta*, **42**, 2342 (1959)
- [16] M. Tanaga y G. Nagasuka, *Anal. Chim. Acta*, **33**, 543 (1965)
- [17] D. Wegmann y W. Simon, *Helv. Chim. Acta*, **45**, 962 (1962)
- [18] J. Barbosa, J. L. Cortina y M. Rosés, *Anal. Chim. Acta*. **256**, 206 (1992)
- [19] J. Barbosa, J. L. Cortina y M. Rosés, *Anal. Chim. Acta*. **256**, 211 (1992)
- [20] J. B. Conant, L. F. Small y B. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **47**, 1959 (1925)
- [21] N. F. Hall y J. B. Conant, *J. Am. Chem. Soc.* **49**, 3062 (1927)
- [22] G. Biedermann y L. J. Sillén, *Ark. Kemi*, **5**, 425 (1953)
- [23] O. W. Kolling, *Anal. Chem.*, **48**, 1221 (1976)

## ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS, FUNCIONAMIENTO Y CONSTRUCCIÓN DE SENSORES TIPO ISFET [1].

### • A2.1 PRINCIPIOS DEL FUNCIONAMIENTO DE UN TRANSISTOR DE EFECTO CAMPO METAL-ÓXIDO-SILICIO (MOSFET).

Desde su construcción en 1948, los transistores han llegado a formar parte importante del desarrollo microtecnológico de nuestros días; desplazando a los grandes tubos de vacío que consumían grandes cantidades de energía y que hacían que los aparatos eléctricos ocuparan espacios físicos importantes. Un ejemplo de estos primeros son los llamados *transistores de efecto campo* (FET por sus siglas en inglés), que representaron un gran avance en la tecnología de transistores. Una clase de FET corresponde a *los MOS-FET (Transistor de Efecto Campo Metal-Óxido-Semiconductor)* cuyo diseño se muestra en la figura 1.





**FIGURA 1. Esquema de un transistor MOS-FET. a) Componentes del transistor. b) Tensiones o Potenciales aplicados en el transistor,  $V_d$  potencial entre fuente y drenador,  $V_g$  potencial entre la puerta y el sustrato,  $I_d$  corriente generada a través del canal de conducción  $n$  causada por la aplicación de los potenciales anteriores.**

Cuando la puerta metálica adquiere una carga positiva respecto a la fuente debido a la aplicación de un potencial eléctrico llamado *potencial de puerta* ( $V_g$ ), los sitios positivos de la red del semiconductor  $p$  son repelidos y a su vez los electrones son atraídos a la superficie del sustrato, por debajo de la capa de dióxido de silicio que funciona como aislante.

Consecuentemente, al aumentar  $V_g$  se crea un canal de conducción en la superficie del sustrato; la densidad de los electrones en este canal es directamente proporcional al  $V_g$  aplicado. Si se aplica un potencial  $V_d$  entre ambos bloques del silicio  $n$ , una corriente eléctrica podrá fluir a través del canal de conducción formado, al bloque donde se origina esta corriente se le llama *fuentes* y al bloque por el que sale la misma *drenador*, por lo que a la corriente producida se le denomina *corriente de drenador* ( $I_d$ ). Como  $V_g$  es directamente proporcional a la densidad de electrones en el canal, se puede decir que  $V_g$  también controla la magnitud de la corriente de drenador. De esta forma el transistor no sólo controla el paso de corriente en un solo sentido, sino que también puede interrumpir el paso de corriente en un momento dado.

Debido al proceso térmico de oxidación requerido para la formación de la capa de  $\text{SiO}_2$ , existen cargas positivas fijas en el óxido por lo que, aún cuando  $V_g$  es cero, existen pequeños canales de conducción en el óxido. Esto hace necesario aplicar un potencial negativo a la puerta para “remover” las capas de

conducción y cortar todo paso de corriente posible entre fuente y drenador. Este potencial es conocido como *potencial umbral* ( $V_t$ ).

Refiriéndonos a la Teoría MOST de primer orden, se tiene que a ciertas condiciones el transistor tiene una zona de comportamiento óhmico, por lo que  $I_d$  depende de  $V_d$ . El  $V_g$  controla la *densidad móvil de carga*  $\sigma_m$ . Si se desprecian los efectos de la distribución de potencial a través del canal de conducción, causada por  $V_d$  (lo cual es cierto a valores de  $V_d < 100\text{mV}$ ), se tiene que se forma un campo eléctrico perpendicular a la superficie del sustrato:

$$E_g = \frac{V_g - V_t}{d_{ox}} \quad (\text{A2.1})$$

La capa de  $\text{SiO}_2$  actúa como dieléctrico con una constante dieléctrica igual a  $\epsilon_0\epsilon_{ox}$  y un espesor  $d_{ox}$ , por lo que de acuerdo a la ya mencionada teoría MOST, se puede determinar la capacitancia del óxido  $C_{ox}$  por unidad de área:

$$\sigma_m = -\epsilon_0\epsilon_{ox}.E_g = -C_{ox}(V_g - V_t) \quad (\text{A2.2})$$

Si se designa el grosor del canal de conducción formado como  $W$ , y al largo del mismo como  $L$ , la conductividad en el canal queda dada por la siguiente ecuación:

$$G = \mu.(W/L) |\sigma_m| \quad (\text{A2.3})$$

donde  $\mu$  es la movilidad electrónica en el canal.

Con una  $V_d$  aplicada,  $I_d$  estará dada por la siguiente expresión:

$$I_d = G.V_d = \beta.V_d(V_g - V_t - V_d/2) \quad (\text{A2.4})$$

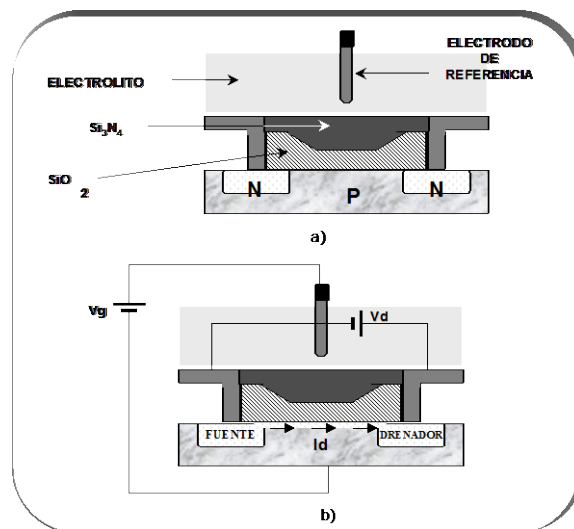
donde  $\beta = \mu.C_{ox}.(W/L)$  es un factor geométrico.

De esta manera, la ecuación A2.4 describe  $I_d$  en función de  $V_g$  y  $V_d$  en el transistor.

- **A2.2 PRINCIPIO ELECTROQUÍMICO DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS TRANSISTORES DE EFECTO CAMPO SENSITIVOS A IONES (ISFET).**

Un ISFET tiene el mismo principio de funcionamiento y la misma configuración que un transistor MOS-FET, con la diferencia de que se le ha sustituido la puerta metálica por una membrana selectiva a iones  $H^+$  en contacto con una solución electrolítica y un electrodo de referencia. Como ya se ha mencionado, para este trabajo se usan ISFET con membrana de  $Si_3N_4$  selectiva a iones  $H^+$ , que presenta características superiores comparada con otras membranas.

Los componentes de estos sensores y su funcionamiento eléctrico se muestran con detalle en la figura 2.



**FIGURA 2.** Esquema de un ISFET. A) Componentes del transistor. B) Potenciales aplicados en el sensor,  $V_d$  potencial entre fuente y drenador,  $V_g$  potencial entre la puerta y el sustrato,

**Id corriente generada a través del canal de conducción n causada por la aplicación de los potenciales anteriores.**

Korita [2] desarrolló el análisis electroquímico de las diferentes fases en contacto en un sistema para la detección de iones  $K^+$ , basados en este trabajo se realiza el siguiente análisis para el sistema de detección de iones  $H^+$ . El sistema es representado en la figura 3.

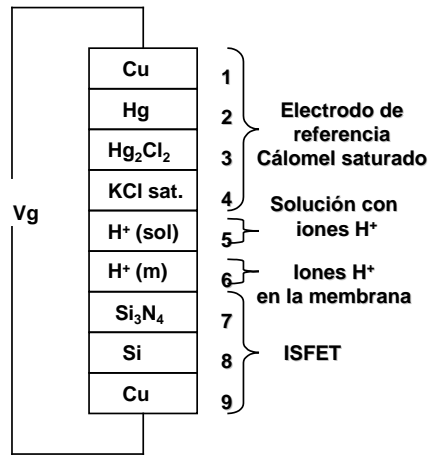


FIGURA 3. Arreglo de las fases en contacto en un sistema de detección de  $H^+$  ISFET con membrana  $Si_3N_4$ .

