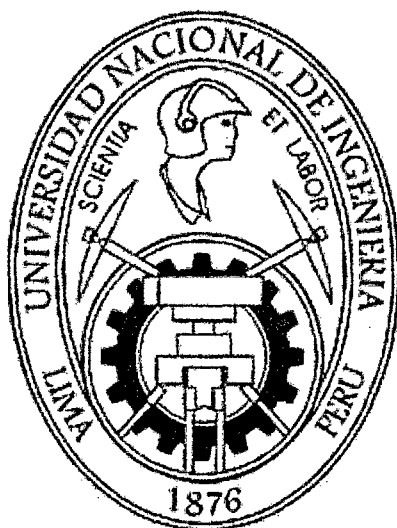


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA**



**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN QUÍMICA**

**TITULADA:**

**ELECTRODOS IMPRESOS MODIFICADOS CON MONOCAPAS  
AUTOENSAMBLADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE  
METRONIDAZOL EN MUESTRAS REALES.**

**PRESENTADA POR:**

**BRYAN CARLOS HUAYHUAS CHIPANA**

**ASESOR:**

**JUAN CARLOS MORALES GOMERO**

**LIMA-PERU**

**2015**

**Digitalizado por:**

**Consortio Digital del  
Conocimiento MebLatam,  
Hemisferio y Dalse**

## DEDICATORIA

*A mis Padres, Bruno y Fidelia, por todo el gran amor,  
confianza y por ser mi inspiración en cada etapa de mi vida,*

*A mis hermanos, Maritza y Freddy, por el amor,  
paciencia y el gran apoyo incondicional.*

*Dedico también a toda mi familia, por los consejos y el cariño,*

*A mis amigos y mis profesores.*

## RESUMEN

El presente trabajo se enfoca en el estudio de sensores para determinar compuestos nitroimidazolicos (secnidazol, metronidazol, etc.), esto surge ante la necesidad de desarrollar pequeños dispositivos de análisis que sean baratos, portátiles, fiables, selectivos, de fácil manejo y que requieran de pocos microlitros de muestra para determinar un parámetro concreto.

Los sensores son basados en monocapas de cisteína sobre electrodos de oro nanoestructurados, cuyo procedimiento de nanoestructuración fue realizado por anodización a 2.0 V por 180 s, posteriormente reducido por Voltametría lineal entre potenciales de 2 - 0.2 V con velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup>. Se activó la superficie de oro de manera que se obtuvo mayores áreas superficiales. Posteriormente, fue modificado mediante la inmersión en una solución de cisteína. Asimismo, se realizó un estudio para mejorar la impregnación de la cisteína en la superficie del electrodo de oro para la formación de las monocapas autoensambladas (SAM's).

A partir de la optimización de parámetros, como tiempo de inmersión de cisteína (10 minutos) y concentración de cisteína 1mM para la formación de monocapas sobre oro, pH 2 y electrolito soporte (Tampón Briton-Robinson 0.1 M) en los ensayos de metronidazol, fueron escogidos para obtener el mejor desempeño del sensor. La respuesta del sensor fue evaluada en una celda por Voltametría de Onda Cuadrada (SQV) obteniendo límites de detección y de cuantificación de 2.6 μmol L<sup>-1</sup> e 8.6 μmol L<sup>-1</sup> respectivamente. Fue realizado un estudio de selectividad en presencia de secnidazol, metronidazol, o-nitrofenol, 1cloro-2,4-dinitrobenzeno, ranitidina, lidocaína y diclofenaco mostrando una alta selectividad para los compuestos que contienen grupos nitroimidazol. En la aplicación del sensor, fue realizado por triplicado la determinación de metronidazol en medicamentos y plasma obteniéndose un error de 98.1% (RSD=1.5) para medicamentos y una recuperación mayor a 89% (RSD=0.8) para muestras biológicas. La respuesta del sensor indica ser viable para la detección de fármacos en diferentes tipos de matrices

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| OBJETIVOS   | 6  |
| INTRODUCCIÓN  | 8  |
| MARCO TEÓRICO                                       | 10 |
| Nitroimidazoles                                     | 11 |
| Mecanismo de acción de los nitroimidazoles          | 11 |
| Estudio electroquímico de los nitroimidazoles       | 13 |
| Efectos sobre el ADN del metronidazol               | 15 |
| Efectos mutagénicos y cancerogénicos                | 15 |
| Sensores  |    |
| Antecedentes  | 16 |
| Clasificación de sensores según tipo de transductor | 17 |
| Monocapas autoensambladas                           | 18 |
| Antecedentes  | 18 |
| Definición  | 19 |
| Escena en los últimos años                          | 19 |
| Comportamiento electroquímico de las SAM's          | 21 |
| Defectos de las SAM's                               | 22 |
| Transferencia de carga en las SAM's                 | 23 |
| Algunos criterios en la formación de SAM's          | 27 |
| Aplicación de las SAM's                             | 28 |
| Electrodos serigrafiados                            | 30 |
| PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL                          |    |
| Reactivos y soluciones                              | 33 |
| Plan experimental                                   | 34 |
| Preparación del sensor                              | 34 |
| Activación de la superficie de oro                  | 34 |
| Formación de la monocapa autoensamblada de cisteína | 35 |
| Ensayos y testes del sensor (Au-Cys)                | 35 |

|  |    |
|--|----|
| Preparación de las muestras de metronidazol                      | 35 |
| Técnicas para la caracterización del sensor                      | 36 |
| Microscopia electrónica de barrido                               | 36 |
| Microscopia de fuerza atómica                                    | 36 |
| Voltamperometría   | 36 |
| Voltametría de Onda Cuadrada                                     | 37 |
| Cronoamperometría  | 38 |
| Voltametría cíclica  | 40 |
| RESULTADOS Y DISCUSIONES   |    |
| Estudio del electrodo de oro                                     | 44 |
| Caracterización morfológica del oro                              | 47 |
| Formación de monocapas autoensambladas Au-Cisteína               | 54 |
| Estudio de la monocapa autoensamblada Au-Cisteína por impedancia | 58 |
| Estudio de la variación del pH                                   | 60 |
| Cuantificación del metronidazol                                  | 61 |
| Aplicación: Determinación de metronidazol en muestras reales     | 62 |
| CONCLUSIONES   | 66 |
| Referencias  | 65 |
| Anexos   | 72 |

# **CAPITULO I**

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar superficies nanoestructuradas de oro.
- Desarrollar un sensor basado en monocapas autoensambladas de tioles sobre electrodo de oro nanoestructurado.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Determinar los factores (tiempo de incubación, concentración del tiol, tipo de tiol) que brindan una mejor formación de monocapas autoensambladas de grupos tiolatos sobre el electrodo de oro.
- ✓ Caracterizar las monocapas autoensambladas (SAM) mediante Voltametría cíclica, microscopía de fuerza atómica y microscopia electrónica de barrido para detectar la estructura morfológica y electrocatalítica del sensor.
- ✓ Determinar metronidazol en medicamentos genéricos y en muestras biológicas (plasma y orina).

# **CAPITULO II**

## **INTRODUCCION**



La detección del oro con buena área superficial es de gran interés debido a su amplia aplicación como catalizadores, sensores y actuadores [1-3]. Comparando con el método de adsorción, el electrodo de oro nano estructurado es el que obtiene una mayor área superficial y el mejor transporte de electrones los cuales guiarían a analizar iones en trazas. La estructura rugosa del electrodo de oro ofrece un gran número de sitios de adsorción de las proteínas y enzimas, lo que hace al oro nanoestructurado muy atractivo en biosensores. Se reportó que el oro nano estructurado puede prepararse eficientemente por electrodeposición. [4]

Existen varios trabajos [5-8] que han usado a aleaciones de Au-Ag como materiales de partida para hacer electrodos de oro nanoestructurado haciendo fundir el oro con la plata para su posterior separación.

El oro, como metal noble, apenas reacciona con el medio que lo rodea, presenta una gran capacidad de funcionalización con agentes químicos o biológicos a través de los fuertes enlaces que forma con los grupos tiol.

El metronidazol tiene una marcada actividad contra bacterias anaerobias y protozoos [9]. Dado que los intermedios formados durante la reducción de metronidazol puede matar la mayoría de las bacterias anaeróbicas, el metronidazol se utiliza a menudo para el tratamiento de tricomoniasis y giardiasis [10]. Sin embargo, un creciente número de estudios han mostrado que la citotoxicidad de metronidazol permite que sea útil en el tratamiento de enfermedades, además hacen que sea peligroso para la salud de los seres humanos y la vida silvestre.

# **CAPITULO III**

**MARCO TEORICO**

## NITROIMIDAZOLES

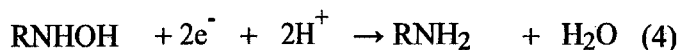
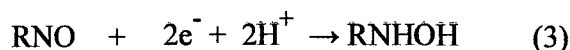
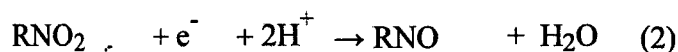
Los compuestos nitroimidazólicos presentan un espectro particular de actividad biológica con aplicaciones, su uso como drogas radios sensibilizadoras y drogas antibacterianas o antiprotozoarias. Su uso como radios sensibilizadores aprovecha su característica de citotoxicidad en células mamíferas hipóxicas, lo que permite aumentar la sensibilidad a la radiación de los tumores cancerígenos [11,12]. Su característica antimicrobiana aprovecha su toxicidad selectiva hacia microorganismos anaeróbicos y permite que estos compuestos sean usados extensamente en el tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en la terapéutica humana como animal [13]. No obstante la genotoxicidad mostrada por estos compuestos, que les hace tan útiles en el tratamiento de infecciones microbianas, se puede manifestar también contra las mismas células sanas del organismo; así algunos estudios en animales relacionan el uso de estos compuestos con un descenso en la tasa de fertilidad [14] y otros estudios les atribuyen propiedades mutagénicas y cancerígenas [15-17].

### MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS NITROIMIDAZOLES

<  
La acción antimicrobiana de los compuestos nitroimidazólicos es producida dentro de los microorganismos patógenos debido a que algunas formas reducidas del grupo nitro interactúan con el DNA del microorganismo causándole daño estructural e impidiendo su reproducción. En consecuencia, resulta vital para el mecanismo de acción que los microorganismos tengan un sistema enzimático capaz de reducir el grupo nitro. La reducción de estos compuestos nitroimidazólicos puede ser producida por dos rutas diferentes de acuerdo a si las condiciones del medio son aeróbicas o anaeróbicas [14], sin embargo, ambas rutas comparten una primera etapa común que corresponde a la reducción monoelectrónica del grupo nitro para formar el anión radical nitro de acuerdo a:



Bajo condiciones anaeróbicas, el anión radical nitro ( $\text{RNO}_2^{\cdot -}$ ) formado inicialmente puede seguir reduciéndose hasta formar los productos de reducción: derivado nitroso ( $\text{RNO}$ ), derivado hidroxilamina ( $\text{RNHOH}$ ) y derivado amina ( $\text{RNH}_2$ ) de acuerdo a las siguientes reacciones de transferencia electrónica:



Por otra parte, bajo condiciones aeróbicas, el anión radical nitro formado sería re-oxidado por oxígeno para producir superóxido y regenerar el nitro derivado inicial provocando el llamado “ciclo fútil” [18,19]:



Posteriormente el anión superóxido podrá generar otras especies reactivas de oxígeno como radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, etc.

En definitiva, la reducción del grupo nitro juega un rol crucial en el mecanismo de acción biológica de los compuestos nitroimidazólicos y consecuentemente el conocimiento de su comportamiento REDOX es de trascendental importancia debido a que su química radicalaria es determinante para su uso en medicina.

Las propiedades prototrópicas y los tiempos de vida media de los aniones radicales nitro han sido estudiados principalmente usando técnicas como la resonancia de Spin Electrónico y la Radiólisis de Pulso [20,21], sin embargo, técnicas electroquímicas como la Voltamperometría Cíclica han demostrado jugar un rol ventajoso en el estudio de estos radicales [22-27]. Bajo condiciones adecuadas del medio, la reducción monoelectrónica de nitro a anión radical nitro produce voltamperogramas cíclicos muy bien resueltos debidos al par redox  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2\cdot$ . En consecuencia, usando apropiadamente la versatilidad de la técnica de Voltamperometría Cíclica es posible estudiar la factibilidad de formación del anión radical nitro [22] así como su comportamiento prototrópico [23], sus tiempos de vida media naturales [24,25] y su reactividad con otras moléculas [26,27].

Dentro de los derivados nitroimidazólicos se distinguen los derivados 2, 4 y 5-nitroimidazólicos de acuerdo a la posición del sustituyente nitro en el anillo imidazólico. En el siguiente esquema se muestran sus estructuras.

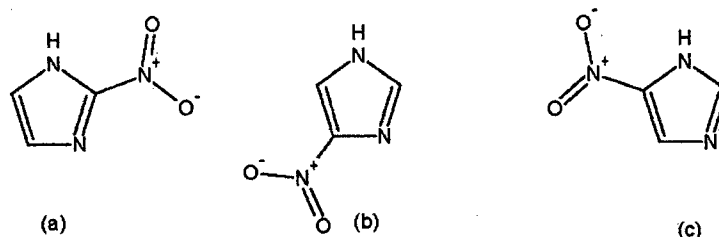


Figura 1: Estructura de los nitroimidazoles

Desde el punto de vista de su actividad biológica se encuentra descrito que los derivados 2-nitroimidazólicos son empleados preferentemente como radio sensibilizadores, mientras que los derivados 5-nitroimidazólicos son más usados por su toxicidad hacia microorganismos y los derivados 4-nitroimidazólicos son relativamente más inertes biológicamente (28).

#### ESTUDIOS ELECTROQUÍMICOS DE LOS NITROIMIDAZOLES

Hay numerosos estudios apuntando a aspectos electroquímicos de los compuestos nitroimidazólicos. Sin embargo, en su mayoría, estos trabajos están enfocados a la determinación electroanalítica de algunos 5-nitroimidazoles de importancia en medicina tales como: metronidazol [29], ornidazol [30], secnidazol [31] tinidazol [32] y megazol [33]. Además se ha usado la técnica de Voltamperometría Cíclica en el estudio de los aniones radicales nitrogenerados desde 5-nitroimidazoles tales como misonidazol, metronidazol y megazol [34-38]. Principalmente en estos últimos estudios se demuestra la utilidad de la Voltamperometría Cíclica (VC) para el estudio de la formación y estabilidad de los aniones radicales generados. En principio, en medio mixto a pH básico, así como en medio totalmente no acuoso, es posible obtener una respuesta reversible que da cuenta de la transferencia monoelectrónica. En el caso del estudio electroquímico de derivados del 4-nitroimidazol estos son mucho más escasos y el primer trabajo registrado data de los años 80 por el grupo de Vianello [39]. En ese trabajo se revisó el comportamiento polarográfico, ciclovolamétrico y EPC-culombimétrico del 4-nitroimidazol sólo en medio aprótico. Mediante VC se encontró dos picos de reducción. El primer pico fue irreversible hasta una velocidad de 250 V/s mientras que el segundo resultó ser reversible aún a bajas velocidades de barrido. El primer pico irreversible fue atribuido a la siguiente reacción global [39]:

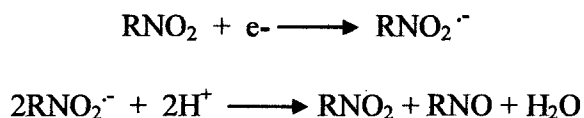


Y el segundo pico reversible se atribuyó a la siguiente reacción de reducción que genera un radical dianión nitro



Además, en ese estudio se informó que el par  $\text{RNO}_2/\text{RNO}_2^-$  no pudo ser aislado debido al rápido decaimiento del  $\text{RNO}_2^-$  producto de una rápida reacción de protonación por el protón ácido del 4-nitroimidazol inicial (reacción padre-hijo) generando la base conjugada  $(\text{RNO}_2)^-$  y el radical neutro  $\text{RNO}_2\text{H}^\cdot$ .

En virtud de la escasez de investigación electroquímica básica sobre 4-nitroimidazol, un grupo realizó un exhaustivo estudio acerca del comportamiento electroquímico de este compuesto en medio prótico en una amplia escala de pH [40]. Los resultados en medio prótico fueron sustancialmente diferentes a los descritos anteriormente por Vianello en medio aprótico, ya que mostraron que la reducción del 4-nitroimidazol, en medio prótico a pH básicos, produjo un anión radical nitro estable dentro de la escala de tiempo de la Voltamperometría Cíclica, lo que no había sido posible en medio aprótico. Ese resultado resultó sorprendente y paradójico ya que lo esperable es que el anión radical nitro sea más estable en medio aprótico que en prótico y no como muestran estos resultados. En el medio prótico estudiado el anión radical nitro decayó de acuerdo a una reacción de 2º orden (disproporcionación) de tal manera que la reducción monoelectrónica del 4-nitroimidazol y el posterior decaimiento del anión radical siguieron un esquema  $\text{EC}_2$  de acuerdo a:



Específicamente, para el estudio de los mecanismos electroquímicos de los compuestos nitroimidazólicos se utiliza fundamentalmente la técnica de Voltamperometría cíclica que se muestra muy adecuada para el estudio de procesos electroquímicos donde aparecen reacciones químicas acopladas a la transferencia electrónica

Existen 2 grupos de Nitroimidazoles: los 5-nitro y los 2-nitroimidazoles. Solamente los 5-nitroderivados son útiles como antibacterianos y antiparasitarios, mencionado anteriormente, mientras que ambos grupos potencian el efecto de las radiaciones sobre tumores de centro necrótico. (anóxicos).

El Metronidazol es la droga patrón de los 5-nitroimidazoles y con la que se tiene la mayor experiencia clínica, se ha usado contra bacterias anaerobias y protozoos.

#### **Efectos sobre el ADN del metronidazol**

El Metronidazol tiene efecto bactericida, lo que parece no ser debido a la interrupción en la producción de energía, pues al finalizar la reducción del fármaco la liberación de H<sub>2</sub> se reestablece y las bacterias no pierden vitalidad. Los derivados reducidos actúan sobre las moléculas de ADN produciendo hipercromaticidad, disminución de la viscosidad y del peso molecular, incremento del número de hebras simples de la molécula de ADN y, además, inhiben a la ADNasa 1 (enzima que cataliza la reparación del ADN fragmentado). El conjunto de estas evidencias señala una extensa ruptura no reparable del ADN y este parece ser el mecanismo del efecto bactericida.

#### **Efectos mutagénicos y carcinogénicos**

El mecanismo de acción del Metronidazol explica que sea mutagénico en bacterias y que den positivas las pruebas de mutagénesis utilizadas para detectar sustancias carcinogénicas. Además, se ha observado un efecto cancerígeno en dosis altas y prolongadas en animales de experimentación. Se menciona su actividad sobre células tumorales humanas en anaerobiosis. Todos estos hechos apuntan hacia una potencialidad carcinogénica en humanos. Sin embargo, a pesar de estar en uso por más de 30 años, no ha sido posible detectar este efecto en humanos, aunque es difícil descartarlo.

En la búsqueda de dispositivos baratos para la determinación de metronidazol, surgen los sensores que han sido desenvueltos de forma mayoritaria debido a las ventajas que será descrito a continuación.

## **SENSORES**

### **Antecedentes**

El crecimiento interés por realizar análisis de forma rápida y económica, así como optimizar la producción mediante análisis en continuo, ha dirigido la investigación hacia la puesta a punto de métodos analíticos que sean compatibles con las necesidades.

