

Capítol 7

Caracterització electroquímica de microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids

7.1. Introducció

Un cop optimitzada la construcció dels microelèctrodes es va procedir a una caracterització electroquímica, tal com es va fer amb els macroelèctrodes, a la part II d'aquest treball de recerca. En aquest cas, però, no va ser possible l'obtenció d'imatges per microscòpia electroquímica ja que no es posseeix un ultramicroelèctrode que actuï de punta amb diàmetre prou petit.

7.2. Reactius i instruments

En aquesta secció es van emprar els mateixos reactius i instruments que en els capítols anteriors.

7.3. Voltamperometria cíclica

Per tal de caracteritzar els microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids es van portar a terme diversos experiments electroquímics. Per començar, es va realitzar una sèrie de voltamperogrames cíclics a diferents velocitats d'escombrat. La figura 7.3-1 mostra la gràfica de Cottrell obtinguda per al microelèctrode basat en el compòsit conductor rígid d'Araldite-M/HY5162-60% grafit en acetonitril amb TBAP 0.1 M i ferrocè 0.9 mM, a temperatura ambient. Les velocitats d'escombrat emprades es troben compreses entre $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ i $500 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. La gràfica de Cottrell obtinguda per al microelèctrode basat en el compòsit conductor rígid d'Araldite-PY302-2/HY943-60% grafit va resultar molt similar a la mostrada a la figura 7.3-1 tot i que es va realitzar en metanol, també amb TBAP 0.1 M i ferrocè 0.9 mM, a temperatura ambient.

A la figura 7.3-1 es comparen els resultats obtinguts per al microelèctrode basat en el compòsit conductor rígid de $25 \mu\text{m}$ de diàmetre amb un microelèctrode de platí del mateix diàmetre. El primer tret a destacar de la figura 7.3-1 és l'elevada similitud en el comportament del microelèctrode basat en el compòsit conductor rígid i l'obtingut per al microelèctrode de platí. A la gràfica es poden distingir tres zones. La primera s'estén entre $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ fins a $0.3 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, i correspon a l'obtenció d'estat estacionari, és a dir, es produeix una difusió esfèrica cap a la superfície total del microelèctrode. Per aquest motiu les intensitats de pic són pràcticament independents de la velocitat d'escombrat en aquesta zona. Entre $0.3 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ i aproximadament $30 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ correspon a un interval en el qual es produeix una difusió del ferrocè cap a la superfície del microelèctrode que és una mescla entre esfèrica i lineal. A partir de $30 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ la difusió cap a la superfície total del microelèctrode és predominantment lineal, i segueix el comportament predit per l'equació de Randles-Sevcic. No es van realitzar voltamperogrames cíclics a velocitats d'escombrat superiors a $500 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ja que tal com es mostrarà més endavant al quadre 7.4-1, la resistència del microelèctrode basat en el compòsit conductor rígid és molt elevada, la qual cosa es tradueix en caigudes òhmiques molt elevades a velocitats d'escombrat altes, de manera que si a $500 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ les distorsions generades per aquesta caiguda òhmica eren, ja, molt elevades, a velocitats d'escombrat superiors les distorsions eren massa grans com per obtenir dades fiables d'aquests voltamperogrames. A més, un altre factor a tenir en compte són els elevats valors obtinguts per la constant de cel·la, RC , quadre 7.4-1, de manera que no permeten la mesura de corrents faradaics a temps massa baixos. A velocitats d'escombrat superiors a $500 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, el corrent capacitatiu esdevé comparable al faradaic, cosa que contribueix a la formació de distorsions en els voltamperogrames cíclics.

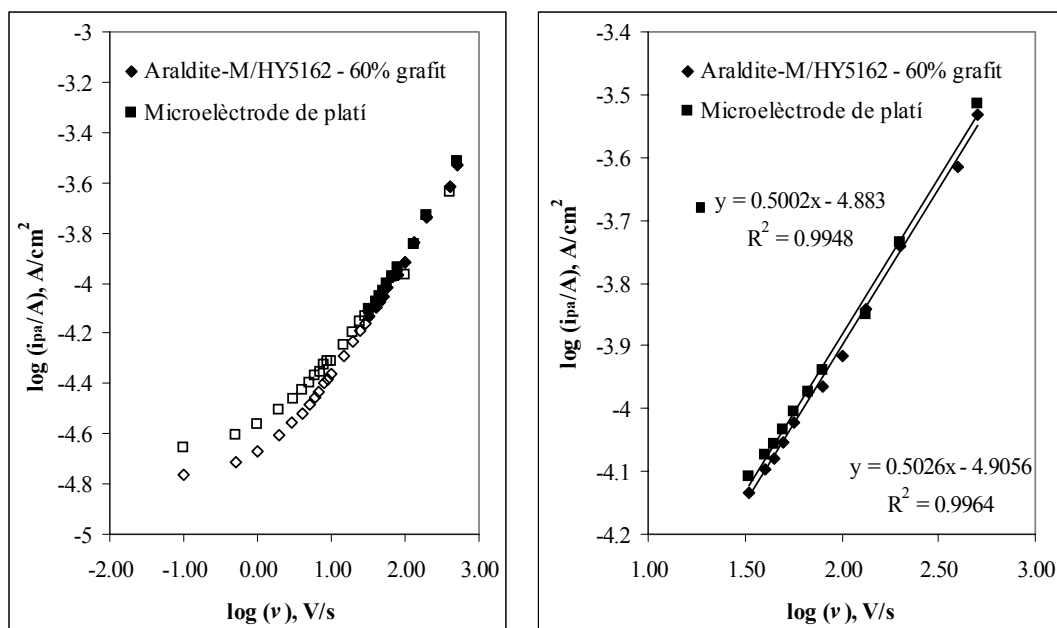


Figura 7.3-1. Gràfiques de Cottrell obtingudes amb el microelectrode basat en el compòsit conductor rígid d'Araldite-M/HY5162-60% grafit en acetonitril amb TBAP 0.1 M i ferroçè 0.9 mM a temperatura ambient i escombrant a diferents velocitats d'escombrat (v) compreses entre $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ i $500 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

L'elevada similitud observada entre el comportament dels microelèctrodes basats en els compòsits conductors rígids i el de platí indica que els voltamperograms cíclics realitzats corresponen a una escala de temps en la qual no és possible observar un comportament de bateria de microelèctrodes, sinó que es té una difusió cap a la superfície total del microelèctrode. Si realment es mantingués l'estructura de feix de microelèctrodes observada a la part II d'aquesta tesi, caldria esperar que aquestes microzones fossin molt petites i que es trobessin molt properes entre elles. Per tant, caldrà escombrar a velocitats molt elevades per tal d'aconseguir difusió cap a cada microzona conductora individualment. Així, en escombrar a velocitats prou grans es tornaria a tenir una zona plana a la gràfica de Cottrell corresponent a una difusió esfèrica cap a cada microzona conductora individualment, i escombrant encara més depressa, s'aconseguiria tenir difusió lineal cap a cada microelèctrode individualment. Com que degut a problemes de caiguda òhmica i de constants de cel·la elevades no es poden assolir aquestes velocitats, no s'ha pogut comprovar mitjançant voltamperometria cíclica si aquests materials realment mantenen el seu comportament de feix de microelèctrodes en passar de dimensions macroscòpiques a dimensions microscòpiques.

Més endavant, però, es veurà que altres experiments generaran resultats que suggeriran que aquesta estructura encara es manté en passar a proporcions microscòpiques i que de fet es reflecteix, tot i que de forma menys evident que quan es treballa amb macroelèctrodes, en el comportament electroquímico d'aquests dispositius.

Donat els problemes de caiguda òhmica observats en escombrar a velocitats elevades, per tal d'obtenir una estimació de la superfície activa dels microelèctrodes basats en els compòsits conductors rígids es van utilitzar els voltamperogrames cíclics realitzats a velocitats d'escombrat compreses entre 1 i 4 $V \cdot s^{-1}$. A aquestes velocitats d'escombrat la difusió esfèrica encara té una contribució important en el règim de difusió global del ferroç cap a la superfície del microelèctrode. Tot i així, les distorsions degudes a efectes òhmics són prou baixes com per permetre l'obtenció de les intensitats de pic amb major precisió. La figura 7.3-2 mostra un exemple d'una de les estimacions realitzades amb el microelèctrode basat en el compòsit d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit. A l'esquerra d'aquesta figura s'il·lustren els voltamperogrames cíclics els quals mostren una clara contribució de la difusió esfèrica. Les intensitats de pic anòdic, i_p , es van representar respecte $v^{1/2}$ i la superfície es va determinar a partir del pendent obtingut en aplicar una regressió lineal i aplicant l'equació de Randles-Sevcic (equació (7.3-1),

$$i_p = 2.687 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_0^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C_0 \quad (7.3-1)$$

on i_p és la intensitat de corrent de pic en A, n és el nombre d'electrons bescanviats, A és la superfície en cm^2 , D_0 és el coeficient de difusió en $cm^2 \cdot s^{-1}$ (el valor del qual es va donar al capítol 4 per acetonitril i per metanol), v és la velocitat d'escombrat en $V \cdot s^{-1}$ i C_0 és la concentració de l'espècie electroactiva al si de la solució en $mol \cdot cm^{-3}$.

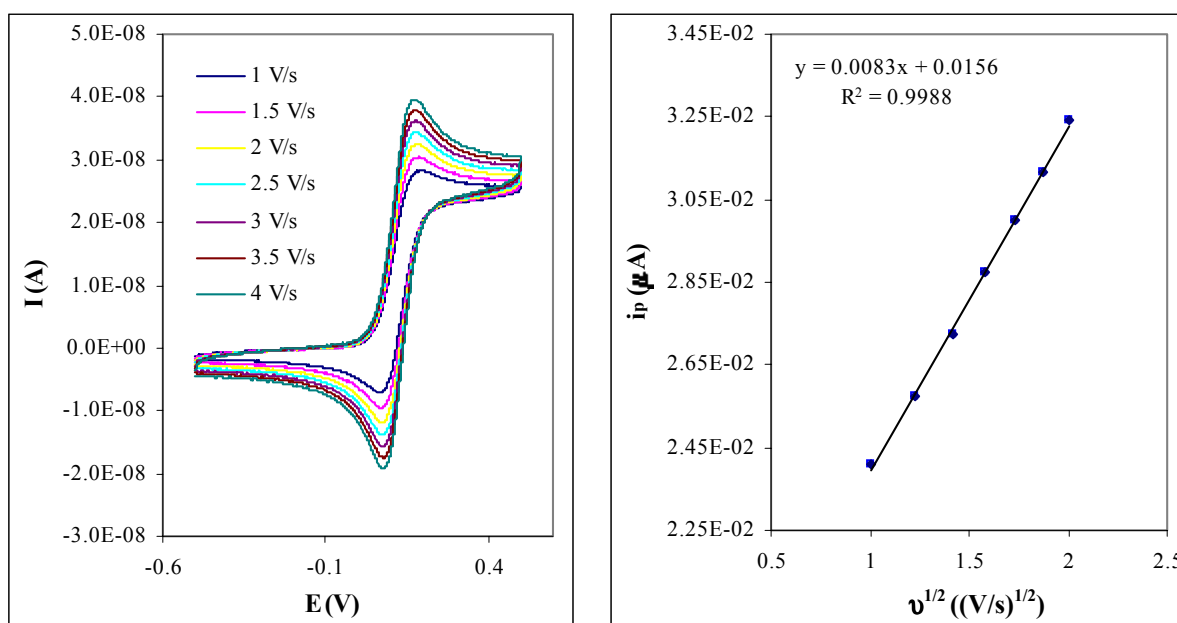


Figura 7.3-2. Voltamperogrames cíclics (esquerra) i i_p vs $v^{1/2}$ (dreta) obtinguts amb el microelèctrode basat en el compòsit d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit. Els experiments es realitzaren en acetonitril amb TBAP 0.1 M i ferroç 0.9 mM, a temperatura ambient, escombrant entre 1 $V \cdot s^{-1}$ i 4 $V \cdot s^{-1}$ respecte un elèctrode de referència de Ag/Ag^+ , a temperatura ambient.

El quadre 7.3-1 mostra els resultats obtinguts per les superfícies actives dels microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids emprant aquest mètode. Aquests resultats són una estimació de la part de superfície que és electroactiva. Tal com es pot veure a partir dels resultats del quadre 7.3-1, la superfície activa del microelèctrode d'Araldite-M no és significativament inferior a la superfície geomètrica. Pel que fa al microelèctrode basat en el compòsit d'Araldite-PY302-2, la superfície obtinguda sembla inferior a la superfície geomètrica. Tot i que no és estrany trobar que part de la superfície dels compòsits sigui no conductora, tenint en compte que a les velocitats d'escombrat utilitzades es té difusió cap a la totalitat de la superfície del microelèctrode, aquest resultat es pot explicar tenint en compte que aquest compòsit té una resistència molt elevada en comparació amb un elèctrode de platí o inclús en comparació amb el compòsit d'Araldite-M, cosa que afegeix error a les mesures a partir de les quals es determina la seva superfície. Per altra banda, el fet que la difusió tingui una contribució important de règim esfèric introdueix error en l'ajust al model de Randles-Sevcic.

Quadre 7.3-1. Superfícies actives

<i>Compòsit</i>	<i>A (cm²)</i>
Araldite-M/HY5162 - 60% grafit	4.87·10 ⁻⁶
Araldite-PY302-2/HY943 - 60% grafit	3.08·10 ⁻⁶
Superfície geomètrica	4.91·10 ⁻⁶

7.4. Cronoamperometria

Altres paràmetres necessaris per caracteritzar els microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids són la seva constant de cel·la, la seva resistència i la seva capacitat. Aquests paràmetres es van obtenir mitjançant cronoamperogrames realitzats en acetonitril o metanol amb els microelèctrodes basats en Araldite-M/HY5162 – 60% grafit o en Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament. Els solvents únicament contenen TBAP en una concentració de 0.1 M, sense ferroçè. Els cronoamperogrames es registraren a temperatura ambient i l'esglaó de potencial va ser 0.4 V en acetonitril i 0.5 V en metanol. Les dades cronoamperomètriques obtingudes amb un elèctrode de superfície contínua haurien de poder-se ajustar a l'equació (7.4-1),

$$\ln(i) = \ln \frac{\Delta E}{R_{cel\cdot la}} - \frac{1}{R_{cel\cdot la} C_{dc}} \cdot t \quad (7.4-1)$$

on ΔE és l'esglaó de potencial, $R_{cel\cdot la}$ és la resistència de cel·la, C_{dc} és la capacitat de la doble capa electroquímica, t és el temps de mesura i i és la intensitat de corrent. Els resultats obtinguts amb els microelèctrodes basats en compòsits, però, no seguien el comportament predit per aquesta equació.

Per tant, tal com es va fer al capítol 4 amb els macroelèctrodes basats en compòsits conductors rígids, el valor de RC es va considerar el temps necessari perquè la intensitat de corrent

esdevingui el 10% de la intensitat de corrent a temps inicial. També es va determinar la càrrega emmagatzemada fins al temps corresponent a RC mitjançant la integració de la corba intensitat de corrent vers temps, i dividint la càrrega pel valor de l'esglaió de potencial, es va obtenir la capacitat del microelèctrode, C_{dc} . La resistència de cel·la, $R_{cel·la}$, es va determinar dividint RC pel valor obtingut per la capacitat. Aquest mètode només permet obtenir una estimació dels valors reals d'aquests paràmetres. Els resultats es mostren al quadre 7.4-1.

Quadre 7.4-1. Dades cronoamperomètriques						
<i>Compòsit</i>	<i>Medi</i>	$R_{cel·la}$ Ω	C_{dc} $\mu F/cm^2$	$R_{cel·la}C_{dc}$ s	iR (V) $v = 25$ $V \cdot s^{-1}$	iR (V) $v = 44.4$ $V \cdot s^{-1}$
Araldite-M / HY5162 - 60% grafit	Acetonitril TBAP 0.1 M	1.51 ± 0.007	$4.98 \cdot 10^{-4} \pm$ $2 \cdot 10^{-6}$	$7.5 \cdot 10^{-4}$	0.12	0.14
Araldite-PY302- 2 / HY943 - 60% grafit	Metanol TBAP 0.1 M	4.06 ± 0.03	$3.52 \cdot 10^{-2} \pm$ $2 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-1}$	0.09	0.10
Pt	Acetonitril TBAP 0.1 M	0.028 ± 0.001	$1.27 \cdot 10^{-4}$	$3.6 \cdot 10^{-6}$	-	-
Pt	Metanol TBAP 0.1 M	0.017 ± 0.002	$1.72 \cdot 10^{-4}$	$2.9 \cdot 10^{-6}$	-	-

El fet que les dades experimentals no es poguessin ajustar a l'equació (7.4-1), podria ser deguda a que l'estructura del compòsit no és una superfície contínua sinó que segurament és una mescla de zones conductores i de zones aïllants com si es tractés d'un feix d'ultramicroelèctrodes. Això implica que no existeix un únic valor per la capacitat, sinó que existeixen diversos valors, i el valor de la capacitat obtingut com es descriu en aquesta secció correspon a un valor mitjà dels diferents valors reals. Per tant, els valors obtinguts per RC , C_{dc} i $R_{cel·la}$ només poden ser estimacions dels valors reals. Tot i així, a partir d'aquests valors es pot concloure que aquests microelèctrodes tenen una capacitat força superior a la d'un microelèctrode convencional de platí, tal com es mostra al quadre 7.4-1. Un possible motiu per les diferències observades en comparació amb l'elèctrode de platí seria la rugositat dels compòsits, la qual no s'ha tingut en compte en els càlculs. Per una altra banda, però, la capacitat observada per al microelèctrode basat en el compòsit d'Araldite-PY302-2, $3.52 \cdot 10^{-2} \mu F$, és massa elevada respecte la del compòsit d'Araldite-M com per poder ser explicada únicament per la rugositat d'aquests materials, sinó que en aquest cas s'haurien de considerar efectes de permeació de les partícules de grafit per part de la solució d'electròlit.

Totes aquestes observacions porten a la conclusió que els microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids tenen superfícies amb estructures complexes que alternen microzones

conductores amb microzones aïllants, tal com es va observar prèviament (veure capítol 4) amb macroelèctrodes basats en aquests materials. En el cas dels microelèctrodes, però, s'ha vist que contràriament al que s'acaba d'observar en aquesta secció, els experiments de voltamperometria cíclica no reflectien aquesta estructura complexa. Aquest fet es va atribuir a un solapament dels camps de difusió. Cal tenir en compte que si realment existeixen microzones conductores i microzones aïllants, aquestes seran extremadament petites i es trobaran molt properes entre elles, cosa que originarà un solapament de capes de difusió a temps molt curts.

Una altra conclusió important que es pot extreure d'aquestes dades cronoamperomètriques és que els valors obtinguts per RC , així com els obtinguts per les resistències de cel·la són molt elevats, fent que aquests microelèctrodes basats en compòsits no siguin massa adequats per mesures molt ràpides, com les requerides en estudis cinètics. Tot i així, els elevats valors obtinguts per RC no limitaran l'aplicació d'aquests microelèctrodes basats en compòsits en el desenvolupament de sensors analítics, ja que les mesures realitzades per fer una corba de calibrat es prenen a temps molt superiors als valors obtinguts per RC per aquests microelèctrodes.

Es va continuar l'estudi cronoamperomètric registrant cronoamperogrames en presència d'una concentració de ferroç de 2 mM, aplicant els mateixos esglaons de potencial que als experiments descrits als paràgrafs anteriors. La figura 7.4-1 mostra els resultats obtinguts per aquests cronoamperogrames, per temps compresos entre el valor de RC i quatre cops aquest valor.