El potencial de puerta  $V_g$  viene dado por la diferencia de potenciales ( $\phi$ ) internos de los contactos de cobre (los números entre paréntesis corresponden a la fase mostrada en la figura 3):

$$V_g = \phi(9) - \phi(1) \quad (A2.5)$$

Se tiene que cuando dos conductores idénticos están en contacto, se cumple:

$$\Delta\phi_{\alpha\beta} = \frac{\Delta\beta}{z_i F} \tilde{\mu}_i \quad (A2.6)$$

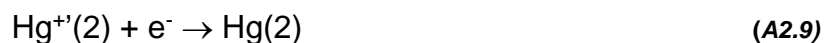
por lo que se puede escribir:

$$Vg = \frac{\tilde{\mu}_e(1) - \tilde{\mu}_e(9)}{F} \quad (\text{A2.7})$$

Se sabe que dos fases en contacto que han alcanzado el equilibrio tendrán los mismos potenciales electroquímicos, por lo que:

$$\tilde{\mu}_e(1) = \tilde{\mu}_e(2) \quad (\text{A2.8})$$

En el mercurio líquido, ocurre la siguiente reacción:



entonces se cumple la siguiente relación de potenciales electroquímicos:

$$\tilde{\mu}_{\text{Hg}^{2+}}(2) + \tilde{\mu}_{e^-}(2) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} \quad (\text{A2.10})$$

Rearreglando A2.10, de A2.8 se tiene:

$$\tilde{\mu}_e(1) = \tilde{\mu}_e(2) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} - \tilde{\mu}_{\text{Hg}^{2+}}(2) \quad (\text{A2.11})$$

En el contacto de las fases 2 y 3 se cumple:

$$\tilde{\mu}_{\text{Hg}^{2+}}(2) = \tilde{\mu}_{\text{Hg}^{2+}}(3) \quad (\text{A2.12})$$

por lo que se puede reescribir A2.11 como sigue:

$$\tilde{\mu}_e(1) = \tilde{\mu}_e(2) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} - \tilde{\mu}_{\text{Hg}^{2+}}(2) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} - \tilde{\mu}_{\text{Hg}^{2+}}(3) \quad (\text{A2.13})$$

dado que

$$\tilde{\mu}_e(3) = \tilde{\mu}_e(4) \quad (\text{A2.14})$$

y que  $\text{Hg}^{2+}$  se tiene como  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  según la reacción:



entonces

$$\mu^{\circ}_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2} + 2\tilde{\mu}_{e^-}(3) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} + 2\tilde{\mu}_{\text{Cl}^-} \quad (\text{A2.16})$$

Rearreglando 2.16 y sustituyendo en 2.13:

$$\tilde{\mu}_e(1) = \tilde{\mu}_e(2) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} - \frac{1}{2}\mu^{\circ}_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2} - \tilde{\mu}_{\text{Cl}^-}(3) \quad (\text{A2.17})$$

Dado que

$$\tilde{\mu}_{\text{Cl}^-}(3) = \tilde{\mu}_{\text{Cl}^-}(4) \quad (\text{A2.18})$$

se puede escribir A2.17 como sigue:

$$\tilde{\mu}_e(1) = \tilde{\mu}_e(2) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} - \frac{1}{2}\mu^{\circ}_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2} - \tilde{\mu}_{\text{Cl}^-}(4) \quad (\text{A2.19})$$

Separando  $\tilde{\mu}_{\text{Cl}^-}$  en sus componentes químico y eléctrico se obtiene:

$$\tilde{\mu}_e(1) = \tilde{\mu}_e(2) = \mu^{\circ}_{\text{Hg}} - \frac{1}{2}\mu^{\circ}_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2} - \mu^{\circ}_{\text{Cl}^-}(\text{ac}) + RT \ln a_{\text{Cl}^-} - F\phi(4) \quad (\text{A2.20})$$

Si se usa un puente salino entre el electrodo de referencia y la solución, prácticamente el potencial de unión líquida se elimina entre las fases (4) y (5), por lo que se puede escribir:

$$\phi(4) = \phi(5) \quad (\text{A2.21})$$

Para el contacto de las fases (5) y (6) se cumple:

$$\tilde{\mu}_{\text{H}^+}(5) = \tilde{\mu}_{\text{H}^+}(6) \quad (\text{A2.22})$$

Separando los potenciales electroquímicos en sus componentes químico y eléctrico, y sabiendo que el potencial interno es la suma de los potenciales de superficie ( $\chi$ ) y externo ( $\psi$ ) se tiene:

$$\mu^{\circ}_{\text{H}^+}(\text{ac}) + RT \ln a_{\text{H}^+}(5) + F\phi(5) = \mu_{\text{H}^+}(\text{mem}) + F\chi(\text{mem}) + F\psi(6) \quad (\text{A2.23})$$

Ya que el potencial real  $\alpha_i$  se define como

$$\alpha_i = \mu_i + F\chi \quad (\text{A2.24})$$

la parte correspondiente a la fase de la membrana en (2.19) se puede escribir como:

$$\mu^{\circ}_{H^+}(\text{ac}) + RT \ln a_{H^+} (5) + F\phi(5) = \alpha_{H^+}(\text{mem}) + \psi(6) \quad (\text{A2.25})$$

De manera similar, para los electrones en la fase del sustrato (8) se tiene:

$$\tilde{\mu}_{e^-} (8) = \alpha_{e^-}(\text{sust}) - \psi(8) = \tilde{\mu}_{e^-} (9) \quad (\text{A2.26})$$

Si se integran las ecuaciones A2.7, A2.20, A2.21, A2.25 y A2.26

$$Vg = \psi(8) - \psi(6) + (\mu^{\circ}_{Hg} - \frac{1}{2}\mu^{\circ}_{Cl^-}(\text{ac}) + RT \ln a_{Cl^-} - \alpha_{H^+}(\text{mem}) + \mu^{\circ}_{H^+} + RT \ln a_{H^+} - \alpha_{e^-}(\text{sust}))/F \quad (\text{A2.27})$$

rearrgando esta ecuación, se obtiene finalmente:

$$Vg - \Delta_m^s \psi = \left(\frac{1}{F}\right)(\mu^{\circ}_{Hg} - \frac{1}{2}\mu^{\circ}_{Cl^-}(\text{ac}) + RT \ln a_{Cl^-} - \alpha_{H^+}(\text{mem}) + \mu^{\circ}_{H^+} - \alpha_{e^-}(\text{sust})) + \frac{RT}{F} \ln a_{H^+} \quad (\text{A2.28})$$

De las ecuaciones A2.4 y A2.28 se nota que el Vg y la Id son una función lineal de  $\ln a_{H^+}$  de la solución, lo que explica la sensibilidad del dispositivo a estos iones.

Si cambiara la actividad de los iones  $H^+$  en solución, necesariamente cambiaría la Id del sensor. Si de alguna forma se mantiene la Id, las variaciones de la actividad del ion  $H^+$  en solución (linealmente respecto al logaritmo natural de esta actividad) estaría representada por los cambios en el Vg, además de que si se plantea A2.28 en términos de logaritmo base 10, se encuentra que el sensor debe presentar un comportamiento nernstiano con una sensibilidad de 59.16 mV/pH a 25°C.

En lo que se refiere a la sensibilidad química del nitruro de silicio a los iones  $H^+$ , el modelo de enlaces locales nos proporciona una explicación adecuada para este comportamiento.

De acuerdo con este modelo, al contacto con el agua, en el nitruro de silicio se forman enlaces entre los átomos de silicio y los hidróxidos presentes en la interfase, así como enlaces entre los átomos de nitrógeno y los iones  $H^+$  de la misma. Dependiendo de la actividad de los iones  $H^+$  en el medio, y en consecuencia en la interfase, se pueden favorecer ya sea el ceder o el aceptar estos iones en los grupos formados en la superficie de la membrana, las posibles interacciones se muestran en la figura 4.

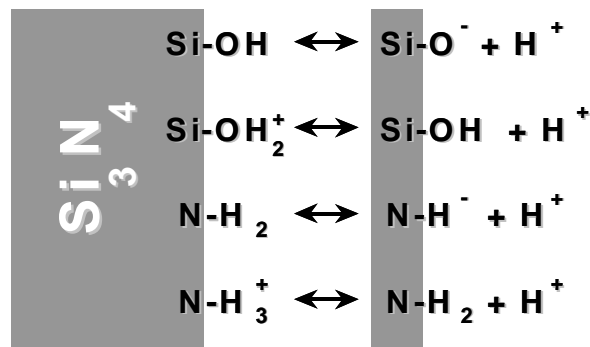


FIGURA 4. Interacciones posibles entre los iones  $H^+$  de la interfase y los grupos en la superficie de la membrana de nitruro de silicio.

Se pueden relacionar la actividad de los iones  $H^+$  en solución, la actividad de los mismos en la interfase y el potencial  $\psi$  originado entre la interfase y la solución por medio de la ley de distribución de Boltzmann. Relacionando el potencial  $\psi$  con la densidad de carga superficial ( $\sigma_0$ ), considerando la linearización del modelo de Gouy-Chapman-Stern que nos dice que la capacidad de la doble capa eléctrica puede considerarse constante (esto nos da la relación  $\sigma_0 = \psi \cdot C_{dc}$ ,



donde  $C_{dc}$  es la capacidad eléctrica de la doble capa) e introduciendo el parámetro  $pH_0$  (valor de pH al cual se tiene que tanto  $\sigma_0$  y  $\psi$  son cero), a ciertas condiciones se puede encontrar que:

$$\psi = 2.30 \left( \frac{kT}{q} \right) (pH_0 - pH) \quad (A2.29)$$

donde se demuestra la linealidad de  $\psi$  respecto a los cambios en el pH de la solución.

- **A2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA FABRICACIÓN DEL ISFET.**

Como se ha mencionado con anterioridad, la construcción de los ISFET requiere de la infraestructura electrónica moderna. Los ISFET utilizados en este trabajo fueron construidos en las salas blancas del Centro Nacional de Microelectrónica en Barcelona, España. Dicho Centro se ha dedicado al estudio de estos sensores desde el punto de vista de diseño y construcción, aplicando variaciones innovadoras a la tecnología NMOS con la cual se construyen.

El proceso de construcción es conocido como CNM008 y consta de seis niveles, los cuales se describen a continuación de manera breve:

**Nivel 1.** El chip de silicio con dimensiones  $2950 \times 2050 \mu\text{m}^2$  es dopado uniformemente con boro a una concentración de  $1.5 \times 10^{16}$  átomos/cm<sup>3</sup>. Se definen las áreas que serán dopadas con fósforo (fuente y drenador) y se “implanta” el mismo. Posteriormente se realiza la oxidación de la superficie del sustrato con métodos térmicos hasta alcanzar un grosor de  $0.8\mu\text{m}$ .

**Nivel 2.** Se define la zona que ocupará la puerta y se retira la capa de óxido de esta zona, a continuación se reinicia el proceso de oxidación únicamente en la zona de la puerta de tal modo que el grosor del óxido sobre la misma alcanza los 780 Å. Con esto se evitan en gran medida las corrientes de fuga entre el sustrato y el electrolito, problema muy frecuente en los métodos de construcción convencionales.

**Nivel 3.** Se define la zona donde se colocará la capa de nitruro de silicio, procediendo al depósito de la misma hasta alcanzar un grosor de 0.28 µm.

**Nivel 4.** Se definen los puntos del chip donde se integrarán los contactos entre el sustrato y los bloques drenador-fuente.