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que puede ser procesada y, por lo tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos [11]

Estas características, combinadas con la incorporación de los últimos avances en tecnologías de miniaturización en la fabricación masiva de sensores, hacen de estos dispositivos de herramientas de gran interés en la industria.

Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que sean capaces de transformar [42]:

- Físicos: Dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.)
- Químicos: detectan cambios de pH, concentración, composición, etc.

Actualmente, la mayor parte de sensores utilizados para el control de procesos industriales son físicos [43], pero la necesidad de obtener información química ha favorecido la investigación y el desarrollo de este tipo de sensores.

Desde que se describieron los primeros sensores químicos a principios del siglo XX [44-45], estos dispositivos han dado lugar a una gran producción científica. Sin embargo, su aplicación es muy limitada ya que su fabricación se suele realizar manualmente, y por lo tanto lleva asociado un elevado coste.

De esta manera, se pone en manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos métodos de fabricación de sensores químicos que permitan una producción automatizada, reduciendo los costes de producción, y poder aprovechar así la potencialidad analítica que tienen estos dispositivos.



### **Clasificación de Sensores según el tipo de transductor**

La clasificación de los sensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, siendo esta la más aceptada [46]. En la tabla 1 se recogen los distintos tipos de sensores y biosensores según este criterio.

**Tabla N°1:** Clasificación de sensores según el tipo de transductor

| <b>TIPOS DE TRANSDUCTORES</b> | <b>DESCRIPCIÓN</b>   |
|-------------------------------|--|
| <b>Ópticos</b>                | Transforman los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor                                  |
| <b>Electroquímicos</b>        | La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.  |
| <b>Piezoeléctricos</b>        | Dispositivos que transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoelectrónicos. |
| <b>Térmicos</b>               | Dispositivos capaces de medir cambio de calor sobre la superficie del electrodo  |

Para preparar los sensores se procederá a la modificación en electrodos de oro con el fin de que presenten selectividad para detectar metronidazol. Una de los métodos para modificar superficies es por la formación de monocapas autoensambladas.

## MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS (SAM's)

### Antecedentes

En años recientes, el diseño y construcción de materiales con superficies caracterizadas por un arreglo ordenado y compacto de grupos funcionales orgánicos ha sido de los objetivos de diversos grupos de investigación alrededor del mundo [47,48]. La importancia del desarrollo de protocolos para la preparación de este tipo de superficies es evidente cuando se consideran las numerosas aplicaciones, que tanto a nivel tecnológico como fundamental, pueden imaginarse y que hasta cierto punto, ya han comenzado a ser explotadas [49-51]. Entre estas, la investigación de reacciones orgánicas superficiales [52]

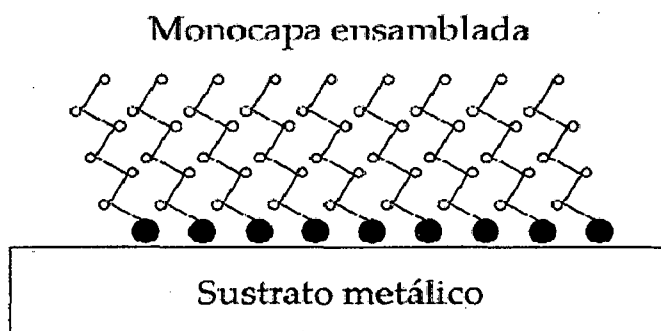


Figura 2: Esquema de una Monocapa Autoensamblada (Fuente: ref. 53)

Existen dos métodos más comunes a la hora de preparar una monocapa son: el método de Langmuir-Blodgett (LB) y el método de Autoensamblado (self-assembled monolayer: SAM) [53]. En el primero, las moléculas anfifílicas se esparcen en la interface aire-agua, se comprimen lateralmente y se transfieren al sustrato por introducción de éste a través de la interface. En el segundo, se forma una monocapa espontáneamente por exposición del sustrato a una disolución o a un vapor que contiene la especie molecular [54-56]. Se puede decir, que el primero constituye el método clásico, aunque aún en vigor y absolutamente renovado, y el segundo se ha puesto en escena en los últimos años.

## **Definición**

Se denomina monocapas autoensambladas (SAM's) a las estructuras moleculares ordenadas que se obtiene por la adsorción espontánea de cierto tipo de moléculas orgánicas, desde una fase gaseosa o líquida, sobre la superficie de sólidos (oro, plata, etc.) o líquidos (mercurio).[57] Durante el proceso de autoensamblado estas moléculas se organizan en estructuras complejas con un menor número de grados de libertad. Este proceso está gobernado por la interacción entre la superficie y algún átomo de la molécula, que normalmente forma un enlace covalente con el sustrato, y por fuerzas de Vander Walls entre las moléculas adsorbidas. [58]

## **Escena en los últimos años**

De los diferentes tipos de SAM's estudiados: ácidos grasos sobre óxidos metálicos, derivados de organosilicatos sobre superficies hidroxiladas y organotioles sobre superficies metálicas y de semiconductores, son estas últimas las que más interés han despertado. [59] Esto se debe a que el grupo tiol (alcanotiol: RSH) presenta una gran afinidad para adsorberse en una gran variedad de metales tales como el oro [60] y mercurio, [61] proporcionando una estrategia simple y flexible con la que modificar de manera controlada y reproducible las propiedades interfaciales de los metales y de semiconductores.

En las moléculas que forman las SAM's se pueden distinguir tres partes (Figura 3):

- a) El grupo anclaje que presenta afinidad específica por el sustrato, formando generalmente un enlace covalente como en el caso de la interacción entre el grupo tiol y un buen número de metales.
- b) La cadena hidrocarbonada, que actúa como espaciador o puente molecular entre el electrodo metálico y la disolución, cuyas interacciones laterales dan lugar a una estructura densamente empaquetada.
- c) El grupo terminal, que se encuentra en contacto con la disolución determina en gran medida las propiedades superficiales de la monocapa. De este modo, se

emplean SAM's terminadas en grupos metilo o hidroxilo (u otros) como modelos de superficies hidrofóbicas o hidrofílicas, respectivamente, [62] mientras que las SAM's terminadas en grupos carboxilo y amino se emplean para obtener superficies ionizadas con carga negativa (carboxilo) o positiva (amino), en función del pH de la disolución.[63]

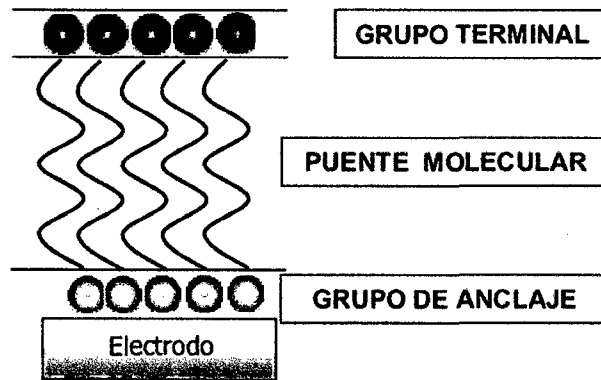


Figura 3: Partes de la SAM's (Adaptado de ref. 59)

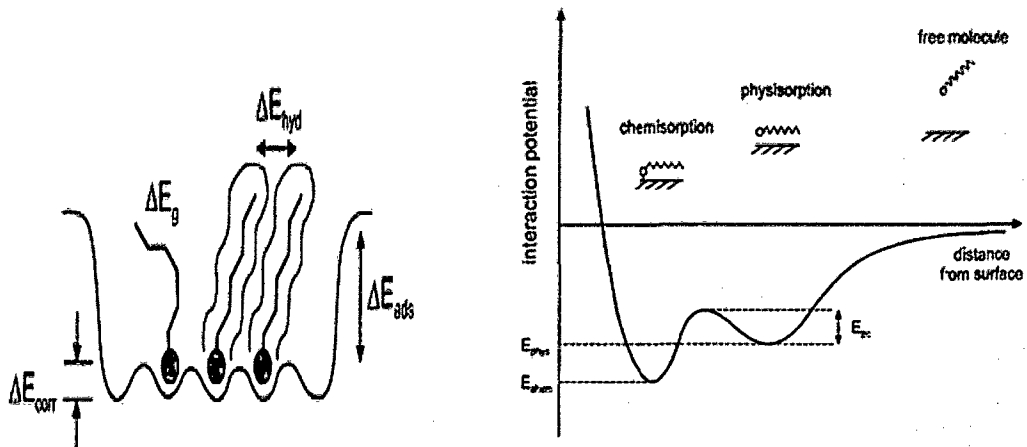


Figura 4: Esquematización de interacción potencial entre el electrodo y la superficie (Adaptado de referencia 62)

Los alcanotioles (RSH) con grupos terminales  $-\text{COOH}$  e  $-\text{NH}_2$  (Figura 5), por ejemplo, son sensibles a variación de pH y permiten el control de la densidad de carga de la superficie de las SAM, conforme el pH de la solución en que estos son sumergidos. Además, con la posibilidad de uso de alcanotioles conteniendo diferentes grupos funcionales es posible el desenvolvimiento de superficies con funciones y características específicas y con elevado nivel de control sobre su arquitectura molecular, hidrofobicidad y reactividad

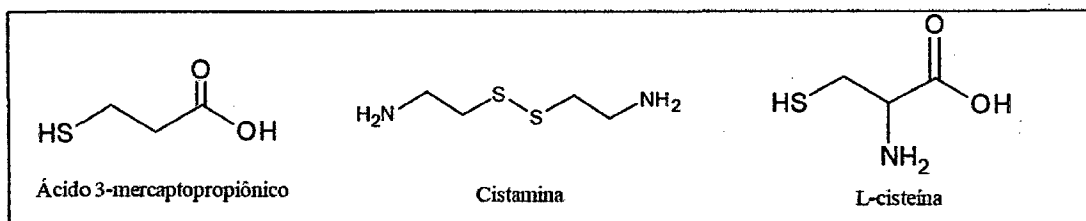


Figura 5: Alcanotioles con grupos terminales  $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$  (grupos activos)

## COMPORTAMIENTO ELECTROQUIMICO DE LAS SAM's

### COMPORTAMIENTO CAPACITIVO

Una de las propiedades más importantes de la interface electrodo/electrolito es la capacidad de la doble capa. La capacidad de la interface refleja la distribución de iones de la disolución en contacto con el electrodo. En dirección hacia la disolución, la doble capa se compone de tres regiones:

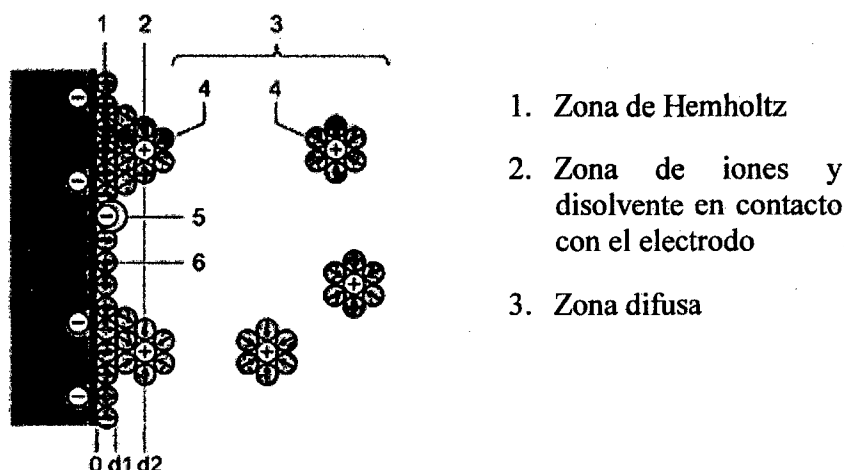


Figura 6. Formación de la doble capa eléctrica en la interface electrodo-solución.

Cuando se deposita una monocapa SAM formada por moléculas de cadena larga sobre un sustrato que actúa de electrodo, se produce un cambio desde una distribución de iones con una constante dieléctrica alta a una zona hidrocarbonada libre de iones con una constante dieléctrica baja. Este cambio produce una disminución drástica de la capacidad interfacial y ésta se hace prácticamente independiente del potencial. La capacidad de la interface se determina a menudo a través de la corriente de carga de un Voltograma cíclico.

Debido a las características de la interface creada, se puede considerar a su vez, que está constituida por dos elementos en serie con su correspondiente capacidad interfacial. De tal modo que la capacidad total es la resultante de dos capacidades en serie, una correspondiente a la monocapa,  $C_m$ , y otra a la doble capa,  $C_d$ . Para una concentración de electrolito 0.1 M o mayor,  $C_d$  es mayor de  $100 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$  [65] y por tanto  $C_d \approx C_m$ . La expresión más simple para  $C_m$  se basa en el modelo de Hemholtz [64]:

$$C_m = \frac{\epsilon_m \times \epsilon_0}{d} \quad (9)$$

Siendo “d” el espesor de la capa dieléctrica,  $\epsilon_m$  y  $\epsilon_0$  la constante dieléctrica de la monocapa y la permitividad en el vacío, respectivamente. Este modelo predice una capacidad constante para la monocapa, lo que está de acuerdo con la corriente de carga obtenida por Voltametría, que resulta independiente del potencial.

#### DEFECTOS DE LAS SAM's

Los sustratos en los que se forman las SAM's están llenos de defectos estructurales. Los sustratos de oro policristalinos presentan una estructura granulada caracterizada por múltiples fronteras, facetas, oclusiones y otras irregularidades, incluso para muestras que presentan una textura (111) se observan defectos tipo escalones atómicos, entre otros.

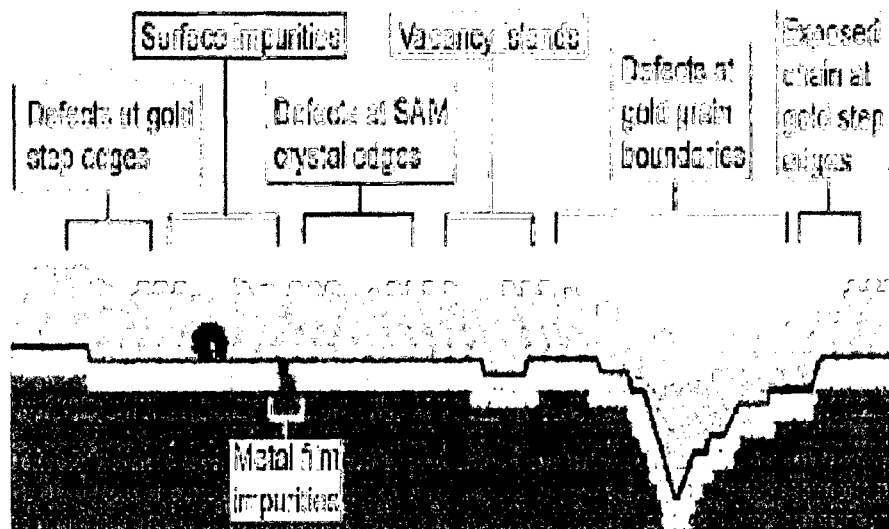
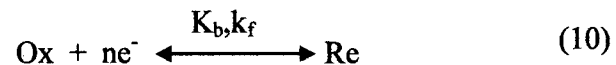


Figura 7: Algunas imperfecciones que pueden ocurrir en una SAM's

Un tipo de defectos inherentes a la formación de la SAM (Figura 7) en oro son las vacantes monoatómicas, esto es, regiones donde la altura de la SAM es mayor que la del resto en una cantidad igual a un diámetro atómico de oro. El origen de estos defectos se entiende considerando la estructura de la superficie del oro previamente a la adsorción de la capa.

### TRANSFERENCIA DE CARGAS EN LAS SAM's

En las reacciones de transferencia electrónica de esfera externa, el intercambio electrónico no va acompañado de la formación o rotura de enlace. Este tipos de reacciones se puede representar mediante

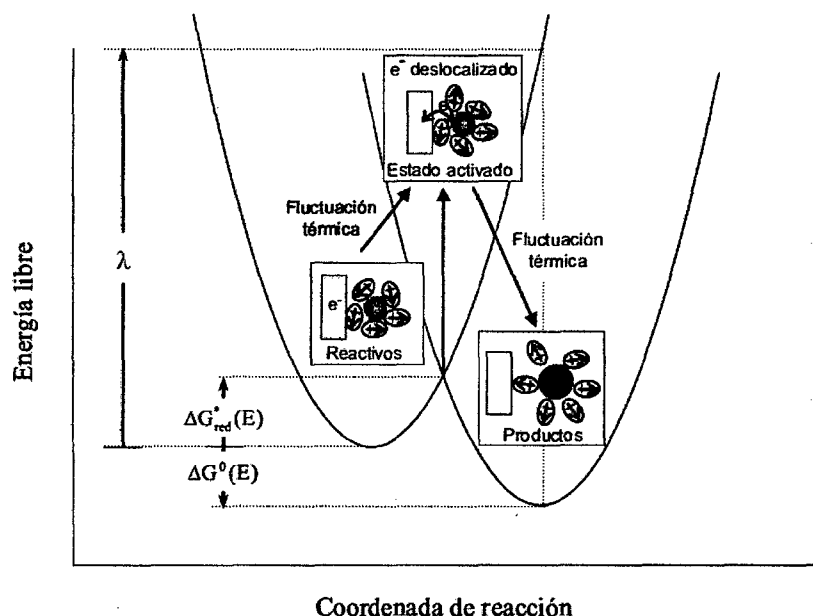


Donde  $K_f$  y  $K_b$  representan las constantes de velocidad en los sentidos de reducción y oxidación, respectivamente. Este tipo de reacción está sujeto a dos restricciones de carácter general [66-71].

1.- Dado que en las transferencias electrónicas no se emite ni se adsorbe radiación, los estados energéticos de los reactivos y productos tienen que coincidir en el momento de la transferencia electrónica

2.- La segunda es una consecuencia del principio Frank-Condon, según el cual en la escala de tiempo que se produce la transferencia electrónica no hay variaciones de los momentos ni de las posiciones nucleares, lo que conlleva que los reactivos y productos compartan una misma configuración nuclear en el momento de la transferencia.

En la Figura 8 se ha representado esquemáticamente la variación de la energía libre de estándar de reactivos y productos en función de la evolución de una coordenada de reacción generalizada. Para que se cumplan las condiciones indicadas anteriormente la transferencia electrónica se producirá en la intersección de las curvas de reactivos y productos. El cambio energético asociado a este tipos de reacciones se atribuye al cambio de distancia y constantes de fuerza de los enlaces de reactivos, productos y la reorganización del entorno. Estas diferencias estructurales son las que determinan la altura de la barrera de activación.



**Figura 8: Representación esquemática de la transferencia electrónica de esfera externa desde un electrodo a una especie redox en solución, donde se muestra los cambios en la estructura de la sonda redox y de la orientación de los dipolos del solvente. (Adaptado de referencia 71)**

Las fluctuaciones térmicas son las responsables de que los reactivos alcancen el estado activado, donde se solapan las curvas energéticas de los reactivos y productos. En ese punto el electrón se encuentra deslocalizado. Debido a nuevas fluctuaciones térmicas el electrón pierde esta degeneración y se ve forzado a pasar al estado de producto o volver hacia atrás, a su estado inicial. La energía de reorganización  $\lambda$ , representa el trabajo que es necesario realizar para llevar los reactivos y su entorno a la configuración de los productos y su entorno sin permitir que se transfiera el electrón como se muestra en figura 8. La energía de organización se puede expresar como la suma de dos componentes: la energía de organización de esfera interna,  $\lambda_{in}$ , asociada a los cambios en la longitud y los ángulos de enlace que conlleva a la conversión de reactivo a producto, y la reorganización de esfera externa,  $\lambda_{ext}$ , que se asocia a la reorganización de las cargas y dipolos del entorno.