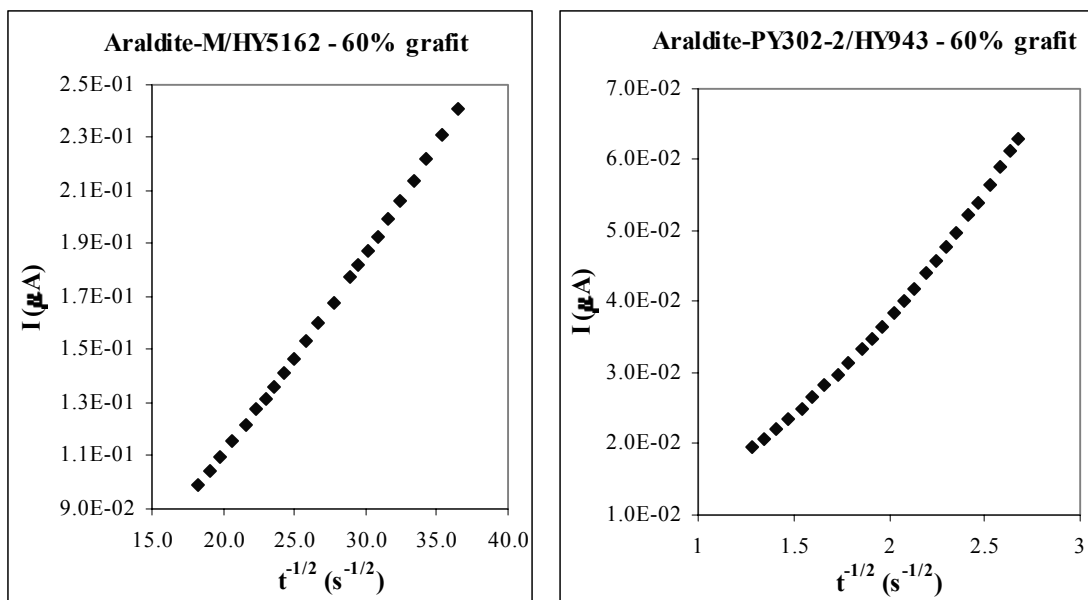


Figura 7.4-1. Cronoamperogrames registrats en acetonitril amb TBAP 0.1 M i ferroç 2 mM amb els microelèctrodes basats en els compòsits d'Araldite-M/HY5162 - 60% grafit (esquerra) i en metanol també amb TBAP 0.1 M i ferroç 2 mM amb el microelèctrode d'Araldite-PY302-2/HY943 - 60% grafit (dreta). Tots dos experiments es van realitzar a temperatura ambient.

Es pot veure que el comportament seguit pels microelèctrodes basats en compòsits és el predit per microelèctrodes de superfície contínua, mentre que pels macroelèctrodes basats en aquests mateixos compòsits es va veure que el comportament es desviava clarament del predit per un macroelèctrode de superfície contínua (veure capítol 4). Per tant, aquests resultats mostren que en aquesta escala de temps, els microelèctrodes basats en compòsits es comporten com microelèctrodes de superfície contínua, de manera que o bé els compòsits no mantenen una estructura de feix de microzones conductores, o bé, tal com s'ha dit prèviament en aquesta secció, les microzones conductores són molt petites i estan molt properes entre sí de manera que les capes de difusió colapsen a temps molt petits, segurament inferiors al valor de RC , que és el temps mínim al qual podem realitzar mesures de corrents faradaics.

La figura 7.4-2 mostra imatges obtingudes per microscòpia electrònica (SEM) de macrodiscs dels compòsits emprats per construir els microelèctrodes.

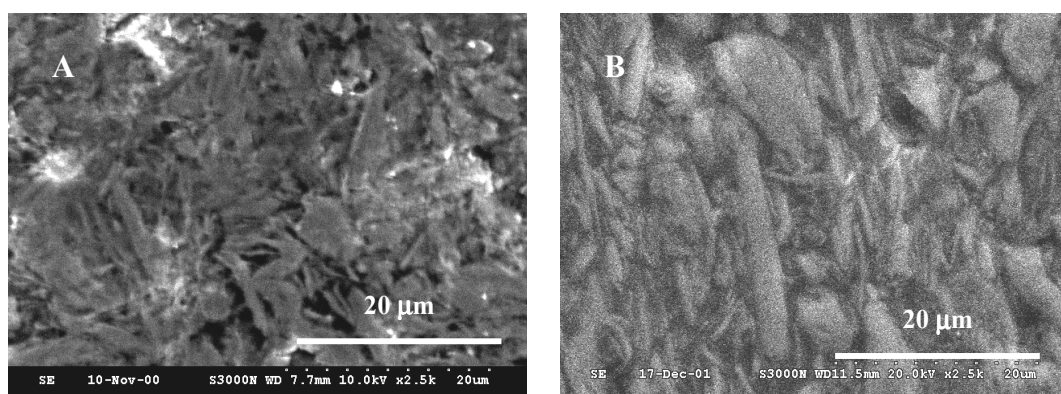


Figura 7.4-2. Imatges obtingudes per microscòpia electrònica de macrodiscs del compòsit (A) d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit, i (B) d'Araldite-PY302-2/HY5162 – 60% grafit. Les imatges es van obtenir a un potencial d'acceleració de 10 i 20 keV respectivament.

Aquestes imatges mostren que les partícules de grafit són, de fet, molt petites i es troben molt properes entre si. Es va demostrar al capítol 5 d'aquesta tesi que la microscòpia electrònica no dóna informació d'a quines partícules de grafit es produeix transferència electrònica, sinó que per tal d'obtenir aquesta informació caldria registrar imatges emprant microscòpia electroquímica. Tot i així, per similitud entre aquestes imatges i les obtingudes emprant grafit de 50 µm de mida de partícula (capítol 5), es pot dir que aquestes imatges obtingudes per SEM recolzen la teoria d'una superfície formada per microzones conductores i microzones aïllants amb una separació entre elles molt petita.

7.5. Cinètica de transferència de càrrega heterogènia

Una elevada velocitat de transferència de càrrega heterogènia és necessària per tal de realitzar electroanàlisis sensibles. Per tant, es van determinar les constants cinètiques de transferència

de càrrega d'aquests microelèctrodes. La figura 7.5-1 il·lustra les respostes obtingudes per l'oxidació i subseqüent reducció del ferroç dissolt en acetonitril (dalt) i metanol (baix) amb els microelèctrodes basats en els compòsits d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament escombrant a $25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (esquerra) i a $44 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (dreta), els quals, tot i ser registrats a velocitats d'escombrat força elevades, mostren una forma general consistent amb una resposta voltamperomètrica sota control de difusió lineal semi-infinita. Els voltamperogrames cíclics experimentals es compararen amb uns de simulats a partir de l'equació de Butler-Volmer¹ d'electrocinètica sota condicions de difusió lineal (equació (7.5-1)), per dos velocitats d'escombrat diferents,

$$i = F \cdot A \cdot k^0 \left[C_0(0,t) \cdot e^{\alpha \cdot f \cdot (E - E^0)} - C_R(0,t) \cdot e^{(1-\alpha) \cdot f \cdot (E - E^0)} \right] \quad (7.5-1)$$

on $f = F / RT$, $C_0(0,t)$ és la concentració de l'espècie oxidada respecte el temps, $C_R(0,t)$ és la concentració de l'espècie reduïda respecte el temps i E^0 és el potencial al qual la constant de velocitat de transferència de càrrega d'oxidació i la de reducció adquireixen el mateix valor, k^0 . Les variables lliures van ser D_0 , k^0 i α . El valor de D_0 es va considerar l'obtingut experimentalment i α es va considerar 0.5, de manera que mitjançant iteracions variant k^0 es va obtenir el voltamperograma cíclic que més s'ajustà als valors obtinguts experimentalment.

Per als microelèctrodes basats en els compòsits conductors rígids, per velocitats d'escombrat de $25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ i $44 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ es va obtenir una millor correlació amb els voltamperogrames cíclics teòrics quan el coeficient de difusió del ferroç és $1.57 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en acetonitril i $3.49 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ en metanol (els coeficients de difusió es van obtenir mitjançant una anàlisi de Randles-Sevcic amb voltamperogrames cíclics realitzats a diferents velocitats d'escombrat en les mateixes condicions que els estudis cinètics amb un macroelèctrode de carboni vitrificat de 3 mm de diàmetre), i la constant de velocitat de transferència electrònica heterogènia, k^0 , va ser $0.22 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ i $0.04 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ per als microelèctrodes basats en els compòsits d'Araldite-M/HY5162 i d'Araldite-PY302-2/HY943 respectivament. Els valors obtinguts per k^0 són únicament una estimació del valor mínim que la constant de velocitat de transferència de càrrega pot tenir, ja que la separació de pics té una contribució significativa de la caiguda òhmica, tal com es va estimar a la taula 7.4-1. A més, els voltamperogrames cíclics experimentals tenen una certa contribució de la difusió esfèrica, i això, junt amb una elevada resistència, generen distorsions en els voltamperogrames (com són una línia base inclinada i pics menys definits) que originen una correlació pobre amb els voltamperogrames cíclics teòrics. El fet que s'obtingui el mateix valor per k^0 amb ambdues velocitats, però, és indicatiu d'una bona homogeneïtat pel que fa a la velocitat de transferència de càrrega a les diferents partícules de grafit, és a dir, la transferència de càrrega es produeix a velocitats molt similars a totes les partícules de grafit exposades al medi.

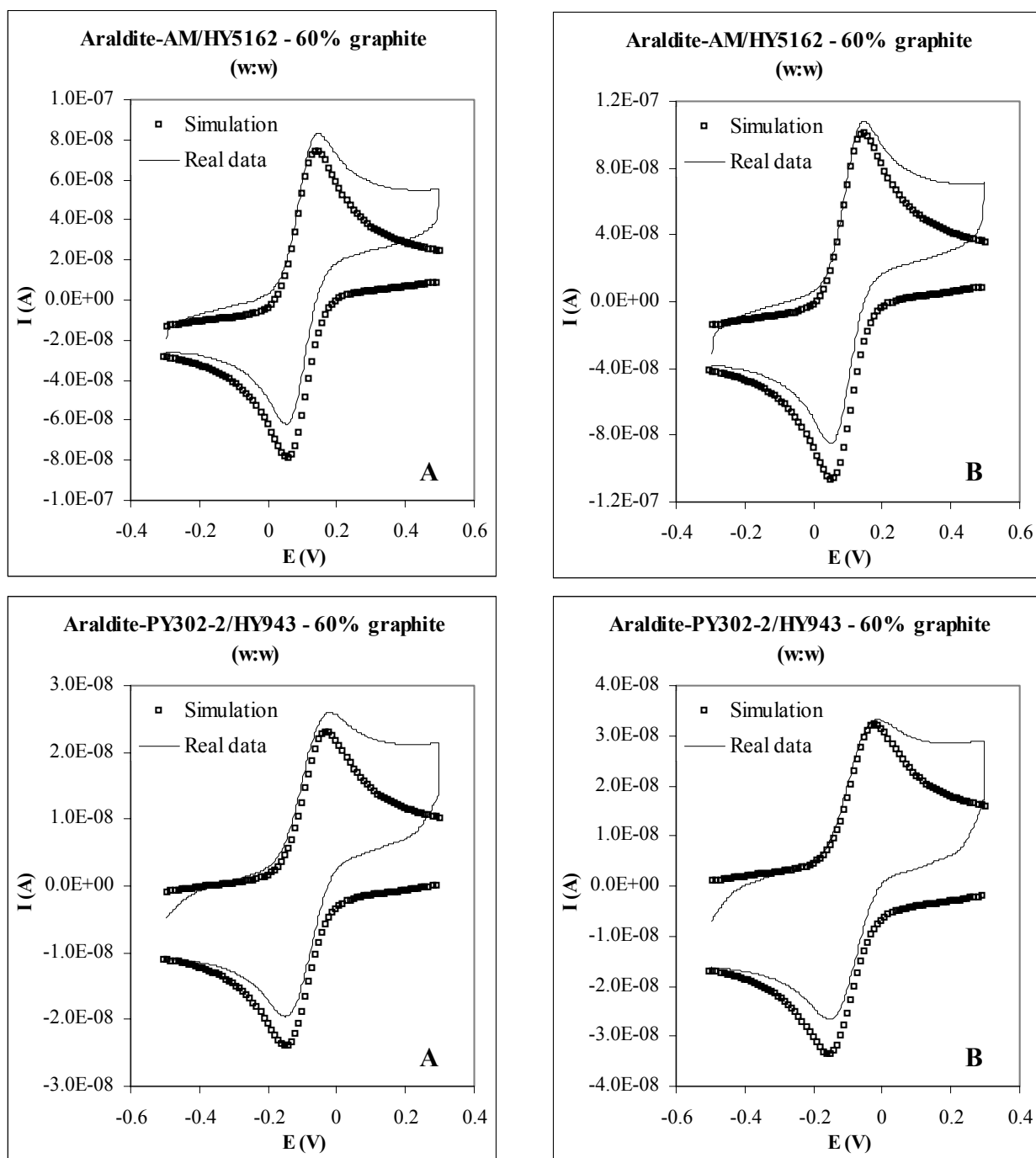


Figura 7.5-1. Comparació entre les dades reals i els voltamperogrames cíclics obtinguts mitjançant un procés de simulació per velocitats d'escombrat de (A) $25 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ i (B) $44.4 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Les dades experimentals es van obtenir en acetonitril quan s'utilitzà el microelèctrode d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i en metanol quan s'utilitzà el microelèctrode d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit. En tots dos casos la concentració de TBAP va ser 0.1 M i la de ferroçè va ser 0.9 mM , i es van portar a terme a temperatura ambient.

Els microelèctrodes amb forma de disc són els que s'han utilitzat normalment per realitzar estudis cinètics donada la baixa capacitat i les poques distorsions dels voltamperogrames cíclics que tenen en general. Contràriament, els microelèctrodes basats en els compòsits van mostrar capacitats molt elevades i voltamperogrames amb moltes distorsions, fent més complicada la correlació amb els voltamperogrames simulats. Les fonts de distorsions dels voltamperogrames cíclics obtinguts amb els microelèctrodes basats en els compòsits conductors rígids són les elevades resistències i la contribució de difusió esfèrica, tal com s'ha dit a paràgrafs anteriors. Per tal d'eliminar la contribució esfèrica, caldria escombrar a velocitats més elevades. Les elevades resistències, però, generarien caigudes òhmiques i distorsions en els voltamperogrames molt més elevades que les distorsions degudes a la contribució de la difusió esfèrica.

L'única conclusió clara que es pot extrapolar d'aquest estudi és que la transferència de càrrega es dona més ràpidament per al compòsit d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit que per al compòsit d'Araldite-PY302-2 / HY943 – 60% grafit. Per tant, quan es pugui escollir entre aquests dos compòsits per a la construcció de microsensors, el compòsit basat en Araldite-M serà l'opció més avantatjosa.

Si comparem el valor estimat per la constant de transferència de càrrega per al microelèctrode basat en Araldite-M / HY5162 – 60% grafit amb l'obtingut per un microelèctrode de fibra de carboni de 6 µm de radi en acetonitril, es va veure que els valors d'aquestes constants no són significativament diferents. Per al microelèctrode de fibra de carboni es va obtenir un valor per la constant de velocitat de transferència de càrrega heterogènia, k^0 , de 2.3 cm·s⁻¹. El fet que la transferència de càrrega es produeixi al microelèctrode d'Araldite-M a una velocitat de només un ordre de magnitud inferior a la d'un microelèctrode de carboni vitrificat és indicatiu d'una bona qualitat de resposta per part d'aquests materials, de manera que optimitzant el contingut de grafit als compòsits, es poden aconseguir materials capaços de rivalitzar amb materials més tradicionals per a la construcció d'elèctrodes, amb un major nombre d'avantatges com són la possibilitat d'afegir agents modificadors al compòsit abans de curar que permetin modular les propietats catalítiques d'aquests materials.

7.6. Corbes de calibrat

Els microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids desenvolupats al present treball van ser dissenyats per ser aplicats com a sensors analítics. Per tant, es van confeccionar corbes de calibrat per tal de caracteritzar aquests microelèctrodes com a sensors analítics seguint l'equació (7.6-1)

$$i_D = K \cdot C_0 \quad (7.6-1)$$

on i_D és la intensitat de corrent limitada per la difusió, K és la constant empírica corresponent a la sensibilitat del sensor i C_0 és la concentració de ferroccè al si de la solució. Les corbes de calibrat realitzades van cobrir un rang ampli de concentracions, per tant es van aplicar logaritmes a l'equació 7.6-1 per tal d'aconseguir una distribució de les dades més espaiada per fer l'anàlisi més clar, de manera que s'obtingué l'equació (7.6-2)

$$\log(i_D) = \log(K) + s \cdot \log(C_0) \quad (7.6-2)$$

on s hauria de ser 1. Es representà el $\log(i_D)$ vers el $\log(C_0)$ i es va aplicar una regressió lineal, amb pendent 1 i ordenada a l'origen corresponent al $\log(K)$. Es van realitzar dos tipus d'estudis. En primer lloc es caracteritzà l'estabilitat de la superfície dels microelèctrodes basats en els compòsits registrant corbes de calibrat sense polir els microelèctrodes en acetonitril i en metanol amb els microelèctrodes d'Araldite-M i PY302-2 respectivament, en presència de TBAP 0.1 M i amb agitació contínua al llarg d'un dia. Els resultats es mostren a la figura 7.6-1. Els paràmetres de calibrat per als microelèctrodes d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit es mostren als quadres 7.6-1 i 7.6-2 respectivament.

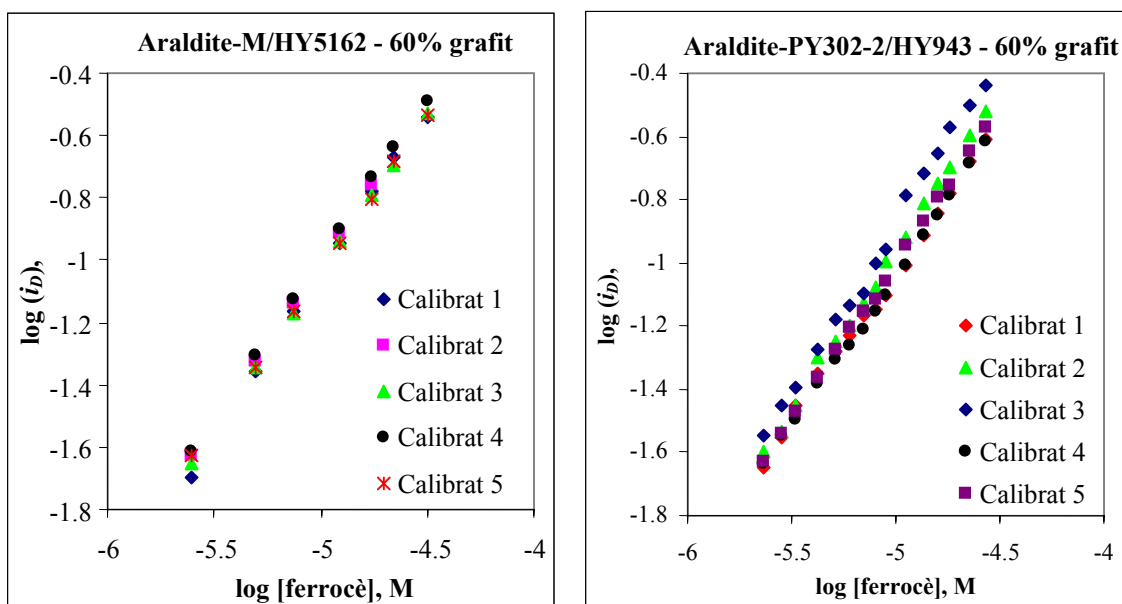


Figura 7.6-1. Corbes de calibrat realitzades a temperatura ambient i amb agitació constant, sense polir els microelèctrodes. Els calibrats realitzats amb el microelèctrode d'Araldite-M/HY5162 - 60% grafit (esquerra) es van realitzar en acetonitril i aplicant un potencial de 100 mV vs Ag/Ag⁺. Els calibrats realitzats amb el microelèctrode d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit es van realitzar en metanol i aplicant un potencial de 250 mV vs Ag/Ag⁺.

