



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN SISTEMAS
CLÍNICOS Y PIROQUÍMICOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Química

PRESENTA:

Q. Prisciliano Hernández Martínez

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Dra. Ma. Yolanda Castrillejo Hernández

PACHUCA DE SOTO HGO

Mayo 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dirección

M. en C. Julio César Leines Medécigo
Director de Administración Escolar
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
PRESENTE

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al pasante del Doctorado en Química, L. en Q. Prisciliano Hernández Martínez, quien presenta el trabajo "Aplicación de técnicas electroquímicas en sistemas clínicos y piroquímicos", después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión del mismo, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal (AAQ)
SECRETARIO: Dra. María Yolanda Castrillejo Hernández (UVa-Es)
VOCAL: Dra. Verónica Salazar Pereda (AAQ)
SUPLENTE: Dr. Gian Arturo Álvarez Romero (AAQ)

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hgo., a 17 de abril 2013

Dr. Orlando Ávila Pozos
Director del ICBI
avilap@uaeh.edu.mx



Ciudad Universitaria Carretera Pachuca – Tulancingo
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184
Mineral de la Reforma, Hidalgo. México.
Tel: (771)7172000 ext. 2230, 2231



AGRADECIMIENTOS

Después de haber terminado el arduo trabajo de esta tesis me doy cuenta es gracias a cada una de las personas que me han brindado todo su apoyo y confianza. Y que este logro no es solo mío sino de todos que en algún momento me ayudaron a cumplir con este objetivo.

En primera instancia quiero agradecer a mis padres Juana Altagracia y Prisciliano por el apoyo incondicional y comprensión que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Carina, Andrés y Julián quienes me han soportado y me han brindado su apoyo moral cuando los he necesitado.

A mi asesor el Dr. José Antonio Rodríguez Ávila quien me brindo su apoyo en la realización de esta tesis y me ha soportado durante el periodo de mi doctorado.

A la Dra. Ma. Yolanda Castrillejo Hernández quien me ofreció su apoyo durante mi estancia en España y me hizo sentir como un miembro más de su gran equipo de trabajo. Y todos quienes me hicieron sentir como si estuviese en casa estando tan lejos (Rafa, Charo, Enrique, Luis, clara, patricia y bueno de mometo son los que me acuerdo pero agradezco a todos los que me brindaron su amistad)

A los Doctores Verónica Salazar Pereda, Giaan Arturo Alvares Romero y Carlos Andrés Galán Vidal quienes con sus comentarios y aportaciones se realizo las mejora de esta tesis. Así como a los

doctores del área académica de química que en algún momento me aportaron sus conocimientos.

A mis compañeros del laboratorio que con quienes compartimos muchas experiencias e hicieron más amena la estancia del doctorado y que de alguna manera participaron en la realización de este trabajo (irmita, yu, isra, iris, Karina, lupita, alida, madai, zeferin, sandra, Sandy, tere, julio, charly, Judith, evelin, nacho, Gaby, mari, Irving, Sergio y a los que de momento no me acorde).

A mis amigos que me han ofrecido buenas experiencias para pasar más amena los años que duro el doctorado y toda persona que de alguna forma a influenciado en mi vida y me ayudado en la superación de este trabajo

Jamadi



El presente trabajo se realizó en el:

Laboratorios 1 y 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Laboratorio de sales fundidas de la Universidad de Valladolid, España.

El presente trabajo se ha realizado gracias al financiamiento otorgado por los siguientes organismos:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el proyecto otorgado 178607 y la beca de posgrado otorgada a Prisciliano Hernández Martínez (CVU/Becario): 294978/227969

Ministerio de Ciencia e Innovación (España), por el proyecto CTQ2010-19912.



Los resultados del presente trabajo generaron las siguientes publicaciones:

1. P. Hernández, J. A. Rodríguez, V. Salazar, G. A. Álvarez-Romero, S. González-Montiel, Yolanda Castrillejo, Determination of glucose by flow injection analysis with amperometric detection at Fe(III)-(tris(3,5-dimethyl-1-pyrazolyl)borate)₂ modified electrodes, J. Mex. Chem. Soc. 55 (2011) 122-128.
2. Y. Castrillejo, P. Hernández, J.A. Rodríguez, M. Vegaa, E. Barrado, Electrochemistry of scandium in the eutectic LiCl–KCl, Electrochim. Acta 71 (2012) 166-172.
3. J. A. Rodríguez, P. Hernández, V. Salazar, Y. Castrillejo, E. Barrado, Amperometric biosensor for oxalate determination in urine using sequential injection analysis, Molecules 17 (2012) 8859-8871.
4. P. Hernández, J. A. Rodríguez, C. A. Galan, Y. Castrillejo, E. Barrado, Amperometric flow system for blood glucose determination using an immobilized enzyme magnetic reactor, Biosens. Bioelectron. 41 (2013) 244-248.

Índice general

<i>Índice de Figuras</i>	<i>i</i>
<i>Índice de Tablas</i>	<i>vi</i>
1. Resumen	1
2. Objetivos	5
3. Desarrollo de biosensores	7
3.1. Sensores y biosensores	9
3.1.1. Biosensores basados en enzimas	11
3.1.2. Mediadores	12
3.1.3. Inmovilización del bioreceptor	14
3.1.4. Soportes magnéticos	17
3.1.5. Aplicaciones de biosensores	18
3.2. Determinación de glucosa en suero sanguíneo	20
3.2.1. Antecedentes	21
3.2.2. Metodología	25
3.2.2.1. Reactivos y disoluciones	25
3.2.2.2. Equipos	25
3.2.2.3. Síntesis del complejo de Fe(III)-(Tp ^{Me2}) ₂	26
3.2.2.4. Modificación del electrodo	26
3.2.2.5. Síntesis del soporte magnético	27
3.2.2.6. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa	27
3.2.3. Resultados y discusión	29

3.2.3.1. Caracterización del [Fe(tris(3,5-dimetil-1-pirazolil)borato) ₂] ⁺ [FeCl ₄] ⁻	29
3.2.3.2. Caracterización del soporte magnético.	33
3.2.3.3. Determinación de glucosa mediante FIA con detección amperométrica	35
3.2.3.3.1. Optimización de las variables en la determinación de H ₂ O ₂	36
3.2.3.3.2. Parámetros analíticos del H ₂ O ₂	38
3.2.3.4. Determinación de glucosa sin inmovilizar la enzima	40
3.2.3.4.1. Optimización para la determinación de glucosa	40
3.2.3.4.2. Parámetros analíticos	42
3.2.3.4.3. Determinación de glucosa en suero sanguíneo	44
3.2.3.5. Determinación de glucosa con la enzima inmovilizada sobre el soporte magnético	44
3.2.3.5.1. Diseño del sistema de análisis de inyección en flujo	45
3.2.3.5.2. Optimización de los parámetros en la determinación de glucosa	46
3.2.3.5.3. Obtención de los parámetros analíticos del método	48
3.2.3.5.4. Análisis de muestras	50
3.3. Desarrollo de un biosensor de oxalato	51
3.3.1. Antecedentes	52
3.3.2. Metodología	56
3.3.2.1. Reactivos	56
3.3.2.2. Síntesis del complejo de [Fe(II)-Bmp]	56

3.3.2.3. Inmovilización del oxalato oxidasa	57
3.3.2.4. Diseño del sistema de inyección secuencial	58
3.3.3. Resultados y discusión	60
3.3.3.1. Comportamiento electroquímico de Fe(II)-Bmp	60
3.3.3.2. Optimización de las variables del sistema	61
3.3.3.3. Parámetros analíticos del método	65
3.3.3.4. Análisis de muestras reales	67
3.4. Conclusiones	69
3.5. Referencias	70
4. Estudio electroquímico del Sc(III) sobre electrodos de W y Al en el eutéctico LiCl-KCl	77
4.1. Introducción	78
4.2. Metodología	81
4.2.1. Reactivos utilizados	81
4.2.2. Celda de trabajo y horno	82
4.2.3. Sistema de control de emisiones al medio ambiente	83
4.2.4. Electrodos	84
4.2.5. Equipos	86
4.2.6. Propiedades Físico-Químicas del medio eutéctico LiCl-KCl	87
4.2.7. Protocolo experimental	88
4.2.7.1. Protocolo dentro de la caja de guantes	88
4.2.7.2. Procedimiento dentro de campana extractora	89

4.3. Resultados y discusión	91
4.3.1. Ventanas electroquímicas de la mezcla eutéctica sobre un electrodo inerte de Wolframio y reactivo de Aluminio	91
4.3.2. Estudio electroquímico del escandio sobre electrodos de Wolframio	93
4.3.2.1. Caracterización de los sistemas electroquímicos. Determinación del número de electrones implicados	93
4.3.2.2. Nucleación electroquímica del Sc	97
4.3.2.3. Determinación del coeficiente de difusión de los iones Sc(III). Verificación de la ley de Arrhenius	102
4.3.3. Estudio electroquímico de los iones Sc(III) sobre un electrodo reactivo de Al	105
4.3.3.1. Introducción	105
4.3.3.2. Diagrama de fases	106
4.3.3.3. Información cualitativa	106
4.3.3.4. Cronopotenciometría con circuito abierto	111
4.3.3.5. Electrólisis galvanostática	115
4.4. Conclusiones	117
4.5. Referencias	118

Índice de Figuras

Figura 3.1. Esquema generalizado de un biosensor	9
Figura 3.2. Esquema básico del funcionamiento de un biosensor	11
Figura 3.3. Esquema generalizado de los métodos de inmovilización de un bioreceptor	17
Figura 3.4. Estructura adoptada por Tp^{Me_2} y $\text{Cp}^{5\text{-Me}}$.	22
Figura 3.5. La estructura molecular de $[\text{Fe}(\text{tris}(3,5\text{-dimetil-1-pirazolil)borato})_2]^+[\text{FeCl}_4]^-$, mostrando un 50% de probabilidad en el desplazamiento de elipsoides	29
Figura 3.6. Análisis del catión ($\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{B}_2\text{N}_{12}\text{Fe}$) del complejo de hierro mediante espectroscopia de masas	31
Figura 3.7. Espectro de IR para el complejo $\text{Fe}[\text{tris}(3,5\text{-dimetil-1-pirazolil)borato})_2]^+[\text{FeCl}_4]^-$	32
Figura 3.8. Voltamperogramas cíclicos del complejo de hierro como mediador en solución acarreadora, A) sin H_2O_2 , B) 1.5, C) 3.0, D) 4.5, E) 6.0 mM H_2O_2	33
Figura 3.9. Micrografías del soporte magnético por SEM y TEM respectivamente	33
Figura 3.10. Patrones de difracción para el soporte magnético	34
Figura 3.11. Espectros IR obtenidos para el soporte magnético. a) magnetita, b) magnetita recubierta con silica gel, c) soporte magnético enzimático	35
Figura 3.12. Sistema FIA diseñado para la determinación de glucosa	36
Figura 3.13. Efecto del valor de pH sobre la señal analítica	37
Figura 3.14. Efecto del caudal de inyección sobre la señal analítica	38

Figura 3.15. Amperograma con inyecciones de 100 μ L de peróxido de hidrógeno de A) 29, B) 59, C) 88, D) 117 y E) 147 μ M. E = -0.06 V, Q = 0.5 mL min ⁻¹ y pH 7.0 (tampón fosfatos 0.1M)	39
Figura 3.16. Efecto de la longitud del reactor	42
Figura 3.17. FIAGrama obtenido del análisis glucosa A) 1.0, B) 3.0, C) 5.0, D) 7.0 y E) 9.0 mM	43
Figura 3.18. Sistema FIA diseñado para la determinación de glucosa	45
Figura 3.19. Efecto de los factores de control sobre la señal analítica de la glucosa	48
Figura 3.20. FIAGrama obtenido del análisis glucosa A) 0.5, B) 1.0, C) 2.0, D) 4.0 y E) 6.0 mM	49
Figura 3.21. Representación del modo de coordinación de los ligantes escorpionato	54
Figura 3.22. Diagrama del análisis elemental del complejo de hierro obtenido	57
Figura 3.23. Diagrama del sistema de SIA usado para la determinación de oxalato. Jeringa (J), Disolución acarreadora (DA), Reactor de carga (RA), Válvula de selección (V), Muestra (M), Suspensión magnética dopada con enzima (SM), Reactor de mezcla (RB), Detector (D), Desechos (DH), Electrodo Auxiliar (EA), Electrodo de referencia (ER), Electrodo de trabajo (ET), Imán de neodimio (N)	59
Figura 3.24. Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado con Fe-Bmp	59
Figura 3.25. Esquema de reacciones para la determinación redox de oxalatos	62
Figura 3.26. Efectos de la interacción de factores de control sobre la señal analítica (μ A)	65

Figura 3.27. Línea de calibrado en un intervalo de concentración de oxalatos de 5.0-50.0 mg L ⁻¹	66
Figura 4.1. Caja de guantes mBraun Labstar 50	81
Figura 4.2. Celda de trabajo y Tapa superior de la celda	82
Figura 4.3. A) Horno TANER y celda de trabajo B) Esquema del montaje experimental	83
Figura 4.4. Sistema regulador de la temperatura West 3300	83
Figura 4.5. Circuito utilizado en la salida de gases	84
Figura 4.6. Electrodo utilizados durante la experimentación	86
Figura 4.7. Potenciostatos y equipo informático	87
Fig 4.8. Diagrama de fases de las mezclas LiCl-KCl	87
Figura 4.9. A) Pesada de la mezcla salina. B) Introducción del crisol en la celda	89
Figura 4.10. Esquema del montaje experimental seguido en el protocolo	90
Figura 4.11. Ventanas electroquímicas registradas en el eutéctico LiCl-KCl a 723 °K sobre (i) un electrodo inerte de W y (ii) un electrodo reactivo de Al	92
Figura 4.12. Voltamperogramas obtenidos a 200 mV s ⁻¹ sobre W a distintos potenciales de inversión y a 723 °K con una disolución de Sc (III)	94
Figura 4.13. A) Cronopotenciograma y B) cronopotenciograma con inversión del sentido de la corriente obtenidos con una disolución de Sc(III) a 723 °K	95
Figura 4.14. Voltamperometría de onda cuadrada de reducción de Sc(III) (1.24x10 ⁻⁴ mol cm ⁻³) sobre un electrodo de W en el eutéctico LiCl-KCl a 723 °K, frecuencia 30 Hz	96

Figura 4.15. Voltamperograma ilustrando el cruce debido a la nucleación. Eeq corresponde al potencial de equilibrio adoptado por un depósito de Sc sumergido en la disolución.	98
Figura 4.16. (a) Curvas i-t obtenidos con una disolución de ScCl ₃ (1.18×10 ⁻⁴ mol cm ⁻³) a 773 °K y a varios potenciales a 723 °K. (b) Evolución de i frente a t ^{1/2} a partir de la parte creciente de los cronoamperogramas de la Figura 4.16a	100
Figura 4.17. Comparación de las curvas adimensionales obtenidas a partir de las i-t experimentales con los modelos para (1) nucleación instantánea y (2) nucleación progresiva a diferentes temperaturas	102
Figura 4.18. (a) Chronopotenciogramas obtenidos con una disolución de ScCl ₃ a varias alturas de inmersión del electrodo de trabajo (W), (b) Relación entre la raíz cuadrada del tiempo de transición y el incremento de superficie activa.	104
Figura 4.19. Variación del coeficiente de difusión de Sc(III) con la temperatura en el eutéctico LiCl-KCl. Verificación de la ley de Arrhenius	105
Figura 4.20. Diagrama de fases del sistema Sc-Al	107
Figura 4.21. Voltamperometría obtenido sobre W a 723 °K con una disolución de AlCl ₃ 0.034 mol kg ⁻¹ . Voltamperogramas obtenidos con una disolución de ScCl ₃ a 723 °K sobre W, y un hilo de Aluminio	109
Figura 4.22. Voltamperogramas obtenidos sobre W a 723 °K: (A) con una disolución de AlCl ₃ 0.034 mol kg ⁻¹ . (B) con una disolución de ScCl ₃ a 723 °K sobre W. (C) con una disolución de AlCl ₃ y ScCl ₃	110
Figura 4.23. Cronopotenciograma en circuito abierto sobre un electrodo de Al después de la electrodeposición de Sc metálico: (1Al) -2.4 V durante 60 s, (2Al) -2.2 V durante 90 s, y electrodeposición conjunta de Sc y Al sobre un electrodo de W: (1W) -2.1 V durante 30 s, (2W) -2.3 V durante 60 s, (3W) -2.3 V durante 300 s. a 723 °K	112

Figura 4.24. Cronopotenciogramas en circuito abierto. Potencial de deposición -2.2 vs (Ag(I)/Ag)/V tiempo de electrodeposición, t_d , 30 s y 20 s. Curva negra potencial de equilibrio adoptado por un electrodeposito de Sc sumergido en la disolución de Sc(III)	113
Figura 4.25. Difractograma del depósito obtenido bajo condiciones de intensidad de corriente. $i_{aplicado} = -50$ mA durante 50 minutos	115
Figura 4.26. Difractograma del depósito obtenido bajo condiciones de intensidad de corriente. $E_{aplicado} = -1.80$ vs (Ag(I)/Ag)/V durante 30 minutos	116
Figura 4.27. Imagen del SEM de un electrodepósito Sc-Al obtenido mediante electrolisis amperométrica (-50 mA durante 50 minutos)	116

Índice de Tablas

Tabla 3.1. Algunos mediadores con su potencial de trabajo	13
Tabla 3.2. Ejemplos de algunas aplicaciones de biosensores en muestras reales	19
Tabla 3.3. Datos cristalográficos para $\text{Fe}[\text{tris}(3,5\text{-dimetil-1-pirazolil)borato})_2]^+[\text{FeCl}_4]^-$	29
Tabla 3.4. Parámetros geométricos del complejo de hierro	30
Tabla 3.5. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, i (μA) versus $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM)	39
Tabla 3.6. Niveles de los factores a optimizar	40
Tabla 3.7. Combinación de niveles y resultados de los mismos	41
Tabla 3.8. Factores F obtenidos a partir del diseño factorial utilizado, $F_{\text{critico}} = 7.571$	41
Tabla 3.9. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, i (μA) versus $[\text{glucosa}]$ (mM)	43
Tabla 3.10. Contenido promedio ($n=3$) de glucosa en suero sanguíneo mediante la metodología de referencia y la propuesta	44
Tabla 3.11. Datos del diseño taguchi y resultados experimentales de cada análisis	47
Tabla 3.12. Resultados del análisis ANOVA para el % de influencia de corriente ($n\text{A}$)	47
Tabla 3.13. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, i ($n\text{A}$) vs $[\text{glucosa}]$ (mM)	49
Tabla 3.14. Datos obtenidos por el método propuesto y por la metodología oficial	50

Tabla 3.15. $L_9(3^4)$ Matriz ortogonal y resultados promedio obtenidos para cada experimento	63
Tabla 3.16. Análisis de la varianza de cada intensidad de corriente de la Tabla anterior	64
Tabla 3.17. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, altura de pico (μA) vs [oxalato] (mg L^{-1})	66
Tabla 3.18. Concentraciones de oxalato en orina (mg L^{-1} , media \pm intervalo de confianza) en personas sanas mediante la metodología SIA y por espectroscopía	68
Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas de la mezcla eutéctica LiCl-KCl	88
Tabla 4.2. Valores termodinámicos de la ventana electroquímica accesible en el eutéctico LiCl-KCl a 723 °K	92
Tabla 4.3. Propiedades termodinámicas de Sc en los compuestos intermetálicos Sc-Al a 723 °K	114
Tabla 4.4. Energías de formación de Gibbs de compuestos intermetálicos Sc-Al	114

1. RESUMEN

1. Resumen

Las técnicas electroquímicas comprenden procesos químicos asociados con la separación de las cargas eléctricas (ánodo y cátodo). Ésta separación es aprovechada para llevar a cabo reacciones electroquímicas sobre la superficie de los electrodos en una disolución homogénea o heterogénea, en donde uno de los electrodos es quien aporta electrones, mientras el otro los acepta. A este fenómeno se le conoce como transferencia de electrones.

Las metodologías analíticas que aprovechan éstos procesos se basan en la medida de la variación de la magnitud eléctrica básica como son: intensidad de corriente, potencial, resistencia (o conductividad) y carga. Cuando se varía sólo una propiedad eléctrica y se fijan las otras variables eléctricas se generan diferentes técnicas de análisis que permiten obtener información útil del sistema de estudio. La medición de las distintas propiedades eléctricas se le han encontrado una amplia gama de aplicaciones, las cuales comprenden diferentes fenómenos (electroforesis y corrosión), su aplicación en dispositivos (equipos electrocrómicos, sensores electroanalíticos, baterías y celdas de combustible) y desarrollo de tecnologías (electroplatinado de metales y la producción a gran escala del aluminio y cloro). Dentro de estos procesos cabe mencionar el monitoreo ambiental, control de calidad en la industria y análisis biomédicos. En la industria los procesos electroquímicos de mayor interés son la obtención de Al metálico y el refinamiento de cobre, arsénico y oro.

La mayoría de las medidas electroquímicas son sistemas que se encuentran en disoluciones homogéneas. Por consecuencia el estudio de las propiedades de dichas disoluciones con electrólitos y los fenómenos que ocurren en los electrodos sumergidos, se realizan en la interfase del electrodo (conductor eléctrico) y el electrolito (conductor iónico). Todas las reacciones electroquímicas se llevan a cabo en la región interfacial entre el electrodo y la disolución, la cual se forma cuando dos fases entran en contacto formándose la llamada doble capa de Helmholtz. Todos los procesos electroquímicos se pueden concentrar en dos grandes grupos que son procesos potencioestáticos y galvanostáticos, en ambos

procesos se involucran al menos dos electrodos y una disolución conductora lo que constituye la celda electroquímica.

El presente trabajo está dividido en dos secciones, la primera se centra en el desarrollo de metodologías de análisis para la determinación de glucosa y ácido oxálico en muestras biológicas a través de la modificación del electrodo de trabajo. Posteriormente en una nueva etapa se evalúa el uso de sales fundidas como electrolito soporte para caracterizar el comportamiento electroquímico del Sc(III).

Usualmente se le da un mayor interés a las propiedades físicas y químicas del electrodo en comparación con el electrolito de la disolución, esto se debe a que dependiendo del tipo de material y las modificaciones que se le hagan al mismo, se afecta directamente las características de análisis hacia un analito en particular que se desee determinar. Aún en la actualidad se continúa buscando nuevos materiales para la fabricación de los electrodos, así como la modificación de los mismos que permitan la mejora de las condiciones de análisis. Este hecho ha favorecido el desarrollo de nuevas metodologías de análisis.

Enfocándonos en el sentido de análisis clínicos nos centraremos en la mejora de la superficie de los electrodos, mediante la incorporación de complejos metálicos y de partículas magnéticas modificadas en el desarrollo de biosensores. Los agentes de reconocimiento son enzimas del tipo oxidasa. La determinación de los analitos se realiza de manera indirecta a través de la detección del H_2O_2 producido, lo que requiere del uso de mediadores que permitan la disminución del potencial de trabajo. En este sentido, se plantea la síntesis de complejos metálicos de hierro para su utilización como mediadores en biosensores.

En ésta misma etapa, se sintetizan partículas magnéticas modificadas con la finalidad de inmovilizar las enzimas sobre la superficie del sólido. Los soportes magnéticos permiten llevar a cabo la reacción enzimática en diversos puntos de sistemas de flujo a través de la retención parcial mediante la aplicación de un campo magnético externo.

A pesar de que se le ha dado una mayor importancia a las características de los electrodos, no se debe descuidar el tipo de electrolito que se utiliza en el sistema electroquímico, debido a que es el que aporta las propiedades de transporte del analito, además de que determina la ventana electroquímica de trabajo. A pesar de que la mayoría de los sistemas electroquímicos son evaluados en disoluciones acuosas, existen una amplia gama de líquidos que pueden ser utilizados como electrolitos soportes, por ejemplo: compuestos orgánicos, inorgánicos e incluso polímeros.

Durante la segunda etapa se realiza la caracterización electroquímica de Sc(III) en el eutéctico de KCl-LiCl. Este electrolito soporte se ha descrito como un medio de reacción adecuado para llevar a cabo solubilizaciones y/o precipitaciones selectivas, y su utilización constituye una ruta prometedora para el tratamiento de materias primas. Por otra parte, los procesos electroquímicos (electrodeposición, electrorefinado, electroplatinado y galvanoplastia) en sales fundidas han demostrado ser más ventajosos que sus análogos en disolución acuosa debido a las mayores eficacias de la electrolisis, menor consumo energético, elevadas velocidades de electrodeposición y mejores características de los depósitos.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Objetivo general:

Aplicar técnicas electroquímicas en sistemas clínicos y piroquímicos, que permitan la determinación de sustancias de interés médico y la obtención de datos termodinámicos en medios acuosos y no acuosos.

Objetivos específicos:

1. Sintetizar, caracterizar y evaluar complejos de Fe(II) y Fe(III) para su posterior utilización como mediador en la cuantificación de glucosa y del ion oxalato en muestras biológicas.
2. Sintetizar, caracterizar y aplicar partículas magnéticas modificadas como soportes para la inmovilización de enzimas en sistemas de flujo.
3. Evaluar el comportamiento electroquímico de Sc(III) en el eutéctico LiCl-KCl, sobre electrodos de W y Al, mediante diferentes técnicas electroquímicas.

3. DESARROLLO DE BIOSENSORES

3. DESARROLLO DE BIOSENSORES

Desde la antigüedad se han logrado identificar diferentes enfermedades de acuerdo al tipo de síntoma que llegue a tener el paciente, en estos casos se tomaban en consideración las características físicas como el color, sabor, olor y consistencia de la sangre, orina o heces del paciente; sin embargo, no se tenía la certeza de un buen diagnóstico médico dando falsos positivos ó falsos negativos [1]. En la actualidad existen innumerables metodologías para el diagnóstico y tratamiento de cada tipo de padecimiento, desde métodos visuales hasta los instrumentales más sofisticados, con mínimo de manipulación de la muestra.

En un sentido estricto, los análisis clínicos tienen la función de ayudar a diagnosticar el tratamiento de una enfermedad en específico, como puede ser la diabetes, cálculos renales, arterosclerosis, entre otros. Estos análisis en algunos casos deben de realizarse rutinariamente, por lo que deben ser rentables, debido a que si son demasiado caros, los médicos y las compañías de seguros pueden juzgar que la información obtenida al hacer la prueba, no justifican el costo de análisis [2]. Por lo tanto, en la actualidad se busca simplificar las metodologías existentes, para reducir costos de los mismos. Los análisis electroquímicos son altamente repetitivos y requieren equipos asequibles, donde destaca el desarrollo de glucómetros.

El uso de la electroquímica abarca una amplia gama de aplicaciones que van desde su uso en informática, entretenimiento, análisis médicos, hasta en la industria automotriz, esto es gracias a que los procesos electroquímicos pueden aplicar la nanotecnología y lograr miniaturizar los procesos, y por ende reducir los costos del procedimiento [3].

Los sistemas electroquímicos que se encuentran compuestos de algún material biológico de reconocimiento, se les conoce como biosensor, y dentro de sus principales aplicaciones se encuentran los análisis biomédicos. Es por ello que como parte del presente trabajo se enfoca en la mejora de biosensores por lo que a continuación se detalla el concepto y el funcionamiento de los mismos.

3.1. Sensores y biosensores

Los sensores biológicos (biosensores) han sido utilizados ampliamente como una alternativa para disminuir la cantidad de reactivos necesarios para un análisis, dando lugar a algunas estrategias como la inmovilización de reactivos, lo que ha permitido su aplicación al análisis de diversos analitos como por ejemplo glucosa, urea y colesterol principalmente [4-6].

El funcionamiento de estos dispositivos se basa en el reconocimiento de un analito en particular, mediante la utilización de un compuesto biológicamente activo también llamado bioreceptor (enzima, tejido, célula o ácido nucleico), el cual se inmoviliza sobre la superficie de un dispositivo denominado transductor que permite medir la alteración producida por el bioreceptor y convertirla en una señal eléctrica. En la Figura 3.1 se muestra el esquema generalizado de un biosensor, donde el sistema de reconocimiento está inmovilizado sobre la superficie del transductor.

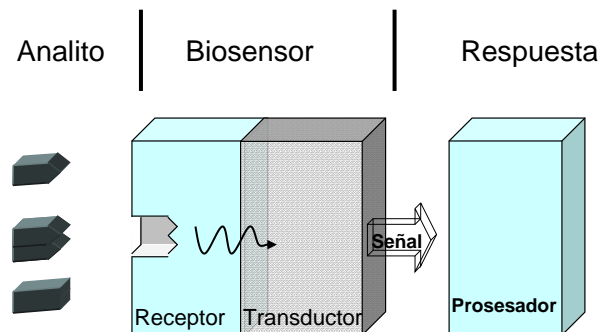


Figura 3.1. Esquema generalizado de un biosensor

En lo que respecta a la clasificación de los biosensores pueden emplearse dos puntos de vista diferentes. Una de las clasificaciones más aceptadas se relaciona al tipo de transductor que se utiliza para el análisis de las muestras, de las cuales se derivan cuatro grupos que son [7]:

- a) Ópticos: transforma los cambios ópticos por la interacción de un analito con el receptor

- b) Electroquímicos: la señal es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.
- c) Piezoeléctrico: estos son capaces de transformar un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales de propiedades piezoeléctricas.
- d) Térmicos: dispositivos capacitados para medir el cambio de calor sobre la superficie del electrodo.

La segunda clasificación también aceptada es aquella basada en la naturaleza del proceso biológico, en donde se pueden distinguir dos grandes grupos:

- a) Biosensores catalíticos: cuyos receptores pueden ser enzimas, tejidos o microorganismos.
- b) Biosensores de afinidad: en estos se encuentran los del tipo de inmunosensores basados en quimiorreceptores y fragmentos de DNA.

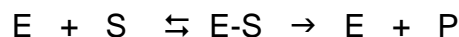
Las características más importantes de estos dispositivos, que los convierten en opciones altamente competitivas en el mercado actual en comparación con otras tecnologías son: su especificidad, alta sensibilidad, requieren un tiempo corto de análisis, facilidad de automatización y bajo costo. Dentro de estas clasificaciones cabe destacar los biosensores electroquímicos que han cobrado gran interés en los últimos años, debido a las ventajas adicionales que estos proporcionan como son [8]:

- a) Las medidas electroquímicas pueden llevarse a cabo en volúmenes pequeños de muestra con gran facilidad.
- b) Suelen ser muy adecuados para la monitorización *in vivo*.
- c) Los límites cuantificación son aptos para la determinación de muchos analitos de interés

Existen distintas modalidades para los biosensores electroquímicos de acuerdo al tipo de técnica electroquímica utilizada para obtener información de la muestra: conductimétricos, potenciométricos y amperométricos. Siendo los dos últimos los más utilizados en la determinación de varias especies, de interés biomédico principalmente.

3.1.1. Biosensores basados en enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores selectivos en una reacción química [9]. Además de acelerar la reacción o incluso inducir reacciones que serían imposibles en ausencia de la enzima, presentan la ventaja de que en ocasiones se produce la renovación de la enzima cuando se genera el producto de reacción, y que está de acuerdo con el mecanismo general de una reacción enzimática:



Donde S es el sustrato, E la enzima, E-S complejo enzima sustrato y P el producto. En la Figura 3.2 se muestran los componentes principales de un biosensor enzimático, en donde inicialmente el analito contenido en la muestra difunde a través de la membrana (u otra barrera en caso de que exista), entrando en contacto con el sitio activo de la enzima, para generar un producto con propiedades electroquímicas, el cual puede ser determinado mediante alguna técnicas electroquímicas.

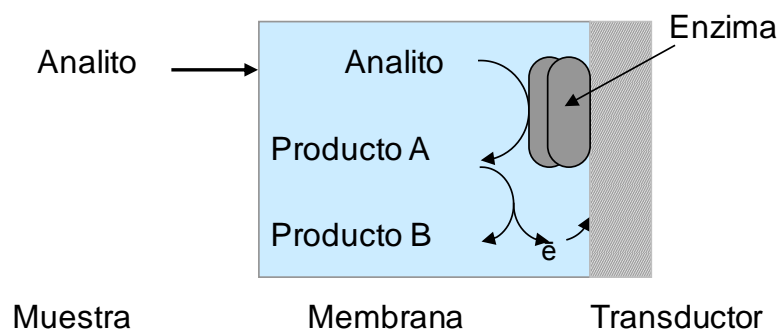


Figura 3.2. Esquema básico del funcionamiento de un biosensor

Durante el desarrollo de los biosensores electroquímicos, se han obtenido tres diferentes generaciones [9]:

- Primera generación: Este tipo de biosensor se basa en la medida de uno de los productos o un cofactor. En el caso de biosensores amperométricos éstos presentan el inconveniente de necesitar potenciales de detección elevados, lo que puede provocar que se puedan oxidar o reducir otros componentes presentes en las muestras, generando interferencia en el análisis. La estrategia más recurrida para minimizar este problema es el uso de mediadores lo que dio lugar a la siguiente generación.
- Segunda generación: Estos biosensores incorporan un mediador realizando una mejora en la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo, minimizan la interferencia debido a que los potenciales redox adecuados de los mediadores son cercanos a cero.
- Tercera generación: En este caso la transferencia de electrones del centro activo y la superficie del electrodo es directa; Ello depende de la construcción del biosensor y de que la enzima no tenga su centro activo en su interior, este debe estar disponible para un contacto directo.

Los sensores de segunda generación son los más utilizados debido a que ofrecen una menor interferencia y su construcción es más sencilla. La característica principal de éste tipo de dispositivos es el uso de mediadores, los cuales se describen a continuación.

3.1.2. Mediadores

Los mediadores son agentes de transferencia artificial de electrones y suelen participar en la reacción redox. La mayor parte de estos compuesto son de bajo peso molecular con la finalidad de poder acoplarse entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo de trabajo.

Un buen mediador debe ser estable a las condiciones de la reacción enzimática y no debe participar en reacciones laterales durante proceso redox. Debe de seleccionarse de tal manera que su potencial de oxidación sea más bajo que del analito (La voltamperometría cíclica es una técnica útil para estudiar las propiedades de un mediador y permite seleccionar aquel que proporcione las mejores características).

El uso de mediadores permite que las medidas sean independientes de la concentración de oxígeno, además de que permiten disminuir el potencial de trabajo disminuyendo las interferencias producidas por otras especies [10].