Según la teoría de Marcus las constantes de velocidad,  $K_f$ ,  $K_b$  y las energías de activación viene dado por las siguientes ecuaciones



$$k_f = \nu \exp\left(\frac{-\Delta G_{\text{red}}^*(E)}{RT}\right), \quad k_b = \nu \exp\left(\frac{-\Delta G_{\text{ox}}^*(E)}{RT}\right) \quad \dots 11$$

$$\Delta G_{\text{red}}^*(E) = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G^0(E)}{\lambda}\right)^2 = \frac{1}{4}\lambda + \frac{1}{2}\Delta G^0(E) + \frac{[\Delta G^0(E)]^2}{4\lambda} \quad \dots 12$$

$$\Delta G_{\text{ox}}^*(E) = \frac{\lambda}{4} \left(1 - \frac{\Delta G^0(E)}{\lambda}\right)^2 = \frac{1}{4}\lambda - \frac{1}{2}\Delta G^0(E) + \frac{[\Delta G^0(E)]^2}{4\lambda} \quad \dots 13$$

Donde,  $\nu$  representa el factor de frecuencia,  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura,  $\Delta G_{\text{oxidac}}^*(E)$  y  $\Delta G_{\text{reduc}}^*(E)$  representan las barreras energéticas que hay que vencer para llegar al estado activado en las semirreacciones de reducción y oxidación, respectivamente (tal y como se muestra en la figura 8,  $\lambda$  es la energía de reorganización y  $\Delta G^0(E)$  es la fuerza impulsora de la reacción, que se relaciona con el potencial mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G^0(E) = F(E - E^0) \quad \dots 14$$

Cuando el potencial que se aplica no difiere mucho del potencial estándar ( $E^0$ ),  $\Delta G^0(E)$ ,  $\lambda$  y las energías de activación de las ecuación 12 y 13 y se puede apreciar:

$$\Delta G_{\text{red}}^*(E) \approx \frac{1}{4}\lambda + \frac{1}{2}\Delta G^0(E), \quad \Delta G_{\text{ox}}^*(E) \approx \frac{1}{4}\lambda - \frac{1}{2}\Delta G^0(E) \quad \dots 15$$

Sin embargo esta aproximación deja de ser válida cuando nos alejamos del potencial estándar, puesto que a elevadas fuerzas impulsoras los electrones se transfieren desde múltiples estados electrónicos al metal. Por tanto, para estudiar la transferencia electrónica a través de electrodos modificados con SAM's, donde es necesario alcanzar sobre voltajes, es más conveniente utilizar el modelo propuesto por Gerischer y también denominado Marcus-Dos según el cual la constante de velocidad es proporcional al solapamiento de los estados electrónicos dadores y aceptores. En la figura 9 se ha representado un diagrama de energía para una reducción en las que los electrones se transfieren desde el electrodo a la especie redox en solución a través de un espaciador

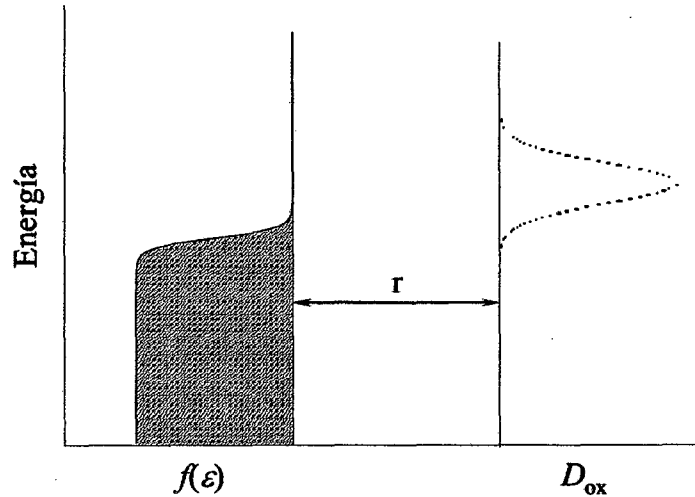
molecular. La constante de velocidad de reducción viene dada por la integración del producto de tres funciones con respecto a la energía  $\epsilon$ . [66-68]

$$k_f = \nu K_{el}(r) \int_{-\infty}^{\infty} D_{ox}(\epsilon, \lambda, \eta) \rho(\epsilon) f(\epsilon) d\epsilon \quad ..16$$

Donde  $\nu$  representa el factor de frecuencia,  $\rho(\epsilon)$ , la densidad de los estados electrónicos en el metal,  $f(\epsilon)$ , representa la probabilidad de que estos estados estén ocupados y se expresa mediante la función de distribución de fermi :[66-68]

$$f(\epsilon) = \left[ 1 + \exp\left(\frac{\epsilon - \epsilon_F}{k_B T}\right) \right]^{-1} \quad ..17$$

$D_{ox}(\epsilon, \lambda, \eta)$  representa la densidad de estados aceptores, y  $k_{el}(r)$  es el coeficiente de transmisión que está relacionado con la probabilidad de túnel del electrón a través del espaciador molecular.



**Figura 9:** Diagrama de energía que ilustra el solapamiento de los niveles energéticos llenos del electrodo con los vacíos de la especie redox en disolución. El aceptor y el dador están separados por una barrera molecular de espesor  $r$  ( Adaptado de referencia 70)

La densidad de los estados aceptores se expresa mediante la siguiente ecuación [66-68]

$$D_{ox}(\epsilon, \lambda, \eta) = (4\pi\lambda k_B T)^{-1/2} \exp\left\{ \frac{-(\epsilon - \lambda - e\eta)^2}{4\lambda k_B T} \right\} \quad ..18$$

Mientras el coeficiente de transmisión disminuye exponencialmente con la distancia entre el dador y aceptor según la ecuación [68]:

$$\kappa_{el}(r) = \kappa_{el}^0 \exp(-\beta r) \quad ..19$$

$\beta$  es el coeficiente de decaimiento exponencial, que es función del espesor del espaciado molecular y de su naturaleza.

Cuando  $kel \rightarrow 1$  se dice que la reacción es adiabática, lo que indica que el acoplamiento electrónico entre el electrodo y la especie redox es muy fuerte. Sin embargo, este no es el caso cuando entre el electrodo y la especie redox se interpone una barrera molecular. En este tipo de transferencias electrónicas el acoplamiento es débil y la reacción se dice que es no adiabática.

#### **Algunos criterios en la formación de la SAM**

Los criterios que se tienen en cuenta para seleccionar el tipo de sustrato y el método de preparación dependen de la aplicación para la cual se usará la SAM (Figura 10). Por ejemplo, para superficies modelo para estudios biológicos, basta con usar sustratos policristalinos, mientras que para medidas de transporte electrónico a través de moléculas orgánicas es mejor el uso de monocristales que presentan una superficie atómicamente lisa y con orientación definida. Asimismo, si se quiere una superficie de SAM hidrofílica, se usara para la formación de SAM moléculas orgánicas con grupos terminados en moléculas polares (OH, COOH, etc.), o si se desea SAM's con superficies hidrofóbicas se utiliza moléculas orgánicas que terminan en grupos metil.

La formación de SAM's se lleva a cabo por adsorción espontánea desde una fase líquida o gaseosa. El ensamblaje desde la disolución es un método conveniente y suficiente para la mayoría de las aplicaciones, especialmente para aquellas que requieren contacto con otra fase líquida para llevar a cabo el experimento. Sin embargo, cuando los experimentos se tengan que realizar en condiciones de ultra alto vacío (UHV), la SAM debe prepararse desde la fase gaseosa.

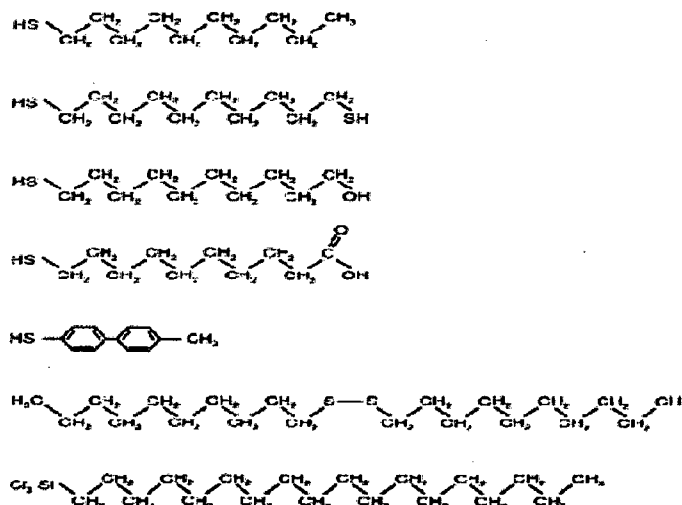


Figura 10: Algunos compuestos de tioles usados para la formación de SAM's

## Aplicación de la SAMs

El gran interés de las SAM's se debe a la enorme variedad de aplicaciones que se han descrito. Estas van desde su utilización en dispositivos basados en la electrónica molecular, [72,73] hasta su empleo en el desarrollo de la bioelectroquímica [74]

Generalmente las SAM's constituyen componentes moleculares básicos a partir de los cuales se construyen estructuras más complejas, en los que se conoce como los métodos 'bottom-up'. Algunas de las aplicaciones que se están investigando con estos sistemas son:

### 1. Plataforma para el crecimiento molecular.

Al modificar un sustrato metálico con una monocapa autoensamblada, es ahora la SAM la que actúa como sustrato superficial. Puesto que se pueden formar SAM's con un enorme variedad de funcionalidades, eligiendo correctamente el grupo terminal se pueden crecer de manera ordenada cristales, materiales orgánicos y metales.

### 2. Electrónica molecular

Son varios los retos que se persiguen actualmente en este campo. Así, se está tratando de obtener moléculas que puedan funcionar como cables, rectificadores e incluso transistores. Además es importante que la unión entre estos

dispositivos moleculares y la fase metálica este bien definido y ofrezca la menor resistencia posible al movimiento de los electrones. El estudio de estos dispositivos moleculares se ha llevado a cabo generalmente aprovechando la punta de un microscopio de efecto túnel (STM) como uno de los contactos. [72]

### 3. SAM modulables con un estímulo externo

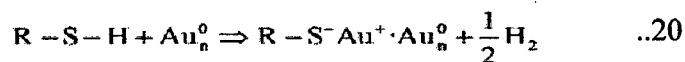
El estímulo de estas aplicaciones es cambiar las propiedades de una monocapa autoensamblada mediante la aplicación de un estímulo externo, como puede ser una diferencia de potencial o un haz de radiación luminosa. Como ejemplo de este tipo de aplicación, Lahann y Col. [75] han demostrado que mediante el control del potencial eléctrico aplicado, pueden cambiar la orientación molecular de los componentes de una monocapa, que no se encuentre densamente empaquetadas y cuyo grupo terminal este cargado negativamente.

### 4. Aplicaciones bioelectroquímicas.

Mediante la modificación de electrodos con monocapa de tioles se ha podido estudiar los factores que influyen en la velocidad de intercambio electrónico de diversas proteínas y enzimas redox, como es el caso de la azurina, citocromo c, rusticianina, ferredoxina, lacasa, nitrito reductasa, etc.

El sustrato sobre el que se ha estudiado con mayor detalle la estructura de las SAM's es el oro, ya que presenta una elevada afinidad por el grupo tiol y se trata de un metal inerte que no reacciona con el O<sub>2</sub> atmosférico, ni se oxida a temperaturas inferiores a su punto de fusión, por lo que se puede manipular en condiciones normales. La mayor parte de la información estructural de las monocapas procede de los estudios de la adsorción de alcanotioles sobre Au(111), especialmente en condiciones de ultra-vacio y suele tomarse como referencia el estudio de otros sistemas.

La reacción por la que la molécula de tiol se enlaza covalentemente al oro se puede considerar como una adsorción oxidativa del enlace S-H con una eliminación reductiva del hidrogeno, [76] aunque este último punto aun se sigue debatiendo. [77-78]



### 3.3. ELECTRODOS SERIGRAFIADOS Y SU APLICACION

Hoy en día los electrodos serigrafiados están dando una mejor respuesta para la fabricación a gran escala de sensores, biosensores o dispositivos que con una mínima modificación puedan ser utilizados como transductores.

La utilización de electrodos convencionales de oro, platino o carbono como transductores de sensores o biosensores viene siendo una práctica habitual en trabajos de investigación, pero difícilmente serán herramientas validas para la construcción de sensores de interés en el diagnostico clínico en general, porque el contacto del elemento de reconocimiento con la muestra (sangre, suero, orina, liquido cefalorraquídeo) invalida al sensor para posteriores determinaciones con lo que la solución lógica seria de construir sensores de un solo uso, es decir, usar y tirar, lo que hace económicamente inviable la utilización de los citados electrodos. Además, la necesidad cada vez mayor de realizar análisis en micro volúmenes de muestra hace también difícil la adaptación de electrodos convencionales a la solución de problemas reales.

En cambio la técnica de serigrafiado que la ingeniería viene utilizando durante más de cincuenta años en la producción de circuitos impresos, se ha ido adaptando también a la producción electrodos serigrafiados con grandes ventajas frente a otras tecnologías como lo son:

- 1) La flexibilidad del diseño: en este sentido cabe destacar que no solo cualquier geometría es posible para el electrodo de trabajo, sino que permite, utilizando distintas mascarar y tintas de serigrafiado, el diseño completo de cualquier celda electrolítica en la que se pueden variar tanto el numero de electrodos como el volumen de la misma en función de las necesidades.
- 2) La automatización del proceso de producción: una vez diseñadas adecuadamente las mascarar y escogidas las tintas de serigrafiado, la producción de tarjetas serigrafiadas que incluyan la celda electrolítica completa se puede hacer a gran

escala, reproduciendo con gran precisión tamaños y geometrías y abaratando costes.

- 3) La gran variedad de tintas de serigrafiado permite combinar distintos materiales electroditos en la misma celda electrolítica. Así es posible utilizar electrodos de oro, de platino, de carbono, de plata/cloruro de plata en la misma celda electrolítica en función de las necesidades de la transducción del biosensor.
- 4) El proceso de producción de electrodos serigrafiados se puede adaptar a distintos soportes también en función de necesidades concretas, de tal manera que la naturaleza de la tarjeta soporte, donde va a quedar impresa la celda y los electrodos, puede variar desde materiales poliméricos o plásticos a materiales cerámicos o alúmina.

En Figura 11 se aprecia las distintas partes de una tarjeta serigrafiada con un diseño clásico de tres electrodos

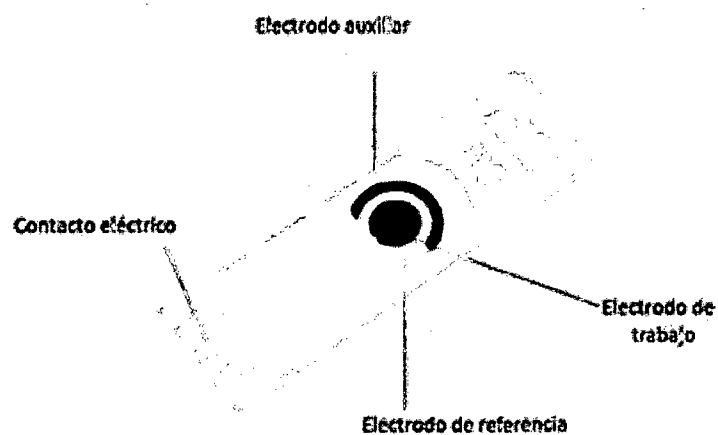


Figura 11: Electrodo serigrafiado en un diseño clásico de DROPSENSE®

**CAPITULO IV**  
**PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**



## REACTIVOS Y SOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico obtenidos comercialmente y todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura. La L-cisteína, hidróxido de sodio, metionina, ácido bórico y el metronidazol fueron adquiridos de la Sigma-Aldrich. El metanol fue adquirido de la J.T.Baker, el Alcohol etílico fue adquirido de FurLab, el ácido acético, ácido sulfúrico, fosfato de sodio monohidratado y dihidratado fueron adquiridos de la Synth, el ácido fosfórico de la Mallinckrodt. Las muestras de metronidazol en suspensión, tabletas y crema fueron obtenidas por donación de la prefeitura de Itatiba, la muestra de orina y el plasma fueron adquiridos del laboratorio de química de la IQ-UNESP.

La solución de tampón fosfato de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  fue preparada disolviéndose 11,98 g de monohidrogenofosfato de sodio y 14,19 g de hidrogenofosfato de sodio en un vaso precipitado que contenía agua destilada. Esta solución fue transferida para un balón volumétrico de 1,0 L en el cual fue completado el volumen. Para el ajuste del pH 7,0 se adiciona gotas de solución  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sodio.

La solución  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampón Britton-Robinson fue preparada disolviendo 2,48g de ácido Bórico en un vaso precipitado conteniendo agua ultrapura, y adicionando 2,3 mL de ácido acético y 2,7 mL de ácido fosfórico. La solución fue llevado a ultrasonido para la completa disolución y posteriormente fue transferida a una fiola de 1 L y completado con agua ultrapura. Para los ajustes de pH 2,28, 3,58 y 4,06 fueron adicionados gotas de solución de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sodio.

Se preparó una solución alcohólica (1:4) de  $1,0 \times 10^{-3}$  de L-cisteína disolviéndose 12,1 mg de esta sustancia en alcohol etílico y se completa a volumen de 100 mL.

Se preparó una solución alcohólica (1:4) de  $1,0 \times 10^{-3}$  de Metionina disolviéndose 14,9 mg de esta sustancia en alcohol etílico y se completa a volumen de 100 mL.

Las soluciones de KOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  y  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  fueron preparados disolviendo 2,8 g y 5,6 g respectivamente en un vaso precipitado con agua ultra-pura, y fue completado en una fiola a un volumen de 100 mL.

## PLAN EXPERIMENTAL

En este trabajo se va a preparar sensores basados en monocapas de cisteína sobre electrodos de oro nanoestructurado para la determinación del fármaco metronidazol. El plan experimental consiste en tres partes: preparación del sensor, ensayo del sensor en metronidazol y las técnicas de caracterización, que van a ser detallados a continuación.

### PREPARACION DEL SENSOR

#### Activación de la superficie de oro

El electrodo de oro fue limpiado en una solución de ácido sulfúrico al 1% durante 10 min. para eliminar interferentes (compuestos orgánicos, inorgánicos o suciedad)

Se realizó el voltograma de oro en una solución de KOH 1 M entre potenciales de -0.8V a +0.6V respecto al electrodo de referencia Hg/HgO con una velocidad de barrido de 0.05V/s en una atmósfera inerte. *En las Voltametrías cíclicas realizadas a pH básico se utiliza al electrodo Hg/HgO como electrodo de referencia debido a que si se hubiese utilizado electrodo de calomel o de Ag/AgCl se contaminaría la superficie de oro, debido a que formaría ligandos con los iones cloruro, y lo que se busca es que el oro se encuentre libre de interferentes. En el caso del voltograma del SAM con la muestra a pH=2 se realizó con el electrodo de referencia de calomel.*

Se oxidó el electrodo de oro electroquímicamente aplicando un potencial fijo de 2V durante un tiempo de 3 min. en una solución buffer de fosfato a pH 7.