Quadre 7.6-1				
$\log (y) = \log (a) + s \cdot \log (x)$				
Microelèctrode - Araldite-M - 60% grafit (2 μm mida de partícula) Calibrats realitzats en acetonitril amb TBAP 0.1 M sense polir l'elèctrode entre calibrats Potencial aplicat: 100 mV vs Ag/Ag ⁺				
	<i>Iresidual</i> (nA)	<i>r</i>	<i>log (a)</i> <i>a=nA/M</i>	<i>s</i>
<i>Calibrat 1</i>	$3.89 \cdot 10^{-2}$	0.9986 (n=7)	4.23	1.06
<i>Calibrat 2</i>	$3.43 \cdot 10^{-2}$	0.9998 (n=5)	4.16	1.03
<i>Calibrat 3</i>	$3.35 \cdot 10^{-2}$	0.9998 (n=7)	4.06	1.02
<i>Calibrat 4</i>	$3.08 \cdot 10^{-2}$	0.9997 (n=7)	4.16	1.03
<i>Calibrat 5</i>	$3.46 \cdot 10^{-2}$	0.9997 (n=7)	3.95	1.00
<i>Coefficient de variació</i>			3%	2%

Quadre 7.6-2				
$\log (y) = \log (a) + s \cdot \log (x)$				
Microelèctrode - Araldite-PY302-2 / HY-943 - 60% grafit (2 μm mida de partícula) Calibrats realitzats en metanol amb TBAP 0.1M sense polir l'elèctrode entre calibrats Potencial aplicat: 250 mV vs Ag/Ag ⁺				
	<i>Iresidual</i> (nA)	<i>r</i>	<i>log (a)</i> <i>a=nA/M</i>	<i>s</i>
<i>Calibrat 1</i>	$1.96 \cdot 10^{-2}$	0.9995 (n=48)	3.81	0.96
<i>Calibrat 2</i>	$1.68 \cdot 10^{-2}$	0.9997 (n=49)	4.15	1.02
<i>Calibrat 3</i>	$2.13 \cdot 10^{-2}$	0.9996 (n=47)	4.18	1.01
<i>Calibrat 4</i>	$5.55 \cdot 10^{-3}$	0.9996 (n=47)	3.88	0.98
<i>Calibrat 5</i>	$1.60 \cdot 10^{-2}$	0.9996 (n=50)	4.05	1.01
<i>Coefficient de variació</i>			4%	3%

Com es pot veure, els valors obtinguts per als pendents, s , és 1, tal com s'havia predit a partir de l'equació (7.6-2), i els valors dels $\log (K)$ corresponen a sensibilitats mitjanes de 12882 nA·l·mol⁻¹ i 10328 nA·l·mol⁻¹ per als microelèctrodes d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament, sent aquests valors sensibilitats acceptables per sensors analítics.

A partir de la figura 7.6-1 es pot predir una bona reproductibilitat dels paràmetres de calibrat. Aquesta predicció es veu confirmada pels baixos coeficients de variació obtinguts per als pendents i per a les ordenades a l'origen dels calibrats obtinguts per aquests microelèctrodes al llarg d'un dia. Per tant es pot concloure que aquests microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids presenten superfícies estables en els solvents estudiats i una passivació negligible com a mínim al llarg d'un dia d'estar en contacte amb una solució contenint ferroçè, i al llarg d'aquest temps aquests microelèctrodes es podran utilitzar com a sensors analítics sense necessitat de polir o recalibrar. Per altra banda, estudis realitzats amb aquests compòsits emprats en la construcció de macroelèctrodes (capítol 3), confirmaren que aquests materials tenen bona estabilitat en aquests solvents al llarg d'un període de temps mínim de dos mesos, i els macroelèctrodes es poden utilitzar durant aquest temps sense necessitat de polir, tant guardant-los secs com submergits en els mateixos solvents. Com que els materials utilitzats per a la construcció d'aquests materials són els mateixos, es pot extrapolar bona estabilitat dels microelèctrodes basats en aquests compòsits conductors en acetonitril o en metanol també durant el mateix període de temps.

En segon lloc, la reproductibilitat de les superfícies successives va ser estudiada mitjançant el registre de diverses corbes de calibrat polint els microelèctrodes cada cop amb alúmina de 0.3 i 0.05 µm de mida de partícula. La figura 7.6-2 mostra els resultats obtinguts per aquests calibrats. Es pot veure que la variació entre resultats no és significativament superior a l'obtinguda amb una mateixa superfície. Els paràmetres de calibrat es mostren als quadres 7.6-3 i 7.6-4 per als microelèctrodes d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament. Aquests resultats confirmen una bona reproductibilitat dels paràmetres de calibrat obtinguts en polir els microelèctrodes.

Quadre 7.6-3				
$\log (y) = \log (a) + s \cdot \log (x)$				
<i>Microelèctrode - Araldite-M - 60% grafit (2 µm mida de partícula)</i>				
<i>Calibrats realitzats en acetonitril amb TBAP 0.1 M polint l'elèctrode entre calibrats</i>				
<i>Potencial aplicat: 100 mV vs Ag/Ag⁺</i>				
	<i>Iresidual (nA)</i>	<i>r</i>	<i>log (a) a=nA/M</i>	<i>s</i>
<i>Superfície 1</i>	5.38E-02	0.9988 (n=33)	4.43	1.11
<i>Superfície 2</i>	6.35E-02	0.9992 (n=7)	4.06	1.05
<i>Superfície 3</i>	3.66E-02	0.9999 (n=6)	4.16	1.04
<i>Superfície 4</i>	3.38E-02	0.9997 (n=7)	4.30	1.08
<i>Superfície 5</i>	3.89E-02	0.9993 (n=7)	4.23	1.06
<i>Coefficient de variació</i>			3%	3%

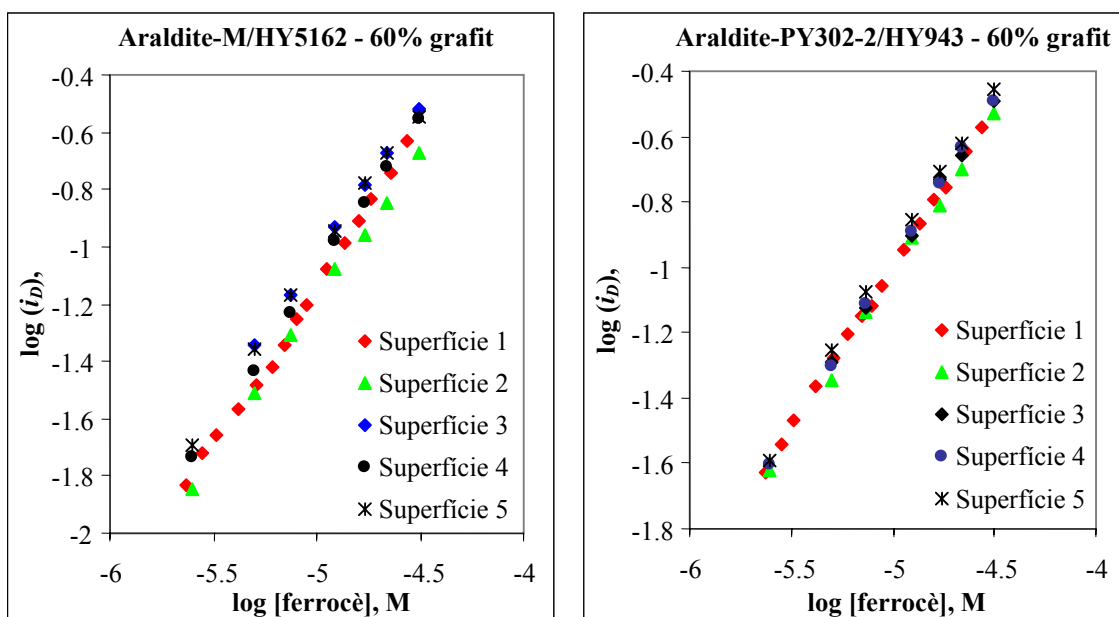


Figura 7.6-2. Corbes de calibrat realitzades a temperatura ambient i amb agitació constant, polint els microelèctrodes entre calibrats. Els calibrats realitzats amb el microelèctrode d'Araldite-M/HY5162 - 60% grafit (esquerra) es van realitzar en acetonitril i aplicant un potencial de 100 mV vs Ag/Ag⁺. Els calibrats realitzats amb el microelèctrode d'Araldite-PY302-2/HY943 - 60% grafit es van realitzar en metanol i aplicant un potencial de 250 mV vs Ag/Ag⁺.

Quadre 7.6-4				
$\log(y) = \log(a) + s \cdot \log(x)$				
Microelèctrode - Araldite-PY302-2 / HY-943 - 60% grafit (2 μm mida de partícula) Calibrats realitzats en metanol amb TBAP 0.1 M polint l'elèctrode entre calibrats				
Potencial aplicat: 250 mV vs Ag/Ag ⁺				
	Iresidual (nA)	r	log(a) a=nA/M	s
Superfície 1	5.38E-02	0.9993 (n=36)	4.05	1.01
Superfície 2	6.35E-02	0.9977 (n=7)	3.93	1.00
Superfície 3	3.66E-02	0.9996 (n=7)	4.07	1.01
Superfície 4	3.38E-02	0.9998 (n=7)	4.09	1.02
Superfície 5	3.89E-02	0.9994 (n=7)	4.16	1.02
Coefficient de variació			2%	1%

La construcció dels microelèctrodes de platí genera unitats poc reproduïbles degut al fet que el microfil de platí sempre queda aïllat a dins del vidre formant un cert angle amb la superfície de l'elèctrode, ja que el fil és tou, generant seccions transversals el·líptiques i poc reproduïbles, cosa que

contrasta amb l'elevada reproductibilitat obtinguda en els resultats per un mateix microelèctrode basat en els compòsits. Com que els microelèctrodes basats en els compòsits es construeixen a partir dels microelèctrodes de platí, també es tindrà una baixa reproductibilitat entre les diferents unitats. Per tant, cada cop que es construeixi un nou microelèctrode caldrà calibrar-lo prèviament a la seva utilització en anàlisi.

La utilització de microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids presenta diversos avantatges des del punt de vista analític respecte la utilització de macroelèctrodes també basats en els mateixos compòsits. L'avantatge més evident prové de les seves reduïdes dimensions les quals permeten la seva aplicació en anàlisi clínic o en volums de mostra molt petits evitant el pas de dilució de la mostra per augmentar el volum. Per altra banda, des del punt de vista electroquímico altres avantatges són nivells de soroll més baixos, la qual cosa permet l'obtenció de límits de detecció més baixos i límits inferiors de resposta lineal també més baixos. Mentre que per als macroelèctrodes els límits inferiors de resposta lineal van ser $1 \cdot 10^{-6}$ M tant per al compòsit d'Araldite-M/HY55162 – 60% grafit en acetonitril com per al compòsit d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit en metanol, quan s'empraren microelèctrodes s'obtingueren límits inferiors de resposta lineal de $4 \cdot 10^{-7}$ M i $3 \cdot 10^{-7}$ M respectivament. per tant, la utilització de microelèctrodes enlloc de macroelèctrodes ha permès baixar el límit inferior de resposta lineal en un factor superior a dos.

Si es té en compte la gran diferència de superfície entre els macroelèctrodes i els microelèctrode, la diferència observada en els límits inferiors de resposta lineal no és tan gran com es podria esperar. Cal tenir en compte, però, que els macroelèctrodes basats en aquests compòsits presenten un comportament de feix de microelèctrodes, la qual cosa justifica les elevades relacions senyal/soroll obtingudes, les quals permeten límits de resposta lineal més baixos que per macroelèctrodes convencionals.

7.7. Estudi en absència de l'electròlit suport

Quan es treballa en medis altament resistius, tals com solvents orgànics, els microelèctrodes proporcionen un clar avantatge respecte els macroelèctrodes, com és la possibilitat de treballar en absència d'electròlit suport. L'addició d'electròlit suport és essencial quan s'empren macroelèctrodes, ja que disminueixen la resistència de la solució suficientment com per evitar problemes de caiguda òhmica excessiva, i eliminen els corrents de migració. L'eliminació de l'electròlit suport presenta diversos avantatges des del punt de vista analític. Per una banda, els electròlits suports poden ser font d'impureses que podrien actuar com a interferències, per exemple en el procés de reconeixement de l'analit per part dels modificadors del sensor. Altres exemples més evidents dels avantatges d'eliminar la necessitat d'electròlit suport són:

- l'addició d'electròlit suport canvia les propietats termodinàmiques i cinètiques de l'analit, així com la força iònica de la solució, fent complicada la comparació de dades electroquímiques amb dades espectroscòpiques.
- els solvents de tipus hidrocarbur saturat són dissolvents pobres de sals tals com els electròlits suport coneguts fins al moment, per tant no són medis disponibles per realitzar estudis electroquímics a menys que es puguin realitzar sense addicionar electròlit suport.
- la necessitat d'utilitzar electròlits suport per realitzar mesures amperomètriques ha fet impossible la utilització de sensors electroquímics com a detectors de sistemes HPLC de fase normal on l'eluent és un solvent orgànic no polar. Sensors capaços de realitzar mesures electroquímiques en aquest tipus de solvents sense necessitat d'electròlit suport faran possible la seva aplicació com a detectors cromatogràfics en cromatografia de fase normal.

En el present treball, s'ha estudiat l'aplicabilitat dels microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids en solvents orgànics en absència d'electròlit suport.

En primer lloc, s'han registrat voltamperogrames cíclics en acetonitril i metanol amb ferroccè 0.9 mM però en absència d'electròlit suport amb els microelèctrodes d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament. La figura 7.7-1 il·lustra els resultat obtinguts comparats amb els voltamperogrames obtinguts en els mateixos solvents però en presència de TBAP 0.1 M.

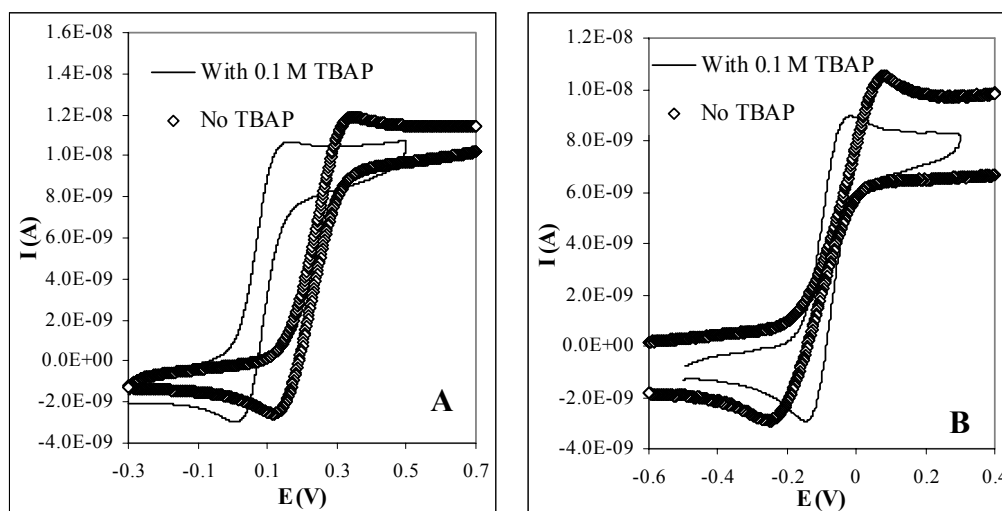


Figura 7.7-1. Voltamperogrames cíclics registrats en absència d'electròlit suport, amb ferroccè 1 mM en (A) acetonitril i (B) metanol emprant els microelèctrodes d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament. els potencials es van mesurar emprant referències de Ag/Ag^+ amb una solució interna amb TBAP 0.1 M en tots els casos, i un elèctrode auxiliar de platí. Les mesures es van realitzar a temperatura ambient i a una velocitat d'escombrat de $1 V \cdot s^{-1}$.

El primer tret a destacar de la figura 7.7-1 (A) és el desplaçament del potencial formal del ferroccè cap a valors més positius en eliminar l'electròlit suport. L'elèctrode de referència emprat per registrar els voltamperogrames cíclics en absència d'electròlit suport conté una solució interna amb TBAP 0.1 M, per tant, cal esperar un cert desplaçament de potencials degut al potencial d'unió líquida², potser d'uns 10-15 mV. Tot i així, el desplaçament observat en acetonitril és d'aproximadament 160 mV, és a dir, aquest desplaçament de potencials no es pot atribuir únicament al potencial d'unió líquida. Una explicació més adient seria l'estabilització del ferricini per formació de parells iònics amb ions perclorat en acetonitril que no es formen en metanol, en presència d'electròlit suport.

Una altra conseqüència de l'absència d'electròlit suport és un augment de la resistència de cel·la, tal com es mostra al quadre 7.7-1. Una major resistència significa majors caigudes òhmiques, i per tant una major separació de pics, tal com es pot veure clarament a la figura 7.7-1, sent la separació de pics lleugerament superior per al compòsit d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit en metanol (figura 7.7-1 (B)) que per al compòsit d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit en acetonitril (figura 7.7-1 (A)), cosa que concorda amb els valors de caiguda òhmica calculats, tot i que en tots dos casos la separació de pics és comparable. De fet, ja a partir dels valors de la permitivitat elèctrica de l'acetonitril ($\epsilon=36.64$) i del metanol ($\epsilon=21.01$) es podia preveure una caiguda òhmica superior en metanol que no pas en acetonitril. Se sap que la permitivitat elèctrica del solvent és inversament proporcional al log K_a , on K_a és la constant d'associació del solvent³. Així, a mida que la permitivitat elèctrica disminueix, la constant d'associació del solvent augmenta, augmentant, així, la resistència del solvent i per tant els solvents amb menor permitivitat elèctrica originaran majors distorsions en els voltamperogrames cíclics registrats.