Los mediadores más utilizados con enzimas de tipo oxidasa son: el ferroceno y sus derivados, tetracianoquinodimetano, quinonas, tetratiofulvaleno y ferri/ferrocianuro. La Tabla 3.1 muestra algunos de los mediadores utilizados con su potencial de trabajo. Recientemente se han sintetizado receptores que tienen como base complejos metálicos de bipyridinas con Ru(II), los cuales son útiles en biosensores de glucosa basados en glucosa oxidasa [11].

Tabla 3.1. Algunos mediadores con su potencial de trabajo [10, 11]

Mediador	E (V vs SCE) trabajo
1,1-dimetil ferroceno	0.100
Ferroceno	0.165
Vinil ferroceno	0.250
Hidroximetil ferroceno	0.185
$[\text{Ru}(\text{CN})_6]^{4-}$	0.685
Benzoquinona	0.039
$\text{cis-}[\text{Ru}(\text{II})(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{-X})(\text{LL})(\text{py})_2]\text{PF}_6$	0.250
Tetratiofulvaleno	0.300
Tetracianoquinodimetano	0.127
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	0.180
Hidroxiquinona	0.060

En la determinación directa del H_2O_2 mediante detección amperométrica se tiene que aplicar un potencial alrededor de 1.5 V (vs Ag/AgCl), donde se pueden oxidar múltiples compuestos como son el oxígeno y el cloro presentes en varias muestras. El uso de mediadores como el ferroceno permite que la oxidación tenga lugar a un potencial entre -0.3 a +0.3 V (vs Ag/AgCl), minimizando así la interferencia que se pudiese encontrar en las muestras reales [12].

3.1.3. Inmovilización del bioreceptor

El concepto de biosensor implica que el elemento de reconocimiento biológico genere productos de reacción que sean detectables por el transductor. Es deseable que los materiales biológicos estén inmovilizados en alguna superficie que permita su aplicación continua. En este sentido, existe una variedad de procesos de inmovilización, los cuales deben de cumplir con algunos requisitos para una eficiente inmovilización: a) conservación de la actividad y de la selectividad de la biomolécula; b) conservación o incremento de la estabilidad de la biomolécula durante la utilización, reutilización y almacenamiento del biosensor; c) conservación de la superficie activa del biosensor; d) reproducibilidad y simplicidad de los métodos de inmovilización, para poder fabricar los biosensores en serie. Existen diferentes tipos de inmovilizaciones de acuerdo al tipo de interacción que exista entre el soporte y el compuesto biológico [13, 14]:

Adsorción física: la adsorción de biomoléculas sobre los transductores es el procedimiento más simple y menos agresivo para inmovilizar. No son necesarios reactivos especiales y los materiales biológicos adsorbidos prácticamente guardan su actividad intacta. Sin embargo, la adsorción no es muy reproducible ni estable y los biosensores suelen presentar problemas de pérdida de sensibilidad con el uso, debido al desprendimiento del material biológico inmovilizado.

Las proteínas (enzimas y anticuerpos) y los ácidos nucleicos se adsorben bien sobre distintos materiales, vía fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, etc. Dichas fuerzas son

reversibles y se interrumpen fácilmente con cambios de pH, temperatura, y fuerza iónica. Un exceso de material proteico puede formar múltiples capas y bloquear la superficie del transductor. De hecho la inmovilización por adsorción se reserva para trabajos exploratorios.

Entrecruzamiento: se puede conseguir una estabilización adicional de las proteínas adsorbidas sobre los transductores mediante el enlace intermolecular con reactivos bifuncionales de entrecruzamiento (crosslinking), tales como glutaraldehído, diisocianato de hexametileno, etc. El entrecruzamiento puede alterar los centros activos de la enzima, por esto es aconsejable mezclarla con una proteína no activa, como la albúmina de suero bovino (BSA), para que ambas se entrecrucen y se repartan el efecto indeseable del agente bifuncional, preservándose más la actividad enzimática. Aunque se puede controlar el grado de entrecruzamiento con la cantidad de agente bifuncional utilizado, la capa resultante de material inmovilizado introduce restricciones en la difusión de los sustratos, que pueden ser moduladas para extender el intervalo de respuesta del biosensor. Este es un método simple para inmovilizar biomoléculas, especialmente enzimas, pero altera la actividad biológica e introduce barreras difusionales a los sustratos.

Atrapamiento: La inmovilización de biomoléculas mediante su atrapamiento físico en matrices de geles como poliacrilamida, goma de silicona o gelatina, por ejemplo, es un método que preserva la actividad biológica. El polímero más utilizado es la poliacrilamida, preparado por copolimerización de acrilamida con N,N'-metilenbisacrilamida. La polimerización, en presencia del material biológico, se puede llevar a cabo bajo radiación UV en presencia de vitamina B1 como fotosensibilizador.

Los métodos de atrapamiento son utilizados porque preservan la actividad biológica, pero no retienen bien a la biomolécula e introducen barreras difusionales, limitando el transporte del sustrato y alargando la respuesta del biosensor.

Retención con membranas: el uso de membranas semipermeables de varias porosidades permite retener sobre el transductor el material biológico, dejando permear el substrato más o menos libremente. Así por ejemplo, las membranas de acetato de celulosa (membrana de diálisis) retienen a las proteínas y retardan la difusión de algunos iones interferentes, las de policarbonato son microporosas, las de teflón son permeables a gases, las de nafión ($C_7HF_{13}O_5S \cdot C_2F_4$) excluyen aniones, etc. Las membranas de polímeros conductores se pueden considerar por analogía permeables a electrones.

La utilización de membranas permite un buen contacto entre el material biológico y el transductor. Es un método muy adaptable que preserva las propiedades del material biológico, limitando la contaminación y la biodegradación. Una membrana suele ser estable a los cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, composición del medio y no existe necesidad de reactivos de ningún tipo

Unión covalente: este tipo de enlace químico de una biomolécula hacia el transductor proporciona superficies sensoras muy estables a los cambios de pH, temperatura y fuerza iónica. Este tipo de inmovilización no es trivial y tolera el uso de procedimientos tediosos y de difícil reproducibilidad. Normalmente se parte de la activación de grupos funcionales en la superficie sensible del transductor (carbono, platino o sílice) para posteriormente, mediante agentes bifuncionales (como el glutaraldehído), poder unir covalentemente la proteína, a través de grupos funcionales ($-NH_2$, $-COOH$, $-OH$ ó $-SH$), los cuales no han de ser esenciales para la acción catalítica o el reconocimiento por afinidad. Muchas veces, el enlace covalente daña la actividad biológica.

Este método de inmovilización disminuye la actividad biológica, pero permite obtener superficies estables modificadas biológicamente, que proporcionan tiempos de vida mayores.

En la Figura 3.3 se muestran las diferentes metodologías de inmovilización de las enzimas.

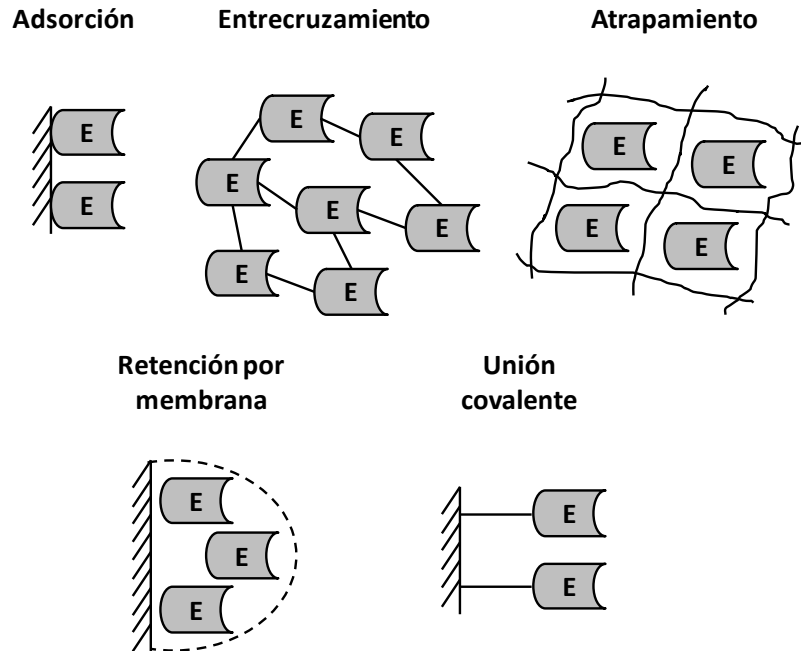


Figura 3.3. Esquema generalizado de los métodos de inmovilización de un bioreceptor

3.1.2.4. Soportes magnéticos

Cuando los sólidos paramagnéticos se colocan en un campo magnético son atraídas hacia este y son retenidas mientras el campo magnético permanezca. Por lo tanto a estas partículas magnéticas se les han encontrado varias aplicaciones como herramienta para el uso biomédico, principalmente como soporte para la inmovilización de compuestos biológicos (enzimas, células, anticuerpos entre otros) [15].

La parte magnética generalmente es de mayor volumen en comparación con el modificante (en general es un polímero). La parte que aporta características deseables de estas partículas hacia un compuesto biológico en específico es el tipo de modificación que se realice sobre las mismas, y puede ser altamente específica dependiendo del tipo de modificación.

Existen diferentes partículas magnéticas comerciales, generalmente compuestas por micropartículas de óxido de hierro recubiertas con grupos silano o con capas

de poliestireno, para la subsecuente funcionalización con un biocomponente para lograr la inmovilización del compuesto biológico. De esta manera se ha logrado el reconocimiento de una gran variedad de analitos.

Su aceptación se debe a las ventajas que ofrecen las partículas magnéticas como son: una buena biocompatibilidad, son altamente paramagnéticas, tienen baja toxicidad hacia el elemento biológico y el proceso de preparación es sencillo. En un sistema en flujo se puede colocar fácilmente en cualquier punto del mismo. Y la retención del elemento de reconocimiento es mayor en comparación con otros soportes [16].

3.1.4. Aplicaciones de biosensores

Actualmente se pueden analizar más de 80 sustancias utilizando biosensores, normalmente metabolitos de bajo peso molecular [9]. Si bien los biosensores se aplican en diferentes sectores de la industria, el sector clínico es donde son más utilizados, debido a su simplicidad, análisis eficiente, repetitividad y bajo coste de esta metodología.

Dentro de sus aplicaciones destaca es el análisis de glucosa en sangre y suero sanguíneo, lo que ha permitido mejorar el control de la diabetes. También se aplican estos dispositivos a la detección o cuantificación de otros analitos que incluyen: colesterol, glutamato, catecolaminas, antígenos de cáncer, dopamina, gonadotropina, coriónica. La Tabla 3.2 presenta algunas de las aplicaciones de los biosensores en muestras reales que utilizan enzimas del tipo oxidasa [17].

Tabla 3.2. Ejemplos de algunas aplicaciones de biosensores en muestras reales.

Analito	Enzima
Glucosa	Glucosa oxidasa
Aminoácidos	D-Amino ácido oxidasa
Etanol	Alcohol oxidasa
Colesterol	Colesterol oxidasa
Ácido úrico	Uricasa
Ácido oxálico	Oxalato oxidasa

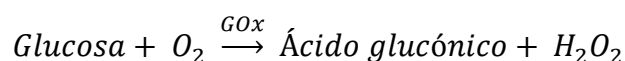
**3.2. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO
SANGUÍNEO**

3.2.1. Antecedentes

La glucosa es la principal fuente de energía del organismo humano y prácticamente la única fuente de energía para las funciones del cerebro. Cualquier desequilibrio en la concentración de este compuesto en la sangre causa diversos trastornos metabólicos. Por ello es de vital importancia que la concentración de este compuesto se mantenga en un determinado intervalo de disponibilidad en sangre [18, 19].

La cuantificación de glucosa en suero sanguíneo ha incrementado el interés clínico en los últimos años. En el caso especial de México el interés se relaciona debido a que ocupa el primer lugar en obesidad a nivel mundial (de acuerdo a la OMS) lo que repercute directamente en la prevención y tratamiento de la diabetes principalmente [20]. Esta enfermedad es el principal padecimiento cuando se tiene obesidad y se tiene un mayor gasto médico a nivel nacional. Una forma de controlar la diabetes es mediante el monitoreo constante de los niveles de glucosa en sangre del paciente [21].

Debido a la importancia en la cuantificación de glucosa se han diseñado varias metodologías de análisis como son: técnicas espectrofotométricas [22], de fluorescencia [23], quimioluminiscencia [24], y métodos electroquímicos [25]. Uno de los métodos más utilizados para la determinación de glucosa es el análisis electroquímico, debido a que utiliza equipos accesibles, no requiere personal especializado y el consumo de reactivos es mínimo. La mayoría de técnicas de cuantificación de glucosa se basan en la utilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx) de acuerdo a la siguiente reacción:



Así, la concentración de glucosa es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno generado en esta reacción. La principal desventaja que presenta la determinación amperométrica de H_2O_2 es la utilización de potenciales de trabajo relativamente altos, produciéndose la oxidación de otros productos presentes en la muestra sobre la superficie del biosensor, lo que trae como

resultado una baja precisión de los resultados y un corto tiempo de vida del electrodo. Para resolver esta desventaja se utilizan mediadores, los cuales son agentes de transferencia artificial que permiten disminuir el potencial de detección, por lo que la interferencia producida por otros compuestos presentes en la muestra es mínima. Varios trabajos han reportado diferentes complejos metálicos como mediadores en los que cabe destacar los complejos metálicos principalmente de ferricianuro y ferroceno [10], sin embargo se continúa la búsqueda de compuestos que presenten características similares para ser utilizados como mediadores, reduciendo principalmente el tratamiento de muestra y como resultado se minimizan también los costos por análisis.

Un buen mediador redox debe cumplir con ciertas características como son: a) debe ser capaz de reaccionar rápidamente con la enzima reducida, b) debe presentar una cinética reversible heterogénea, c) el potencial de regeneración del mediador debe ser bajo y d) deben ser estables la forma oxidada y reducida [26]. El tris(3,5-dimetilpirazolil) borato (Tp^{Me_2}) es un ligante que forma complejos con metales de transición, a los que se le han encontrado una amplia aplicación en diversas áreas de la química. A menudo el Tp^{Me_2} es comparado con el $\text{Cp}^{5\text{-Me}}$ debido a sus similitudes entre ellos, las cuales se muestran en la Figura 3.4 [27].

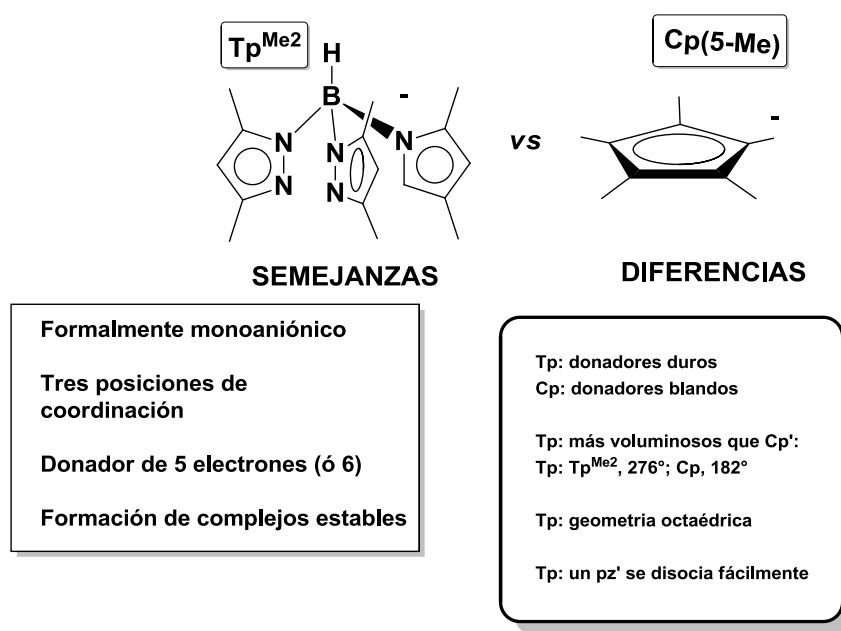


Figura 3.4. Análisis comparativo de Tp^{Me_2} y $\text{Cp}^{5\text{-Me}}$ [27]

Estos complejos no han sido utilizados como mediadores, pero se han reportado trabajos donde se aplican como ionóforos en electrodos selectivos de iones [28, 29].

En otro sentido para la disminución de reactivos una de las principales estrategias es la inmovilización de enzimas, ya que permite la reutilización del compuesto biológico, causando que el costo por análisis sea asequible. En este sentido las partículas magnéticas han tenido un incremento en su utilización como soporte para la inmovilización de enzimas. La principal ventaja es que es fácil aislarlas del medio de trabajo y son altamente específicas dependiendo del tipo de modificación. Además de que las nanoestructuras magnéticas permiten una inmovilización eficiente de la enzima sin afectar significativamente su estructura tridimensional y por consecuencia no es afectada la actividad enzimática [14]. Esta tecnología se ha utilizado en biosensores compuestos de tirosinasa [30] y glucosa oxidasa [16].

La creciente demanda en análisis clínicos en los últimos años, principalmente a causa del incremento de pacientes con diabetes, ha permitido el desarrollo de sistemas de análisis de glucosa semi-automatizados y automatizados, reduciendo el tiempo de análisis sin afectar la precisión y exactitud [23]. El análisis por inyección en flujo (FIA) es una técnica semi-automatizada con múltiples aplicaciones para el análisis cuantitativo, por ser una técnica sencilla y de bajo costo. El acoplamiento a sistemas de detección amperométricos se ve limitada por el tiempo de vida del electrodo [31].

Por otra parte la ventaja principal que presenta la combinación de las partículas magnéticas y los sistemas de flujo, es que las partículas magnéticas pueden colocarse en diferentes secciones dentro del flujo previo a la detección del H_2O_2 , el cual es producido a partir de la glucosa y la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en el soporte magnético que es colocado en un reactor. La combinación de sistemas de flujo y el reactor basados en partículas magnéticas permite una renovación fácil del elemento de reconocimiento [32].

En el presente capítulo, se describen tres puntos críticos para la determinación amperométrica de glucosa utilizando sistemas FIA. El primero es la síntesis y caracterización de un complejo de $\text{Fe(III)[tris(3,5-dimetilpirazolil)borato]}_2^+$ usado para la modificación de electrodos, este complejo se aplicó como mediador para la determinación amperométrica de H_2O_2 acoplada a un sistema en flujo. El segundo punto es la aplicación de un sistema en flujo con la enzima en solución para la determinación amperométrica de glucosa, así como la determinación de glucosa en muestras de suero sanguíneo. El tercer punto describe la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en un soporte magnético y su aplicación en un sistema en flujo para la determinación de glucosa mediante amperometría. El soporte magnético fue previamente sintetizado y caracterizado para lograr una eficiente inmovilización de la enzima y se colocó en una minicolumna previa al detector.

3.2.2. Metodología

3.2.2.1. Reactivos y disoluciones

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada con una resistividad no menor a 18 M Ω cm. Las disoluciones estándar de glucosa y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se prepararon diariamente a partir de disoluciones patrón de concentración 100 mM y 2.5 M respectivamente.

La glucosa oxidasa (216 U/mg, 28 mg/mL), glutaraldehído (al 25% de pureza), bromuro de cetiltrimetilamonio, triton X-100, tetrametoxisilano, 3-aminopropiltriethoxisilano, cloroformo, hexano, tetrahidrofurano, ácido bórico, ácido acético, NaOH y el metanol son de la marca Sigma Aldrich. La glucosa, FeSO₄·7H₂O, FeCl₃·6H₂O, NH₃ (Al 28% de pureza) y CaCl₂·H₂O son de la marca Merck.

3.2.2.2. Equipos

Para la caracterización del complejo se utilizaron los siguientes equipos: para la difracción de rayos X se utilizó un difractómetro Oxford Diffraction-CCDGemini a 130 °K con monocromador de grafito usando radiación Mo K α (λ = 0.71073 Å). Para el análisis elemental se utilizó un analizador 2400 Perkin-Elmer series II. El análisis por Infrarrojo se registró en un equipo Perkin Elmer 2000 FT-IR en un intervalo de 4,000-400 cm⁻¹ usando pastillas de KBr.

Para el análisis de la morfología del soporte magnético se utilizaron los siguientes equipos: para la microscopia electrónica de barrido se utilizó un equipo FEI Model Quanta 200F, para la microscopia electrónica de transmisión se utiliza un equipo JEOL JEM-1011 y para la difracción de rayos X se utilizó un equipo Philips PW1710 equipado con un monocromador de grafito usando radiación Cu K α (λ = 1.54 Å).

Las medidas electroquímicas se realizaron en una celda convencional de tres electrodos usando un bipotenciostato Drop Sens μ STAT 200 controlado por un software Drop View 1.3. Los electrodos serigrafiados utilizados durante la experimentación electroquímica son DropSens 110A constituidos por un electrodo de Ag como electrodo de referencia, un electrodo de carbón como electrodo auxiliar y un electrodo de carbono ($\varnothing = 4\text{mm}$) como electrodo de trabajo el cual se modificó con los complejos de hierro.

3.2.2.3. Síntesis del complejo de $\text{Fe(III)}-(\text{Tp}^{\text{Me}_2})_2$

Una disolución acuosa de 5 mL que contiene $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (54 mg, 0.2 mmol) se le adiciona una solución de THF (5 mL) que contiene $\text{K}^+[\text{tris}(3,5\text{-dimetil-pirazolil})\text{borato}]^-$ (68 mg, 0.2 mmol). Observándose la formación de un precipitado rojo de $[\text{Fe}(\text{tris}(3,5\text{-dimetil-pirazolil})\text{borato})_2]^+[\text{FeCl}_4]^-$. La mezcla se agita constantemente durante 12 horas [33]. Una vez transcurrido el tiempo se extrae el complejo con cloroformo en dos ocasiones, después se deja evaporar la fase orgánica a temperatura ambiente. El sólido obtenido se lava con hexano (5×4 mL). Obteniendo: 78 mg (0.09 mmol, 46%). Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{B}_2\text{Cl}_4\text{Fe}_2\text{N}_{12}$: C, 42.49; H, 5.23; N, 19.82 %. Encontrado: C, 42.12; H, 5.85; N, 17.54%. El complejo muestra una naturaleza paramagnética por lo que no se pueden realizar estudios de resonancia magnética nuclear.

3.2.2.4. Modificación del electrodo

La modificación del electrodo serigrafiado se realizó adicionando 10 μL del complejo $[\text{Fe}(\text{tris}(3,5\text{-dimetil-pirazolil})\text{borato})_2]^+[\text{FeCl}_4]^-$ disuelto en cloroformo a una concentración de 2000 ppm sobre la superficie del electrodo de trabajo ($S = 0.13 \text{ cm}^2$) dejando secar el disolvente orgánico a temperatura ambiente, con este procedimiento se logra impregnar 20 μg del complejo sobre la superficie del electrodo.

Previo a la aplicación de los electrodos serigrafados como detectores de peróxido de hidrógeno, se realizó la activación de los electrodos de trabajo mediante voltamperometría cíclica. Se realizaron 20 barridos en la ventana electroquímica de -0.6 a 0.8 V, a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} , en un medio de boratos pH 9.0 (0.1M).

3.2.2.5. Síntesis del soporte magnético

Inicialmente se sintetiza magnetita por co-precipitación [34, 35]. Se disuelven 3 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua (80 mL), la mezcla se coloca en agitación constante en un vaso de precipitado y se introduce una corriente de aire en la solución y se calienta a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente se ajusta el pH = 10 adicionando NaOH 6 M, el pH se monitorea y mantiene durante una hora. Transcurrida la reacción se obtiene un precipitado negro con carácter magnético, el cual se separa del medio de reacción por acción de un campo magnético externo. El sólido se lava 3 ocasiones con porciones de agua destilada de 50 mL.

El sólido magnético obtenido se coloca en un matraz balón y se añaden 0.25 g de tetrametoxisilano, 1.25 g de aminopropiltriethoxisilano, $100 \mu\text{L}$ de NH_3 , 28.0 % (p/v) y 6.25 mL de una disolución compuesta por Triton X-100 al 2.0 % (p/v), bromuro de cetiltrimetilamonio al 0.2 % (p/v) y etanol 25.0 % (v/v). La mezcla se coloca en reflujo durante 16 hrs. Transcurrida la reacción el sólido magnético obtenido se lava con agua ($25 \text{ mL} \times 4$) seguido de etanol ($10 \text{ mL} \times 3$) aislando el sólido con la ayuda de un campo magnético externo. El soporte magnético se seca a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas, se pulveriza en mortero de ágata.

3.2.2.6. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx)

Se toman 50 mg de soporte magnético y se colocan en un vaso de precipitado con 5 mL de glutaraldehído al 2%, la mezcla se agita durante dos horas, transcurrido el tiempo se lava el sólido con agua previamente desoxigenada con N_2 ($5 \text{ mL} \times 4$) y

posteriormente con una disolución de fosfatos (0.1 M, pH 7) previamente desoxigenada con N₂ (5 mL x 4). El soporte magnético activado se le adicionan 5 mL de una disolución de fosfatos (0.1 M, pH 7.0) desoxigenada que contiene 100 µL de GOx (28 mg prot./mL y 216 U/mg prot.) y se coloca en agitación durante 6 hrs a 25 °C.

Una vez completada la inmovilización, 2.0 mL de la dispersión se coloca en el sistema en flujo a 0.5 mL min⁻¹ y se retiene magnéticamente en una mini columna (30 mm x 2 mm d.i.) de metacrilato. La mini-columna con el soporte magnético (con GOx) se lava con agua bidestilada y se almacena en una disolución de fosfatos (0.1 M, pH 7) a 4 °C hasta su utilización.

3.2.3. Resultados y discusión

3.2.3.1. Caracterización del $[Fe(\text{tris}(3,5\text{-dimetil-1-pirazolil})\text{borato})_2]^+ [FeCl_4]^-$

La caracterización estructural del mediador de hierro se realizó mediante difracción de rayos X de monocristal, utilizando cristales adecuados para determinar la estructura teórica del compuesto. Los datos del cristal difractado se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Datos cristalográficos para $Fe[\text{tris}(3,5\text{-dimetil-1-pirazolil})\text{borato}]_2^+ [FeCl_4]^-$

$[Fe(C_{15}H_{22}BN_6)_2][FeCl_4] \cdot CHCl_3$	
Monoclínico, $P2_1/n$	$T = 295 \text{ }^\circ\text{K}$
$a = 14.724 (3) \text{ \AA}$	$\alpha = 90$
$b = 19.042 (3) \text{ \AA}$	$\beta = 105.298 (4)^\circ$
$c = 16.045 (3) \text{ \AA}$	$\gamma = 90$
$V = 4339.3 (14) \text{ \AA}^3$	Color = marrón
$Z = 4$	Tamaño = $0.75 \times 0.48 \times 0.15$

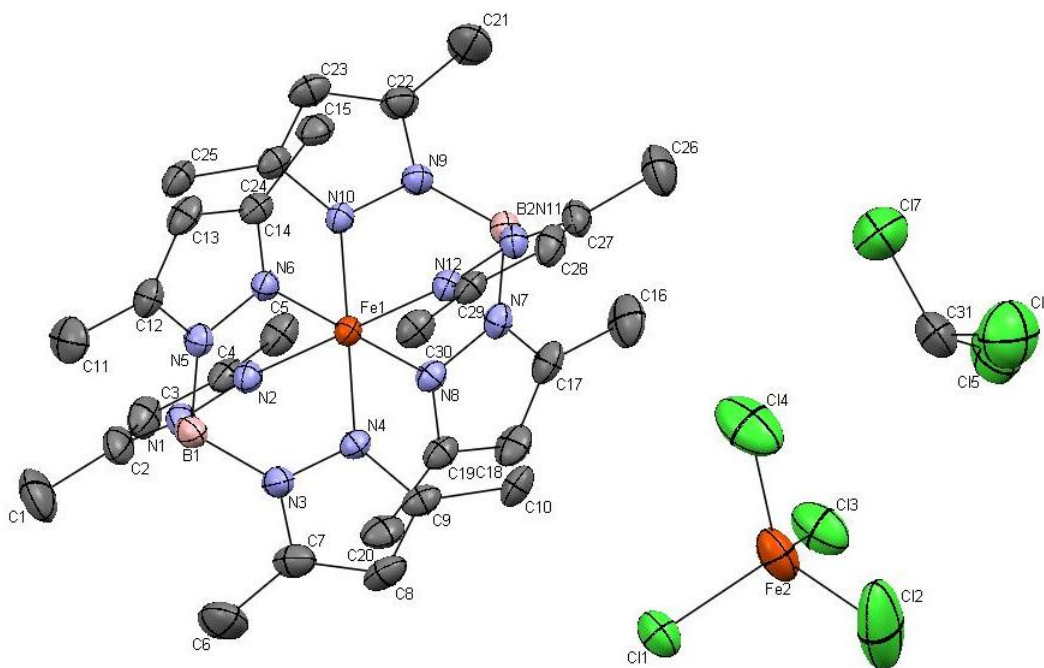


Figura 3.5. La estructura molecular de $[Fe(\text{tris}(3,5\text{-dimetil-1-pirazolil})\text{borato})_2]^+ [FeCl_4]^-$, mostrando un 50% de probabilidad en el de desplazamiento de elipsoides

El compuesto sintetizado consta de dos complejos de hierro (aniónico y catiónico) como puede observarse en la Figura 3.5: el complejo aniónico (clorocomplejo) de geometría tetraédrica con respecto al hierro con distancias de enlace Fe-Cl entre 2.1566(14) a 2.210(2) Å y el complejo catiónico compuesto de dos ligantes de tris(3,5-dimetil-1-pirazolil)borato unidos al hierro de geometría octaédrica ligeramente distorsionada con distancias Fe-N de 1.962(3) a 1.77(3) Å (Tabla 3.4). Los parámetros característicos del compuesto son análogos a los de otros compuestos con estructura tridimensional equivalentes [36, 37].

Tabla 3.4. Parámetros geométricos del complejo de hierro

a. Distancias de enlace característicos			
Fe1-N12	1.962 (3)	Fe1-N2	1.977 (3)
Fe1-N10	1.963 (3)	Fe2-Cl1	2.1566 (14)
Fe1-N4	1.965 (3)	Fe2-Cl2	2.163 (2)
Fe1-N6	1.969 (3)	Fe2-Cl3	2.2041 (16)
Fe1-N8	1.971 (3)	Fe2-Cl4	2.210 (2)
b. Ángulos de enlace			
N12-Fe1-N10	90.23 (13)	N10-Fe1-N2	89.77 (13)
N12-Fe1-N4	90.09 (13)	N4-Fe1-N2	89.91 (13)
N10-Fe1-N4	179.63 (14)	N6-Fe1-N2	90.16 (12)
N12-Fe1-N6	89.79 (12)	N8-Fe1-N2	89.93 (13)
N10-Fe1-N6	89.57 (13)		
N4-Fe1-N6	90.25 (13)	Cl1-Fe2-Cl2	109.98 (9)
N12-Fe-N8	90.11 (13)	Cl1-Fe2-Cl3	108.31 (6)
N10-Fe-N8	90.12 (13)	Cl2-Fe2-Cl3	109.68 (9)
N4-Fe1-N8	90.06 (13)	Cl1-Fe2-Cl4	109.94 (7)
N6-Fe1-N8	179.68 (14)	Cl2-Fe2-Cl4	110.96 (12)
N12-Fe-N2	179.95 (15)	Cl3-Fe2-Cl4	107.92 (8)

También se realizó análisis de espectro parciales de masas del ion común (+) del compuesto de hierro. HRMS (EI) calcd. para: $C_{30}H_{44}B_2N_{12}Fe$ (M^+) 650.3341, encontrado 650.3345 (Figura 3.6).

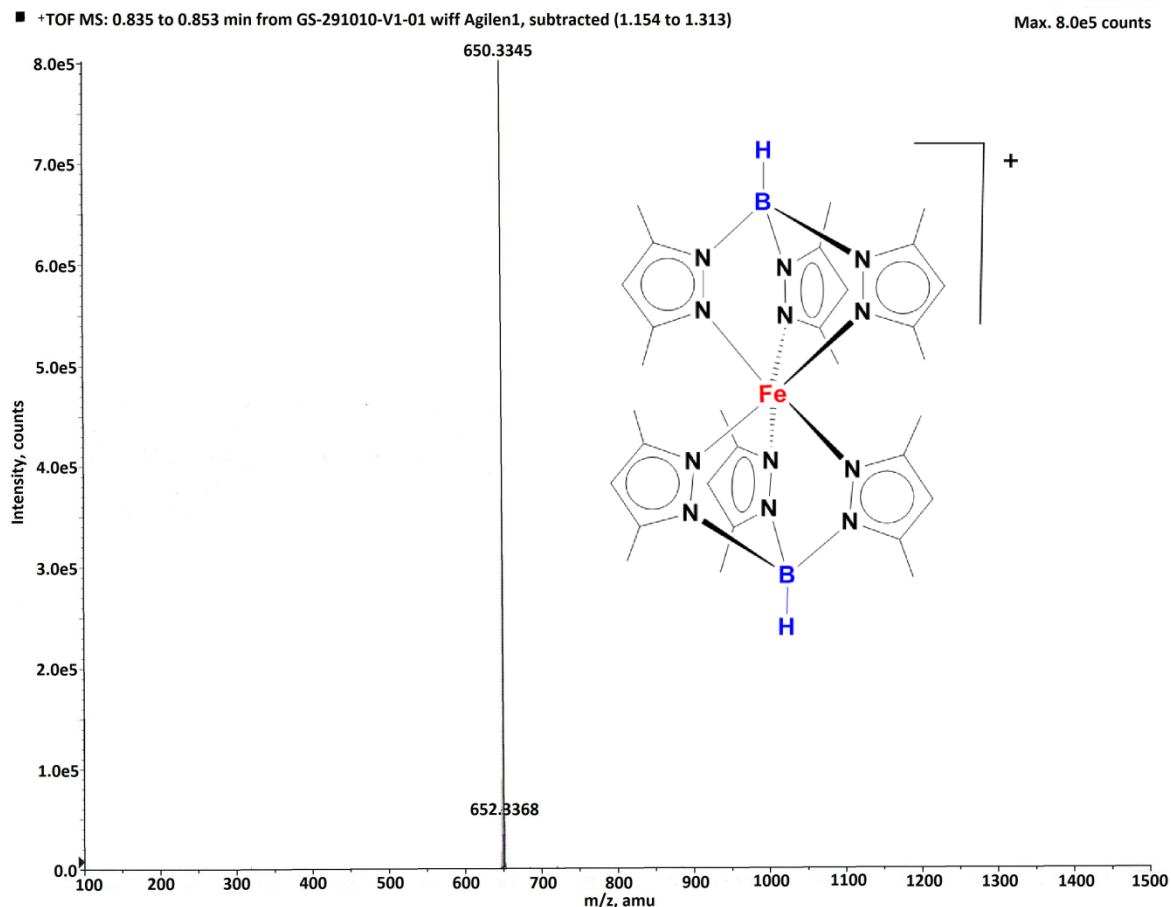


Figura 3.6. Análisis del catión ($C_{30}H_{44}B_2N_{12}Fe$) del complejo de hierro mediante espectroscopia de masas

En el espectro infrarrojo (IR) del complejo de hierro (Figura 3.7) se observan las bandas características para los grupos funcionales: $CH_{3pz} = 2923\text{ cm}^{-1}$, $B-H = 2511\text{ cm}^{-1}$, $C=N_{pz} =$ traslapada, $C=C = 1546\text{ cm}^{-1}$ y $C-N = 1203\text{ cm}^{-1}$.