Se logró la reducción del electrodo de oro aplicando un barrido de reducción de 2V hasta -0.2 V respecto al electrodo de referencia Hg/HgO con una velocidad de barrido de 10mV/s con una velocidad de paso de 0.00495 en una solución buffer de fosfato a pH 7

Se realizó el voltograma del electrodo de oro nanoestructurado en una solución de KOH 1 M entre potenciales de -0.8V a +0.6V respecto al electrodo de referencia Hg/HgO, con una velocidad de barrido de 50mV/s en una atmósfera inerte.

### **Formación de la Monocapa Autoensamblada de cisteína (SAM)**

Se sumergió el electrodo de oro en una solución de cisteína 1mM por un tiempo de 10 minutos a una temperatura de medio ambiente.

Se retiró el electrodo de oro de la solución y fue lavado con agua ultra para remover las moléculas en exceso impregnadas en la superficie.

Se realizó la Voltámtria cíclica de la SAM en una solución de KOH 0.5 M entre potenciales de -0.8V a +0.6V respecto al electrodo de referencia Hg/HgO con una velocidad de barrido de 50 mV<sup>-1</sup>.

### **ENSAYOS Y TESTES DEL SENSOR (Au-Cys).**

Los ensayos del sensor (Au-Cys) en solución de metronidazol (PBS, 0.1M, pH 2) fueron realizados en una celda de 5 compartimientos de un volumen de 20 mL y fueron utilizados electrodo de platino como electrodo auxiliar, electrodo de Hg/HgO como electrodo de referencia y electrodo serigrafado de oro (DROPSENSE) como electrodo de trabajo. El tratamiento de las muestras reales contenidas metronidazol es descrito a continuación:

#### **Preparación de la muestras de metronidazol**

El tratamiento de todas las muestras presentadas a continuación son tratamientos encontrados y determinados según la Farmacopeia British 2007, vol III.

La muestra de metronidazol en crema (0.61g) fue calentada en una solución conteniendo 2.5 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1mM en un vaso precipitado y 3 mL de metanol, para su posterior filtración y se completo a un volumen de 50 mL.

Se tomó 2.2 mL de la muestra de suspensión, trasvasado en un vaso precipitado, enseguida fue adicionado 50 mL de una solución de alcohol: agua (1:4) y fue disuelto en ultrasonido, para posterior filtrado y se completo a un volumen de 50 mL.

Se trituró 1 tableta de metronidazol en polvo, contenidas 500 mg por tableta, fueron completamente homogenizadas. Fueron pesadas 15 mg y fueron disueltos en 250 mL de una solución etanol (2:8). Se tomó 4 mL de la solución resultante y fue diluida 10 veces en el búfer Britton-Robinson de pH 2, esta solución es usada para la determinación electroquímica.

## **TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACION DEL SENSOR**

### **Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

La microscopia electrónica nos proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos que son normalmente necesarios para entender el comportamiento de las superficies. Así, un análisis por microscopia electrónica es a menudo la primera etapa en el estudio de las propiedades de las superficies de un sólido.

Mediante esta técnica se consigue formar y presentar imágenes micrométricas mediante un haz de electrones que se hace incidir sobre la superficie de la muestra.

En este trabajo se busca mostrar la diferencia entre Au, Au nanoestructurado y la monocapa de Au-Cys.

### **Microscopia de fuerza atómica. (AFM)**

La microscopia de fuerza atómica provee la imagen de una superficie sin que intervengan los efectos eléctricos, al medir las fuerzas mecánicas en la punta detectora por lo que también resulta útil para materiales no conductores.

En este trabajo se pretende medir como se encuentra la superficie de oro nanoestructurado antes de ser modificada y después, así, verificar la formación de pequeñas rugosidades en la superficie de oro, en la búsqueda de generar mayores áreas superficiales.

### **Voltamperometría cíclica (VC)**

En este trabajo las mediciones electroquímicas fueron desarrolladas con un Potenciostato-Galvanostato (Autolab Mod. PGSTAT 30) en una celda convencional de 5 bocas, usando como electrodo de referencia Hg/HgO (1.0 M de KOH) y como contraelectrodo platino. Estos tres electrodos se conectan a un potenciostato/galvanostato (Figura 12) que permite utilizar un software de control para registrar las respuestas en voltaje/corriente dependiendo de la técnica de perturbación utilizada.

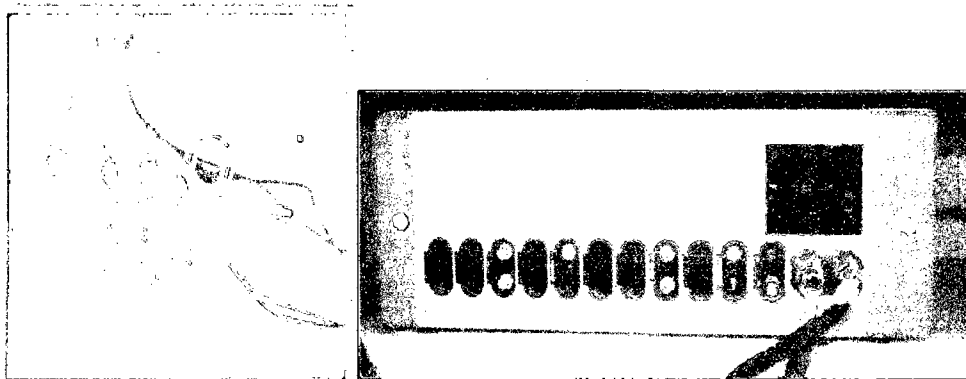


Figura 12: Equipo utilizado, izquierda: Celda electroquímica; a la derecha: Potenciostato/ Galvanostato

### Voltametría de Onda Cuadrada

Esta es una técnica de pulso que ofrece ventajas como mayor intensidad de señal, mejor resolución del pico, medidas más rápidas y mayor sensibilidad, pudiendo su límite de detección ser comparado al de técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

También la corriente faradaica puede ser colectada en un intervalo de tiempo adecuado para disminuir la contribución de la corriente capacitiva. El análisis de sus parámetros característicos permite aun, la evaluación mecanística y cinética de los procesos electroquímicos (SOUZA *et al.*, 2003). En esta técnica, ocurre un pulso directo y un pulso inverso. En el primero es producida una corriente catódica  $I_1$  y en el segundo una corriente anódica  $i_2$ . La forma de la curva de corriente vs potencial es proveniente de la aplicación de potenciales de altura  $\Delta E_s$  (amplitud del pulso de potencial), que varía de acuerdo con una escalera de potencial de largura  $E_s$  (incremento) y período  $t$  (duración del pulso). El perfil de la variación de potencial está representado en la 13 e consiste en la superposición de una onda cuadrada a una función rampa escalonada en degrados. Durante cada pulso catódico, el analito se reduce en la superficie del electrodo, y durante el pulso anódico, el analito reducido vuelve a oxidarse.

En el punto 1, los electrones fluyen del electrodo para el analito, y en el punto 2 en la dirección inversa. Las corrientes son medidas al final de los pulsos directos y reversos, y la señal es obtenido como una intensidad de la corriente resultante ( $\Delta i$ ) de forma diferencial (Figura 14), o sea, como las dos corrientes tienen señales opuestas, su diferencia es mayor que cualquier una de las corrientes en separado. Los límites de

detección para esta técnica voltamétrica son del orden de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (SKOOG *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; HARRIS, 2005).

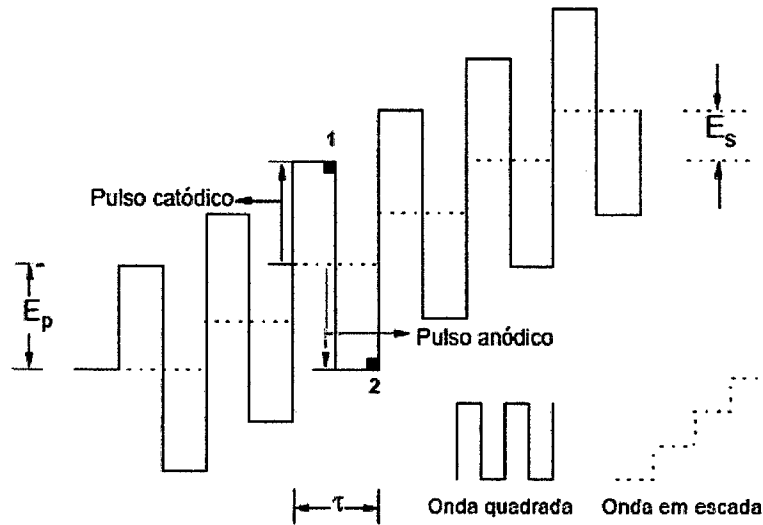


Figura 13: Forma de aplicación del potencial en una Voltametría de onda cuadrada.

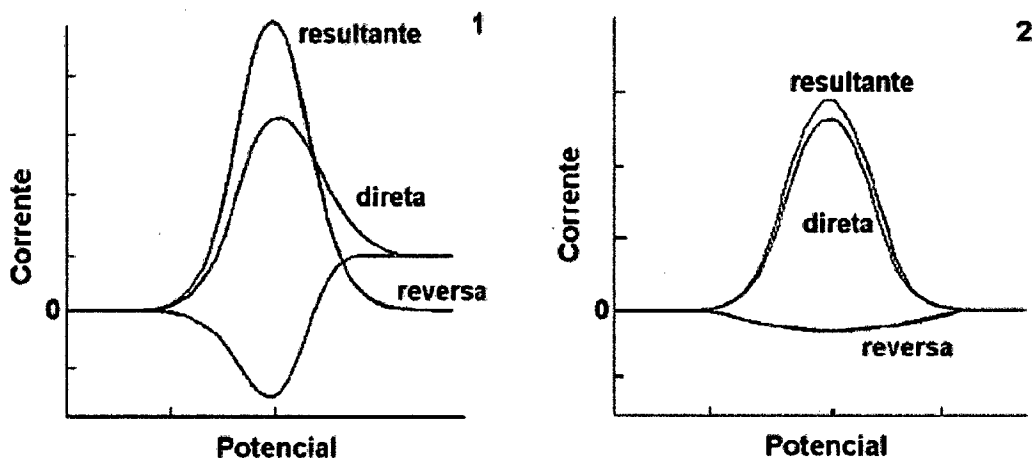


Figura 14: Voltagramas de Onda cuadrada (1) proceso redox de un sistema reversible y (2) procesos redox de un sistema irreversible (SOUZA *et al.*, 2003).

### Cronoamperometría

La Cronoamperometría es una técnica electroquímica que registra un transiente de corriente en función del tiempo cuando el electrodo de trabajo es sometido a un pulso, o a una secuencia de potenciales eléctricos, en que el potencial inicial y final son previamente definidos [22,23]. Bajo estas condiciones, el sistema hace una rápida

transición de un estado inicial E1, donde procesos faradaicos no ocurren para un estado estacionario E2, controlado por el flujo de transferencia de la especie electroactiva del interior de la solución para la superficie del electrodo (Figura 15a). Tan largo que la especie oxidada (Ox) alcanza la superficie electrodoica, Ox y rápidamente reducido y su concentración en la superficie cae a cero, creando un gradiente de concentración en la superficie electrodoica. En este proceso, la corriente aumenta continuamente hasta alcanzar un valor máximo, que corresponde a corriente transiente máxima  $i_n$ . El gradiente de concentración generado por la reducción inicial de Ox en el electrodo provoca un flujo continuo de Ox del bulk de la solución para el electrodo que, así como la corriente, y proporcional al gradiente de concentración.

El flujo continuo de Ox para el electrodo genera una monocapa de difusión deficitaria de la especie electroactiva que se extiende de la superficie electrodoica hasta el interior de la solución. Entonces, la concentración de la especie Ox en el electrodo decae con el tiempo y lo mismo ocurre con la corriente, hasta que un estado estacionario sea alcanzado (Figura 15b) y el proceso se torna controlado por la corriente limite de difusión [24], como descrito por la ecuación de Cottrell.

$$i_d = nFC_j AD_j^{1/2} (\pi t)^{-1/2}$$

Donde  $i_d$  representa la corriente limite de difusión

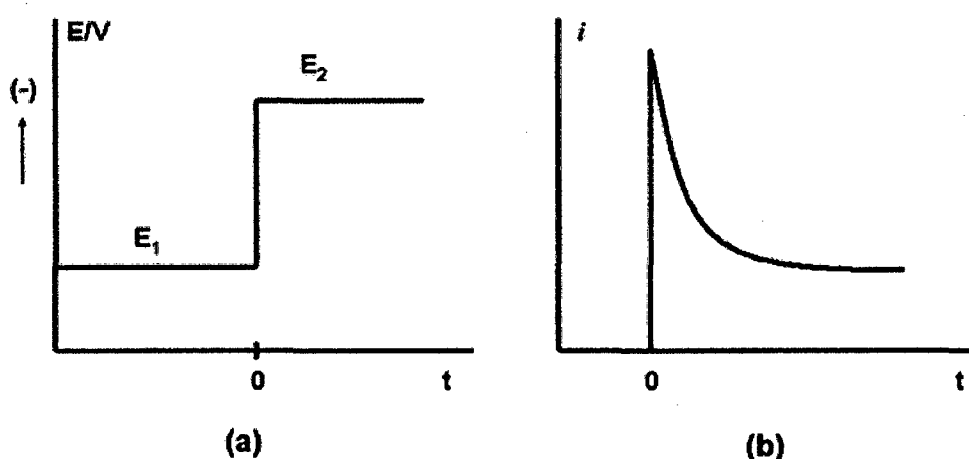


Figura 15: (a) Pulso de potencial aplicado al electrodo de trabajo en que la especie Ox no es electroactiva en el potencial E1, pero es reducido en el potencial E2 y (b) transiente potenciostato resultante.

## Voltametría cíclica

Esta técnica se caracteriza por la aplicación al electrodo de trabajo, cuyas condiciones son estacionarias y sin agitación de la disolución, de una señal de potencial triangular (figura 16). El potencial va desde un potencial inicial  $E_0$  hasta un potencial final  $E_f$ , en el cual se produce una inversión en el sentido del barrido, volviendo a su valor original de  $E_0$ . En este ciclo suele darse varias veces, y los potenciales en los que se da esta inversión de la dirección reciben el nombre de potenciales de inversión

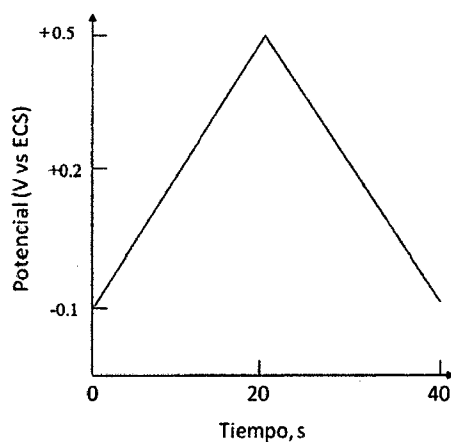


Figura 16: Voltamperometría cíclica, Potencial con respecto al tiempo

El intervalo de potencial de inversión impuesto en cada experimento es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o varios analitos, y la dirección en la que se produce el barrido va a depender de la composición de la muestra.

Esta técnica es usada, principalmente, como herramienta para análisis cualitativo. Los parámetros principales que permiten la identificación del analito son: el potencial de pico anódica, el potencial de pico catódico, la corriente de pico anódico, la corriente de pico catódico.

Las ecuaciones empleadas en la Voltamperometría son las siguientes:



Para sistemas reversibles

$$\frac{I_{pc}}{I_{pa}} = 1 \quad 21$$

$$I_p = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{ecuación de Randles-Sevcik})$$

Siendo n el número de electrones intercambiados en la reacción, A el área del electrodo (cm<sup>2</sup>). C la concentración de reactivo en el seno de la disolución (mol cm<sup>-3</sup>). Y D el coeficiente de difusión (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) de las especies oxidadas y reducidas (supuestos iguales).

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad \dots 21$$

En estos sistemas, E<sub>p</sub> es independiente de la velocidad de barrido, mientras que I<sub>p</sub> es proporcional a v<sup>1/2</sup>

Para sistemas cuasi reversibles

$$I_p = 0.4463 K(\Lambda, \alpha) n F A C_A D^{1/2} v^{1/2} \left( \frac{nF}{RT} \right)^{1/2} \quad \dots 22$$

En estos sistemas, I<sub>p</sub> aumenta con v<sup>1/2</sup> pero no es proporcional a ella. Además, el valor de ΔE<sub>p</sub> se aproxima a 60/n (mV) a bajas velocidades de barrido pero se incrementa al aumentar la velocidad de barrido

Para sistemas irreversibles

$$I_p = (2.99 \cdot 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad \dots 23$$

En estos sistemas, no hay pico de vuelta. Además, E<sub>p</sub> es una función de la velocidad de barrido. Aproximadamente, la variación de E<sub>p</sub> es de 30/αn (mV) por cada 10 veces de aumento de la velocidad de barrido.

### Algunas aplicaciones

A partir de la altura de la onda se obtiene información acerca del número de electrones, del área del electrodo, del coeficiente de difusión del electrolito, de la concentración de especies electroactivas (bien por calibración o por adición de estándar) y la dimensión crítica del electrodo.

A partir de la forma de la onda se obtiene información del número de electrones de la reacción redox (que es útil a su vez para el estudio de los mecanismos y cinéticas de los procesos de oxido/ reducción), y de si el sistema es reversible. A menudo, los voltagramas cíclicos revelan la presencia de intermedios en las reacciones de oxido/reducción.

A partir de la posición de la onda se pueden estimar los potenciales formales del sistema químico.

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSIONES**

## ESTUDIO DEL ELECTRODO DE ORO

Se observa que cuando una superficie sólida presenta mayor área superficial (determinado), esto permitirá generar mayor número de interacciones moleculares (quimisorción o fisorción) en las inmediaciones de dicha superficie con la misma, obteniéndose así una mayor formación de enlaces en la superficie. Es así que en el presente trabajo se genera electrodos con ciertas rugosidades ( $FR > 1$ ), permitiendo que el área superficial aumente, trabajándose a partir de un electrodo serigrafiado de oro (ver figura 11), debido a los beneficios mencionados en la sección 3.3 que presentan estos tipos de electrodos. Se limpia el electrodo de Au en disolución de KOH 1M, con barridos de potencial de 0.050 V/s hasta conseguir una superficie reproducible y estable, cabe mencionar que fue utilizado diversos tipos de limpieza como se relata en la literatura, sin embargo no fue adoptado debido a que causaban daño a la superficie del electrodo, eso se evidenció en el oscurecimiento de la superficie del electrodo y en ocasiones hasta desprendimiento de la misma. En la figura 17 muestra el diagrama de Pourbaix del oro, donde el electrodo de oro al ser sometido a un potencial de 2.0 V durante 180 segundos ocurre la formación de óxidos de Au (formación de sustancia negra en el centro del electrodo serigrafiado). Asimismo, en la figura 18 se observó como la corriente en un primer momento va en ascenso y luego por encima de los 100 segundos se observa un descenso de la corriente, estos cambios se podrían justificar con la aparición de capas de óxido sobre la superficie.