Un altre fenomen visible a la figura 7.7-1 és l'augment d'intensitat de pic catòdic observat en registrar els voltamperogrames cíclics en absència d'electròlit suport, mentre que la intensitat de pic anòdic roman pràcticament invariable. Aquest augment es deu a efectes de migració, ja que en oxidar el ferroccè es produeix ferricini, carregat positivament, que és atret electrostàticament cap a la superfície del microelèctrode, que està carregada negativament, augmentant així la intensitat de corrent registrada en reduir el ferricini, mentre que el ferroccè, com que és una espècie neutra no migra. Un efecte semblant ja va ser observat en treballs previs realitzats per Bond *et al*^{2,4,6}. En aquests treballs es va veure que la relació de Stokes-Einstein permet predir de forma qualitativa els corrents de migració depenent de les propietats físiques dels solvents. L'equació (7.7-1) descriu la relació de Stokes-Einstein en termes de mobilitat iònica, μ :

$$\mu = \frac{|Z| \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (7.7-1)$$

on η és la viscositat del solvent, r és el radi de la molècula que s'oxida o es redueix, e és la càrrega elèctrica d'un electró i $|Z|$ és el valor absolut de la valència iònica de la molècula. Segons la relació de

Stokes-Einstein es pot predir que a mida que la viscositat del solvent augmenta, el corrent migratori disminueix. A la pràctica, però, es va veure que la relació no és lineal, ja que existeixen altres paràmetres que afectaran els corrents de migració, sent el més important degut a les propietats dielèctriques dels solvents. Així, es produirà fricció degut a la reorientació dels dipols del solvent a mida que la molècula iònica el travessa. Altres factors que faran que el corrent de migració experimental no segueixi la relació de Stokes-Einstein són la força iònica, la qual no es té en compte en aquesta llei, i l'assumpció d'electroneutralitat microscòpica, la qual no necessàriament es produeix en un medi sense electròlit suport. De fet, en el present treball els resultats s'ajusten a la tendència general observada en els treballs de Bond *et al.*, és a dir, els corrents de difusió van ser menors en metanol ($\eta=0.544$ m·Pa·s) que no pas acetonitril ($\eta=0.369$ m·Pa·s), ja que per al microelèctrode d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit en acetonitril es van tenir corrents de migració de $1.78 \cdot 10^{-9}$ A mentre que per al microelèctrode d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit en metanol es van tenir corrents de migració de $4.66 \cdot 10^{-10}$ A. Tot i que els elèctrodes emprats en cada cas són diferents, es pot veure la tendència general observada en els treballs de Bond *et al.* on els corrents de difusió són superiors en els solvents amb una viscositat menor.

Des del punt de vista del desenvolupament de biosensors per a la seva utilització en solvents orgànics, el microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids són una solució interessant especialment per aquells solvents poc o no polars on la majoria d'electròlits suports presenten una solubilitat extremadament baixa. Treballs previs han mostrat que l'activitat biocatalítica dels enzims es pot predir fins a cert punt emprant el logaritme del coeficient de partició del solvent estudiat en un sistema binari octanol:aigua ($\log P$), el qual està relacionat amb la polaritat dels solvents⁵. Aquest tema es tractarà amb més profunditat al capítol 8. En aquest treball es va veure que els solvents poc polars tenen una menor tendència a extreure l'aigua essencial dels enzims, de manera que la majoria d'enzims presenten una major activitat biocatalítica en aquest tipus de solvents. Per aquest motiu, l'hexà és un dels solvents més utilitzats en bioanàlisi en solvents no aquosos. L'hexà, però, és un solvent molt pobre per als electròlits suports coneguts, de manera que l'anàlisi amperomètrica amb biosensors caldrà fer-los emprant microelèctrodes.

Tenint en compte això, el microelèctrode basat en el compòsit d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit s'ha utilitzat en hexà en absència d'electròlit suport, ja que com es va veure al capítol 3 aquest material presenta bona estabilitat en aquest solvent. Es va veure, però, que en hexà pur no es va obtenir senyal que es pogués distingir del soroll de fons. Segurament es requereixen microelèctrodes de radis molt més petits per obtenir senyal en un medi tan resistiu⁶. Per tant, es va augmentar la conductivitat mitjançant l'addició d'un solvent amb major polaritat on el compòsit d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit també presenti bona estabilitat física i química. Així, es va escollir l'etanol, i es van fer mescles binàries hexà:etanol amb un 30%, 40% i 50% en volum d'etanol. La figura 7.7-2 mostra els voltamperogrames cíclics obtinguts per aquest microelèctrode en aquests solvents binaris. A mida que el contingut d'etanol augmenta, les distorsions dels voltamperogrames esdevenen menys

importants, però tot i així tots els voltamperogrames mostraren elevades distorsions. Per aquest motiu, no es van realitzar més experiments amb el microelèctrode d' Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit de 25 μm de diàmetre en mescles de solvents contenint hexà.

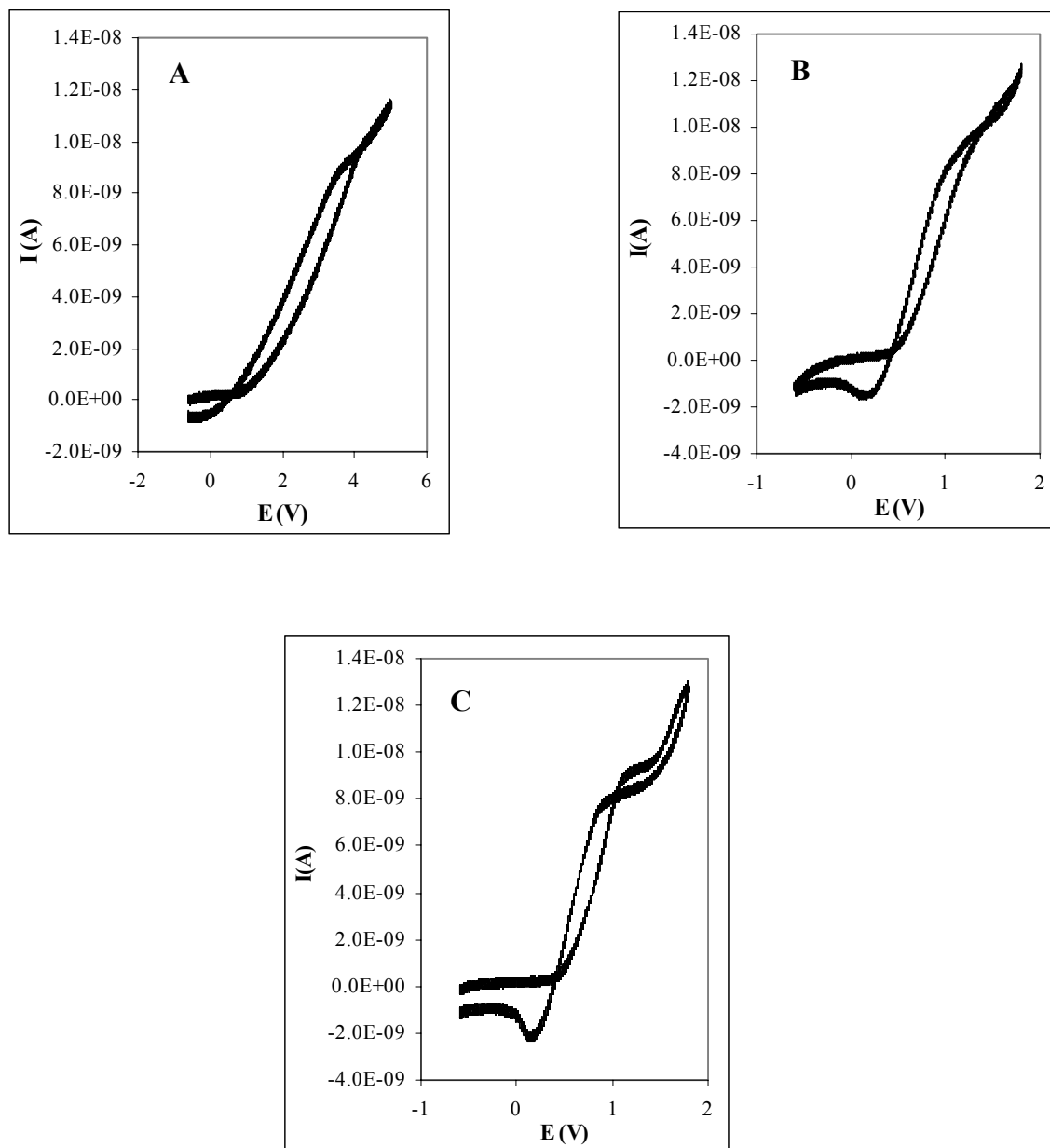


Figura 7.7-2. Voltamperogrames cíclics registrats en absència d'electròlit suport, i en presència de ferrocè 1 mM emprant el microelèctrode d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit en mescles hexà:etanol (A) 70:30 (v:v), (B) 60:40 (v:v) i (C) 50:50 (v:v). Els potencials es van mesurar respecte un elèctrode de referència de Ag/Ag^+ , l'elèctrode auxiliar va ser un elèctrode de platí i les mesures es van realitzar a temperatura ambient.

Les dades cronoamperomètriques obtingudes en acetonitril i metanol en absència de ferroccè i d'electròlit suport es van estudiar per als microelèctrodes d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament. El quadre 7.7-1 mostra els resultats obtinguts per als valors de la constant de cel·la, la resistència de cel·la i la capacitat de la doble capa per aquests microelèctrodes. L'esglaió de potencial va ser 500 mV en acetonitril i 1000 mV en metanol.

Quadre 7.7-1. Dades cronoamperomètriques en absència d'electròlit suport						
Compòsit	Solvent	$R_{cel·la}$ Ω	C μF	$R_{cel·la}C$ s	$i_{pa}R$ (V) $v = 1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$	<i>Separació de pics</i> (V)
Araldite-M / HY5162 - 60% grafit	Acetonitril	$5.5 \cdot 10^7 \pm 2 \cdot 10^7$	$3.4 \cdot 10^{-5} \pm 1 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-4}$	0.63	0.140
Araldite-PY302-2 / HY943 - 60% grafit	Metanol	$8.1 \cdot 10^7 \pm 4 \cdot 10^6$	$1.23 \cdot 10^{-4} \pm 6 \cdot 10^{-6}$	$1.0 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-5}$	0.76	0.180

Tal com s'esperava, les resistències de cel·la són superiors que en presència de TBAP 0.1 M, però les capacitats són més baixes. Aquest resultat no és sorprenent ja que una disminució de la concentració d'ions al medi fa que la doble capa electroquímica sigui més difusa, és a dir, s'estén una major distància cap al si de la solució que no pas en presència d'electròlit suport. Quan la concentració d'ions al medi és baixa, les forces d'atracció electrostàtica entre els ions i la superfície de l'elèctrode són inferiors a les forces tèrmiques que allunyen i randomitzen les càrregues en solució, de manera que la doble capa electroquímica esdevé més gruixuda. Així, en absència d'electròlit suport es té, per una banda una menor quantitat d'ions i per tant una menor quantitat de càrrega al «condensador» format per la superfície de l'elèctrode i la solució, i per altra banda es té una doble capa electroquímica més gruixuda, de manera que el potencial que patiran aquestes càrregues serà molt menor que en presència d'electròlit suport (efecte de la doble capa serà molt pronunciat), obtenint-se, així, menors corrents capacitius.

També es van registrar cronoamperogrames en presència de ferroccè 2 mM. La figura 7.7-3 il·lustra els resultats obtinguts amb els dos microelèctrodes estudiats.

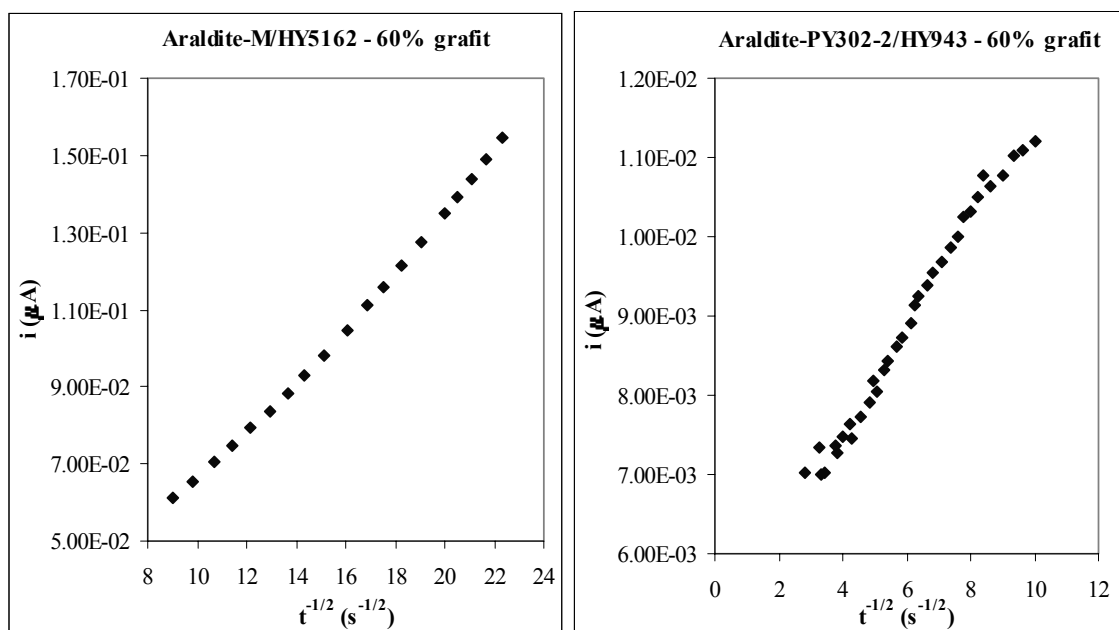


Figura 7.7-3. Cronoamperogrames registrats en acetonitril (esquerra) i metanol (dreta) amb ferroçè 2 mM sense electròlit suport amb els microelèctrodes d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit i d'Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit respectivament. Tots els experiments es van realitzar a temperatura ambient. Els esglaons de potencial van ser 400 mV en acetonitril i 1000 mV en metanol.

Tant els resultats obtinguts en acetonitril com els obtinguts en metanol són semblants als obtinguts en presència d'electròlit suport, és a dir, els resultats s'ajusten al cronoamperograma predit per microelèctrodes de superfície contínua. Els resultats obtinguts en metanol en absència d'electròlit suport, però, presenten intensitats de corrent molt baixes, properes al límit de corrent detectable pel potenciostat emprat, cosa que genera certes distorsions instrumentals.

Per últim, es van realitzar corbes de calibrat emprant aquests microelèctrodes en acetonitril i metanol en absència d'electròlit suport i amb agitació constant. Les corbes de calibrat es mostren a la figura 7.7-4. Al llarg dels registres es va observar que els nivells de soroll no van ser significativament superiors als observats en presència d'electròlit suport, de manera que es van obtenir els mateixos límits inferiors de resposta lineal.

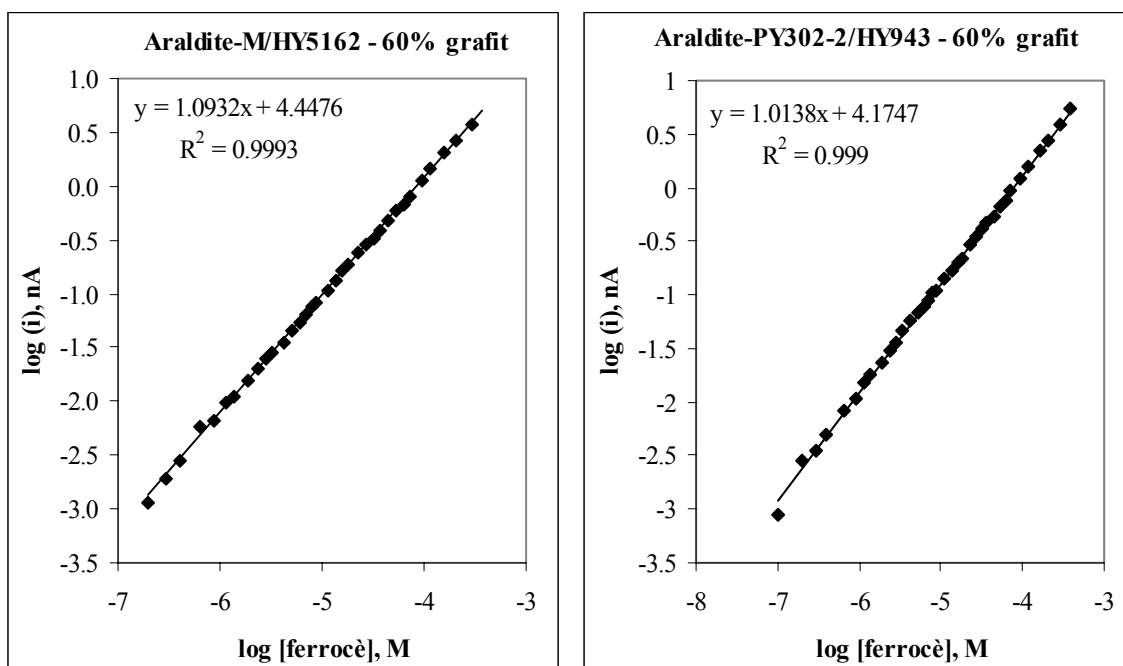


Figura 7.7-4. Corbes de calibrat realitzades a temperatura ambient i amb agitació constant. Els calibrats realitzats amb el microelèctrode d'Araldite-M/HY5162 - 60% grafit (esquerra) es van realitzar en acetonitril i aplicant un potencial de 400 mV vs Ag/Ag⁺. Els calibrats realitzats amb el microelèctrode d'Araldite-PY302-2/HY943 - 60% grafit es van realitzar en metanol i aplicant un potencial de 200 mV vs Ag/Ag⁺.

Per tant, es pot concloure que aquests microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids es poden utilitzar com a sensors electroanalítics en acetonitril i metanol en absència d'electròlit suport.

7.8. Conclusions

Amb aquest treball, doncs, s'ha demostrat la versatilitat dels compòsits pel que fa a formes i mides dels elèctrodes de manera que es poden construir sensors que satisfacin molt diverses necessitats. Aquests microelèctrodes tenen els avantatges propis dels microelèctrodes de fase continua i els avantatges dels compòsits, com són facilitat d'immobilització de modificadors i renovabilitat de la superfície sensora mitjançant un simple procés de polit. Aquests dispositius han mostrat bones característiques de resposta en solvents orgànics relativament polars tant en presència com en absència d'electròlit suport. Contràriament, en hexà es van observar problemes per registrar senyal analític donada l'elevada resistència elèctrica d'aquest solvent i mescles amb etanol van ser necessàries.

Per una altra banda, aquests compòsits van mostrar elevades resistències de cel·la així com elevades constants de cel·la, de manera que la seva aplicació en estudis cinètics és molt limitada. Com a sensors analítics, aquests microelèctrodes van mostrar baixos nivells de soroll tant en presència com

en absència d'electròlit suport, de manera que es van obtenir baixos límits inferiors de resposta lineal. També es va obtenir una elevada reproductibilitat dels resultats obtinguts amb una mateixa superfície al llarg d'un dia, de manera que es pot concloure que aquests microelèctrodes són estables en acetonitril i metanol i que presenten pocs problemes de passivació de la superfície per adsorció d'impureses, avantatge molt important respecte els microelèctrodes de platí on l'adsorció del ferroç i la conseqüent passivació de la superfície és un problema important a l'hora de realitzar experiments electroquímics. En polir els microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids també es va obtenir una bona reproductibilitat dels resultats de manera que es podran immobilitzar modificadors i la superfície sensora es podrà renovar amb un simple procés de polit.

Contràriament al que s'ha vist als capítols de la part II d'aquesta tesi, els microelèctrodes basats en compòsits conductors rígids presenten característiques de resposta molt semblants a les d'un microelèctrode de superfície contínua, mentre que els macroelèctrodes basats en aquests materials presenten un clar comportament de feix de microelèctrodes. Tot i així, la manca de convencionalitat d'alguns dels resultats obtinguts, especialment en cronoamperometria en absència de ferroç, suggereixen l'existència d'una superfície d'estructura complexa, i el fet que no s'observi un clar comportament de feix d'ultramicroelèctrodes podria ser degut al fet que les microzones conductores segurament es troben molt properes entre sí i tenen mides molt petites, cosa que provocarà un solapament de les capes de difusió a temps molt curts, segurament inferiors a la constant de cel·la, justificant la inexistència de mesures que mostrin una difusió cap a cada microzona individualment, cosa que si va ser possible observar en treballar amb macroelèctrodes.