**Nivel 5.** Se definen las conexiones entre los bloques de fuente y drenador y los pads del circuito

**Nivel 6.** Se definen las dimensiones de la puerta del sensor, donde el nitruro de silicio estará al descubierto. Una vez terminado esto, se procede a fijar el chip en la tableta de circuitería y por último al encapsulado. Para el encapsulado se usan dos materiales diferentes: resina termocurable y resina fotocurable. El primero método consiste en aplicar resina EPO-TEK H77 en la tableta de manera puramente manual y posteriormente polimerizar térmicamente la resina a 120°C durante 1 hora; el segundo método se realiza de manera semiautomática usando resinas que curan mediante técnicas fotolitográficas. Este último método es el más utilizado, pues se pueden definir de manera más precisa las zonas donde debe colocarse el encapsulante.

## • A2.4 REFERENCIAS

- [1] A. Baldi i Coll, *Estudi y caracterització de l'Éfecte de la Ilum i la temperatura sobre dispositius tipus ISFET*, Tesis de Ingeniería, Universidad Politécnica de Cataluña, (1996)
- [2] J. Koryta, K.Stulik. *Ion-Selective Electrodes* (Cambridge University Press), 2ª edición, Londres Inglaterra (1983)

## **ANEXO 3. TEORÍA SOBRE LA ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE PIRROL**

### **• A3.1 ANTECEDENTES**

Desde 1977 en que Shirakawa et al. [1] reportara por primera vez el desarrollo de un polímero conductor a base de poliacetileno, se ha despertado un gran interés por el estudio, desarrollo y aplicaciones de diversos tipos de polímeros conductores. Las aplicaciones que se ha encontrado a este tipo de materiales son enormes: recubrimientos antiestáticos y anticorrosivos, sensores, baterías, supercapacitores [2,3], desarrollo de LEDs (light emitting diodes) de nueva generación [4], dispositivos electrocrómicos [5] y materiales para electrodos transparentes [6].

Los polímeros conductores pueden ser preparados mediante oxidación del monómero por medios químicos o electroquímicos, siendo estos últimos los preferidos pues brindan un mejor control en cuanto al grueso de la película, a su morfología, además de obtener películas más limpias (sin impurezas).

La electropolimerización se realiza a partir de la oxidación anódica del monómero en un electrolito soporte sobre la superficie de un electrodo, este último puede ser de diferentes materiales dependiendo de la aplicación posterior. Para la

electropolimerización se pueden usar diferentes técnicas electroquímicas: potencioestáticas, galvanostáticas y potenciodinámicas. La conductividad eléctrica en el polímero se logra por la oxidación seguida del dopaje por los aniones del electrolito soporte. Como se forma un polímero conjugado con dobles enlaces alternados, las especies cargadas formadas durante el dopaje pueden moverse por la cadena de carbonos (deslocalización), permitiendo de esta forma el transporte electrónico.

De todos los polímeros conductores que se han preparado hasta la fecha, el polipirrol sigue siendo con creces el más estudiado, dado que su monómero es fácilmente oxidable, es soluble en agua y es disponible comercialmente. Además de lo anterior, el polipirrol presenta ventajas como estabilidad, propiedades redox adecuadas, y alta conductividad eléctrica [7]. Las propiedades intrínsecas del polipirrol dependen en gran medida de las condiciones de electropolimerización, por lo que entender el proceso de electrodeposición es importante, pues así se pueden controlar las propiedades del polímero mejorando sus características químicas y físicas para las muy diversas aplicaciones que ha encontrado en nuestros días [7].

- **A3.2 ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE PIRROL.**

En esta técnica se utiliza una solución del monómero de pirrol disuelto en el solvente apropiado el cual debe contener a la sal que proporcionará al dopante aniónico. Así el monómero es oxidado sobre la superficie de un electrodo aplicando un potencial anódico. La elección del solvente y del electrolito es de

importancia particular pues ambos deben ser estables al potencial de oxidación del monómero y deben proveer un medio de conducción iónica adecuado. Es sabido que solventes orgánicos como el acetonitrilo o el propileno tienen ventanas de potencial bastante amplias [8] y altas permitividades relativas, lo que permite una adecuada disociación del electrolito y por lo tanto una buena conductividad iónica. Dado que el pirrol tiene un bajo potencial de oxidación comparado con otros compuestos polimerizables, la electropolimerización puede llevarse a cabo en medio acuoso, mientras que no es posible usar como solventes benceno ni tiofeno.

De manera resumida, como resultado de la oxidación inicial, el radical catiónico del monómero se forma y reacciona con otros monómeros presentes en solución para formar oligómeros y posteriormente el polímero. La conjugación extendida del polímero provoca una disminución en el potencial de oxidación comparado con el monómero. El proceso de síntesis y dopaje generalmente son simultáneos, el anión se incorpora al polímero para asegurar la electroneutralidad del mismo y al final de la reacción obtener una película del mismo sobre el ánodo.

El ánodo puede estar construido de diversos materiales incluyendo platino, oro, carbón vítreo e ITO (óxido de indio - estaño).

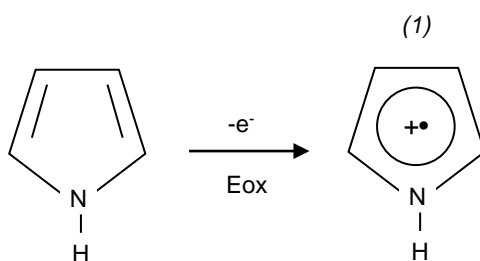
### • **A3.3 MECANISMO DE ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE PIRROL**

El mecanismo de electropolimerización del polipirrol sigue siendo un tema muy debatido y controversial en la actualidad, dada la rapidez de la polimerización, la poca solubilidad del polímero y su estructura no cristalina. Dado lo anterior, no es

de sorprenderse que en la literatura se encuentren diferentes mecanismos propuestos; el mecanismo propuesto por Díaz et al. [9] es el que comúnmente se reporta en la literatura y se presume que es el mejor para describir la reacción de polimerización. Walkman y Bargon [10,11] confirmaron el mecanismo por medio de estudios teóricos basados en la correlación entre la reactividad y la densidad de electrones desapareados de los radicales catiónicos. También se sabe que el mecanismo está de acuerdo con observaciones EPR que muestran la evidencia de la existencia de radicales tipo  $\pi$  y que la eliminación de  $H^+$  de la posición  $\alpha$  indicada por el mecanismo está de acuerdo con la disminución del pH que se observa experimentalmente. [12]

Los pasos del mecanismo se describen a continuación:

- *Paso 1:* Este paso implica la oxidación del monómero R en la superficie del electrodo para formar el radical  $R^{+\bullet}$  (1), como se muestra en la figura 1.

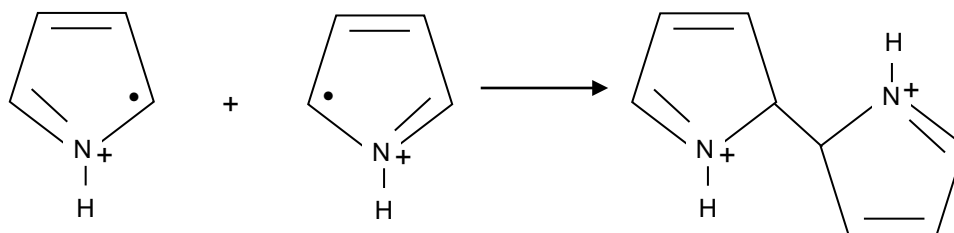


**FIGURA 1. Paso 1 de la electropolimerización de pirrol según Díaz et. al. [9], formación del radical catiónico monomérico**

Dado que el monómero es oxidado a  $R^{+\bullet}$ , la reacción de transferencia electrónica es más rápida que la difusión de R en la solución a la superficie del electrodo, lo que provoca que, al potencial aplicado, las especies monoméricas cerca del electrodo se encuentren repentinamente en su estado oxidado  $R^{+\bullet}$  por lo

que se tendrá una alta concentración de este radical mantenida por una continua difusión de R hacia el electrodo. Los radicales monoméricos catiónicos pueden sufrir diferentes reacciones dependiendo de su reactividad:

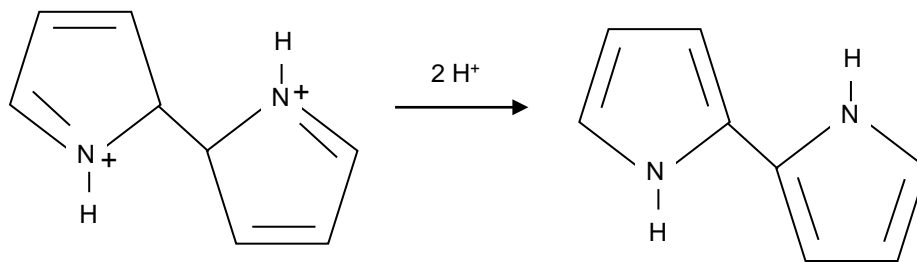
- a) Cuando  $R^{+\bullet}$  es relativamente estable, puede difundir a la solución y reaccionar para formar productos solubles con bajos pesos moleculares.
  - b) Cuando  $R^{+\bullet}$  es muy inestable, puede reaccionar rápidamente con el solvente o con los aniones cerca del electrodo formando también productos de bajo peso molecular.
  - c) Entre estos dos casos,  $R^{+\bullet}$  puede sufrir reacciones de dimerización.
- *Paso 2:* El radical catiónico  $R^{+\bullet}$ , teniendo una gran densidad de electrones desapareados en la posición  $\alpha$  dimeriza vía ciertas estructuras resonantes, el acoplamiento entre estos dos radicales resulta en la formación de un enlace entre sus posiciones  $\alpha$  y por lo tanto la formación de un dímero dicatiónico, en la figura 2 se presenta un esquema de este paso.



**FIGURA 2. Paso 2 de la electropolimerización de pirrol según Diaz et. al. [9], formación del dímero dicatiónico.**

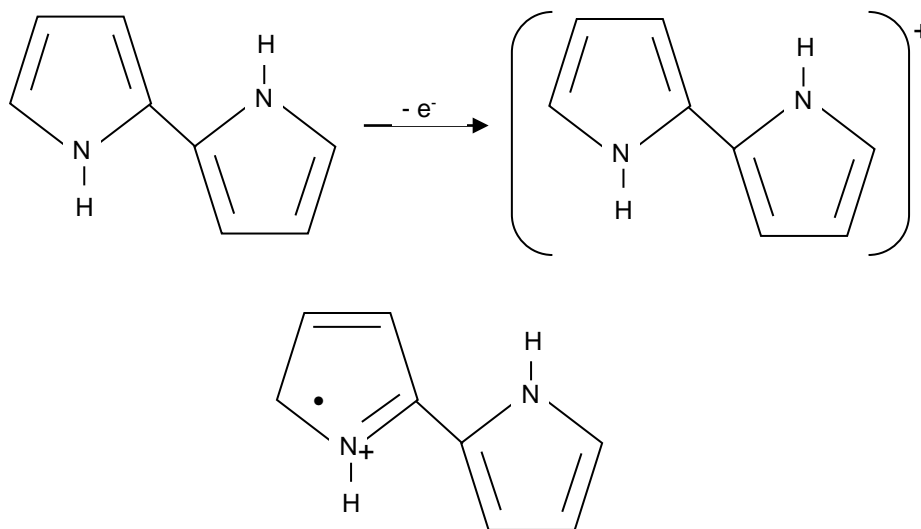
- *Paso 3:* La pérdida de dos protones produce un dímero aromático, a este paso se le llama etapa de estabilización, en la figura 3 se muestra esta etapa.