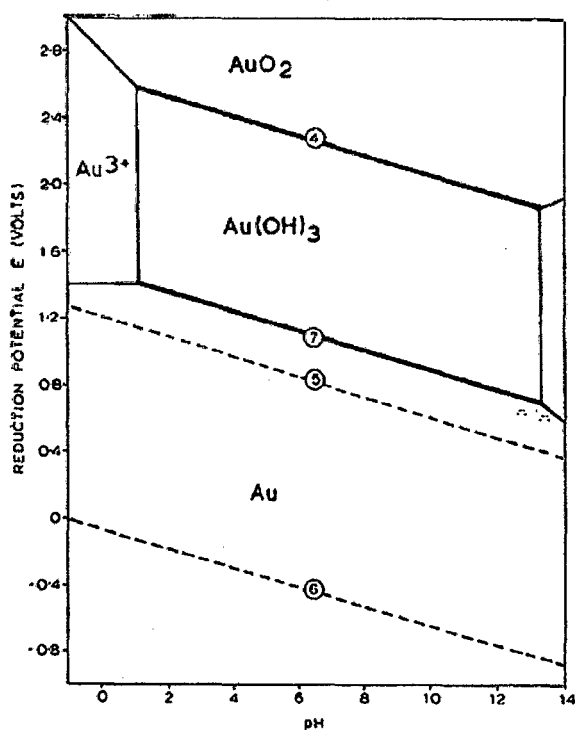


Figura 17: Diagrama de Pourbaix para el sistema Au-H<sub>2</sub>O a 25°C.

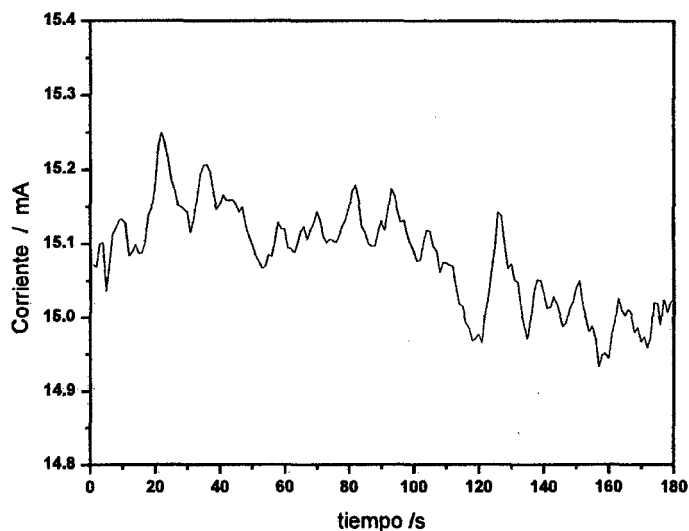
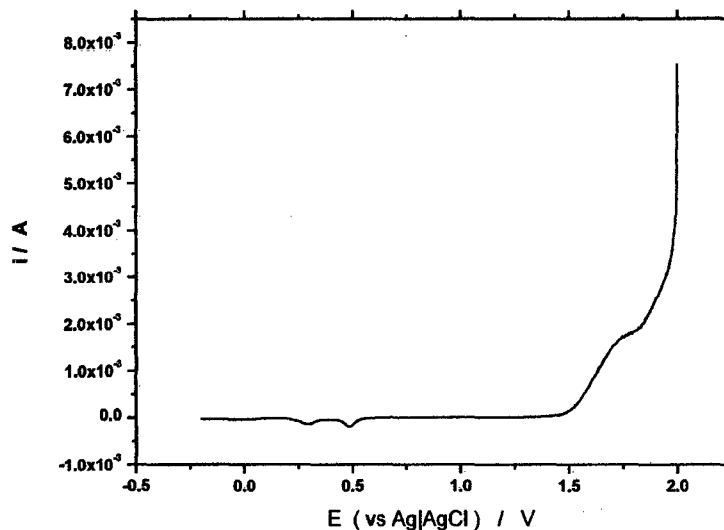


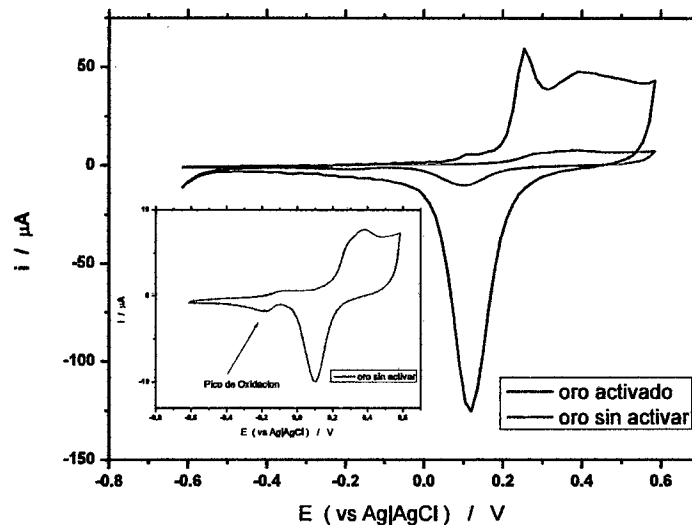
Figura 18. Cronoamperometría del proceso de formación de la capa de óxido de oro en pH 7 tampón fosfato 0.1M

Para la reducción de la especie de óxido de oro formado en la superficie del electrodo de oro, utilizando la técnica de Voltametría cíclica, se emplea un barrido de reducción (2V – 0.2V) tal como muestra en la Figura 19, donde se podría atribuir a la reducción del óxido de oro en dos intervalos de potencial, a 0.5V y a 0.25V con corrientes negativas.



**Figura 19: Reducción electroquímica del oro en un buffer de fosfato a pH 7 con una velocidad de barrido de 10 mV respecto a un electrodo mHg/HgO como referencia**

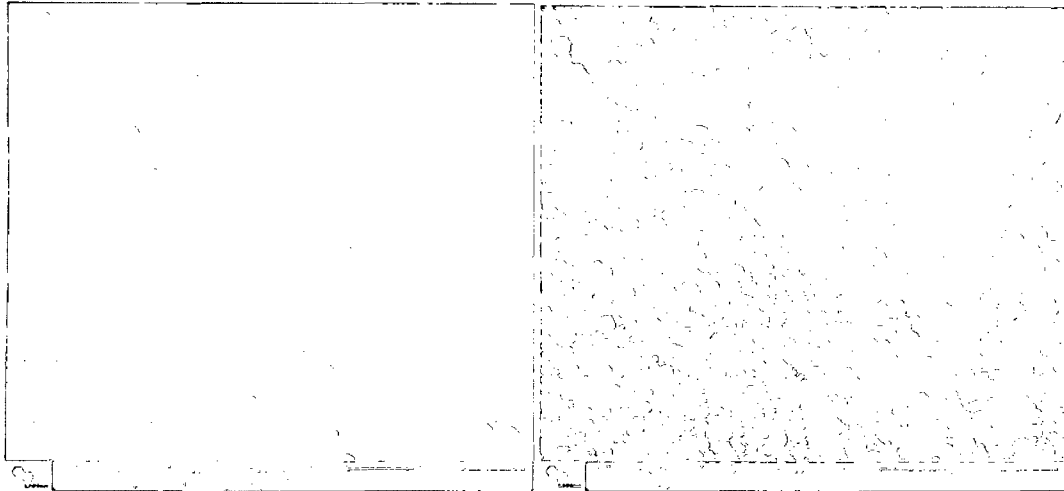
Se realizó una Voltametría cíclica al electrodo de oro antes y después del procedimiento realizado, asimismo la figura 20 muestra la comparación voltamétrica donde se observa un aumento de corriente en el potencial de reducción del oro a 0.10 V y también un aumento en el potencial de oxidación del perfil voltamétrico, es así que la superficie al modificarse y presentar mayor señales de corrientes (pico de reducción), se ha ganado en la formación de mayor área superficial expuesta, la cual será cuantificada y mostrada en cálculo del área posteriormente.



**Figura 20:** Voltagrama del electrodo de oro en una solución de KOH 1M con una velocidad de barrido de 0.05V/s respecto al electrodo de referencia Hg/HgO

### Caracterización morfológica del oro

Se utilizan métodos microscópicos para conocer las modificaciones hechas en la superficie del electrodo de oro serigrafiado. El SEM en la figura 21 muestra en diferentes escalas (20x y 10x) que la superficie de oro nanoestructurado al haber sido sometido al procedimiento realizado, muestra una superficie que presenta cavidades rugosas lo cual conlleva que el área superficial se mayor por la formación de óxidos de oro (según el diagrama de Pourbaix) formados en su superficie.



**Figura 21: Microscopia electrónica de barrido (SEM) del electrodo de oro**

La figura 22 muestra un perfil estructural del electrodo oro, donde se observa que la superficie modificada presenta variaciones estructurales. La superficie de oro muestra en un comienzo (Figura 22A) una estructura cuasi lisa con menos imperfecciones en su estructura morfológica, cuando es sometido al procedimiento dicha estructura morfológica presenta mayor imperfecciones (Figura 22B), haciendo que el área superficial aumente, por ello la superficie de oro esta mayormente expuesta a diferentes moléculas que serán descritos más adelante, esta superficie de oro al estar con mayores imperfecciones, como lo vimos anteriormente en la sección de Defectos de SAM nos muestra que esta superficie no es muy conveniente en la formación de SAM con cadenas carbonadas largas, pues su conformación es un impedimento para la transferencia electrónica por la forma como la cadena se posiciona.



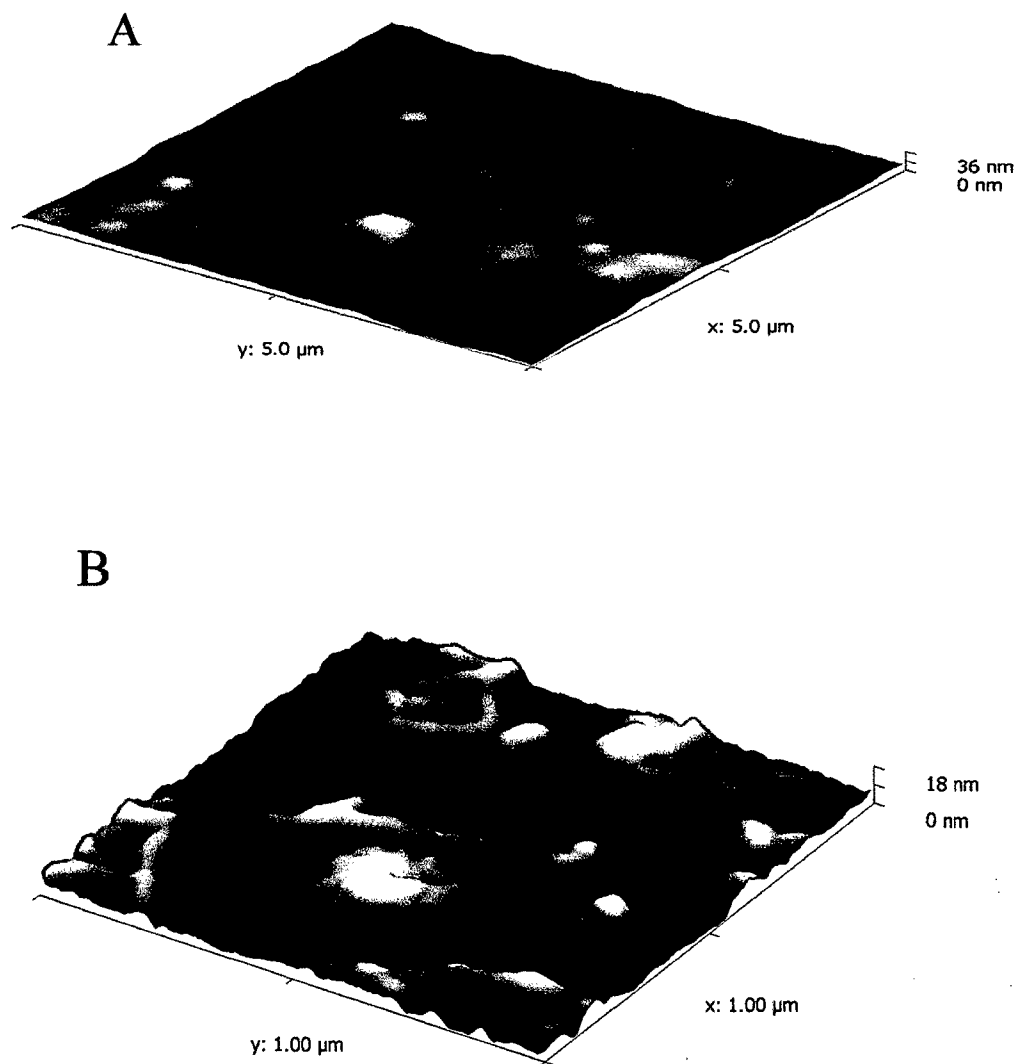


Figura 22: Microscopia de Fuerza atómica del electrodo de oro (A) oro pretratado (B)

### Calculo del área activa de la superficie del oro

El área activa del oro policristalino fue determinada utilizando el método desarrollado por Burshtein. Según ese método, el área correspondiente al inicio de la formación de óxidos de oro hasta el **mínimo de Burshtein**, como puede ser observado a partir del voltamograma cíclico de la figura 23, corresponde a la formación de una monocapa de óxido de oro sobre la superficie de este. Siendo posible calcular la densidad de carga

( $Q_0$ ) en la reducción. El mínimo de Burshtein es utilizado para calcular el potencial máximo que tiene que ser alcanzado, pues si llegamos hasta potenciales más positivos, formaremos más óxidos y en la lectura de la reducción de ese óxido se obtendrá un error en el cálculo de el área activa pues el pico de catódico será mayor porque mas óxido es reducido.

La determinación del área activa de electrodo de oro se basa en el área de la corriente de cátodo que representa la eliminación de una superficie monocapa de oxígeno. Así, el área se determina por la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{1}{v} \int_{T_i}^{T_f} I dE$$

La corriente capacitiva puede generar error en el cálculo de la superficie real debido a una pequeña región de acumulación de carga interfacial (zona de la doble capa eléctrica). Por lo tanto debe integrarse la correspondiente respuesta actual a la región del condensador de doble capa y sacarlo de la obtención de:

$$Q = \frac{1}{v} \int_{T_i}^{T_f} I dE - Q_{dc} \quad (\text{eq. 2})$$

En el que  $Q_{dc}$  es la capacidad de carga de la doble capa y el "v" constante es una constante específica para el oro ( $400 \text{ mC cm}^{-2}$ ), resultando en la tabla 2

TABLA N° 2: Cálculo del área superficial de oro

| Área del eletrodo sólido de Au ( $\text{cm}^2$ ) | Área de $\text{Au}_{\text{nano}}$ ( $\text{cm}^2$ ) | Razon área $\text{Au}_{\text{nano}}$ / área sólido |
|--|---|--|
| 0,2024   | 3,2051  | 15,8   |

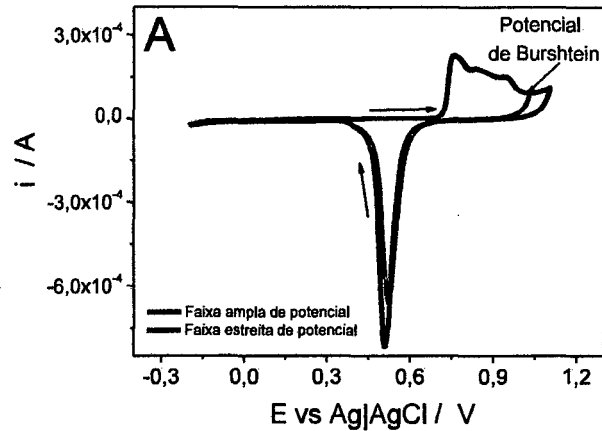


Figura 23: Voltagrama del electrodo de oro en una solución  $H_2SO_4$  0.1M

Existe otra forma para calcular área utilizada para diferentes metales, sin embargo en este trabajo se realizó utilizando la carga del pico catódico, pero por una cuestión de información se desarrollara a continuación.

Para la determinación del área microscópica de la superficie de oro se utiliza puede ser utilizado la ecuación de Randles-Sevcik para tal proceso reversible.

$$I = 2.69 \times 10^{-5} (A.s. mol^{-1} V^{1/2}) n^{1/2} A C_o D_R^{1/2} v^{1/2}$$

donde I es la corriente del pico anodico , n es el numero de electrones/mol., A es el area activa,  $D_R$  es el coeficiente de difusion,  $C_o$  concentracion de  $K_3Fe(CN)_6$ , v es la velocidad de barrido.

Una grafica de  $v^{1/2}$  vs  $I_{pico}$  para una reacción en la que la unica incognita sea el A y que se conosca los demas parametros seria muy util, es asi que se escoje el par redox ferri/ferro que ha sido muy estudiado y los datos de difusion  $D_R$  son conocidos, asimismo el número de electrones es 1 y la concentración es establecida. Asi fue realizado una grafica de I vs E (figura 24) y que fue rediseñada en otro grafico I vs  $v^{1/2}$  (figura 25) para mejor observación.

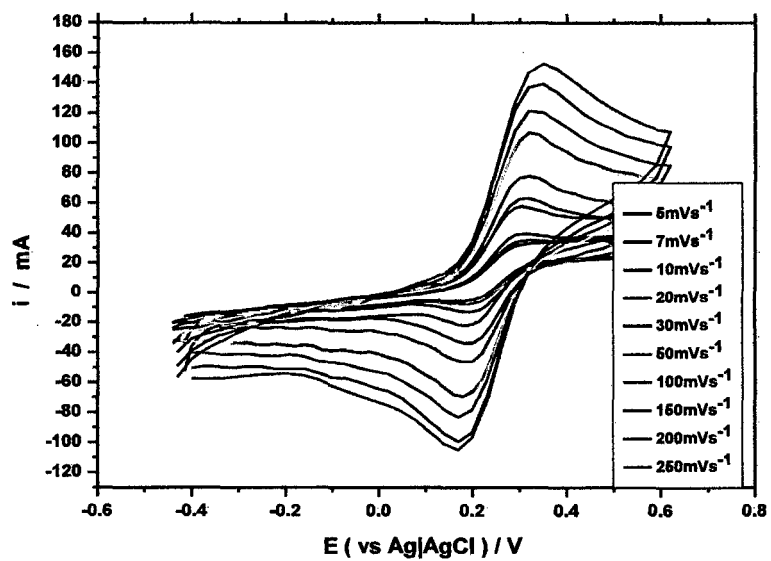


Figura 24: Voltametría cíclica de  $0.1\text{M K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  sobre electrodo de oro en una solución de  $\text{KCl } 1\text{M}$  y scan rate  $5\text{-}250\text{ mVs}^{-1}$

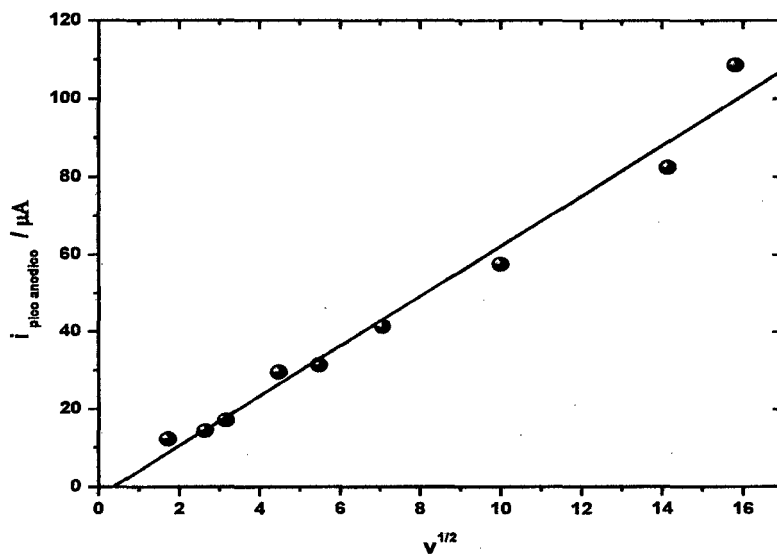


Figura 25: Relación entre la corriente con la velocidad de barrido de la grafica anterior.

