



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Desarrollo de sensores electroquímicos de
afinidad preparados por electrodeposición
para la detección de neurotransmisores

María Porcel Valenzuela



Tesis **Doctorales**

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Departamento de Química Física

Instituto Universitario de Materiales

Facultad de Ciencias

**Desarrollo de sensores electroquímicos de afinidad
preparados por electrodeposición para la detección de
neurotransmisores**

María Porcel Valenzuela

Tesis presentada para aspirar al grado de

DOCTORA por la Universidad de Alicante

DOCTORADO EN CIENCIA DE MATERIALES

Dirigida por:

Francisco Montilla Jiménez

Prof. Titular de Química Física

Emilia Morallón Núñez

Catedrática de Química Física



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A mis padres,
A mi hermana,



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

que me llevan a hombros de gigantes.
mi pequeña de las dudas infinitas.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

A mi Babi,



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

especialmente a ti.

Dicen que los sueños son una ventana al alma pero también son, sin duda, una puerta a los mecanismos de nuestra mente. En la noche, los engranajes de nuestros pensamientos no desaparecen, se mezclan con ruedas curvas, como los relojes blandos de Dalí, se deforman, aparecen piezas nuevas y a veces, de ese caos onírico, surgen cosas que el cerebro despierto no alcanza a imaginar. Ya lo dijo Shakespeare en La Tempestad, que los hombres estamos hechos de la misma materia de los sueños. Y la Ciencia, a veces, también.

(La nariz de Charles Darwin y otras historias de neurociencia, J.R. Alonso)

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Llegó el momento de agradecer...

Gracias a mis directores Dra. Emilia Morallón y Dr. Francisco Montilla por aceptarme en su grupo de investigación, ayudarme y tratarme tan bien en estos 3 años. A veces, en los planes interfieren elementos que los dilatan en el tiempo y sin su apoyo y consejos este trabajo no habría podido hacerse realidad.

Gracias a la Fundación Ramón Areces por el apoyo económico para realizar esta tesis doctoral.

¡Paco! Ahora que entiendo tus garabatos esto se acaba, pero he de reconocer que ha sido un placer. Gracias por enseñarme que todo: bueno, malo o regular, viene a demostrar algo y estamos aquí para buscar la explicación. ¡Has conseguido que me guste la Electroquímica y entienda la Química Física! Gracias por cuidarme. Gracias Paco, de corazón.

Esta tesis quizás no existiría si el Dr. Fermín Capitán Vallvey, el Dr. Ignacio De Orbe y el Dr. Julio Ballesta no me hubiesen permitido estar en el lugar y momento adecuados. Gracias a los tres.

Gracias a Paco Huerta, que siempre llega al despacho temprano y feliz, dos cosas que hasta conocerle me parecían incompatibles.

Al Dr. Antonio Rodes por su asistencia técnica con el FTIR.

A Javier Medina, porque con su ayuda ha sido más fácil encontrar al electrón.

A Toya, la persona más eficiente que conozco.

A Aurora, gracias por tus historietas y “regañinas” de cada tarde.

Alonso, gracias por aquellas teorías y/o conspiraciones científicas y cotidianas en servilletas entre cervezas y canciones. A pesar de todo sigo conservando mi pared celular.

Halima... Halimita gracias por todo, siempre serás la reina del lab.

Carolina, gracias por los grandes momentos vividos en el lab, nunca olvidaré la síntesis electroquímica de la Coca-cola y esas conversaciones vespertinas intentando arreglar el mundo con la ciencia.

A María José... Sugar Free. Ha sido un placer coincidir y procrastinar contigo.

A Daviiiiiiiiid por estar siempre dispuesto a ayudar.

A Ramiro, por su ayuda científica con los "TGs" y por darle un toque andaluz al grupo.

A mis compañeros del GEPE y adoptados, ya sean residentes o nómadas: Sara, Atshusi, Raúl, Alex, Felipe, Asma, Fabián, Jose Quintero, Maribel, Omar, Adilene, Zakaria, Sarai, Juan Manuel Sieben, Sandra, Carlos Sanchís, Maali, Samiha, Zoubida, Isa I y II.

Gracias a Carlos Busó, Sara Chumillas, William, Bethzy, Valentín, Juan Víctor, Fran Sarabia, Javi Navarro, Miguel Montiel, Ariadna, Elena, Rubén Sarabia y María Dolores. A Ana (Pantoja) y Loles por traer su arte al levante español.

Gracias a los habitantes del CTQ: Alicia, Daniel, Pablo, Vero, Elena, Blanca, Ana, Liuba, María, Oksana y Andrés, por hacer amenas e interesantes las comidas.

A las Anas, B y C, Boronat y Crispeta, gracias por la alegría de los miércoles y por las incoherencias.

A Ximo, por organizar aquel magnífico workshop y traerme un pedacito granaíno junto a los castillos de corcho blanco pintados con témperas.

A Gloria, gracias por todo, que ya fue mucho aparecer y ni te cuento que te quedaras. Gracias por el comanche y por enseñarme, entre otras muchas cosas, que hasta para abrir una lata de cerveza hay que tener arte. ¡Grande!

A María José, mi casera, por tratarme tan bien.

A Patry, gracias por hacerme descubrir a Otto, gracias ya tú sabes, por seguir dónde y cómo siempre.

A Chío, Elena y Jess, gracias por guardarme el sitio en el sur y por no saliros del bolsillo.

A Noe, aún queda la tesis importante, la de las zapatillas. Gracias desconocidas, porque aun estando lejos me llega tu onda verde-popera.

Rubén, gracias por tus ocurrencias locas. A ^^, Gregor, gracias todavía por cada “sabes...?”. Señor Mn, gracias por los post-it y las rimas.

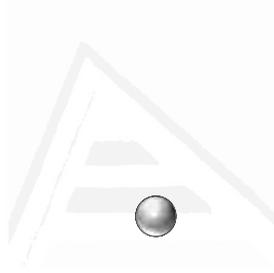
A mi abuelo, por advertirme siempre de los peligros de vivir y recordarme que todo lo químico explota. A mis abuelos Carmen y Juan Manuel, gracias por cuidarme desde allá. A mi Babi, abuela ojalá hubieras sido eterna, gracias donde estés. Gracias a mis tíos, Encarna y Salvador, y mis primos Pablo y Andrés (mi Brujo) por tenerme presente. Gracias también a Rafa.

Para agradecerles todo lo que han hecho a mis padres y mi hermana habría que inventar otra palabra, mientras la inventan, **GRACIAS** porque sí, porque por ellos yo soy así. Y a ti, Lucía, mi pequeña de las dudas infinitas, gracias por tu alegría. ¡Os quiero!

Por encima de todo he sido un ser con sentidos, un animal pensante, en esta etapa y esto, en sí, ha sido un enorme privilegio y una aventura, mejor que Oliver Sacks no lo podría yo escribir.

1	Introducción	15
1.1	Neurotransmisores: hallazgo e importancia	17
1.1.1	Dopamina	22
1.1.2	Norepinefrina o noradrenalina.....	23
1.1.3	Epinefrina o adrenalina	24
1.1.4	Detección de neurotransmisores	25
1.2	Sensores electroquímicos. Electroodos modificados	28
1.2.1	Química Sol-gel de la sílice.....	31
1.2.2	Electrodos modificados con sílice	36
1.2.3	Sílice modificada orgánicamente	37
1.2.4	Sílice impresa molecularmente	39
1.2.5	Depósito electro-asistido de sílice.....	43
1.3	Objetivos	46
2	Experimental.....	47
2.1	Introducción.....	49
2.2	Técnicas de caracterización	49
2.2.1	Técnicas microscópicas	49
2.2.2	Técnicas espectroscópicas	55
2.2.3	Técnicas termogravimétricas	60
2.2.4	Técnicas electroquímicas	62
2.3	Disoluciones, reactivos y electrodos	69
3	Síntesis y caracterización de sílice	73
3.1	Introducción.....	75
3.2	Experimental.....	77
3.3	Resultados y discusión	82
3.3.1	Caracterización por microscopía electrónica	82
3.3.2	Caracterización por análisis termogravimétrico	87
3.3.3	Caracterización por espectroscopia infrarroja en modo transmisión	107

3.4	Conclusiones	123
4	Sílice impresa molecularmente para la detección selectiva de dopamina.....	125
4.1	Introducción	127
4.2	Experimental.....	129
4.3	Resultados y discusión.....	130
4.3.1	Depósito electroquímico de sílice	130
4.3.2	Caracterización morfológica y electroquímica de sílice electrodepositada.....	131
4.3.3	Comportamiento electroquímico de la dopamina y el ácido L- ascórbico	135
4.3.4	Optimización de la impresión molecular: Selectividad y efecto de impresión	141
4.3.5	Sílice impresa molecularmente como sensor electroquímico de dopamina	146
4.4	Conclusiones	154
ii	5 Estudio de la afinidad de electrodos modificados con sílice por distintos neurotransmisores	155
5.1	Introducción	157
5.2	Experimental.....	163
5.3	Resultados y discusión.....	166
5.3.1	Comportamiento electroquímico de dopamina, norepinefrina y epinefrina	166
5.3.2	Estudio de la afinidad de electrodos modificados con sílice para distintos neurotransmisores	172
5.3.3	Afinidad de sílice modificada orgánicamente por dopamina	190
5.3.4	Afinidad de sílice modificada orgánicamente por norepinefrina	194
5.3.5	Afinidad de sílice modificada orgánicamente por epinefrina.....	198
5.4	Conclusiones	203
6	Conclusiones generales.....	205
7	Bibliografía	211



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introducción

1.1 Neurotransmisores: hallazgo e importancia

En 1921, [1] Otto Loewi (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1936 compartido con Henry Hallett Dale) realizó un experimento sobre el control de la frecuencia cardíaca.

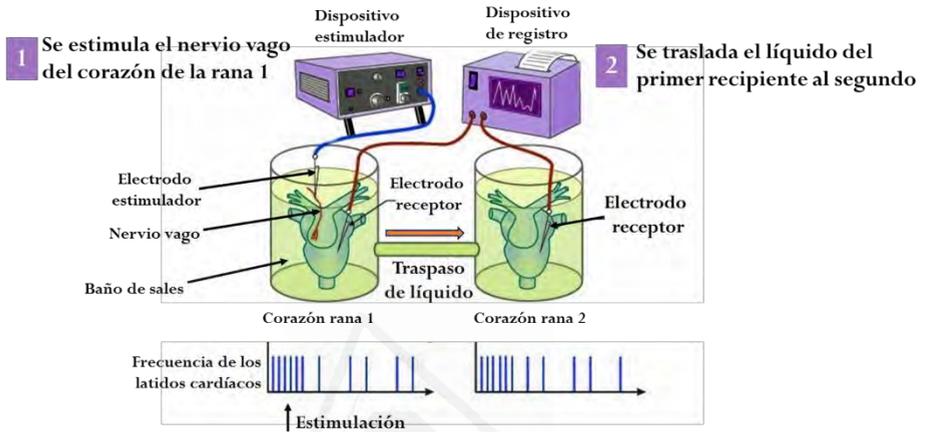


Figura 1.1. Experimento de Otto Loewi. [1]

El experimento de Loewi consistió en estimular eléctricamente el nervio vago de una rana mientras el corazón estaba sumergido en una disolución de sales. La disolución se hacía fluir a través de un tubo a otro recipiente que contenía un segundo corazón al que Loewi no estimuló eléctricamente (figura 1.1). Loewi registró la frecuencia de los latidos de ambos corazones. La estimulación eléctrica disminuyó la frecuencia de los latidos del primer corazón pero, lo más importante fue que la disolución que pasó del primer recipiente al segundo, disminuyó también la frecuencia de los latidos del segundo corazón. Indudablemente, la disolución transportaba un mensaje sobre la velocidad a la cual el segundo corazón debía latir.

¿Pero de dónde provenía originariamente el mensaje? La única explicación es que el mensaje llegó a la disolución gracias a una sustancia química liberada a partir del nervio vago, en cantidad suficiente como para influir en el segundo corazón. Por lo tanto, el experimento demostró que el nervio vago contiene una sustancia química que le comunica al corazón que disminuya su frecuencia de latidos y que Loewi identificó como acetilcolina (ACh) [2].

En experimentos consecutivos, Loewi estimuló el nervio acelerador y obtuvo una aceleración de la frecuencia cardíaca. Además, la disolución que bañaba al corazón acelerado aumentó la frecuencia de los latidos de un segundo corazón que no fue estimulado eléctricamente. Loewi descubrió que la sustancia química que aceleraba frecuencia cardíaca es la adrenalina o epinefrina (EP). En conjunto, estos experimentos demostraron que las sustancias químicas del nervio vago y el nervio acelerador modulan la frecuencia cardíaca: una inhibe los latidos del corazón y otra los excita.

El descubrimiento de Otto Loewi de la regulación de frecuencia cardíaca fue el primero de los dos hallazgos importantes que proporcionaron la base para nuestro conocimiento actual del modo en el que se comunican las neuronas. El segundo tuvo que esperar al invento del microscopio electrónico, entre 1925 y 1930, que permitió a los científicos ver la estructura de una sinapsis.

En definitiva, se definen los neurotransmisores como las biomoléculas que transmiten información de una neurona a otra neurona consecutiva, unidas mediante sinapsis. Se conocen con certeza unas 50 sustancias que actúan como transmisores, pero pocos científicos ponen límite al número de neurotransmisores que se encontrarán [3]. Como puede deducirse, clasificar estas sustancias es una tarea complicada, ya que puede hacerse atendiendo a distintos criterios. Basándonos en su composición se clasifican en 3 grupos: 1)

transmisores peptídicos, también llamados neuropéptidos; 2) gases transmisores y 3) transmisores de moléculas pequeñas [1].

Transmisores peptídicos. Están formados por cadenas cortas de aminoácidos. Se constituyen directamente a partir de las instrucciones contenidas en el ADN de la célula. Los péptidos ejercen una enorme variedad de funciones en el sistema nervioso. Son activos en las respuestas de estrés, estimulan la unión entre la madre y el hijo, facilitan el aprendizaje y ayudan a regular la ingesta y la bebida, así como el placer y el dolor. Por ejemplo, desde hace mucho tiempo se sabe que el opio, obtenido de la cápsula de la amapola, produce euforia y disminuye el dolor. El opio y un grupo de sustancias químicas relacionadas, por ejemplo, la morfina, parecen simular las acciones, no de uno, sino de tres péptidos: metaencefalina, leuencefalina y beta-endorfina.

Gases transmisores. Son gases solubles como el óxido nítrico (NO) y otros. Son sintetizados cuando se necesitan. Cada gas se difunde lejos del sitio en donde se elaboró, atraviesa fácilmente la membrana celular y se vuelve inmediatamente activo.

El óxido nítrico (NO) es un neurotransmisor que controla los músculos de las paredes intestinales y dilata los vasos sanguíneos en las regiones encefalíticas que se encuentran en actividad, lo que permite que estas regiones reciban más sangre. Por ejemplo, el fármaco citrato de sildenafil (nombre comercial Viagra) es un tratamiento ampliamente utilizado para la disfunción eréctil masculina y actúa potenciando la acción del NO.

Transmisores de moléculas pequeñas. Fueron los primeros transmisores identificados, como su nombre indica se trata de moléculas pequeñas, además sus componentes principales se derivan de los alimentos que ingerimos. En consecuencia, sus niveles y sus actividades en el organismo pueden estar influidos

por la dieta. En este grupo se encuentran: la acetilcolina (ACh), aminoácidos: glutamato (Glu), ácido gamma-aminobutírico (GABA), glicina (Gly) e histamina (H); y las aminas: serotonina (5-HT), dopamina (DA), epinefrina o adrenalina (EP) y norepinefrina o noradrenalina (NE). A su vez, este último grupo también conocido como neurotransmisores adrenérgicos se divide en indolaminas (serotonina, 5-HT) y catecolaminas (DA, EP, NE).

Estas aminas se sintetizan por la misma vía bioquímica y, de ahí, que estén relacionadas. En la figura 1.2 puede verse que la epinefrina es el tercer neurotransmisor producido por una secuencia bioquímica. Su precursor es la tirosina, un aminoácido abundante en los alimentos. La enzima tirosina hidroxilasa convierte a la tirosina en L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina), que es transformada secuencialmente por otras enzimas en dopamina, noradrenalina o norepinefrina y, finalmente, epinefrina o adrenalina.

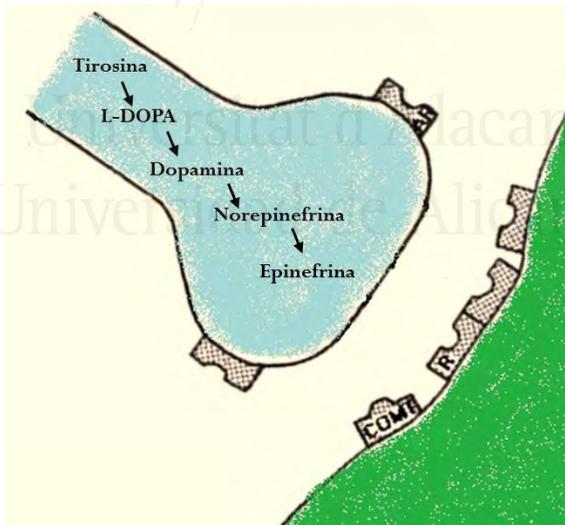


Figura 1.2. Esquema de la ruta bioquímica que produce secuencialmente dopamina, norepinefrina y epinefrina.