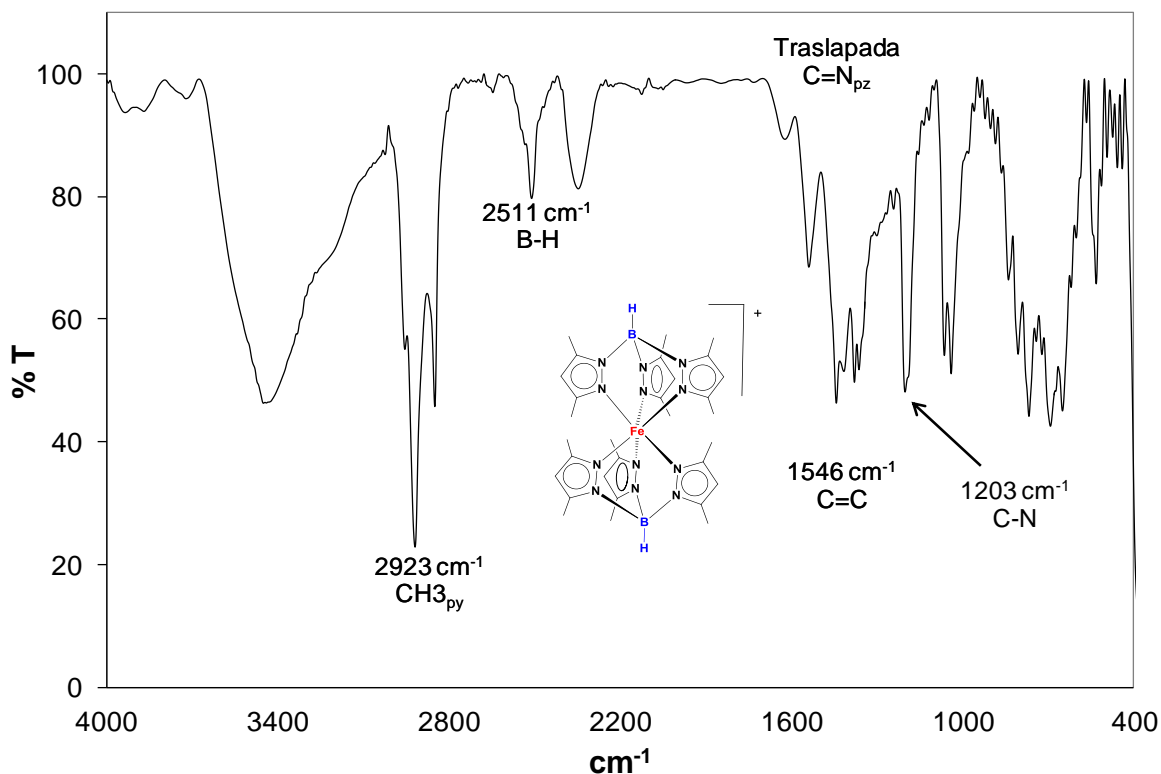


Figura 3.7. Espectro de IR para el complejo $\text{Fe}[\text{tris}(3,5\text{-dimetil-pirazolil)borato}]_2^+[\text{FeCl}_4]^-$

La estructura tridimensional obtenida para el compuesto permite corroborar el comportamiento electroquímico del compuesto durante el proceso de activación del electrodo, en el cual se observan dos señales de oxidación y reducción correspondientes a los complejos catiónico y aniónico (Figura 3.8). En la Figura 3.8 se puede observar que presenta una reacción catalítica a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Lo que permite disminuir el potencial de detección a valores de 0.06 V (potencial de pico) y así minimizar la posible interferencia debida a la presencia de otros analitos durante el análisis amperométrico.

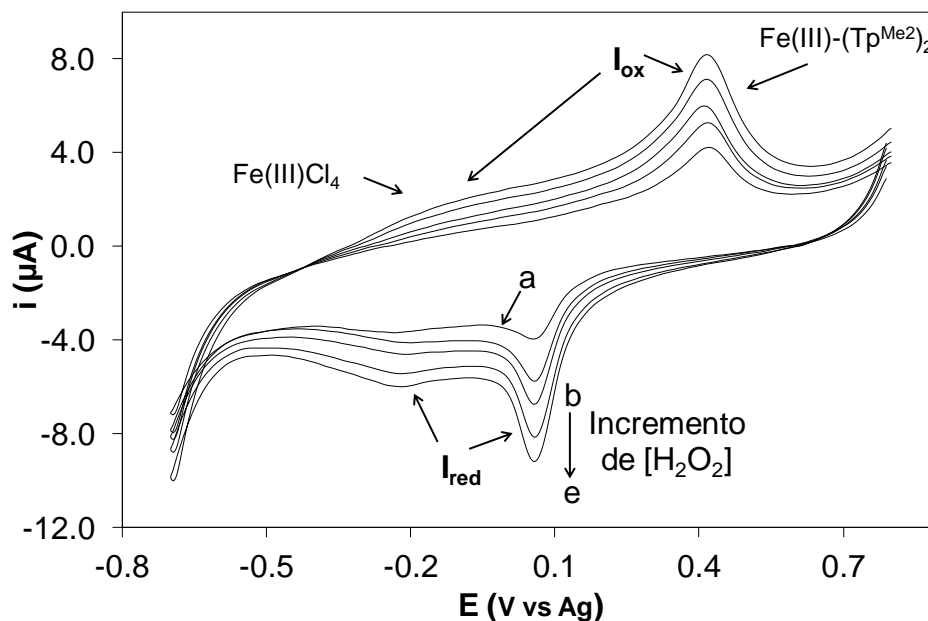


Figura 3.8. Voltamperogramas cíclicos del complejo de hierro como mediador en solución acarreadora, A) sin H_2O_2 , B) 1.5, C) 3.0, D) 4.5, E) 6.0 mM H_2O_2

3.2.3.2. Caracterización del soporte magnético.

La morfología de las partículas obtenidas se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM, Figura 3.9a) y por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en donde se puede observar que las partículas están formadas por multi-núcleos (Figura 3.9b).

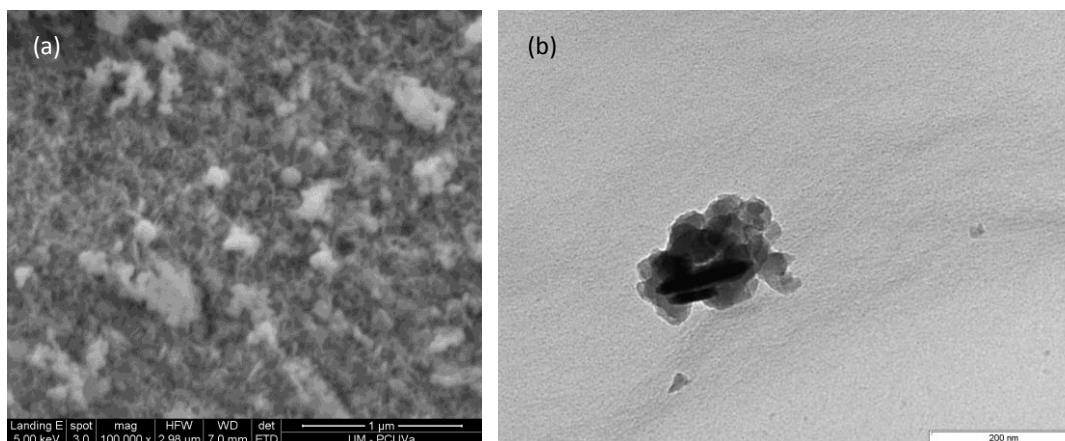


Figura 3.9. Micrografías del soporte magnético por SEM y TEM respectivamente

La distribución del tamaño de partícula que se tiene se encuentra en el rango de 50-150 nm. Los multi-núcleos son favorables para una buena inmovilización de las enzimas además de que evita la formación de agregados que son las responsables de formar una suspensión del material magnético [38].

Para determinar la composición del soporte magnético utilizado para la inmovilización de las enzimas se realizó un análisis por difracción de rayos X del soporte (Figura 3.10). El cual está compuesto mayoritariamente por magnetita (m) y dos señales amorfas entre 15-25° 2θ, características del óxido de silicio.

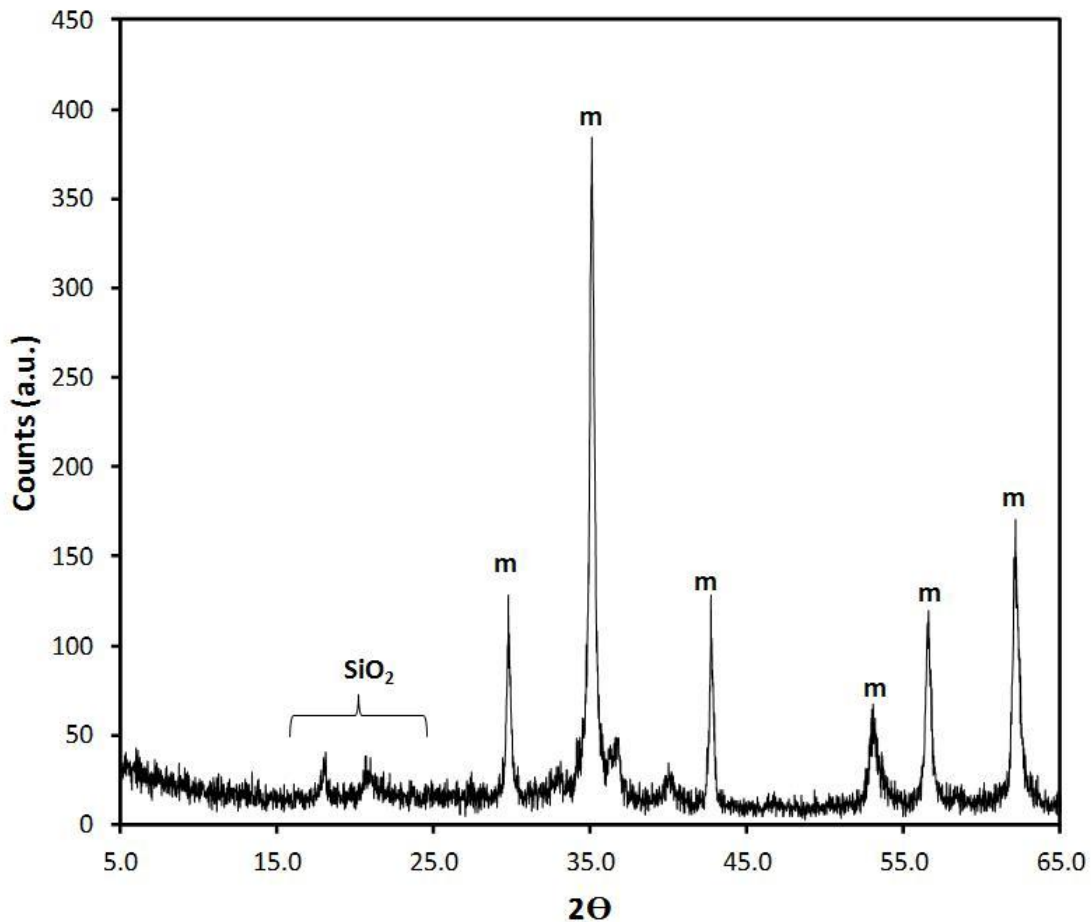


Figura 3.10. Patrones de difracción para el soporte magnético (líneas de difracción para la magnetita)

Así mismo se realizó el análisis por espectroscopia de infrarrojo (IR) para la magnetita (Figura 3.11). En la Figura 3.11a se observan una banda de vibración a 584 cm^{-1} atribuida a la vibración Fe-O correspondiente a la magnetita. En la Figura 3.11b adicional a las bandas de la magnetita se obtiene una banda de vibración ancha a 3148 cm^{-1} atribuida a los grupos Si-OH y N-H, también se obtiene una banda de vibración a 1074 cm^{-1} atribuida al grupo Si-O-Si (magnetita recubierto de grupos N-H). En la Figura 3.11c se observa una banda de vibración a 2926 cm^{-1} atribuida al grupo C-H alifáticos y una banda de vibración a 1644 cm^{-1} atribuida a los grupos C=O (magnetita con enzima inmovilizada).

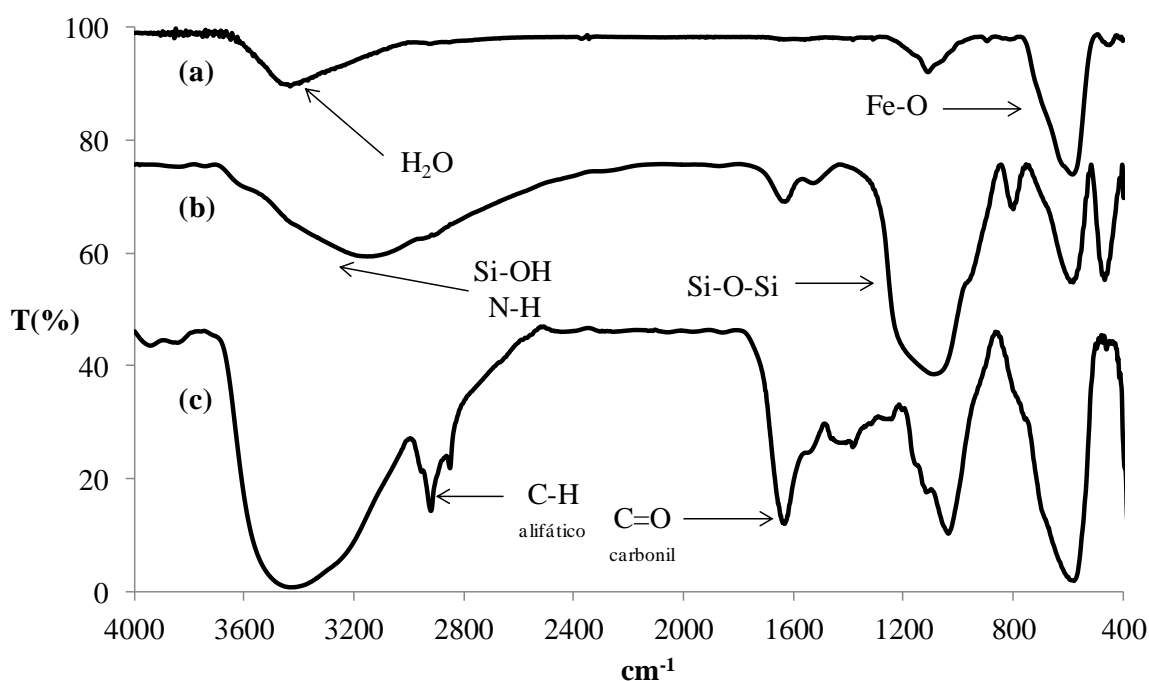


Figura 3.11. Espectros IR obtenidos para el soporte magnético. a) magnetita, b) magnetita recubierta con silica gel, c) soporte magnético enzimático

3.2.3.3. Determinación de glucosa mediante FIA con detección amperométrica

Para la cuantificación de H_2O_2 y glucosa se utilizó un sistema FIA semi-automatizado como se muestra en la Figura 3.12. En donde la disolución transportadora (disolución buffer de fosfatos pH 7.0, 0.1 M) y la muestra (H_2O_2 ó

glucosa) son propulsadas en el sistema de flujo a una velocidad de flujo (Q) de 0.5 mL min^{-1} con la ayuda de una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 2), la muestra se inyecta en la disolución transportadora mediante el uso de una válvula rotativa de cuatro vías (Rheodyne 5020). Las muestras son transportadas y mezcladas en un reactor con la disolución transportadora hacia el detector amperométrico. La detección electroquímica se realiza en una celda de flujo tipo wall-jet en donde se coloca un electrodo serigrafiado previamente modificado, aplicando un potencial de trabajo de 0.06 V (vs Ag). En la determinación de H_2O_2 se utilizó únicamente disolución transportadora, mientras que para la determinación de glucosa se añadieron 60 U de glucosa oxidasa (GOx) a la disolución transportadora.

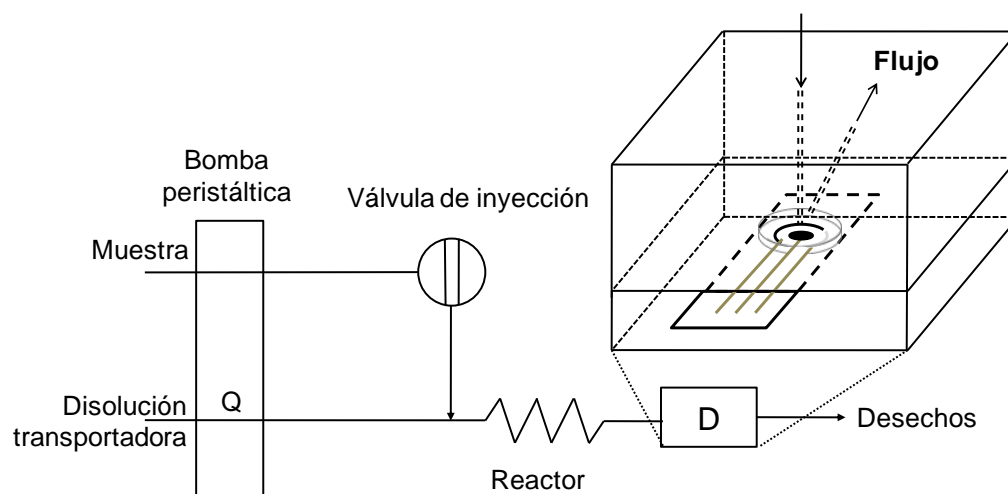


Figura 3.12. Sistema FIA diseñado para la determinación de glucosa.

3.2.3.1.4. Optimización de las variables en la determinación de H_2O_2

Una vez evaluado el comportamiento del mediador, según se describió en el apartado 3.2.3.1, se optimizan las variables que influyen en la determinación de H_2O_2 debido a que estas se relacionan con la determinación de glucosa. Inicialmente se evaluaron los efectos del pH y el caudal en la respuesta amperométrica durante la determinación de H_2O_2 . Para disminuir la interferencia de cualquier otro agente oxidante se seleccionaron: un potencial de 0.06 V , una

longitud del reactor de 30 cm, un volumen de inyección de 100 μL y una concentración de H_2O_2 de 147 μM .

Mediante los valores de pH evaluados (utilizando disoluciones Britton-Robinson) en el intervalo de 4.0-10.0, se elige como mejor valor de pH aquel que proporciona mayor intensidad de la señal obtenida al inyectar disoluciones de H_2O_2 . Como se observa en la Figura 3.13 la señal analítica aumenta con el valor de pH, esto puede atribuirse al comportamiento del complejo a los diferentes valores de pH. Sin embargo, debido a que la enzima glucosa oxidasa trabaja a un pH óptimo en un intervalo de 7.0-7.5, se decidió trabajar a un valor de pH de 7.0 (ajustando el pH con un buffer de fosfatos 0.1 M) con la finalidad de simplificar el sistema FIA, de lo contrario se requeriría un canal adicional para ajustar el pH, produciéndose una dilución de la muestra y con ello una disminución de la señal.

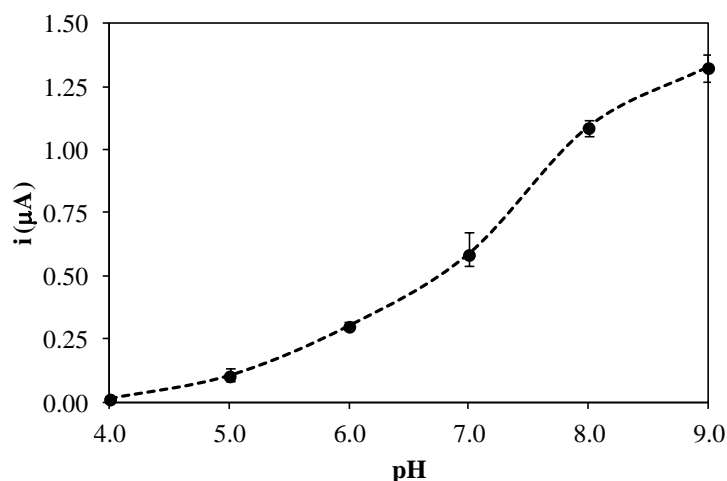


Figura 3.13. Efecto del valor de pH sobre la señal analítica. Condiciones: pH, 4.0 - 9.0, $E = 0.06 \text{ V}$, $Q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$, volumen de inyección, 100 μL , $[\text{H}_2\text{O}_2] = 147 \mu\text{M}$

La velocidad de flujo (Q) se evaluó de forma univariable en el intervalo de 0.2 a 0.5 mL min^{-1} , observándose un incremento de la señal a medida que se aumenta la velocidad de flujo (Figura 3.14), por lo que se seleccionó un valor de 0.5 mL min^{-1} . Cabe resaltar que como se tiene previsto el acoplamiento de la enzima glucosa

oxidasa, la cinética de la reacción enzimática limitara el intervalo de trabajo de esta variable, debido a esto no se evaluaron caudales más elevados.

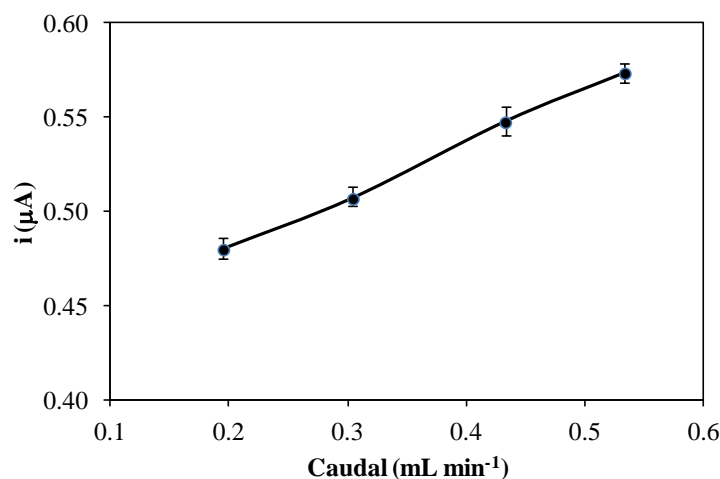


Figura 3.14. Efecto del caudal de inyección sobre la señal analítica. Condiciones: Disolución transportadora, buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7), Q, 0.2-0.5 mL min⁻¹, E = 0.06 V y volumen de inyección de 100 μL, [H₂O₂]= 147 μM

3.2.3.1.5. Parámetros analíticos de H₂O₂

Una vez evaluadas y optimizadas las variables seleccionadas, se demuestra que la modificación del electrodo es adecuada para la determinación H₂O₂ en medio acuoso. Bajo las condiciones optimizadas se elaboró la línea de calibrado (Figura 3.15) a un E= 0.06 V, buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7), longitud del reactor de 30 cm, caudal de 0.5 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 100 μL. Los parámetros de regresión obtenidos a partir del FIAGrama se muestran en la Tabla 3.5. Cabe destacar el intervalo lineal que está comprendido entre 29 - 147 μM, el límite de detección se obtuvo de acuerdo a la IUPAC [39]. Los valores obtenidos son comparables con otros trabajos similares en donde se utilizan otros mediadores [40, 41].

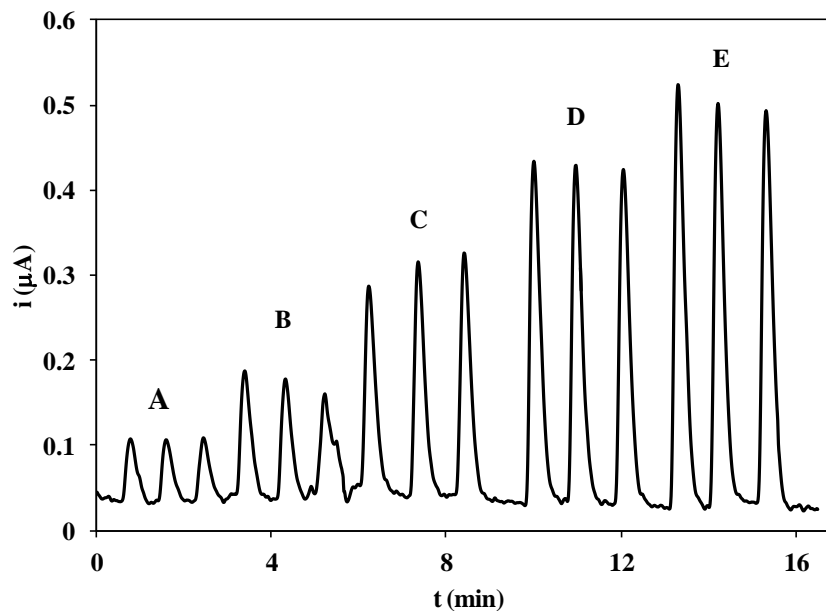


Figura 3.15. FIAgrama con inyecciones de 100 μL de peróxido de hidrógeno A) 29, B) 59, C) 88, D) 117 y E) 147 μM . $E = 0.06\text{ V}$, $Q = 0.5\text{ mL min}^{-1}$ y $\text{pH } 7.0$ (buffer de fosfatos 0.1M)

Tabla 3.5. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, i (μA) versus $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (μM)

Parámetro	Valor
Raíz cuadrada de la varianza residual, S_e	0.019
Coefficiente de correlación, r^2	0.991
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$	-0.05 ± 0.02
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$ ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	$3.7 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$
Repetitividad (%DSR, $n=3$, 5.0 μM)	3.93
Intervalo lineal (μM)	29-147
Límite de detección (μM)	10
Velocidad de análisis (muestras h^{-1})	60.0

3.2.3.4. Determinación de glucosa con la enzima en disolución

3.2.3.4.1. Optimización para la determinación de glucosa

Para la determinación de glucosa se utiliza el mismo sistema en flujo que se utilizó para el análisis de peróxido de hidrógeno, ya que nos ayuda a simplificar el sistema de análisis. Como se había mencionado anteriormente en la sección 3.2.3.3 se requiere la adición de la enzima glucosa oxidasa en la disolución transportadora para la determinación de la glucosa.

Conociendo los posibles intervalos de las variables que afectan la señal analítica, y para saber si se tiene un efecto de la señal sobre la determinación de glucosa se aplicó un diseño factorial completo a dos niveles, el cual considera el efecto de cada factor, así como el efecto de las interacciones entre factores. La optimización del sistema de análisis considera como variables que afectan al sistema el caudal, longitud del reactor y volumen de inyección. El potencial de trabajo y la composición de la disolución transportadora se fijaron en -0.06 V y pH 7.0, realizándose $2^3 = 8$ experiencias por duplicado. Cada factor toma dos valores que se denominan alto (+) y bajo (-), los cuales se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Niveles de los factores a optimizar

Factores	Nivel	
	Bajo(-)	Alto(+)
Volumen de inyección (Vi) (μL)	30	100
Caudal (Q) (mL min^{-1})	0.5	1.5
Longitud del reactor (R) (cm)	50	100

El diseño considera todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores elegidos como puede observarse en la Tabla 3.7. Cada experiencia se realizó por duplicado y de manera aleatoria. Para el análisis estadístico se tomó en cuenta el promedio de cada experiencia.

Tabla 3.7. Combinación de niveles y resultados de los mismos

R	Q	Vi	Señal analítica (μA)		Promedio
-	-	-	0.251	0.252	0.252
+	-	-	0.459	0.389	0.424
-	+	-	0.138	0.138	0.138
-	-	+	0.221	0.236	0.229
+	+	-	0.281	0.251	0.266
+	-	+	0.244	0.197	0.221
-	+	+	0.196	0.162	0.179
+	+	+	0.407	0.363	0.385

La estimación del efecto que ejerce cada factor e interacción así como la varianza se muestra en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Factores F obtenidos a partir del diseño factorial utilizado, $F_{\text{critico}} = 7.571$

Factor	Efecto	Varianza	F_{calculado}
Vi	-0.017	0.001	0.390
Q	-0.039	0.006	2.162
R	0.125	0.062	21.939
Vi-Q	0.097	0.037	13.188
Vi-R	-0.026	0.003	0.928
Q-R	0.042	0.007	2.536
Vi-Q-R	0.065	0.017	5.899

Como se observa en la Tabla 3.8, la variable que ejerce un mayor efecto sobre la respuesta es la longitud del reactor ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{critico}}$) lo que se relaciona con fenómenos de difusión y tiempo de reacción en el sistema. También se tiene un efecto significativo la combinación del volumen de inyección y la velocidad de flujo, estas variables por separado tiene un efecto negativo lo que indica que el óptimo

de los mismos se encuentra al nivel que se le asigno como negativo, por lo que el volumen de inyección y el caudal de trabajo se fijan en valores bajos.

La selección de la longitud del reactor se realizó de manera univariable, evaluándose reactores en un intervalo de 40 - 140 cm. Los resultados obtenidos (Figura 3.16) presentan un máximo de la señal analítica para una longitud del reactor de 120 cm, esto se debe a la combinación de dos efectos; por un lado, cuanto mayor es la longitud se tiene tiempo suficiente para que la enzima promueva la producción de H_2O_2 , sin embargo cuando se tienen longitudes mayores el proceso de difusión se ve favorecido produciendo un efecto de dilución del H_2O_2 , por lo que se seleccionó el valor de 120 cm como el más adecuado.

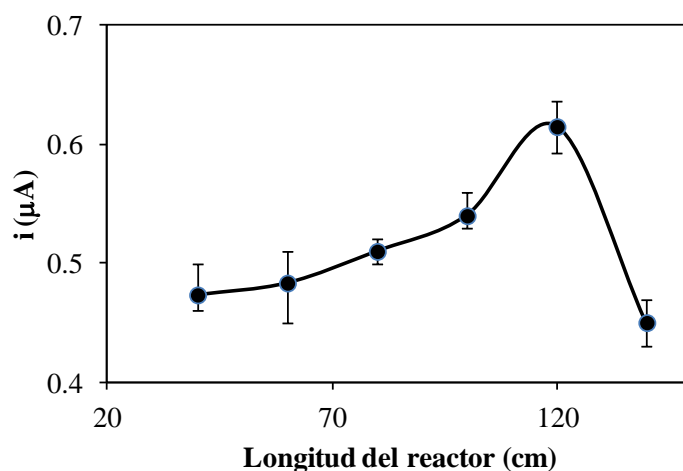


Figura 3.16. Efecto de la longitud del reactor: 40, 60, 80, 100, 120 y 140 cm. $E = -0.06 V$, $Q = 0.5 mL min^{-1}$, pH 7 (fosfatos $0.1M$), volumen de inyección de $30\mu L$ [glucosa] ($9.0 mM$)

3.2.3.4.2. *Parámetros analíticos*

Una vez optimizado el sistema de análisis de la glucosa, se determinaron los parámetros analíticos a través de la construcción de la línea de calibrado. Los parámetros analíticos y el FIAGrama obtenido se muestran en la Figura 3.17 y la Tabla 3.9, respectivamente. Cabe resaltar el intervalo lineal de 1.5 a 9.0 mM de glucosa con un límite de detección 0.5 mM obtenido de acuerdo a la normativa de

la IUPAC [39]. Los parámetros se encuentran en el intervalo de interés para el análisis de muestras de sangre, en donde la concentración de glucosa de personas sanas se sitúa entre 4 y 6 mM.

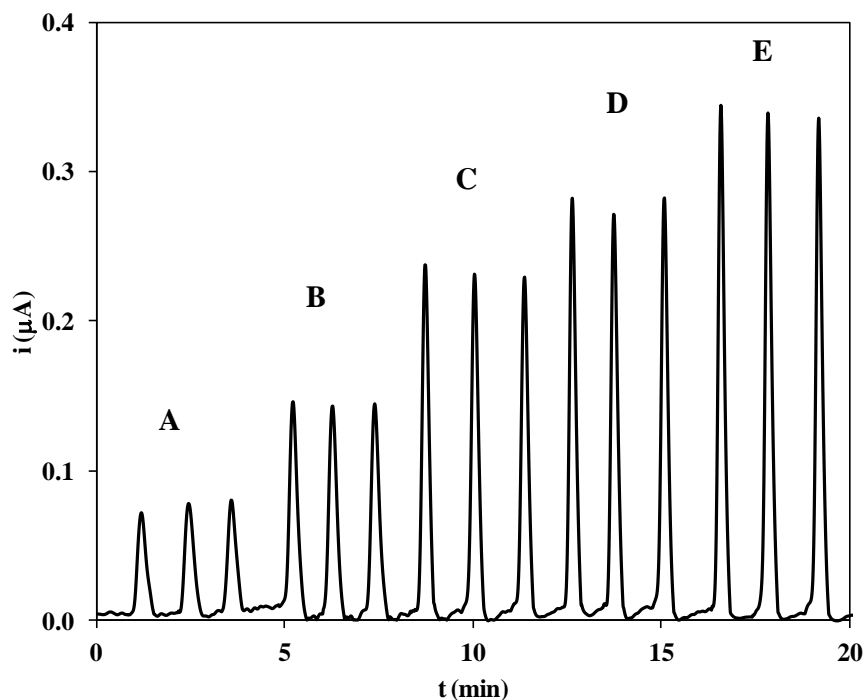


Figura 3.17. FIagrama obtenido del análisis glucosa A) 1.0, B) 3.0, C) 5.0, D) 7.0 y E) 9.0 mM. Condiciones: volumen de inyección, 30 μL . $E = -0.06\text{ V}$, $Q = 0.5\text{ mL min}^{-1}$, longitud de reactor de 120 cm y disolución transportadora de fosfatos pH 7.0, 0.1 M

Tabla 3.9. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, i (μA) versus [glucosa] (mM)

Parámetro	Valor
Raíz cuadrada de la varianza residual, S_e	0.009
Coefficiente de correlación, r^2	0.97
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$	-0.059 ± 0.035
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$ ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	0.063 ± 0.005
Repetitividad (%DSR, $n=3$, 3.0 mM)	4.15
Intervalo lineal (mM)	1.5-9.0
Límite de detección (mM)	0.5
Velocidad de análisis (muestras h^{-1})	60.0

3.2.3.4.3. Determinación de glucosa en suero sanguíneo

Para la determinación de glucosa en suero sanguíneo, se recolectaron muestras de sangre en tubos al vacío sin coagulante separándose el suero sanguíneo del plasma de la sangre centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos. El suero obtenido se mantiene en refrigeración a 4 °C hasta su análisis, realizándose los análisis el mismo día. El análisis FIA con detección amperométrica se realizó en las condiciones óptimas mencionadas anteriormente. Los resultados obtenidos del análisis se muestran en la Tabla 3.10. Los resultados obtenidos fueron comparados con 7/los obtenidos mediante la metodología oficial de análisis (enzimática-espectrofotométrica), observándose mediante una prueba *t-student* que estadísticamente no existe diferencia significativa entre los valores proporcionados por la metodología de referencia y los encontrados por el método propuesto.