7.9. Bibliografia

- 1 Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications"; Wiley, New York, **1980**
- 2 Bond, A. M.; Fleischmann, M.; Robinson, J.; *J. Electroanal. Chem.*; 168 (**1984**) 299-312
- 3 Kay, R. L.; Evans, D. F.; Matesich, S. M.; Coetzee, J. F.; Ritchie, C. D.; (Eds); Vol. 2, "Solute-Solvent Interactions", Marcel Dekker, New York, **1976**, cap. 10
- 4 Stevens, N. P. C.; Bond, A. M.; *J. Electroanal. Chem.*; 538-539 (**2002**) 25-33
- 5 Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotechnol. Bioeng.*; 30 (**1987**) 81-87
- 6 Cooper, J. B.; Bond, A. M.; *J. Electroanal. Chem.*; 315 (**1991**) 143-160

PART IV

DESENVOLUPAMENT D'UN BIOSENSOR BASAT EN UN COMPÒSIT CONDUCTOR RÍGID DE DISPERSIÓ COMPATIBLE AMB SOLVENTS ORGÀNICS

Capítol 8

Desenvolupament d'un biosensor basat en un compòsit conductor rígid compatible amb solvents orgànics

8.1. Introducció

Tal com s'ha dit anteriorment, un compòsit és el resultat de combinar dos o més materials diferents de manera que cadascun manté les seves propietats individuals, però el material resultant té unes característiques físiques, químiques i mecàniques noves. Un biocompòsit és, doncs, el resultat de combinar un polímer, grafit (o qualsevol altre material conductor) i el material biològic. Per tal de demostrar l'aplicabilitat dels compòsits conductors rígids en la construcció de biosensors compatibles amb solvents orgànics, en aquest capítol es descriurà un biocompòsit basat en l'enzim peroxidasa de rave picant com a exemple de modificació biològica emprant el compòsit d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit per determinar amperomètricament en acetonitril peròxids orgànics altament insolubles en aigua i d'elevada toxicitat.

8.1.1. Enzims com a catalitzadors en solvents orgànics

Els enzims són dels primers materials d'origen biològic emprats en la construcció de biosensors. Aquestes molècules són un tipus de proteïna amb la capacitat de catalitzar reaccions químiques que es donen a l'interior de les cèl·lules o a les seves membranes. De manera molt simple es pot dir que un enzim és una cadena d'aminoàcids enllaçats mitjançant el que s'anomena enllaços peptídics (estructura primària). Els grups funcionals dels aminoàcids interaccionaran entre ells, normalment interaccions estèriques, de manera que aquesta cadena es doblega generant el que s'anomena estructura secundària, sent les més importants l'el·líptica (conformació α) i la de full plegat (conformació β). En una cadena polipeptídica normalment existeix una mescla de diverses estructures secundàries. Quan aquesta cadena polipeptídica entra en contacte amb el medi (normalment aigua), es produeixen interaccions febles entre les molècules de solvent i els grups funcionals dels aminoàcids, tals com ponts d'hidrogen o forces hidrofíliques i hidrofòbiques, de manera que es produeix un doblegament que proporciona una conformació concreta característica de l'enzim¹, i és el que s'anomena estructura terciària.

Tenint en compte que l'evolució ha tingut lloc en un entorn bàsicament aquós, resulta evident que les biomolècules han establert unes interaccions amb l'aigua que els permeten adquirir la seva forma activa, i per aquest motiu, la majoria d'estudis que involucren enzims s'han centrat en medi aquós². Tot i així, ja des del 1985 apareixen estudis on es porta a terme catàlisi enzimàtica en solvents orgànics seguint bàsicament dos tipus d'estratègies. Per una banda, els enzims es poden dissoldre en micromiscel·les d'aigua emulsificades en solvents immiscibles amb aigua, de manera que aquesta microemulsió es pot estabilitzar emprant surfactants. Aquesta estratègia rep el nom de «miscel·les reverses»³⁻⁵. Per altra banda, una altra possible estratègia seria la suspensió directa de l'enzim liofilitzat en el solvent orgànic^{6,7}. Aquesta darrera estratègia, en exposar l'enzim en contacte directe amb els diferents solvents fa que aquest desenvolupi una sèrie de propietats noves molt avantatjoses^{2,8}, entre les quals es poden destacar les següents:

- elevada solubilitat de la majoria de compostos orgànics que actuen de substrat
- major estabilitat tèrmica d'alguns enzims en solvents orgànics⁹⁻¹³
- possibilitat de portar-se a terme noves reaccions catalítiques que són impossibles en aigua degut a restriccions cinètiques o termodinàmiques^{6,14}
- una major facilitat de recuperació de productes a partir de solvents orgànics comparat amb aigua
- insolubilitat de la majoria d'enzims en solvents orgànics, la qual cosa permet simplificar els processos d'immobilització dels enzims o inclús permet una fàcil recuperació dels mateixos en cas que no se segueixi cap estratègia d'immobilització
- reaccions indesitjades, com per exemple la hidròlisi d'àcids anhídrids, es poden evitar en passar a solvents orgànics

- la inhibició de l'enzim degut a productes de la reacció enzimàtica es pot evitar en utilitzar solvents orgànics ja que les interaccions dels productes amb els solvents són diferents¹⁵
- canvi d'especificitat de l'enzim respecte del substrat degut a una interacció diferent del substrat amb el solvent orgànic^{9,16}

Existeixen diversos treballs on es mostra un ampli ventall d'enzims que han presentat activitat catalítica en solvents orgànics^{8,14,17-23}, o inclús s'ha vist que algunes cèl·lules enteres mantenen la seva activitat biològica en medis orgànics²⁴. Està clar, doncs, que els enzims poden mantenir la seva activitat catalítica en un medi no aquós, però l'extracció total d'aigua de l'enzim provoca una desnaturalització de l'enzim fins al punt de desactivar-lo, la qual cosa es podria considerar com el desavantatge principal d'emprar solvents orgànics. Per tant, es planteja la qüestió de quanta aigua és necessària per l'enzim per romandre actiu. Zaks i Klivanov han realitzat estudis per tal de resoldre aquesta qüestió. En un dels seus estudis⁷, Zaks i Klivanov monitoritzen l'activitat catalítica de la subtilisina i la α -quimiotripsina, que són enzims que es troben al citoplasma cel·lular, és a dir, que el seu entorn natural és aquós, quan aquests enzims s'afegeixen en forma liofilitzada en diferents solvents amb polaritats molt diverses. A partir d'aquest estudi arriben a la conclusió que l'activitat catalítica de l'enzim en sotmetre's a contacte amb un solvent orgànic no depèn de la concentració d'aigua del solvent sinó de la quantitat d'aigua unida directament a l'esquelet de la proteïna. I no només això, sinó que van observar que no cal que es formi una monocapa d'aigua al voltant de l'enzim, sinó que només cal una petita quantitat de molècules d'aigua unides a l'enzim en forma de petits clusters, que anomenaren «aigua essencial» o «aigua estructural» de l'enzim.

Cal tenir en compte, però, que en substituir el medi aquós per un medi orgànic és possible que l'enzim perdi aquesta aigua essencial, inactivant-se. S'han realitzat estudis per tal de determinar quines propietats dels solvents o dels enzims es poden utilitzar per tal de predir l'activitat catalítica de l'enzim en els diferents solvents orgànics. Bone i Pethig²⁵ van realitzar un estudi de la relació entre les constants dielèctriques de diferents solvents i la quantitat d'aigua que quedava unida a l'enzim lisozim, i tot i que van observar una certa correlació, no van aconseguir una predicció fiable de l'activitat biocatalítica en base a aquest paràmetre físic dels solvents. Laane *et al.*²⁶ van trobar que la propietat dels solvents que permet predir de forma aproximada l'activitat enzimàtica en diferents solvents orgànics és el $\log P$ on P és el coeficient de partició del solvent en un sistema bifàsic octanol/aigua. Aquest paràmetre es pot considerar fins a cert punt com una mesura quantitativa de la polaritat dels solvents, i es va veure que aquells solvents més polars tenien més capacitat d'extreure l'aigua essencial dels enzims, mentre que en solvents amb molt baixa polaritat, tals com hexà, els enzims tendeixen a presentar una activitat catalítica més elevada ja que aquests solvents no tenen tanta capacitat d'extreure l'aigua essencial dels enzims. Així, en termes del $\log P$, tal com es va veure a §2.1.3, es té que per valors del $\log P < 2$, el solvent és força polar i els enzims tendeixen a presentar una activitat baixa en aquest solvent, per valors del $\log P$ entre 2 i 4 l'enzim només perd part de la seva

aigua essencial i disminueix la seva activitat catalítica i per valors del $\log P > 4$ l'enzim és molt poc polar i extreu molt poca aigua essencial de l'enzim, de forma que aquest conserva la majoria de la seva activitat catalítica.

Més endavant, Ann *et al.*²⁷ van realitzar un estudi on no només van considerar les propietats dels solvents, sinó també el tipus d'unions entre l'aigua essencial i l'esquelet de l'enzim, ja que es van adonar que l'activitat catalítica per diferents enzims en un mateix solvent era diferent. Així van observar que alguns enzims retenien les molècules d'aigua mitjançant enllaços més forts que uns altres de manera que conservaven major activitat catalítica en un major nombre de solvents. També van observar que hi ha dos fraccions d'aigua enllaçada a l'enzim com a mínim. La primera fracció es pot extreure amb relativa facilitat, i consisteix en aquelles molècules d'aigua que interaccionen amb els grups funcionals dels enzims relativament polars i no polars. La segona fracció es troba unida als grups funcionals carregats dels aminoàcids, i és el que es considera aigua estructural. També van observar que només cal que l'enzim tingui una fracció d'aigua molt petita per presentar activitat catalítica, tot i que alguns solvents polars extreuen l'aigua dels enzims molt ràpidament i amb molta eficàcia, fent que aquest perdi activitat catalítica. En aquests casos, per tal d'utilitzar aquests enzims caldrà modificar la seva estructura. De fet ja existeixen diversos treballs on realitzen modificacions en l'estructura de l'enzim que han generat resultats molt positius a l'hora de ser utilitzats en medis no aquosos. Un exemple relativament senzill és la modificació d'un enzim mitjançant lligands que van portar a terme Russell i Klibanov²⁸, els quals van observar que si la subtilisina es liofilitzava després de ser pretractada en una solució amb un lligand, aquesta retenia més o menys activitat catalítica depenent del lligand utilitzat. També s'ha portat a terme la modificació d'enzims que per si sols ja mostraven activitat biocatalítica en medis orgànics, per tal de millorar encara més la seva estabilitat en aquests medis. Així, es poden trobar exemples de modificació de la peroxidasa de rave picant amb poli(etilenglicol) per tal de millorar la seva activitat catalítica en acetat d'etil i 1,2-diclorobenzè²⁹. De fet, Dordick va realitzar un estudi de diferents tipus d'immobilització possible per tal de millorar l'estabilitat dels enzims en medis no aquosos³⁰.

Un factor curiós és l'efecte del pH sobre l'activitat catalítica. En treballar amb solvents orgànics, el pH esdevé un paràmetre poc important. Tot i així, s'ha observat que l'enzim «recorda» el pH de la darrera solució aquosa a la qual s'ha exposat, és a dir, l'enzim adquireix la conformació corresponent al pH de la solució aquosa i en liofilitzar-se reté la mateixa conformació¹⁴. Per tant, per treballar amb solvents orgànics cal utilitzar enzims que han estat liofilitzats a partir de solucions aquoses amb el pH òptim per l'activitat catalítica.

Així doncs, sembla clar que certs enzims poden ser utilitzats en certs solvents orgànics. Aquesta característica ha estat explotada dins del món de l'enzimologia i de processos biotecnològics³¹. Però no només s'ha aprofitat aquesta possibilitat dels enzims dins del món de la biotecnologia, sinó que també s'ha utilitzat al món de l'anàlisi enzimàtica. Ja dins del grup dels biosensors, es poden trobar alguns reviews que posen de manifest el creixent impacte dels biosensors

en medis orgànics. Així, dins del camp dels biosensors òptics es pot destacar el review de Díaz-García i Valencia-González³², on es citen nombrosos exemples de biosensors òptics per medis orgànics. Pel que fa a biosensors electroquímics es poden destacar els reviews de Saini *et al.*³³ i d'Iwuoha i Smyth^{34,35}, els quals donen exemples innovadors de biosensors desenvolupats per treballar en solvents orgànics amb elevada reproductibilitat i temps de vida. Els biosensors electroquímics per medis orgànics han proliferat de manera notable al llarg de la dècada dels 90 i encara ara és un tema en constant desenvolupament. Per aquest motiu també es poden trobar reviews més específics on es consideren els biosensors en fase orgànica com a detectors de sistemes de flux³⁶, o reviews on es consideren sistemes bienzimàtics com a detectors electroquímics per medis orgànics³⁷.

8.1.2. Anàlisi en medis orgànics emprant biosensors basats en peroxidasa de rave picant

A §1.4, ja es va parlar de forma general dels biosensors enzimàtics electroquímics per medis no aquosos. Es va veure que s'han emprat enzims de molt diversa natura, entre els quals es poden destacar deshidrogenases com la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa³⁸ o l'alcohol deshidrogenasa³⁹; hidrolases com la creatinina amidinohidrolasa⁴⁰, i oxidases com l' α -quimiotripsina^{33,41}, la colesterol oxidasa⁴², la glucosa oxidasa^{43,44}, la tirosinasa⁴⁵⁻⁶³, la colina oxidasa⁶⁴, la fosfolipasa colin oxidasa⁶⁵, l'acetilcolinesterasa⁶⁶, la lacasa⁶⁷, la sarcosinasa⁶⁸, o la peroxidasa de rave picant (quadre 8.1.2-1).

Un dels enzims més populars a l'hora de desenvolupar biosensors electroquímics enzimàtics per medis no aquosos és la peroxidasa de rave picant (HRP). Aquest enzim ha mostrat elevada activitat biocatalítica en un ampli ventall de solvents, cosa que ha permès la fabricació de biosensors que han trobat aplicacions dins de camps tan diversos com l'anàlisi clínica, d'aliments o fins i tot medioambiental. Al quadre 8.1.2-1 es mostra un recull d'exemples de diferents biosensors basats en la HRP amb transducció amperomètrica emprant un ampli ventall de solvents i de tipus d'immobilització.

Tal com es pot veure al quadre 8.1.2-1, la majoria dels biosensors de HRP requereixen la utilització de mediadors per tal que es produeixi la transferència electrònica⁹⁰. Aquests mediadors són el ferroçè, el ferrocianur de potassi o l'*o*-fenilen-diamina, predominantment. En alguns casos, però, s'han emprat polímers conductors que contenen centres metàl·lics, tals com àtoms de ruteni o osmi, per mediar la transferència electrònica. Aquests polímers són molt avantatjosos ja que a més d'immobilitzar l'enzim, eviten la necessitat d'afegir mediadors al solvent i no es té el problema de pèrdua del mediador per extracció cap al solvent que es tindria en casos on el mediador és una molècula immobilitzada en un polímer o per adsorció a l'elèctrode.

Un altre factor a destacar del quadre 8.1.2-1 és l'observació generalitzada de la necessitat d'un cert percentatge d'aigua al medi en forma de tampó fosfat; tot i que es poden trobar treballs contradictoris, els quals afirmen l'existència de biocatàlisi en medis totalment orgànics, especialment si el solvent és molt hidrofòbic^{13,81}.

Altres treballs interessants no inclosos al quadre 8.1.2-1 involucren el desenvolupament de biosensors bienzimàtics emprant HRP i altres enzims en medis parcialment aquosos però amb un cert percentatge de solvent orgànic. Entre aquests treballs cal destacar per exemple el treball de Cerro *et al.*⁹¹ en el qual es fabrica un biosensor de tercera generació emprant un compòsit de Tefló-grafit on es coimmobilitza HRP i glucosa oxidasa i ferrocè (mediador) per tal de determinar glucosa en vins i most. Aquest treball no s'inclou al quadre 8.1.2-1 ja que el medi analític no és majorment orgànic, però és un treball representatiu del creixent impacte dels biosensors multienzimàtics que empen HRP com a forma de determinar l'activitat de l'enzim coimmobilitzat al mateix biosensor.

Així, un altre exemple d'aquest tipus de biosensors és el desenvolupat per Braco *et al.*⁹², el qual coimmobilitza HRP i colesterol oxidasa per adsorció sobre llits de vidre porós per construir un bioreactor per a la determinació de colesterol mitjançant detecció espectrofotomètrica en l'ultravioleta-visible. En aquest exemple, en la reacció entre la colesterol oxidasa i el colesterol del medi (en aquest cas toluè saturat d'aigua) es genera H₂O₂ que és oxidada per la HRP. Aquest exemple tampoc s'inclou al quadre 8.1.2-1 ja que no es tracta d'un biosensor amperomètric. Aquests treballs on es desenvolupen sistemes bienzimàtics constitueixen interessants exemples d'eines electroanalítiques simples i de baix cost per a l'anàlisi de bioanalits.

Per altra banda, la HRP també s'ha emprat com a marcador d'anticossos, com en el treball desenvolupat per Sasaki *et al.*⁹³. En aquest cas, es determinà atrazina en toluè saturat d'aigua emprant anti-atrazina marcada amb HRP immobilitzada sobre llits de vidre porós. Un cop més, no es tracta d'un biosensor enzimàtic i per tant no s'ha inclòs al quadre 8.1.2-1.

Pel que fa al tipus d'immobilització, a la literatura es poden trobar estratègies molt diverses. Una estratègia emprada amb molta generalitat i que ha donat resultats molt positius és la utilització d'hidrogels, ja que aquests proporcionen un microentorn aquós que assegura la retenció de l'estructura terciària de l'enzim. Existeixen, també, alguns treballs en els quals s'empen compòsits conductors rígids, tot i que són treballs molt puntuals. Així, cal destacar el treball d'Ortiz *et al.*⁸⁵ els quals van emprar un compòsit de Tefló per immobilitzar l'enzim i el mediador. Dins de la literatura revisada, no s'han trobat exemples de biosensors basats en HRP per medis orgànics emprant compòsits conductors rígids de dispersió. Per tant, en el present treball es desenvoluparà i caracteritzarà per primer cop un biosensor basat en un compòsit conductor rígid de dispersió d'epoxi-grafit amb HRP immobilitzada a la matriu i compatible amb acetonitril.