Un hecho interesante es que la cantidad de enzima tirosina hidroxilasa en el organismo es limitada y, en consecuencia, también lo es la velocidad con la cual se producen la dopamina, norepinefrina y epinefrina, independientemente de la cantidad de tirosina presente o ingerida. Este factor limitante de velocidad puede ser evitado con la administración oral de L-DOPA y a eso se debe que ésta sea utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, cuya causa es una insuficiencia de dopamina [4].

En esta tesis nos hemos centrado en los neurotransmisores pertenecientes a la familia de las catecolaminas. Químicamente, las catecolaminas son monoaminas. En concreto, las tres catecolaminas estudiadas en esta tesis han sido: dopamina, norepinefrina y epinefrina o adrenalina y su estructura se muestra en la figura 1.3.

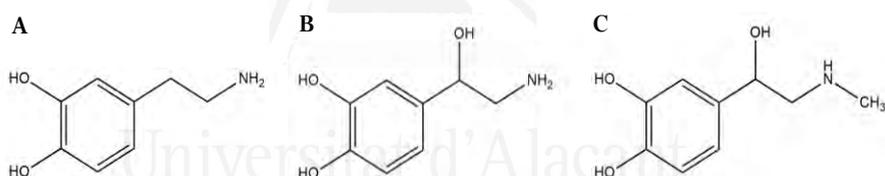


Figura 1.3. Fórmula química de tres catecolaminas: (A) dopamina, (B) norepinefrina y (C) epinefrina.

Ralph Adams fue pionero en implantar un microelectrodo de carbono en el cerebro de una rata con el objetivo de medir la concentración in vivo de neurotransmisores (catecolaminas) y sus metabolitos en el líquido extracelular [5], demostrando así la importancia de identificar y confirmar el origen químico de las corrientes de oxidación en el cerebro in vivo y en tiempo real [6].

1.1.1 Dopamina

La dopamina (DA) se produce en muchas partes del sistema nervioso, especialmente en la sustancia negra, en una amplia variedad de animales, vertebrados e invertebrados [7].

Fue sintetizada artificialmente por primera vez en 1910 por George Barger y James Ewens en los Laboratorios Wellcome en Londres [8]. En 1952, Arvid Carlsson y Nils-Åke Hillarp, del Laboratorio de Farmacología Química del Instituto Nacional del Corazón en Suecia, pusieron de manifiesto su importante papel como neurotransmisor. Éste y otros logros en transducción de señales en el sistema nervioso le valieron a Carlsson el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 2000 [9].

La dopamina tiene muchas funciones en el sistema nervioso, influyendo en la actividad motora, el comportamiento, la cognición, en la motivación y el placer [10–14]. Niveles deficientes de dopamina están relacionados con enfermedades como el Parkinson, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad. La dopamina también puede relacionarse con el sistema del placer del cerebro; participa en experiencias como la alimentación, el sueño, el humor y el sexo [15]. Por otro lado, niveles elevados de ésta se relacionan con psicosis y esquizofrenia [16]. Por esto, la mayoría de los fármacos antipsicóticos están diseñados para bloquear la función de la dopamina.

Además, la dopamina se usa como medicamento. En la década de 1950 quedó demostrado que el cerebro parkinsoniano era deficiente en dopamina y que por tanto se podría “normalizar” elevando el nivel de dopamina. Cuando George Cotzias publicó sus resultados [17], en febrero de 1967, la perspectiva de los pacientes con Parkinson cambió. Oliver Sacks, tal como relata él mismo en *Despertares* [4] administró L-DOPA, que aún era un medicamento en fase

experimental, a pacientes supervivientes de la epidemia de encefalitis letárgica, o enfermedad del sueño, que había barrido el mundo entre 1917 y 1928. Estos pacientes llevaban décadas en “estado congelado”, incapaces de realizar ningún movimiento y la L-DOPA les permitió recuperar la consciencia. Además, la dopamina es coadministrada típicamente con un inhibidor de la descarboxilación periférica (dopa descarboxilasa). La dopamina es también usada como una droga inotrópica en pacientes con shock para incrementar el ritmo cardíaco y la presión sanguínea.

1.1.2 Norepinefrina o noradrenalina

La norepinefrina o noradrenalina (NE) es también una catecolamina. El prefijo *nor-* se deriva de la abreviación alemana para "*N ohne Radikal*" (N, el símbolo del nitrógeno, sin radical), refiriéndose a la ausencia del grupo metilo en el átomo de nitrógeno de la epinefrina [18] (figura 1.3). Tiene múltiples funciones fisiológicas y puede actuar como hormona y como neurotransmisor. Las áreas del cuerpo que producen o se ven afectadas por la norepinefrina son descritas como noradrenérgicas. La norepinefrina se biosintetiza a partir de la dopamina, como se mostró en la figura 1.2.

Como hormona del estrés, la norepinefrina afecta a partes del cerebro donde se controlan la atención y las acciones de respuesta [19]. Junto con la epinefrina, la norepinefrina también interviene en la respuesta "luchar o huir", aumentando de manera directa la frecuencia cardíaca, provocando la liberación de glucosa a partir de las reservas de energía, y aumentando el flujo sanguíneo al músculo esquelético. Es liberada de las neuronas simpáticas afectando al corazón e incrementando el suministro de oxígeno al cerebro [20,21]. Un mal funcionamiento en la secreción de norepinefrina puede influir seriamente en la

salud mental, desarrollando fobias, hostilidad, ataques de pánico y trastorno bipolar.

La norepinefrina, junto con la dopamina, han sido reconocidas por jugar un importante rol en la atención y concentración [22,23].

1.1.3 Epinefrina o adrenalina

La epinefrina (EP) o adrenalina, es una hormona y un neurotransmisor [24]. El término adrenalina se deriva de las raíces latinas *ad-* y *renes* que literalmente significa "junto al riñón", en referencia a la ubicación anatómica de la glándula suprarrenal en el riñón. Las raíces griegas *epi* y *nephros* tienen un significado similar, "sobre el riñón", y dan origen al nombre epinefrina.

Es sintetizada en las glándulas suprarrenales en una ruta enzimática que convierte el aminoácido tirosina en una serie de intermediarios y, finalmente, en epinefrina (figura 1.2).

El fisiólogo polaco Napoleon Cybulski, en 1895, obtuvo por primera vez los extractos suprarrenales conteniendo adrenalina. Estos extractos, que él llamó *nadnerczyna*, contenían epinefrina y otras catecolaminas [25]. En 1900, el químico japonés Jokichi Takamine y su asistente Keizo Uenaka descubrieron la adrenalina [26,27] y en 1901, Takamine aisló y purificó con éxito la hormona de las glándulas suprarrenales de ovejas y bueyes [28]. La adrenalina fue por primera vez sintetizada en un laboratorio por Friedrich Stolz y Henry Drysdale Dakin, de forma independiente, en 1904 [27].

Los principales desencadenantes fisiológicos de la liberación de adrenalina son las tensiones, tales como las amenazas físicas, las emociones intensas, los ruidos, las luces brillantes y la alta temperatura ambiental. Todos estos estímulos se procesan en el sistema nervioso central [29]. Con la liberación

de epinefrina se produce un aumento en la frecuencia cardíaca, se contraen los vasos sanguíneos, se dilatan los conductos de aire, y además es partícipe en la reacción de lucha o huida del sistema nervioso simpático. Por todo ello, se usa para tratar una serie de afecciones incluyendo: paro cardiorrespiratorio y otras arritmias, anafilaxia, también se añade a ciertos anestésicos locales inyectables, por ejemplo la lidocaína, como un vasoconstrictor que permite retardar la absorción y por tanto, prolongar la acción del agente anestésico [30].

La epinefrina puede ser cuantificada en la sangre, plasma o suero como ayuda diagnóstica para monitorear la administración terapéutica o para identificar el agente causante en una posible víctima de envenenamiento. Las concentraciones de epinefrina endógena en el plasma en un adulto en reposo son normalmente menores de $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, pero pueden subir 10 veces durante el ejercicio y 50 veces o más durante periodos de estrés [31,32].

Niveles anormalmente altos de adrenalina pueden provocar una variedad de afecciones, tales como el feocromocitoma (tumor del tejido de la glándula suprarrenal) y otros tumores de los ganglios simpáticos.

1.1.4 Detección de neurotransmisores

Llegados a este punto, resulta evidente que las catecolaminas, antes descritas, tienen interés clínico. La identificación y cuantificación de estos compuestos en fluidos biológicos, plasma u orina, es fundamental para la detección y el diagnóstico de enfermedades [33].

Para realizar este análisis en tejidos y fluidos biológicos se han utilizado gran variedad de técnicas: fluorimétricas, radioenzimáticas, cromatográficas (GC y HPLC) o inmunoensayos, entre otras [34,35].

En cuanto a los procedimientos basados en técnicas de inmunoensayo para la detección de neurotransmisores [36], existen problemas asociados con la especificidad de los anticuerpos para esos haptenos de bajo peso molecular (parte de un antígeno que por sí sola no produce la respuesta inmune, pero sí posee especificidad); debido a esos problemas el uso de estas técnicas para la detección de catecolaminas no está muy extendido [37–39].

La presencia en su estructura de un anillo aromático hace que estos compuestos sean fluorescentes. Por tanto, no es de extrañar que existan métodos analíticos basados en esta propiedad para la detección de catecolaminas [40–45]. Sin embargo, muchos otros compuestos y drogas presentes en el plasma tienen absorción y emisión máxima a la misma longitud de onda [46]. Por tanto, es necesario técnicas de aislamiento altamente específicas para aplicar los métodos fluorimétricos. Aunque la conversión de las catecolaminas a derivados fluorescentes puede aumentar la sensibilidad, la especificidad está aún limitada debido a la presencia de interferentes provenientes de otras drogas, incluso de la dieta [41,42,45]. Combinando la cromatografía de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia y usando una derivatización con precolumna [47] o postcolumna [48] se pueden resolver alguna de las desventajas. Sin embargo, la HPLC con detección electroquímica (HPLC-EC) es el procedimiento analítico dominante para el análisis de las catecolaminas en plasma, ya que el pretratamiento de las muestras es a menudo más simple con HPLC y detección electroquímica que con detección por fluorescencia ya que esta última generalmente requiere la formación de derivados fluorescentes estables. Estas moléculas, dopamina, epinefrina y norepinefrina, al ser electroactivas, es completamente normal encontrar métodos electroquímicos para su detección.

Por otra parte, la alta fuerza iónica de entornos biológicos crea un ambiente perfecto para la electroquímica, ya que ésta requiere medios conductores.

Otra alternativa para la determinación de catecolaminas plasmáticas está basada en técnicas de ensayos radioenzimáticos, método bastante sensible donde se usan uno o dos isótopos y un volumen de muestra pequeño (50-100 μL) [49]. Sin embargo, se trata de métodos bastante complejos y tediosos requiriendo una atención minuciosa y no son adecuados para aplicar en la rutina del laboratorio clínico.

Al igual que en plasma, para el análisis de catecolaminas libres en orina se han descrito diferentes métodos para su determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos procedimientos son los que se aplican en laboratorios clínicos para análisis de rutina, ya que existe la posibilidad de automatizar la técnica lo que permite el manejo de un gran número de muestras.

Con excepción de la HPLC, pocas aplicaciones han tenido amplia aceptación en los laboratorios de análisis clínicos. Se ha demostrado que la HPLC [50] es una técnica específica y sensible capaz de ser automatizada y es, por tanto, la preferida para la determinación de catecolaminas. Sin embargo, aunque la detección electroquímica pueda proveer la sensibilidad necesaria para el análisis de catecolaminas, el paso inicial de purificación previa a la separación cromatográfica tiene una importancia crítica. Además, hay que considerar que los detectores electroquímicos son más susceptibles a fluctuaciones en la velocidad de bombeo en la HPLC y que la fase móvil debe ser eléctricamente conductora restringiendo la elección de su composición.

Tanto para el análisis de catecolaminas en orina como en plasma, se han descrito diferentes formas de aislamiento preliminar y purificación de éstas

usando resinas de intercambio iónico, derivatización fluorescente, alúmina, etc. [51–58].

También existen productos comerciales disponibles para el aislamiento de catecolaminas basados en minicolumnas de sílice con propiedades de intercambio catiónico fuerte y débil, pero son caros [59].

1.2 Sensores electroquímicos. Electroodos modificados

Un sensor químico es un dispositivo pequeño que se puede utilizar para realizar la medida directa del analito (sustancia objetivo) en una muestra. Lo ideal es que se trate de un dispositivo capaz de responder de forma continua y reversible y que no perturbe la muestra. Los sensores evitan etapas de pretratamiento de la muestra para la medida. Poseen un elemento de transducción que normalmente consta de una zona de reconocimiento, esta zona interactúa con la sustancia de interés y los cambios químicos resultantes de dicha interacción se traducen en señales eléctricas en el caso de que se trate de un sensor electroquímico.

Los sensores electroquímicos representan una importante subclase, dentro de los sensores químicos, éstos utilizan un electrodo como elemento de transducción (figura 1.4). Estos dispositivos tienen bastante importancia en la actualidad y cuentan con una amplia gama de aplicaciones: análisis clínicos, industriales, ambientales y agrícolas [60].

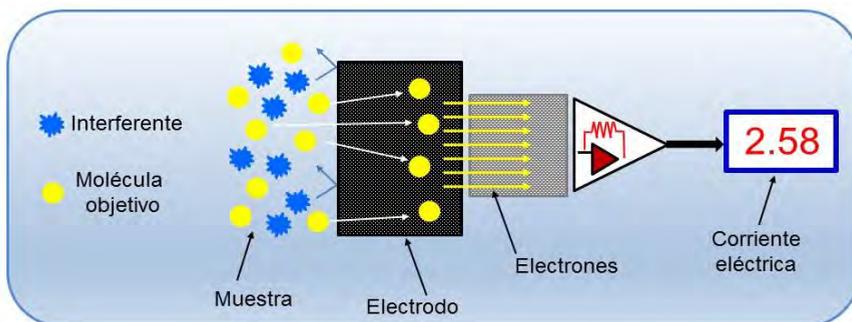


Figura 1.4. Esquema de sensor electroquímico.

Los métodos electroquímicos han evolucionado de manera constante desde que Jaroslav Heyrovský, recibiera el Premio Nobel de Química en 1959 por el descubrimiento y desarrollo de métodos de análisis polarográficos. Heyrovský descubrió que era posible reducir moléculas orgánicas en un electrodo de mercurio aplicando un voltaje apropiado. La reducción de dichas moléculas dio lugar a una corriente que se relacionaba con la concentración de la sustancia que se estaba reduciendo. Además, la posición y la forma de la onda polarográfica, es decir, la relación de la corriente observada con el potencial aplicado, era útil para identificar la sustancia. Estos son los principios fundamentales que hacen que los métodos electroquímicos, en concreto los amperométricos y voltamperométricos, sean usados hoy en día en innumerables aplicaciones [61,62].

Una característica atractiva del análisis voltamperométrico moderno es que con instrumentación de bajo coste se puede obtener una elevada sensibilidad y eficacia. La mayoría de estos métodos se basan en la medida de la corriente que fluye a través de un electrodo de trabajo después de una perturbación del potencial, por tanto, el electrodo puede y debe ser considerado como el corazón

del experimento. Consecuentemente, debe dedicarse especial atención a su fabricación y mantenimiento [63].

Hasta hace pocos años el desarrollo del análisis voltamperométrico estaba limitado por los materiales electródicos disponibles, sólo era posible utilizar el electrodo de gota de mercurio, un metal o un electrodo basado en carbono. El concepto de “electrodo modificado químicamente” nació a mitad de los años 70 cuando Murray y colaboradores lograron funcionalizar un electrodo de SnO_2 con grupos amino [64]. Este trabajo fue el punto de partida para el desarrollo de una extraordinaria era en electroanálisis. La importancia de lo que ha significado el control en la modificación de la superficie electródica fue expuesta acertadamente por Bard y Faulkner [65] “Hace veinte años, el concepto de controlar la superficie de los electrodos de una manera general a nivel químico era desconocido. Hoy en día, la síntesis y aplicación de microestructuras químicas en los electrodos no sólo es una de las áreas más nuevas de la electroquímica sino que es una de las que ofrece más perspectivas de avance en toda la Química”.

Con el uso de electrodos modificados se intenta controlar más sus características e influir no sólo en el potencial aplicado sino en la reactividad superficial, pudiendo, de este modo anticipar la respuesta del electrodo modificado hacia determinadas especies [63].