Tabla 3.10. Contenido promedio (n=3) de glucosa en suero sanguíneo mediante la metodología de referencia y la propuesta

Muestras	Enzimática UV-Vis (mmol L⁻¹)	FIA- amperometría (mmol L⁻¹)	DER (%, n=3)	t- calculada (95%)
1	4.78	4.65	3.05	0.78
2	4.67	4.81	2.75	1.08
3	5.56	5.35	4.55	0.95

$t_{\text{critica}} = 4.30$

3.2.3.5. Determinación de glucosa utilizando un reactor magnético enzimático

Una vez que se logran obtener resultados satisfactorios para la cuantificación de glucosa en suero sanguíneo en un sistema continuo, se desean mejorar los costos de análisis. Para cumplir con el objetivo, uno de los procesos más utilizados es la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa, ya que al mantener al elemento de reconocimiento biológico en un determinado lugar permite su reutilización y por lo

tanto se reducen los costos de análisis. En este sentido, las partículas magnéticas juegan un papel importante como soportes para la inmovilización de la enzima.

3.2.3.5.1. Diseño del sistema de análisis de inyección en flujo

El sistema FIA utilizado (Figura 3.18) consta de una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2 con tuberías de la misma marca en donde se propulsaba las muestras y la solución acarreadora (disolución de fosfatos 0.1 M, pH 7.0). Un volumen de 100 μL se inyecta al canal de la disolución acarreadora mediante una válvula rotativa Rheodyne 5020 de cuatro vías a un flujo de 0.1 mL min^{-1} . La muestra se mezcla con la solución acarreadora en el reactor A (30 cm) reaccionando la glucosa contenida en la muestra con la GOx magnéticamente retenida en la mini-columna, esta variable nos e optimizo debido a que no tiene un efecto significativo sobre la señal analítica. El H_2O_2 producido es transportado y mezclado con la disolución transportadora por el reactor B (50 cm) hacia la superficie del electrodo modificado (mencionado en la sección de 3.2.2.4) que se encuentra en la celda de flujo tipo wall-jet conectada a un Bipotenciostato (Dropsens μSTAT 200) controlado a través del software DropView 1.3. La cuantificación electroquímica se realiza a un potencial de trabajo de 0.06 V.

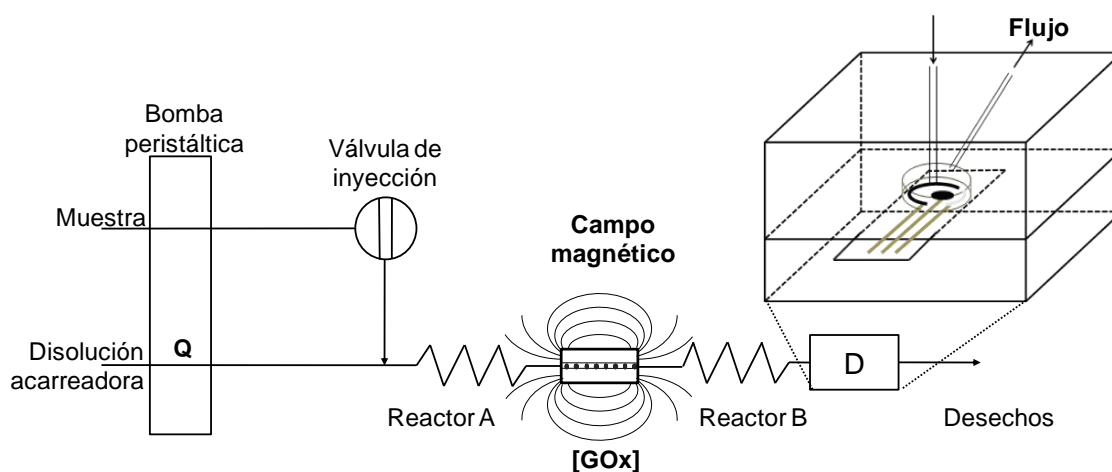


Figura 3.18. Sistema FIA diseñado para la determinación de glucosa

3.2.3.5.2. Optimización de los parámetros en la determinación de glucosa

Debido a que existen diversos factores que ejercen un efecto significativo sobre la señal analítica, se decidió realizar la optimización con la ayuda de un diseño de parámetro de Taguchi (DPT) para obtener las condiciones adecuadas. Este diseño discrimina entre los factores de control y el ruido experimental a través de matrices ortogonales en donde las columnas (factores) y las filas (experiencias) están adecuadas de una manera convenientemente fijado. Estas matrices permiten la evaluación simultánea de múltiples variables con un mínimo de ensayos. Los resultados obtenidos se analizan estadísticamente para obtener el óptimo de cada variable.

La optimización del sistema utilizando DPT involucra cinco pasos, a) identificación de la variable de salida a optimizar, b) identificación y selección de los factores que afecten al sistema, c) selección de la matriz ortogonal apropiada y asignación de los valores adecuados a las variables elegidas, d) análisis de datos para la determinación de las condiciones óptimas de análisis y e) la realización de un experimento bajo las condiciones obtenidas.

Las variables seleccionadas son: la velocidad de flujo (VF , mL min^{-1}), el volumen de inyección de la muestra (V_i , μL), la concentración de la GOx en el soporte magnético [GOx] (U enzimática) y la longitud del reactor B (RB , cm). Los valores de cada factor, la combinación utilizada y datos obtenidos para una concentración de 6.0 mM de glucosa se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Datos del diseño taguchi y resultados experimentales de cada análisis

VF	Vi	GOx	RB	i (nA)	
0.091	50	300	30	91	85
0.091	100	600	50	111	118
0.091	150	1200	70	69	74
0.148	50	600	70	41	43
0.148	100	1200	30	39	39
0.148	150	300	50	78	75
0.205	50	1200	50	25	26
0.205	100	300	70	43	44
0.205	150	600	30	62	62

Los resultados obtenidos se analizan estadísticamente con la ayuda del software ANOVA TM v2.5. Como puede observarse en la Tabla 3.12 la variable que ejerce una mayor influencia sobre la señal analítica es la velocidad de flujo (VF) y la influencia residual es menor al 1.0 % en comparación con las variables escogidas lo que indica una buena selección de las mismas.

Tabla 3.12. Resultados del análisis ANOVA para el % de influencia de corriente (nA)

	GDL	SS	V	F	Contribución
VF	2	7702.4	3851.2	293.6	60.9
Vi	2	1066.4	533.2	40.6	8.4
GOX	2	2675.1	1337.6	102.0	21.2
RB	2	1168.4	584.2	44.5	9.2
RESIDUAL	9	118.1	13.1	1.0	0.2
TOTAL	17	12730.5	6319.3		

A partir de un análisis de medias de la matriz de datos se obtiene la siguiente combinación de niveles (Figura 3.19) que generan un óptimo: velocidad de flujo (VF) de 0.1 mL min^{-1} , esto se relaciona con el tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato para la producción de peróxido de hidrógeno, entre mayor sea éste tiempo se produce una mayor cantidad de H_2O_2 . El volumen de inyección (Vi) de

150 μL , mejora la intensidad de la señal analítica, debido a que se tiene una mayor volumen de analito, provocando una mayor producción de H_2O_2 .

Una concentración de glucosa inmovilizada [GOx] de 600 U, se explica porque cuando se deposita un mayor volumen de enzima inmovilizada se tiene una competencia por los sitios activos del soporte y por lo tanto se tiene una deficiente inmovilización, por lo que se pierde rápidamente la enzima en solución y por ende la señal analítica disminuye. La longitud óptima de reactor B (RB) de 50 cm, es razonable ya que cuando se tienen reactores pequeños no se tiene una eficiente disolución transportadora y el H_2O_2 , por lo que se tiene una disminución de la señal, sin embargo cuando se tiene una reactores largos se diluye el H_2O_2 por lo que tiene una disminución de la señal analítica.

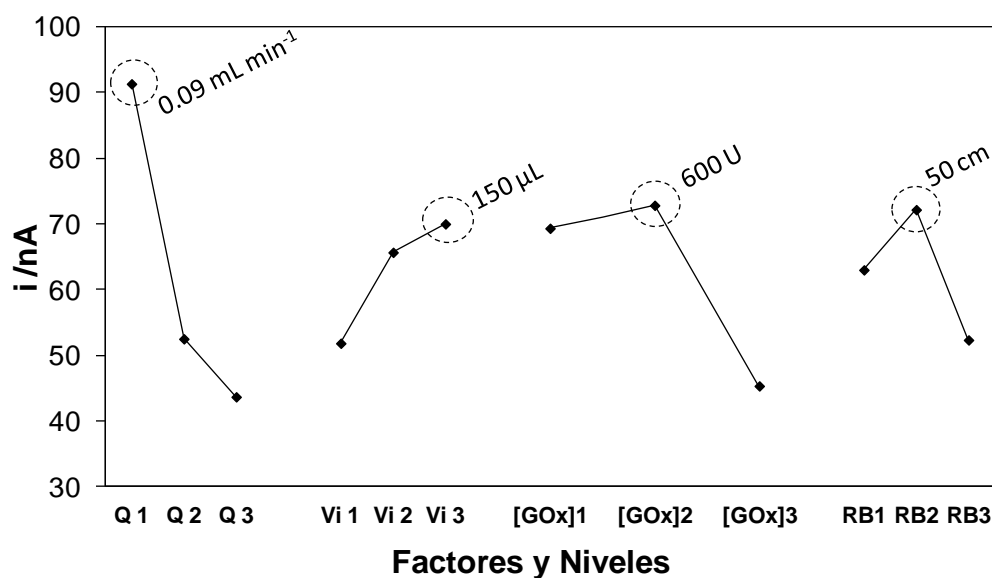


Figura 3.19. Efecto de los factores de control sobre la señal analítica de la glucosa

3.2.3.5.3. Parámetros analíticos del método

Bajo las condiciones óptimas previamente descritas se realizó la línea de calibrado (Figura 3.20), obteniendo los parámetros analíticos a partir de los resultados. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.13, en donde cabe destacar el límite de detección de 0.08 mM de glucosa obtenido de acuerdo al criterio de la IUPAC

[42] y un intervalo lineal de trabajo de 0.24-6.0 mM de glucosa. Los parámetros proporcionados por el método propuesto son adecuados para la determinación de glucosa en suero sanguíneo sin tratamiento.

Tabla 3.13. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, i (nA) vs [glucosa] (mM)

Parámetro	Valor
Raíz cuadrada de la varianza residual, S_e	0.25
Coefficiente de correlación, r^2	0.999
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$	-0.58 ± 0.60
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$ (nA mM ⁻¹)	10.77 ± 0.18
Repetitividad (%DSR, $n=3$, 4.0 mM)	1.0
Intervalo lineal (mM)	0.24-6.0
Límite de detección (mM)	0.08
Velocidad de análisis (muestras h ⁻¹)	6

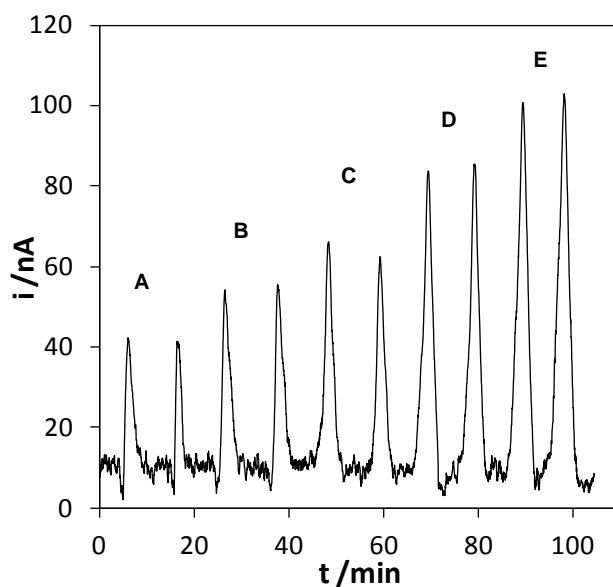


Figura 3.20. FIAgrama obtenido del análisis glucosa A) 0.5, B) 1.0, C) 2.0, D) 4.0 y E) 6.0 mM

3.2.3.5.4. Análisis de muestras

Para la determinación de glucosa en suero sanguíneo, la sangre fue recolectada en tubos al vacío sin coagulante. El plasma del suero sanguíneo se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, siendo almacenado a 4 °C hasta su análisis. El suero sanguíneo se inyectó en el sistema de flujo para la determinación de la glucosa bajo las condiciones óptimas (sin dilución). El análisis de cada muestra se realizó por triplicado. La exactitud del método propuesto se realizó comparando los resultados obtenidos con la metodología oficial de análisis de glucosa (espectrofotometría enzimática). Los resultados obtenidos se compararon mediante una prueba de t Student, encontrándose la $t_{calculada}$ para cada muestra y comparándose con la $t_{critica}$ al 95% ($t_{critica} = 4.30$). A partir de los resultados obtenidos (Tabla 3.14) se puede deducir que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos ($\alpha = 0.05$) por ambas metodologías.

Tabla 3.14. Datos obtenidos por el método propuesto y por la metodología oficial

Muestras	FIA	DER (n=3)	Espectroscopia enzimática	$t_{calculada}$
M1	8.80	0.44	8.78	0.09
M2	12.89	0.98	12.06	1.47
M3	4.18	0.34	3.78	2.07
M4	5.59	0.25	5.39	1.35
M5	5.67	0.36	6.17	2.40

$t_{critica} = 4.30$

3.3. DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE OXALATO

3.3. Desarrollo de un biosensor de oxalato

3.3.1. Antecedentes

El ácido oxálico es un ácido orgánico que proviene de alimentos y del propio cuerpo. Se puede encontrar presente en diferentes alimentos en altas concentraciones como el cacao, chocolate, avellanas, espinacas, rábano, frijoles entre otros, asimismo se encuentran presentes en tejidos de mamíferos y en los fluidos corporales. La concentración excretada de esta especie se le ha tomado un especial interés en los últimos años, debido a que dicha concentración es indicador de algunas enfermedades renales como son: hiperoxaluria, falla renal, piedras, insuficiencia pancreática [43].

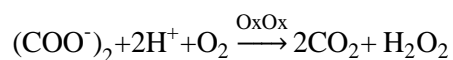
La mayoría de los cálculos renales están formados principalmente por oxalato de calcio. El oxalato de calcio puede encontrarse en dos formas principalmente como: oxalato de calcio monohidratado u oxalato de calcio dihidratado. El primero se encuentra preferentemente en pacientes con hiperoxaluria primaria, mientras que el segundo se encuentra en pacientes con hipercalciuria. Estudios epidemiológicos indican que los cálculos de oxalato de calcio y ácido úrico se han vuelto más comunes en los últimos años [44].

La cantidad de oxalatos excretados por la orina está determinado por la ingesta diaria, absorción intestinal, secreción tubular renal y la velocidad de síntesis endógena. Varios factores están clínicamente involucrados en la génesis de la hiperoxaluria incluyendo el alto consumo de precursores de oxalatos, deficiencia de piridoxina, hiperoxaluria primaria (tipo 1 y 2), ingesta alta de oxalato, hiperoxaluria estérica, formadores idiopáticos de piedras con una leve hiperoxaluria y la ausencia de "*Oxalobacter formigenes*" en la flora intestinal [45].

La hiperoxaluria se define como un nivel de oxalatos superior al intervalo normal, esta desempeña el papel más importante al influir en la saturación urinaria de oxalato de calcio. La sobresaturación urinaria favorece al proceso de cristalización del oxalato de calcio.

En sentido clínico la excreción de oxalato en orina es determinante como indicativo de un padecimiento renal, sin embargo no existe un método oficial para la estimación de la saturación urinaria de las sustancias litogénicas. Se han desarrollado diferentes técnicas analíticas para la cuantificación de los niveles de oxalato en orina. Las metodologías más utilizadas son la espectroscopia enzimática, cromatografía de líquidos y gases, electroforesis capilar y cromatografía iónica [46-49].

Los biosensores basados en enzimas han tenido un especial interés en diferentes áreas debido a que tienen una buena selectividad y repetitividad [50]. Los biosensores de oxalato se basan usualmente en el análisis de los productos de reacción entre el oxalato y el oxalato oxidasa (OxOx) en presencia de oxígeno, de acuerdo con la siguiente reacción:



Conforme a la reacción anterior, la concentración de oxalatos se puede determinar indirectamente por la medida del cambio de pH (proporcional a la concentración de CO_2), ó por la medida espectroscópica o electroquímica de la concentración de peróxido de hidrógeno [51, 52].

En la determinación directa del H_2O_2 mediante detección amperométrica se tienen que aplicar un potencial alrededor de 1.5 V (vs Ag/AgCl), donde se oxidan múltiples compuestos como son el oxígeno, Cl^- presentes en las muestras. El uso de mediadores como el ferroceno permite que la oxidación tenga lugar a un potencial cercano a 0.0 V (vs Ag/AgCl), minimizando así la interferencia que se pudiese encontrar en las muestras reales [10].

Los ligantes de tipo poli(pirazolil)borato, son conocidos como ligantes escorpionato, se encuentran entre los tipos más versátiles de ligantes tridentados, sin embargo también son bien conocidos los ligantes bi-dentados. Estos ligantes tienen una fórmula general $[\text{RR}'\text{B}(\text{pz})_2]$, donde pz es un anillo de pirazolilo, sustituido o no, y se coordinan a una gran variedad de elementos, por lo que se

conocen compuestos de estas agrupaciones tanto con metales de los grupos principales, con casi todos los metales de transición [53]. En estos compuestos, que responden a la fórmula general $[RR'B(\mu\text{-pz})_2ML_n]$, se forma un anillo de seis miembros que en la mayoría de los casos presenta una conformación de tipo bote. Esto hace que los grupos R y R' se encuentren en entornos diferentes, quedando el grupo R' en una disposición pseudoaxial dirigido hacia el metal, pudiéndose coordinar al centro metálico, como se muestra en la Figura 3.1.

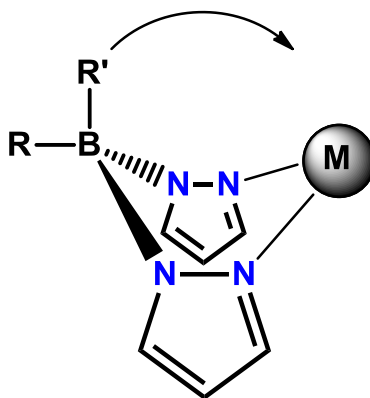


Figura 3.21. Representación del modo de coordinación de los ligantes escorpionato. R' = -H, -OR, -SR, -NR₂, -pz, -C—H agóstico

Cabe destacar los sistemas que comprenden anillos de mercaptopiridina, los cuales son más flexibles y logran obtener una mejor fuerza complejante entre el metal y el ligante. R' puede sustituirse por algún grupo funcional como: -H, -OH, -SR, -NMe₂. Los compuestos bidentados son las estructuras más básicas de la familia de los escorpionatos [53]. Este tipo de complejos no se han reportado como mediadores en los biosensores, por lo que han generado interés en los últimos años. Esta sección se realiza la síntesis y caracterización de un complejo de hierro con estas características, para su posterior utilización como mediador.

Por otra parte las partículas magnéticas han tenido un incremento en su utilización como soporte para la inmovilización de enzimas, por lo que se ha encontrado una amplia aplicación en el campo de la biotecnología y la biomedicina. La principal ventaja es que es fácil aislarlas del medio de trabajo y son altamente específicas dependiendo del tipo de modificación. Además las nanoestructuras magnéticas

permiten una inmovilización eficiente de la enzima sin afectar su estructura tridimensional y por consecuencia no es afectada la actividad enzimática [15]. Esta tecnología se ha utilizado en biosensores para la inmovilización de la tirosinasa [54].

El presente capítulo describe el desarrollo de un biosensor para la determinación de oxalatos, tomando en consideración la síntesis y utilización de un complejo de hierro-Bmp como un nuevo mediador hacia el H_2O_2 , así como la utilización de partículas magnéticas como soporte para la inmovilización de la enzima oxalato oxidasa en un sistema de inyección secuencial aplicado al análisis de orina.

3.3.2. Metodología

3.3.2.1. Reactivos

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada con una resistividad no menor al 18 MΩ cm. La disolución madre de ácido oxálico se prepara semanalmente en una concentración de 1.0 g L⁻¹; a partir de esta disolución se preparan diariamente disoluciones estándar en un intervalo de 5.0-50.0 mg L⁻¹. Una disolución buffer de acetatos (pH 4.0, 0.1 M) es utilizada como disolución acarreadora. Todos los reactivos utilizados son de grado analítico, oxalato oxidasa (0.7 U /mg), glutaraldehído (25% w/w), 3-aminopropiltrimetoxisilano, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tritón X-100, tetrametoxisilano, cloroformo, hexano de la marca Sigma Aldrich y FeSO₄·7H₂O, FeCl₃·6H₂O, NaOH, metanol, CaCl₂·2H₂O y NH₃ de la marca Merck.

3.3.2.2. Síntesis del complejo de [Fe(II)-Bmp]

Una disolución de metanol de 5 mL con FeCl₃·6H₂O (25 mg) se adiciona una disolución de metanol de 5 mL con K⁺[dihidrobis(2-tiopiridona)borato]⁻ (48 mg) y con 2-mercaptopiridina (20 mg) [55]. Un precipitado amarillo se forma inmediatamente y la mezcla se coloca en agitación constante durante 12 horas. El precipitado se lavó con 5 mL con cloroformo dos ocasiones y con hexano (5 × 4 mL), el complejo obtenido es Fe(II)[dihidrobis(2-tiopiridona)borato][3H₂O]Cl y la 2,2'-dipiridilo disulfuro. Rendimiento: 59 mg (0.07 mmol, 78%). Vibraciones por espectroscopia infrarroja ν_{B-H} = 2510; ν_{C-H₃} = 2850; ν_{C-H_{th}} = 2920 cm⁻¹. El estudio de resonancia magnética (NMR) sugiere que el complejo es de naturaleza paramagnética.

Para conocer el peso molecular de la parte catiónica del complejo se realizó análisis elemental, como se observa en la Figura 3.22 se tienen dos compuestos mayoritarios uno correspondiente al 2,2'-dipiridilo disulfuro con una masa molecular de 220.0208 g/mol y el complejo de hierro con una masa molecular de 343.0539 g/mol. El primero obtenido a partir de una reacción concertada y el segundo obtenido a partir de una complejación del ligante con el metal.

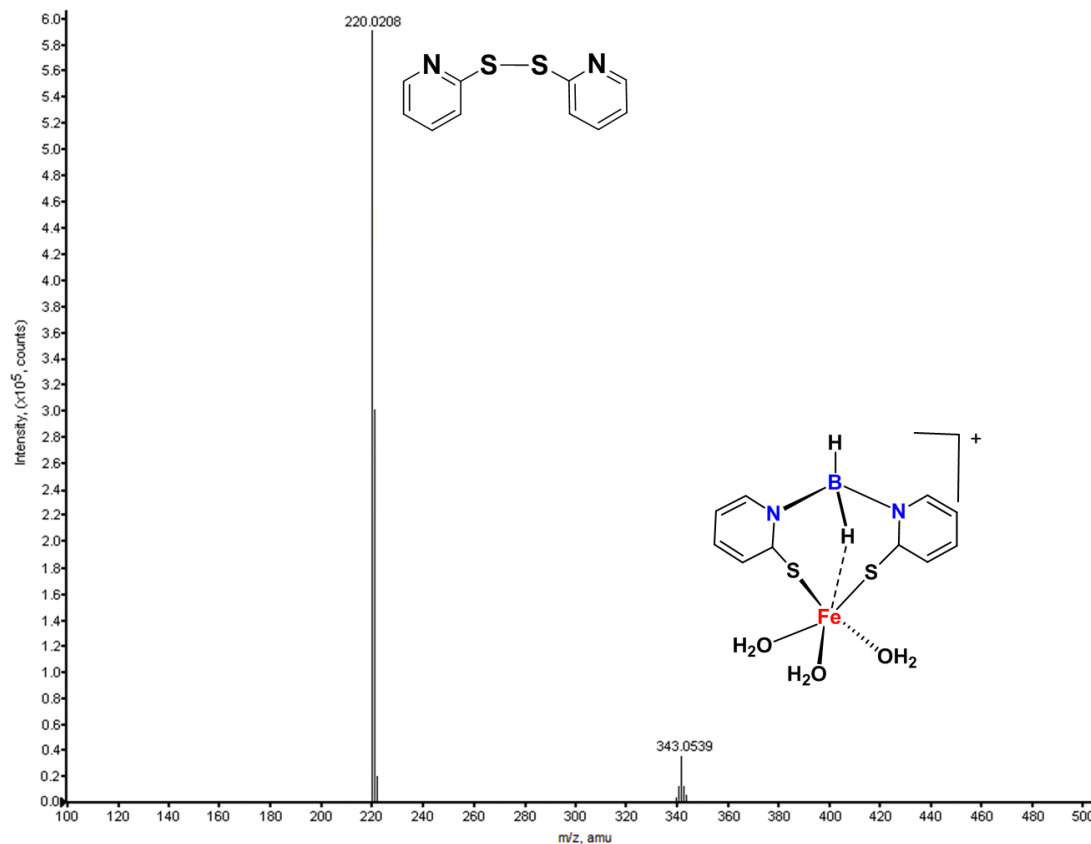


Figura 3.22. Diagrama del análisis elemental del complejo de hierro obtenido

El complejo obtenido se utiliza para modificar el electrodo de trabajo (Drop Sens 110A) de acuerdo a la siguiente metodología: se dispersan 10 mg del complejo en 5 mL de acetonitrilo. Se añaden 10 μ L de ésta disolución sobre la superficie del electrodo de carbono dejando evaporar la fase orgánica a temperatura ambiente durante 24 h.

3.3.2.3. Inmovilización del oxalato oxidasa

La oxalato oxidasa (OxOx) se inmovilizó sobre el soporte magnético de acuerdo a la siguiente metodología: se toman 50 mg del sólido magnético modificado con grupos amino y se dispersan en 5 mL de una disolución de glutaraldehído al 2.0 %. La mezcla se colocó en agitación durante 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo el sólido se lavó con 20 mL de agua desionizada previamente desoxigenada, después se lavó con una disolución buffer de fosfatos (pH 7.0, 0.1

M) previamente desoxigenada. Posteriormente el sólido se dispersa en 5 mL de una disolución que contiene 500.0 μL de OxOx (3.5 U), la dispersión se mantiene en agitación constante durante 6 horas a temperatura ambiente. Las partículas obtenidas se utilizaron en el sistema de inyección secuencial.

3.3.2.4. Diseño del sistema de análisis de inyección secuencial (SIA)

El sistema de inyección secuencial (Figura 3.23) consiste de una bureta multijeringa con velocidad programable (microBu 2030, Crison) utilizada para aspirar y dispensar las disoluciones de los reactivos, una válvula de selección de ocho vías (crison) y un bipotenciostato (Drop Sens μstat 200) como detector. Los diferentes conexiones utilizadas para el sistema fueron hechas con tubo Omnifit de 0.8 mm. El sistema fue controlado con el software Autoanalysis 5.0

El ciclo analítico optimizado inicia con la aspiración 10 μL de la suspensión magnética dopada con enzima (SM, 0.7 U mL^{-1}) dentro de reactor de 100 cm (RA) a un flujo de 30 mL min^{-1} . Estas partículas fueron llevadas hacia el detector electroquímico por la disolución acarreadora (DA, buffer de acetatos 0.1 M, pH 4.0) en donde son retenidas gracias a un campo magnético externo. Para renovar el agente de reconocimiento se retira el campo magnético externo y se repiten los pasos anteriores. El campo magnético externo fue impuesto por un imán de neodimio (Nd-Fe-B, 3.0 mm x 4.0 mm d.e., 1.3 T) colocado en la parte inferior del electrodo de trabajo.

Una vez formado el biosensor continúa la etapa de análisis. Inicialmente se aspiran 200 μL de una disolución que contiene la muestra (M), esta disolución se mezcla con la disolución acarreadora en un reactor de 50 cm (RB) a una velocidad de flujo de 1.0 mL min^{-1} , y se realiza la detección a un potencial de -0.2 V usando los electrodos modificados. Los electrodos serigrafados (Drop Sens 110A) que constan de electrodos auxiliares de carbono (EA), electrodos de referencia de Ag (ER) y electrodos de trabajo de grafito (ET, $\varnothing = 0.4 \text{ mm}$) a los cuales se les modificó impregnando 20 μg de Fe(II)-Bmp (dispersado en acetonitrilo) sobre la

superficie del electrodo y se deja secar el disolvente orgánico a temperatura ambiente.

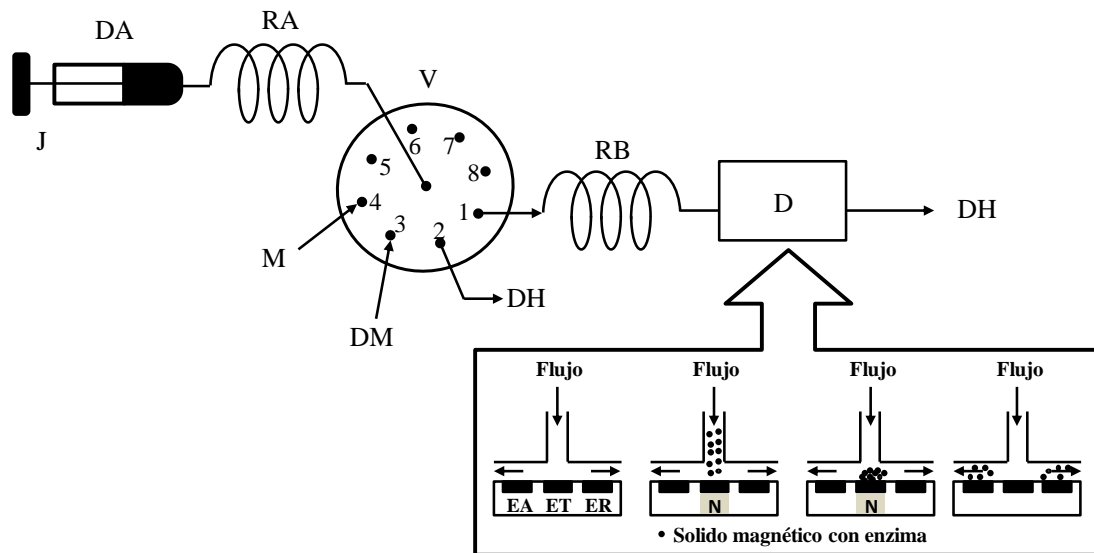


Figura 3.23. Diagrama del sistema de SIA usado para la determinación de oxalato. Jeringa (J), Disolución acarreadora (DA), Reactor de carga (RA), Válvula de selección (V), Muestra (M), Suspensión magnética dopada con enzima (SM), Reactor de mezcla (RB), Detector (D), Desechos (DH), Electrodo Auxiliar (EA), Electrodo de referencia (ER), Electrodo de trabajo (ET), Imán de neodimio (N)

La concentración de oxalatos se analizó en muestras reales por la metodología mencionada anteriormente. De forma comparativa se realizó el análisis usando el análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica (FIA-Vis). Esta metodología fue previamente validada para analizar oxalatos en muestras de orina [56].

La muestra fue tratada para su análisis en el sistema FIA-vis de acuerdo al siguiente protocolo. 5.0 mL de una muestra de orina se mezcla con 2.0 mL de una disolución saturada de CaCl_2 . La mezcla se centrifugada a 2500 rpm durante 5 min. La fase líquida es desechada y el precipitado obtenido se disuelve en 1.0 mL de H_2SO_4 0.1 M. La disolución obtenida es inyectada en el sistema FIA para la cuantificación de oxalatos mediante interpolación en la línea de calibrado obtenida del análisis de estándares de oxalato en un intervalo de concentraciones de 10.0 a 50.0 mg L^{-1} .

3.3.3. Resultados y discusión

3.3.3.1. Comportamiento electroquímico del Fe(II)-Bmp

En la Figura 3.24 se observan los voltamperogramas cíclicos utilizando los electrodo modificado con Fe(II)-Tmp en una disolución de buffer de acetatos (pH 4.0, 0.1 M) en ausencia de peróxido de hidrógeno y a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se puede observar un par redox bien definido ($E_{1/2}^{\circ} = -0.09$ V) correspondiente a sistema Fe(III)/Fe(II)'. Como puede observarse en la Figura 3.24b-i a medida que se incrementa la concentración de H_2O_2 provoca un aumento en la altura del pico catódico mientras en el pico anódico presenta un comportamiento inverso. La corriente catalítica tiene un incremento lineal con respecto al aumento de la concentración de H_2O_2 en un intervalo de 0.1 a 2.6 mM obtenida a partir de la voltamperometría cíclica a un potencial catódico de $E = -0.3$.