**FIGURA 3.** Paso 3 de la electropolimerización de pirrol según Diaz et. al. [9], formación del dímero neutro.

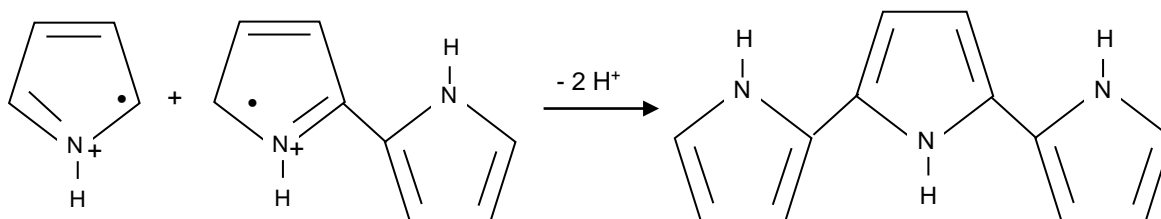
- Paso 4:* A continuación se tiene la oxidación del dímero por lo que se forma un nuevo radical catiónico. Dado que el electrón desapareado se encuentra deslocalizado sobre los dos anillos, el potencial de oxidación es menor que para el monómero, esto es, es más fácil oxidar al dímero al potencial de oxidación del monómero. El nuevo radical catiónico tendrá varias estructuras resonantes, siendo sólo una la predominante, en la figura 4 se resume este hecho.



ESPECIE RESONANTE PREDOMINANTE

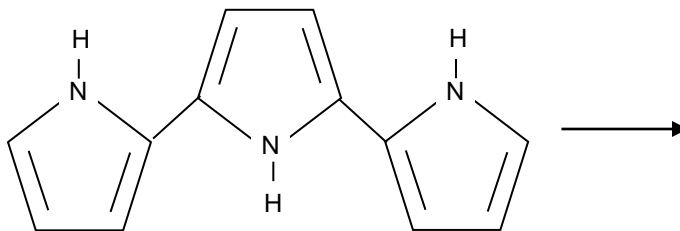
**FIGURA 4.** Paso 4 de la electropolimerización de pirrol según Diaz et. al. [9], formación del radical catiónico dimérico.

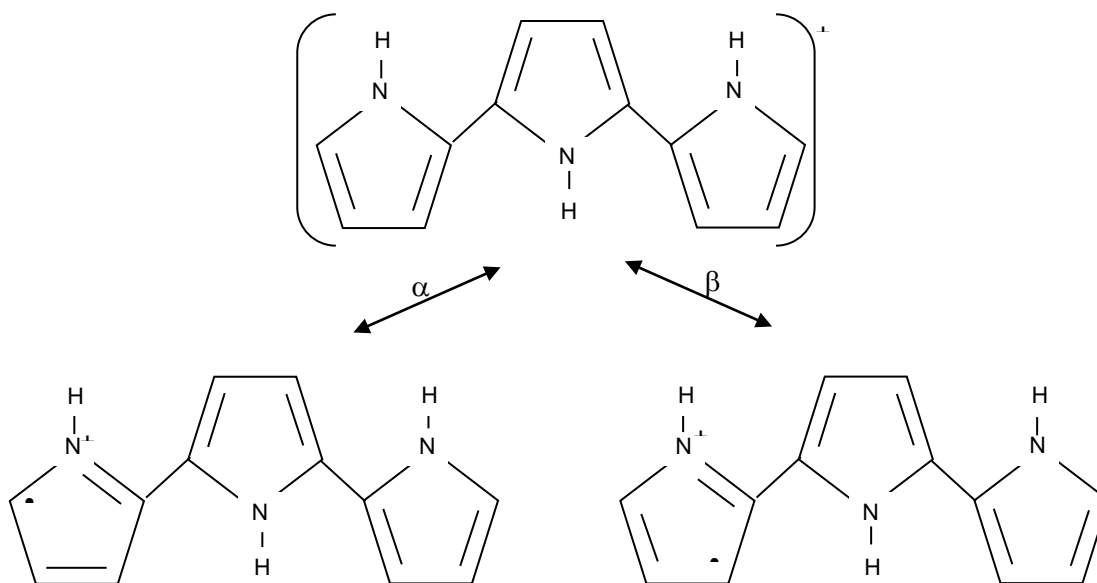
- *Paso 5:* La forma de resonancia predominante reacciona con uno de los radicales catiónicos monoméricos que se muestran en la figura 2 para formar un trímero neutro, en la figura 5 se representa este paso.



**FIGURA 5.** Paso 5 de la electropolimerización de pirrol según Diaz et. al. [9], formación del trímero neutro.

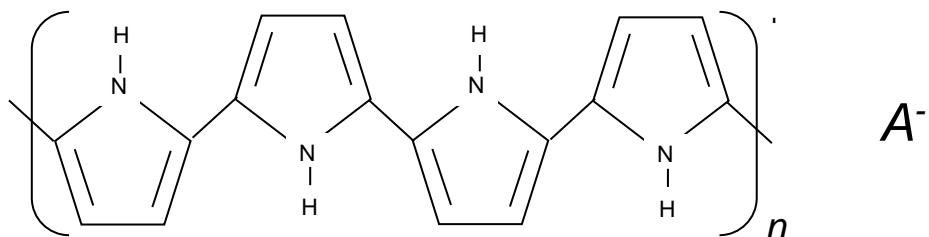
- *Paso 6:* La electrooxidación del trímero forma un radical catiónico trimérico. Las estructuras resonantes  $\alpha$  y  $\beta$  del radical trimérico pueden a su vez reaccionar con otros oligómeros extendiéndose así la cadena, en la figura 6 se representa esta estructura. Cabe mencionar que el acoplamiento a las posiciones  $\alpha$  estará favorecido sobre las posiciones  $\beta$  dado que existen mayores impedimentos estéricos en esta posición. A pesar de lo anterior, Street et. al. [13,14] demostró que mientras más grande es la cadena, se tiene mayor deslocalización del electrón desapareado y se forman más enlaces  $\beta$ , los cuales son los responsables de la baja cristalinidad del polímero.





**FIGURA 6. Paso 6 de la electropolimerización de pirrol según Diaz et. al. [9], radical trimérico catiónico y sus principales estructuras resonantes.**

- Paso 7:* La propagación continúa vía la misma secuencia, oxidación, acoplamiento, desprotonación, hasta que el producto final es obtenido. La electropolimerización no genera polipirrol neutro no conductor, más bien se obtiene la forma oxidada conductora (dopada). La cadena de polipirrol tiene asociada una carga positiva cada 3 o 4 unidades de pirrol, que es balanceada por un anión. La estructura general del polipirrol dopado se presenta en la figura 7.



**FIGURA7. Paso 7 de la electropolimerización de pirrol según Diaz et. al. [9], polímero formado**

Se ha propuesto en la literatura otros mecanismos con base a diversas evidencias experimentales. Kim et al. [15,16] propuso un mecanismo donde la polimerización es iniciada por la pérdida de dos electrones y un protón de la molécula de pirrol formando así un intermediario. Posteriormente el intermediario sufre dimerización por una molécula de pirrol neutra perdiéndose un protón extra, la polimerización continúa por el mismo procedimiento (pérdida de dos electrones y acoplamiento). Pletcher et al. [17] propuso un mecanismo donde el radical catiónico formado por la pérdida de un electrón reacciona directamente con una molécula neutra de pirrol produciendo un catión dimérico. Este catión pierde entonces un segundo electrón y dos protones formando un dímero neutro, y así sucesivamente. Aunque este mecanismo encontró soporte por Satoh et al. [18] otros investigadores han cuestionado duramente el mismo, como Takakubo [19], quien demostró por cálculos de orbitales moleculares que la adición del radical catiónico a una especie neutra es simétricamente prohibido y requeriría entonces de una alta energía de activación.

- **A3.4 FACTORES QUE AFECTAN LA POLIMERIZACIÓN.**

- ***A3.4.1 Efecto del electrolito soporte.***

De los parámetros que más afectan las características físicas y la morfología del polipirrol (Ppy), se encuentra la naturaleza y la concentración del dopante, que representa el 30% del peso del polímero obtenido. La elección del electrolito se hace considerando su solubilidad y nucleofilicidad, además de que su potencial de oxidación debe ser mucho más alto que el del monómero. El dopante puede ser

orgánico y puede variar en tamaño, el tamaño del anión controla la microestructura y la porosidad del polímero [20]. El carácter hidrofóbico del anión así como su interacción con el polímero también tiene un alto impacto en la calidad del polímero producido. Por ejemplo, Kassim et al. [21] demostraron que en agua se obtienen polímeros conductores estables y de mejores propiedades mecánicas usando aniones aromáticos de cadena larga (como surfactantes) que usando como dopante el anión perclorato. Lo anterior se debe a la interacción hidrofóbica con el agua, lo que orienta la cadena polimérica de manera paralela a la superficie del electrodo, y que incrementa el orden en la estructura del polímero [22]. Kuwabata et al. [23] demostró que mientras mayor sea la basicidad del anión, menor será la conductividad del polímero; esto se debe a un incremento en las interacciones entre las cargas positivas del polímero y los aniones. De manera análoga, la acidez de los aniones aumenta la conductividad del polímero [22]. La nucleofilicidad del anión interfiere con la reacción de polimerización incrementando la formación de productos solubles.

La concentración del electrolito también es un factor importante a considerar, aunque su efecto aún no ha sido completamente entendido. Se ha observado que mientras más alta sea la concentración del electrolito, mayor es la conductividad del polímero formado [24].