Fue encontrado y realizado el cálculo en la ecuación de Randles encontrándose un valor para el área de oro de  $0.20 \text{ cm}^2$  (24% mas grande que el electrodo de oro)

Fue calculado el factor de rugosidad definido de la siguiente manera

$$FR = \frac{\text{Area Real}}{\text{Area Geométrica}}$$

$$FR = \frac{0,20 \text{ cm}^2}{0,16 \text{ cm}^2} = 1,4$$

Se intentaron realizar otros metodos para la formación de rugosidad descritos en la literatura donde se aplica un potencial en forma de pulso, mostrado en la figura 26, sin embargo para garantizar el mismo área superficial encontrada por nuestro método descrito, se tuvo que realizar un procedimiento de aproximadamente 7 horas, e inclusive existen articulos que reportan realizar el procedimiento hasta 24 horas para alcanzar superficies ordenadas estables y homogéneas, así nuestro procedimiento podría ser considerado ventajoso en cuestión de tiempo del procedimiento a realizar para obtener esas mismas áreas superficiales.

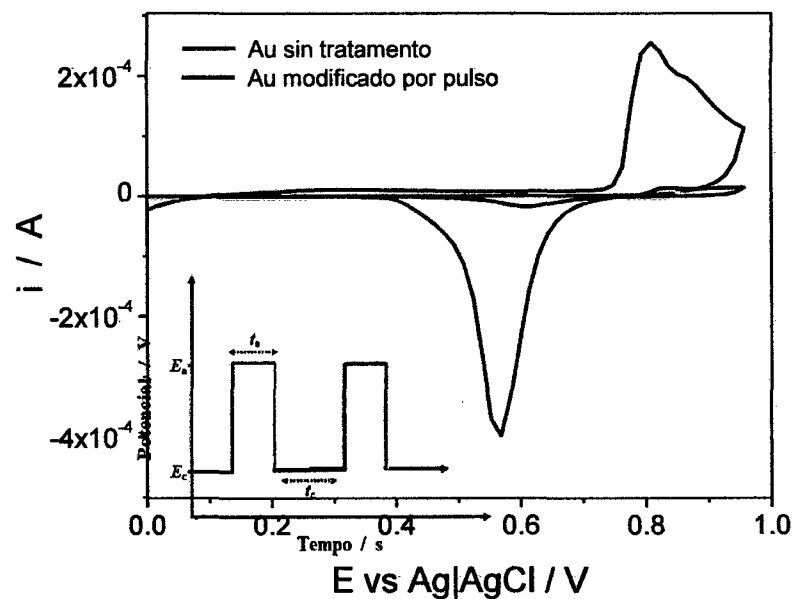


Figura 26: Voltograma cíclico de oro realizado por pretratamiento alternativo

## FORMACIÓN DE MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS (SAM-Cys)

La figura 27 permite mostrar la formación de la monocapa autoensamblada Au-Cys donde se observa el pico de reducción a -700mV mostrándose la desorción reductiva de un electrón en la superficie del electrodo de Au. Los tioles son desorvidos reductivamente según la siguiente reacción:

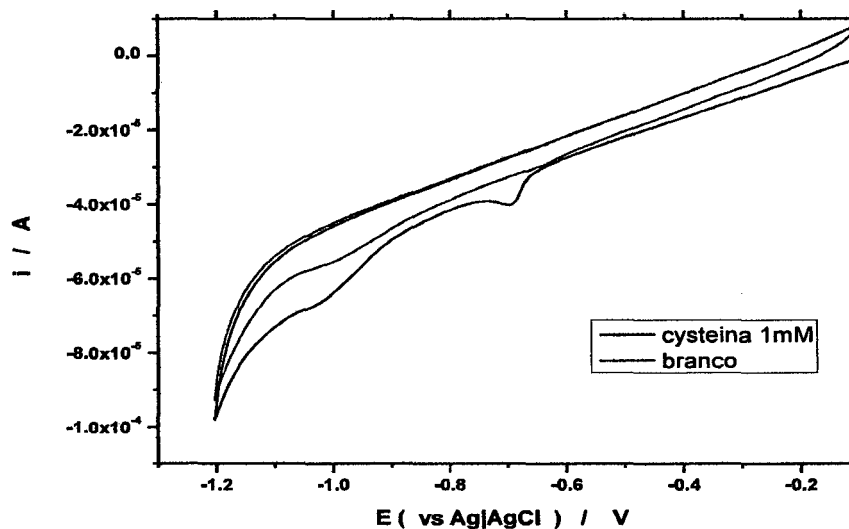
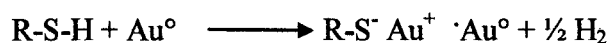


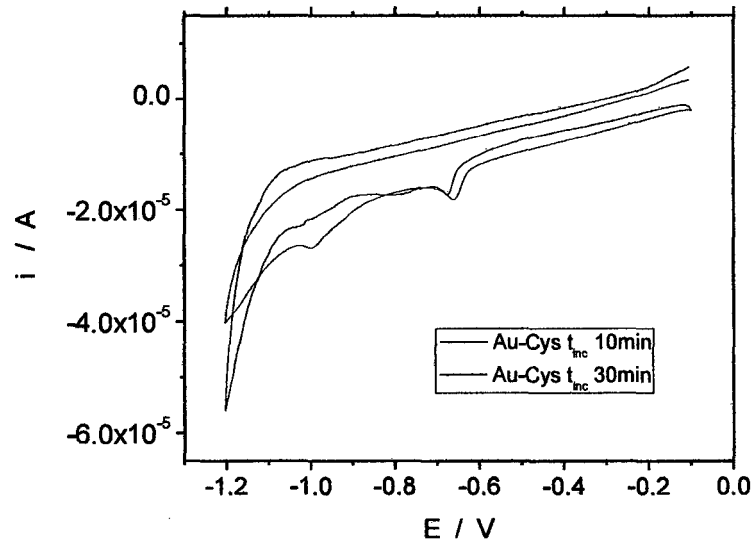
Figura 27: Voltametría cíclica de la desorción reductiva de la cisteína auto ensamblada realizado en una solución de KOH 0.5M (scan rate  $100\text{mVs}^{-1}$ )

Asimismo se realizó previamente la optimización de la formación de la monocapa autoensamblada Au-Cys obteniéndose los valores reportados en la tabla a continuación presentada:

TABLA N° 3: Parámetros que influyen en la formación de SAM's

| Parámetros optimizados    | Resultados |
|---------------------------|------------|
| Tiempo de incubación      | 10 min     |
| Concentración de cisteína | 1mM        |
| Solvente de la solución   | Agua       |

La optimización de la monocapa autoensamblada fue realizada teniendo en cuenta la señal del pico de reducción de la cisteína tal como se presenta a continuación:



**Figura 28:** Voltametría cíclica de la desorción reductiva de la cisteína con tiempo de incubación 10min (línea roja), 30min (línea negra) realizado en una solución de KOH 0.5M (scan rate  $100\text{mVs}^{-1}$ )

En la figura 28 se muestra que el pico de desorción del Au-Cys, donde el oro fue incubado en una solución de cisteína 1mM por un tiempo de 10 minutos presentó una mejor señal de corriente. Asimismo, fue realizada la optimización de los parámetros escogiéndose los parámetros ya indicados anteriormente.

#### **ESTABILIDAD DE LAS MONOCAPAS AUTOENSAMBLADA ( Au-Mety)**

Se sabe que se puede formar monocapas de tioles en superficies de oro y que dependerá de la mejor interacción que exista entre la superficie del electrodo y las moléculas del tiol para que la monocapa sea mas compacta, así se realizó un estudio para comprobar de manera rápida que la formación de monocapas depende del tiol. Asimismo, se utilizó metionina 1mM, tiempo de inmersión de 10 min. en solución acuosa para dar a la formación de la SAM (Au-Mety) mostrado el perfil voltamogramico figura 29 donde se muestra la desorción reductiva del grupo tiol a un potencial de -600mV.

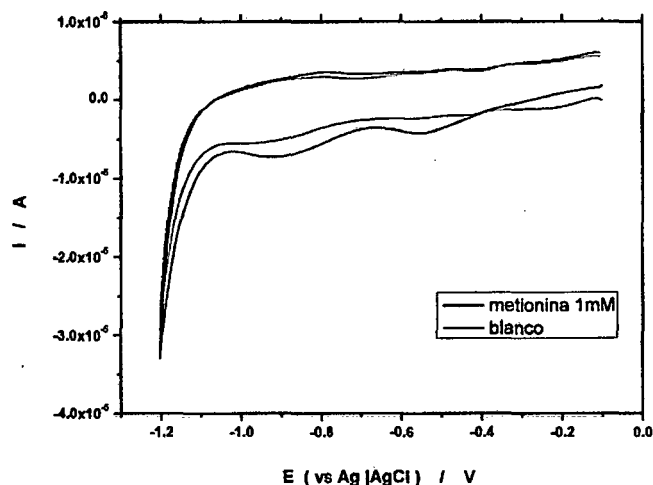


Figura 29: Voltagrama de la SAM ( Au-metionina 1mM) en una solución de KOH 0.5M con una velocidad de barrido de 0.100 V/s respecto al electrodo de referencia Ag|AgCl

Asimismo, se observa que la altura del pico de la corriente reductiva es menor en la metionina en comparación con la cisteína, esto debido a que la metionina al unirse con la superficie de oro presenta un impedimento estérico entre cadenas adyacentes, permitiendo así que la densidad de monocapas sea menos, lo cual muestra que los tioles ramificados son menos favorecidos para formar monocapas compactas, por ello para estudios posteriores será formado SAM's de Au con cisteína.

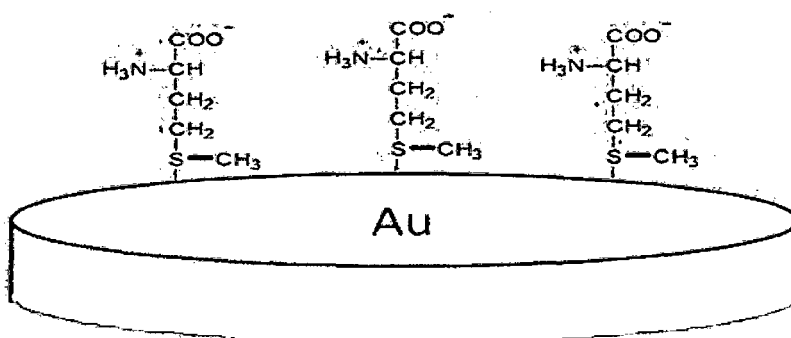


Figura 30: Esquema de la impedimento estérico de la formación de SAM ( Au-Cys)

La figura 31 muestra la caracterización de la formación de monocapas autoensambladas de Au con cisteína en donde observamos que la microscopia de barrido muestra que algunas áreas presentan un defecto en la SAM sin embargo de manera general la morfología persiste y será necesario utilizar otros tipos de caracterizaciones para poder afirmar que el Au-Cys ha sido formado.



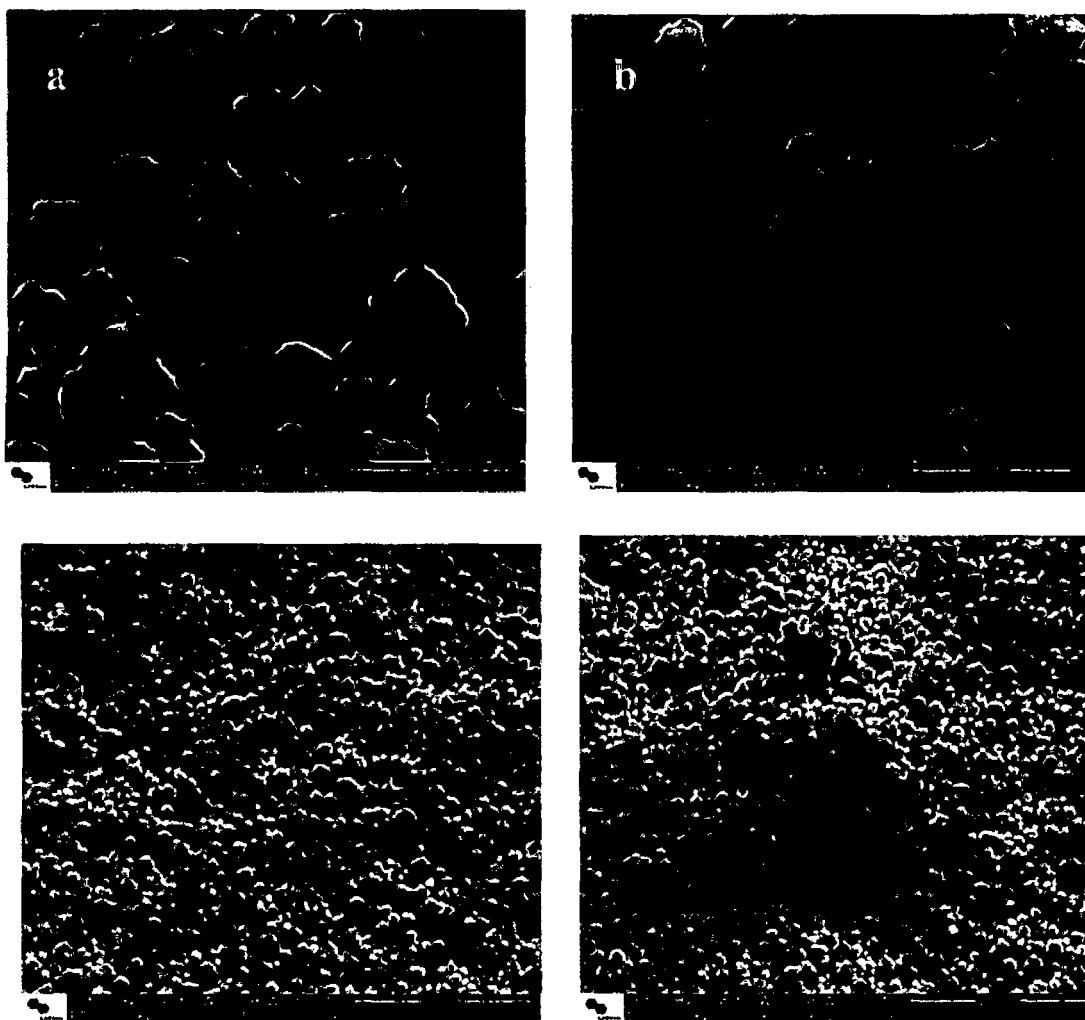
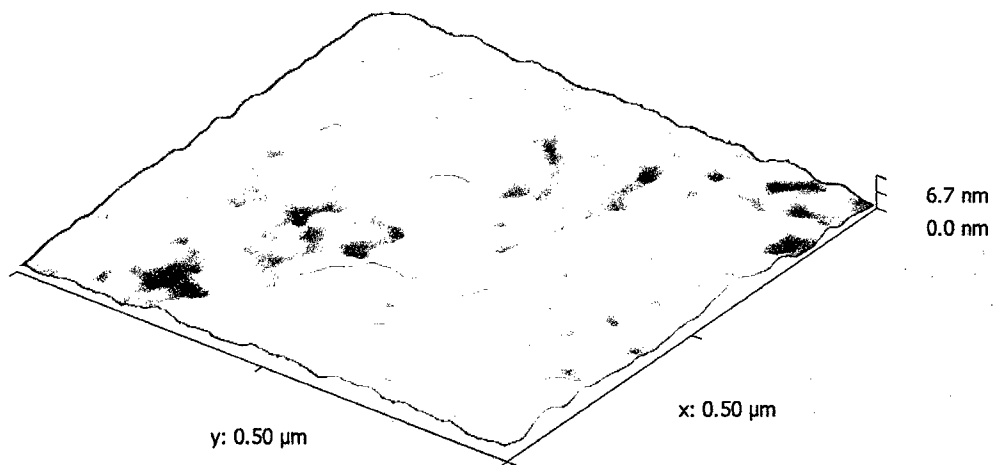


Figura 31: imagen SEM del electrodo de oro (a) sin cisteína , (b) con cisteína

La figura 32 muestra las imágenes de AFM de la SAM formada, observamos que la superficie presenta aun rugosidad, lo cual hace que tenga mayor área superficial que una superficie lisa, esto debido a la terminación del grupo tiol, en nuestro caso el empleo de cisteína hace que el tiol termina en una molécula  $-\text{COOH}$  el cual es una molécula más voluminosa lo cual hace que la superficie presente deformación.



**Figura 32: Microscopia de fuerza atómica de la monocapa Au-Cisteína**

### **Estudio de la monocapa autoensamblada Au-Cys por impedancia**

Fue realizado un estudio de impedancia para el sistema oro con cisteína mostrado en la figura 33 donde podemos observar los cambios que se produce al modificar la superficie del oro. La resistencia de transferencia electrónica y la impedancia aumentan debido a la dificultad que se tiene por la presencia de cisteína en la superficie de oro.

Del grafico 33 podemos obtener la resistencia de la solución ( $347\Omega$ ) y la resistencia de transferencia de carga ( $R_{TC}$ )  $37k\Omega$  y  $30 k\Omega$  para la monocapa de oro con cisteína y del oro respectivamente, mostrando que la cisteína ha sido depositado (quimisorción) sobre el electrodo de oro presentando una mayor resistencia a la transferencia electrónica.

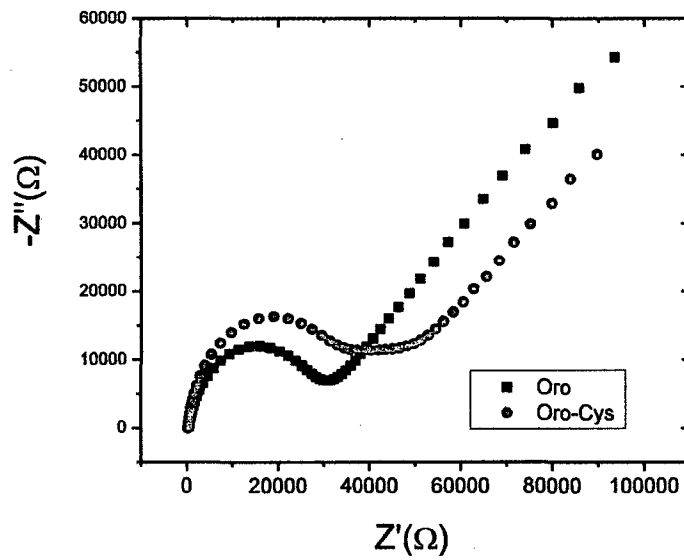


Figura 33: Espectroscopia de Impedancia de la superficie de oro (negro) y de Au-Cys (rojo) en una solución de tampón fosfato pH 7 con amplitud de perturbación de 10mV.