Entre la amplia gama de aplicaciones que incluyen los electrodos modificados químicamente se encuentran: el uso como membranas de permeabilidad selectiva, electrocatálisis, como dispositivos de almacenamiento de carga; además, en electroanálisis, ocupan un lugar importante usándose como sensores electroquímicos.

La capa o compuesto modificador debe permitir la comunicación electroquímica entre el material del electrodo y la disolución que contiene la

sustancia de interés. Así, el material modificador se elige de tal manera que sea o bien selectivo (e incluso específico) a una sustancia en particular, o bien capaz de mediar reacciones redox que son lentas sobre el electrodo sin modificar. De esta manera, los procesos redox que ocurren entre el electrodo y la sustancia de interés en disolución están fuertemente influidos por las características de la modificación realizada [63].

Los métodos más importantes utilizados para la modificación de superficies electrónicas son:

-Fijación covalente, como son las monocapas autoensambladas (SAM) (silanización, tiolación).

-Adsorción, por ejemplo por uniones tipo Van der Waals.

La gran mayoría de electrodos modificados [66] están hechos mediante la adsorción o la unión de diversas especies en sustratos sólidos, monocapas autoensambladas (SAM), revestimientos formados de múltiples capas homogéneas (polímeros conductores o semiconductores o resinas de intercambio iónico) o incluso materiales heterogéneos fruto de la dispersión del modificador dando lugar a una matriz compuesta. También existen electrodos modificados con materiales inorgánicos, como son: óxidos metálicos, alúmina, fosfatos y fosfonatos, sílice y óxidos obtenidos mediante el método sol-gel, arcillas, zeolitas, etc. [66].

En esta tesis se va a realizar un estudio de la modificación de electrodos mediante películas delgadas de sílice mediante el método sol-gel.

1.2.1 Química Sol-gel de la sílice

La sílice existe bajo una amplia variedad de formas, con estructura cristalina y amorfa. Se trata de un material que ha sido examinado

exhaustivamente [67], tanto sus propiedades físicas como químicas son perfectamente conocidas [68], lo que le confiere un extraordinario número de aplicaciones, como su uso en cromatografía, aislamiento térmico, catálisis y como soporte para catalizadores, se usa en el refuerzo de polímeros y como soporte para inmovilizar enzimas, entre otras.

La sílice se puede encontrar de forma natural o prepararse mediante procedimientos sintéticos.

Existen 3 rutas de síntesis de sílice usando como precursor compuestos de silicio [69]. Por pirolisis, mediante la descomposición térmica de haluros de silicio en fase gaseosa, normalmente entre 1000 y 1100 °C en una llama de hidrógeno y aire. El producto resultante es un aerogel de sílice. Una alternativa a este método es la fusión de arena en plasma a partir de silicatos solubles, principalmente Na_2SiO_3 . El tercer método de síntesis consiste en la hidrólisis de alcoxisilanos en medio hidroalcohólico, lo que lleva a la formación de sílice tras dos reacciones, una de hidrólisis y otra de condensación. Este método es que vamos a utilizar a lo largo de esta tesis para la preparación de sílice, por lo que va a ser descrito en detalle a continuación.

Método Sol-gel

El método sol-gel consiste en la producción de materiales de vidrio o de cerámica, a través de la hidrólisis y la condensación de alcóxidos metálicos adecuados [68]. Para la preparación de materiales de sílice, uno de los alcóxidos más usados como precursor es el tetraetoxisilano (TEOS). Este precursor puede ser hidrolizado y condensado en condiciones relativamente suaves, como se indica a continuación.

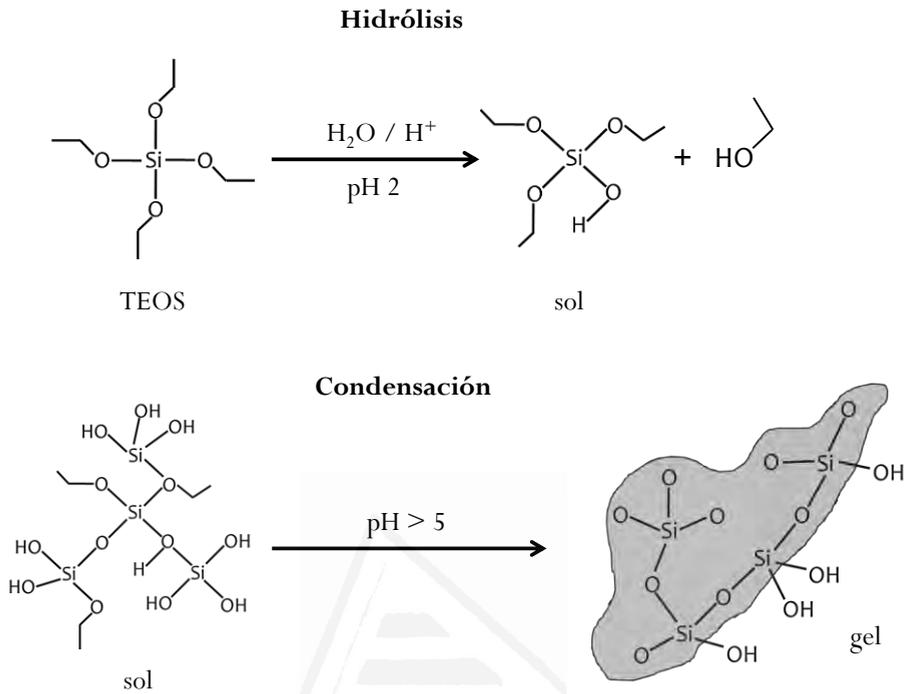


Figura 1.5. Etapas método Sol-gel.

La etapa de hidrólisis a pH ácido, figura 1.5, conduce a una disolución coloidal metaestable (figura 1.6) a pH 2 conocida como sol. La segunda etapa, mostrada en la figura 1.5, consiste en la condensación mediante el aumento del pH del sol, obteniéndose así el gel, por agregación de coloides.

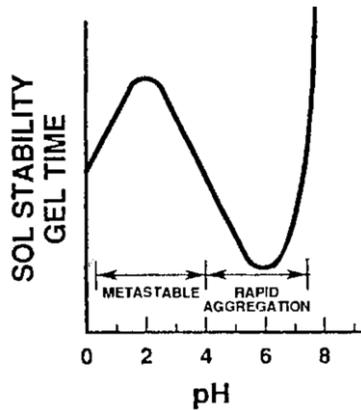


Figura 1.6. Efecto del pH en el sistema coloidal sol-gel.[68]

En la etapa de hidrólisis, el precursor, en este caso TEOS, se mezcla con agua y etanol, este último actúa como co-solvente, y un catalizador ácido, como por ejemplo ácido clorhídrico. Durante la formación del gel, la viscosidad de la disolución aumenta gradualmente a medida que el sol, formado por una suspensión coloidal de partículas pequeñas (1-100 nm) se van interconectando entre sí mediante reacciones de poli-condensación para formar una red rígida y porosa [68]. Dependiendo de las condiciones del proceso sol-gel (relación Si:H₂O:EtOH, tipo y concentración de catalizador, precursores de alcóxidos, etc.), la formación del gel puede tener lugar en segundos, minutos, incluso días o meses. Además, durante el secado, el alcohol y el agua se evaporan de los poros provocando que el gel se encoja, por esa razón, los xerogeles, o geles totalmente secos, son significativamente menos porosos que sus homólogos hidratados.

Los materiales de sílice son químicamente y fotoquímicamente estables. También son ópticamente transparentes. Como se muestra en la figura 1.7A, se pueden obtener fácilmente materiales en diversas configuraciones: películas, fibras, monolitos, polvos, etc.

Además, se pueden incorporar en la matriz de sílice grupos funcionales, obteniendo geles estables y modulando de forma sencilla sus propiedades. Cuando los grupos incorporados en la sílice sean de naturaleza orgánica (figura 1.7B) , se obtiene sílice modificada orgánicamente, estos compuestos son conocidos con el nombre de ORMOSIL; por su nombre en inglés, *OR*ganically *MO*dified *SIL*ica (véase epígrafe 1.2.3.).

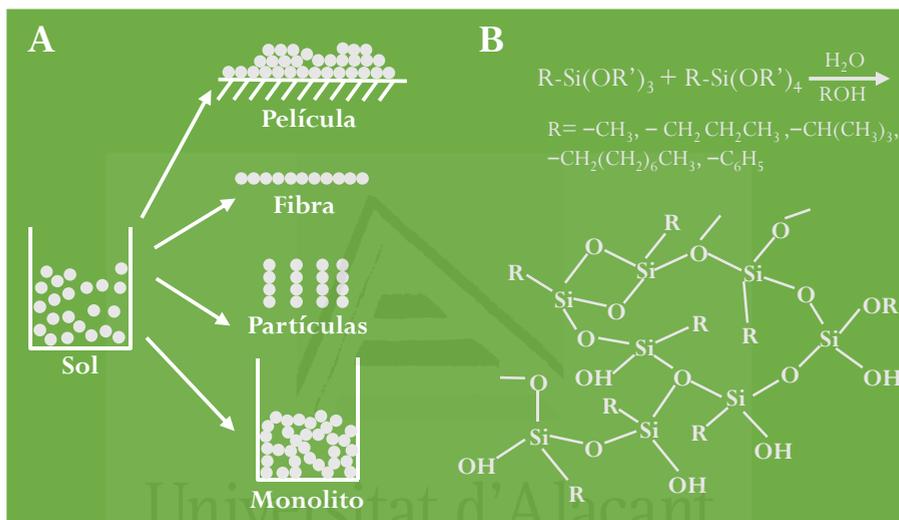


Figura 1.7. (A) Diferentes conformaciones de sílice. (B) Esquema de modificación de sílice con grupos orgánicos (ORMOSIL) [70].

A mediados de 1980, se demostró que había moléculas que podían ser atrapadas en la matriz porosa, simplemente dopando la disolución sol con dichas moléculas, antes de su condensación (gelificación) [71]. Se demostró que las moléculas retenidas por el gel conservaban las mismas propiedades que tenían estando en disolución [72]; fue entonces cuando la aplicación de la química sol-gel, en aplicaciones como sensores, catálisis y dispositivos electroquímicos, se disparó [72–79]. Los materiales basados en sol-gel usados en electroquímica

forman una gran familia. Se incluyen los materiales inertes inorgánicos, los óxidos metálicos con actividad redox, los híbridos orgánicos-inorgánicos, y los compuestos macro y microscópicos. Los recientes avances en los diversos campos y aplicaciones de la electroquímica de sol-gel se describen en dos excelentes artículos de revisión realizados por Lev y colaboradores [80] y por Alber y Cox [81].

1.2.2 Electroodos modificados con sílice

El campo de los electrodos modificados con sílice comenzó en los años 1989-1990 y ha ido aumentando en los últimos años. A pesar de las extraordinarias características químicas que ofrecen los materiales basados en sílice, es bastante sorprendente que el uso en electroquímica de este material sea tan reciente. La sílice presenta bastantes propiedades atractivas (capacidad de adsorción, propiedades ácido/base, estabilidad térmica), que pueden ser aprovechadas en múltiples aplicaciones. Además, como se ha dicho anteriormente, la sílice puede ser modificada con una gran variedad de grupos funcionales (epígrafe 1.2.3), lo que lleva a un considerable enriquecimiento y control de sus propiedades superficiales. Por ejemplo, estas propiedades han sido explotadas en gran medida en cromatografía, diseñando fases estacionarias nuevas. También, la elevada área superficial combinada con las propiedades químicas superficiales hace que la sílice sea un material excelente para ser usado como soporte de catalizadores. A pesar de todas estas propiedades atractivas, el uso de sílice en métodos electroquímicos no fue generalizado. Los geles de sílice preparados por la química sol-gel son materiales interesantes para la modificación de electrodos, y ya que no son electroactivos, se pueden utilizar como soporte para especies electroactivas, ya sea por adsorción o atrapamiento durante su

formación, mejorando así su detección amperométrica [82–87]. Pero a mediados de los años 90, la sílice se utilizó como soporte para enzimas sin impedir su actividad biológica y además mejorando el acoplamiento de la actividad redox de la enzima inmovilizada y la superficie del electrodo modificado [73,88,89]. En particular, los avances se centraron en la encapsulación de enzimas en materiales de sílice sintetizados a temperatura ambiente aplicando el proceso sol-gel.

El uso de sílice como modificador de electrodos ha demostrado una gran versatilidad en la inmovilización de distintas especies, tales como películas de óxido u otras especies electroactivas. Gran parte del trabajo en esta dirección se ha hecho por Walcarius, Kubota, Gushiken y colaboradores [90–95].

Resumiendo, las propiedades más atractivas de los materiales de sílice son que tiene gran capacidad para acumular diversos analitos por adsorción, la sílice puede ser modificada con grupos orgánicos de forma sencilla y estas modificaciones conllevan el desarrollo de un amplio abanico de nuevos materiales. Además, estos materiales sirven como soporte para la inmovilización de enzimas en la fabricación de biosensores. Pero la razón fundamental del uso de materiales sol-gel en electroquímica es la existencia de múltiples vías para combinar las propiedades de materiales inorgánicos con una gran variedad de compuestos orgánicos por medio de ORMOSIL.

1.2.3 Sílice modificada orgánicamente

Son materiales compuestos o materiales híbridos a escala atómica que se producen fácilmente por el método sol-gel, simplemente por la adición de precursores moleculares que son capaces de someterse a las mismas reacciones de hidrólisis y condensación que el alcóxido de metal. En el mundo sol-gel, estos materiales se conocen con el término de organosílices. Organosílice describe

cualquier material silíceo en el que los átomos de silicio (algunos o todos) se unen covalentemente a al menos un átomo de carbono; para aclarar, el término sílice se utilizará para referirse a materiales que no contienen enlaces Si–C en absoluto y ORMOSIL se usará para materiales derivados de sílice modificada orgánicamente y que al menos contenga un enlace Si–C.

Como se ha visto anteriormente, un silicato de sol-gel se forma de acuerdo con una reacción de polimerización entre alcoxisilanos y agua (hidrólisis), seguida de una condensación. Como puede observarse en la figura 1.8, usando precursores que contienen grupos funcionales orgánicos (R) directamente unidos al átomo de Si del precursor de sol-gel, es posible preparar una gran variedad de materiales híbridos inorgánicos-orgánicos [72] variando el grupo terminal.

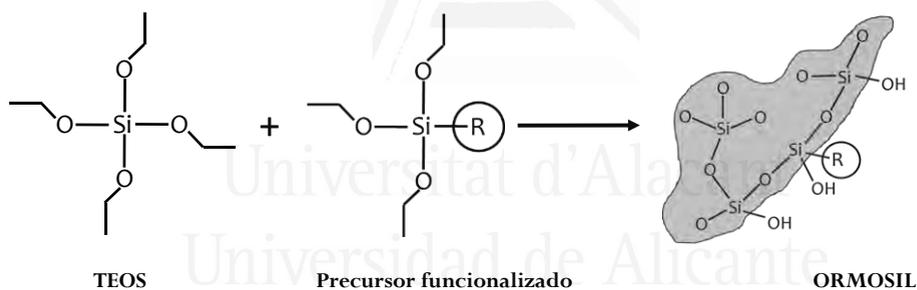


Figura 1.8. Reacción para obtener Sílice Modificada Orgánicamente (ORMOSIL).

Los ORMOSIL [96] se han convertido en un campo atractivo de estudio debido a la variabilidad y flexibilidad asociada con su método de preparación. Ofrecen la posibilidad de ser usados en distintas áreas: catálisis, recubrimientos protectores y de intercambio iónico, técnicas de separación (cromatografía), impresión molecular, sensores químicos, entre muchas otras aplicaciones [97].

Su uso en sensores químicos ofrece una elevada versatilidad. Con estos materiales híbridos resulta sencillo modificar las capas sensoras al gusto, por ejemplo, se puede alterar el tamaño de poro de material, la hidrofobicidad, y la flexibilidad o introducir un grupo funcional específico en la matriz para mejorar el rendimiento del sensor, incluyendo así zonas de reconocimiento molecular más específicas y/o selectivas, mejorar el tiempo de respuesta, la tasa de lixiviación, etc.[98]. Uno de los problemas habituales que se encuentra cuando se modifica un electrodo, es que el reactivo atrapado en la capa sensora, tiende a escaparse, a lixiviar a la disolución. Utilizando materiales híbridos inorgánicos-orgánicos se ha demostrado que estos problemas de difusión indeseada se han solventado [99,100].

Con la inclusión de grupos orgánicos en la matriz de sílice también se modula la hidrofobicidad del material, también es un beneficio para algunas aplicaciones, por ejemplo, un aumento en la hidrofobicidad de la película puede reducir la solubilidad de ciertas especies en la matriz provocando un aumento en el rendimiento del sensor [98].

Por otro lado, aumentando la flexibilidad de la matriz se consiguen capas más coherentes, evitando grietas en las películas [101]. También se han usado estos materiales en el diseño de sensores de guía de ondas para detección de gases [102] y vapores [103].