#### - **A3.4.2 Efecto del solvente**

El solvente usado debe minimizar las reacciones nucleofílicas, los solventes apróticos han resultado ser los mejores para la polimerización de pirrol, entre ellos destaca el acetonitrilo. En solución acuosa, generalmente se requieren

cantidades apreciables de electrolito para dar al polímero las propiedades mecánicas y conductoras deseadas. La mezcla de solventes también tiene un efecto notorio en las características del polímero que se desea obtener. Por ejemplo, se ha observado que al agregar pequeñas cantidades de agua al acetonitrilo tiene una gran influencia en la cinética de reacción y las propiedades del Ppy obtenido. Esto se ha explicado dada la estabilización del radical catiónico por las moléculas de agua que tienen una polaridad mayor que la del acetonitrilo. Imanishi et al. [25] ha tratado de explicar la fuerte influencia del solvente en la electropolimerización atendiendo a la basicidad y polaridad del mismo. Considera que la basicidad del solvente es el principal factor que afecta la selectividad en la formación del polímero, mientras que la polaridad afecta la interacción entre el solvente y los aniones del electrolito. Ko et al. [26] estudiaron las diferencias morfológicas entre Ppy formado en acetonitrilo y Ppy formado en agua. Encontraron que el Ppy crecido en acetonitrilo presenta mejores características conductoras y es más homogéneo, mientras que el crecido en agua es más poroso.

#### - **A3.4.3 Efecto del pH**

Aún cuando la oxidación del monómero de pirrol es independiente del pH, este tiene una gran influencia en la reactividad y estabilidad del Ppy formado en el electrodo [18]. Como se vio antes, los protones son producidos después de cada oxidación en el electrodo, lo que provoca la disminución del pH en las cercanías del electrodo. Unsworth et al. [27] demostraron que la optimización del pH durante el proceso mejora la uniformidad del Ppy obtenido presentando pocos

defectos estructurales. Se ha observado que en general los pH ácidos favorecen la polimerización, aunque un pH muy ácido puede provocar pérdida en la conductividad debido a que se cataliza la formación de trímeros no conjugados, que pueden reaccionar para formar Ppy parcialmente conjugado, o bien difundir a la solución. La estabilidad del Ppy en solución acuosa con respecto al pH fue estudiada por Pei y Qian [28], quienes demostraron que el Ppy podía protonarse o desprotonarse. La cadena polimérica sufre desprotonación en medio básico (donde el pKa tiene un valor entre 9-11) lo que resulta en la modificación de la estructura electrónica del polímero generando una disminución en la conductividad del mismo. Por otro lado, ocurre un proceso de protonación en soluciones ácidas con un pKa en el intervalo de 2-4, lo que provoca un aumento en la conductividad.

- ***A3.4.4 Efecto de la técnica electroquímica.***

Otero y DeLarreta han señalado que la elección de la técnica electroquímica para crecer al polímero tiene un efecto en la morfología, apariencia y capacidad adhesiva del mismo [29]. Cuando se usan técnicas a galvanostáticas o potencioestáticas, se obtiene un polímero con estructura de dendritas y poco adhesivo. Por otro lado, los polímeros obtenidos usando técnicas potenciodinámicas resultan muy adhesivos y presentan una superficie lisa y homogénea. Kiani y Mitchell [30] formularon la hipótesis que esto se debería al gran número de sitios de nucleación y el proceso de crecimiento.

### • A3.5 REFERENCIAS

- [1] E. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, A. J. Heeger, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 588, (1977)
- [2] H. S. Nalwa, *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, John Wiley & Sons, New York, (1997)
- [3] J. L. Reddinger, J. R. Reynolds, *Adv. Polymer Sci.*, **145**, 57, (1999)
- [4] R. H. Friend, R. W. Gymer, A. B. Holmes, J. H. Burroughes, R. N. Marks, C. Taliani, D. C. Bradley, D. A. Santos, J. L. Brédas, M. Lögdlundand, W. R. Salaneck, *Nature*, **397**, 121, (1999)
- [5] I. D. Brotherson, J. L. Boehme, J. P. Ferraris, D. L. Meeker, *Electrochim. Acta*, **44**, 2993, (1999)
- [6] L. Groenendaal, F. Jonas, D. Freitag, H. Pielartzik, J. R. Reynolds, *Adv. Mater.*, **7**, 481, (2000)
- [7] J. Simonet, J. R. Berthelot, *Prog. Solid State Chem.*, **21**, 1, (1991)
- [8] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, (1980)
- [9] E. M. Genies, G. Bidan, A. F. Díaz, *J. Electroanal. Chem.* **149**, 101, (1983)
- [10] R. J. Walkman, J. Bargon, *Can. J. Chem.*, **64**, 76, (1985)
- [11] R. J. Walkman, J. Bargon, *Tetrahedron*, **40**, 3963, (1984)
- [12] G. B. Street, *Handbook of Conducting Polymers*, 1a Edición, Ed. T. J. Skotheim, Marcel Dekker, New York, 188, (1986)
- [13] P. Pfluger, M. Krounbi, G. B. Street, *J. Chem. Phys.*, **78**, 3212, (1983)



- [14] P. Pfluger, G. B. Street, *J. Chem. Phys.*, **80**, 544, (1984)
- [15] K. J. Kim, H. S. Song, J. D. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **9**, 248, (1988)
- [16] Y. T. Kim, R. W. Collins, K. Vedom, D. L. Allara, *J. Electrochem Soc.*, **138**, 3266, (1991)
- [17] S. Asavapiriyant, G. K. Chandler, A. Gunawardena, D. Pletcher, *J. Electroanal. Chem.*, **177**, 229, (1984)
- [18] M. Satoh, K. Imanishi, K. Yoshino, *J. Electroanal. Chem.*, **317**, 139, (1991)
- [19] M. Takakubo, *J. Electroanal. Chem.*, **258**, 303, (1989)
- [20] E. Beelen, J. Riga, J. J. Verbist, *Synth. Met.*, **41**, 449, (1991)
- [21] A. Kassim, F. J. Davis, G. R. Mitchell, *Synth. Met.*, **62**, 41, (1994)
- [22] L. F. Warren, D. P. Anderson, *J. Electrochem. Soc.*, **134**, 101, (1987)
- [23] S. Kuwabata, J. Nakamura, H. Yoneyama, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 779, (1988)
- [24] Y. Li, J. Yang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, 2739, (1997)
- [25] K. Imanishi, M. Satho, Y. Yasuda, R. Tsushima, S. Auki, *J. Electroanal. Chem.*, **242**, 203, (1988)
- [26] J. M. Ko, H. W. Rhee, S. M. Park, C. Y. Kim, *J. Electrochem. Soc.*, **137**, 905, (1990)
- [27] J. Unsworth, P. C. Innis, B. A. Lunn, Z. Jin, G. P. Norton, *Synth. Met.*, **53**, 59, (1992)
- [28] Q. Pei, R. Quian, *Synth. Met.*, **45**, 35, (1991)
- [29] T. F. Otero, E. DeLarreta, *Synth. Met.*, **26**, 79, (1988)
- [30] M. S. Kiani, G. R. Mitchell, *Synth. Met.*, **48**, 203, (1992)

## ANEXO 4. PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

### • A4.1 ANTECEDENTES

Los métodos automáticos de análisis han cobrado inusitado interés en las últimas décadas. Su aplicación abarca campos como la química clínica donde se requiere la obtención de datos con rapidez y a bajo costo, los laboratorios de control de las industrias donde la calidad de los materiales de entrada, los parcialmente tratados y los productos finales requiere de un control continuo, la ecología donde es necesario un monitoreo progresivo y permanente de los contaminantes en el aire y todo tipo de aguas (urbanas, lagos, ríos, etc.).

Existen tres tipos de métodos automáticos de análisis [1]:

1. *Métodos discontinuos (batch methods)*: Donde cada muestra se encuentra de manera separada en recipientes y es dentro de ellos donde tienen lugar las diferentes etapas analíticas de manera secuencial. Las muestras son transportadas de manera mecánica a unidades dispensadoras de los diluyentes y reactivos con intermedios de agitación y de ahí pasar al detector.

2. *Métodos continuos (continuous methods)*: Estos se refieren a aquellos procesos analíticos en los que la concentración del analito es medida sin interrumpir un flujo de líquido o gas; las muestras se introducen de manera sucesiva y a intervalos regulares de tiempo en un canal por el que fluye un líquido en el que se encuentra disuelto el reactivo, o bien este es introducido posteriormente mediante canales auxiliares que confluyen con

el principal, de aquí el flujo pasa a través de una *cubeta de flujo* que forma parte del sistema de detección y se recoge la señal obtenida en un registrador y es de tipo continuo. Dentro de los métodos continuos tenemos otros dos tipos de métodos:

i.- Los métodos continuos segmentados (SFA), donde las muestras son aspiradas secuencialmente y entre ellas se sitúan burbujas de aire que separan (segmentan) el flujo establecido, incluido un ciclo de lavado.

ii.- Los métodos continuos no segmentados, que se denominan genéricamente Análisis por Inyección en Flujo (FIA), donde el flujo no se encuentra segmentado por burbujas de aire sino que la muestra es inyectada en vez de aspirada y en el momento de la detección no se han alcanzado ni el equilibrio físico (homogenización del fluido) ni el equilibrio químico.

3. *Métodos robotizados*. En estos un robot hace las veces de un operador, actualmente estos métodos no han tenido un desarrollo muy amplio.

#### • **A4.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS SFA Y FIA.**

Los analizadores automáticos continuos presentan grandes ventajas en comparación con otros métodos automáticos de análisis; sin embargo, dentro de estos el método de FIA presenta ventajas aun mayores en comparación con el método SFA. El primero es de bajo costo, presenta la posibilidad de variar las características geométricas e hidrodinámicas del sistema de manera sencilla, ya que se logra una perfecta identidad de cada muestra inyectada secuencialmente

en el flujo, la complejidad mecánica es menor, se puede adaptar al análisis de un gran número de muestras, cuyos volúmenes son mucho menores variando entre 10 y 1000  $\mu\text{l}$ ; el tiempo de respuesta es mucho más corto, su capacidad de muestreo es mucho mas alta, no se requiere de ningún ciclo de lavado, se pueden realizar análisis cinéticos, valoraciones, las respuestas se pueden interpretar de diferentes formas como altura de pico, ancho de pico, área de pico, distancia pico-pico y es más versátil. En la tabla 1 se realiza una comparación de las características entre los dos métodos, donde se aprecia de manera clara la ventaja de FIA sobre SFA.