### Determinación de metronidazol

La figura 34 siguiente muestra un esquema en forma general como fue realizada la detección de metronidazol

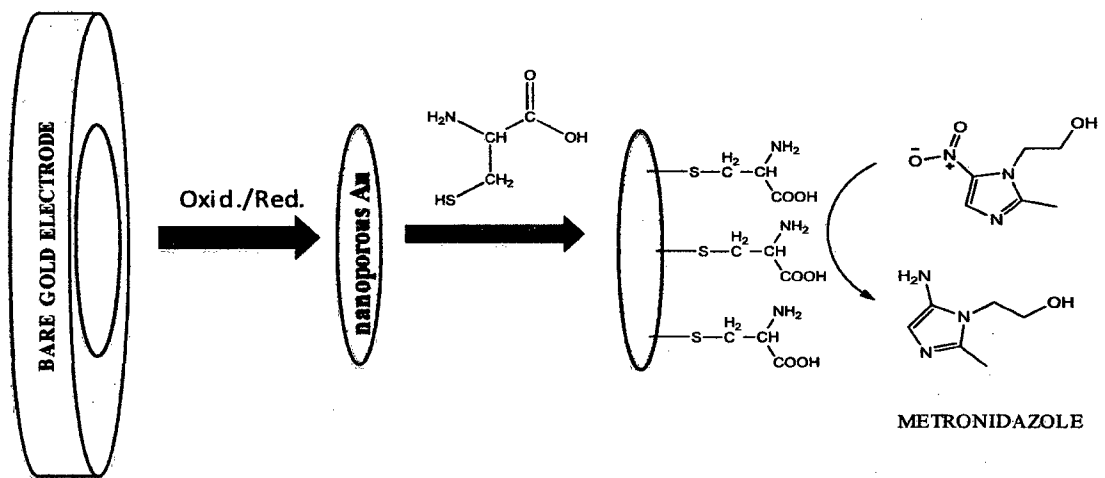


Figura 34: Esquema general de la respuesta del sensor

## ESTUDIO DE LA VARIACION DEL pH

El potencial del pico catódico depende del pH de la solución buffer, es así que la figura 35 muestra como varía el voltograma del metronidazol dependiendo del pH, observamos que a pH ácidos el potencial del pico tiende a ser más positivo, asimismo se observa en la figura 36 la relación entre pH y el potencial es de forma inversa, al aumentar el pH el potencial del pico catódico se desplaza a potenciales negativos, también puede observarse que no existe un aumento en la corriente catódica.

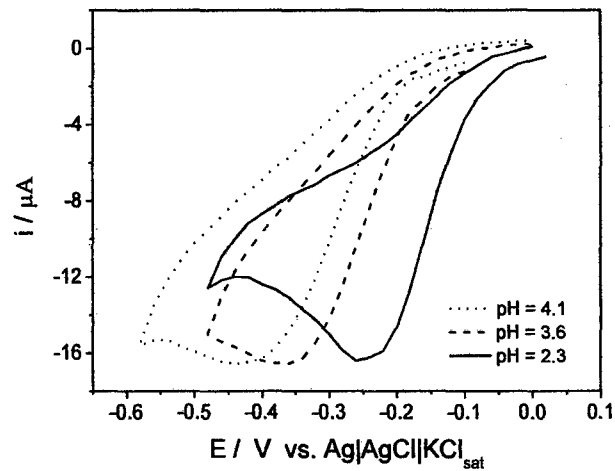


Figura 35: Efecto del pH en la respuesta del sensor Au-Cys a metronidazol en un buffer Britton-Robinson

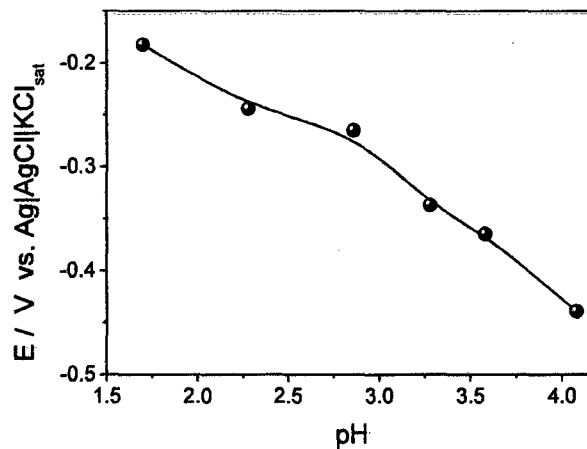


Figura 36: Relación que existe en la respuesta del sensor entre el potencial y el pH

## ESTUDIO DE SELECTIVIDAD DE LA SAM (Au-Cys)

El estudio de la selectividad de la SAM fue realizada mediante voltametría cíclica en diferentes compuestos, así la figura 37 muestra que la SAM responde frente a los grupos nitros de los diferentes compuestos analizados, presentando el pico de reducción resultado de la reducción de  $-\text{NO}_2$  a  $-\text{NH}_2$ , asimismo también la SAM formada presenta una mayor corriente catódica, frente a secnidazol y metronidazol, ambos pertenecen a la familia de los imidazoles, lo cual indica que es más selectivo a este grupo de familia por los componentes que la envuelve. Asimismo fueron analizados otros compuestos como lidocaina, diclofenaco sodico, ranitidina hidrocloreto, 2-nitro-parafenilendiamina, y 4-nitro-*o*-fenilendiamina, los cuales no presentaron alguna respuesta.

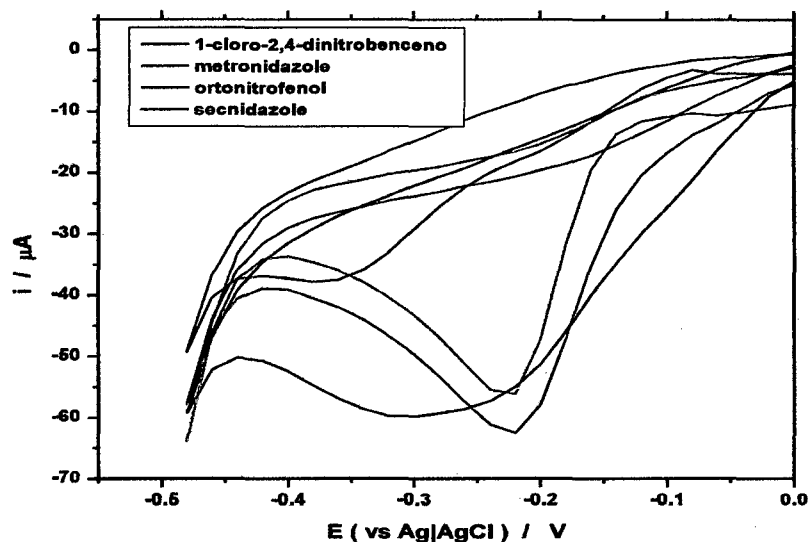


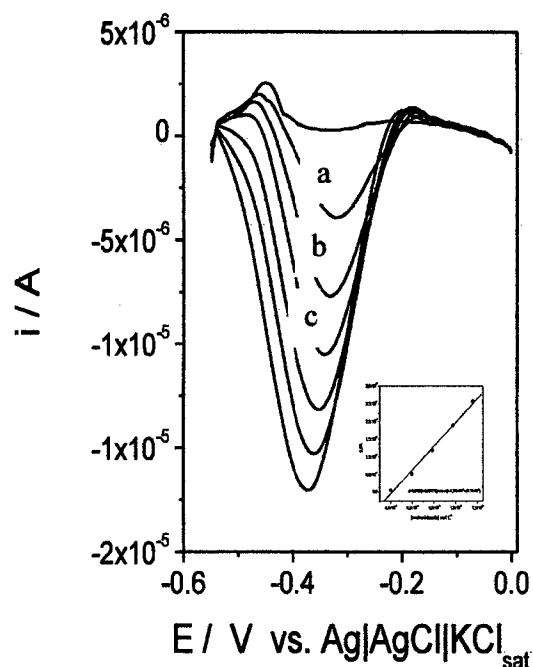
Figura 37: Voltamograma de diferentes compuestos (1-cloro-2,4-dinitrobenceno, metronidazol, ortonitrofenol, secnidazol) en una concentración de 200  $\mu\text{M}$  en buffer Britton-Robinson pH 3.5

### Cuantificación del metronidazol

Fue utilizado la Voltametría de onda cuadrada, previamente optimizado los parámetros de la técnica ( $E_{\text{step}}=10\text{mV}$ , Frecuencia =60 Hz y Amplitud=100mV), debido a que es una técnica muy sensible y rápida. El cálculo del límite de detección fue realizado a partir de una curva de calibración de los datos de la figura 38.

$$\Delta i (\mu\text{A}) = 1.7 \times 10^{-6} (\pm 2.0 \times 10^{-7}) + 6.0 \times 10^{-2} (\pm 1.2 \times 10^{-3}) C_{\text{MTZ}}$$

Los límites de detección y cuantificación fueron  $2.6 \mu\text{mol L}^{-1}$  y  $8.6 \mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente. Además el sensor mostró una respuesta lineal entre  $50 - 300 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 38:** Respuesta en SWV para MTZ en condiciones optimizadas. Medidas llevadas a cabo en  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  BR buffer (pH 2.0),  $f = 60 \text{ Hz}$ ,  $a = 100 \text{ mV}$ ,  $\Delta E = 10 \text{ mV}$ . (a)  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  BR buffer; (b)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  MTZ; (c)  $101 \mu\text{mol L}^{-1}$  MTZ; (d)  $151 \mu\text{mol L}^{-1}$  MTZ; (e)  $199 \mu\text{mol L}^{-1}$  MTZ; (f)  $245 \mu\text{mol L}^{-1}$  MTZ and (g)  $295 \mu\text{mol L}^{-1}$  MTZ.

**Aplicación:** Determinación de metronidazol en muestras reales

Se determinó metronidazol mediante la técnica de Cronoamperometría, como muestra la figura 39 donde al adicionar la muestra de metronidazol la corriente catódica aumenta proporcionalmente a la concentración, así se adiciona en un comienzo una concentración conocida de metronidazol patrón (  $100 \mu\text{L}$  de Metronidazol  $7.2 \text{ mM}$  ) , para posteriormente se adiciona la muestra conteniendo una cantidad X de metronidazol generando nuevamente el aumento de la corriente catódica (por presencia de grupos nitro) y así nuevamente se adiciona  $100 \mu\text{L}$  de metronidazol  $7.2 \text{ mM}$  , así la corriente reductiva es proporcional a la concentración adicionada.

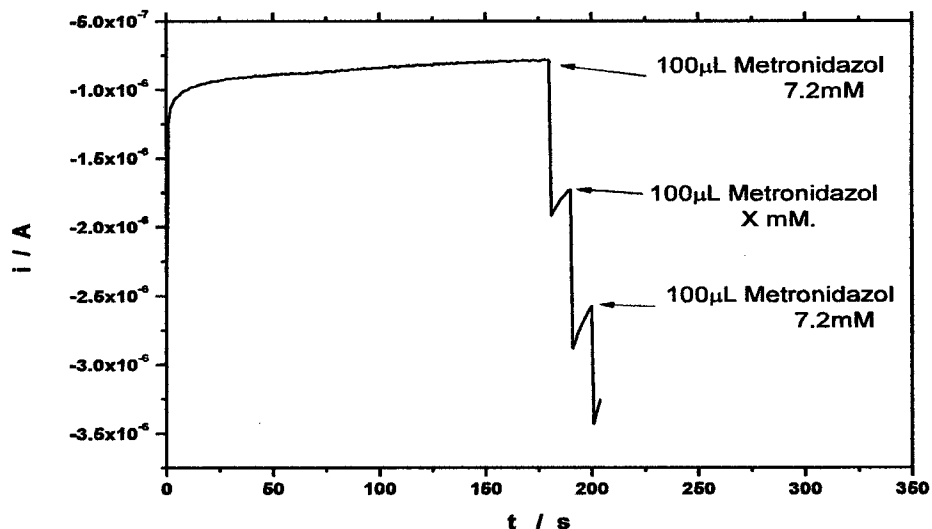


Figura 39: Cronoamperometria de la respuesta del sensor a metronidazol en un buffer BR 0.1 M

En seguida se muestra en la tabla 4 los resultados obtenidos por Cronoamperometría, donde se puede observar que el sensor obtiene una respuesta muy próximo al valor nominal, reportados en los medicamentos comerciales, sin embargo para la muestra en suspensión, el sensor presenta una respuesta más baja, debido a que el analito indicado en dicha muestra es un análogo estructural al reportado en esta tesis.

Tabla N° 4: Determinación de metronidazol en diversos tipos de medicamentos comerciales

| Muestras                             | Cantidad |            | Respuesta(%) |
|--------------------------------------|----------|------------|--------------|
|                                      | Nominal  | Encontrada |              |
| Pastilla / mg pastilla <sup>-1</sup> | 250      | 245.3      | 98.1 ± 1.5   |
| Suspensión* / mg mL <sup>-1</sup>    | 40       | 17.7       | 44.2 ± 0.5   |
| Crema / mg g <sup>-1</sup>           | 100      | 99.4       | 99.4 ± 2.3   |

Se realizó también el análisis en una muestra fortificada, con una concentración del fármaco conocida, y se determinó que la recuperación fue de 93.4% en muestra de orina y 89.3% en muestra de plasma sanguíneo, estos valores se difieren debido posiblemente a la complejidad de la muestra analizada.

**TABLA N° 5: Determinación de metronidazol en muestras biológica**

| Muestras         | Concentración (mmol L <sup>-1</sup> ) |            | Recuperación (%) |
|------------------|---------------------------------------|------------|------------------|
|                  | Adicionada                            | Encontrada |                  |
| Orina            | 7.20                                  | 6.72       | 93.4 ± 0.8       |
| Plasma sanguíneo | 1.98                                  | 1.73       | 89.3 ± 2.1       |



**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## CONCLUSIONES

- Este trabajo presentó un método simple para obtener superficies de oro nanoestructuradas, realizado por anodización (2V, 180s) y reducción electroquímica (Voltametría lineal de 2 – 0.2V).
- Se determinó las variables que determinan una monocapa autoensamblada compacta (aminoácido escogido cisteína con una concentración  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , tiempo de inmersión 10 min.)
- Se caracterizó las monocapas autoensambladas mediante Voltametría cíclica, demostrando la formación de la SAM (Au-Cys) por los picos de reducción del enlace Au-SR y se caracterizó morfológicamente por AFM y SEM, sin embargo no pudo observarse cambio morfológico entre Au y Au-Cisteína.
- Se determinó metronidazol en muestras reales de plasma y de orina fortificadas con el analito obteniéndose valores de recuperación de 89 y 93%.
- La respuesta del sensor tiene un intervalo linear  $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  -  $300 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  y un límite de detección y de cuantificación de  $2.6 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $8.6 \mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente. El sensor presentó alta selectividad para compuestos con grupos que tienen grupos nitroimidazoles.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Ding, Y.; Chen, M. W.; Erlebacher, J. Metallic mesoporous nanocomposites for electrocatalysis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, v. 126, pp.6876.
- [2] Bonroy, K.; Friedt, J.-M.; Frederix, F.; Laureyn, W.; Langerock, S.; Campitelli, A.; Sara, M.; Borghs, G.; Goddeeris, B.; Declerck, P. Realization and characterization of porous gold for increased protein coverage on acoustic sensors, *Anal. Chem.* **2004**, v. 76, pp. 4299.
- [3] Kramer, D.; Viswanath, R. N.; Weissmüller, J. Surface-stress induced macroscopic bending of nanoporous gold cantilevers, *Nano Lett.* **2004**, v. 4, pp. 793.
- [4] Shin, H. C.; Dong, J.; Liu, M. L. Nanoporous structures prepared by an electrochemical deposition process, *Adv. Mater.* **2003**, v. 15, pp. 1610.
- [5] Luo, H.; Sun, L.; Lu, Y.; Yan, Y. S. Electrodeposition of mesoporous semimetal and magnetic metal films from lyotropic liquid crystalline phases. *Langmuir* **2004**, v. 20, pp. 10218-10222.
- [6] Zhang, H.; Hussain, I.; Brust, M.; Cooper, A. I. Emulsion-templated gold beads using gold nanoparticles as building blocks, *Adv. Mater.* **2004**, v. 16, pp. 27.
- [7] Walsh, D.; Arcelli, L.; Ikoma, T.; Mann, J. T. Dextran templating for the synthesis of metallic and metal oxide sponges, *Nat. Mater.* **2003**, v. 2, pp. 386-390.
- [8] Shchukin, D. G.; Caruso, R. A. Template synthesis of porous gold microspheres, *Chem. Commun.* **2003**, pp. 1478.
- [9] Gong, F. C.; Zhang, X. B.; Guo, C. C.; Shen, G. L.; Yu, R.Q. Amperometric metronidazole sensor based on the supermolecular recognition by metalloporphyrin incorporated in carbon paste electrode, *Sensors* **2003**, v. 3, pp. 91.
- [10] Roe, F. Safety of nitroimidazoles, *Scand. J. Infect. Dis.* **1985**, v. 46, pp.72.
- [11] Thall, D.; Rosner, G.; Azuma, C.; Mc Entee, M.; Raleigh, J. Hypoxia marker labeling in tumor biopsies: quantification of labeling variation and criteria for biopsy sectioning, *Radiotherapy & Oncology* **1997**, v. 44, pp. 171-176.

- [12] Riché, F.; du Molinet, A.; Sèpe, S.; Riou, L.; Fagret, D.; Vidal, M. Nitroimidazoles and hypoxia imaging: synthesis of three technetium-99m complexes bearing a nitroimidazole group: biological results, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, v. 11, pp. 71-74.
- [13] Edwards, D.I. *Progress Med. Chem.* **1981**, v. 18, pp. 87.
- [14] Bone, W.; Jones, N.; Kamp, G.; Yeung, C.; Cooper, T. Effect of ornidazole on fertility of male rats: inhibition of a glycolysis-related motility pattern and zona binding required for fertilization in vitro, *Reprod. Fertility* **2000**, v. 118, pp. 127-135.
- [15] Menéndez, D.; Rojas, E.; Herrera, L.; Lopez, M.; Sordo, M.; Elizondo, G.; Ostrosky-Wegman, P. DNA breakage due to metronidazole treatment, *Mut. Res.* **2001**, v. 478, pp. 153-158.
- [16] Hrelia, P.; Fimognari, C.; Maffei, F.; Brighenti, B.; Garuti, L.; Burnelli, S.; Cantelli, G. Synthesis, metabolism and structure-mutagenicity relationships of novel 4-nitro-(imidazoles and pyrazoles) in *Salmonella typhimurium*. *Mut. Res.* **1998**, v. 397, pp. 293-301.
- [17] Trinh, S.; Reisset, G. Mutagenic action of 5-nitroimidazoles: in vivo induction of GC→CG transversion in two *Bacteroides fragilis* reporter genes, *Mut. Res.* **1998**, v. 398, pp. 55-65.
- [18] Viodé, C.; Battache, N.; Cenas, N.; Krauth-Siegel, L.; Chauviere, G.; Bakalara, N.; Perie, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, v. 57, pp. 549-557.
- [19] Mason, R. P.; Holtzman, J. L. The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates, *Biochem.* **1975**, v. 14, pp. 1626-32.
- [20] Mason, R. P.; Holtzman, J. L. The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1975**, v. 67, pp. 1267-74.
- [21] Mason, R. P. Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals, en: W.A. Prior (Ed.), *Free radicals in Biology*, Vol.5, Academic Press, New York, 1982, pp.161.