1.2.4 Sílice impresa molecularmente

El reconocimiento molecular [104] es uno de los procesos básicos encontrados en la naturaleza. Se puede diseñar la unión preferente de una molécula a un receptor con alta selectividad frente a otros receptores análogos estructurales. El sueño de muchos químicos sintéticos ha sido y sigue siendo el

intento de entender e imitar los principios de reconocimiento molecular biológico para el desarrollo de materiales derivados abióticos. Los enfoques más tempranos son de la década de 1930 en la preparación sintética de materiales nanoestructurados para el reconocimiento molecular y explicar así el funcionamiento del sistema inmunológico humano, se inspiraron en las contribuciones de Mudd [105] y Pauling [106], en la década de 1940. Sus suposiciones básicas fueron que en los sistemas vivos, los anticuerpos se construyen mediante el uso de moléculas como huellas o plantillas. La estructura primaria de cualquier anticuerpo sería la misma, pero la selectividad, es decir, la diferencia en la conformación del anticuerpo sería inducida por una molécula plantilla. Cuando se elimina la molécula plantilla, queda una cavidad con características morfológicas y estereoquímicas relacionadas con las de la plantilla y se mantiene para dar al anticuerpo una preferencia a volver a enlazar la molécula. La descripción era muy similar al modelo “llave-cerradura”, utilizado para explicar la acción de enzimas en reacciones bioquímicas.

La impresión molecular es un enfoque sintético muy poderoso utilizado para crear receptores artificiales para el reconocimiento molecular [78,104,107–111]. Este método, esquematizado en la figura 1.9, consiste en la síntesis de una matriz que puede ser un polímero reticulado, elegido adecuadamente, en presencia de una molécula de interés (molécula molde). Ésta se mantiene en su lugar ya sea covalentemente o no [112]. La eliminación de la molécula molde produce una cavidad, en definitiva, una huella de un tamaño y forma específicos y con una superficie funcionalizada capaz de interactuar específicamente con una molécula diana apropiada. La molécula diana puede ser, pero no es siempre, la misma que la molécula molde. En contraste con los receptores biológicos

utilizados en bioquímica (enzimas), esta imitación artificial es mucho menos costosa. más estable y capaz de soportar condiciones adversas.

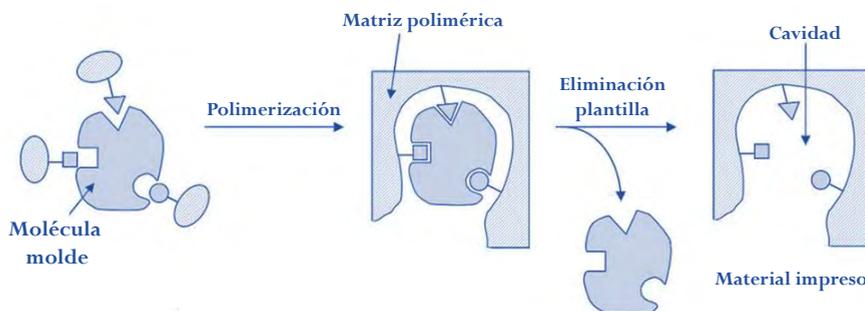


figura 1.7. proceso de impresion molecular.

Como polímeros impresos molecularmente es frecuente encontrar materiales orgánicos de todo tipo, acrílicos, vinílicos o siloxanos. La primera aproximación a la síntesis de materiales impresos molecularmente basados en sílice (MIS, de sus siglas en inglés *Molecularly Imprinted Silica*) se remonta a principios de 1930. Polyakov [113] fue el primero en reportar que la estructura de los poros de sílice estaba influenciada por la presencia de benceno, tolueno o xileno durante el proceso de secado, es decir, el grado de adsorción del gel de sílice para los diferentes vapores dependía de la estructura del disolvente presente durante el proceso de secado. Se sugirió que la selectividad surge de los cambios en la estructura de sílice inducidos por la presencia de un disolvente en particular. Desde este trabajo, pionero en la impresión molecular, se han impreso diferentes óxidos, sílice y óxidos metálicos mixtos, en un intento de preparar adsorbentes, catalizadores y medios de separación específicos. En 1949, Dickey publicó la que parece ser la primera demostración documentada de que la sílice se podía imprimir molecularmente con homólogos de naranja de metilo [114].

Más tarde, en la década de 1970, la investigación en sílice impresa molecularmente se retomó encontrando aplicaciones muy diversas de estos materiales como adsorbentes, sistema de separación, catalizadores, sensores químicos, etc.[115–117].

La aplicación de materiales sol-gel impresos para la producción de sensores está en continuo desarrollo, estas matrices de sílice impresa se pueden usar como capas de reconocimiento en los sistema de transducción de sensores: piezoeléctricos, fluorescentes, electroquímicos, etc. [118,119]. En comparación con los métodos de polimerización orgánica convencional presenta las siguientes ventajas: flexibilidad que aporta el método sol-gel; número de monómeros disponibles y compatibles; transparencia óptica, rigidez, estabilidad en medios adversos, porosidad [104]. Por tanto, las razones para imprimir molecularmente con sílice son numerosas [115]: su reactividad es baja en condiciones extremas, incluso expuesta a ácidos y bases muy fuertes, y oxidantes. Esto hace que sea una matriz robusta y adecuada para una amplia variedad de aplicaciones y entornos químicos. La estructura rígida altamente reticulada de la sílice permite la creación de sitios de impresión con un alto grado de selectividad en cuanto a la forma en comparación con polímeros orgánicos más flexibles. En la etapa de hidrólisis del método sol-gel, como se vio anteriormente, se puede tener un elevado control sobre la forma en la que se va a obtener la sílice, simplemente controlando la relación Si: H₂O, el pH, etc. En la sílice la distancia de reticulación es menor que en polímeros orgánicos, por eso la sílice cuando se pone en contacto con disolventes no presenta procesos de dilatación (*swelling*) en su estructura, esto ayuda a tener un control en la distancia de difusión de moléculas a través de sus poros. Sin embargo, la porosidad puede suponer un problema, ya que se trata de un sólido con porosidad desordenada, por lo que el camino de

difusión no es directo. Presenta gran estabilidad térmica, todo esto hace que pueda mantener la forma y el tamaño de las cavidades impresas. Además, la sílice es muy estable frente a la oxidación y al envejecimiento, aspectos problemáticos en polímeros orgánicos. También un aspecto importante, es que la sílice es compatible con sistemas acuosos y biológicos, y es capaz de encapsular con éxito enzimas, proteínas y anticuerpos sin dañar su actividad [72,120,121].

Una de las grandes ventajas del método sol-gel es la facilidad para producir películas delgadas de alta calidad. La ventaja es obvia, al tratarse de películas finas, presentan longitudes de difusión más cortas, lo que se traduce en que la cinética de unión de la molécula de interés y los sitios impresos será más rápida, mejorando la eficiencia del sensor.

1.2.5 Depósito electro-asistido de sílice

Ya se han comentado con anterioridad las virtudes y las aplicaciones derivadas de éstas que los materiales basados en sílice, y los híbridos derivados, especialmente inorgánicos-orgánicos, ofrecen. Las dos configuraciones más comunes en las que podemos encontrar los materiales sol-gel son: monolitos y películas delgadas. Los monolitos se preparan mediante el vertido de la disolución sol en un recipiente, por ejemplo, en una cubeta; y se deja gelificar lentamente [122].

Estos materiales son aislantes eléctricos, por tanto, para su aplicación en electroquímica exigen que la conexión con la superficie del electrodo sea estrecha. Para integrar matrices sol-gel en las superficies electródicas se emplean diferentes estrategias recubrimiento por giro, *spin-coating* [123,124]; recubrimiento por inmersión, *dip-coating* [125,126]; y recubrimiento por pulverización, *spraying* [127,128]. Estos métodos son sencillos de aplicar, no

requieren el uso de instrumentación sofisticada, y permiten controlar el espesor de las películas depositadas. Normalmente, con estas técnicas se consiguen espesores que oscilan entre 100 nm y unos pocos mm. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes, por ejemplo, las técnicas de *spin-coating* y *dip-coating* sólo se pueden aplicar a superficies planas, esto se solventaría aplicando la técnica de *spraying*, que en general proporciona recubrimientos homogéneos, pero mucho más gruesos. La segunda limitación que tienen estas técnicas es la falta de selectividad, es decir, toda la superficie quedaría recubierta, por lo que si lo que deseamos es recubrir solo algunas partes de la superficie del electrodo tendríamos que hacer el recubrimiento en varias etapas por litografía, primero recubrir con una capa que posteriormente sería eliminada y a continuación cubrir la superficie con la película sol-gel [129].

En 1999, Shacham y colaboradores propusieron una alternativa elegante [130], para ayudar a solventar los inconvenientes citados anteriormente. La idea básica es la de manipular los dos pasos del método sol-gel [68], controlando el pH electroquímicamente en la interfase electrodo/disolución [131].

La disolución hidrolizada, el sol, se encuentra a un pH próximo a 2, a este valor de pH la condensación se da de forma muy lenta. Es posible acelerar la poli-condensación aplicando un potencial negativo en el electrodo, es decir, consiste en la generación electroquímica del catalizador básico necesario (OH^-), responsable de la poli-condensación, y así generar una película de sílice en la superficie conductora del electrodo.

La formación de la película sol-gel mediante el aumento local de pH se parece al depósito electrolítico de hidróxidos metálicos, en el que se provoca la reducción de H_2O para aumentar el pH localmente [111, 112]. Las características de la película se ven afectadas por el potencial aplicado, el tiempo de

electrodepósito, la naturaleza del electrodo, etc. por lo que modulando estos parámetros se pueden obtener diferentes espesores, por ejemplo.

El depósito es impulsado por la transferencia de electrones, que se producen en las proximidades de la superficie del electrodo, obligando a que el depósito se adapte íntimamente a la superficie. Esto permite el recubrimiento y relleno de geometrías complejas [133]. Esta técnica se limita, como es obvio, a superficies conductoras. Sin embargo, la formación de sol-gel sobre el electrodo no implica procesos de transferencia electrónica, sino más bien reacciones ácido-base.

La versatilidad de la técnica de electro-depósito se ha demostrado en trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de investigación llevándose a cabo la modificación de electrodos con sílice-PSS, sílice-SWCNT (nanotubos de carbono de pared simple), sílice-PANI para diferentes aplicaciones [134].

1.3 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es la síntesis de materiales basados en sílice utilizando técnicas electroquímicas. Se optimizará el método de depósito electroasistido para depositar capas finas de este material sobre diversos electrodos de carbón vítreo.

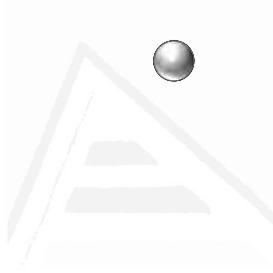
Se caracterizarán las propiedades del depósito de sílice resultante mediante técnicas termogravimétricas, espectroscópicas y de microscopía.

Se realizará la impresión molecular de matrices sol-gel soportadas sobre electrodos para ser empleadas en la detección electroquímica selectiva de neurotransmisores.

Se sintetizarán materiales basados en sílice modificada con grupos orgánicos (ORMOSIL) utilizando técnicas electroquímicas. Se estudiará el efecto del contenido en grupos orgánicos en los depósitos obtenidos.

Se evaluarán las propiedades de las capas electrosintetizadas (morfología, estabilidad térmica y composición química) modificadas con grupos orgánicos empleando los precursores adecuados.

Se estudiará la afinidad por los distintos neurotransmisores (dopamina, norepinefrina y epinefrina) de electrodos modificados con sílice funcionalizada orgánicamente.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. Experimental

2.1 Introducción

En este capítulo se describirán las técnicas de caracterización y síntesis utilizadas durante el desarrollo de esta tesis. Además de los reactivos y el material empleado. Sin embargo, las condiciones experimentales específicas se recogerán en los capítulos correspondientes.

2.2 Técnicas de caracterización

2.2.1 Técnicas microscópicas

La microscopía electrónica es una técnica instrumental que emplea haces de electrones muy acelerados y de muy elevada energía (desde cientos de eV hasta decenas de KeV), con el propósito de observar las características de la materia a escala nanométrica.

Estas técnicas se basan en la interacción de la radiación de electrones con la muestra. Esta interacción produce una serie de radiaciones secundarias: electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones transmitidos, radiación de rayos X, electrones Auger, catodoluminiscencia y energía absorbida (por la muestra). La utilización de una u otra nos permite obtener distinta información sobre la naturaleza de la muestra: morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc. En la figura 2.1 se muestra un esquema de los diferentes tipos de interacciones electrón-materia.

Las técnicas microscópicas empleadas han sido: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM).

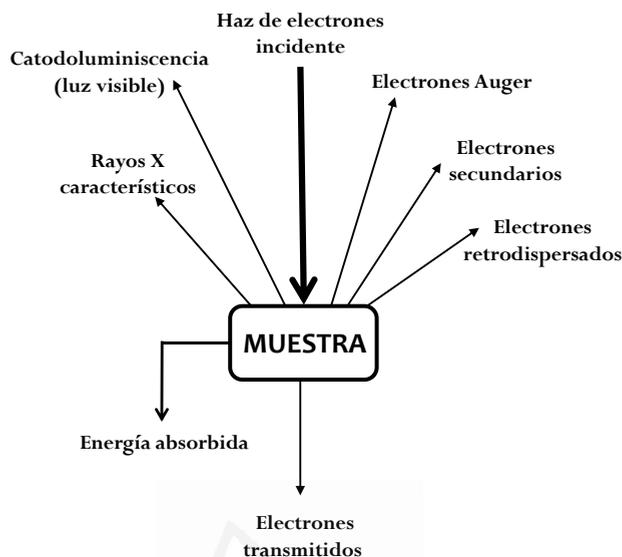


Figura 2.1. Tipos de interacción electrón-materia.

2.2.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la microscopía electrónica de transmisión (TEM), una muestra delgada se irradia con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, cuya energía está dentro del intervalo de 100 a 200 keV. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes [135]; la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina; y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra (composición química, de fases o mezcla de fases).

Una condición para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es que ésta sea delgada, es decir, transparente a los electrones. Es

recomendable no utilizar muestras de más de 10 nm de grosor ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra mejor será la calidad de las imágenes obtenidas.

Los microscopios electrónicos más sencillos constan de dos lentes formadoras de la imagen de manera muy parecida a los microscopios ópticos convencionales. La iluminación proviene de un cañón de electrones emitidos por un filamento de W o LaB₆. Los electrones son acelerados al aplicar un potencial negativo (100 – 100 kV) y enfocados mediante dos lentes condensadoras sobre una muestra delgada, transparente a los electrones.

Después de pasar a través de la muestra los electrones son recogidos y focalizados por la lente objetiva dentro de una imagen intermedia ampliada. La imagen es ampliada aún más gracias a las lentes proyectoras, que controlan la ampliación de la imagen en la pantalla fluorescente. La imagen final se proyecta sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica.

La preparación de las muestras consiste en la dispersión de ésta en etanol. Posteriormente, la dispersión se deposita sobre una rejilla de carbón o metálica y es introducida directamente en el microscopio.

En el presente trabajo se empleó el microscopio electrónico de transmisión de 120 kV marca *JEOL* modelo *JEM-1400 Plus*. La fuente de electrones empleada consiste en un filamento caliente de wolframio que por efecto termoiónico emite electrones, los cuales son acelerados por un potencial de 100 a 200 kV. Se obtiene una resolución entre líneas de 0.2 nm y entre puntos de 0.38 nm. La cámara de adquisición de imágenes es de la marca *GATAN* modelo *ORIOUS SC600*. Está montada en eje con el microscopio en la parte inferior y está integrada dentro del programa de adquisición y tratamiento de imágenes *GATAN*

DigitalMicrograph 1.80.70 para *GMS 1.8.0*. El equipo utilizado está instalado en Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante.

2.2.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite visualizar la morfología de muestras sólidas sobre el límite físico de la óptica, permitiendo una resolución de unos miles de Å, dependiendo de la naturaleza de la muestra [136]. La técnica emplea una fuente de emisión de electrones, generalmente de wolframio o lantano, y un haz de electrones acelerados de entre 5 y 30 keV. Ésta consiste, principalmente, en enviar un haz de electrones a la superficie de la muestra y, mediante un detector apropiado, registrar los electrones secundarios y retrodispersados. El haz se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones X e Y, de tal forma que la intensidad de la imagen varía en cada punto con la intensidad del haz de electrones generado en la superficie.

Los electrones arrancados de los átomos de la muestra, producto del bombardeo de electrones del haz primario, son denominados electrones secundarios. Éstos, proporcionan información acerca de la topografía superficial y es la señal con la que se obtiene una imagen de la muestra. Debido a la baja energía de los electrones secundarios (menos de 50 eV), en su viaje hacia el exterior de la muestra van perdiendo energía por diferentes interacciones, de forma que solo los que están muy próximos a la superficie tienen alguna probabilidad de escapar del material y llegar al detector. Por tanto, la señal de los electrones secundarios procede de la misma superficie y de una pequeñísima zona por debajo de ella, en torno a unos pocos nanómetros (del orden de 5 a 10 nm). Por otra parte, al ser electrones de baja energía, pueden ser desviados

fácilmente de su trayectoria emergente inicial, y se puede obtener información de zonas que no están a la vista del detector. Esta particularidad es fundamental para otorgar a esta señal la posibilidad de aportar información “del relieve”.