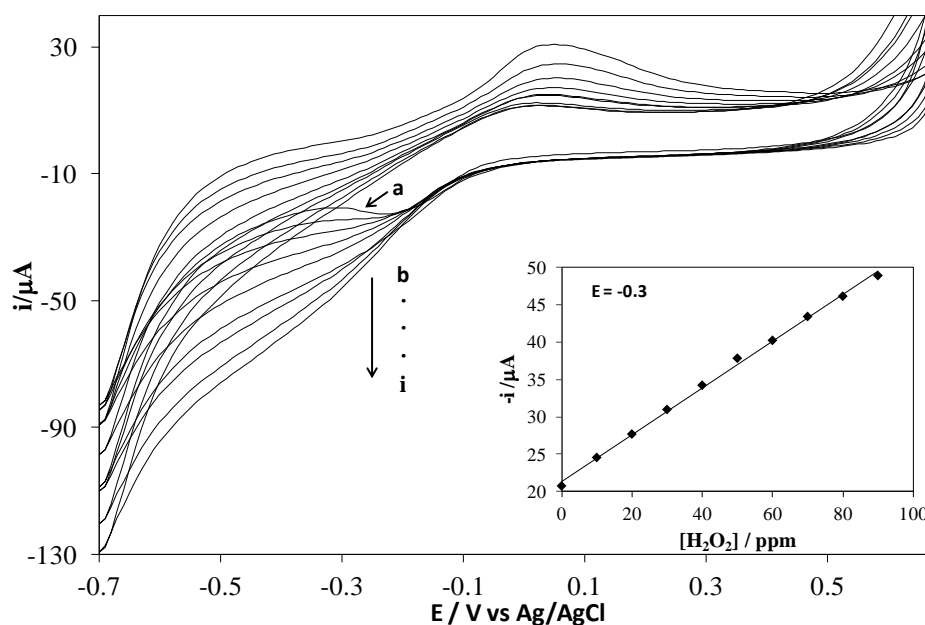


Figura 3.24. Voltamperogramas cíclicos del electrodo modificado con Fe-Bmp en una disolución buffer de acetatos (pH 4.0, 0.1 M), una velocidad de barrido de 50 mV min⁻¹, en diferentes concentraciones de H_2O_2 . Grafico insertado: Corriente del pico catódico (μ A) vs $[H_2O_2]$ (mM).

El intervalo de concentraciones puede mejorarse al usar la detección amperométrica. La reversibilidad, estabilidad, reproducibilidad y la eficiente cinética de transferencia electrónica del electrodo modificado con el complejo Fe(II)-Bmp son apropiadas para ser utilizado como mediador en la detección de peróxido de hidrógeno a intervalo de concentraciones bajos aplicando un potencial de -0.2 V.

La influencia que tiene el pH sobre la respuesta catalítica fue estudiada en un intervalo de pH de 2.0 – 10.0 utilizando una disolución Britton-Robinson 0.1 M para ajustar el pH. Todas las experiencias se realizaron a una concentración de peróxido de hidrógeno de 1.0 mM. Se tomó como punto de referencia el incremento de la corriente del pico catódico, por lo que se obtiene un aumento de la altura catódica a medida que se aumenta el pH (2.0-4.0), obteniéndose un máximo entre 4.0-5.0 seguido de una disminución de la respuesta catalítica a valores de pH mayores, este efecto se atribuye al comportamiento catalítico del complejo de Fe(II) a los diferentes pHs impuestos. Por lo que se elige como valor óptimo un pH 4.0 (disolución buffer de acetatos). Este valor de pH corresponde al valor óptimo utilizado durante la reacción enzimática de la enzima OxOx [52].

Del mismo modo se evaluó el efecto del potencial aplicado en el electrodo de trabajo sobre la respuesta catalítica mediante detección amperométrica. La señal amperométrica muestra un incremento de la corriente de respuesta en presencia de peróxido de hidrógeno cuando se disminuye el potencial aplicado (0.0 a -0.3 V) y a potenciales más catódicos (-0.4 a -0.5) no muestra un aumento significativo en la señal de respuesta en presencia de peróxido de hidrógeno. En base a esto se seleccionó trabajar a un potencial de -0.3 V con la finalidad de minimizar las posibles interferencias que se pudiesen encontrar en muestras reales.

3.3.3.2. Optimización de las variables del sistema

La cuantificación de oxalatos se determina de acuerdo a la secuencia de reacciones que se muestran en la Figura 3.25. La eficiencia de estas reacciones se ven afectadas por varios factores, por esta razón es necesario optimizar estas

variables. El método de optimización seleccionado para optimizar las variables es el diseño de parámetros Taguchi (DPT). Los resultados obtenidos se analizan estadísticamente para obtener el óptimo de cada variable.

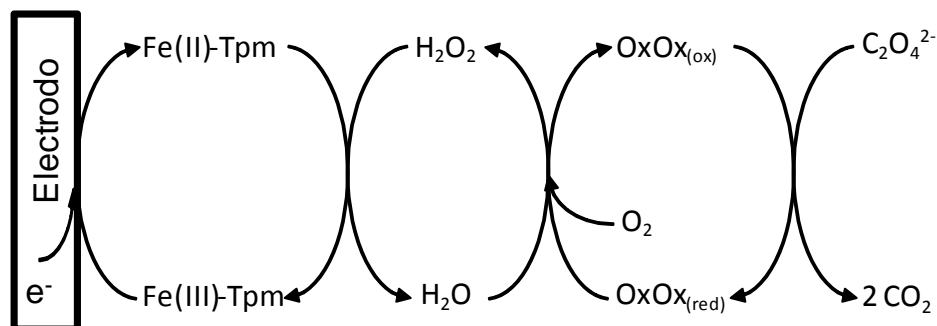


Figura 3.25. Esquema de reacciones para la determinación redox de oxalatos

En la metodología analítica propuesta, la respuesta deseada es la altura máxima de la señal analítica (corriente, μA). Las variables de flujo a optimizar en el sistema de inyección secuencial son: la concentración de enzimática OxOx (volumen aspirado de la suspensión magnética dopada con enzima), la velocidad de flujo de la solución acarreadora, el volumen de la muestra aspirado para ser inyectado hacia el detector y la longitud del reactor desde la válvula selectora hacia el detector. La matriz de diseño seleccionada debe de tener un número de columnas igual o mayor que el número de grados de libertad del sistema. Los tres parámetros seleccionados para cada factor se consideraron análisis preliminares.

Se ha demostrado que el control de la velocidad de flujo (Q) en sistemas enzimáticos determina la producción de H_2O_2 ya que establece el tiempo de la reacción enzimática. En un sistema de SIA con inyección de partículas dopadas con enzima es necesario la aplicación de velocidades de flujo $<1.0 \text{ mL min}^{-1}$ para tener un incremento en la producción de H_2O_2 . La longitud del reactor (RB) debe ser lo suficientemente grande como para ajustar el pH del volumen de la muestra inyectada (M) con respecto a la disolución transportadora. La suspensión magnética modificada con enzima (DM) debe ser lo suficientemente grande para

tener una buena producción de H₂O₂, así como debe de permitir el transporte del H₂O₂ hacia la superficie del electrodo modificado.

En la Tabla 3.15 se puede observar la matriz del diseño Taguchi, los parámetros de cada factor utilizados para la optimización experimental y los resultados obtenidos de cada experimento con respecto a la intensidad de corriente obtenido. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para lograr calcular el error residual, por lo que el número de experimentos realizados fue de 27 (9 experimentos × 3 réplicas). Las experiencias se realizaron utilizando una disolución que contenía 50.0 mg L⁻¹ de ácido oxálico.

Tabla 3.15. L₉(3⁴) Matriz ortogonal y resultados promedio obtenidos para cada experimento

DM (μl) ^a	Q (ml min ⁻¹)	RB (cm)	M (μl)	Intensidad de pico, μA (%DER, n=3)
10	0.50	30	100	1.54(0.23)
10	0.75	50	150	2.13(0.05)
10	1.00	70	200	2.62(0.10)
20	0.50	50	200	1.77(0.08)
20	0.75	70	100	0.71(0.28)
20	1.00	30	150	1.53(0.26)
30	0.50	70	150	0.38(0.37)
30	0.75	30	200	0.59(0.09)
30	1.00	50	100	0.40(0.13)

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el mínimo de variables posible para calcular el óptimo de cada variable. Todos los cálculos se realizaron con la ayuda del software ANOVA-TM v2.5. Los resultados obtenidos por este análisis se muestran en la Tabla 3.16. Los valores de la varianza proporcional (F) y el valor de la varianza crítica (F_{crítica} = 4.56, a un 95 % de confianza) demuestran que todos los factores tienen una influencia crítica sobre la

señal analítica ($F_{\text{calculada}} > F_{\text{crítica}}$). El factor con una mayor influencia en la respuesta fue el volumen de la suspensión magnética dopada con enzima, el cual contribuye con 77.34 % del total de la varianza, seguido por el volumen de inyección de la muestra con 16.82 % de contribución en la varianza. La contribución del error residual fue de 0.01 indicándonos que se realizó una buena selección de los parámetros experimentales.

Tabla 3.16. Análisis de la varianza de cada intensidad de corriente de la Tabla anterior

Origen de la varianza	Varianza	Varianza proporcional (F) ^a	Influencia (%) ^b
DM	6.300	11340	77.34
Q	0.345	621	4.24
RB	0.130	234	1.60
M	1.370	2466	16.82
Residual	0.001		0.01

^a La varianza crítica para un nivel de confianza del 95 % es de $F_{\text{crítica}} = 4.56 (2, 18)$

^b La influencia es calculada: $100 \times (\text{varianza} / \text{Suma total de las varianzas})$

La Figura 3.26 muestra el efecto que aporta cada factor de control en la variable de salida, en donde se puede distinguir que el volumen de la suspensión magnética dopada con enzima es la más importante. Los valores óptimos de cada factor a partir de la respuesta máxima son: volumen de la suspensión magnética dopada con enzima (DM), 10 μL , velocidad de flujo (Q), 1.0 mL min^{-1} , longitud del reactor (RB), 50 cm, volumen de la muestra inyectada (M), 200 μL . La combinación de las condiciones óptimas genera una señal máxima. La velocidad flujo de aspiración de las disoluciones utilizadas fue de 30 mL min^{-1} lo que promueve la turbulencia del flujo que contribuye la mezcla de la muestra y la solución acarreadora, permitiendo incrementar la velocidad de flujo del método.

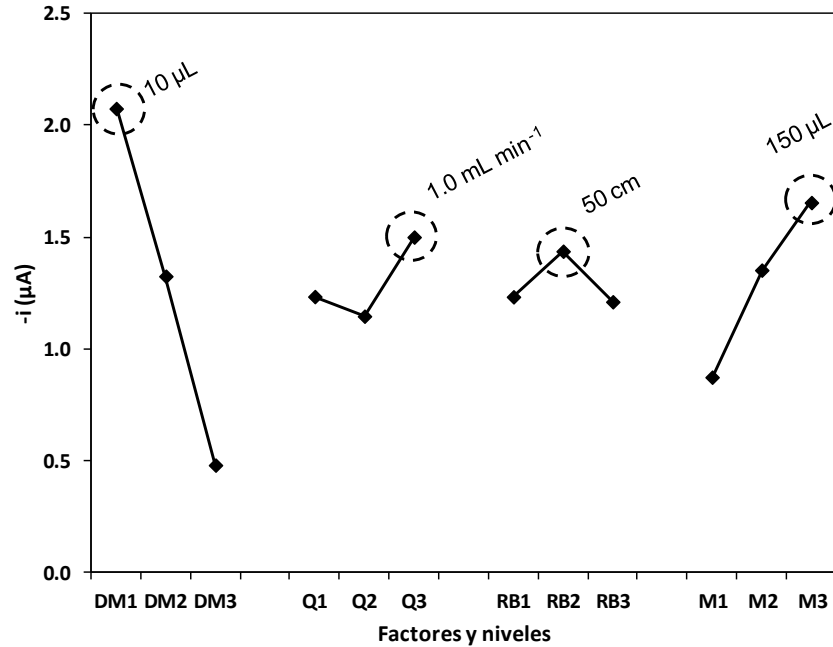


Figura 3.26. Efectos de la interacción de factores de control sobre la señal analítica (μA)

3.3.3.3. Parámetros analíticos del método

Bajo las condiciones óptimas obtenidas para el sistema SIA se elaboró la línea de calibrado (Figura 3.27) a partir de disoluciones estándares de oxalatos en un intervalo de concentraciones de 5.0 a 50.0 mg L^{-1} . La línea de calibrado se construye a partir de la media de las intensidades de pico (μA) de cada disolución estándar. La Tabla 3.17 se muestran los parámetros de regresión obtenidos a partir de la línea de calibrado, en donde cabe destacar el límite de detección calculado de acuerdo al criterio de la IUPAC [42]. La reproducibilidad del método se expresa como la desviación estándar relativa (%DER), para tres determinaciones (realizadas en diferentes días) usando una muestra dopada con una concentración del analito de 3.0 mg L^{-1} ; fue de 2.2 %. Los resultados de la línea de calibrado se utilizaron para calcular la repetitividad de las determinaciones encontrando un valor de menor al 2 % para todos los estándares. Bajo las condiciones óptimas se pueden realizar 30 determinaciones por hora.

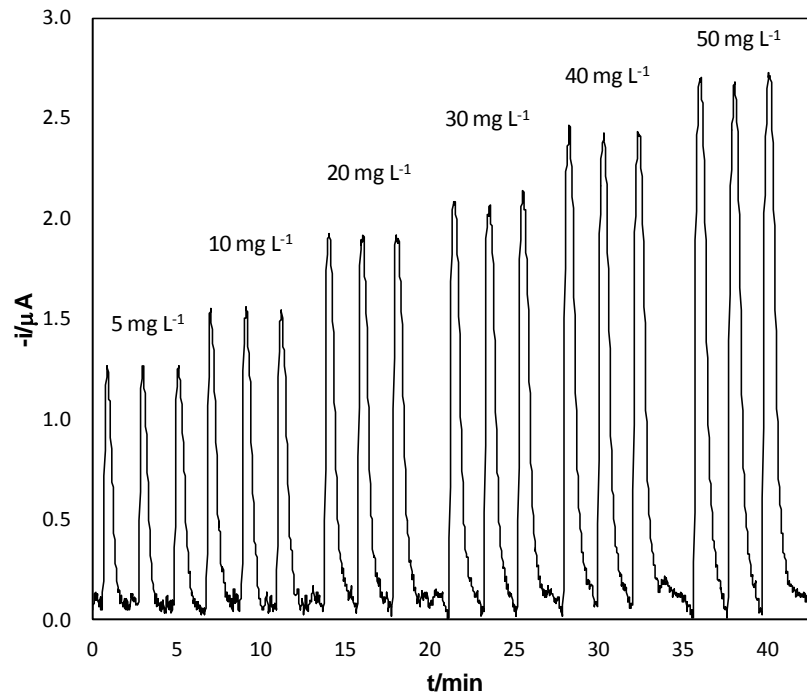


Figura 3.27. Línea de calibrado en un intervalo de concentración de oxalatos de 5.0-50.0 mg L⁻¹

Tabla 3.17. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, altura de pico (μA) vs [oxalato] (mg L⁻¹)

Parámetro	Valor
Raíz cuadrada de la varianza residual, S _e	0.009
Coefficiente de correlación, r ²	0.999
Ordenada en el origen, b ₀ ±ts(b ₀)	0.017±0.019
Pendiente, b ₁ ±ts(b ₁) (μA L mg ⁻¹)	0.031±0.001
Repetitividad (%DER, n=3, 3.0 mg L ⁻¹)	0.7
Reproducibilidad (%DER, n=3, 3.0 mg L ⁻¹)	2.2
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	3.0-50.0
Límite de detección (mg L ⁻¹)	1.0
Velocidad de análisis (muestras h ⁻¹)	30

Adicionalmente se evaluaron las posibles interferencias presentes en muestras reales, para ello se eligieron los compuestos con una posible interferencia que se encuentran en la orina como son: urea, ácido úrico, ácido ascórbico y ácido salicílico. Las disoluciones estudiadas contenían 20.0 mg L⁻¹ de oxalato y una mayor concentración del interferente en una proporción 10:1 (interferente:analito). La concentración de cada interferente fue evaluada con respecto a la variación de la señal analítica del oxalato, observándose que no existe una variación superior de la señal 5.0 % compara cuando no se tiene la presencia de interferente. Lo que indica que no existirá interferencia significativa cuando se realicen experiencias en muestras reales. También se pueden considerar al límite de detección e intervalo lineal de trabajo adecuados para el análisis de orina en personas sanas que presentan un intervalo de concentración de 0.0 - 20 mg L⁻¹, así como a las personas formadoras de piedras que presentan un intervalo de concentraciones > 20 mg L⁻¹.

3.3.3.4. Análisis de muestras reales

El método descrito se aplicó al análisis de oxalatos en muestras de orina de pacientes aparentemente sanos. Las muestras se recolectaron y se clasificaron tomando en cuenta la edad y el género. Cada grupo está constituido por tres muestras diferentes a las cuales se realizaron análisis por triplicado para conseguir datos estadísticos. Los resultados obtenidos por esta metodología se presentan en la Tabla 3.18, los valores obtenidos se compararon con los obtenidos mediante la metodología FIA-Vis. Para cada muestra se toma el promedio de las concentraciones (n=3) adquiridos por ambas metodologías y son comparadas entre sí con la ayuda de una prueba t-student asumiendo varianzas comparables. Los valores de $t_{\text{experimental}}$ se comparan con la t_{critica} con un intervalo de confianza del 95% ($t=2.78$, $\alpha=0.05$, $n=4$). Como puede observarse no existe diferencia significativa entre ambos métodos ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{critica}}$). Los resultados de la concentración de oxalatos se encuentran en el intervalo de 10.5-37.4 mg L⁻¹ en

personas sanas tanto masculinas como femeninas respectivamente. Estos valores son comparables con concentraciones encontradas en muestras de orina [57]

Tabla 3.18. Concentraciones de oxalato en orina (mg L^{-1} , media \pm intervalo de confianza) en personas sanas mediante la metodología SIA y por espectroscopía

Grupos por edad (años)	Sexo	[Oxalato](mg l^{-1})		$t_{\text{experimental}}$
		SIA	FIA- Vis	
Niños (1-20)	Masculino	10.5 \pm 4.0	10.8 \pm 4.3	0.15
	Femenino	17.2 \pm 3.8	17.4 \pm 1.9	0.19
Adultos (21-45)	Masculino	21.0 \pm 6.3	20.5 \pm 2.2	1.35
	Femenino	20.3 \pm 1.2	21.1 \pm 2.3	1.23
Ancianidad (>45)	Masculino	23.5 \pm 2.3	23.6 \pm 2.4	0.08
	Femenino	37.4 \pm 4.1	36.8 \pm 3.5	0.15

$t_{\text{critica}} = 2.78$

3.4. Conclusiones

- a) El complejo $[\text{Fe}(\text{tris}(3,5\text{-dimetil-pirazolil})\text{borato})_2]^+[\text{FeCl}_4]^-$ se sintetizó, caracterizó y fue utilizado como mediador para la determinación de H_2O_2 , las características obtenidas son similares a otros mediadores descritos para la determinación de glucosa.
- b) Se ha desarrollado un sistema FIA con detección amperométrica el cual permite la determinación de glucosa utilizando electrodos planos modificados con $\text{Fe(III)}[\text{tris}(3,5\text{-dimetil-1-pirazolil})\text{borato}]_2\text{-FeCl}_4$ y la enzima GOD en disolución. Los límites de detección e intervalos lineales fueron adecuados para su aplicación en el análisis de glucosa en muestras de suero sanguíneo. El sistema diseñado no se ve afectado por los interferentes contenidos en las muestras debido a que se utiliza un potencial de detección relativamente bajo de 0.06 V, minimizando el efecto matriz. Adicionalmente el sistema alcanza una velocidad de análisis de 60 muestras h^{-1} lo que lo hace competitivo con otras metodologías propuestas.
- c) El uso de soportes magnéticos permite una inmovilización efectiva de GOx, permitiendo su aplicación como reactor magnético en una minicolumna, dando lugar a la reacción enzimática previamente a la detección amperométrica.
- d) La combinación del reactor magnético con el electrodo modificado permite determinar glucosa en el intervalo de interés clínico. El método propuesto se aplicó para el análisis de glucosa en suero sanguíneo. La metodología propuesta es una nueva alternativa para la determinación de glucosa en muestras reales.
- e) Los resultados demuestran que la modificación de los electrodo con el complejo Fe(II)-Bmp presentan una respuesta adecuada para la determinación de peróxido de hidrógeno en el intervalo de interés para su posterior análisis de los iones oxalato.

- f) La combinación del uso del SIA con la enzima inmovilizada permite la renovación de las partículas magnéticas en línea. El biosensor es renovable y la superficie del electrodo conserva su sensibilidad por un periodo de tiempo mayor (aprox. 6 meses de vida útil).

3.5. Referencias

- [1] H Kenneth Walker, MD, W Dallas Hall, MD, and J Willis Hurst, MD., *Clinical Methods*, 3rd edition, The History, Physical, and Laboratory Examinations, H. Kenneth Walker, Chapter 1. The Origins of the History and Physical Examination, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, Boston: Butterworths; 1990.
- [2] K. J. Skogerboe, *Contributions of Analytical Chemistry to the Clinical Laboratory*, *Analytical Chemistry*, 1988, 60 (22), pp 1271A–1278A.
- [3] Wolfgang Ehrfeld, *Electrochemistry and Microsystems*, *Electrochimica Acta*, 48, 20–22, (2003), 2857-2868
- [4] A. Salimi, B. Kavosi, R. Hallaj, A. Babaeic, *Fabrication of a Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Immobilization of Osmium Complex and Glucose Oxidase onto Carbon Nanotubes Modified Electrode*, *Electroanalysis*, 21, (2009) 909-917
- [5] Y. Luo, H. Liu, Q. Rui, Y. Tian, *Detection of Extracellular H₂O₂ Released from Human Liver Cancer Cells Based on TiO₂ Nanoneedles with Enhanced Electron Transfer of Cytochrome c*, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 3035-3045
- [6] P. R. Solanki, S. K. Arya, Y. Nishimura, M. Iwamoto, B. D. Malhotra, *Cholesterol Biosensor Based on Amino-Undecanethiol Self-Assembled Monolayer Using Surface Plasmon Resonance Technique*, *Langmuir*, 23 (2007) 7398-7403
- [7] Jiri Janata, Mira Josowicz, D. M. DeVaney, *Chemical Sensors*, *Analytical Chemistry*, 66, (1994) 207R-228R.

- [8] J. Janata, M. Josowicz, P. Vanssek, D. M. DeVaney, *Chemical Sensors, Analytical Chemistry* 70 (1998) 179-208
- [9] J. M. P. Carrazón, P. S. Batanero, *Química electroanalítica fundamentos y aplicaciones*, Editorial Síntesis, 1999
- [10] A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Mediated biosensor, Biosensors & Bioelectronics* 17 (2002) 441-456
- [11] A. D. Ryabov, V. S. Kurova, E. V. Ivanova, R. Le Lagadec, L. Alexandrova, *Redox mediation and photomechanical oscillations involving photosensitive cyclometalated Ru(II) complexes, Glucose Oxidase, and Peroxidase, Analytical Chemistry* 77(2005) 1132-1139
- [12] J. J. Kulis, V. S. A. Laurinavicius, M. V. Perliakiene, V. V. Gureviciene, *The determination of glucose, hypoxanthine and uric acid with use of bi-enzyme amperometric electrodes, Analytica Chimica Acta*, 148 (1989) 13-18
- [13] S. Alegret, M. Valle, A. Merkoci, *Sensores electroquímicos*, Editorial: Servei de publicacions Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, 2004.
- [14] D. Diamond, *Principles of chemical and biological sensors, Chemical Analysis*, 150, 1998
- [15] M. Koneracká, P. Kopčanský, M. Timko, C.N. Ramchand, Z.M. Saiyed, M. Trevan, A. Sequeira, *Immobilization of enzymes on magnetic particles*, in: Guisan, J.M. (Eds.), *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press Inc., New Jersey, (2006) pp. 217-228.
- [16] J. Li, R. Yuan, Y. Chai, X. Che, *Fabrication of novel glucose biosensor based on Pt nanoparticles-decorated iron oxide-multiwall carbon nanotubes magnetic composite, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (2010) 8-14.
- [17] B. R. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*, John Wiley and Sons, Ltd, 2002, pp 154-160.

- [18] J. W. Baynes, M. H. Dominiczak, *Bioquímica médica*, (2ª ed.) 2006; Elsevier España, S.A.
- [19] M. J. Cipolla, J. A. Godfrey, Effect of hyperglycemia on brain penetrating arterioles and cerebral blood flow before and after ischemia/reperfusion, *Translational Stroke Research*, 1 (2010) 127-134.
- [20] R. Rodríguez, OCDE: México supera a EU en obesidad, *El universal*, México D.F., a 25 de noviembre de 2010.
- [21] L. Jiang, H. Liu, J. Liu, Q. Yang, X. Cai, A sensitive biosensor based on Os-complex mediator and glucose oxidase for low concentration glucose determination, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 619–620 (2008) 11–16.
- [22] J. C. Pickup, F. Hussain, N. D. Evans, O. J. Rolinski, D. J. S. Birch, Fluorescence-based glucose sensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 20 (2005) 2555-2565.
- [23] L. JieHua, Z. Hui, Z. ShuShrng, New bienzymatic strategy for glucose determination by immobilized-gold nanoparticle-enhanced chemiluminescence, *Science in China Series B: Chemistry*, 52 (2009) 196-202.
- [24] A. C. A. Oliveira, V. C. Assis, M. A. C. Matos, R. C. Matos, Flow-injection system with glucose oxidase immobilized on tubular reactor for determination of glucose in blood samples, *Analytica Chimica Acta*, 553 (2005) 213-217.
- [25] A. Nomura, S. Shin, O. O. Mehdi, J.M. Kauffmann, Preparation, characterization, and application of an enzyme-immobilized magnetic microreactor for Flow Injection Analysis, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 5498-5502.
- [26] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, A glucose biosensor using methyl viologen redox mediator on carbon film electrodes, *Analytica Chimica Acta* 532 (2005) 145-151.

- [27] D. M. Tellers, S. J. Skoog, R. G. Bergman, T. B. Gunnoe, W. D. Harman, Comparison of the relative electron-donating abilities of hydridotris(pyrazolyl)borate and cyclopentadienyl ligands: different interactions with different transition metals, *Organometallics* 19 (2000) 2428.
- [28] A.K. Singh, V. Aggarwal, U.P. Singh, Nickel pyrazolyl borate complexes: Synthesis, structure and analytical application in biological and environmental samples as anion selective sensors, *Talanta* 77 (2008) 718-726.
- [29] U.P. Singh, V Aggarwal, A.K. Singh, S. Mehtab, Nickel Pyrazolyl Borate Complex: Synthesis, Structure, and Analytical Application as Benzoate Selective Sensor, *Electroanalysis* 21 (2009) 172-178.
- [30] V.H. Sima, S. Patris, Z. Aydogmus, A. Sarakbi, R. Sandulescu, J.M. Kauffmann, Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: Application to the skin whitening agents, *Talanta* 83 (2011) 980-987.
- [31] J.M. Bosques-sendra, L. Gamiz-Gracia, A.M. Garcia-Campaña, An overview of qualimetric strategies for optimisation and calibration in pharmaceutical analysis using flow injection techniques, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003) 863-874.
- [32] A. Nomura, S. Shin, O.O. Mehdi, J.M. Kauffmann, Preparation, Characterization, and Application of an Enzyme-Immobilized Magnetic Microreactor for Flow Injection Analysis, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 5498-5502.
- [33] J. R. Sheets, F. A. Schultz, Coupled electron-transfer and spin-exchange reactions of metal-bis[tris(pyrazolyl)methane] complexes, *Polyhedron* 23 (2004) 1037-1043.
- [34] E. Barrado, F. Prieto, M. Vega, Polanco, F. F., Optimization of the operational variables of a medium-scale reactor for metal-containing wastewater purification by ferrite formation, *Water Research* 32 (1998) 3055-3061.

- [35] K. Aguilar-Arteaga, J.A. Rodriguez, J.M. Miranda, E. Barrado, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion–HPLC, *Talanta* 80 (2010) 1152-1157.
- [36] S.J. Mason, C.M. Hill, V.J. Murphy, D. O'Hare, D.J. Watkin, Synthesis, crystal structures and magnetic properties of salts containing bis[hydrotris(3,5-dimethyl-1-pyrazolyl)borate]iron(III), *Journal of Organometallic Chemistry* 485 (1995) 165-171.
- [37] C.G. Hong, A.J. Zhou, M.L. Tong, Bis[hydrotris(1-pyrazolyl)borato- k^3N,N',N'']iron(III) tetrachloroferrate(III) acetonitrile solvate, *Acta Crystallographic Section E* 61 (2005) m1774-m1776.
- [38] S. Dutz, J. H. Clement, D. Eberbeck, T. Gelbrich, R. Hergt, R. Müller, J. Wotschadlo, M. Zeisberger, Ferrofluids of magnetic multicore nanoparticles for biomedical applications, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (2009) 1501–1504.
- [39] G. L. Long, J. D. Winefordner, Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition, *Analytical Chemistry* 55 (1983) 712A-724A.
- [40] C. Lei, J. Deng, Hydrogen Peroxide Sensor Based on Coimmobilized Methylene Green and Horseradish Peroxidase in the Same Montmorillonite-Modified Bovine Serum Albumin-Glutaraldehyde Matrix on a Glassy Carbon Electrode Surface, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 3344-3349.
- [41] P. Kotzian, P. Brazdilova, K. Kalcher, K. Vytras, Determination of Hydrogen Peroxide, Glucose and Hypoxanthine using (Bio)Sensors Based on Ruthenium Dioxide-Modified Screen-Printed Electrodes , *Analytical Letters* 38 (2005) 1099-1113.
- [42] L. A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Pure & applied Chemistry* 67 (1995) 1699-1723.

- [43] A. Verhulst, M.E. De Broe, Oxalate. In: Clinical nephrotoxins. Renal injury from drugs and chemicals, 3rd ed.; M.E. De Broe, G.A. Porter, W.M. Bennett, G. Deray, Eds.; Springer: New York, USA (2008) pp. 749- 756.
- [44] L. Maurice-Estépa, P. Levillain, B. Lacour, M. Daudon, Advantage of zero-crossing-point first-derivative spectrophotometry for the quantification of calcium oxalate crystalline phases by infrared spectrophotometry, *Clinica Chimica Acta*, 298 (2000) 1 –11.
- [45] Y. Ogawa, T. Miyazato, T. Hatano, Oxalate and Urinary Stones, *World Journal of Surgery* 24 (2000) 1154–1159.
- [46] M. Thakur, L. Goyal, C.S. Pundir, Discrete analysis of plasma oxalate with alkylamine glass bound sorghum oxalate oxidase and horseradish peroxidase, *Journal of Biochemical Biophysical Methods* 44 (2000) 77-88.
- [47] H. Li, X.S. Chai, N. DeMartini, H. Zhan, S. Fu, Determination of oxalate in black liquor by headspace gas chromatography, *Journal Chromatography A* 1192 (2008) 208-211.
- [48] A. Zhang, Y.L. Fang, J.F. Meng, H. Wang, S.X. Chen, Z.W. Zhang, Analysis of low molecular weight organic acids in several complex liquid biological systems via HPLC with switching detection wavelength, *Journal Food Composition and Analysis* 24 (2011) 449-455.
- [49] J.A. Muñoz, M. Lopez-Mesas, Development and validation of a simple determination of urine metabolites (oxalate, citrate, uric acid and creatinine) by capillary zone electrophoresis, *Talanta* 81 (2010) 392-397.
- [50] J. Perello, P. Sanchis, F. Grases, Determination of uric acid in urine, saliva and calcium oxalate renal calculi by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 824 (2005) 175-180

- [51] P.M. Ladwing, R.R. Liedtke, T.S. Larson, J.C. Lieske, Sensitive spectrophotometric assay for plasma oxalate, *Clinical Chemistry* 51 (2005) 2377-2380.
- [52] C.S. Pundir, M. Sharma, Oxalate biosensor: a review, *Journal Scientific & Industrial Research* 69 (2010) 489-494.
- [53] S. Trofimenko, Scorpionates, the coordination chemistry of polypyrazolylborate ligands, Imperial College press USA (1999) pp 3-17
- [54] X. Liu, H. Feng, J. Zhang, R. Zhao, X. Liu, D.K.Y. Wong, Tyrosinase immobilized magnetic nanobeads for the amperometric assay of enzyme inhibitors: Application to the skin whitening agents, *Biosensors & Bioelectronics* 32 (2012) 188-194
- [55] G. Dyson, A. Hamilton, B. Mitchell, G.R. Owen, A new family of flexible scorpionate ligands based on 2-mercaptopyridine, *Dalton Transactions* (2009) 6120-6126.
- [56] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, A. Sanz, Flow injection with spectrophotometric determination of oxalate, citrate and tartrate based on photochemical reactions, *Analytical Letters* 31 (1988) 1413-1427.
- [57] R. Chaudhary, C.S. Pundir, An electrochemical oxalate biosensor based on CA membrane bound sorghum oxalate oxidase, *Sensors & Transducers Journal* 113 (2010) 127-139.

ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LOS IONES Sc(III)

**SOBRE: (I) UN ELECTRODO INERTE DE W Y UN
ELECTRODO REACTIVO DE Al EN EL EUTÉCTICO**

LiCl-KCl

4.1. Introducción

Existen tres tipos de disolventes líquidos: disolventes líquidos moleculares, metales líquidos y líquidos iónicos. Los solutos disueltos pueden estar presentes en estado sólido, líquido o gaseoso. Los disolventes líquidos moleculares son los más comunes, incluyen aparte del agua, algunos disolventes orgánicos e inorgánicos como por ejemplo: el fluoruro de hidrógeno, amoníaco y dióxido de azufre; en este grupo pueden incluirse algunos fluidos supercríticos utilizados generalmente para separaciones. Dentro del grupo de disolventes metálicos muy pocos lo son a temperatura ambiente, un ejemplo típico es el mercurio. Los disolventes iónicos son, como su nombre indica, compuestos en estado líquido formados totalmente por iones. Si se utilizan a alta temperatura se denominan “*Sales Fundidas*”, reservándose habitualmente el término líquido iónico a aquellos que están en forma líquida por debajo de 100 °C y son considerados como un tipo de disolvente de tecnología “verde” [1].

Históricamente las Sales Fundidas fueron reconocidas como disolventes líquidos altamente iónicos a principios del siglo XIX, con los experimentos de Michael Faraday en 1834; recordemos que las leyes de la electrólisis se verificaron en halogenuros fundidos. Años más tarde, las sales fundidas adquirieron gran importancia en el proceso de obtención de aluminio por electrólisis de la alúmina disuelta en criolita fundida, inventado en 1886 por Paul Louis-Toussaint Héroult y un poco más tarde, de forma independiente, por Charles Martin Hall. Ese mismo año, Henri Moissan descubrió el flúor por electrólisis de una mezcla de HF-KF. Hoy en día, las aplicaciones de las sales fundidas han aumentado considerablemente, incluyendo áreas tan diversas como la electrometalurgia, las pilas de combustible y los reactores nucleares de 4ª generación.