**Tabla 1. Características de los sistemas SFA y FIA**

<b>Parámetro</b>	<b>SFA</b>	<b>FIA</b>
<i>Introducción de muestra</i>	Aspiración	Inyección
<i>Volumen de muestra</i>	200 a 2000 $\mu\text{l}$	10 a 1000 $\mu\text{l}$
<i>Tiempo de respuesta</i>	2 a 30 min	3 a 60 s
<i>Diámetro mínimo del tubo de paso del fluido</i>	2 mm	0.5 a 0.7 mm
<i>Ciclo de lavado</i>	Esencial	No esencial
<i>Análisis cinético</i>	No es posible	Stopped flow Continuo
<i>Valoraciones</i>	No posible	Posible
<i>Respuesta</i>	Altura de pico	Altura de pico Área de pico Ancho de pico Distancia pico-pico

Los rasgos esenciales del FIA son establecidos de manera clara y concreta por Valcárcel y Luque de Castro [1]:

- El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de SFA.
- La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada en el mismo.
- Se realiza un transporte del bloque inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).
- La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Se produce una mezcla incompleta pero reproducible, que da lugar a un gradiente de concentración variable con el tiempo a lo largo del sistema.
- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada.
- En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogenización de una porción del flujo, ni el equilibrio químico, (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los métodos cinéticos de análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.

- El tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

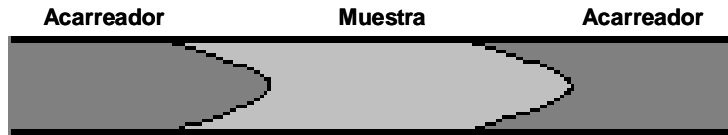
- **A4.3 FUNDAMENTOS OPERACIONALES DE FIA**

Las condiciones experimentales del FIA originan una mezcla incompleta del trozo inyectado con el flujo portador que se caracteriza por dos aspectos:

1. Es variable con el tiempo, y por tanto es distinta en diferentes puntos del sistema.
2. Esta variabilidad debe ser muy reproducible, lo que significa que cuando se inyecta sucesivamente el mismo volumen de muestra en el mismo sistema FIA, el grado de mezcla debe ser el mismo en cada uno de los distintos puntos del sistema.

Los fundamentos físicos del FIA están relacionados con la *dispersión*, que se define como la dilución que sufre un volumen de muestra inyectada en el flujo, siendo el *fiagrama* (señal transitoria obtenida en el detector) una representación de la dispersión en el punto de detección. Este fenómeno también es incluido como característica fundamental de los sistemas FIA por Rusicka [2-5]. Se ha determinado que el flujo en FIA debe tener un régimen laminar en cuanto al transporte de materia en los tubos, por lo que el número de Reynolds debe ser muy inferior a 2000 [6], esto le proporciona al método muchas de sus ventajas de análisis. Debido a este régimen laminar, habrá dos mecanismos que contribuyan a la dispersión del trozo de muestra inyectado:

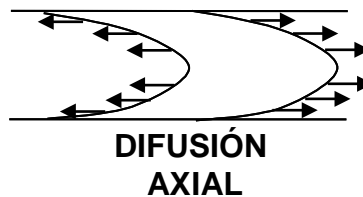
1. Transporte por convección, que origina un perfil parabólico de velocidades debido al flujo laminar. En la figura 1 se muestra esquemáticamente el perfil.



**Figura 1. Perfil parabólico de la muestra debido al transporte por convección.**

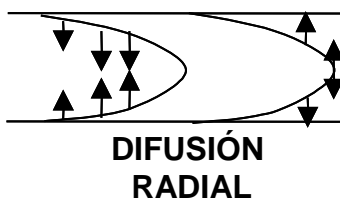
2. Transporte por difusión, debido a la existencia de gradientes de concentración en diferentes momentos del transporte. A su vez existen dos posibilidades:

i.- Difusión axial, debido a gradientes horizontales de concentración tanto en la "punta" como en la "cola" del trozo de muestra, este tipo de difusión no tiene una contribución significativa. En la figura 2 se esquematiza este tipo de difusión.



**FIGURA 2. Difusión axial del trozo de muestra inyectado.**

ii.- Difusión radial, debido a las diferencias de concentraciones entre dos puntos situados perpendicularmente a la dirección del flujo. Esta contribución es la más importante, las moléculas que están en las paredes del tubo tienden a desplazarse hacia el centro mientras que las del centro se desplazan en dirección contraria. Este movimiento "retrasa" en cierto sentido el movimiento por convección y, por tanto, la dilución en el flujo del trozo. La difusión radial en FIA hace las veces de las burbujas de aire en el SFA, en la figura 3 se representa este tipo de difusión.



**FIGURA 3. Difusión radial del trozo de muestra inyectado.**

Dependiendo del tiempo que tarda en llegar la muestra al detector se tiene el predominio de determinado tipo de transporte, inmediatamente después de la inyección se tiene que predomina el transporte por convección; luego de cierto tiempo, la difusión comienza a establecerse hasta que el transporte es controlado tanto por convección como por difusión; si pasa aún mas tiempo, el transporte que predomina es el de tipo difusional.

La sensibilidad y la capacidad de muestreo del sistema de análisis están íntimamente relacionadas con las variables geométricas e hidrodinámicas del sistema ya que de ellas depende el régimen de transporte de la muestra. Si  $V$  es el volumen del reactor,  $L$  es la longitud del caudal,  $q$  es el caudal (en ml.min) y  $R$  es el radio del reactor, se tiene que el tiempo medio de residencia  $t$  está dado por:

$$t = \frac{V}{q} = \frac{\pi R^2 L}{q} \quad (1)$$

despejando a  $L/q$  de (1) se tiene:

$$\frac{L}{q} = \frac{t}{\pi R^2} \quad (2)$$

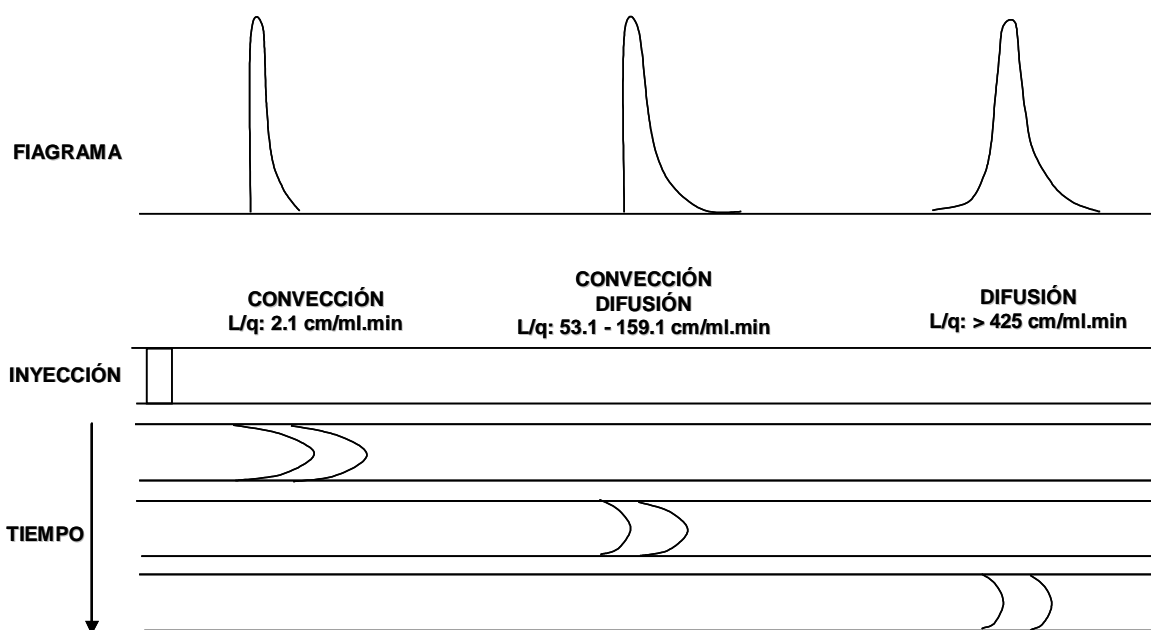
La relación  $L/q$  proporciona información sobre el régimen de transporte de la muestra en el momento de la detección, como se muestra en la tabla 2.



**TABLA 2. Relación entre  $L/q$  y el régimen de transporte predominante en un sistema FIA**

<b><math>L/q</math> (cm/ml.min)</b>	<b>Régimen de transporte predominante</b>
2.1	Convección
53.1 – 159.1	Convección – Difusión (iguales)
> 425	Difusión

Desde el punto de vista analítico práctico, hay dos parámetros importantes dentro del fiagrama que conviene controlar en cada sistema FIA: *la altura o el área del pico y el tiempo de retorno a la línea base*, ya que son los que definen dos aspectos decisivos para el método analítico: *la sensibilidad y la capacidad de muestreo*. Así mismo, la forma del fiagrama proporciona importante información sobre el tipo de transporte que predomina en el momento en que la muestra pasa por el detector, en la figura 4 se resume la forma del fiagrama dependiendo del régimen de transporte del sistema.



**FIGURA 4. Perfiles de transporte y fiagrama correspondiente de la muestra inyectada dentro del sistema FIA con respecto al tiempo.**

La utilización del FIA es cada vez más amplia ya que por las ventajas que presenta, basta con decir que sus limitaciones son únicamente el ingenio y la imaginación de los investigadores que deseen aplicarlo.

#### • **A4.4 FIA Y SENSORES QUÍMICOS POTENCIOMÉTRICOS**

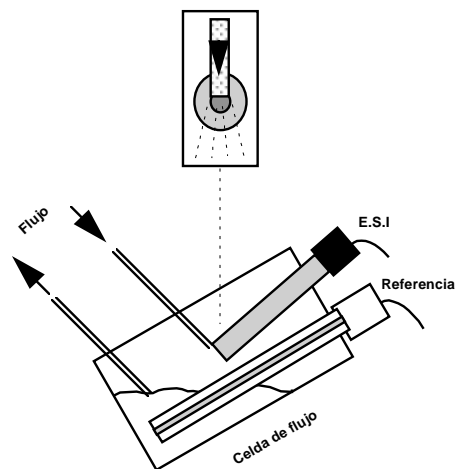
Los métodos de detección que pueden ser utilizados en un sistema FIA. son muy variados, algunos de los más populares son la espectrofotometría, fluorescencia, potenciometría y voltametría. La utilización de sensores químicos potenciométricos para mediciones dentro de los sistemas FIA. va cobrando mayor importancia conforme se moderniza esta técnica de análisis, Ruzicka y Hansen han contribuido enormemente a la aplicación de este tipo de detectores en FIA [7,8].