Los electrones que rebotan elásticamente sobre la superficie se denominan electrones retrodispersados. Su energía es superior a 50 eV y la profundidad del sitio de la que proceden (del orden de centenas de nanómetros) es mayor que la de los electrones secundarios. La intensidad de la señal de electrones retrodispersados, para una energía dada del haz, depende del número atómico de los átomos del material. Este hecho permite, a partir de diferencias de intensidad, distinguir fases de material de diferente composición química, aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas. Las zonas con mayor número atómico (Z) se verán más oscuras que las zonas que tienen menor número atómico. Esta es la principal aplicación de la señal de electrones retrodispersados.

Las muestras que vayan a ser analizadas mediante microscopía electrónica de barrido deben ser secadas antes de ser introducidas en el microscopio, de otro modo la baja presión en el mismo causará que el agua (y otros líquidos volátiles) se evapore saliendo violentamente de la muestra alterando la estructura de la misma. Cuando se desea visualizar una muestra en un microscopio electrónico de barrido ésta debe ser conductora ya que, de no ser así, se carga durante la irradiación por una acumulación de carga que desvía el haz electrónico y, como consecuencia de ello aparecen distorsiones en la imagen. Una solución a este problema es recubrir la muestra con una película conductora, de espesor comprendido entre 10 y 25 nm.

La elección del material con el que se va a recubrir la muestra depende fundamentalmente del estudio que se va a realizar. Así, para la observación de

imágenes de electrones secundarios el oro y el oro-paladio son los materiales que ofrecen mejores resultados; al ser elementos pesados, producen mayor emisión. Cuando lo que se pretende es realizar un estudio microanalítico es recomendable emplear carbono. El bajo número atómico de este elemento lo hace prácticamente transparente a los rayos X emitidos por la muestra. También se emplean, a veces, aluminio, cromo, etc. Además es importante que la muestra no se recubra con un material que forme parte de ella.

El microscopio electrónico de barrido utilizado en este trabajo es de la marca *JEOL JSM-840*, instalado en Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante. Este equipo consta de un detector de electrones secundarios tipo centelleador fotomultiplicador con resolución de 4 a 3.5 nm y un detector de electrones retrodispersados tipo Si P-N con resolución de 10 a 5 nm.

2.2.1.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), es un instrumento que al igual que el microscopio SEM es capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un rango de energía mucho mayor. El funcionamiento es igual al de un SEM convencional; se barre un haz de electrones sobre la superficie de la muestra mientras que en un monitor se visualiza la información que nos interesa en función de los detectores disponibles.

La mayor diferencia entre FESEM y SEM reside en el sistema de generación de electrones. El microscopio FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones

de alta y baja energía muy focalizados, lo que mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales, de 0.02 a 30 kV, permitiendo observar muestras sensibles al haz de electrones sin dañarlas y minimizando los efectos de carga. Otra característica muy destacable de los microscopios FESEM es la utilización de detectores dentro de la lente. Estos detectores están optimizados para trabajar a alta resolución y muy bajo potencial de aceleración, por lo que son fundamentales para obtener el máximo rendimiento al equipo.

El equipo instalado en Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante y usado en esta tesis es un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) marca ZEISS modelo *Merlin VP Compact* equipado con un sistema de microanálisis por EDX marca BRUKER modelo *Quantax 400*. La resolución que alcanza es 0,8 nm a 15 kV y 1,6 nm a 1 kV.

2.2.2 Técnicas espectroscópicas

La espectroscopia surgió con el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. La radiación electromagnética se atribuye a las diferencias de energía en las transiciones de los electrones de unos niveles atómicos a otros. La espectroscopia estudia en qué frecuencia o longitud de onda una sustancia puede absorber o emitir energía en forma de un cuanto de luz. La energía de un fotón (un cuanto de luz) de una onda electromagnética o su correspondiente frecuencia, equivale a la diferencia de energía entre dos estados cuánticos de la sustancia estudiada: $\Delta E = h\nu$, donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia del haz de luz u onda electromagnética asociada a ese cuanto de luz y ΔE es la diferencia de energía. En esta ecuación se basa la espectroscopia. Las diferencias de energía entre estados cuánticos dependen de la composición elemental de la muestra o de la estructura de la molécula, por eso estas técnicas

nos permiten obtener información desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo [137].

Existen distintos tipos de métodos espectroscópicos, según la naturaleza de su interacción, se pueden distinguir los siguientes:

-De absorción. Usa el rango del espectro electromagnético en el cual una sustancia absorbe. Incluye la espectrometría de absorción atómica y varias técnicas moleculares, como la espectroscopia infrarroja (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN).

-De emisión. Usa el rango del espectro electromagnético en el cual una sustancia irradia (emite). La sustancia primero debe absorber la energía. Esta energía puede proporcionarse con distintas fuentes, éstas determinan el nombre de la emisión subsiguiente, como la luminiscencia. Las técnicas de luminiscencia moleculares incluyen la espectrofluorimetría.

-De dispersión. Mide la cantidad de luz que una sustancia dispersa en ciertas longitudes de onda, ángulos de incidencia y ángulos de polarización. El proceso de dispersión es mucho más rápido que el proceso de absorción/emisión. Una de las aplicaciones más útiles es la espectroscopia Raman.

De todas las técnicas espectroscópicas, la que se ha usado en esta tesis ha sido la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en modo transmisión.

2.2.2.1 Espectroscopía FTIR en modo transmisión

La espectroscopia infrarroja es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se emplea con fines cuantitativos [138].

Cuando la radiación infrarroja incide sobre una muestra, es capaz de provocar cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes.

Tanto desde el punto de vista instrumental como de sus aplicaciones es conveniente dividir la región infrarroja en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). La gran mayoría de las aplicaciones analíticas clásicas de la espectroscopia infrarroja se basan en el empleo del infrarrojo medio ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo cercano ($13000\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$), que proporciona la posibilidad de convertir esta técnica en una técnica cuantitativa.

La radiación infrarroja a diferencia de la radiación UV, no es lo suficientemente energética como para inducir transiciones electrónicas. La absorción en el IR se restringe a los compuestos con diferencias de energía pequeñas en los posibles estados vibracional y rotacional.

Para que una molécula absorba radiación IR, las vibraciones o rotaciones dentro de la misma deben causar un cambio neto en su momento dipolar. El campo eléctrico alternante de la radiación interactúa con las fluctuaciones en el momento dipolar de la molécula. Si la frecuencia de la radiación es igual a la frecuencia vibracional de la molécula, entonces la radiación será absorbida, causando un cambio en la amplitud de vibración molecular [139].

Los átomos en las moléculas no están en una posición fija; se hallan sujetas a un número de vibraciones diferentes. Las vibraciones pueden clasificarse en dos categorías principales: *Stretching* (tensión) y *Bending* (torsión o deformación).

Stretching: cambios en las distancias interatómicas a lo largo del eje de enlace.

Bending: cambios en los ángulos entre dos enlaces. Hay cuatro tipos de torsión o deformación. En el plano: *Rocking* (balanceo) y *Scissoring* (vibración en tijera); Fuera del plano: *Wagging* (cabeceo) y *Twisting* (torsión).

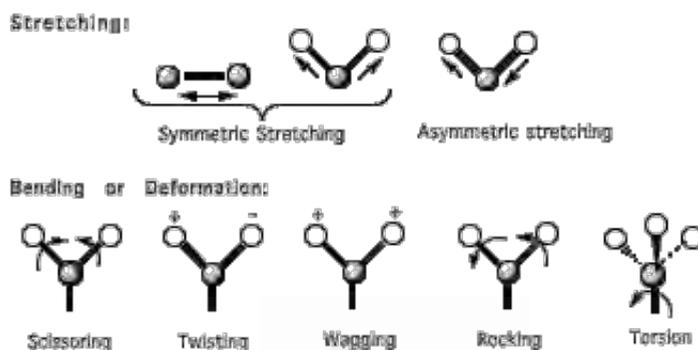


Figura 2.2. Vibraciones de tensión y deformación.

La técnica de transformada de Fourier, que permite mediante una operación matemática, convertir un espectro en dominio del tiempo a un espectro en dominio de frecuencia, permite la obtención de espectros de forma rápida, precisa y con relaciones Señal/Ruido (S/N) elevadas.

Esta técnica se basa en el análisis de la información vibracional contenida en un haz de luz infrarroja tras su interacción con una muestra problema. Los espectros resultantes representan la intensidad (I) de la radiación transmitida (I/I_0 , transmitancia) o absorbida ($-\log(I/I_0)$, absorbancia) por la muestra frente al número de onda, o número de ciclos por unidad de longitud, ν en cm^{-1} , que es una magnitud proporcional a la frecuencia y, por tanto, a la energía de la radiación.

Los enlaces entre los átomos que conforman las moléculas discretas y las macromoléculas presentan unas energías características para la excitación de sus distintos modos vibracionales, los cuales quedan en el intervalo de energías de la

radiación infrarroja, típicamente 4000 a 400 cm^{-1} . Dichas energías dependen de la naturaleza de los átomos directamente enlazados, del orden del enlace, del tipo de vibración (tensión simétrica/antisimétrica, ν -flexión/deformación en el plano y fuera del plano) y en menor medida de efectos electrónicos del entorno molecular o del medio que lo rodea. A la frecuencia característica para excitar uno de los modos vibracionales de un determinado enlace o grupo funcional presente en la muestra, el espectro infrarrojo presentará un pico en el espectro de transmisión, correspondiente a la absorción de radiación que ha tenido lugar. La intensidad de este pico depende de la concentración del grupo responsable, así como de un parámetro cuántico que describe la eficiencia con que se da la absorción.

En modo transmisión la radiación IR atraviesa la muestra registrándose la cantidad de energía absorbida por la muestra. A partir de la comparación de la radiación registrada tras atravesar la muestra, con un experimento de referencia se obtiene el espectro IR. Esta técnica permite analizar con los accesorios adecuados, muestras gaseosas, líquidas y sólidas. En caso de muestras sólidas, éstas se muelen junto con KBr en polvo (ópticamente transparente al IR) y se prensa para obtener una pastilla delgada que se expone a la radiación infrarroja.

Esta configuración (transmisión) es la que se ha usado en este trabajo, es la más extendida para muestras sólidas pulverulentas.

El equipo utilizado en la caracterización de materiales de sílice fue un espectrofotómetro *Nicolet 5700* con detector de sulfato de triglicina deuterada (*deuterated triglycine sulfate*, DTGS) y transformada de Fourier.

2.2.3 Técnicas termogravimétricas

La termogravimetría (TG) se define como la técnica en que se mide el peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras se somete la muestra a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica [140].

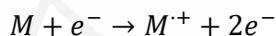
El programa de temperatura puede ser mantener a temperatura constante (isotermo), calentamiento a velocidad constante (el más habitual junto al isotermo), enfriamiento o cualquier combinación de ellos. Lo habitual es que se produzca una pérdida de peso pero también es posible que haya una ganancia de éste. La atmósfera puede ser estática o dinámica con un caudal determinado (también se emplean condiciones de presión reducida) y los gases más habituales son N₂, aire, Ar, CO₂. También se usan H₂, Cl₂, o SO₂. Una característica fundamental de la TG es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso tales como descomposiciones, sublimaciones, reducción, desorción, absorción, etc. mientras que no permite estudiar procesos como fusiones, transiciones de fase, etc.

Los métodos térmicos a menudo requieren análisis complementarios mediante otras técnicas para una completa comprensión de los procesos que están ocurriendo, incluso de los más sencillos. Los métodos térmicos más utilizados de manera simultánea con la TG son el análisis térmico diferencial (DTA) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) dando lugar a las técnicas TG-DTA y TG-DSC. Por su parte los productos desprendidos en un análisis termogravimétrico pueden analizarse mediante cualquier método analítico: los gases pueden separarse mediante una columna cromatográfica de gases, pueden analizarse mediante espectroscopia infrarroja (TG-IR) o por espectrometría de masas (TG-MS).

En esta tesis las distintas muestras de sílice fueron analizadas empleando termogravimetría acoplada a un espectrómetro de masas.

2.2.3.1 Termogravimetría acoplada a espectrometría de masas (TG-MS)

La espectrometría de masas es una magnífica técnica para la identificación de gases y vapores. Si una muestra en estado gaseoso se introduce en un espectrómetro de masas en condiciones de alto vacío (del orden de 10^{-6} mbar) las moléculas pueden ser ionizadas de diferentes formas, por ejemplo mediante impactos con electrones de alta energía acelerados mediante una diferencia de potencial del orden de 70 V:



La especie $M^{+\cdot}$ es el ion molecular, normalmente un catión radical con un electrón desapareado. Con una energía tan elevada, hay una alta probabilidad de que el ion molecular se divida en un fragmento iónico de masa más pequeña y un fragmento neutro. El patrón de fragmentación es característico de la molécula estudiada y puede utilizarse como una especie de huella dactilar [138].

El equipo utilizado es el que se encuentra en Servicios Técnicos de Investigación en la Universidad de Alicante, se trata de un equipo de TG-DTA de la marca *METTLER TOLEDO* modelo TGA/SDTA851e/LF/1600, capaz de trabajar entre temperatura ambiente y 1600 °C. En cuanto al Espectrómetro de Masas, se trata de un equipo cuadrupolar de la marca *PFEIFFER VACUUM* modelo *THERMOSTAR GSD301T* con un rango de masas de hasta 300 uma, con un detector SEM (multiplicador electrónico).

2.2.4 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas permiten el análisis de los procesos que ocurren en la superficie del electrodo (electrodo de trabajo o *working electrode*, WE) sumergido en un electrolito. La información fundamental de estas técnicas viene dada por la corriente eléctrica (i) que pasa a través del electrodo como respuesta a un estímulo, en una determinada escala de tiempo.

El estímulo al que se hace referencia es una diferencia de potencial (ΔE) aplicada respecto a otro electrodo (electrodo no polarizable, electrodo de referencia o *reference electrode*, RE). La corriente medida sobre el electrodo tiene un doble origen, ya que puede proceder tanto de la migración de iones para compensar cargas fijas en la superficie del electrodo (fenómenos capacitativos), o moléculas que experimentan una reacción de oxidación-reducción como resultado del potencial electroquímico aplicado (fenómenos farádicos) [63].

Celda electroquímica de tres electrodos.

Las técnicas electroquímicas requieren el uso de un electrodo auxiliar además del electrodo que se desea caracterizar y el electrodo de referencia.

Para que circule corriente es necesario un segundo electrodo sumergido en la disolución, llamado contra-electrodo o *counter electrode* (CE). Sobre él tiene lugar una reacción complementaria a la que ocurre en el electrodo de trabajo (WE) que cierra el tránsito de cargas a través del sistema. Generalmente, se trata de un material inerte cuya reactividad electroquímica no implica la disolución de iones metálicos, los más adecuados son el Pt, el Au y los materiales carbonosos inertes.

Entre los electrodos de referencia más comunes se encuentran los electrodos de referencia de $H_2(g)$ en el cual se burbujea H_2 sobre un negro de Pt con elevada área superficial sumergido en una disolución con electrolito soporte

(*Normal Hydrogen Electrode*, NHE, para $\text{pH}=0$ y *Reversible Hydrogen Electrode*, RHE para pH igual al de la disolución de trabajo); los electrodos de segunda especie como el Ag/AgCl y el de calomelanos ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$) generalmente sumergidos en disoluciones concentradas de NaCl o KCl ; y por último los electrodos denominados pseudo-referencias por tener un potencial sensible a las condiciones de trabajo, siendo el más típico un hilo de Ag el cual es sumergido directamente en la disolución de trabajo.



Figura 2.3. Celda electroquímica de tres electrodos.

Como puede observarse en la figura 2.3 además de los tres electrodos ya descritos se hace uso de un pasador de gases con el objetivo de eliminar oxígeno disuelto en disolución mediante burbujeo de N_2 (g). Esto suele realizarse a través de un burbujeo constante durante al menos 10 minutos antes de comenzar el experimento, y a continuación se pasa a mantener purgado el ambiente interno de la celda con el N_2 , con el objetivo de mantener una atmósfera inerte durante las medidas electroquímicas.

También se suele usar un capilar Luggin provisto de una llave que permite mantener al electrodo de referencia en un pequeño compartimento saturado de H_2 (g) y ajeno a posibles cambios en la composición de la disolución. El uso de un hilo de Pt como parte del sistema de referencia aconseja llenar el Luggin con una disolución que solo contenga el electrolito soporte.

Los electrodos auxiliares comúnmente empleados en la presente tesis son:

-contra-electrodo (CE): hilo de Pt.