A pesar de que durante décadas ha existido interés en utilizar líquidos iónicos a baja temperatura como electrolitos, sobre todo en baterías y electrodeposición, ha sido a partir de los noventa, con la proliferación de variedades líquidas y estables frente al oxígeno y a la humedad atmosféricos, cuando esta tecnología ha tomado relevancia en el campo de la electroquímica.

Las normativas medioambientales obligan a las industrias a desarrollar tecnologías limpias en las que se generen pocos residuos y/o sean fácilmente reciclables. Esto ha provocado la revisión de los procesos de producción en vigor y al desarrollo de otros nuevos. En este marco, las sales fundidas son cada vez más reconocidas como una alternativa a los disolventes clásicos (disoluciones acuosas que generan volúmenes de residuos muy grandes, y disoluciones orgánicas a menudo inestables y contaminantes). Las sales fundidas, tradicionalmente utilizadas en electrometalurgia y en pirometalurgia para la obtención de metales muy reactivos (p.e. alcalinos, lantánidos, etc.), se han visto en la necesidad de extender su campo de aplicación a otros procesos, que hasta la fecha se han realizado en medios acuosos y orgánicos, considerados demasiado contaminantes o inadaptados al reproceso. Por otra parte, la riqueza en las propiedades físicas y químicas específicas de las sales fundidas permite fácilmente la innovación en sectores como el nuclear, energético y de materiales avanzados.

Entre las particularidades de los líquidos iónicos a alta y baja temperatura, cabe destacar su gran conductividad eléctrica que unida a su amplia zona de electroactividad, favorece la concepción y desarrollo de procedimientos electrolíticos. La riqueza incomparable de su química (propiedades solvatantes, ácido-básicas y redox) permite llevar a cabo reacciones poco favorecidas en otros medios.

Por lo que respecta a sus propiedades físicas, es destacable su gran estabilidad, lo que permite desarrollar ciclos térmicos dependiendo del tipo de procedimiento, partiendo de una temperatura de utilización a medio ambiente hasta una temperatura de fusión de los silicatos. Las altas temperaturas favorecen además cinéticas de reacción elevadas. La elevada capacidad calorífica de las sales fundidas, las convierte en excelentes fluidos caloportadores con aplicación en centrales solares y reactores nucleares. Su densidad se encuentra en un intervalo de $1 - 4 \text{ mg/cm}^3$ dependiendo de su composición, lo que representa un gran abanico en el diseño de procedimientos de separación, principalmente, en la extracción electrolítica de metales (más pesados o más ligeros que el disolvente

utilizado). Además, son muy resistentes a la radiación, lo que permite su utilización en reactores nucleares.

A lo largo de los años la electroquímica a alta temperatura ha permitido el desarrollo de procesos para la electrodeposición de metales en estado metálico y en forma de aleaciones que en su combinación directa son muy difíciles de obtener. La principal ventaja que ofrecen las sales fundidas está unida al hecho de que debido a su gran diversidad, siempre podremos seleccionar el disolvente cuyas propiedades químicas, electroquímicas y fisicoquímicas sean las más adecuadas para llevar a cabo un determinado proceso. Entre el abanico de sales fundidas potencialmente utilizables como medios de reacción, destacan los medios formados por fluoruros y cloruros fundidos, ampliamente utilizados tanto en la industria como a nivel laboratorio.

En los últimos años está creciendo la demanda de: (i) los metales integrantes del grupo de las tierras raras REs (entre los que se incluyen los lantánidos ligeros y pesados, el itrio y aunque estrictamente no sea una tierra rara, el escandio) y (ii) sus aleaciones con un metal ligero (p.e. Al) y metales de transición (Ni, Co, etc), debido a sus aplicaciones en el campo de los materiales avanzados, por ejemplo como materiales magnéticos, materiales fluorescentes, sensores químicos, superconductores a alta temperatura, etc. Como se indicó anteriormente, la utilización de sales fundidas como medio de reacción representa una oportunidad única para la producción electrolítica y el electro-refinado de estos metales, así como para la electrosíntesis de sus aleaciones.

En los últimos años se ha puesto un especial interés sobre las aleaciones de Sc con Al debido a las características que proporciona el aluminio como son: mejora de su resistencia, soldabilidad, resistencia a la recristalización y corrosión, considerándolas como sustitutos a las aleaciones de Titanio y la fibra de carbono. Existen muy pocos datos bibliográficos acerca de la reducción electroquímica de Sc(III) en cloruros fundidos, en este sentido se mencionan los trabajos de Kononov et al [2] acerca de la reducción de Sc(III) en la mezcla NaCl-KCl sobre un electrodo inerte, y Kononov, et al [3] sobre la síntesis de aleaciones Sc-Ni en el

eutéctico LiCl-KCl. Con base en lo anteriormente expuesto, este capítulo se enfoca en el estudio electroquímico de ScCl_3 sobre electrodos inertes (W) y reactivos (Al) en el eutéctico LiCl-KCl en un intervalo de temperatura de 673-823 °K.

4.2. Metodología

4.2.1. Reactivos utilizados

Los reactivos utilizados son: LiCl (Sigma Aldrich, 99.0%), KCl (Sigma Aldrich, 99.0%), ScCl_3 anhidro (Sigma Aldrich, 99.9 %) y AgCl (Merck o Sigma Aldrich, 99.0 %).

Todos los reactivos se manipulan y almacenan en una caja de guantes “mBraun Labstar 50” bajo una atmosfera de argón “Alphagaz” de la firma Air liquide, con un contenido en $\text{H}_2\text{O} < 3\text{ppm}$ y en $\text{O}_2 < 2\text{ppm}$ (Figura 4.1).



Figura 4.1. Caja de guantes mBraun Labstar 50

La preparación de la celda electroquímica se realizó en caja de guantes, para ello se pesan en los crisoles de alúmina o carbono vitrificado las cantidades adecuadas de LiCl (35.88 g) y KCl (44.12 g) para conseguir 80.00g de la mezcla eutéctica de LiCl-KCl.

4.2.2. Celda de trabajo y horno

La celda de trabajo o reactor utilizado, que aparece fotografiada en la Figura 4.2, es una combinación de vidrio PYREX y cuarzo y consta de dos partes:

- Parte inferior: se compone de un cilindro de cuarzo de fondo plano de 110mm de altura y 65mm de diámetro externo, con un ensanchamiento en la parte superior, que sirve de sujeción al horno y sobre el cual se coloca la tapa. En su interior se introduce el crisol de alúmina o carbono vitrificado que contiene la mezcla eutéctica LiCl-KCl.
- Cuerpo superior o tapa de la celda: es de vidrio PYREX y está provista de ocho orificios de diferentes diámetros, por donde se introducen los electrodos, termopar y los tubos de entrada y salida de gases, utilizando una de las entradas para la adición de reactivos. (Figura 4.2).



Figura 4.2. Celda de trabajo y Tapa superior de la celda

Las dos partes de la celda se unen con grasa resistente a la temperatura, y se sujetan con uniones de acero. Los tapones de los orificios contienen juntas de teflón, para minimizar las fugas de gases al exterior y la entrada de oxígeno y humedad.

Una vez preparada la celda electroquímica en la Caja de guantes, se lleva al horno para proceder a su fusión (Figura 4.3). El horno utilizado durante la experimentación es un horno tubular de resistencia de Kanthal A1 de 145 mm de alto, con diámetro interno y externo de 70 y 160 mm respectivamente

(suministrado por TANER), conectado a un regulador West 3300 o West 8100 que mantiene la temperatura en ± 2 °K (Figura 4.4). La temperatura se midió con un termopar tipo K Ni-Cr/Ni (0 - 1371 °C), protegido por un tubo de alúmina inmerso en el baño fundido.

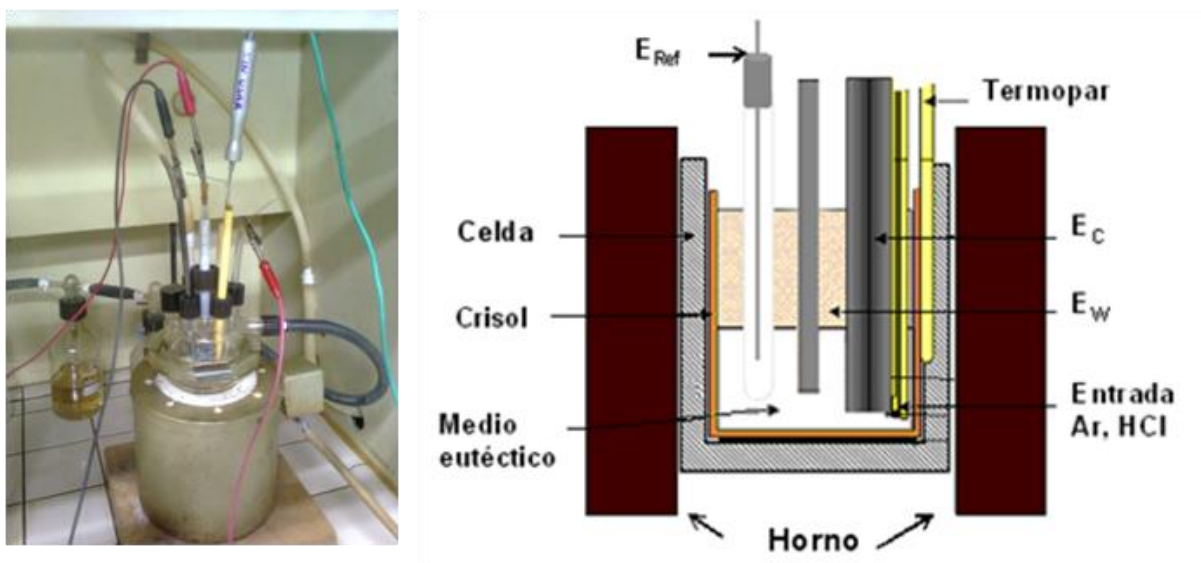


Figura 4.3. A) Horno TANER y celda de trabajo B) Esquema del montaje experimental, E_{Ref} : electrodo de referencia, E_C : contra electrod, E_W : electrodo de trabajo



Figura 4.4. Sistema regulador de la temperatura West 3300

4.2.3.- Sistema de control de emisiones al medio ambiente

Todos los experimentos se realizaron en una campana de extracción y con burbujeo de Argón en la celda de trabajo. Con objetivo de minimizar las emisiones

al medio ambiente, la celda de trabajo está conectada a una batería de frascos lavadores de gases (Figura 4.5) que permiten:

- Neutralizar el HCl mediante dilución, reacciones ácido-base y procesos de adsorción, minimizando así su salida al exterior.
- Evitar la entrada de humedad en la celda de trabajo mediante la utilización de H_2SO_4

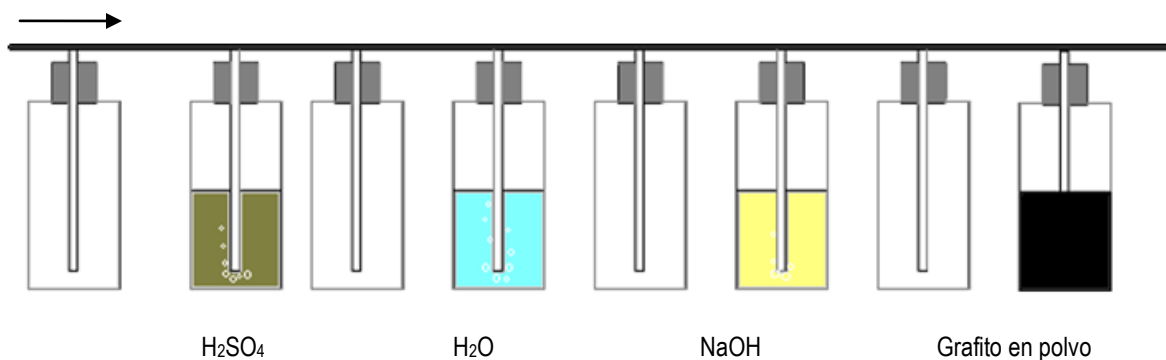


Figura 4.5. Circuito utilizado en la salida de gases

4.2.4. Electroodos

Para el estudio electroquímico se utilizaron tres diferentes tipos de electrodos de trabajo, los cuales se muestran en la Figura 4.6 y se explican a continuación

Electrodos de trabajo

- Hilo de Wolframio de 1mm de diámetro (Sigma Aldrich 99.99%), introducido en un tubo cerámico provisto de una regleta graduada
- Hilo de aluminio de 1mm de diámetro x 35 cm de longitud (99.99%, Sigma Aldrich)
- Placa de aluminio de 1 cm x 2.5 cm con un espesor de 0.5 mm (99.99%, Sigma Aldrich) este electrodo se utiliza en los procesos de electrolisis.

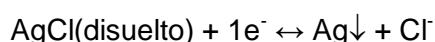
Contra electrodos

- Hilos de wolframio de 1.6 mm de diámetro (99.95% Alfa Aesar), introducidos en un tubo cerámico provisto de regleta. La superficie del contraelectrodo siempre es superior a la del electrodo de trabajo con objeto de conseguir una distribución adecuada de las líneas de corriente (la corriente no esté limitada).

- Barras de grafito de 6 mm de diámetro (Sofacel) para los experimentos de electrólisis.

Electrodo de referencia:

El sistema seleccionado como origen de la escala de potencial en cloruros fundidos es el sistema Cl_2/Cl^- , al que se asigna el valor 0.0 V, sin embargo este sistema es muy difícil de manejar, como ocurre con el sistema H^+/H_2 en disolución acuosa. El sistema más sencillo de preparar y el más utilizado en cloruros fundidos se basa en la pareja Ag^+/Ag



Se trata de un sistema reversible y muy reproducible en un amplio rango de concentraciones. Se conoce su respuesta a diversas temperaturas, por lo que los datos obtenidos con el son fácilmente transformables a la referencia Cl_2/Cl^- .

El potencial del electrodo Ag^+/Ag se puede transformar en datos respecto al sistema Cl_2/Cl^- mediante las siguientes ecuaciones [4]:

$$E_{Ref} = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 + \frac{RT}{F} \ln X_{\text{AgCl}}$$

$$E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 = -1.0910 + 0.0002924T$$

El electrodo se prepara para cada experimento utilizando un tubo pyrex cerrado por un extremo en el que se introduce una cantidad conocida de la mezcla eutéctica LiCl-KCl , AgCl en concentración 0.75 mol Kg^{-1} y un hilo de plata (1 mm de diámetro). El electrodo se cierra con un tapón de silicona.

El potencial del electrodo es bastante estable, logrando utilizarlo durante 120 horas consecutivas sin problemas.

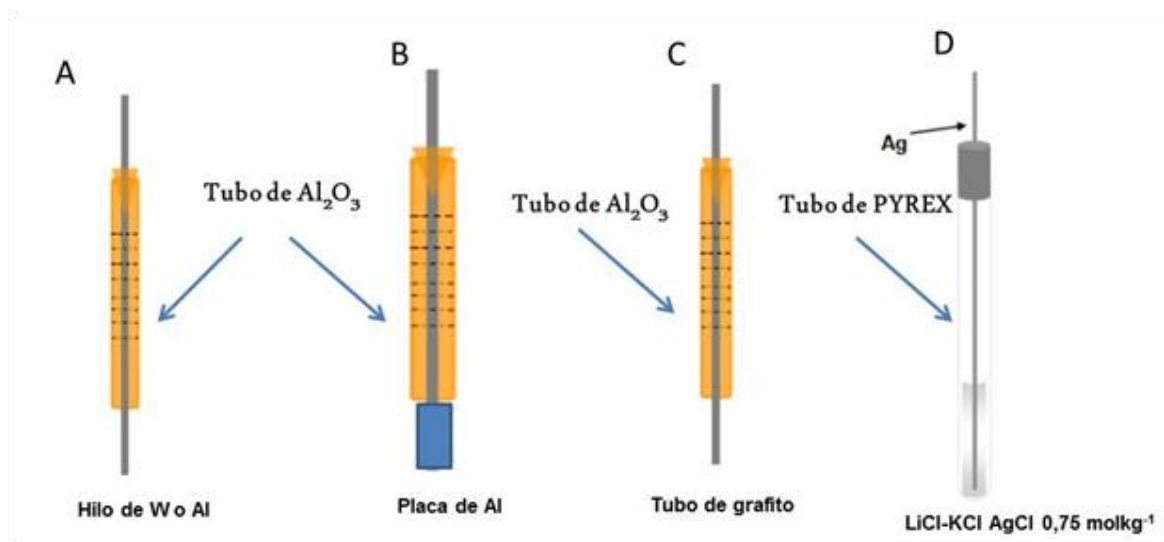


Figura 4.6. Electrodos utilizados durante la experimentación. A) Electrodo de trabajo W ó Al, contra electrodo W; B) Electrodo de trabajo placa de aluminio; C) Contra electrodo barra de grafito; D) Electrodo de referencia Ag/AgCl

4.2.5.- Equipos

El equipo utilizado para la adquisición de datos es EG&G Par Model 273 A, controlado por el software PAR EG&G M270 4, 6. (Figura 4.7).

Los datos han sido almacenado en disquetes 3 ½ y tratados con los siguientes programas:

- Echem software PAR EG&G M270 4, 6.
- Model 271 Cool Kinetics Analysis software 1.00.
- Condecom TM 2000 CV System version 1.20 EG&G Instruments
- Microsoft Office 2003 Excel



Figura 4.7. Potenciostatos y equipo informático

4.2.6.- Propiedades Fisico-Químicas del medio eutéctico LiCl-KCl

El diagrama de fases de las mezclas LiCl-KCl está representado en la Figura 4.8, ha sido estudiado por Aukrust [5]. En él se observa la existencia de un eutéctico a 626 °K (353°C) que corresponde a una composición de 41.5% de KCl y 58.5% de LiCl.

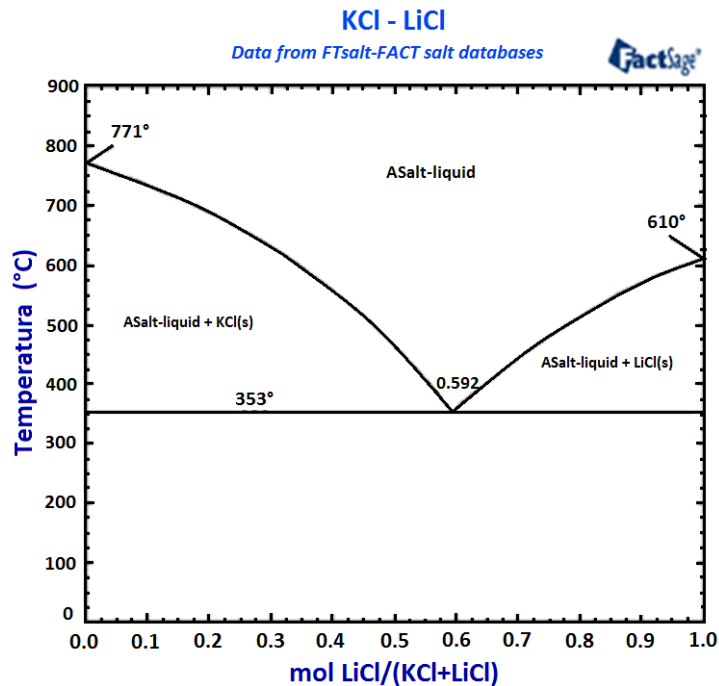


Fig 4.8. Diagrama de fases de las mezclas LiCl-KCl [5]

En la Tabla 4.1 se recogen las propiedades fisicoquímicas de la mezcla eutéctica LiCl-KCl a 723 °K (temperatura de trabajo)

Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas de la mezcla eutéctica LiCl-KCl [6]

	Expresión	T=723 °K
Temperatura de fusión / °C		354
Densidad / gcm ³	2.0286-5.267x10 ⁻⁴	1.65
Viscosidad/ mN s m ⁻²	0.087exp(20852.57/RT)	2.79
Conductividad/ Ω ⁻¹ cm ⁻¹	23.021 exp(-16204.9/RT)	1.55
Tensión superficial/ mN m ⁻¹	189.566-0.082T	130.03

Las disoluciones de Sc(III) utilizadas en este estudio estuvieron comprendidas en el intervalo de concentraciones de 0.07-0.09 mol Kg⁻¹, la preparación de las mismas se realizó por adición directa de ScCl₃ anhidro (Sigma Aldrich 99.99%) al medio fundido. Es importante indicar que, dada la utilización de materiales óxido (Al₂O₃ y PYREX) y con objeto de evitar la formación de Sc₂O₃, todos los días antes de empezar la experimentación se burbujeó HCl_(g) (99.8%) durante 20 minutos en el medio fundido, realizando el resto de la experimentación bajo atmósfera de Ar.

4.2.7.- Protocolo experimental

4.2.7.1.- Protocolo dentro de la caja de guantes

- Se introduce en la pre-cámara de la caja de guantes todo el material necesario para la experimentación, limpio y seco.
- Se realiza el vacío en la misma durante aproximadamente 10 min, seguido de la introducción de Ar, para conseguir una atmósfera de Argón.
- Se abre la escotilla del interior de la caja de guantes y se recoge el material.

- La mezcla LiCl-KCl se prepara en un crisol de alúmina pesándose las cantidades adecuadas de LiCl y KCl en una balanza analítica para obtener la mezcla eutéctica y se homogeniza (Figura 4.9A).
- Las cantidad adecuada del reactivo de Sc(III), ScCl_3 , se pesa en el interior de la caja de guantes y se adiciona ya sea, (i) directamente sobre la mezcla eutéctica LiCl-KCl, ó (ii) en los tubos portamuestra (de cristal), convenientemente cerrados, de manera que se proceda a la adición a la mezcla eutéctica, una vez que esta haya sido fundida y purificada.
- Se Introduce el crisol con ayuda de las pinzas dentro de la celda de cuarzo (Figura 4.9B). Se unen las dos partes de la celda utilizando grasa de litio y se asegura la unión con cuatro cierres metálicos. Se aseguran todos los tapones de las conexiones, se pasa la celda a la pre-cámara, se cierra la puerta que comunica la caja de guantes con la pre-cámara y se abre a esta última la puerta del exterior para retirar la celda.



Figura 4.9. A) Pesada de la mezcla salina. B) Introducción del crisol en la celda

4.2.7.2.-Procedimiento dentro de campana extractora

- Se traslada la celda de la caja de guantes al horno que se encuentra en la campana extractora, y se conecta el Ar a una de las entradas de la celda.
- Se introducen en los orificios adaptados para ello, el tubo protector con el termopar, el electrodo de referencia y el “YZE” (electrodo de membrana de circonia ytriada para medir los O^{2-})

- Se conecta el sistema de regulación de temperatura y se procede a la fusión de la mezcla utilizando rampas de temperatura. (1) 120 °C durante 2 horas, (2) 240 °C , 2 horas, (3) 400 °C
- Tras la fusión se procede a la purificación del medio frente a los iones O²⁻, realizando para ello el siguiente protocolo:
 - 1.- Burbujeo de HCl (Abelló Linde) durante 20 minutos.
 - 2.- Burbujeo de Ar (Air liquide) durante 40 minutos con objeto de eliminar el HCl disuelto.
 - 3.- Durante toda la experimentación permanece una atmósfera de Ar (Air liquide: H₂O < 3 ppm, O₂ < 2 ppm).

Diariamente antes de empezar la experimentación, se burbujea HCl durante 10-20 minutos para evitar la formación de óxido de escandio Sc₂O₃(s).

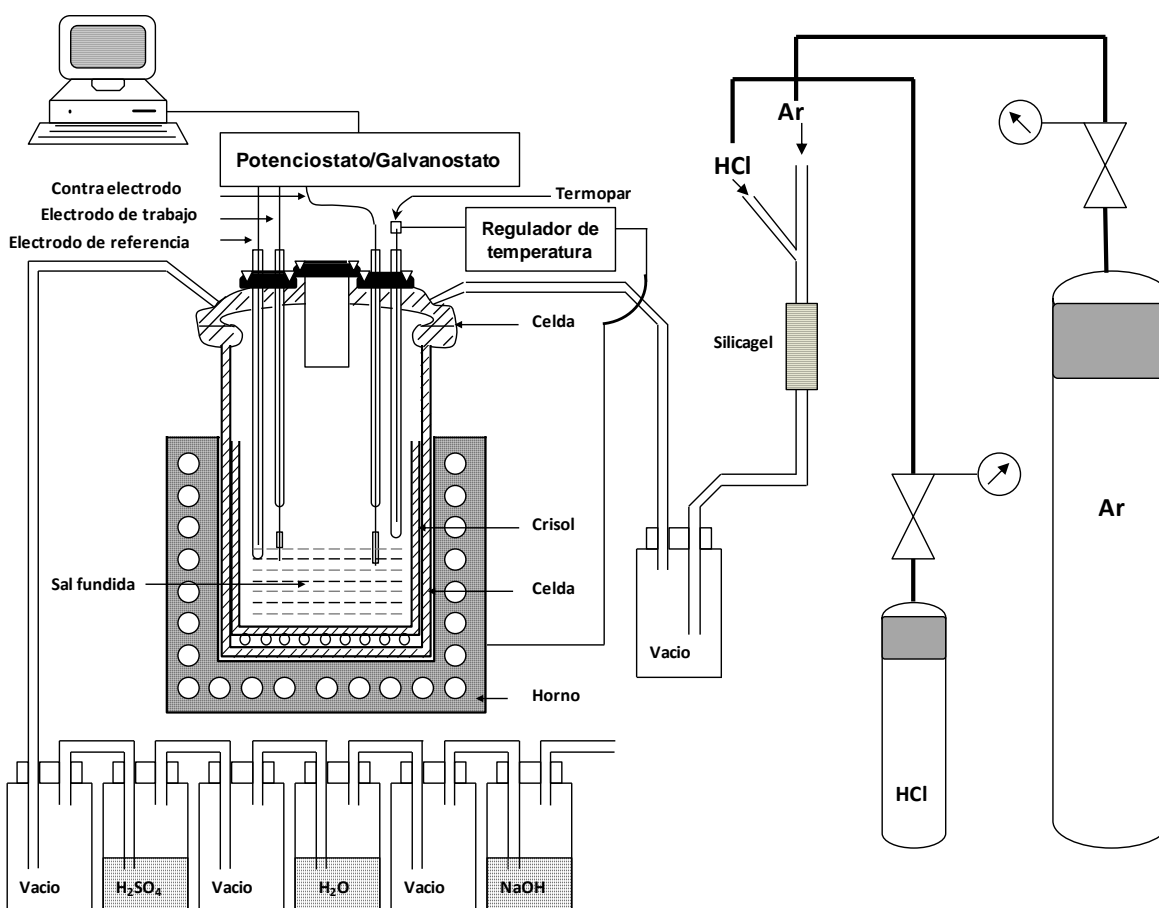
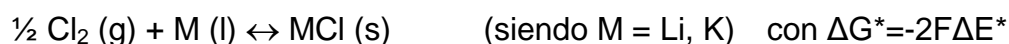


Figura 4.10. Esquema del montaje experimental seguido en el protocolo

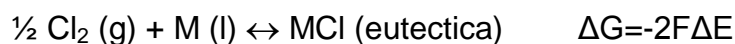
4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Ventanas electroquímicas de la mezcla eutéctica sobre un electrodo inerte de Wolframio y reactivo de Aluminio

La zona de electroactividad y la naturaleza de las reacciones que la limitan, puede determinarse a partir de un estudio termodinámico. La utilización de la base de datos HSC Chemistry 4.1 [7] permite calcular el potencial estándar de las especies susceptibles de oxidarse y reducirse, vía el cálculo de la entalpía libre de Gibbs de las reacciones entre cuerpos puros:



Y la de la misma reacción pero con la composición de la mezcla eutéctica:



Teniendo en cuenta las actividades del LiCl y KCl, a través de la expresión:

$$\Delta E = \Delta E^* - \frac{2.3RT}{F} \log(a_{\text{MCl}})$$

En el caso de la mezcla eutéctica, los iones Li(l) y K(l) son susceptibles de reducirse. El cálculo termodinámico (ver Tabla 4.2) lleva a un potencial para el par Li(l)/Li de $-3.679 \text{ V vs Cl}_2/\text{Cl}^-$ (considerando a LiCl = 0.37) [8], mientras que el par K(l)/K es de $-3.909 \text{ V vs Cl}_2/\text{Cl}^-$ (considerando a KCl = 0.19) [8]. Esto indica que el límite inferior de la zona de electroactividad que ha de observarse sobre un electrodo inerte (ausencia de reacción química entre la especie reducida y el electrodo, no hay formación de aleaciones o compuestos intermetálicos) corresponderá a la reducción de los iones Li(l) a Li(0). Este límite representa la barrera de reducción del disolvente.

Por otra parte la oxidación del ión cloruro a cloro corresponde al límite anódico teórico de la zona de electroactividad, límite que es posible alcanzar en estos medios, siempre y cuando el material utilizado como electrodo no se oxide antes que el ión cloruro.

Tabla 4.2. Valores termodinámicos de la ventana electroquímica accesible en el eutéctico LiCl-KCl a 723 °K

Reacción	$\Delta E^*(\text{cuerpos puros})/V$	$\Delta E (\text{mezcla eutéctica})/V$
	[HSC]	
$\frac{1}{2} \text{Cl}_2 (\text{g}) + \text{Li} (\text{l}) \leftrightarrow \text{LiCl} (\text{s})$	3.620	3.679
$\frac{1}{2} \text{Cl}_2 (\text{g}) + \text{K} (\text{l}) \leftrightarrow \text{KCl} (\text{s})$	3.805	3.909

En la Figura 4.11 se recogen ejemplos de los voltamperogramas experimentales sobre un electrodo inerte de wolframio y un electrodo reactivo de Al.

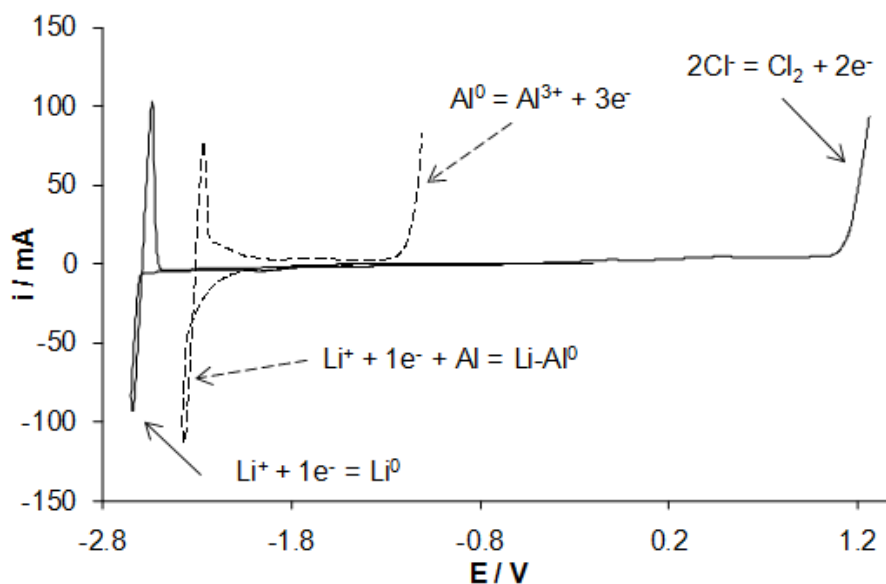


Figura 4.11. Ventanas electroquímicas registradas en el eutéctico LiCl-KCl a 723 °K (200 mV s^{-1}) sobre (i) un electrodo inerte de W; (línea continua), y (ii) un electrodo reactivo de Al (línea punteada).

Cuando se utiliza W como electrodo de trabajo, la ventana electroquímica es la esperada para un electrodo inerte, oxidación de los iones Cl^- a $\text{Cl}_{2(\text{g})}$ y reducción de los iones $\text{Li}(\text{l})$ a $\text{Li}(\text{liquido})$. Sin embargo cuando se utiliza como electrodo de trabajo un material reactivo como es el caso del Al (línea punteada), la ventana electroquímica es más pequeña, y está limitada anódicamente por la oxidación del propio electrodo: $\text{Al} - 3\text{e} \rightarrow \text{Al}(\text{III})$, y catódicamente por la reducción de los iones

Li(I) sobre Al formando una aleación. El desplazamiento del potencial de reducción del Li(I) sobre Al hacia potenciales más anódicos se debe a una disminución de la actividad de Li(0) por formación de la aleación.

4.3.2.- Estudio electroquímico del escandio sobre electrodos de Wolframio

4.3.2.1. Caracterización de los sistemas electroquímicos. Determinación del número de electrones implicados.

La Figura 4.12 muestra ejemplos representativos de los voltamperogramas obtenidos sobre un electrodo de W con una disolución de Sc(III) en el eutéctico LiCl-KCl. En la adquisición de los voltamperogramas se compensó la caída óhmica de la disolución, la cual se determinó por la técnica de "positivefeedback". La especie electroactiva, Sc(III), se reduce antes de la reducción masiva de los iones Li(I) en una única etapa A/A'. El aspecto del pico A, es característico de la formación de una nueva fase, Sc(0), se observa un aumento brusco de la corriente catódica hasta alcanzar el valor máximo seguido de una disminución paulatina de la corriente. Al invertir el sentido de potencial hacia valores anódicos, tiene lugar el desarrollo del pico A', con la forma característica de un pico de redisolución, aumento paulatino de la corriente anódica hasta alcanzar el valor máximo, seguido de una caída brusca de la misma, debido al consumo del Sc(0) depositado durante el barrido catódico.