Quadre 8.1.2-1: Biosensors amperomètrics basats en HRP per a medi orgànic					
Medi	Substrat [analiu]	Mediador	Tipus d'immobilització	Aplicació	Referència
Etanol Acetonitril:aigua 85:15 v/v	Hidroperòxid de <i>t</i> -butil Peròxid de 2-butanona	<i>o</i> -Fenilendiamina	L'enzim liofilitzat es troba en suspensió al medi i la detecció amperomètrica es realitza amb un microelectrode de fibra de carboni	No s'apliquen a mostres reals	69
Acetonitril:aigua 40:60 v/v	Hidroperòxid de <i>t</i> -butil Hidroperòxid de cumè Peròxid de 2-butanona Hidroperòxid de trigènilmetil Peròxid de lauroil Peroxibenzoat de <i>t</i> -butyl	<i>o</i> -Fenilendiamina	En pasta de carboni composta de 5% en pes d'enzim, 52.5% de grafit i 42.5% de greix de silicona	Determinació de peròxids orgànics en aigües residuals desinfectades mitjançant ozonització	70
Dioxà:aigua 85:15 v/v Cloroforn Toluè Octanol Clorobenzè Benzè Propanol Metanol:aigua 90:10 v/v	H ₂ O ₂	[Fe(CN) ₆]K ₄	Adsorció sobre una superfície de grafit juntament amb el mediador	Estudi de l'activitat enzimàtica en funció del valor del <i>logP</i> del solvent i de la presència o no d'aigua (els solvents immiscibles amb aigua els saturen amb tampò fosfat)	71

Quadre 8.1.2-1: Biosensors amperomètrics basats en HRP per a medi orgànic					
Medi	Substrat [anali]t]	Mediador	Tipus d'immobilització	Aplicació	Referència
Cloroform saturat d'aigua	Peròxid de 2-butanona	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]\text{K}_4$	Adsorbit sobre microelèctrodes de fibra de carboni formant un arranjament	No s'apliquen a mostres reals. Aplicacions proposades són la determinació de peròxids orgànics en olis d'oliva amb un sistema FLA.*	72
Acetonitril amb 5% (v/v)	Peròxid de dodecanoil	Ferrocè			
Acetonitril amb un 2% en volum d'aigua	Peròxid de 2-butanona [tiourea, àcid benzoic, dietilditiocarbamat, sulfat d'hidroxilamoni, mercaptoetanol]	o -Fenilendiamina	En un hidrogel (Eastman AQ-55D) sobre un elèctrode de carboni vitrificat	Sistema FLA per a la determinació d'inhibidors	73
Acetonitril amb 10% (v/v)	H_2O_3	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]\text{K}_5$	Enzim i mediador dins d'un hidrogel (Eastman-AQ) sobre un elèctrode de carboni vitrificat	Determinació de peròxids en aigües de consum	74
Acetonitril amb 4% (v/v)	H_2O_2	Ferrocè	Dins un hidrogel (Eastman-AQ) sobre un elèctrode de carboni vitrificat	Determinació de peròxid d'hidrogen en productes farmacèutics, terapèutics i cosmètics	75

Quadre 8.1.2-1: Biosensors amperomètrics basats en HRP per a medi orgànic

<i>Medi</i>	<i>Substrat [analiu]</i>	<i>Mediador</i>	<i>Tipus d'immobilització</i>	<i>Aplicació</i>	<i>Referència</i>
Miscel·les reverses on la fase orgànica és n-hexà, cloroform o acetat d'etil	Peròxid de 2-butanona	Ferrocè	Adsorció sobre un elèctrode de grafit rugós	Estudi de l'activitat catalítica en variar el percentatge d'aigua a les miscel·les i la natura de l'agent surfactant	76
Acetonitril amb un 1.5% v/v d'aigua Metanol amb un 1.5% v/v d'aigua 2-butanol amb un 1.5% v/v d'aigua	Peròxid de butanona [pesticida: metil isocianat]	<i>o</i> -Fenilendiamina	Atrapament en un hidrogel (Eastman-AQ) dipositat sobre un elèctrode de plati	Estudi del mecanisme i paràmetres cinètics de la inhibició de l'enzim en els diferents solvents	77
Cloroform saturat d'aigua	Peròxid de lauroil	Ferrocè	Atrapament en un hidrogel (Eastman-AQ) sobre un elèctrode de carboni vitrificat	Determinació de peròxids orgànics en olis vegetals provinents de la seva degradació oxidativa	78
Acetonitril amb un 2% d'aigua	Peròxid de 2-butanona [tiourea, etiltiourea, mercaptoetanol]	<i>o</i> -Fenilendiamina	Atrapament en un hidrogel (Eastman-AQ) dipositat sobre un elèctrode de plati	Estudi del mecanisme i paràmetres cinètics de la inhibició de l'enzim pels diferents inhibidors	79

Quadre 8.1.2-1: Biosensors amperomètrics basats en HRP per a medi orgànic					
<i>Medi</i>	<i>Substrat [analiu]</i>	<i>Mediador</i>	<i>Tipus d'immobilització</i>	<i>Aplicació</i>	<i>Referència</i>
Cloroform Diclorur d'etilè Acetonitril Dioxà Metanol Ciclohexà Etanol THF** N,N-DMFA***	H ₂ O ₂	[Fe(CN) ₆]K ₄	Immobilització de l'enzim i del mediador dins de polihidroxil-celulosa dipositada sobre un elèctrode de grafit	Estudien la diferent termoestabilitat de l'enzim en els diferents solvents	13
Acetonitril amb un 2% v/v d'aigua Metanol amb un 2% v/v d'aigua	Peròxid de 2-butanona [inhibidor: sulfat d'hidroxilamina]	Sense mediador	Atrapament de l'enzim en un hidrogel (Eastman-AQ) dipositat sobre un elèctrode de plati	No l'apliquen a mostres reals	80
Cloroform Clorobenzè	H ₂ O ₂	Sense mediador	Atrapament de l'enzim en un criohidrogel (poliol-celulosa) dipositat sobre un elèctrode de grafit espectrogràfic, plati i carboni vitrificat	No l'apliquen a mostres reals	81
Acetonitril amb un contingut d'aigua d'entre 0 i 5% v/v	Peròxid de 2-butanona Peròxid de lauroil Hidroperòxid de cumè Hidroperòxid de <i>t</i> -butil	Ferrocè	Enzim i mediador s'uneixen electrostàticament a un film de polianilina	Determinació de H ₂ O ₂ en cremes blanquejadores del cabell	82

Quadre 8.1.2-1: Biosensors amperomètrics basats en HRP per a medi orgànic					
Medi	Substrat [analiu]	Mediador	Tipus d'immobilització	Aplicació	Referència
Acetonitril amb 1.5% d'aigua Metanol amb 1.5% d'aigua Acetona amb 1.5% d'aigua	Peròxid de 2-butanona [teiourea, etilentiourea]	1,1-Dimetilferrocè	Atrapament de l'enzim en un hidrogel (Eastman AQ-55D) dipositat sobre un elèctrode de carboni vitrificat	No s'apliquen a mostres reals. Estudien l'efecte dels inhibidors sobre l'enzim en solvents orgànics	83
Acetonitril amb un 4% d'aigua	H ₂ O ₂	Sense mediador	Atrapament de l'enzim al polímer conductor poli(3-(3'-tiènil) àcid propanulfonic) electropolimeritzat sobre un elèctrode de SnO ₂	No s'apliquen a mostres reals.	84
Miscel·les reversees amb fase orgànica d'acetat d'etil i 4% de fase aquosa Acetonitril amb un 10% v/v d'aigua	H ₂ O ₂ Peròxid de 2-butanona	Fe(CN) ₆ K ₄	Atrapament de l'enzim i el mediador a un compost de Tefló-grafit	No s'apliquen a mostres reals	85
Acetonitril amb un 10% v/v d'aigua	H ₂ O ₂ [isocianat de metil]	L'osmi del polímer sobre el qual s'immobilitza l'enzim	Complexació electrostàtica sobre un polímer de [Os bis(piridil) poli(4-vinilpiridina)] electropolimeritzat sobre un elèctrode de carboni vitrificat	Caracterització de l'enzim modificat amb N-hidroxisuccinimida i determinació del pesticida isocianat de metil	86

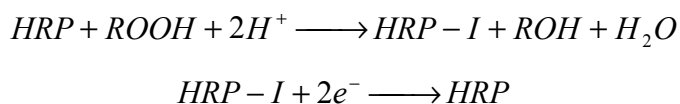
Quadre 8.1.2-1: Biosensors amperomètrics basats en HRP per medi orgànic

<i>Medi</i>	<i>Substrat [analiu]</i>	<i>Mediador</i>	<i>Tipus d'immobilització</i>	<i>Aplicació</i>	<i>Referència</i>
Acetona amb un 1.5% d'aigua Acetonitril amb un 10% v/v d'aigua 2-Propanol Tetrahidrofurà	H ₂ O ₂	El film de polianilina actua de mediador	Complexació electrostàtica sobre un film de polianilina dopada amb poli(vinilsulfat) electropolimeritzat sobre un elèctrode de platí	No s'apliquen a mostres reals	87
Metanol amb un 20% v/v d'aigua Acetonitril amb un 20% v/v d'aigua 2-Propanol saturat d'aigua Acetona amb un 20% d'aigua Cloroform saturat d'aigua Clorobenzè saturat d'aigua	H ₂ O ₂ Peròxid de 2-butanona Hidroperòxid de <i>t</i> -butil Peròxid de lauroil	Ferrocè	Adsorció sobre un elèctrode de pasta de carboni i es recobreix d'un film de Sol-gel	Determinació de peròxids orgànics d'antisèptics i cremes en metanol amb un 20% v/v de medi aquós	88
Dimetilsulfòxid amb un 30% i un 80% v/v d'aigua	H ₂ O ₂	Sense mediador, la transferència electrònica està assistida pel film on s'immobilitza l'enzim	Atrapament dins d'un film de clorur de tributilmetil fosfoni (TBMPC) dipositat sobre d'un elèctrode de grafit pirolític	Estudi electroquímic i espectroscòpic de l'efecte del dimetilsulfòxid sobre les propietats estructurals de l'enzim	89

8.2. Elecció de l'enzim

Tal com hem vist, existeix un gran nombre d'enzims aplicats a l'anàlisi en medi no aquós. Entre aquests enzims, els més destacables gràcies a la seva elevada activitat en medis orgànics són la tirosinasa i la peroxidasa de rave picant. En el present treball, s'ha desenvolupat un biosensor basat en un dels compòsits caracteritzats anteriorment, modificat amb peroxidasa de rave picant (HRP, EC. 1.11.1.7, 1380 unitats/mg sòlid, comprat a Sigma). S'ha escollit un enzim l'activitat del qual en medis orgànics ja ha estat comprovada. La innovació que presenta aquest treball és referent al tipus d'immobilització de l'enzim, ja que es porta a terme per atrapament dins d'un compòsit conductor rígid dispersiu, mentre que en treballs previs s'ha realitzat per adsorció sobre un elèctrode de carboni vitrificat, o de platí, atrapant l'enzim en un polímer d'àcid poliestersulfònic (Eastman AQ), tot i que també hi ha algun exemple de biocompòsits però consolidat. L'objectiu d'aquest treball, però, no és el desenvolupament del biosensor en si, sinó que només s'ha construït com a exemple de biosensor compatible amb solvents orgànics emprant els compòsits preparats i caracteritzats al llarg del present treball. Per tant, aquest biosensor no ha estat optimitzat ni des del punt de vista de construcció, ni d'utilització.

La peroxidasa de rave picant és una hemoglicoproteïna de pes molecular 42000 (figura 8.2-1). El seu seti catalític és la sisena posició de coordinació d'un Fe(III), que pot ser ocupat per aigua, peròxids, fluorurs i cianurs. El mecanisme d'aquest procés és el següent:



on *ROOH* és un peròxid orgànic. La peroxidasa serà, doncs, l'espècie que es reduirà a la superfície de l'elèctrode (a menys que es posi un mediador, com es fa a les referències citades). En el present treball es treballarà sense mediador, ja que l'enzim es troba en contacte íntim amb les partícules conductores, cosa que fa que la detecció sigui més ràpida i es pugui produir una transferència electrònica directa entre l'enzim i el material conductor.

8.3. Elecció de l'analít

Els peròxids són substàncies amb un interès analític molt divers. Alguns peròxids orgànics apareixen a les aigües de consum com a conseqüència d'un procés de desinfecció per ozonització⁷⁰. Per tant, el seguiment d'aquests peròxids té un interès medioambiental. Aquestes substàncies són, per exemple, els hidroperòxids de cumè, el peròxid de *t*-butil i el peròxid de butanona, entre d'altres.

Per una altra banda, els aliments que contenen olis vegetals poden contenir peròxids orgànics com a conseqüència del deteriorament oxidatiu dels àcids grassos poliinsaturats⁷⁸. Aquests peròxids són tòxics, i el seu seguiment dona una idea de la qualitat dels aliments.

Un dels peròxids que es generen com a conseqüència de la degradació dels olis vegetals és el peròxid de lauroïl, $[CH_3(CH_2)_{10}CO]_2O_2$. Per il·lustrar, doncs, la viabilitat de les anàlisis enzimàtiques en medis no aquosos, s'ha escollit aquest substrat de la peroxidada de rave picant, ja que el seu seguiment té un clar interès analític des del punt de vista de control de qualitat dels aliments. Les solucions es van preparar a partir de peròxid de lauroïl comercial, obtingut d'Aldrich.

8.4. Elecció del medi i del compòsit conductor rígid

Estudis previs on s'analitza el peròxid de lauroïl en acetonitril⁷⁰ emprant peroxidasa de rave picant han mostrat una bona estabilitat d'aquest enzim en aquest medi. Donats els bons resultats obtinguts en aquest medi pels transductors desenvolupats en el present treball, especialment del transductor d'Araldite-M, s'ha decidit realitzar els assajos enzimàtics en acetonitril, amb una concentració de sal inert de 0.15 M, per assegurar una bona conductivitat del medi. L'electròlit suport emprat ha estat el *p*-toluensulfonat de tetrabutilamoni (TBAP).

Els elèctrodes s'han confeccionant seguint la mateixa tècnica explicada al capítol 2. El biocompòsit, en aquest cas, consisteix en un 3% en pes de peroxidasa i un 97% en pes de compòsit d'Araldite-M. La construcció d'aquests elèctrodes s'ha portat a terme en base a treballs anteriors del grup^{94,95}. No obstant, el percentatge d'enzim al compòsit és un altre paràmetre que caldrà optimitzar en un futur.

La reacció que es produeix a la superfície de l'elèctrode és la reducció de l'enzim. Aquesta es dona a un potencial de -300 mV respecte l'elèctrode de Ag/Ag⁺ amb una solució interna de sal inert a una concentració de 0.15 M i de AgNO₃ 0.01 M en acetonitril, com es pot veure a la figura 8.5-1. El potencial que s'aplica per realitzar els calibrats, però, és de -320 mV, ja que d'aquesta manera s'aconsegueix tenir menys soroll i un senyal més estable. Però cal tenir en compte que en mostres reals caldrà optimitzar el potencial de treball, així com la resta de condicions experimentals, ja que treballar a aquest potencial podria generar interferències.

En el present treball no s'utilitza mediador, ja que l'enzim es troba en contacte íntim amb les partícules de grafit, de manera que la transferència electrònica entre l'enzim i l'elèctrode és ràpida. En

treballs futurs, però, podria considerar-se la possibilitat d'emprar algun mediador ja que d'aquesta manera es podria treballar a un potencial més baix, minimitzant-se així les possibles interferències que podrien trobar-se en mostres reals.

8.5. Resultats i discussió

Per començar aquest estudi, de la mateixa forma que es va fer amb els transductors, es van realitzar voltamperogrames cíclics amb l'elèctrode enzimàtic i amb el transductor sol, sense i amb peròxid, tal com es mostra a la figura 8.5-1.

S'observà que el peròxid presentava un pic de reducció a un potencial aproximadament de -600 mV. En canvi, amb l'elèctrode que contenia peroxidasa, s'aconseguia reduir el potencial de pic catòdic fins a -300 mV aproximadament. El motiu és que l'espècie que es redueix a l'elèctrode enzimàtic és el propi enzim (bioelectrocatalísis), el qual es troba en íntim contacte amb les partícules conductores. Per tant, amb l'elèctrode enzimàtic s'aconsegueix reduir el potencial al qual es poden realitzar les mesures, a més d'obtenir-se un pic més definit.

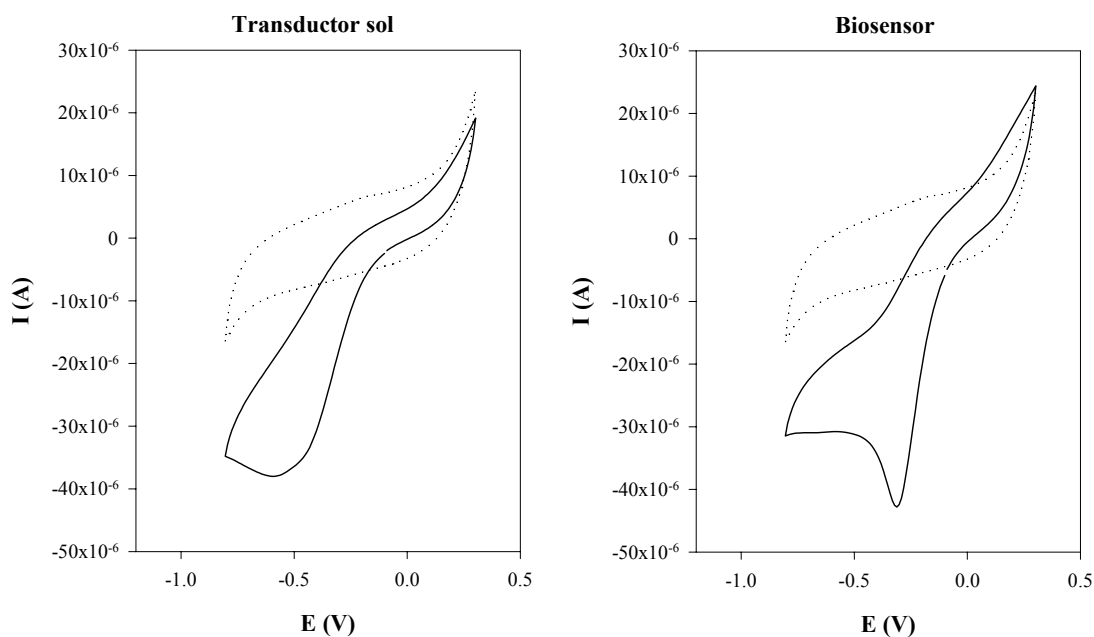


Figura 8.5-1. Voltamperogrames cíclics obtinguts amb l'elèctrode modificat amb peroxidasa i el transductor sol en absència (·····) i en presència de peròxid de lauroil 0.9 mM (—). Els voltamperogrames s'han enregistrat a temperatura ambient, una concentració de TBAP de 0.15 M. L'elèctrode auxiliar va ser Pt i el de referència va ser un Ag/Ag⁺.

A continuació, es van realitzar sèries de calibrats amb una mateixa superfície, i amb superfícies successives. Un exemple del tipus de calibrats obtinguts es mostren a la figura 8.5-2.

Es pot veure que entre el primer i el segon calibrat, hi va haver una pèrdua d'enzim, però entre el segon i el tercer calibrats, aquesta pèrdua va ser molt menys acusada. A partir d'aquests resultats, doncs, es podria pensar que el compost conté enzim no immobilitzat al començament, el qual es va perdre al llarg de la realització de la primera corba de calibrat.