- *A4.4.1 Tipos de configuraciones FIA-sensor químico potenciométrico*

Se han probado distintas configuraciones para los sensores químicos potenciométricos en los sistemas FIA:

1. Configuraciones convencionales, que a su vez se subdividen en:

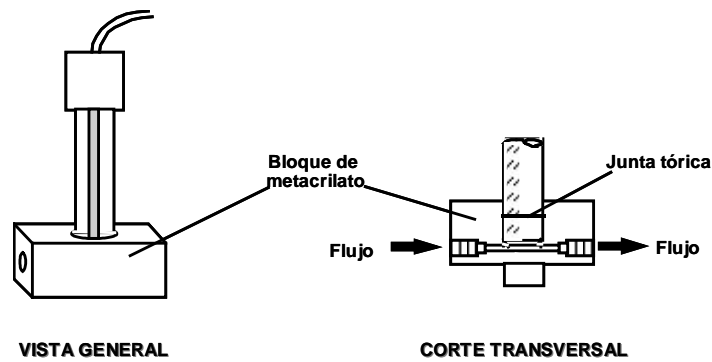
i.- Disposición en cascada, propuesto desde un inicio por Rusicka [5], que utiliza una celda de flujo donde el sensor se encuentra soportado sobre el electrodo de referencia, en la figura 6 se presenta un esquema de esta configuración.



**FIGURA 6. Disposición en cascada del sistema de detección en FIA**

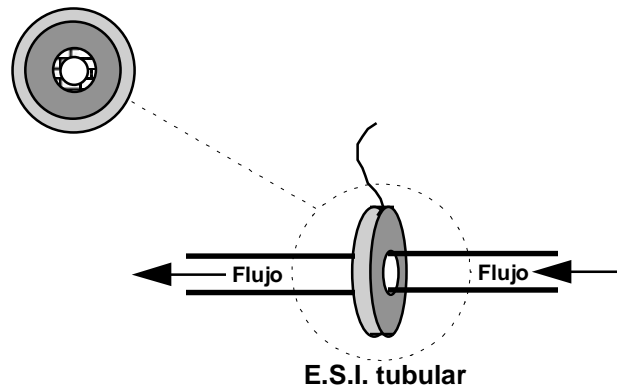
ii.- Disposición de hilo recubierto, propuesto por Trojanowicz [9-12], que corresponden a "microelectrodos" basados en hilos metálicos recubiertos con compuestos electroquímicos.

iii. Disposiciones de celda o casquete (flow-through-cap), donde los sensores químicos y el electrodo de referencia están adaptados a una celda o casquete que cuenta con entrada y salida para flujos, en la figura 7 se presenta un esquema para esta configuración.



**FIGURA 7. Disposición de celda para el sistema de detección en FIA**

2. Configuraciones tubulares (flow-through-electrodes), propuestos en un principio por Muller [13,14] hechos de dispositivos tubulares de las mismas dimensiones que los tubos conductores de los flujos, con las paredes actuando como membranas sensoras, en la figura 8 se muestra un esquema de esta configuración.



**FIGURA 8. Configuración tubular propuesta por Muller .**

Las configuraciones convencionales presentan ciertas desventajas, como evaporación, poca reproducibilidad, ruido de fondo, alteraciones hidrodinámicas como un régimen turbulento, no permiten el análisis multiparamétrico y los electrodos siempre deben colocarse al final de la línea; desventajas que no presentan las configuraciones tubulares ya que los electrodos así diseñados

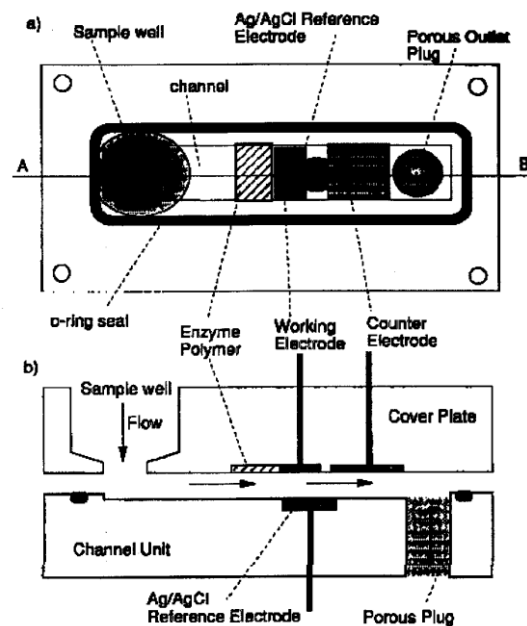
pueden colocarse en cualquier punto del sistema de flujo sin distorsionarlo, es decir, el régimen laminar del sistema FIA. se conserva.

En la utilización de los electrodos tubulares, se prefiere el uso de membranas heterogéneas ya que las homogéneas presentan poca moldeabilidad, fragilidad y dificultad al momento de taladrarlas para obtener el canal por el que pasa el flujo, debido a esto los electrodos tubulares usados en este trabajo corresponden al tipo de electrodos con membrana heterogénea de portador neutro.

#### • **A4.5 FIA Y SENSORES AMPEROMÉTRICOS.**

El acoplamiento de biosensores amperométricos en sistemas FIA es algo más complejo que para el caso de los sensores potenciométricos, dado que generalmente se requiere acoplar tres electrodos: el biosensor, el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar. Los problemas se derivan de que las configuraciones usadas pueden provocar un incremento de volumen en la celda donde se realiza la detección, lo cual implica una dilución y por consiguiente una disminución en la señal registrada. Se han desarrollado diferentes configuraciones [15,16], las más conocidas corresponden a la configuración T con entrada inferior de flujo y salida lateral y que es comercializada por Metrohm. Otra configuración usada es la diseñada por Ivaska [17] y colaboradores en la que sobre el electrodo de trabajo choca el flujo que entra en la parte inferior de la celda, el fondo de la celda lo constituye el electrodo auxiliar que comúnmente es de acero inoxidable, mientras que el electrodo de referencia está separado de la corriente de fluido mediante un “plug” de cerámica. Aún estas configuraciones presentan limitaciones

en su utilización, pues el óptimo funcionamiento del sistema de análisis depende de la configuración del biosensor usado, el electrodo de referencia, etc. De hecho, aún en la actualidad se siguen desarrollando investigaciones para poder efficientar de manera general las celdas para el acoplamiento de los biosensores a FIA, como lo muestran los trabajos de Fang et al. [18], Gooding et al. [19] y Lapierre et al. [20]. El gran problema con las celdas desarrolladas por estos investigadores radica en su complejidad de construcción (véase figura 9), ya que se requieren equipos muy sofisticados para trabajos de alta precisión, los cuales sólo se pueden encontrar en las salas blancas de los laboratorios de electrónica. Esto provoca que la infraestructura para la construcción de este se encuentre muy lejos del alcance de muchos laboratorios de investigación.



**Figure 1.** Schematic of the channel biosensor. (a) Top view; (b) section view through cut A–B.

**FIGURA 9.** Esquema de la celda propuesta por Gooding y colaboradores<sup>48</sup>

- **A4.6 REFERENCIAS.**

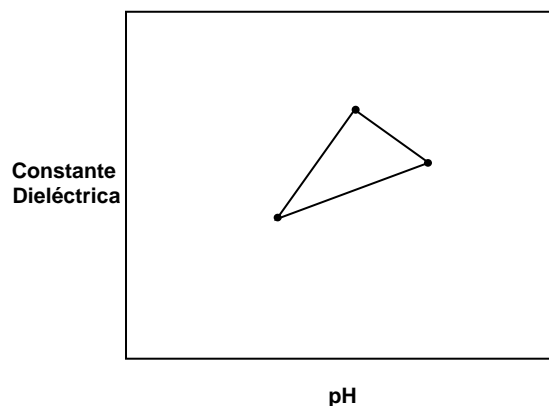
- [1] M. Valcárcel, M. Luque de Castro, “*Análisis por inyección en flujo*”, 1ª. Edición, Departamento de Química Analítica-Universidad de Córdoba Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba (1984)
- [2] Ruzicka J., Hansen E., *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145 (1975)
- [3] Ruzicka J., Hansen E., *Anal. Chim. Acta*, **99**, 37 (1978)
- [4] Ruzicka J., Hansen E., *Talanta*, **29**, 157 (1982)
- [5] Ruzicka J., Hansen E., “*Flow Injection Analysis*”, 2<sup>nd</sup> Edition, Ed. Wiley Interscience (1988)
- [6] Stewart, K. K., *Talanta*, **28**, 311 (1981)
- [7] Ruzicka J., Hansen E., Zagatto, E. A., *Anal. Chim. Acta*, **88**, 1 (1977)
- [8] Ruzicka J., Hansen E., Zagatto, E. A., *Anal. Chim. Acta*, **88**, 16 (1977)
- [9] Alexander P., Haddad P., Trojanowicz M, *Anal. Chem.*, **56**, 2417 (1984)
- [10] Alexander P., Haddad P., Trojanowicz M, *Anal. Lett.*, **17**, 309 (1984)
- [11] Alexander P., Haddad P., Trojanowicz M, *Anal. Lett.*, **18**, 1953 (1985)
- [12] Alexander P., Haddad P., Trojanowicz M, *Anal. Chim. Acta*, **171**, 151 (1985)
- [13] Muller H., *Anal. Chem. Symp. Series*, **8**, 279 (1981)
- [14] Muller H., *Anal. Chem. Symp. Series*, **18**, 353 (1984)
- [15] A. G. Fog, N. K. Bsebsu, *Analyst*, **107**, 566 (1982)
- [16] A. G. Fog, N. K. Bsebsu, *Analyst*, **107**, 1462 (1982)
- [17] A. Ivaska y T. Ryan. *Collect. Czech. Chem Commun.*, **46**, 2865 (1981)
- [18] Q. Fang, X. T. Shi, Y. Sun, Z. Fang, *Anal. Chem.*, **69**, 3570 (1997)
- [19] J. Gooding, E. Hall, *Anal. Chem.*, **70**, 3131 (1998)
- [20] A. Lapierre, R. Olsina, J. Raba, *Anal. Chem.*, **70**, 3679 (1998)

## **ANEXO 5. MÉTODO DE OPTIMIZACIÓN SIMPLEX**



La optimización experimental de una función de varias variables fue establecida por primera vez por Hotelling [1] y ampliamente discutida por Friedman y Savage [2], quienes presentaron un procedimiento secuencial de optimización de “un factor a la vez”. Box y Wilson [3] demostraron que varios factores pueden ser variados al mismo tiempo para alcanzar el óptimo, estableciendo así las bases de los procesos de “operación evolutiva” (EVOP). Las técnicas EVOP fueron diseñadas para analizar los resultados de pequeñas variaciones en las condiciones operacionales de procesos industriales. Sin embargo, Spendley [4] desarrolla un método más eficiente de optimización llamado método de SIMPLEX secuencial y que fue utilizado por primera vez en Química Analítica por Long [5]. Este método no utiliza las pruebas tradicionales de significancia por lo que es más rápido y simple que métodos anteriores. El método SIMPLEX rápidamente alcanza el óptimo experimental, guiado por cálculos y decisiones rígidas en su metodología, pero simples en su aplicación.