-electrodo de referencia (RE): RHE ($E = -0.059 \cdot \text{pH}$ vs NHE) o pseudo-referencia de Ag para casos específicos.

Dispositivos electrónicos para estudios electroquímicos.

Además de los electrodos, se necesita un dispositivo electrónico que permita fijar el potencial entre el WE y el RE, a la vez que mide la corriente entre WE y CE. Además, para aprovechar todas las posibilidades que ofrece la electroquímica es necesario que estos dispositivos sean capaces de generar programas de potencial complejos tales como: barridos de potencial a distintas velocidades, saltos sencillos o múltiples entre distintos valores de potencial, programas cíclicos, etc. Es por ello que un sistema electroquímico completo necesita, además de la celda, los siguientes componentes:

-un potencióstato;

-un dispositivo generador de señales (programable), que indica al potencióstato el potencial que debe establecer en cada instante.

-un registrador que digitalice la señal de corriente circulada como función de la variable potencial/tiempo.

Estos componentes se conectan como se muestra en la figura 2.4.

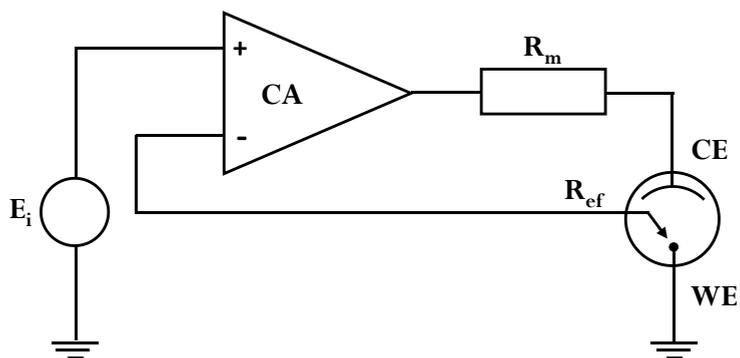


Figura 2.4. Esquema de un sistema electroquímico de tres electrodos.

En el presente trabajo los equipos usados fueron un generador de señales *EG&G Parc* (Priceton Applied Research) *Mod. 175*, un potencióstato *eDAQ EA161* y un registrador digital *eDAQ ED401* controlados por el software *eDAQ EChart*.

2.2.4.1 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más empleadas por su sencillez operacional y la cantidad de información que se puede obtener con un simple voltamperograma. Se trata de un método potenciodinámico en el que el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo es variado a velocidad constante entre dos valores límite de potencial de forma cíclica. El perfil potencial-tiempo de un ciclo es de tipo triangular (figura 2.5), en el que el vértice es el límite superior de potencial y la pendiente de los lados es la velocidad de barrido.

La respuesta típica de un proceso farádico de una especie R en disolución se muestra en la figura 2.5. La corriente aumenta a medida que lo hace el sobre-potencial aplicado ($E-E_0'$), hasta que se alcanza el máximo gradiente de concentración para la especie reactiva, R , que es el que determina la velocidad a

la que difunden las moléculas hacia la superficie. En el máximo de corriente, la concentración de la especie reactiva en la superficie desciende a cero, mientras que el gradiente comienza a disminuir por empobrecimiento del entorno del electrodo en dicha especie. En el barrido catódico el entorno se ha enriquecido en la especie O , la reducción de esta especie produce la corriente negativa observada en el voltamperograma.

Una particularidad de la voltamperometría cíclica es que cualquier disolución preparada a partir de O o de R , siempre registrará los picos correspondientes a las dos especies, debido a que durante el barrido (catódico o anódico) se generan en las inmediaciones del electrodo la especie que originariamente estaba ausente [141].

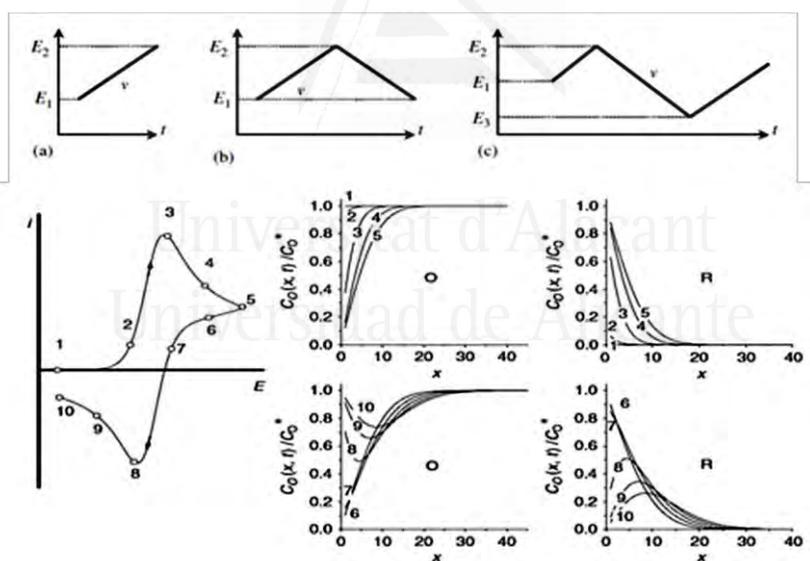


Figura 2.5. Zona superior: diagramas potencial-tiempo a distintas condiciones de potencial inicial, potencial final y velocidad de barrido. Zona inferior izquierda: voltamperograma típico de una especie redox en disolución; derecha: perfiles de gradiente de concentración para un determinado valor de potencial [141].

Por lo general, cuando las especies están adsorbidas sobre la superficie del electrodo el pico registrado es simétrico y no presenta cola difusional, además que su máximo coincide en los dos sentidos del barrido, al no tener influencia el control difusional (procesos de superficie).

A parte de los procesos farádicos descritos se deben tener en cuenta los procesos de origen capacitativo, que dan lugar a una corriente base de signo positivo en el barrido anódico (hacia potenciales más positivos) y una corriente base negativa en el barrido catódico (hacia potenciales más negativos), como resultado de la migración de iones para compensar la creciente densidad de carga de la superficie del electrodo. A esta contribución “de fondo” se le denomina comúnmente carga de la “doble capa” y su magnitud en coulombios (carga encerrada) está relacionada con el área activa real del electrodo. A la hora de estimar la corriente de pico relacionada con un proceso farádico será necesario trazar una línea base para la sustracción de la corriente de fondo relacionada con esta doble capa.

2.2.4.2 Cronoamperometría o salto potencioestático

Esta técnica electroquímica consiste en aplicar un salto de potencial sobre el electrodo de trabajo, desde un potencial inicial E_1 hasta un potencial final E_2 (figura 2.6) registrándose la variación de la corriente en el tiempo.

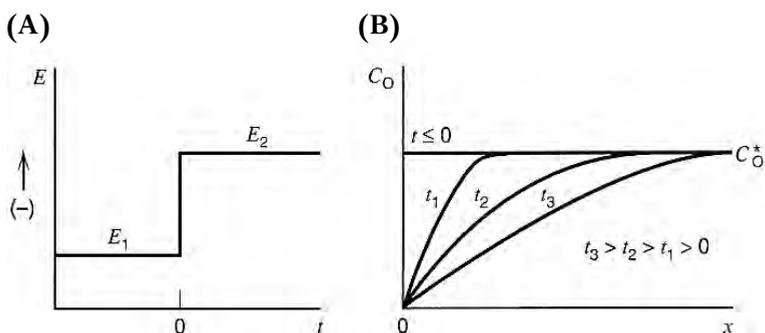


Figura 2.6. (A) Señal de excitación utilizada en un experimento cronoamperométrico básico; (B) perfiles de concentración para varios tiempos en el experimento [141].

La figura 2.6 muestra una curva $E(V)$ vs $t(s)$ donde el inicio del experimento se da a un potencial E_1 (generalmente a un potencial donde no se observan procesos farádicos) y a continuación, se aplica un potencial continuo E_2 hasta la finalización del experimento, este potencial puede ser de oxidación o de reducción. Mediante el análisis de la corriente con el tiempo se pueden estudiar procesos en disolución y determinar los coeficientes de difusión.

El equipo usado para este tipo de experimento fue el mismo que el usado para las medidas de voltamperometría cíclica.

2.2.4.3 Depósito por electrolisis a corriente constante

El electrodeposición o depósito electroquímico es un tratamiento electroquímico que se emplea para modificar un material con una capa deseada, por ejemplo, con resistencia a la corrosión, al desgaste o la abrasión, con cualidades estéticas o para la modificación de electrodos.

Se aplica una corriente eléctrica para provocar una reacción redox que produzca el depósito de una especie en disolución. Tal como puede observarse en la figura 2.7 tanto el ánodo como el cátodo, conectados a una fuente externa

de corriente continua (galvanostato), se encuentran inmersos en la disolución (baño electrolítico) que contiene los precursores del depósito electroquímico.

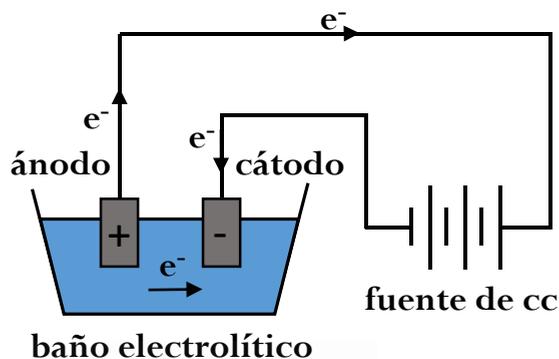


Figura 2.7. Esquema del sistema usado para realizar el depósito electroquímico.

Para la realización del depósito electroquímico en esta tesis se ha usado un galvanostato, como cátodo una barra de carbón vítreo y como ánodo un hilo de Pt.

2.3 Disoluciones, reactivos y electrodos

El agua utilizada para la preparación de todas las disoluciones se obtuvo de un sistema *ELGA Lab Water Purelab* con una resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ medida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Como electrolitos soporte se emplearon disoluciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98%) suministrado por *Merck*, y disoluciones tamponadas a pH 7 preparadas con dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4 , 99.5%) y hidrógeno fosfato de dipotasio (K_2HPO_4 , 99.8%), reactivos suministrados por *Merck* y *Sigma-Aldrich*, respectivamente.

Las disoluciones de trabajo se desoxigenaron antes del comienzo de los experimentos burbujando, durante unos 15 minutos, gas nitrógeno (99.999%) suministrado por *Air Liquide*.

Los reactivos utilizados fueron: tetraetoxisilano (TEOS, 98%), metil-trietoxisilano (MTES, 99%), n-propil-trietoxisilano (PrTES, 98%), isobutil-trietoxisilano (isoBTES, 95%), octil-trimetoxisilano (OTMS, 96%), fenil-trietoxisilano (PhTES, 98%), etanol (EtOH, 99.95%), ácido L-ascórbico (AA, 99%), dopamina hidrocloreto (DA, 98%), (-)-epinefrina (EP, 97%) y norepinefrina (NE, 98%) suministrados por *Sigma-Aldrich*; cloruro potásico (KCl, 99%), bromuro potásico (KBr, 99%) y ácido clorhídrico (HCl, 37%) suministrados por *Merck*; permanganato potásico (KMnO₄, 99%), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 20%) suministrados por *VWR International*.

Los electrodos de trabajo utilizados fueron un electrodo policristalino de platino, varillas de carbón vítreo (área geométrica = 0.07 cm²) suministradas por *Carbone Lorraine*, modelo V-25. Como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino y como electrodo de referencia un electrodo reversible de hidrógeno (RHE), burbujando gas hidrógeno (99.999%) suministrado por *Air Liquide*.

Limpieza del material de vidrio

En voltamperometría cíclica la limpieza del material de vidrio que se encuentra en contacto con las disoluciones es bastante importante. El protocolo de limpieza es el siguiente:

Se sumerge el material de vidrio en una disolución ácida concentrada de KMnO₄ durante unas 12 horas. La receta de preparación de la disolución oxidante es la siguiente: 30 g de KMnO₄ + 5 mL H₂SO₄ (98%) en 2 L de H₂O. De esta forma se consigue oxidar la materia orgánica presente a especies más sencillas de eliminar.

A continuación, se extrae el material de vidrio de la mezcla oxidante y se enjuaga con una disolución ácida de H_2O_2 . Con esta disolución se consiguen reducir los restos de MnO_4^- que no hayan reaccionado. Luego el material es lavado con abundante agua ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) para eliminar las sales, residuos y los productos de la oxidación.

Tras el lavado se hierve repetidamente el material de vidrio en placas calefactoras o en microondas con agua ultrapura, se pretende con ello eliminar las sustancias que aún puedan quedar adheridas a las paredes del material. Finalmente, el material se enjuaga con agua ultrapura y éste queda listo para ser usado.

El último paso de este protocolo de limpieza consiste en comprobar el grado de limpieza de la celda electroquímica. Para ello se realiza un voltamperograma cíclico de un electrodo policristalino de Pt en la disolución de trabajo (normalmente H_2SO_4 0.5M, o tampón fosfato). La figura 2.8 muestra un voltamperograma para un electrodo de Pt inmerso en una disolución 0.5M de H_2SO_4 , se observa la zona característica generalmente denominada adsorción-desorción de hidrógeno (1,2 y 3,4 de la figura 2.8), aunque también se da la adsorción-desorción del anión del electrolito; la zona no farádica completamente horizontal (7 en la figura 2.8) y el proceso de oxidación-reducción superficial del Pt (5, 6 en la figura 2.8). Lo que demuestra que el nivel de limpieza la celda es el adecuado para trabajar.

Además, este último paso se utiliza como calibrado del electrodo de referencia (RHE, Ag/AgCl, pseudoreferencia), teniendo en cuenta que la producción de hidrógeno con un electrodo de Pt ocurre a 0.0 V vs NHE.

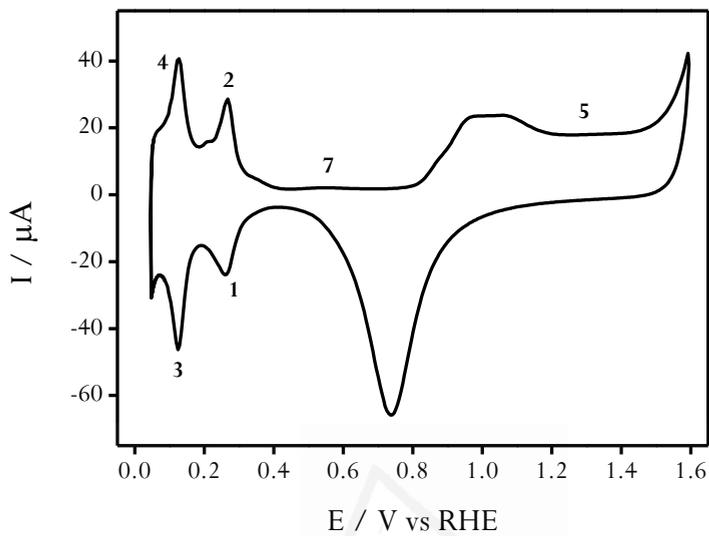
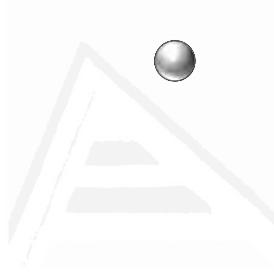


Figura 2.8. Voltamperograma cíclico de un electrodo policristalino de Pt inmerso en una disolución 0.5M H₂SO₄.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3. Síntesis y caracterización de sílice

3.1 Introducción

La sílice es seguramente el polímero inorgánico más estudiado y por ende conocido [67,142]. Como ya se expuso en el capítulo 1, mediante el método sol-gel, a través de la hidrólisis de alcóxidos metálicos adecuados y la posterior condensación de los silanoles formados en esa primera etapa (figura 3.1A), se preparan materiales híbridos inorgánicos-orgánicos, permitiendo, de una forma eficiente y sencilla, la incorporación de grupos orgánicos a matrices inorgánicas. Los compuestos obtenidos, conocidos con el nombre de organosílices (ORMOSIL), se caracterizan por tener enlaces silicio-carbono en su estructura (figura 3.1B), es decir, grupos siloxano (del inglés *siloxanes*: *silicon oxygen alkanes*) [143].

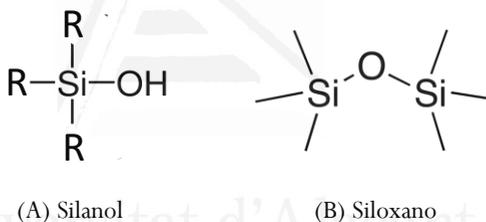


Figura 3.1 Estructura química de silanol (A) y siloxano (B).

Las propiedades de estos geles están influenciadas por variables tales como la relación agua:catalizador:alcóxido en la disolución precursora del gel, la estructura del alcóxido precursor, el pH del medio de reacción, el tipo de disolvente, la temperatura y la concentración total de las sustancias implicadas en la reacción [67]. Estos materiales tienen aplicaciones muy diversas, por ejemplo, en catálisis, como recubrimientos protectores y de intercambio iónico, se usan en técnicas de separación (cromatografía), impresión molecular, sensores químicos, entre muchas otras aplicaciones [78,79,96,97].