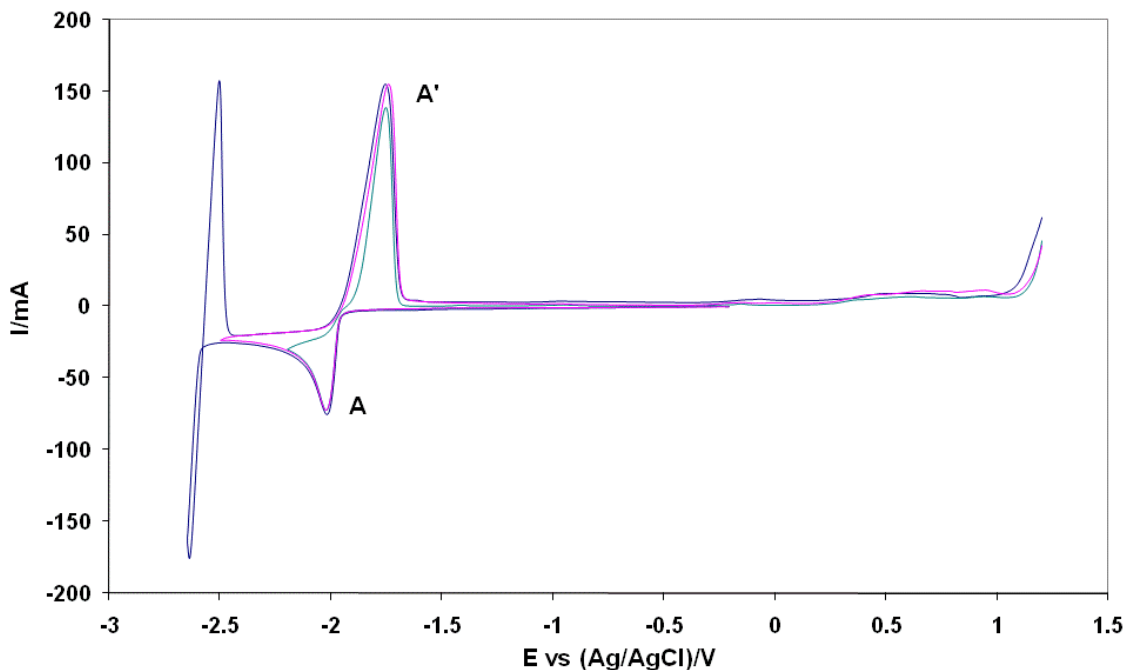


Figura 4.12. Voltamperogramas obtenidos a 200 mV s^{-1} sobre W a distintos potenciales de inversión y a 723 °K con una disolución de Sc (III) ($C= 1.24 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$)

Los resultados anteriores se confirman por cronopotenciometría. Las curvas cronopotenciométricas muestran la existencia de una meseta a un potencial aproximadamente de -2.0 V (Figura 4.13a). Tras esta meseta se produce un incremento importante del potencial y cuando la corriente aplicada se mantiene durante un tiempo superior al tiempo de transición, el electrodo adquiere el potencial correspondiente a la electrodeposición de $\text{Li}(0)$. La Figura 4.13b muestra un ejemplo de cronopotenciograma con inversión del sentido de la corriente, en dicha figura se observa que el tiempo de transición anódico es aproximadamente igual al catódico, ($T_{\text{Red}} \approx T_{\text{Ox}}$), lo cual es típico de la formación de un compuesto insoluble que permanece adherido al electrodo, confirmando la formación de Sc metálico en el electrodo.

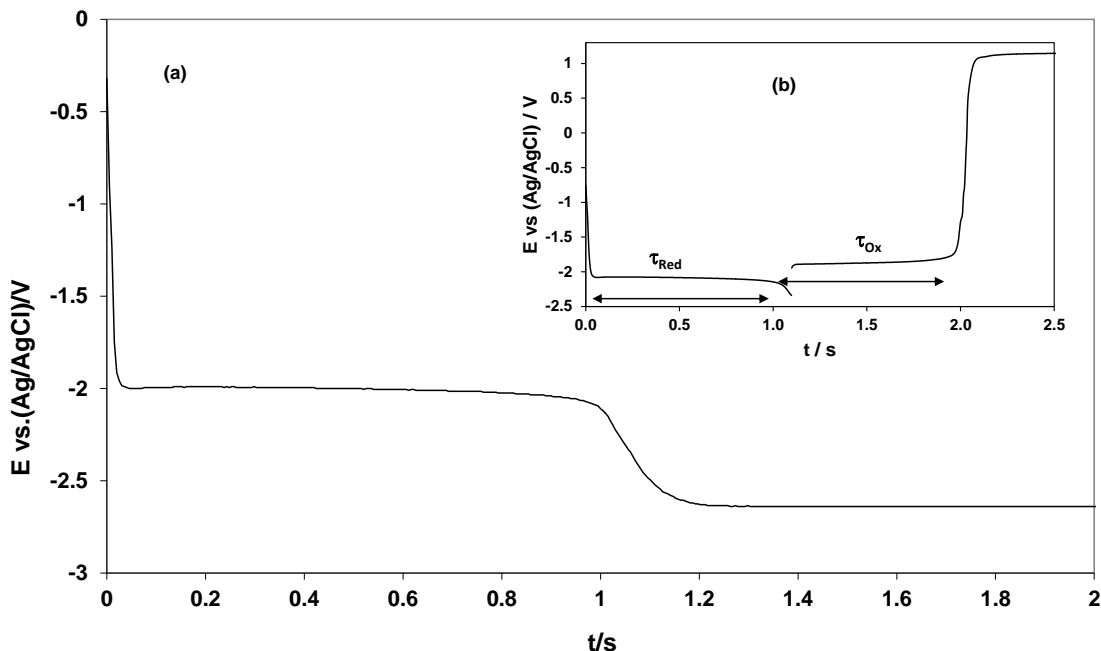


Figura 4.13. A) Cronopotenciograma y B) cronopotenciograma con inversión del sentido de la corriente obtenidos con una disolución de Sc(III) ($1.24 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$) a 723 °K, $i = -30 \text{ mA}$

El número de electrones implicados en el proceso de electro-reducción se calculó mediante voltamperometría de onda cuadrada. Con esta técnica, se obtienen para sistemas reversibles, curvas i - E en forma de campana simétricas con respecto al potencial de onda media, siendo las alturas de los picos proporcionales a la concentración de la especie electroactiva presente en disolución.

La anchura de pico medio, $W_{1/2}$ (anchura de la curva medida a la mitad del valor máximo de la intensidad), está relacionada con el número de electrones intercambiados en el proceso según la expresión [9]:

$$W_{1/2} = 3.52 \frac{RT}{nF}$$

El pico que se observa en la Figura 4.14 muestra una señal Gaussiana asimétrica, las curvas presentan una bajada brusca de la corriente, esta distorsión se debe a la presencia del fenómeno de nucleación, el aumento de la corriente se retrasa por el sobrepotencial provocado por la formación de una nueva fase sobre un material

de distinta estructura cristalina. Comportamientos análogos se han reportado para el caso de Nd, Am y U [10-13].

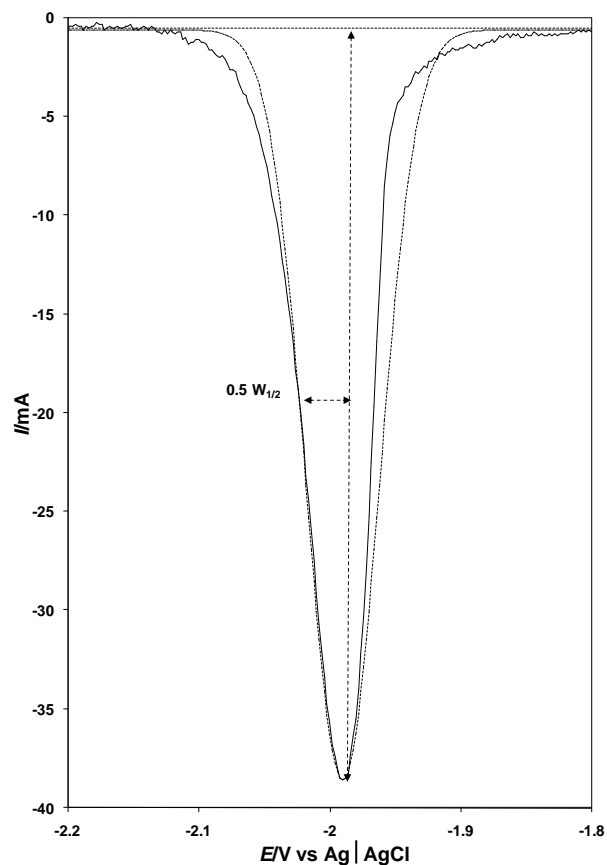


Figura 4.14. Voltamperometría de onda cuadrada de reducción de Sc(III) (1.24×10^{-4} mol cm^{-3}) sobre un electrodo de W en el eutéctico LiCl-KCl a 723 °K, frecuencia 30 Hz. Curva experimental (—) y su correspondiente ajuste (-----)

El análisis de las ondas, en este caso es ligeramente diferente al de las curvas gaussianas para sistemas entre especies en disolución, analizándose únicamente la semianchura a la mitad de la altura de pico de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{W_{1/2}}{2} = 3.52 \frac{1}{2} \frac{RT}{nF}$$

Obteniéndose en este caso un valor medio del número de electrones en el intervalo de temperaturas estudiadas igual a 3.1 ± 0.2

4.3.2.2. Nucleación electroquímica del Sc

El proceso de formación de una nueva fase sobre un material de estructura cristalina diferente no se realiza de forma homogénea sino que coexisten dos fenómenos: nucleación y crecimiento de los cristales.

Antes de continuar recordemos que por *nucleación* se entiende la formación de nuevos núcleos cristalinos (microcristales), constituidos por un mayor o menor número de átomos dispuestos en una red cristalina. El proceso de *crecimiento* consiste en la incorporación de nuevos átomos a los cristales ya existentes.

La Figura 4.15 muestra un voltamperograma típico de la existencia del fenómeno de nucleación, caracterizado por un desplazamiento de potencial de pico catódico correspondiente a la electrodeposición de escandio metálico, lo que da lugar a un típico “bucle” en el barrido de vuelta [14].

La razón de la existencia de este fenómeno de histéresis es la siguiente: para que se puedan formar los primeros núcleos de la nueva fase, se necesita el aporte de una **sobretensión suplementaria**, que se añade a las demás sobretensiones de transferencia de carga (η_{tc}), de concentración (η_c , que comprende la sobretensión de difusión y de reacción), y de difusión superficial (término que suele despreciarse frente a los demás), la denominada **sobretensión de nucleación** (η_n), cuya amplitud es función de la energía de formación de esta nueva fase. Además, el crecimiento de los núcleos demanda una sobretensión extra (η_{cc} , denominada de **crystalización**) alrededor de un orden de magnitud más débil que la sobretensión de cristalización. Es decir, en este caso, la sobretensión del proceso en su conjunto, está dada por la expresión:

$$\eta_{total} = \eta_{tc} + \eta_c + \eta_n + \eta_{cc}$$

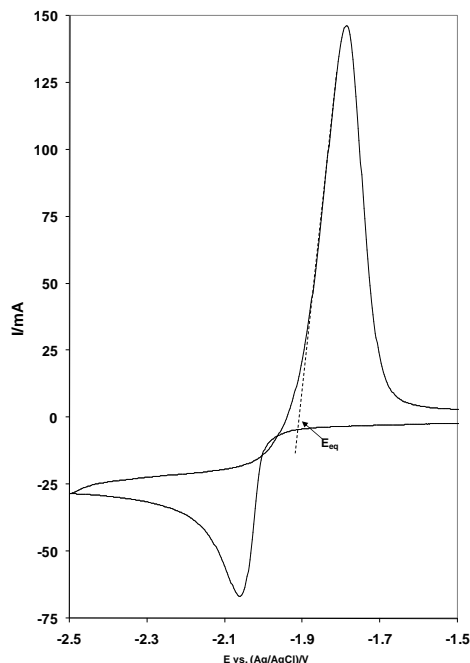


Figura 4.15. Voltamperograma ilustrando el cruce debido a la nucleación. E_{eq} corresponde al potencial de equilibrio adoptado por un depósito de Sc sumergido en la disolución. $[Sc(III)] = 1,24 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3} v = 500 \text{ mV s}^{-1}$

Por lo tanto, la explicación del desplazamiento de potencial en las señales voltamperométricas es la necesidad de suministrar una sobretensión adicional para que se formen los núcleos de escandio y a su vez crezcan. El comportamiento de histéresis se debe al hecho de que al invertir el sentido del barrido de potencial las condiciones no son las de un electrodo metálico (W), sino las de un electrodo recubierto de escandio, es decir, las de un electrodo de escandio propiamente dicho. Al no existir entonces sobretensión de nucleación se produce el cruzamiento de los voltamperogramas.

La sobretensión de nucleación explica entonces los desplazamientos del potencial de pico catódico observados en el apartado anterior, y que por tanto no son debidos a la irreversibilidad del sistema. Y dado que la voltamperometría suministra únicamente información cualitativa acerca de los fenómenos de nucleación, se realizan estudios mediante cronoamperometría.

Los experimentos se llevaron a cabo partiendo de un valor del potencial E_1 en donde no se produce la electrodeposición de Sc (potencial de circuito abierto), para aplicar inmediatamente un valor E_2 suficientemente negativo para iniciar el proceso de nucleación y crecimiento de los mismos. Después de cada experiencia, el metal depositado se eliminó de la superficie del electrodo mediante polarización anódica.

Ejemplos representativos de curvas cronoamperométricas se observan en la Figuras 4.16. En todos los casos, las curvas experimentales intensidad-tiempo presentan tres zonas perfectamente definidas.

Zona I: Corresponde a la carga de la doble capa y tras ella la formación de los primeros núcleos.

Zona II: Se trata de una zona de crecimiento de la corriente, el cual se atribuye a un incremento de la superficie activa del electrodo debido al crecimiento de los cristales de Sc. La corriente aumenta hasta alcanzar un valor máximo i_m para un tiempo t_m . En los casos donde no hay formación de núcleos, o la cinética de formación es muy rápida, los cronoamperogramas no presentan esta zona.

Zona III: El decrecimiento de la corriente es proporcional a $t^{-1/2}$; el proceso de reducción está limitado por la difusión lineal semi-infinita de los iones hacia el cátodo (ley de Cottrell).

La parte más interesante de las curvas catódicas $i-t$ es la parte ascendente (zona II), que corresponde a la corriente antes de la superposición de las zonas de difusión de la primera monocapa del crecimiento del núcleo, en donde se puede emplear para determinar la cinética de crecimiento de los núcleos. De esta forma la parte ascendente de los cronoamperogramas fue comparada con modelos que implican nucleación tridimensional instantánea o progresiva, con crecimiento de los núcleos controlado por difusión. El primer modelo corresponde con una nucleación muy rápida de Sc sobre un número limitado de núcleos, y el último representa un modelo de nucleación más lento sobre un gran número de núcleos.

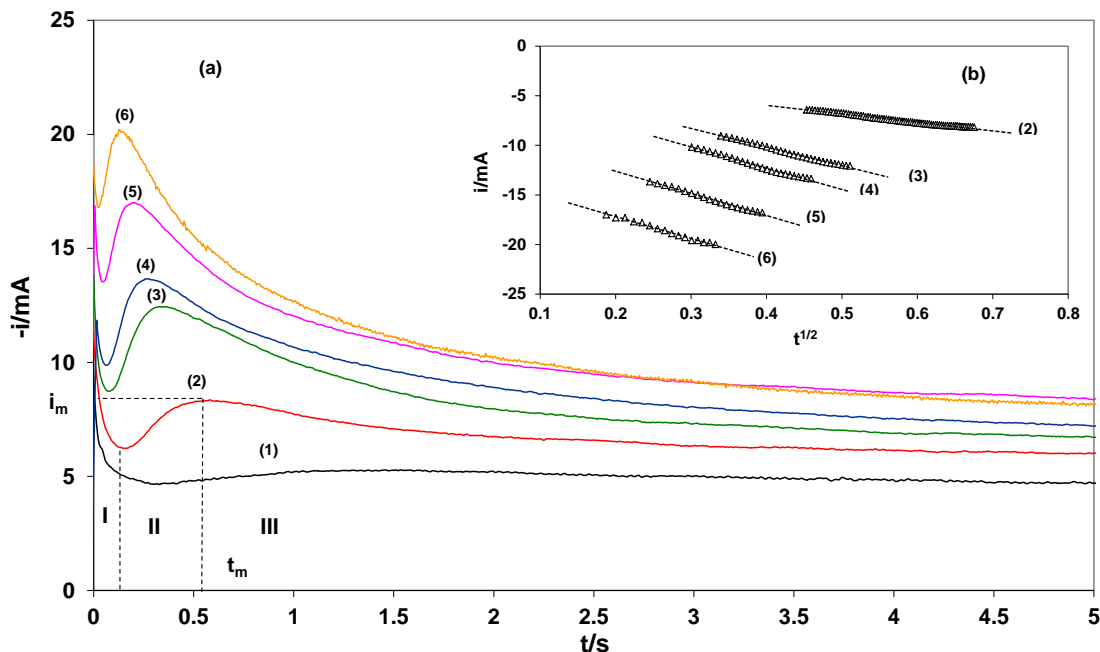


Figura 4.16. (a) Curvas i - t obtenidos con una disolución de $ScCl_3$ (1.18×10^{-4} mol cm^{-3}) a 773 °K y a varios potenciales [(1) -1.980, (2) -1.985, (3) -1.990, (4) -1.996, (5) -2.000 y (6) -2.005 V vs $Ag|AgCl$] a 723 °K. (b) Evolución de i frente a $t^{1/2}$ a partir de la parte creciente de los cronoamperogramas de la Figura 4.16a

De acuerdo con Allongue y Souteyrand 1990 y Scharifker y Hills 1983 [15, 16] la relación entre la corriente, i , y tiempo, t , en el tramo siguiente a la doble capa viene dado por una ecuación del tipo:

$$i = \alpha t^x$$

En donde el exponente x depende del tipo de nucleación, la geometría de los núcleos y de las condiciones de crecimiento. Los diferentes modelos fueron propuestos por Allongue y Souteyrand [15]. En la Figura 4.16b se observa la proporcionalidad entre i y $t^{1/2}$ para varios potenciales, sugiriendo que los estados iniciales de la electrodeposición de Sc sobre un electrodo de wolframio pueden explicarse en términos de un modelo que implica nucleación instantánea y crecimiento tridimensional de los cristales controlado por difusión semiesférica [15]. En la práctica es conveniente analizar los gráficos adimensionales de las curvas cronoamperométricas de acuerdo a los modelos de Scharifker [16], debido a que

se analiza la totalidad de la curva. Las curvas adimensionales obtenidas a partir de las curvas intensidad-tiempo experimentales, para los diferentes potenciales catódicos aplicados (Figura 4.16a), fueron comparadas con las curvas teóricas calculadas a partir de los modelos adimensionales para nucleación instantánea y progresiva de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\left(\frac{I}{I_{\max}}\right)^2 = 1.9542 \frac{[1 - \exp(-1.2564(t/t_{\max}))]^2}{(t/t_{\max})} \quad (\text{Instantánea})$$

$$\left(\frac{I}{I_{\max}}\right)^2 = 1.2254 \frac{[1 - \exp(-2.3367(t/t_{\max})^2)]^2}{(t/t_{\max})} \quad (\text{Progresiva})$$

En la nucleación instantánea se produce la activación inmediata de todos los núcleos, siendo la velocidad de formación de nuevos núcleos despreciable en la escala de tiempos del experimento, por lo tanto todos los núcleos de Sc se forman al mismo tiempo que inicia la electrólisis. Por el contrario, en el modelo progresivo, la velocidad de formación de nuevos núcleos no es despreciable, por lo tanto continuamente se generan nuevos cristales durante toda la electrólisis

En la Figura 4.17 se presentan los datos experimentales adimensionales, extraídos de las curvas cronoamperométricas de la Figura 4.16a, y los modelos teóricos correspondientes a la nucleación instantánea (curva 1) y progresiva (curva 2). De acuerdo a la Figura 2.17, es evidente que los estados iniciales de la electrodeposición de escandio sobre W en la mezcla eutéctica pueden explicarse en términos de un modelo que implica nucleación instantánea con crecimiento tridimensional de los núcleos, y que el modelo de nucleación del escandio no se ve afectado por la temperatura en el intervalo de 673-773 °K.

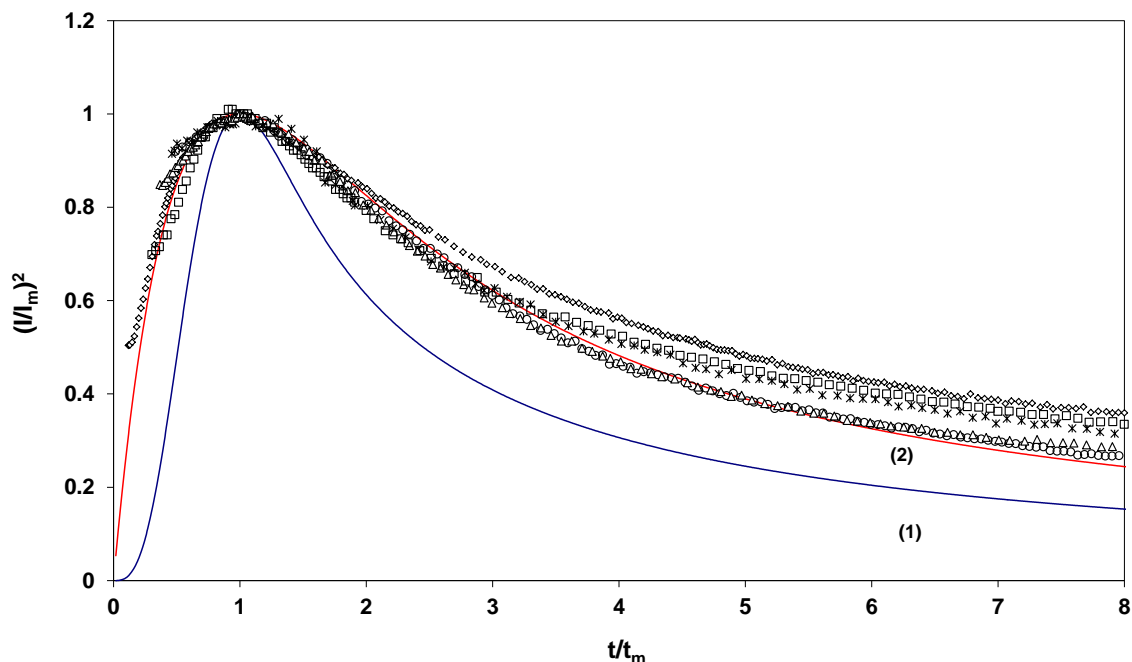


Figura 4.17. Comparación de las curvas adimensionales obtenidas a partir de las i - t experimentales con los modelos para (1) nucleación instantánea y (2) nucleación progresiva a diferentes temperaturas: (Δ) 673, (O) 723, ($*$) 748, (\square) 773 y (\diamond) 798 °K

4.3.2.3. Determinación del coeficiente de difusión de los iones Sc(III). Verificación de la ley de Arrhenius

El coeficiente de difusión del Sc(III), $D_{Sc(III)}$ en la mezcla eutéctica LiCl-KCl se determinó en el intervalo de temperaturas entre 673 y 823 °K mediante cronopotenciometría, utilizando la ecuación de Sand [6]:

$$\tau^{1/2} = \frac{nFSC_0 D^{1/2} \pi^{1/2}}{2i} \quad \text{(Ecuación de Sand)}$$

Donde τ es el tiempo de transición medido en los cronopotenciogramas, C_0 y D , la concentración y el coeficiente de difusión de la especie electroactiva respectivamente, y S la superficie activa del electrodo.

Tras aplicar diferentes intensidades de corriente, i , se midieron los tiempos de transición y se verificó que el término $i\tau^{1/2}C^{-1}$ permanecía constante a las

diferentes intensidades de corriente (i , aplicadas), lo cual nos indica que se cumplen todos los requisitos para la aplicar la ecuación de Sand.

Para la determinación del coeficiente de difusión es difícil definir el área exacta del electrodo de trabajo en la sal fundida, esto se debe principalmente al efecto menisco provocado por los ángulos de mojado entre el electrodo y la sal fundida. No obstante es posible eliminar este efecto comparando los tiempos de transición obtenidos a diferentes alturas de inmersión del electrodo de trabajo, cuando se mantienen constantes: la concentración de Sc(III) en disolución, la corriente aplicada sobre el electrodo de trabajo y la temperatura del sistema. Bajo estas condiciones, el tiempo de transición es función de la superficie activa del electrodo de trabajo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\tau^{1/2} = \frac{nFC_0 D^{1/2} \pi^{1/2}}{2i} S = \frac{nFC_0 D^{1/2} \pi^{1/2}}{2i} (S_0 + \Delta S)$$

La Figura 4.18a muestra algunos ejemplos de los cronopotenciogramas obtenidos con una disolución de ScCl₃ en la mezcla eutéctica LiCl-KCl a varias alturas de inmersión del electrodo de trabajo. Las mesetas correspondientes a la reducción de Sc(III) a Sc(0) y los saltos de potencial se definen claramente a las diferentes alturas de inmersión y se observa que el tiempo de transición, “ τ ”, aumenta a medida que aumenta la altura de inmersión del electrodo y consecuentemente el área activa.

El coeficiente de difusión de los iones Sc(III) se calcula a partir del valor de la pendiente de variación de $\tau^{1/2}$ con ΔS (Figura 4.18b).

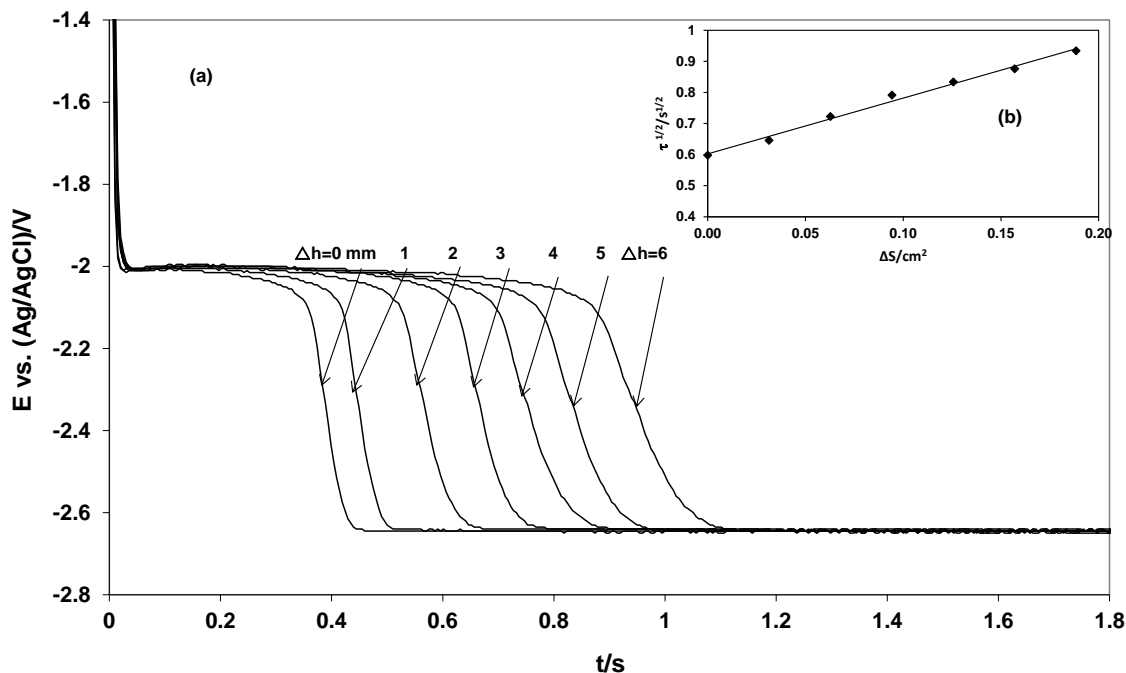


Figura 4.18. (a) Cronopotenciogramas obtenidos con una disolución de ScCl_3 a varias alturas de inmersión del electrodo de trabajo (W): $i = -47 \text{ mA}$; $[\text{ScCl}_3] = 1.24 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$; $T = 723 \text{ °K}$. (b) Relación entre la raíz cuadrada del tiempo de transición y el incremento de superficie activa

Los coeficientes de difusión en sales fundidas habitualmente siguen la ley de Arrhenius, expresada como:

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_A}{RT}\right)$$

Donde D_0 es el coeficiente de la ley de Arrhenius y E_A la energía de activación para la difusión.

La Figura 4.19 muestra la variación del logaritmo del $D_{\text{Sc(III)}}$ frente al inverso de la temperatura. Los resultados muestran la validez de la ley de Arrhenius. Siendo posible formular la siguiente relación:

$$\log D_{\text{Sc(III)}} = -2.48(\pm 0.14) - 1993(\pm 102)T^{-1} \quad (D_{\text{Sc(III)}})(\text{cm}^2 \text{ s}^{-1})$$

A partir de esta ecuación se puede obtener el valor de la energía de activación para la difusión, en donde se obtiene que el $\Delta H = 38.18 \pm 1.95 \text{ kJ mol}^{-1}$.

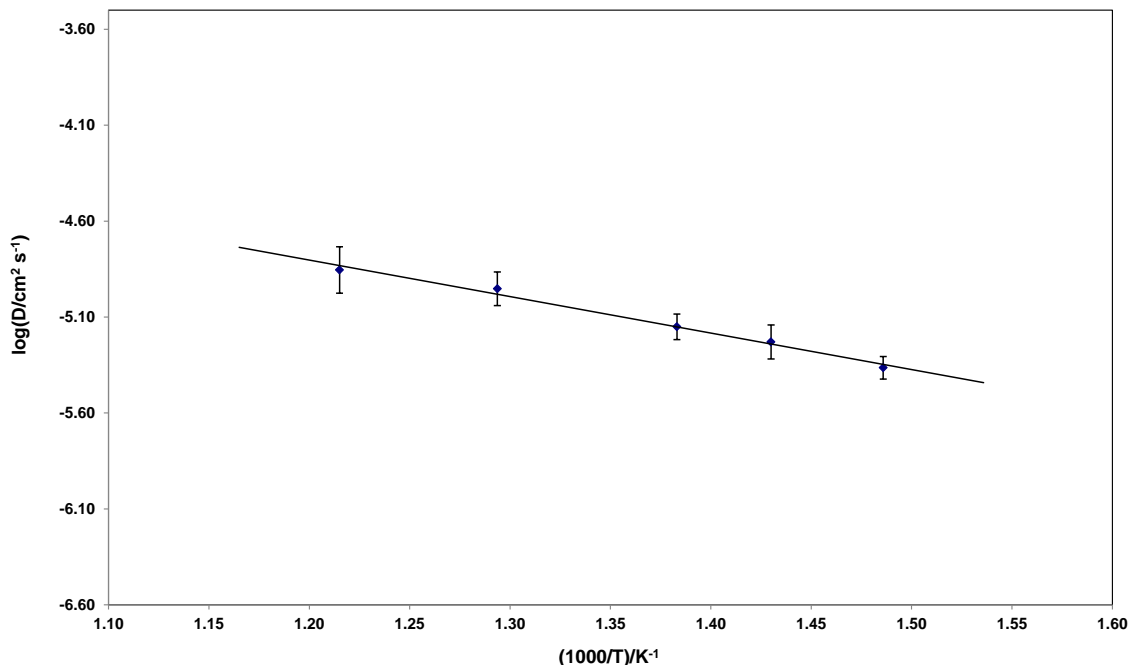


Figura 4.19. Variación del coeficiente de difusión de Sc(III) con la temperatura en el eutéctico LiCl-KCl. Verificación de la ley de Arrhenius

4.3.3. Estudio electroquímico de los iones Sc(III) sobre un electrodo reactivo de Al

4.3.3.1. Introducción

Las aleaciones de aluminio son obtenidas a partir de aluminio y otros elementos (generalmente cobre, zinc, manganeso, magnesio o silicio). Forman parte de las llamadas aleaciones ligeras, con una densidad mucho menor que los aceros, pero no tan resistentes a la corrosión como el aluminio puro, que forma en su superficie una capa de óxido de aluminio. Las aleaciones de aluminio tienen como principal objetivo mejorar la dureza y resistencia del aluminio, debido a que en estado puro es un metal muy blando.

El escandio es un metal plateado blanquecino que se extrae de la corteza terrestre, es un potente refinador de grano, que al añadirse a aleaciones de aluminio aumenta la resistencia y durabilidad del metal en un 50 %. Estas propiedades se obtienen “enderezando” los granos de la aleación y consiguiendo

que el metal sea menos susceptible a fracturas. Fueron los rusos durante la Guerra Fría los primeros en utilizarlo y fue en la construcción de aletas de dirección de misiles ya que las aleaciones de escandio resistían a fuerzas increíbles sin sufrir daño alguno, incluso cuando lanzaban los misiles a través del casquete glaciar polar. Las aleaciones de escandio se convirtieron en un punto fuerte de los aviones de construcción rusa puesto que les proporcionaban increíble peso, manejabilidad y ventajas de alcance. Es esta resistencia y durabilidad lo que hace que las aleaciones Sc-Al sean un material tan atractivo, por lo que presentan un interés cada vez mayor en aspectos fundamentales y aplicados.

Dado el elevado precio del escandio metálico, los campos de aplicación de las aleaciones Sc-Al están limitados hasta la fecha a sectores como el aeroespacial y de material deportivo. Para que esta situación cambie, es necesario el desarrollo de nuevos y relativamente baratos procesos de producción de Sc y sus aleaciones Sc-Al. La utilización de sales fundidas como medios de reacción puede ser una opción prometedora para el desarrollo de procesos que permitan la producción electrolítica de: (i) Sc metálico, utilizando como cátodos materiales inertes como wolframio, y (ii) aleaciones Sc-Al utilizando como cátodo un electrodo reactivo de aluminio.

4.3.3.2.- Diagrama de fases

De acuerdo al diagrama de fases Sc-Al [17], que aparece en la Figura 4.20, el escandio puede formar 4 compuestos intermetálicos sólidos con aluminio a la temperatura de los experimentos (Al_3Sc , Al_2Sc , AlSc y AlSc_2).