Un SIMPLEX es una figura geométrica definida por un número de puntos igual a uno más el número de dimensiones del espacio considerado (el número de dimensiones está dado por el número de variables independientes a considerar), por ejemplo, un SIMPLEX en dos dimensiones es un triángulo, un SIMPLEX en tres dimensiones es un tetrahedro, y así (véase figura 1).

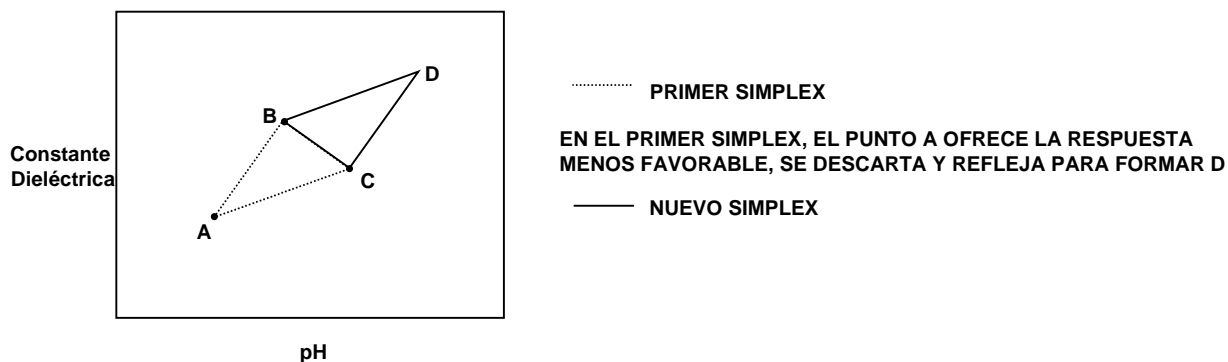


**FIGURA 1. Ejemplo de SIMPLEX en dos dimensiones**

Los vértices del SIMPLEX se determinan mediante la realización de experimentos separados a diferentes condiciones. Por simplicidad, se describirá el proceso de optimización de un SIMPLEX de dos dimensiones, aunque el mismo raciocinio puede aplicarse a más dimensiones.

El objetivo del método SIMPLEX secuencial es forzar al SIMPLEX a moverse a una región de respuesta óptima (sobre la superficie de resta que depende de las variables independientes que se consideren), las decisiones requeridas para lograr esto constituyen las llamadas Reglas del método SIMPLEX:

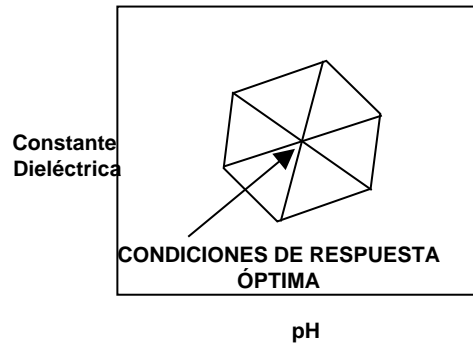
- Regla 1. Solo se pueden hacer movimientos después de haber realizado cada observación de la respuesta.
- Regla 2. El movimiento se realiza como si se creara un nuevo SIMPLEX junto al anterior, el cual se obtiene descartando los puntos donde el SIMPLEX anterior presentaba la respuesta menos adecuada y reemplazándola con su correspondiente punto especular (véase figura 2).



**FIGURA 2. Movimiento básico del SIMPLEX: Reflexión.**

- *Excepción a la Regla 2.* Si el punto reflejado resulta tener la respuesta menos deseable del sistema que se analiza, no se aplica la regla 2, en cambio, se desecha el segundo valor con respuesta menos deseable del nuevo SIMPLEX y continúe.
- *Regla 3.* Si un vértice es retenido en  $k+1$  números de SIMPLEX, antes de aplicar la regla 2 verifique de nuevo la respuesta en el vértice que persiste. Si el vértice está realmente cerca del valor óptimo, es probable que la evaluación repetitiva de la respuesta sea consistentemente alta y el máximo sea alcanzado. Si la respuesta en el vértice es alta debido a un error en la observación, es improbable que la repetición de la observación sea alta y el vértice será consecuentemente eliminado.
- *Regla 4.* Si un nuevo vértice cae fuera de los límites permitidos para las variables independientes, asignar una respuesta indeseable para el sistema que se analiza. Entonces la aplicación de las reglas 2 y 3 forzarán al SIMPLEX a regresar dentro de los límites permitidos y continuará buscando la respuesta óptima.

Cuando un óptimo se ha alcanzado, las reglas forzan al SIMPLEX a ciclar (véase figura 4).



**FIGURA 4.** Esquema de cómo cicla el SIMPLEX alrededor del punto de respuesta óptima.

Posteriormente se modificó el método original de SIMPLEX. Su modificación no solo indica con mayor claridad cuándo se ha llegado a un óptimo estacionario suficientemente preciso, también logra una adaptación rápida a la superficie de respuesta estudiada. La modificación consiste en la inclusión de nuevas operaciones como expansión y contracción.

Dada su simplicidad y accesibilidad, se usará el método SIMPLEX como parte de la metodología para optimizar así, por un lado, el sistema de detección en el caso de los sensores para surfactantes propuestos, y por el otro, los sistemas de análisis propuestos en cuanto a su configuración geométrica respecto a los diferentes componentes que lo integran

## • 5.1 REFERENCIAS

[1] H. Hotelling, *Ann. Math. Statist.*, **12**, 20 (1941)

- [2] M. Friedman, L. J. Savage, "*Techniques of Statistical Analysis*", Ed. Mc Graw Hill, 1ª. Edición (1947)
- [3] G. E. P. Box, K. B. Wilson, *Roy. Stat. Soc.*, **Series B 13**, 1 (1951)
- [4] W. Spendley, G. R. Hext, F. R. Himsforth, *Technometrics*, **4**, 441 (1962)
- [5] D. E. Long, *Anal. Chim. Acta*, **46**, 193 (1969)

## ANEXO 6. LÍMITES DE DETECCIÓN Y COEFICIENTES DE SELECTIVIDAD [1]

### • A6.1 LÍMITES DE DETECCIÓN

En términos generales, el límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento ( $y$ ) significativamente diferente a la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. En términos estadísticos, la mejor forma de definir el LODes como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco,  $y_B$ , más tres veces la desviación estándar del blanco,  $s_B$ :

$$\text{LOD} = y_B + 3s_B \quad (\text{A6.1})$$

En la práctica, cuando se hace una curva de calibración se pueden usar los datos arrojados durante el ajuste de mínimos cuadrados para estimar los parámetros  $y_B$  y  $s_B$ . La ordenada al origen puede ser usada como una estimación de  $y_B$  y  $s_B$  puede aproximarse como el error aleatorio de  $y$  debido a que el método de ajuste por mínimos cuadrados no ponderados supone que cada punto en la representación gráfica (incluido el punto que representa al blanco) tiene una variación distribuida normalmente (solo en la dirección  $y$ ).

### • A6.2 COEFICIENTES DE SELECTIVIDAD

Para considerar las contribuciones en la respuesta de potencial en un ISE debidas a la presencia de especies químicas interferentes se usa la ecuación de Nikolsky-Eisenmann, que se muestra en A6.2.

$$E = E_o + S \log \left[ a_i + \sum_{i \neq k} K_{ik}^{\text{pot}} (a_k)^{\frac{z_i}{z_k}} \right] \quad (\text{A6.2})$$

donde  $K_{ik}^{\text{pot}}$  es llamado *coeficiente de selectividad*,  $z_k$  es la carga del ión interferente  $k$ ,  $a_k$  corresponde a la actividad de este ión y  $a_i$  corresponde a la actividad del ión  $i$ . El coeficiente de selectividad potenciométrico  $K_{ik}^{\text{pot}}$  es una medida de la selectividad del ISE respecto a un ión  $k$  con respecto al ión principal  $i$ .

Los coeficientes de selectividad pueden ser medidos con diferentes métodos, el más común es el llamado *método de soluciones mezcladas* que recomienda la IUPAC [2]. En este método se puede fijar la actividad ya sea de la especie principal  $i$  o bien de la especie interferente  $k$ ; se varía la actividad de la especie que no se mantiene fija. Cuando se fija  $i$ , se grafica el potencial de celda vs el  $\log_{10}$  de la actividad de la especie interferente  $j$ . Se extrapola la línea de calibración y se intersecta con la línea base obtenida de los potenciales por debajo del LOD. La información de la intersección se usa para estimar los coeficientes de selectividad según la siguiente ecuación:

$$K_{ik}^{\text{pot}} = a_i / (a_k)^{z_i/z_k} \quad (\text{A6.2})$$

### • A6.3 REFERENCIAS

- [1] J. N. Miller, J. C. Miller, J. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* 4th Edition Prentice Hall (2001).
- [2] E. Pungor, K. Tóth, A. Hrabéczy–Páll. *Pure Appl. Chem.* **51**, 1913 (1979).