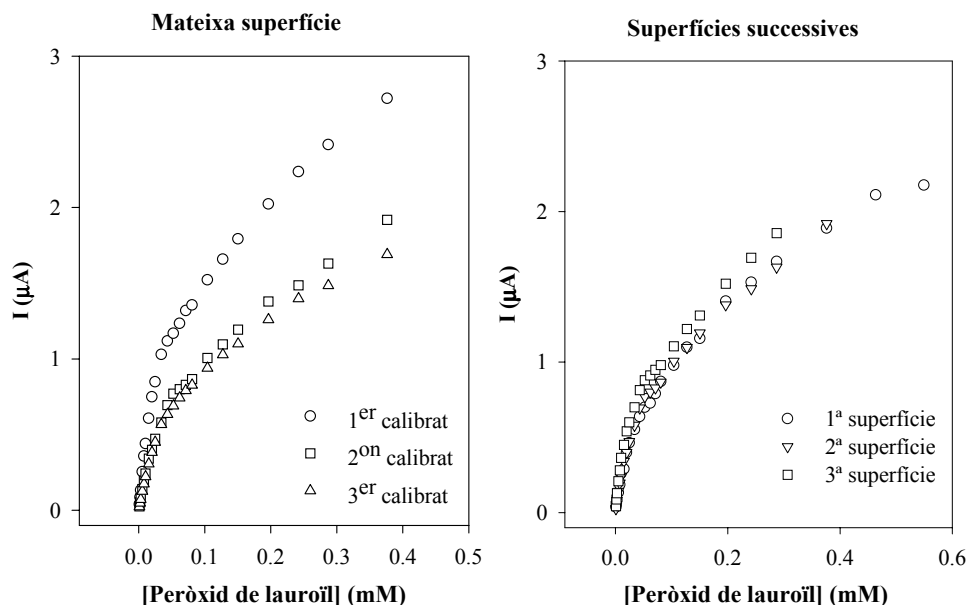


Figura 8.5-2. Tres calibrats successius per una mateixa superfície (esquerra) i per superfícies successives obtingudes en polir el biosensor (dreta) realitzats amb l'elèctrode d'Araldite-M-60% grafit modificat amb un 3% de peroxidasa. Els calibrats s'han realitzat a temperatura ambient i amb una concentració de TBAP de 0.15 M, fent addicions de peròxid de lauroil. Potencial aplicat: -320 mV respecte Ag/Ag⁺.

Pel que fa als paràmetres de les rectes de calibrat, s'ha observat que el rang de resposta lineal va des de 10⁻⁶ fins a 10⁻⁵ M, tot i que un cop es millorin les condicions experimentals aquest rang es podria ampliar. De moment, però, aquest rang de resposta lineal és comparable amb els esmentats a la bibliografia del quadre 8.1.2-1. Al quadre 8.5-1 es resumeixen els paràmetres dels tres calibrats representats a la figura 8.5-2 (esquerra).

Quadre 8.5-1: Paràmetres de calibrat del biosensor per una mateixa superfície

	$\frac{i_{m\grave{a}x}}{K_m}$	Ordenada a	
		l'origen	r (n=7)
	(μA/mM)	(μA)	
1 ^{er} calibrat	40.11	0.02	0.996
2 ^{on} calibrat	22.03	0.01	0.998
3 ^{er} calibrat	19.86	0.01	0.998

Les condicions experimentals són les mateixes que les especificades a la figura 8.5-2

Al quadre 8.5-2 es mostren els paràmetres de la recta de calibrat obtinguts per tres superfícies successives obtingudes polint el biosensor amb paper de vidre de diferents mides de partícula i alumina, corresponents als il·lustrats a la figura 8.5-2 (dreta). Es pot observar que s'obté, també, una bona reproductibilitat de les diferents superfícies obtingudes en polir el biosensor. Aquesta reproductibilitat es podrà millorar optimitzant les condicions de treball i el contingut d'enzim del biosensor.

Quadre 8.5-2: Paràmetres de calibrat del biosensor per superfícies successives

	$\frac{i_{m\grave{a}x}}{K_m}$ ($\mu A/mM$)	Ordenada a l'origen (μA)	r (n=7)
1 ^a superfície	39.02	0.03	0.998
2 ^a superfície	40.11	0.02	0.996
3 ^a superfície	33.34	0.02	0.998
Coeficient de variació	10%	2%	

Les condicions experimentals són les mateixes que les especificades a la figura 8.5-2

Tot i els bons resultats obtinguts en aquests experiments, cal esmentar que no va resultar possible la reproducció d'aquests resultats amb biosensors construïts en diferents batchs. En el present treball no es disposa de prou informació experimental per poder explicar les causes, però s'especula amb la possibilitat que la transferència electrònica directa entre l'enzim i les partícules de grafit estigui impedida en certa manera pel polímer de manera que per treballs futurs es suggereix la utilització de mediadors o la immobilització per adsorció de l'enzim sobre les partícules de grafit abans de preparar el compost.

8.6. Conclusions

En aquest darrer apartat, s'ha comprovat la viabilitat d'emprar enzims en medis orgànics. Per altra banda, s'ha demostrat que els composts conductors rígids desenvolupats i caracteritzats al llarg del present treball són transductors adients per a la construcció de biosensors per realitzar anàlisis amperomètriques en medis orgànics. Així, els biosensors enzimàtics amperomètrics compatibles amb medis orgànics presenten com a principals avantatges, la simplificació del procés analític, ja que eliminen la necessitat de fer separacions de l'analit des de solvents orgànics a medi aquós, i a més permeten assolir límits de detecció més baixos ja que en realitzar l'anàlisi directament en medi orgànic, a part de ser una simplificació del procés analític, es té una major concentració d'analit,

avantatge molt important especialment quan es determina la concentració de substàncies que poden resultar molt perjudicials pel medi ambient o per la salut humana.

A més a més, la utilització d'aquests compòsits com a transductor permeten avantatges importants des del punt de vista de la construcció dels biosensors, ja que no només són fàcils de construir, sinó que a més mitjançant un simple procés de polit es tenen superfícies noves i reproduïbles, evitant la necessitat de realitzar la immobilització de l'enzim cada cop.

Per tant, es pot concloure que el desenvolupament d'aquests nous materials compòsits conductors rígids obre noves possibilitats pel que fa a l'anàlisi enzimàtica en medis orgànics, fent possible estratègies analítiques que fins al moment no eren viables.

8.7. Bibliografia

1. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Ed.; "Principles of biochemistry", second ed.; Worth Publishers, Inc.; New York, **1982**, pp. 160-239
2. Natarajan, K. R.; *J. Chem. Edu.*; 68 (**1991**) 13-16
3. Luisi, P. L.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; 24 (**1985**) 439-450
4. Martinek, K.; Levashov, A. V.; Klyachko, N.; Khmelnski, Y. L. Berezin, I. V.; *Eur. J. Biochem.*; 155 (**1986**) 453-468
5. Waks, M.; *Proteins: Struct. Funct. Genetics*, 1 (**1986**) 4-15
6. Klibanov, A. M.; *Chemtech*; 16 (**1986**) 354-359
7. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.*; 263 (**1988**) 3194-3201
8. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Science*, 228 (**1985**) 1280-1284
9. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Science*, 224 (**1984**) 1249-1251
10. Wheeler, C. J.; Croteau, R.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 248 (**1986**) 429-434
11. Ayala, G.; de Gómez-Puyou, M. T.; Gómez-Puyou, A.; Darszon, A.; *FEBS Lett.*; 203 (**1986**) 41-43
12. Estrada, P.; Baroto, W.; Castillon, M. P.; Acebal, C.; Arche, R.; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*; 56 (**1993**) 59-65
13. Dong, S.; Guo, Y.; *Anal. Chem.*; 66 (**1994**) 3895-3899
14. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 82 (**1985**) 3192-3196
15. Kazandjian, R. Z.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Soc.*; 107 (**1985**) 5448-5450
16. Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (**1986**) 2767-2768
17. Jones, J. B.; Schwartz, H. M.; *Can. J. Chem.*; 61 (**1982**) 1030-1033
18. Dastoli, F. R.; Price, S.; *Arch. Biochem. Biophys.*; 118 (**1967**) 163-165
19. Kazandjian, R. Z.; Klibanov, A. M.; *J. Am. Chem. Soc.*; 107 (**1986**) 5448-5450
20. Ye. Y.-H.; Tian, G.-L.; Xing, G.-W.; Dai, D.-C.; Chen, G.; *Tetrahedron*; 54 (**1998**) 12585-12596

21. Yang, D.; Rhee, H. S.; *Biotech. Bioeng.*; 40 (1992) 748-752
22. Stahl, M.; Mansson, M.-O.; Mosbach, K.; *Biotech. Letters*; 12 (1990) 161-166
23. Burton, S. G.; Duncan, J. R.; Kaye, P. T.; Rose, P. D.; *Biotech. Bioeng.*; 42 (1993) 938-944
24. Duff, S. J. B.; Murray, W. D.; *Biotech. Bioeng.*; 34 (1989) 153-159
25. Bone, S.; Pethig, R.; *J. Mol. Biol.*; 157 (1982) 571-575
26. Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotech. Bioeng.*; 30 (1987) 81-87
27. Gorman, L. A. S.; Dordick, J. S.; *Biotech. Bioeng.*; 39 (1992) 392-397
28. Russell, A. J.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.*; 263 (1988) 11624-11626
29. Yang, L.; Murray, R. W.; *Anal. Chem.*; 66 (1994) 2710-2718
30. Dordick, J. S.; *Biotechnol. Prog.*; 8 (1992) 259-267
31. Gaertner, H. F.; Puigserver, A. J.; *Biotech. Bioeng.*; 36 (1990) 601-607
32. Díaz-García, M. E.; Valencia-González, M. J.; *Talanta*; 42 (1995) 1763-1773
33. Saini, S.; Hall, G. F.; Downs, M. E. A.; Turner, A. P. F.; *Anal. Chim. Acta*; 249 (1991) 1-15
34. Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Anal. Commun.*; 33 (1996) 23H-26H
35. Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; Lyons, M. E. G.; *Biosens. Bioelectr.*; 12 (1997) 53-75
36. Wang, J; *Talanta*; 40 (1993) 1905-1909
37. Saini, S.; Turner, A. P. F; *TrAC*; 14 (1995) 304-310
38. Wang, J; Naser, N.; Lopez, D.; *Biosens. Bioelectr.*; 9 (1994) 225-230
39. Eisenberg, E. J.; Cundy, K. C.; *Anal. Chem.*; 63 (1991) 845-847
40. Choi, S. H.; Lee, S. D.; Shin, J. H.; Ha, J.; Nam, H.; Cha, G. S.; *Anal. Chim. Acta*; 461 (2002) 251-260
41. Miyabayashi, A.; Reslow, M.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B.; *Anal. Chim. Acta*; 219 (1989) 27-36
42. Hall, G. F.; Turner, A. P. F; *Anal. Letters*; 24 (1991) 1375-1388
43. Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; Lyons, M. E. G.; *J. Electroanal. Chem.*; 390 (1995) 35-45
44. Kröger, S.; Setford, S. J.; Turner, A. P. F; *Anal. Chim. Acta*; 368 (1998) 219-231
45. Hall, G. F.; Best, D. J.; Turner, A. P. F; *Anal. Chim. Acta*; 213 (1988) 113-119
46. Campanella, L.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Sens. Actuat. B. Chem.*; 7 (1992) 383-388
47. Wang, J; Reviejo, A. J.; Mannino, S.; *Anal. Letters*; 25 (1992) 1399-1409
48. Wang, J; Naser, N.; Kwon, H. S.; Cho, M. Y.; *Anal. Chim. Acta*; 264 (1992) 7-12
49. Wang, J; Reviejo, A. J.; *Anal. Chem.*; 65 (1993) 845-847
50. Campanella, L.; Beone, T.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Analyst*; 118 (1993) 979-986
51. Liu, F.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M.; Wang, J; *Talanta*; 41 (1994) 455-459
52. Campanella, L.; Fortuney, A.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Talanta*; 41 (1994) 1397-1404
53. Campanella, L.; Favero, G.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Talanta*; 41 (1994) 1015-1023

54. Mannino, S.; Cosio, M. S.; Wang, J; *Analyst*; 119 (1994) 2001-2003
55. Iwuoha, E. I.; Adeyoju, O.; Dempsey, E.; Smyth, M. R.; Liu, J.; Wang, J.; *Biosens. Bioelectr.*; 10 (1995) 661-667
56. Deng, Q.; Dong, S.; *Anal. Chem.*; 67 (1995) 1357-1360
57. Reviejo, A. J.; Fernández, C.; Liu, F.; Pingarrón, J. M.; Wang, J; *Anal. Chim. Acta*; 315 (1995) 93-99
58. Adeyoju, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; Leech, D.; *Analyst*; 121 (1996) 1885-1889
59. Pravda, M.; Petit, C.; Michotte, Y.; Kauffmann, J.-M.; Vytras, K.; *J. Chromatogr. A*; 727 (1996) 47-54
60. Deng, Q.; Dong, S.; *Analyst*; 121 (1996) 1979-1982
61. Ruiz, M. A.; Reviejo, A. J.; Parrado, C.; Pingarrón, J. M.; *Electroanalysis*; 8 (1996) 529-533
62. Hipólito-Moreno, A.; León-González, M. E.; Pérez-Arribas, L. V.; Polo-Díez, L. M.; *Anal. Chim. Acta*; 362 (1998) 187-192
63. Wang, B.; Dong, S.; *J. Electroanal. Chemistry*; 487 (2000) 45-50
64. Leca, B.; Moréllis, R. M.; Coulet, P. R.; *Anal. Letters*; 29 (1996) 661-672
65. Campanella, L.; Pacifici, F.; Sammartino, M. P.; Tomassetti, M.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*; 47 (1998) 25-38
66. Wilkins, E.; Carter, M.; Ivnitski, D.; *Electrochem. Commun.*; 2 (2000) 786-790
67. Wang, J; Lin, Y; Eremenko, A. V.; Ghindilis, A. L.; Kurochkin, I. N.; *Anal. Letters*; 26 (1993) 197-207
68. Choi, S. H.; Lee, S. D.; Shin, J. H.; Ha, J.; Nam, H.; Cha, G. S.; *Anal. Chim. Acta*; 461 (2002) 251-260
69. Wang, J; Wu, L. H.; Angnes, L.; *Anal. Chem.*; 63 (1991) 2993-2994
70. Wang, J; Freiha, B.; Naser, N.; González-Romero, E.; Wollenberger, U.; Ozsoz, M.; Evans, O.; *Anal. Chim. Acta*; 254 (1991) 81-88
71. Schubert, F.; Saini, S.; Turner, A. P. F; *Anal. Chim. Acta*; 245 (1991) 133-138
72. Wang, J; Lin, Y. H.; *Anal. Chim. Acta*; 271 (1993) 53-58
73. Wang, J; Dempsey, E.; Eremenko, A. V.; Smyth, M. R.; *Anal. Chim. Acta*; 279 (1993) 203-208
74. Wang, J; Lin, Y; Chen, Q.; *Electroanalysis*; 5 (1993) 23-28
75. Wang, J.; Lin, Y.; Chen, L; *Analyst*; 118 (1993) 277-280
76. Reviejo, A. J.; Liu, F.; Pingarrón, J. M.; Wang, J; *J. Electroanal. Chem.*; 374 (1994) 133-139
77. Adeyoju, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Anal. Letters*; 27 (1994) 2071-2081
78. Mannino, S.; Cosio, M. S.; Wang, J; *Anal. Letters*; 27 (1994) 299-308
79. Adeyoju, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Talanta*; 41 (1994) 1603-1608
80. Adeyoju, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Anal. Proc.*; 31 (1994) 177-179

81. Dong, S.; Guo, Y.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*; **1995**; 483-484
82. Wang, C. L.; Mulchandani, A.; *Anal. Chem.*; **67** (**1995**) 1109-1114
83. Adeyolu, O.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Anal. Chim. Acta*; **305** (**1995**) 57-64
84. Tatsuma, T.; Ariyama, K.; Oyama, N.; *Anal. Chim. Acta*; **318** (**1996**) 297-301
85. Ortiz, G.; González, M. C.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M.; *Anal. Chem.*; **69** (**1997**) 3521-3526
86. Iwuoha, E. I.; Leister, I.; Miland, E.; Smyth, M. R.; Ó Fágáin, C.; *Anal. Chem.*; **69** (**1997**) 1674-1681
87. Iwuoha, E. I.; Saenz de Villaverde, D.; Garcia, N. P.; Smyth, M. R.; Pingarrón, J. M.; *Biosens. Bioelectr.*; **12** (**1997**) 749-761
88. Li, J.; Tan, S. N.; Oh, J. T.; *J. Electroanal. Chem.*; **448** (**1998**) 69-77
89. Santucci, R.; Laurenti, E.; Sinibaldi, F.; Ferrari, R. P.; *Biochim. Biophys. Acta*; **1596** (**2002**) 225-233
90. Stoecker, P. W.; Yacynych, A. M.; *Bul. Electrochem.*; **8** (**1992**) 181-185
91. del Cerro, M. A., Cayuela, G.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M.; Wang, J.; *Electroanalysis*; **9** (**1997**) 1113-1119
92. Braco, L.; de la Guardia, M.; *Anal. Chem.*; **64** (**1992**) 129-133
93. Sasaki, S.; Tokitsu, Y.; Ikebukuro, K.; Yokoyama, K.; *Anal. Letters*; **30** (**1997**) 429-443
94. Céspedes, F.; Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, **1993**
95. Céspedes, F.; Martínez-Fàbregas, E.; Alegret, S.; *Electroanalysis*; **6** (**1994**) 759-763

PART V

CONCLUSIONS GENERALS

Capítol 9

Conclusions generals

[a] En el treball acabat de relatar, doncs, s'han desenvolupat i caracteritzat nous materials compòsits conductors rígids compatibles amb solvents orgànics, amb l'objectiu de construir sensors amperomètrics. En primer lloc es van desenvolupar els materials en si, cosa que implicà l'elecció de la càrrega de grafit adient per a cada compòsit. Es van confeccionar corbes de percolació, on es mostra l'evolució de la resistència dels compòsits a mida que s'incrementa la càrrega de grafit. Mitjançant microscopia electrònica (SEM), es va veure que l'efecte d'una major quantitat de grafit al compòsit fa disminuir els porus deguts a aire atrapat al polímer i fa que les partícules de grafit es trobin més properes entre si. Aquest resultat explica la disminució de resistència del material a mida que s'incrementa la càrrega de grafit, ja que es formen més contactes entre partícules de grafit i per tant més camins de percolació. Per tant, la composició del compòsit va ser un compromís entre una màxima conductivitat i una màxima estabilitat física.

[b] Amb els compòsits desenvolupats d'aquesta manera, es van construir macroelèctrodes, els quals es van utilitzar per mesurar la reacció redox del ferro en diferents solvents al llarg de diferents períodes de temps, guardant-los secs i en contacte amb cada solvent, per tal d'estudiar la seva estabilitat electroquímica en els solvents estudiats. Així, la primera conclusió que es pot extreure d'aquest treball és que compòsits basats en resines epoxi tals com l'Araldite-M, l'Araldite-CW2215, l'Araldite-PY302-2 i l'Araldite-GY250, així com el compòsit basat en una resina de silicona comercial, han mostrat bona estabilitat en certs solvents orgànics, la majoria d'ells polars, tot i que els Araldites PY302-2 i GY250 també van mostrar bona estabilitat física i química en hexà, el qual és un solvent apolar. L'estabilitat electroquímica d'aquests compòsits en els diferents solvents es mostra al quadre 9.1, el qual es va mostrar al capítol 3 d'aquesta tesi.

Aquest estudi es va realitzar mitjançant corbes de calibrat realitzades periòdicament amb cada compòsit en cada solvent, així com el registre de voltamperogrames cíclics, també periòdicament. Es pot veure que la majoria de compòsits mostren bona estabilitat en solvents polars, i només dos dels vuit epoxis estudiats van mostrar bona estabilitat electroquímica en solvents apolars tals com hexà. Tots els compòsits que van presentar bona estabilitat en els diferents solvents van mantenir bona estabilitat al llarg de la totalitat de temps estudiat, amb excepció del compòsit d'Araldite-CW2215/HY5162 en metanol. Per tant, els temps en mesos especificats al quadre 9-1 corresponen al temps mínim que aquests compòsits van ser estables en aquests solvents, ja que no es va continuar l'estudi de l'estabilitat electroquímica per temps superiors als especificats al quadre 9-1.