- [22] Squella, J. A.; Mosre, J.; Blázquez, M.; Núñez-Vergara, L. J. Cyclic voltammetric study of the nitro radical anion from nitrendipine generated electrochemically, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, v. 319, pp. 177.
- [23] Núñez-Vergara, L. J.; Bollo, S.; Alvarez, A.; Blázquez, M.; Squella, J.A. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, v. 345, pp. 121.
- [24] Bollo, S.; Núñez -Vergara, L. J.; Navarrete, P.; Squella, J. A. Cyclic voltammetric determination of free radical species from nitroimidazopyran: a new antituberculosis agent, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, v. 494, pp. 69.
- [25] Tocher, J. H.; Edwards, D.I. *Int. J. Radiat. Biol.* **1990**, v. 57, pp. 45.
- [26] Squella, J. A.; Solabarrieta, C.; Núñez -Vergara, L. J.; *Chem-Biol. Interact.* **1993**, v. 89, pp. 197.
- [27] Tocher, J. H.; Edwards, D.I. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, v. 50, pp. 1367.
- [28] Church, D.; Rabin, H.; Laishley, E. Reduction of 2- , 4- and 5-nitroimidazole drugs by hydrogenase 1 in *Clostridium pasteurianum*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1990**, v. 25, pp. 15-23.
- [29] Dumanovic, D.; Volke, J.; Vajgand, V. Simultaneous polarographic determination of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole, 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-4-nitroimidazole and 2-methyl-5-nitroimidazole, *J. Pharm. Pharmacol.* **1966**, v. 18, pp. 507.
- [30] Ozcan, S. A.; Senturk, Z.; Biryol, I. Determination of ornidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at an activated glassy carbon electrode, *Int. J. Pharm.* **1997**, v. 157, pp. 137.
- [31] Radi, A. S.; Laban, E. I.; El-Kourashy, Abdel-Ghany; Electrochemical reduction of secnidazole and its determination in tablets, *Electroanalysis* **1997**, v. 9, pp. 625-628.
- [32] Okzan, S.A. Voltammetric determination of tinidazole of tablets, *Analisis* **1997**, v. 25, pp. 130.

- [33] Bollo, S.; Núñez-Vergara, L. J.; Bontá, M.; Chauviere, G.; Perie, J.; Squella, J.A. Polarographic reduction of megalol and derivatives, and its polarographic, uv spectrophotometric, and HPLC determination, *Electroanalysis* **2001**, v. 13, pp. 936
- [34] Tocher, J. H.; Edwards, D. I. *Free. Radical Res. Commun.* **1992**, v. 16, pp. 19.
- [35] Tocher, J. H.; Edwards, D. I. *Free. Radical Res. Commun.* **1990**, v. 9, pp. 49.
- [36] Barety, D.; Resibois, B.; Vegoten, G.; Moschetto, Y. Electrochemical behaviour of nitroimidazole derivatives in dimethylsulphoxide, *J. Electroanal. Chem.* **1984**, v. 162, pp. 335-341.
- [37] Bollo, S.; Núñez-Vergara, L.J.; Bontá, M.; Chauviere, G.; Perie, J.; Squella, J. A. Nitroradical Anion Formation from some Iodo-Substituted Nitroimidazoles *J. Electroanal. Chem.* **2001**, v. 511, pp. 46.
- [38] Arguelho, M. L.; Silva, G.; Stradiotto, N. Electroreduction of Benznidazole in Dimethylsulfoxide, *J. Electrochem. Soc.* **2001**, v. 148, n.2, D1-D3.
- [39] Roffia, S.; Gottardi, C.; Vianello, E. Electrochemical behaviour of 4-nitroimidazole and 2-methyl-5-nitroimidazole Autoprotonation of anion radical and redox-catalysed reduction of the supporting electrolyte cation, *J. Electroanal. Chem.* **1982**, v. 142, pp. 263-275.
- [40] Carbajo, J.; Bollo, S.; Núñez-Vergara, L. J.; Campero, A.; Squella, J. A. Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media, *J. Electroanal. Chem.* **531**, 187-194 (2002)
- [41] Vives, E. A.; Ventriglia, M. V.; Medvedovsky, D.; Rothlin, R. Nitroimidazoles y nitrofuranos, *Farmacología II*. 2004.
- [42] L. Ristic. *Sensor technology and devices*, ed. I. Artech House. (1994), Norwood.
- [43] N. Graber, H. Ludi, H.M. Widmer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1 (1990) 239.
- [44] W.H. Göpel; J.N. Zemel. *Sensors. A comprehensive Survey. Vol 1*, ed. W. VCN. (1989).
- [45] W.H. Göpel; J.N. Zemel. *Sensors. A comprehensive Survey. Vol 2*, ed. W. VCN.

(1991).

- [46] B. Egdins. *Biosensors, an introduction.*: John Wiley & Sons Ltd (1996).
- [47] Ulman, A. *Introduction to thin organic films: from Langmuir- Brodgett to self-assembly*, Academic Press: Boston, 1991. pp. 305.
- [48] *Interfacial Design and Chemical sensing*, ACS Symposium Series 561; Malouk, T. E. Harrison, D. J., Eds. ; American chemical society; Washington D. C. ; 1994
- [49] Ulman, A. *Chem. Rev.*; **1996**, v. 96, pp. 1533.
- [50] Zhong, C-J.; Porter, M. D. Designing interfaces at the molecular level, *Anal. Chem.* **1995**, v. 67, pp. 709A
- [51] Dubois, L. H; Nuzzo, R. G. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, v. 43, pp. 437-463.
- [52] Rowe, G. K.; Creager, S. E. Redox and ion-pairing thermodynamics in self-assembled monolayers, *Langmuir* **1991**, v. 7, pp. 2307.
- [53] Ulman A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films*, Academic Press: Boston, 1991, pp. 101.
- [54] Nuzzo R. G.; Allara, D.L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, v. 105, pp. 4481.
- [55] Nuzzo R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D.L. Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, v. 109, pp. 2358.
- [56] Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D.; Chidsey, C. E. D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, v.109, pp. 3559.
- [57] Love, J. C. Estroff, L. A. ; Kriebel, J. Nuzzo, R. G. ; Whitesides, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem. Rev.* **2005**, v. 105, pp. 1103.

- [58] Vericat, C. ; Vela M. E. ; Benitez, G. A. ; Martin Gago, J. A. ;Torrelles, X. ; Salvarezza, R. C. Surface characterization of sulfur and alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111), *J Phys. : Condens Matter* **2006**, v. 18, R867.
- [59] Ulman, A.; An Introduction to ultrathin Organic Films: From Lagmouir-Blodgett to Self- Assembly. Academic Press: San Diego, 1991, pp. 237.
- [60] Nuzzo, R. G.; Allara, D. L., Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, v. 105, pp. 4481-83.
- [61] Cohn-Atiya, M. ; Mandler, D., Studying Electron Transfer through Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on A Hanging Mercury Drop Electrode Using Potentiometric Measurements, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, v. 267, pp. 550-551.
- [62] Miller, C.; Gratzel, M., Electrochemistry at .omega.-hydroxythiol coated electrodes. 2. Measurement of the density of electronic states distributions for several outer-sphere redox couples, *J. Phys. Chem.* **1991**, v. 95, pp. 5225-5233.
- [63] Gershevit, O.; Sukenik, C. N. In situ FTIR-ATR analysis and titration of carboxylic acid-terminated SAMs, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, v. 126, pp. 482.
- [64] Porter, D.; Bright, T. B.; Allara, D.; Chidsey, C. E. D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, v. 109, pp. 3559.
- [65] Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2a ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2001, pp. 758.
- [66] Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2a ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2001, pp. 778.
- [67] Schmickler, W., *Interfacial Electrochemistry*. Oxford University Press: New York, **1996**, pp 195-206.
- [68] Finklea, H. O., In *electroanalytical chemistry* (Bard, A. J.; Rubinstein, I. Eds.); Marcel Dekker, Inc., 1996, v. 19, pp.221-240.



- [69] Berry, R. S.; Rice, S. A.; Ross, Physical and Chemical Kinetics J. Physical and Chemical Kinetics. 2<sup>a</sup> ed.; Oxford University Press, 2002, pag. 999-1008.
- [70] Marcus, R. A. Electron transfer reactions in chemistry theory and experiment, *J. Electroanal. Chem.* 1996, 438,251.
- [71] Marcus, R. A., Tutorial on rate constants and reorganization energies, *J. Electroanal. Chem.* 2000, 483,2.
- [72] Tour, J. M., *Acc. Chem. Rev.* 2000, v. 33, pp. 791.
- [73] Ratner, M. Pushing electrons around, *Nature* 2000, v. 404, pp. 6774.
- [74] Willner, I.; Katz, E., Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, v. 39, pp. 1180.
- [75] Lahann, J.; Mitragotri, S.; Tran, T-N.; Kaido, H.; Sundaram, J.; Choi, I. S., Hoffer, S.; Somorjai, G.A.; Langer, R., A reversibly switching surface, *Science* 2003, v. 299, pp. 371.
- [76] Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem. Rev.* 1996, v. 96, pp.1533.
- [77] Hasan, M.; Bethell, D.; Brust, M., The fate of sulfur-bound hydrogen on formation of self-assembled thiol monolayers on gold: (1) H-NMR spectroscopic evidence from solutions of gold clusters, *J. Am Chem. Soc.* 2002, v. 124, pp. 1132-1133.
- [78] Widrig, C. A.; Chung, C.; Porter, M. D. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 1991, v. 310, pp. 335-359.

## ANEXOS

### Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La figura 39 muestra el esquema de un instrumento combinado que es a la vez un microscopio de electrones y una microsonda de barrido de electrones. Obsérvese que se utiliza un detector de electrones, mientras que la microsonda utiliza un detector de rayos X.

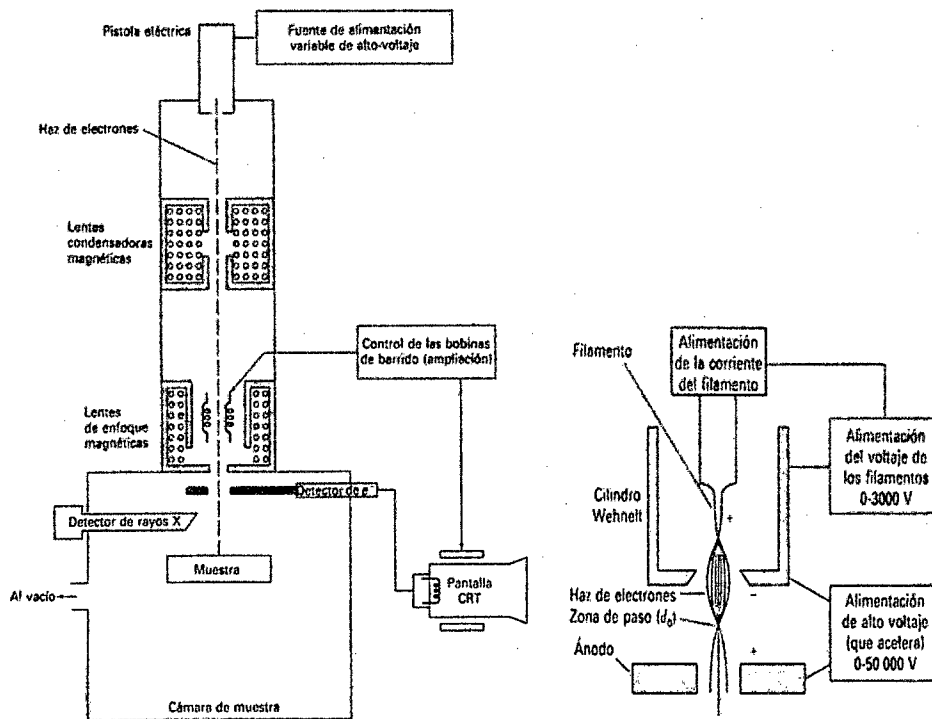


Figura 39: Izquierda: Esquema de SEM. Figura tomada de: D.A. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid (2002) Derecha: Diagrama de bloque de una fuente de filamento de tungsteno. Figura tomada de: D.A. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid (2002)

### Interacción de los haces de electrones con la muestra

La versatilidad del microscopio electrónico de barrido para el estudio de sólidos proviene de la amplia variedad de señales que se generan cuando el haz de electrones interacciona con el sólido. Las interacciones de un sólido con un haz de electrones se pueden dividir en dos categorías: interacciones elásticas que afectan a las trayectorias de los electrones en el haz sin que se alteren significativamente sus energías e interacciones inelásticas, que resultan de transferir al sólido una parte o toda la energía de los electrones. El sólido

excitado emite entonces electrones secundarios, electrones Auger, Rayos X y a veces fotones de longitud de onda larga (catodoluminiscencia).

#### Dispersión elástica

En la dispersión elástica, la colisión de un electrón con un átomo provoca un cambio en la componente de dirección del electrón pero deja virtualmente intacta la velocidad del mismo; por lo tanto la energía cinética del electrón permanece prácticamente constante. El ángulo de desviación de una colisión es aleatorio y puede variar desde  $0^\circ$  hasta  $180^\circ$ . Una simulación obtenida con un ordenador del comportamiento aleatorio de 5 y 100 electrones cuando entran en un sólido perpendicularmente a su superficie con una energía de 20 keV, valor relativamente corriente indica que los electrones penetran hasta una profundidad de 1.5  $\mu\text{m}$  o más. Algunos de los electrones pierden su energía; sin embargo, la mayoría experimenta numerosas colisiones y como resultado, acaban saliendo de la superficie como electrones retrodispersados. Es importante señalar que el haz de electrones retrodispersados tiene un diámetro mucho mayor que el haz incidente; por ejemplo, para un haz incidente de 5 nm, el haz retrodispersado puede tener un diámetro de varios micrómetros. El haz retrodispersado es uno de los factores que limitan la resolución de los microscopios de electrones

#### Interacción inelástica

Electrones secundarios. Se observa que cuando la superficie de un sólido se bombardea con un haz de electrones del orden de varios keV, se emiten de la superficie electrones con energías de menos de 50 eV junto con los electrones retrodispersados. El número de estos electrones secundarios es generalmente de la mitad aproximadamente la quinta o incluso menos en los electrones retrodispersados. Los electrones secundarios, que tienen energías entre 3 y 5 eV, se producen como resultado de interacciones entre los electrones de elevada energía del haz (primarios) y los electrones de la banda de conducción del sólido lo que da lugar a la expulsión de estos electrones con energías de unos pocos electronvoltios. Los electrones secundarios tan solo se pueden producir una profundidad de 5 a 500 Å y forman un haz que tienen un diámetro algo superior al haz incidente. Puede evitarse que los electrones secundarios lleguen al detector desviando ligeramente la posición del mismo. Los electrones

secundarios son los que utilizan comúnmente para la formación de la imagen en el SEM. Emisión de rayos X. la obtención de rayos X característicos, como resultado de la interacción de los electrones con la materia, permite una de las aplicaciones más importantes en los microscopios electrónicos: analizar la composición de la muestra “in situ”, es decir a la vez que observamos su imagen real.

#### **Microanálisis en microscopia electrónica**

La emisión de rayos X característicos cuando un haz de electrones incide sobre una muestra permite, bien analizar muestras muy pequeñas o estudiar áreas muy pequeñas de muestras mayores. Ya que las técnicas convencionales de análisis no permiten esto, el análisis en microscopia electrónica se ha convertido en una técnica muy importante para la caracterización de todo tipo de materiales sólidos

#### **Aplicación de la Microscopia Electrónica**

La microscopia electrónica nos proporciona información morfológica y topografía sobre la superficie de los sólidos que son normalmente necesarios para entender el comportamiento de las superficies. Así, un análisis por microscopia electrónica es a menudo la primera etapa en el estudio de las propiedades de las superficies de un sólido.

Mediante esta técnica se consigue formar y presentar imágenes micrométricas mediante un haz de electrones que se hace incidir sobre la superficie de la muestra como lo mencionamos anteriormente.

Todos los efectos descritos se pueden aprovechar para crear imágenes, ahora bien la formación más común es la debida a electrones secundarios de baja energía.

#### **Microscopia de fuerza atómica**

El Microscopio de Fuerza Atómica monitorea la superficie de la muestra con una punta de radio de curvatura de 20 a 60 nm que se localiza al final de un cantilever. Las fuerzas entre la punta y la muestra provocan la deflexión del cantilever, simultáneamente un detector mide esta deflexión a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la

muestra generando una micrografía de la superficie. La fuerza interatómica que contribuye a la deflexión del cantilever es la fuerza de Van der Waals.

La figura 39 muestra la magnitud de deflexión del cantilever como una función de la distancia entre la punta y la muestra. También, se muestran dos intervalos de operación: de contacto y no contacto. Para el primer intervalo de operación, el cantilever se mantiene a pocos angstroms de la superficie de la muestra y la fuerza interatómica entre el cantilever y la muestra es repulsiva. Para el segundo, el cantilever se mantiene a decenas de angstroms de la superficie de la muestra y la fuerza interatómica entre la punta y la muestra es atractiva.

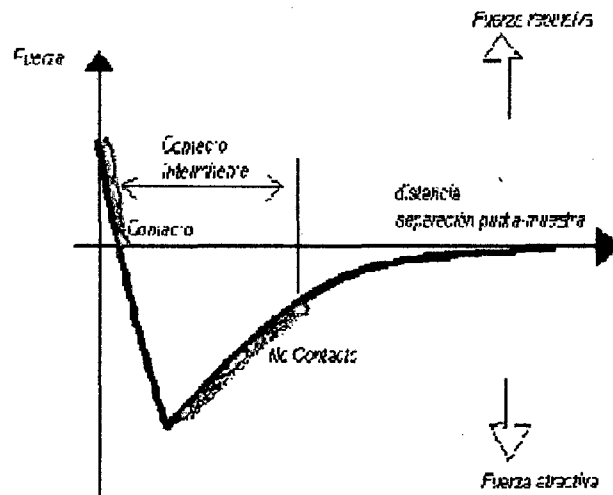


Figura 6: Magnitud de deflexión del cantilever como función de la distancia entre la punta y la muestra.

### Modo de operación de la fuerza atómica

El Microscopio de Fuerza Atómica utiliza múltiples modos de operación de acuerdo a las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir.

*Contacto:* Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie.

*Tapping:* También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.

*Imagen de Fase:* Proporciona una imagen contrastada generada por las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra.

*No Contacto:* Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta.

*Fuerza Magnética:* Mide el gradiente de fuerza magnética sobre la superficie de la muestra.

*Fuerza Eléctrica:* Mide el gradiente de fuerza eléctrica sobre la superficie de la muestra.

*Potencial de Superficie:* Mide el gradiente de campo eléctrico sobre la superficie de muestra.

*Modo Lift:* Técnica que utiliza dos modos de operación usando la información topográfica para mantener la punta a una altura constante sobre la superficie.

*Modulación de Fuerza:* Mide la elasticidad/suavidad relativa de la superficie de las muestras.

*Fuerza Lateral:* Mide la fuerza de fricción entre la punta y la superficie de las muestras.

*Microscopía de Tunelamiento:* Mide la topografía de superficie de la muestra utilizando la corriente de tunelamiento.

*Microscopía Electroquímica:* Mide la estructura de la superficie y las propiedades de los materiales conductores inmersos en soluciones electrolíticas.

*Litografía:* Se emplea una punta especial para grabar información sobre la superficie de muestra