En la superficie de la sílice se encuentran grupos silanol de distintos tipos: aislados, geminales y vecinales, como los mostrados en la figura 3.2., éstos le confieren a la sílice diferentes propiedades químicas superficiales. Los grupos silanol se consideran sitios con carácter hidrofílico, con distinto grado de acidez [144]. Además, en la superficie de la sílice se encuentran los grupos orgánicos con los que haya sido modificada, que en general se consideran hidrófobos [142].

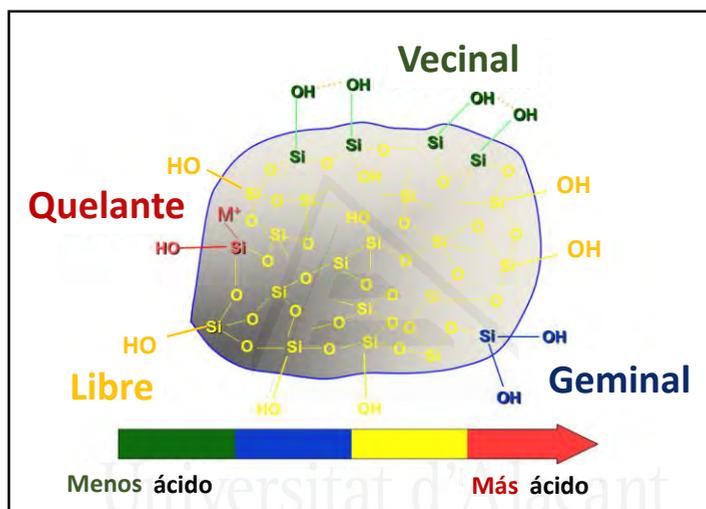


Figura 3.2. Diferentes tipos de grupos silanol en la sílice [144].

Además, los geles obtenidos con diferentes precursores Si-alcóxidos presentan diferencias dependiendo del grupo orgánico enlazado a la matriz inorgánica. Las diferencias en su estructura y composición están relacionadas con diferencias en sus propiedades. En bibliografía se encuentran numerosos estudios de las diferentes propiedades: química y área superficial, porosidad, hidrofobicidad, estabilidad térmica, morfología, capacidad de retención, etc.[67,68,145,146].

En este capítulo se ha llevado a cabo la caracterización morfológica, mediante el uso de técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM).

También se han empleado técnicas de análisis termogravimétrico (TG) para estudiar la estabilidad térmica y conocer cómo es la interacción entre los grupos orgánicos y el silicio. Con el objetivo de hacer un análisis más completo, el análisis térmico se realizó acoplado a espectrometría de masas. Esta técnica permite además conocer la composición del gel formado.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en modo transmisión fue utilizada para obtener información acerca de los distintos grupos funcionales presentes en la sílice. Con esta técnica se examinó el efecto de los grupos orgánicos presentes en la sílice con cadenas alifáticas de distinta longitud y ramificación, así como la presencia de grupos aromáticos.

3.2 Experimental

Los reactivos utilizados fueron: tetraetoxisilano (TEOS), metil-trietoxisilano (MTES), n-propil-trietoxisilano (PrTES), isobutil-trietoxisilano (isoBTES), octil-trimetoxisilano (OTMS), fenil-trietoxisilano (PhTES), etanol (EtOH), cloruro potásico (KCl), ácido clorhídrico (HCl) pureza del 37%. Todas las disoluciones fueron preparadas usando agua ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenida de un sistema *ELGA Lab Water Purelab*. Para más detalles ver el capítulo 2.

Como se explicó en el capítulo 1 (epígrafe 1.2.1) para sintetizar sílice mediante el método sol-gel se llevan a cabo dos reacciones, la primera de ellas consiste en la hidrólisis ácida de los precursores. En el caso de la sílice convencional (SC) se mezclan 6 mL de TEOS (0.0269 moles), 8.2 mL de EtOH

y 5.8 mL de una disolución que contiene 0.01M HCl + 0.46 M KCl, y se agita durante una hora con agitación magnética. El EtOH actúa como co-disolvente, el HCl como catalizador ácido y el KCl proporciona la conductividad necesaria para llevar a cabo la etapa de condensación mediante una reacción electroquímica. Una vez realizada la hidrólisis tenemos una disolución metaestable, conocida como sol, formada por coloides de sílice.

La segunda etapa, la condensación, se llevó a cabo mediante una reacción electroquímica, por vía catódica.

La figura 3.3 muestra el voltamperograma cíclico estabilizado para un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución sol que contiene KCl como electrolito soporte. En el barrido hacia potenciales negativos se observa la aparición de una corriente negativa a potenciales menos negativos que -0.5 V.

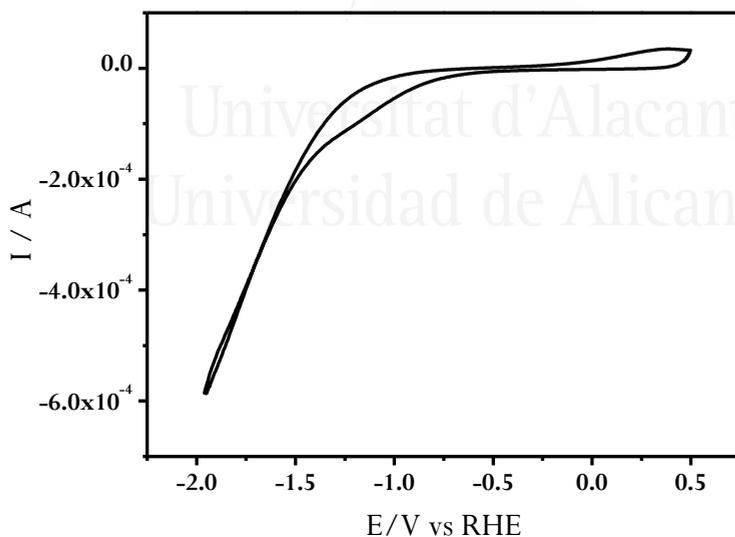
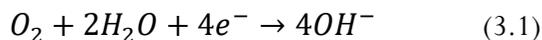


Figura 3.3. Voltamperograma cíclico estabilizado de un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución precursora de sílice (TEOS+HCl+EtOH).

Esta corriente negativa corresponde a un proceso de reducción, según bibliografía podrían ocurrir las siguientes reacciones [147]:



Puesto que estamos en una disolución no desoxigenada la reducción de oxígeno puede darse aunque en menor extensión que la reducción de los protones para generar H_2 , en ambos casos, se produce un aumento del pH. Este aumento de pH acelera los procesos de gelificación de la sílice en el entorno del electrodo.

Aprovechando este efecto se preparó un dispositivo experimental para llevar a cabo la modificación de los electrodos con películas de sílice, que se muestra en la figura 3.4. Al electrodo de carbón vítreo inmerso en el sol se le aplica una corriente negativa (-0.175 mA) y como consecuencia se produce la reducción de agua y un aumento del pH en las cercanías del electrodo, provocando la gelificación de la sílice. La corriente fue aplicada durante 1 minuto. Como ánodo se utilizó un hilo de Pt con forma espiral.

Además de sílice convencional podemos sintetizar de igual forma sílice modificada orgánicamente (ORMOSIL). Las disoluciones precursoras de los distintos ORMOSIL se prepararon siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la sílice convencional, pero reemplazando parte del precursor TEOS por los correspondientes precursores modificados con grupos orgánicos (trialcoxisilanos): metil-trietoxisilano (MTES), n-propil-trietoxisilano (PrTES), isobutil-trietoxisilano (isoBTES), octil-trietoxisilano (OTMS) y fenil-trietoxisilano (PhTES). Los moles totales de precursor de silicio se mantuvieron constantes (0.0269 moles).

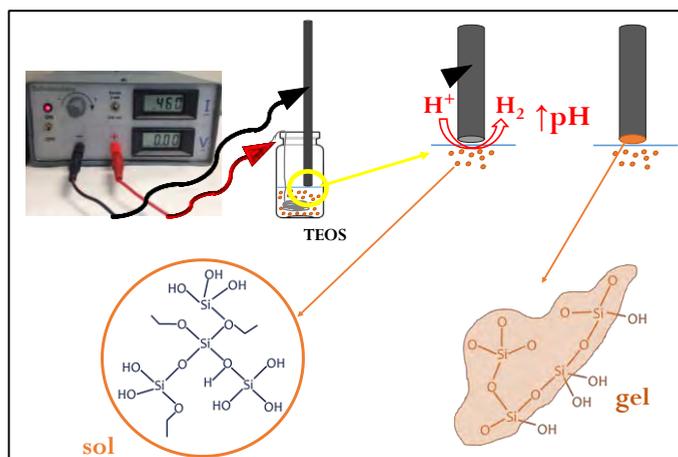


Figura 3.4. Esquema del depósito electroasistido.

En la tabla 3.1 se muestra la nomenclatura utilizada para identificar las distintas capas de sílice sintetizadas. Así, la sílice convencional (SC) preparada tal y como se describió anteriormente se etiquetó como SC. Para el caso de las capas modificadas con grupos orgánicos (R) se etiquetaron empleando el término xR, siendo x la fracción molar de precursor orgánico (R–Si(EtO)₃) en la mezcla inicial (expresada como %) y R un identificador del grupo orgánico empleado y sustituido por : M para R = –CH₃ (metilo); P para R = –CH₂CH₂CH₃ (propilo); I para R = –CH(CH₃)₃ (isobutilo); O para R = –(CH₂)₇CH₃ (octilo); y F para R = –C₆H₅ (fenilo). En general, una película de gel de sílice xR se representa con la fórmula $SiO_{(2-0.5x)}R_x$, sustituyendo x por el valor correspondiente para cada concentración se obtiene la composición teórica del gel, tal como se muestra en la tabla. Así por ejemplo, la sílice etiquetada como 5I correspondería a una capa sintetizada a partir de una disolución precursora en la que el 5% de los moles de precursor son de isobutil-trietoxisilano y el 95% restante de tetraetoxisilano (Si(EtO)₄).

Tabla 3.1. Fracción molar expresada como moles de precursor orgánico de silicio entre moles totales de precursor de silicio en las disoluciones precursoras de sílice modificada orgánicamente, xR (moles totales de silicio=0.0269).

Fracción molar R-Si(EtO) ₃ /moles Si totales	Composición teórica del gel	Acrónimo
0	SiO ₂	SC
0.01	SiO _{1.995} R _{0.01}	1R
0.05	SiO _{1.975} R _{0.05}	5R
0.10	SiO _{1.95} R _{0.1}	10R
0.20	SiO _{1.9} R _{0.2}	20R

Para realizar los análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis termogravimétrico acoplado a espectrometría de masas (TG/MS) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier por transmisión (FTIR) la sílice se obtuvo sintetizando películas sobre barras de carbón vítreo, se rasparon y se acumuló la cantidad necesaria para cada análisis.

En el caso de análisis termogravimétrico (TG) se molturó la sílice y se secó durante toda la noche usando una estufa a vacío a 65°C para eliminar la humedad; posteriormente, se usaron 20 mg de muestra en un crisol de alúmina. Los análisis termogravimétricos se realizaron en las condiciones siguientes:

- Atmósfera N₂:O₂ en relación 4:1
- Flujo: 100 mL·min⁻¹
- Etapa isoterma a 25°C durante 120 minutos
- Rampa de temperatura de 10°C·min⁻¹ hasta 700°C
- Acoplado a un espectrómetro de masas en modo SIM (*Single-Ion monitoring*) y se siguió la masa 44 con el fin de determinar el contenido en grupos orgánicos en la sílice sintetizada.

Estos análisis se realizaron con el equipo que se encuentra en Servicios Técnicos de Investigación en la Universidad de Alicante, se trata de un equipo de TG-DTA de la marca *METTLER TOLEDO* modelo TGA/SDTA851e/LF/1600. En cuanto al espectrómetro de masas, es un equipo cuadrupolar de la marca *PFEIFFER VACUUM* modelo *THERMOSTAR GSD301T* con un rango de masas de hasta 300 uma y con detector SEM (multiplicador electrónico).

Para la caracterización por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en modo transmisión, la sílice se secó durante toda la noche usando una estufa a vacío a 65°C para eliminar la humedad. La sílice en polvo se molturó con KBr con una concentración de 0.2% en peso (400 mg de KBr y 1 mg de sílice). Se pesaron 150 mg de esta mezcla y se prensaron aplicando 3.5 Tn durante 15 minutos usando un molde para obtener una pastilla. Los espectros se obtuvieron adquiriendo 100 interferogramas con una resolución de 8 cm⁻¹, en modo transmisión. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro *Nicolet 5700* con detector de sulfato de triglicina deuterada (*deuterated triglycine sulfate*, DTGS).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Caracterización por microscopía electrónica

La caracterización morfológica de las películas de sílice obtenidas electroquímicamente se ha llevado a cabo utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión y de barrido por emisión de campo (FESEM).

3.3.1.1 Microscopía electrónica de transmisión

Para la caracterización electrónica de transmisión (TEM), la sílice se obtuvo tal y como se explica en la parte experimental de este capítulo (epígrafe 3.2). La sílice obtenida en forma de polvo se suspendió en etanol y se soportó

sobre una rejilla de carbono o metálica para ser estudiada. El equipo utilizado fue el microscopio electrónico de transmisión de 120 kV marca *JEOL* modelo *JEM-1400 Plus* disponible en los Servicios Técnicos de Investigación en la Universidad de Alicante.

En la figura 3.5 se muestran las micrografías obtenidas para sílice convencional (SC) y sílice modificada con distintos grupos orgánicos con una relación molar del 10% del alcóxido correspondiente (10R) en la disolución precursora.

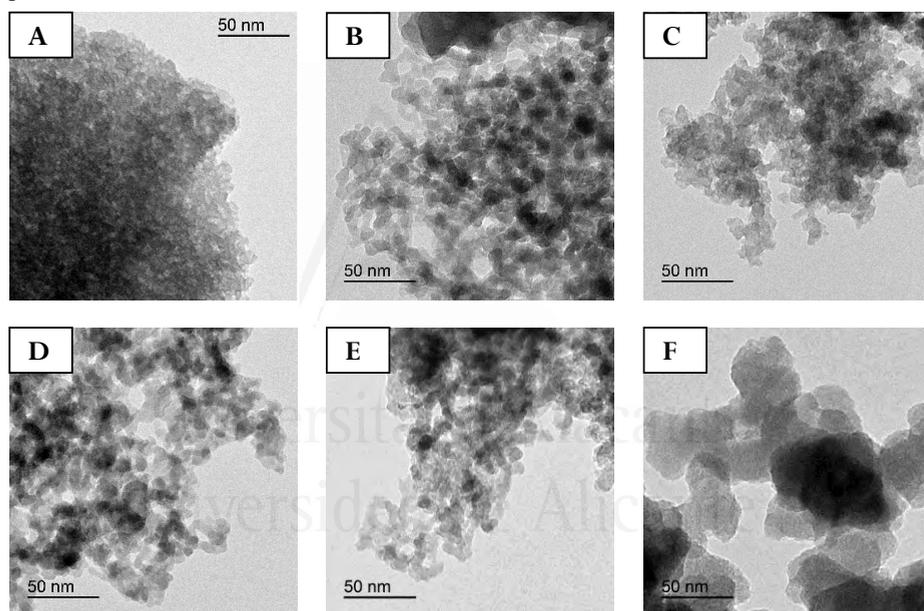


Figura 3.5. Micrografías realizadas por TEM para (A) sílice convencional (SC); sílice 10M (B), 10P (C), 10I (D), 10O (E) y 10F (F).

La micrografía correspondiente a sílice convencional (SC) se puede observar en la figura 3.5A, se aprecia una estructura poco característica y compacta que debe ser el resultado de la agregación de los coloides de sílice, si bien estos no se aprecian claramente tienen una medida aproximada de 5-10 nm.

Las micrografías de sílice modificada orgánicamente usando el 10% de alcóxido precursor (10R) se observan en las figuras 3.5 (B-F), de igual forma que para sílice convencional se observa una estructura poco característica, aunque algo menos compacta que para SC y los coloides se observan algo más claramente, con tamaños de 10-30 nm para sílice modificada con grupos metilo, propilo, isobutilo, octilo y fenilo.

3.3.1.2 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo

Para la caracterización de sílice por microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), las películas se prepararon sobre electrodos de carbón vítreo y exentas de humedad, se introdujeron en el portamuestras del microscopio sin ningún tipo de pretratamiento.