[c] Mitjançant microscòpia electrònica (SEM) es va veure que els compòsits que van presentar bona estabilitat electroquímica en certs solvents, van mostrar esquerdes des del primer dia d'estar en contacte amb aquests solvents i que aquestes esquerdes no augmentaven en mida o nombre de forma evident al llarg del temps estudiat, cosa que explica l'elevada reproductibilitat dels resultats obtinguts amb els sistemes compòsit-solvent on el compòsit presentava bona estabilitat física i electroquímica.

Quadre 9-1

Temps testat en els quals els compòsits són estables (mesos)

	Condicions d'emmagatzematge	Acetonitril	Etanol	Cloroform	Metanol	Tetrahidrofurà	Acetona	Hexà:Etanol (1:1, v:v)
Araldite-M/HY5162-60% grafit	en el solvent	2	1	-	-	-	1	-
	sec	2	1	-	-	-	1	-
Epo-tek H77-20% grafit	en el solvent	-	-	-	-	-	-	-
	sec	-	-	-	-	-	-	-
Araldite-CW2215/HY5162-40% grafit	en el solvent	2	1	-	15-20 dies	-	1	-
	sec	2	1	-	1	-	1	-
Poliéster	en el solvent	-	-	-	-	-	-	-
	sec	-	-	-	-	-	-	-
Poliuretà	en el solvent	-	-	-	-	-	-	-
	sec	-	-	-	-	-	-	-
Silicona	en el solvent	2	1	-	1	-	-	-
	sec	2	1	-	1	-	-	-
Araldite-GY250/HY943-60% grafit	en el solvent	-	2	-	2	-	-	2
	sec	-	2	-	2	-	-	2
Araldite-PY302-2 / HY-943-60% grafit	en el solvent	-	2	-	2	-	-	2
	sec	-	2	-	2	-	-	2
Araldite-GY250 / HY-956 -50% grafit	en el solvent	-	-	-	-	-	-	-
	sec	-	-	-	-	-	-	-
Araldite-GY250 / HY-850/830-60% grafit	en el solvent	-	-	-	-	-	-	-
	sec	-	-	-	-	-	-	-
Araldite-PY302-2 / HY-850/830-60% grafit	en el solvent	-	-	-	-	-	-	-
	sec	-	-	-	-	-	-	-

En canvi, en els sistemes compòsit-solvent on el compòsit no és estable les imatges obtingudes per SEM mostraven la formació de zones aïllants en la superfície del compòsit, les quals es van atribuir a l'extracció de components del polímer per part del solvent. En aquests casos també es va observar la formació de clivells macroscòpiques, les quals van ser visibles a simple vista. Aquestes esquerdes són el resultat de l'evident inflament del compòsit en ser sotmès a contacte amb aquests solvents. Aquestes observacions expliquen la desintegració dels compòsits en sotmetre'ls a contacte amb solvents tals com cloroform o tetrahidrofurà, o la pèrdua de senyal electroanalític en el cas d'altres solvents, com és el cas de l'Araldite-CW2215/HY5162 – 40% grafit en metanol.

[d] També es va comprovar al present treball una elevada reproductibilitat en polir els elèctrodes basats en aquests materials compòsits conductors rígids. Per tant, aquests materials permeten la renovació de la superfície mitjançant un simple procés de polit, cosa que proporciona avantatges clars de cara a la construcció de sensors electroquímics ja que permetrà renovar la superfície sensora sense haver de realitzar la immobilització dels modificadors cada cop que calgui polir l'elèctrode. Però no només això, sinó que la immobilització dels modificadors es realitza per atrapament a la matriu polimèrica, de forma que aquests materials no pateixen canvis en la seva estructura, i a més es simplifica el procés de construcció dels sensors.

[e] Altres avantatges de la utilització d'aquests materials va ser una major relació senyal soroll que emprant un elèctrode de grafit pur, o fins i tot comparat amb un elèctrode de carboni vitrificat. Aquesta característica constitueix un gran avantatge en la realització d'anàlisis amperomètriques, ja que permet assolir límits de detecció més baixos. Una possible explicació per aquest fenomen seria assumir que la superfície dels compòsits està formada per una mescla de zones conductores i de zones aïllants, similar a un feix de microelèctrodes.

[f] Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, es va investigar l'estructura d'aquests materials des d'un punt de vista electroquímic. Mitjançant voltamperometria cíclica es va veure que la superfície activa d'aquests compòsits és inferior a la seva superfície geomètrica. No només això, sinó que es va obtenir estat estacionari escombrant a una velocitat relativament elevada, de $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, la qual cosa només és possible emprant microelèctrodes. Per últim, es va veure mitjançant les gràfiques de Cottrell, on es va representar el logaritme de la intensitat de corrent de pic anòdic respecte el logaritme de la velocitat d'escombrat, que no s'obtenien regressions lineals amb pendent 0.5, contràriament al que prediu l'equació de Randles-Sevcic per macroelèctrodes de superfície contínua. Per altra banda es van realitzar cronoamperograms, els quals tampoc es van ajustar a l'equació de Cottrell, sinó que van resultar qualitativament comparables al que prediu el model de Sharifker per feixos de microdiscs amb solapament entre ells. Tots aquests resultats es poden explicar considerant que la superfície dels compòsits no és contínua, sinó que realment està formada per microzones electroactives mesclades amb microzones inertes, de forma que a temps curts es té una difusió individualment cap a cada microzona electroactiva.

[g] També es va realitzar la mesura de les resistències dels compòsits i de les resistències de cel·la, així com la mesura de la capacitat i de la constant de cel·la per aquests compòsits. Es va veure que les resistències obtingudes són superiors que per un elèctrode metàl·lic o de carboni vitrificat, i les constants de cel·la obtingudes van ser força elevades, de manera que aquests compòsits en forma de macroelèctrodes no són ideals per realitzar mesures d'alta velocitat, com ara mesures de constants cinètiques, ja que per una banda les constants de cel·la no permetran realitzar mesures a temps inferiors als microsegons, i les resistències generaran elevades distorsions en els voltamperogrames cíclics realitzats a velocitats elevades. Tot i així, aquests resultats no invaliden els compòsits com a materials transductors per la construcció de sensors químics, ja que les mesures requerides per realitzar anàlisis amperomètriques es fan a temps molt superiors als microsegons. Es va veure que les dades cronoamperomètriques obtingudes en absència de ferrocè no es van poder ajustar a l'equació estàndard emprada amb elèctrodes de superfície homogèniament activa ($\ln i = f(t)$, equació (4.4.1-1)), cosa que suggereix que es té una mescla de microzones electroactives de manera que el valor obtingut per la capacitat va ser la mitjana dels valors de les capacitats de cada microzona, resultat que abona, un cop més, la hipòtesis d'una estructura de feix de microelèctrodes.

[h] Totes aquestes dades recolzen clarament la hipòtesi que els compòsits presenten una estructura similar a un feix de microelèctrodes de formes i mides irregulars i distribuïts a l'atzar. Però la prova conclouent es va obtenir mitjançant tècniques microscòpiques. Imatges obtingudes mitjançant SEM mostren que la superfície dels compòsits està formada per una mescla de polímer i de grafit i en tots els casos es pot distingir clarament entre aquests dos components, tot i que cada compòsit va presentar una estructura pròpia, degut al tipus de polimerització de cada tipus de material polimèric. Tot i així, aquestes imatges no donen informació de quines partícules de grafit són electroactives i quines no ho són. Aquesta informació, però, es va obtenir emprant microscopia electroquímica (SECM), la qual va permetre obtenir imatges de la superfície dels compòsits on les zones electroactives apareixen en un color diferent a les zones aïllants. Aquesta tècnica, doncs, aporta la prova conclouent necessària per poder afirmar que la hipòtesi d'una estructura similar a un feix de microelèctrodes és apropiada per explicar els resultats obtinguts amb els compòsits, i especialment justifica les elevades relacions senyal/soroll obtingudes al llarg dels calibrats, característica que resulta un gran avantatge especialment en el desenvolupament de sensors químics amperomètrics.

[i] Donades les avantatjoses característiques dels compòsits com a macroelèctrodes, es va decidir construir microelèctrodes basats en aquests materials per tal d'estudiar el seu comportament quan la superfície exposada ja és de l'ordre dels micròmetres. Així, es van construir microelèctrodes de 25 μm de diàmetre emprant grafit de 2 μm de mida de partícula. Es van seleccionar els compòsits basats en Araldite-M/HY5162 i en Araldite-PY302-2/HY943 per ser estudiats en acetonitril i metanol. L'Araldite-M/HY5162 es va escollir per la seva elevada estabilitat en acetonitril, mentre que l'Araldite-PY302-2/HY943 es va escollir degut a la seva bona estabilitat en hexà, tot i que per motius

esmentats al capítol 6 es va estudiar en metanol. La composició dels compòsits es va tornar a optimitzar per grafit de 2 µm de mida de partícula per aquests dos compòsits.

[j] Un cop escollides les composicions, es van realitzar voltamperogrames cíclics a diferents velocitats i es van comparar amb els obtinguts amb un microelèctrode de platí del mateix diàmetre. Es va estudiar l'obtenció d'estat estacionari, es van confeccionar gràfiques de Cottrell, i es van mesurar les superfícies actives. En tots dos casos es va veure que els compòsits no presentaven un comportament significativament diferent del d'un microelèctrode de superfície contínua, i la seva superfície activa no va ser significativament inferior a la seva superfície geomètrica. Per altra banda, es van realitzar cronoamperogrames en presència de ferroçè, i es va veure que les dades seguien l'equació de Cottrell.

Contràriament, però, es va veure que les dades cronoamperomètriques en absència de ferroçè no es podien ajustar a l'esmentada equació (4.4.1-1). Per tant, el valor de les capacitats, les constants de cel·la i les resistències de cel·la es van haver d'obtenir mitjançant el mateix mètode aproximat que es va utilitzar amb els macroelèctrodes (el qual s'explicà detalladament al capítol 4). Un possible motiu per aquesta manca de correlació amb l'equació teòrica podria ser que la superfície dels microelèctrodes està, de fet, composta per una mescla d'ultramicrozones electroactives i d'ultramicrozones aïllants, però aquestes estan tan properes entre si que l'escala de temps en la qual es van realitzar els cronoamperogrames en presència de ferroçè i els voltamperogrames cíclics és massa gran com per tenir difusió independent cap a cada microzona individualment. De fet, les imatges obtingudes per microscòpia electrònica mostren una estructura similar a la dels macroelèctrodes, on es poden distingir les partícules de grafit del polímer. Però, tal com s'ha dit a paràgrafs anteriors, SEM no és una tècnica que permeti determinar quines zones són electroactives i quines no ho són, per tant no és una prova determinant de l'existència d'aquesta estructura complexa observada amb els macroelèctrodes basats en aquests compòsits.

Per tant, els resultats obtinguts mitjançant voltamperometria cíclica i cronoamperometria no demostren l'existència d'una superfície composta per una mescla d'ultramicrozones conductores i aïllants, però els cronoamperogrames en absència de ferroçè i les imatges obtingudes per SEM semblen indicar que de fet existeix una estructura semblant a un feix d'ultramicroelèctrodes, però aquests segurament es troben massa propers com perquè les capes de difusió siguin independents a les escales de temps dels voltamperogrames cíclics i dels cronoamperogrames en presència de ferroçè i per tant únicament s'observa difusió cap a la totalitat de la superfície, com si tant les zones conductores com les aïllants fossin conductores.

[k] Es va estudiar la capacitat d'aquests microelèctrodes de realitzar mesures cinètiques. Es va veure, però, que els voltamperogrames cíclics realitzats a velocitats superiors al 500 V·s⁻¹ mostraven grans distorsions que generaven errors molt elevats en la mesura de la intensitat de pic. Aquestes distorsions es deuen a les elevades resistències de cel·la obtingudes per als microelèctrodes basats en els compòsits. A més, es van obtenir valors per la constant de cel·la força elevats, de manera

que no es podran realitzar mesures a temps prou curts com per fer estudis cinètics o mecanístics. Tot i així, mitjançant simulacions de voltamperogrames cíclics realitzats a velocitats d'escombrat inferiors a $100 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$, on les distorsions degudes a efectes òhmics són baixes, s'ha pogut realitzar una estimació del valor de la constant de transferència heterogènia de càrrega del ferroç, k^0 , el qual va ser només un ordre de magnitud inferior al valor obtingut per aquesta constant emprant un microelèctrode de carboni vitrificat de $6 \mu\text{m}$ de radi en acetonitril. El valor obtingut amb els compòsits per k_0 és únicament una estimació del valor mínim que cal esperar per aquesta constant, ja que la caiguda òhmica en aquestes mesures té un efecte no negligible que no es va tenir en compte, però permet afirmar que la transferència heterogènia de càrrega es produeix a velocitats només lleugerament inferiors a materials utilitzats normalment en estudis electroquímics, tals com la fibra de carboni.

[l] La utilitat d'aquests microelèctrodes com a sensors també va ser estudiada mitjançant la realització de corbes de calibrat sense polir i polint. Es va obtenir bona reproductibilitat dels resultats sense polir les superfícies d'aquests materials, la qual cosa implica que es produeix una passivació negligible de les superfícies, cosa que contrasta amb la fàcil passivació de materials tals com platí, posant els compòsits com a materials preferibles per a realitzar estudis analítics on el mediador és ferroç. També es va obtenir bona reproductibilitat dels resultats polint aquests microelèctrodes, de la mateixa manera que es va obtenir amb els macroelèctrodes, de manera que es pot afirmar que les superfícies presenten característiques similars fins i tot quan les seves dimensions són de l'ordre dels micròmetres, i per tant aquests microelèctrodes es podran modificar en tot el seu volum, fent possible la renovació de la superfície mitjançant un simple procés de polir. Per últim, cal destacar l'obtenció de nivells de soroll més baixos, cosa que permet obtenir límits inferiors de resposta lineal un ordre de magnitud més baixos que per als macroelèctrodes basats en aquests mateixos materials.

[m] També, es van realitzar voltamperogrames cíclics, calibrats i cronoamperogrames en absència d'electròlit suport emprant aquests microelèctrodes. Es va veure que els efectes de la migració són importants quan el ferroç s'ha oxidat a ferroçeni, el qual està carregat positivament i per tant farà que el pic de reducció tingui una notable contribució del corrent de migració. Els corrents migratoris, però, seran negligibles quan es monitoritzi la concentració de molècules neutres, tals com el ferroç. Es van estudiar els voltamperogrames cíclics obtinguts amb els microelèctrode basat en Araldite-PY302-2/HY943 – 60% grafit en hexà pur, però es va veure que aquest solvent és excessivament resistiu com per poder obtenir una resposta significativament superior al soroll de fons, és a dir, el radi d'aquest microelèctrode és massa gran com per realitzar mesures en un medi tan resistiu, i per tant, caldrà augmentar la constant dielèctrica del medi. Per tal d'aconseguir-ho es van preparar mescles binàries hexà:etanol, de manera que es va veure que a mida que la concentració d'etanol augmentava, la resposta millorava, obtenint-se cada cop menys distorsions degudes a efectes òhmics. Tot i així, la qualitat de la resposta és molt pobre, per tant per tal d'utilitzar hexà com a medi analític en absència d'electròlit suport caldrà construir microelèctrodes de radis més petits.

Tal com es va veure amb els cronoamperogrames obtinguts amb aquests microelèctrodes en presència de ferrocè i d'electròlit suport, en absència d'electròlit suport també es va obtenir una resposta típica d'un elèctrode de superfície contínua, de manera que els resultats s'ajusten a l'equació de Cottrell. Es van obtenir valors per les capacitats inferiors als obtinguts en presència d'electròlit suport i resistències de cel·la superiors, tal com es podia preveure degut a la dràstica disminució de la concentració d'ions al medi. Les constants de cel·la són comparables a les obtingudes en presència d'electròlit suport.

Finalment es van realitzar corbes de calibrat, obtenint-se valors per als límits inferiors i superiors de resposta lineal comparables als obtinguts en presència d'electròlit suport. Per tant, la realització de corbes de calibrat en absència d'electròlit suport és factible emprant aquests microelèctrodes.

Per tant, la utilització de microelèctrodes basats en materials compòsits conductors rígids presenten com a avantatges per sobre dels macroelèctrodes també basats en aquests materials la possibilitat de ser utilitzats en mostres de mida més petita o inclús per anàlisi *in vivo*, així com l'obtenció de límits inferiors de resposta lineal més baixos, i també la possibilitat de realitzar anàlisis en medis altament resistius en absència d'electròlit suport, fent possible l'aplicació d'aquests microelèctrodes per exemple com a detectors cromatogràfics de fase normal, on l'eluent és un solvent orgànic, poc conductor i sense electròlit suport.

[n] Per últim, es va estudiar una possible aplicació dels compòsits en la construcció de biosensors. Es va utilitzar el compòsit d'Araldite-M/HY5162 – 60% grafit en acetonitril. El transductor es va modificar amb un 3 % en pes d'enzim peroxidasa de rave picant (HRP). Es van realitzar voltamperogrames cíclics en presència de peròxid de lauroïl amb el biosensor i amb el transductor sol, obtenint-se una reducció del valor absolut del potencial de reducció al qual es detecta el peròxid de lauroïl quan s'empra el biosensor.

També es van realitzar calibrats sense polir el biosensor i polint-lo. Es va obtenir bona reproductibilitat dels calibrats realitzats amb la mateixa superfície, excepte el primer calibrat, el qual va mostrar intensitats superiors als altres. Un possible motiu per aquest fenomen és que el percentatge d'enzim és massa elevat i hi ha una certa quantitat que no queda ben atrapada a la matriu polimèrica, de manera que al llarg del primer calibrat es perd aquest excés d'enzim, mentre que als calibrats següents l'enzim que queda es troba ben atrapat al compòsit i no es produeixen pèrdues. També es va obtenir bona reproductibilitat en polir el biosensor, cosa que confirma una bona homogeneïtat del material biocompòsit fent possible la renovació de la superfície sensora mitjançant un simple procés de polit.

Tot i els bons resultats obtinguts amb aquest biosensor, es va veure que no va ser possible reproduir els resultats. Al llarg del present treball no es tenen suficients dades com per donar el motiu d'aquesta manca de reproductibilitat a l'hora de construir el biosensor, però una possible hipòtesi que es suggereix és que no sempre es produeix una transferència electrònica directa entre l'enzim i el

grafit. Per tant, en treballs futurs caldrà treballar en aquest punt potser emprant mediadors afegits al medi d'anàlisi o immobilitzats al biocompòsit, o potser immobilitzant l'enzim a les partícules de grafit abans d'immobilitzar el grafit al polímer.

[o] Així doncs, en resum, es pot concloure que s'han desenvolupat amb èxit nous materials compòsits conductors rígids de dispersió que són estables electroquímicament en certs solvents orgànics. Aquests materials presenten característiques electroquímiques pròpies de feixos de microelèctrodes, cosa que afavoreix la relació senyal/soroll a l'hora de realitzar anàlisis amperomètriques emprant aquests dispositius. També es va aconseguir construir microelèctrodes basats en aquests materials els quals no es van comportar clarament com un feix d'ultramicroelèctrodes, tot i que van presentar certes característiques que suggereixen que la seva superfície no és simplement contínua. A més, es van aplicar aquests microelèctrodes en solvents en absència d'electròlit suport, obtenint-se resultats que confirmen la possible aplicabilitat d'aquests microelèctrodes com a sensors analítics en medis resistius sense electròlit suport. Per últim, es va demostrar la viabilitat de construir biosensors enzimàtics emprant aquests materials per ser aplicats a solvents orgànics.