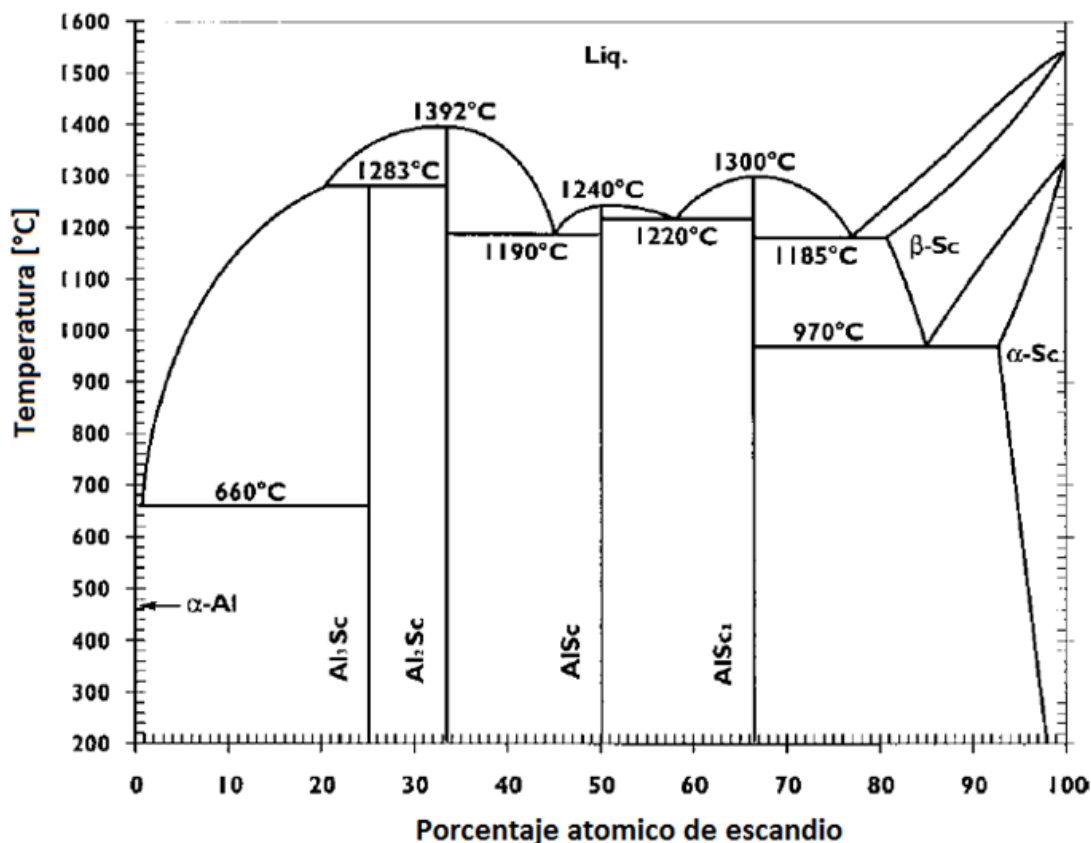


Figura 4.20. Diagrama de fases del sistema Sc-Al [17]

El proceso de formación de aleaciones Sc-Al, se estudió en el eutéctico LiCl-KCl a 723 °K utilizando una disolución de Sc(III) y un electrodo de trabajo de Aluminio (hilos de 1 mm de diámetro y placas de 1.0 x 0.6 x 0.05 cm) mediante diferentes técnicas electroquímicas.

4.3.3.3.- Información cualitativa

(A) Resultados obtenidos por voltamperometría cíclica.

En la Figura 4.21 se muestran ejemplos de los voltamperogramas cíclicos obtenidos con: (i) una disolución de Al(III) sobre un electrodo inerte de wolframio (curva negra), y (ii) una disolución de iones Sc(III) sobre electrodos de W (curva punteada) y Al (curva roja).

El voltamperograma obtenido con una disolución de Al(III) muestra varias señales que vamos a relacionar con dos zonas de potencial. En la “**zona 1**” se define un grupo de señales, a las que hemos denominado B/B’, relacionadas con la reducción de los iones Al(III) a Al(0) (caracterizada por el pico B) y su correspondiente reoxidación (pico B’); en la “**zona 2**”, se observan dos grupos de señales denominadas C/C’ y a potenciales más catódicos D/D’. El grupo D/D’ corresponde como indicamos anteriormente a la electroreducción de los iones Li(I) a Li(0) sobre W, responsable de la señal D, y su correspondiente pico de reoxidación, D’, mientras que las señales C/C’ se deben a la electrodeposición de Li(I) sobre una película de Al previamente depositado en la Zona 1, lo que da lugar a la formación de una aleación Li-Al (pico C) y su correspondiente reoxidación (pico C’).

Como ya indicamos en el apartado 4.3.2.1, cuando se registran los voltamperogramas de una disolución de Sc(III) en el eutéctico LiCl-KCl utilizando como electrodo de trabajo un material que no forma aleaciones con escandio, caso del W, además de las señales correspondientes a la ventana electroquímica, se observan las señales correspondientes a la reducción de los iones Sc(III) a Sc(0) a aproximadamente -2.0 V, pico denominado **A** en la Figura 4.21, y su correspondiente pico de reoxidación **A’**.

Sin embargo cuando se utiliza como electrodo de trabajo un material capaz de formar aleaciones con escandio (ej. aluminio), el espectro electroquímico es diferente; en este caso, como queda reflejado en la Figura 4.21, los iones Sc(III) se pueden reducir a potenciales menos catódicos que -2.0 V, dando lugar a un pico de reducción “**E**” bien definido, en la zona de potenciales de -1.5 V, con el hábito característico de la formación de una nueva fase. Tras desarrollarse el pico **E**, se observa una importante corriente de fondo, pudiéndose detectar 2 ondas denominadas **F** y **G**, y ya a potenciales entorno a -2.0 V aparecen las señales correspondientes a la reducción de Sc(III) a Sc(0), onda **A**. Las señales **E**, **F** y **G**, corresponden por lo tanto a la formación de distintos compuestos intermetálicos Al_xSc_y .

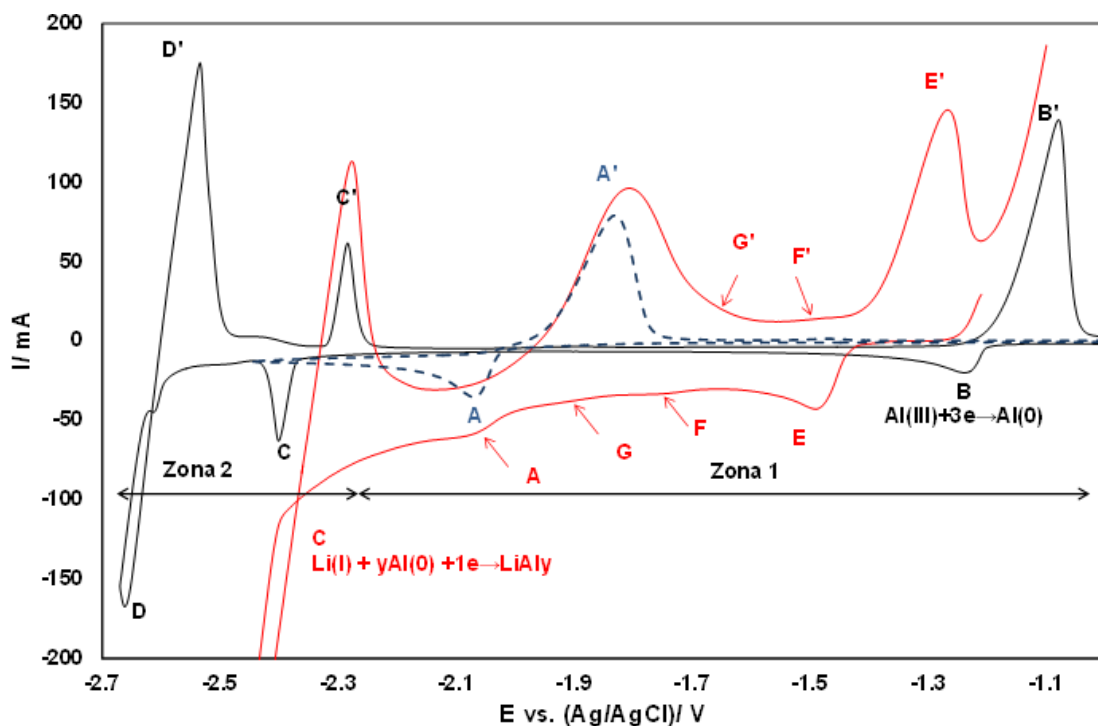


Figura 4.21. Voltamperometría obtenida sobre W a 723 °K con una disolución de AlCl_3 0.56×10^{-4} mol cm^{-3} (—). Voltamperogramas obtenidos con una disolución de ScCl_3 a 723 °K sobre W (---), y un hilo de Aluminio (—) Velocidad de barrido 200 mVs^{-1}

Al invertir el sentido del barrido de potencial, se observan el pico A' , bien definido y ancho, otros dos no tan bien definidos denominados G' y F' , y el pico E' muy bien definido. Estas señales ponen de manifiesto la posibilidad de formación de más de un compuesto intermetálico Sc-Al, correspondiendo cada una de las mismas a la disolución de Sc de las diferentes aleaciones Sc-Al.

(B) Electrodeposición de escandio sobre cátodos inertes asistida por aluminio.

Con el objeto de elucidar el mecanismo de formación de aleaciones, se realizaron varios experimentos a 723 °K en la mezcla eutéctica LiCl-KCl que contenía iones Sc(III) y Al(III), utilizando como electrodo de trabajo un hilo de W. Cabe mencionar que debido a la volatilidad de cloruro de aluminio, su concentración solo es conocida de forma aproximada.

La Figura 4.22 presenta los siguientes voltamperogramas:

- Línea negra.- Voltamperograma cíclico obtenido después de la adición de AlCl_3 a la mezcla eutéctica LiCl-KCl , cuyas señales acabamos de explicar en la sección anterior.
- Línea azul.- Voltamperograma obtenido con una disolución de Sc(III) sobre wolframio.
- Curva roja.- Voltamperograma obtenido con una disolución que contiene iones Sc(III) y Al(III) .

En la curva roja, la disolución que contiene Sc(III) y Al(III) se observan claramente en reducción los picos B/B' (Al(III)/Al(0)) y A/A' (Sc(III)/Sc(0)) entre ambos sistemas aparecen nuevas señales, en reducción son destacables el pico E y una importante corriente residual. Al invertir el sentido del barrido de potencial ya se observan claramente 4 nuevos picos, cada uno de ellos correspondiente a la reoxidación de cada una de las 4 aleaciones Sc-Al (AlSc_2 , AlSc , Al_2Sc y Al_3Sc).

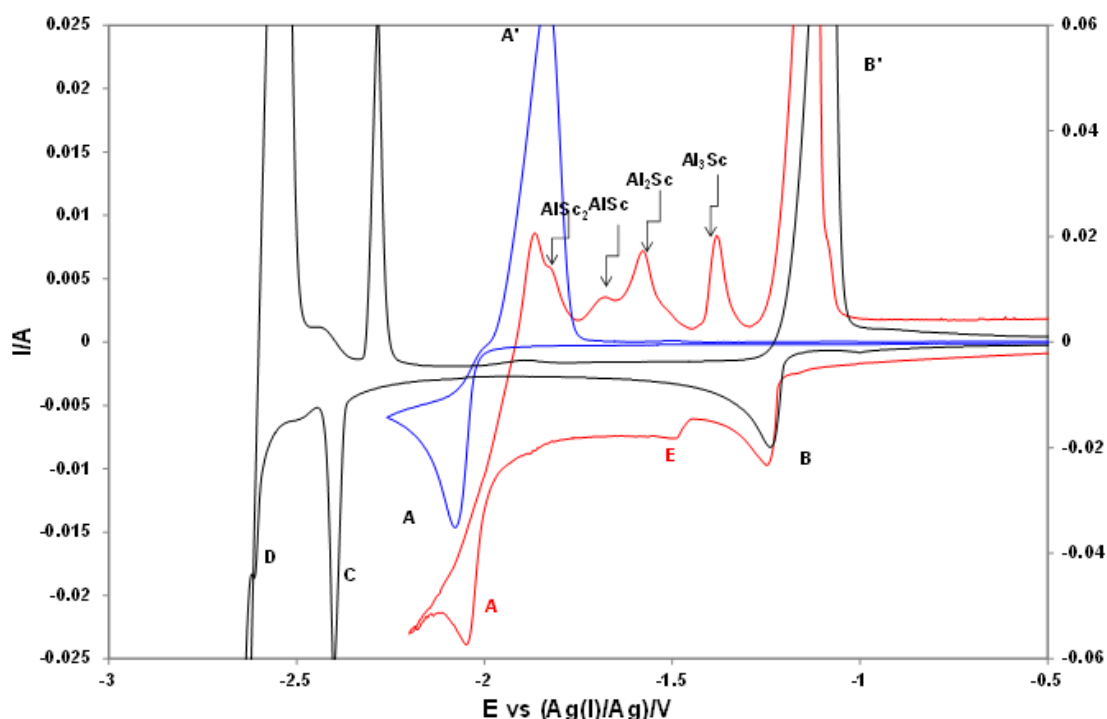


Figura 4.22. Voltamperogramas obtenidos sobre W a 723 °K: (A) (—) con una disolución de AlCl_3 $0.56 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-3}$. (B) (—) con una disolución de ScCl_3 a 723 °K sobre W. (C) (—) con una disolución de AlCl_3 y ScCl_3

4.3.3.4. Cronopotenciometría con circuito abierto

Dado que no es posible extraer más información referente a la formación de las distintas aleaciones Sc-Al de los voltamperogramas, decidimos utilizar la técnica denominada cronopotenciometría en circuito abierto (OCP). La técnica consiste en electrodepositar escandio sobre un electrodo de aluminio durante un periodo de tiempo (por lo general 30, 60 y 90 s) imponiendo una intensidad (electrólisis intensiostática) o un potencial (electrólisis potenciostática). Una vez transcurrido ese tiempo, se registra la evolución del potencial del electrodo a corriente cero con el tiempo, de ahí el nombre de cronopotenciometría en circuito abierto. Puesto que el Sc metálico depositado reacciona con el Al y difunde hacia el interior del electrodo, el potencial del electrodo en circuito abierto se desplaza gradualmente con el tiempo hacia valores positivos. Durante este proceso se observan varias mesetas de potencial, correspondientes a la coexistencia de varios equilibrios bifásicos.

Se realizaron 3 tipos de experimentos:

- (i) Un electrodo de aluminio sumergido en una disolución de Sc(III), al que se imponen diferentes potenciales de electrodeposición (-2.4; -2.2; -1.8 V)
- (ii) Un electrodo de wolframio sumergido en una disolución que contiene Sc(III) y Al(III) (codeposición de Sc y Al)
- (iii) Un electrodo de wolframio sumergido en una disolución de Sc(III) al que se impone un potencial de -2.3 V durante 300 s.

La Figura 4.23 muestra varios ejemplos de los cronopotenciogramas en circuito abierto obtenidos en los diferentes experimentos.

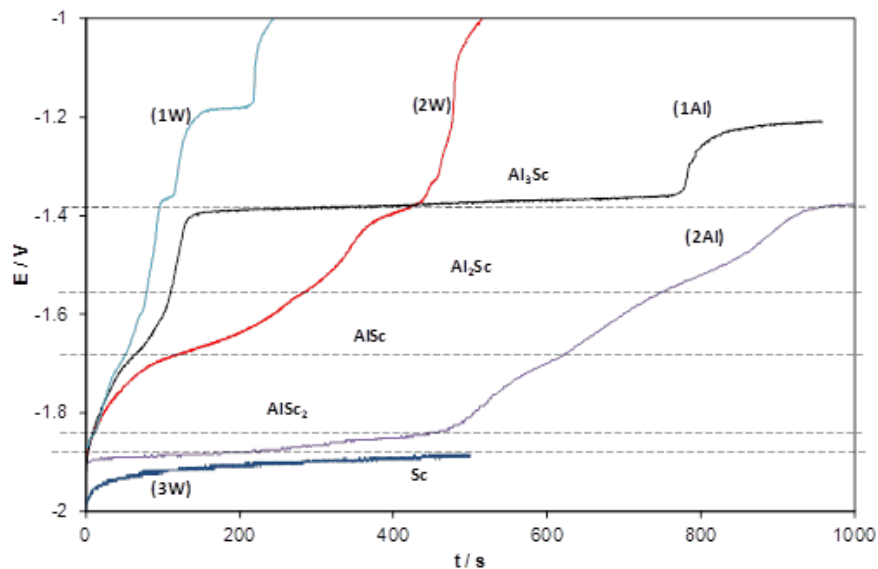


Figura 4.23. Cronopotenciograma en circuito abierto sobre un electrodo de Al después de la electrodeposición de Sc metálico: (1Al) -2.4 V durante 60 s, (2Al) -2.2 V durante 90 s, y electrodeposición conjunta de Sc y Al sobre un electrodo de W: (1W) -2.1 V durante 30 s, (2W) -2.3 V durante 60 s, (3W) -2.3 V durante 300 s. a 723 °K

Los potenciales de equilibrio medidos usando la referencia $\text{Ag(I)}|\text{Ag}$ fueron convertidos en fuerza electromotriz (emf) respecto a Sc(0) , (Figura 4.24) el cual fue preparado por electrodeposición de Sc metálico sobre un hilo de W puro, siendo posible la estimación de las energías molares parciales de Gibbs, y las energías de formación de Gibbs de Sc en los compuestos intermetálicos [18 - 20].

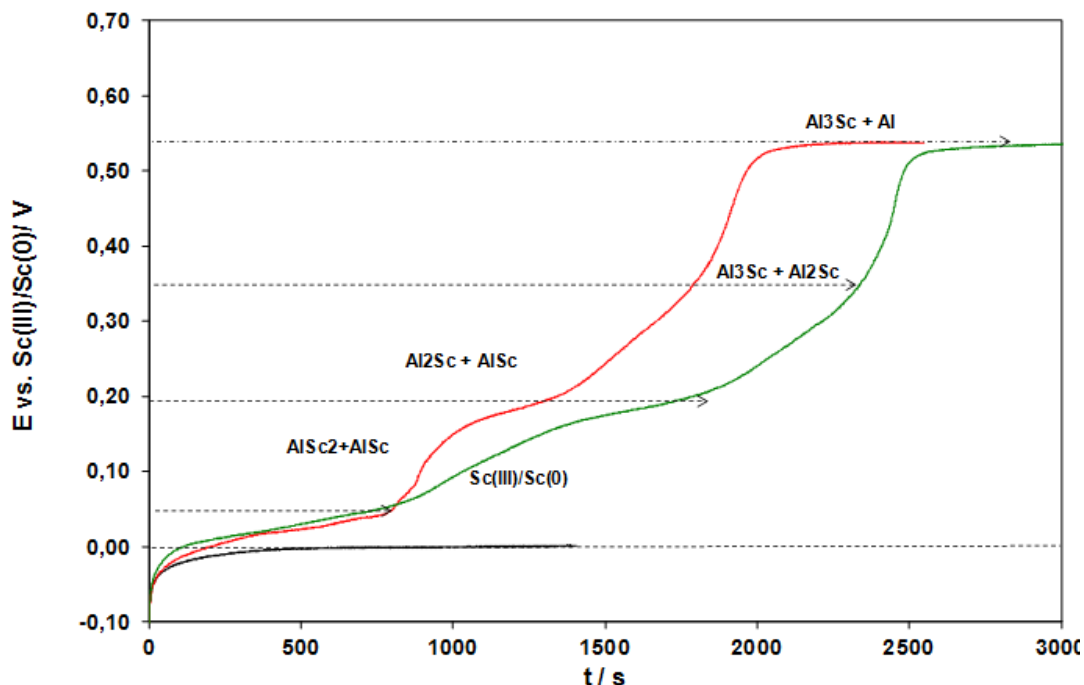
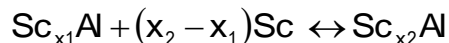


Figura 4.24. Cronopotenciogramas en circuito abierto. Potencial de deposición -2.2 vs (Ag(I)/Ag)/V tiempo de electrodeposición, t_d , 30 s y 20 s. Curva negra potencial de equilibrio adoptado por un electrodeposito de Sc sumergido en la disolución de Sc(III)

La emf medida depende de la composición química de las aleaciones y es función de la actividad de Sc, según la expresión:

$$emf = \frac{RT}{3F} \ln a_{Sc}$$

a_{Sc} , es la actividad del Sc en los compuestos intermetálicos Sc-Al, tomando el Sc puro como el estado estándar. Cuando la superficie del electrodo está compuesta por una mezcla de 2 aleaciones de composiciones definidas $Sc_{x_1}Al$ y $Sc_{x_2}Al$, la actividad del escandio viene determinada por el equilibrio:



Por lo que la emf adquiere un valor constante durante la transformación completa de la aleación $Sc_{x_1}Al$ a la aleación $Sc_{x_2}Al$. Para la composición exacta de la aleación definida $Sc_{x_2}Al$, por ejemplo, se observa una variación de la emf entre el valor de las mesetas correspondientes a los equilibrios bifásicos de la mezcla

Sc_{x1}Al + Sc_{x2}Al y de la mezcla Sc_{x2}Al + Sc_{x3}Al. La a_{Sc} en los diferentes equilibrios bifásicos se muestra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Propiedades termodinámicas de Sc en los compuestos intermetálicos Sc-Al a 723 °K

T/°K	E/V vs Sc(III)/Sc	$\Delta\bar{G}_{Sc}/\text{kJ mol}^{-1}$	a _{Sc}
<i>En las dos fases coexistentes entre AlSc₂ y AlSc</i>			
723	0.060 ± 0.015	-17.4 ± 4,3	5.5 x 10 ⁻²
<i>En las dos fases coexistentes entre AlSc y Al₂Sc</i>			
723	0.193 ± 0.020	-55.9 ± 5,8	9.2 x 10 ⁻⁵
<i>En las dos fases coexistentes entre Al₂Scy Al₃Sc</i>			
723	0.340 ± 0.010	-98.4 ± 2,9	7.7 x 10 ⁻⁸
<i>En las dos fases coexistentes entre Al₃Sc y Al</i>			
723	0.540 ± 0.010	-156.3 ± 2,9	5.0 x 10 ⁻¹²

La energía de formación estándar de Gibbs de una aleación de composición Sc_{x2}Al se calcula a partir de la aleación Sc_{x1}Al por la relación:

$$\Delta G_f^0(\text{Sc}_{x_2}\text{Al}) = \int_{x_1}^{x_2} \Delta E(x)dx + \Delta G_f^0(\text{Sc}_{x_1}\text{Al})$$

Un procedimiento previamente utilizado por Picard [20] en el caso de aleaciones de La-Ni, y Taxil en el caso de aleaciones Ta-Ni [21]. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Energías de formación de Gibbs de compuestos intermetálicos Sc-Al

Reacción de formación	T/K	$\Delta G_f^0/\text{KJ mol}^{-1}$	$\Delta G_f^0/\text{KJ mol}^{-1}$
3 Al+ Sc ↔ Al ₃ Sc	723	-156.33	-39.08
2Al + Sc ↔ Al ₂ Sc	723	-137.03	-45.68
Al + Sc ↔ AlSc	723	-96.45	-48.23
Al + 2Sc ↔ AlSc ₂	723	-113.82	-37.94

4.3.3.5. Electrólisis galvanostática

Basándonos en los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica y cronopotenciometría y con el fin de preparar las aleaciones de Sc-Al aún más estables, se realizaron varias electrólisis potencioestáticas y galvanostáticas de pulsos con disoluciones de Sc(III) imponiendo respectivamente diferentes potenciales e intensidades de corriente y diferentes tiempos de electrodeposición, utilizando como electrodo de trabajo placas de aluminio de 2.5 x 0.6 x 0.5 cm. Después de la electrólisis las muestras se lavaron con etilén glicol anhidro (Aldrich 99.8%) y se guardaron en la caja de guantes hasta su análisis.

En las Figuras 4.25 y 4.26 se recogen los difractogramas de dos de las placas analizadas, en las que puede verse la formación de Al_3Sc y Al_2Sc

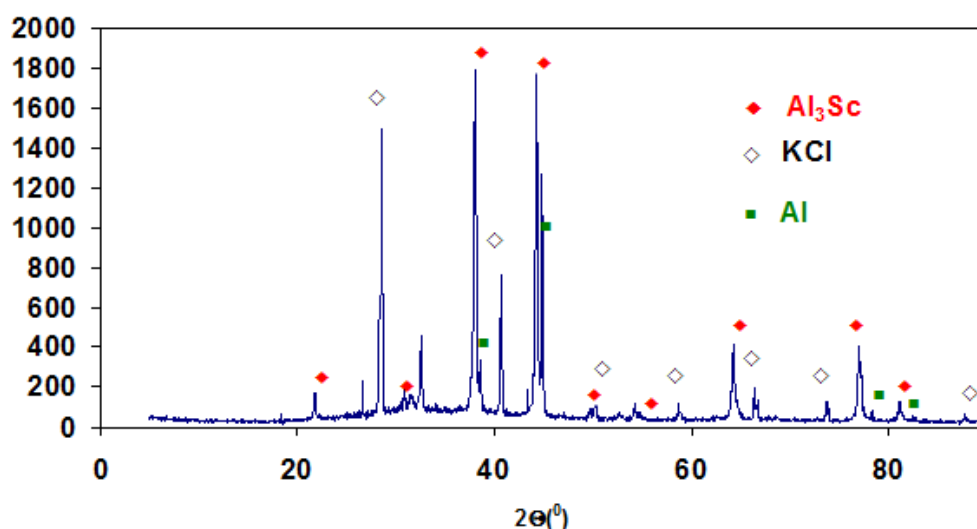


Figura 4.25. Difractograma del depósito obtenido bajo condiciones de intensidad de corriente.

$i_{\text{aplicado}} = -50 \text{ mA}$ durante 50 minutos

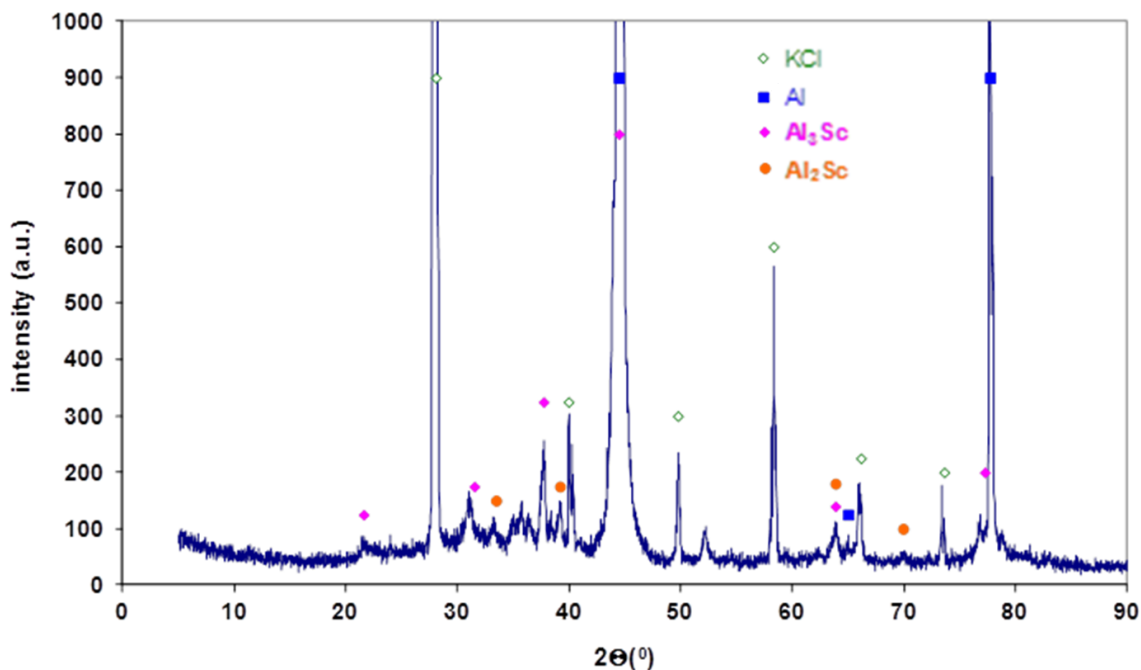


Figura 4.26. Difractograma del depósito obtenido bajo condiciones de intensidad de corriente.

$E_{\text{aplicado}} = -1.80 \text{ V vs (Ag(I)/Ag)}$ durante 30 minutos

La morfología de los depósitos se observó por microscopía electrónica de barrido (SEM, Figura 4.27) en donde se logran observar que las aleaciones mayoritarias son Al_2Sc y Al_3Sc . Además de este análisis, se realizó espectrometría de energía dispersiva (SEM-EDX) en donde se logran obtener evidencia de formación de las cuatro aleaciones reportadas para Al-Sc.

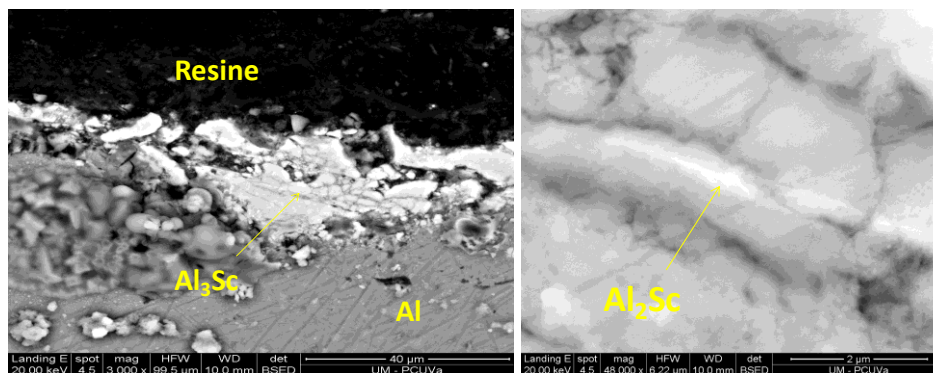


Figura 4.27. Imagen del SEM de un electrodepósito Sc-Al obtenido mediante electrolisis amperométrica (-50 mA durante 50 minutos)

4.4. Conclusiones

- a) Se ha investigado la electrodeposición de Sc sobre un electrodo inerte de W y reactivo de Al en el eutéctico LiCl-KCl, mediante la combinación de diferentes técnicas electroquímicas.
- b) Sobre un electrodo inerte de W, la electrorreducción de Sc(III) tiene lugar en una única etapa y la electrocristalización juega un papel fundamental. Las curvas experimentales intensidad-tiempo se ajustan al modelo teórico basado en nucleación instantánea (todos los núcleos se forman “inmediatamente” después de aplicar el potencial) con crecimiento tridimensional de los núcleos a todos los potenciales aplicados y temperaturas ensayadas. El coeficiente de difusión de los iones Sc(III) se ha determinado mediante cronopotenciometría aplicando la ecuación de Sand, y evitando el efecto menisco mediante sucesivas inmersiones del electrodo de trabajo. Se verificó la ley de Arrhenius representando la variación del logaritmo del coeficiente de difusión frente a $1/T$, y se calculó la energía de activación para la difusión resultó ser de $38.18 \pm 1.95 \text{ kJ mol}^{-1}$.
- c) La reducción de los iones Sc(III) sobre electrodo reactivo de Al tiene lugar a potenciales menos catódicos que sobre un electrodo inerte de W. Este desplazamiento del potencial se interpreta termodinámicamente como una disminución de la actividad de Sc en la fase metálica, debido a la formación de compuestos intermetálicos Al-Sc.
- d) Las actividades de Sc en la fase aluminio así como las energías standard de Gibbs de formación de Al_3Sc , Al_2Sc , AlSc , y AlSc_2 se estimaron a partir de medidas cronopotenciométricas en circuito abierto.
- e) Se obtuvieron aleaciones Al-Sc mediante electrolisis poteenciostática y galvonstática pulsante que fueron caracterizadas mediante Difracción de Rayos X y microscopio electrónico de barrido. El análisis MEB-EDX y XRD de los depósitos obtenidos sugirió la formación mayoritaria de la aleación es Al_3Sc . El análisis del corte transversal indicó un transporte del Sc metálico hacia el interior del cátodo de Al.

2.5. Referencias

- [1] Kosuke Izutsu, *Electrochemistry in Nonaqueous Solutions*. Copyright © 2002 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBNs: 3-527-30516-5 (Hardback); 3-527-60065-5 (Electronic)
- [2] A. Kononov, E. Polyakov, Cathodic process in halide melts containing scandium, *Electrochimica Acta* 43 (1998) 2537-2542
- [3] A.I. Kononov, D.V. Elizarov, S.A. Kuznetsov, Ya.A. Pakhomovskiy, E.G. Polyakov, Mechanism of formation of Ni-Sc intermetallic compound layers on a nickel surface in molten halides, *Journal of Alloys and Compounds* 219 (1995) 149-151
- [4] L. Yang and R.G. Hudson, *Transactions of the Metallurgical Society of the American Institute of Mechanical Engineers* 215 (1959) 589.
- [5] E. Aukrust, B. Björge, H. Flood and T. Førland, Activities in molten salt mixtures of potassium-lithium-halide mixtures: a preliminary report, *Annals of the New York Academy of Sciences* 79 (1960) 830-837
- [6] G.J. Janz, NIST Properties of molten salts database, NIST Standard Reference Data Base 27. Versión 2.0 (1992)
- [7] HSC Chemistry 4.1, "Chemical reaction and equilibrium software with extensive thermochemical database", Outkumpu, (1974-2000)
- [8] J. Lumsden, *Thermodynamics of molten salts mixtures*, Academic Press, New York 1966
- [9] A.J. Bard and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamental and application*, Wiley, New York (2001)
- [10] K. Serrano, P. Taxil, Electrochemical nucleation of uranium in molten chlorides, *The Journal Applied Electrochemistry* 29 (1999) 505-510
- [11] C. Hamel, P. Chamelot, P. Taxil, Neodymium(III) cathodic processes in molten fluorides, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4467-4476

- [12] J. Serp, P. Chamelot, S. Fourcaudot, R.J.M. Konings, R. Malmbeck, C. Pernel, J.C. Poignet, J. Rebizant, J.P. Glatz, Electrochemical behaviour of americium ions in LiCl-KCl eutectic melt, *Electrochimica Acta* 51 (2006) 4024-4032
- [13] C. Hamel, P. Chamelot, A. Laplace, E. Walle, O. Dugne, P. Taxil, Reduction process of uranium(IV) and uranium (III) in molten fluorides, *Electrochimica Acta* 52 (2007) 3995–4003
- [14] *Instrumental Methods in Analytical Chemistry*, Southampton Electrochemistry group, University of Southampton, Horwood, Chichester (2001)
- [15] P. Allongue and E. Souteyrand, Metal electrodeposition on semiconductors: Part I. Comparison with glassy carbon in the case of platinum deposition, *Journal Electroanalytical Chemistry* 286 (1990) 217-237
- [16] B. Scharifker and G. Hills, Theoretical and experimental studies of multiple nucleation, *Electrochimica Acta* 28 (1983) 879
- [17] H. Okamoto, Al-Sc (Aluminum-Scandium), *Journal of Phase Equilibria* 12 (1991) 612-613
- [18] H. Konishi, T. Nishikiori, T. Nohira and Y. Ito, Thermodynamic properties of Dy Ni intermetallic compounds, *Electrochimica Acta* 48 (2003) 1403-1408
- [19] G.S. Picard, .E. Mottot, B.L. Trémillon, in: “Proceedings of the fourth International Symposium on Molten Salts” The Electrochemical Society 84 (1984) 585-602
- [20] P. Taxil, J. Mahenc, Formation of corrosion-resistant layers by electrodeposition of refractory metals or by alloy electrowinning in molten fluorides, *Journal of Applied Electrochemistry* 17 (1987) 261-269