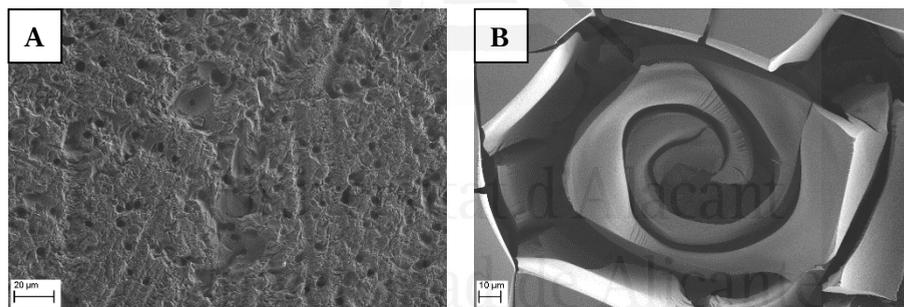


Figura 3.6. Micrografías obtenidas por FESEM (A) para un electrodo de carbón vítreo sin modificar y (B) un electrodo de carbón vítreo modificado con sílice convencional (SC).

En la figura 3.6A se muestra la micrografía obtenida por FESEM para un electrodo de carbón vítreo sin modificar. Se observa que tiene un aspecto heterogéneo, se pueden apreciar agujeros y las estrías como consecuencia del proceso de lijado del electrodo.

En la figura 3.6B se muestra la micrografía de un electrodo de carbón vítreo modificado con sílice convencional, se observa que la sílice al secarse lo hace formando espirales.

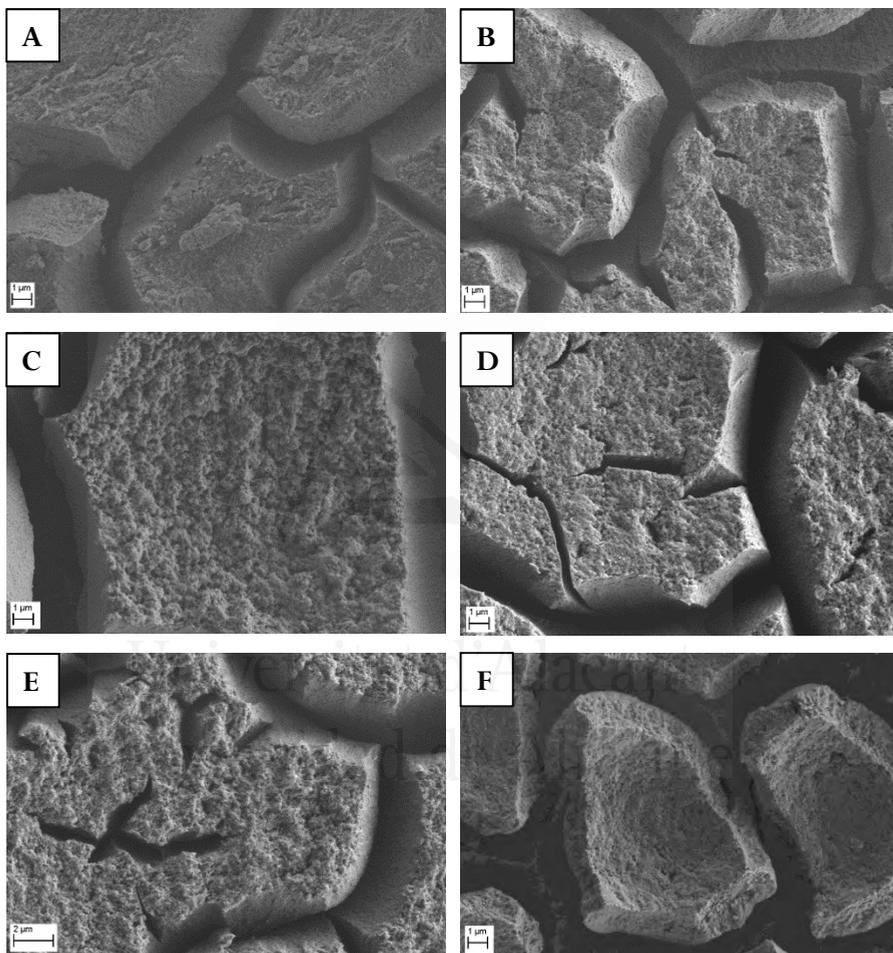


Figura 3.7. Micrografías obtenidas por FESEM para un electrodo de carbón vítreo modificado con sílice convencional (A) y con sílice modificada con distintos grupos orgánicos: (B) 10% metilo, (C) 10% propilo, (D) 10% isobutilo, (E) 10% octilo y (F) 10% fenilo.

En la figura 3.7 se muestran las micrografías de un electrodo de carbón vítreo modificado con sílice convencional (A) y sílice modificada con el 10% de los distintos grupos orgánicos: (B) metilo, (C) propilo, (D) isobutilo, (E) octilo y (F) fenilo. En todos los casos se observa que estos geles se secan formando placas de tamaños comprendidos entre 5-20 μm y con un grosor de $\sim 2 \mu\text{m}$.

En la figura 3.8 se muestran las micrografías para electrodos de carbón vítreo modificados con sílice funcionalizada con el 20% de distintos grupos orgánicos: (A) propilo y (B) octilo. Se observa la formación de agregados para sílice modificada con el 20% de grupos propilo y octilo en la disolución precursora del gel. En el caso de la sílice modificada con grupos propilo (A) estos agregados tienen forma de hebras y para grupos octilo (B) tienen forma esférica con tamaños comprendidos entre 1 y 20 μm . Esto se deberá probablemente a la segregación de fases, que es más común cuando los valores de concentración de precursor orgánico es elevada [148,149]. Para sílice modificada con los otros grupos orgánicos no aparecen agregados.

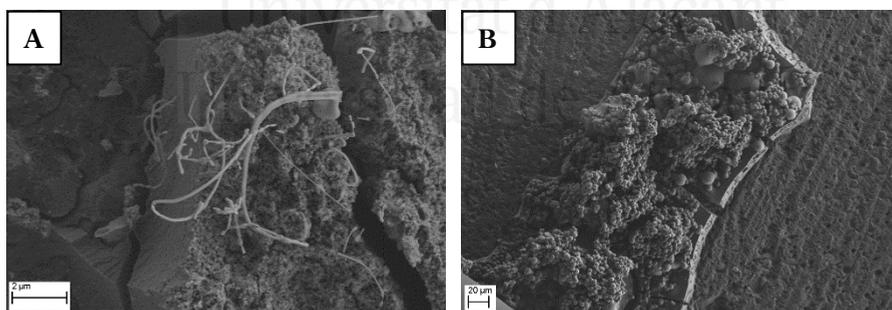


Figura 3.8. Micrografías FESEM de un electrodo de carbón vítreo modificado con (A) sílice 20P (5% n-propil-trietoxisilano) y (B) 20O (20% octil-trimetoxisilano).

3.3.2 Caracterización por análisis termogravimétrico

La termogravimetría es una técnica de análisis térmico en la que se mide la variación de masa en función del tiempo o la temperatura mientras la muestra es sometida a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica.

En primer lugar se han analizado una serie de muestras, en concreto sílice convencional y distintas sílices 10R, para conocer en detalle la interacción entre el grupo orgánico (R) y el silicio. Las condiciones del análisis se muestran en la parte experimental de este capítulo (epígrafe 3.2).

La figura 3.9A muestra el termograma o curva termogravimétrica (TG) para una muestra de sílice convencional (SC). En ella observamos el cambio de masa expresado como porcentaje frente a la temperatura (línea negra). También está representada la curva DTG (línea roja, la primera derivada de la curva TG frente a la temperatura), es decir, la velocidad de pérdida o ganancia de masa, expresada en $\text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$. En esta figura vemos que la masa de la muestra empieza a descender a una temperatura próxima a 100°C , por encima de esta temperatura se observa una pérdida de masa constante con la temperatura no observándose procesos muy definidos. La curva DTG (línea roja) nos muestra la velocidad del cambio de masa, en este caso pérdida de masa, al aumentar la temperatura. Alrededor de 100°C observamos un pico que puede relacionarse con la pérdida de agua contenida en el gel, y para valores de temperatura mayores se observan cambios pero no tan agudos.

En la figura 3.9B se muestra la cuantificación de la señal obtenida por espectrometría de masas para m/z 44 (CO_2), se observan dos picos alrededor de 100 y 400°C .

La pérdida de masa que tiene lugar a 100°C también podría relacionarse con la pérdida de moléculas de EtOH que podrían haber quedado en los poros de la sílice. A 400°C se observa un pico de CO₂, que podría ser debido a restos de EtO⁻ retenidos en el gel, probablemente grupos etóxido no hidrolizados enlazados a silicio [150].

El porcentaje en peso perdido en el proceso que ocurre a 100°C es del 2.68%. Para el proceso que tiene lugar a una temperatura próxima a 400°C la pérdida de masa es del 2.58%. Esto se traduce en que el 1.39% de la masa del gel corresponde a grupos EtO⁻ no hidrolizados.

En el primer proceso (100°C) la pérdida de masa es más o menos similar a la que se produce a 400°C. Sin embargo, la cuantificación de la cantidad de CO₂ formada es 270 μmol·g⁻¹ mientras que la del segundo pico a 400°C es de 720 μmol·g⁻¹ que correspondería a una pérdida de etanol de un 1.6%, valor menor que la pérdida de masa observada, por lo que además de producirse CO₂ proveniente de EtOH retenido en los poros, podríamos decir que también se produce la pérdida de moléculas de H₂O o de grupos OH⁻ tal y como ya describieron otros autores [150,151].

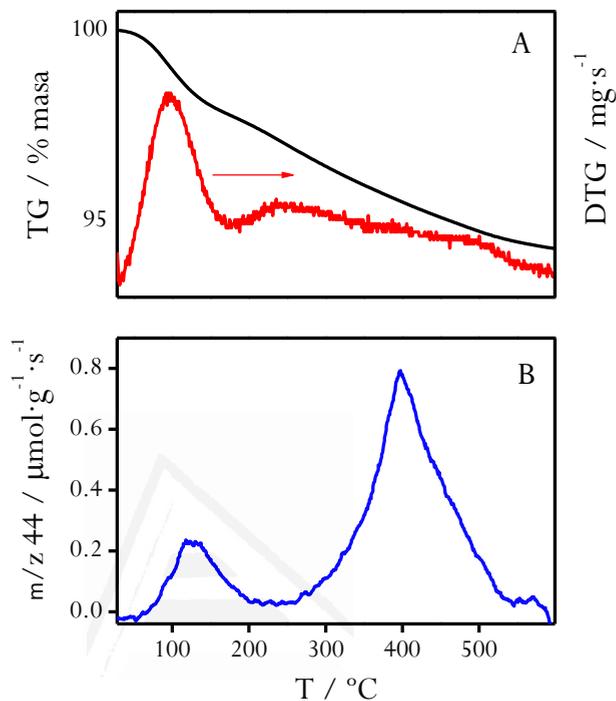


Figura 3.9. (A) Curva termogravimétrica (TG, línea negra) y su primera derivada (DTG, línea roja). (B) Señal obtenida por espectrometría de masas para m/z 44 (CO_2) para una muestra de sílice convencional (SC) preparada electroquímicamente.

La figura 3.10A muestra la variación de masa (línea negra) y la velocidad de dicha variación (línea roja) para una muestra de sílice modificada con el 10% de metil-trietoxisilano en la disolución precursora (10M), conforme aumentamos la temperatura. Podemos observar que a partir de 100°C se produce un descenso suave en la masa, de nuevo no se observan procesos muy definidos por encima de esta temperatura y finalmente se alcanza un valor constante de masa a 700°C.

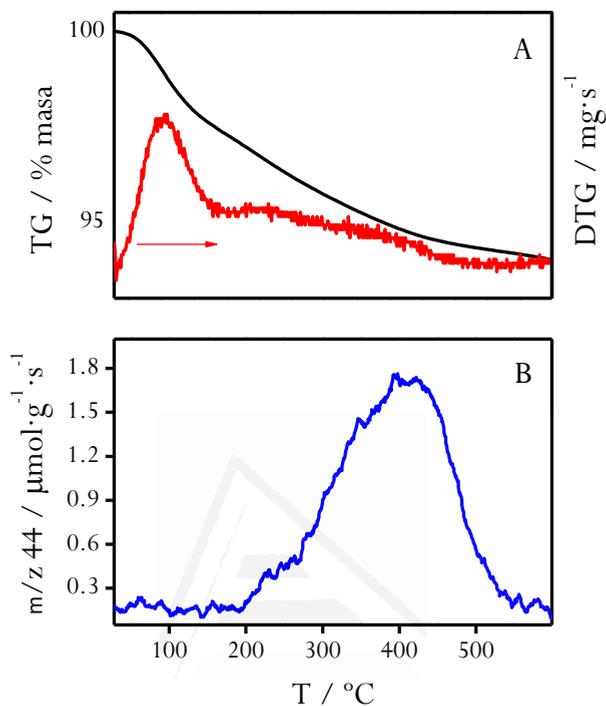


Figura 3.10. (A) Curva termogravimétrica (TG, línea negra) y su primera derivada (DTG, línea roja). (B) Señal obtenida por espectrometría de masas para m/z 44 (CO_2) para una muestra de sílice 10M preparada electroquímicamente.

La representación de la primera derivada del TG (línea roja) nos indica que a una temperatura próxima a 100°C tiene lugar un proceso de pérdida de masa del 2.62%, podría estar relacionado con la pérdida de moléculas de H_2O ya que a esa temperatura no se observa emisión de CO_2 por espectrometría de masas (figura 3.10B). El porcentaje en peso perdido entre 200 y 700°C es del 3.87%. Suponiendo que todo el CO_2 formado es debido al grupo metilo, la pérdida de masa correspondería a 2.4% que coincide con la pérdida de masa detectada por

TG , por tanto, para este gel el 13.71%, expresado en porcentaje molar, correspondería con los grupos metilo que se han incorporado al gel.

La figura 3.11A, muestra el termograma (línea negra) y su primera derivada (línea roja) para una muestra de sílice modificada usando el 10% de n-propil-trietoxisilano en la disolución precursora del gel (10P). Conforme aumenta la temperatura podemos observar una primera pérdida de masa a 100°C, después la masa se mantiene más o menos estable y a 500°C podemos observar una segunda disminución. La primera derivada (línea roja) presenta claramente dos procesos bien definidos a las temperaturas antes mencionadas; como en casos anteriores, la primera pérdida de masa (100°C) podría asignarse a la pérdida de H₂O, supone una pérdida de masa del 4.99%. En la figura 3.11B se observa que a 500°C se produce la formación de CO₂, proceso que corresponde a una segunda pérdida de masa del 5.28% que corresponde con un 7.79%, expresado en % molar, de grupos propilo en el gel.

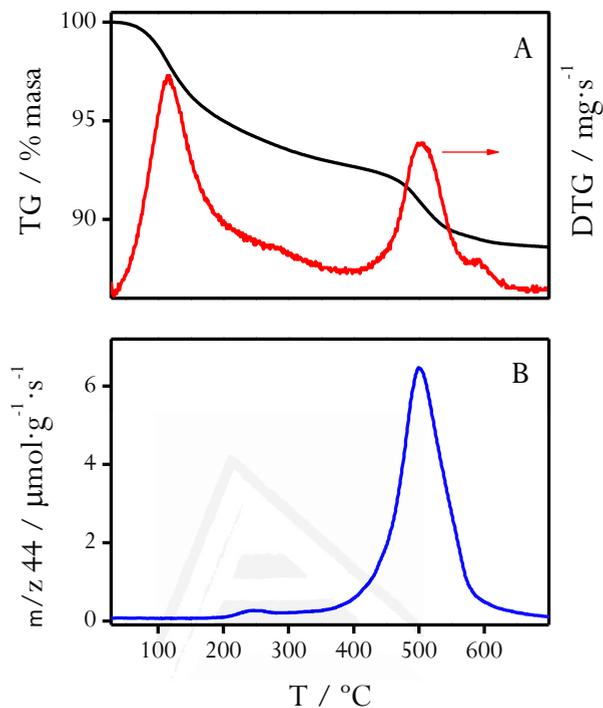


Figura 3.11. (A) Curva termogravimétrica (TG, línea negra) y su primera derivada (DTG, línea roja). (B) Señal obtenida por espectrometría de masas para m/z 44 (CO_2) para una muestra de sílice 10P preparada electroquímicamente.

La figura 3.12A, muestra la variación de masa (línea negra) y su primera derivada (línea roja) para una muestra de sílice modificada con el 10% de isobutil-trietoxisilano en la disolución precursora (10I) en función de la temperatura. Se puede observar que la masa disminuye en dos procesos, a 100°C se produce una pequeña pérdida de masa (3.61%) y a 500°C se observa una pérdida de masa mayor. Observando la primera derivada del TG (línea roja) vemos que aparecen dos picos, uno a 100°C, correspondiente, como en las otras muestras con la

pérdida de H₂O; y el otro proceso, que tiene lugar a 500°C relacionado con la descomposición de materia orgánica y formación de CO₂, tal como nos confirma la señal obtenida por espectrometría de masas (figura 3.12B).

La pérdida de masa observada para el proceso que tiene lugar a 500°C es del 7.98%, y corresponde con la cantidad de CO₂ detectada por masas y asociada a los grupos propilo, lo que implica que la composición molar de estos grupos en este gel es del 9.09%.

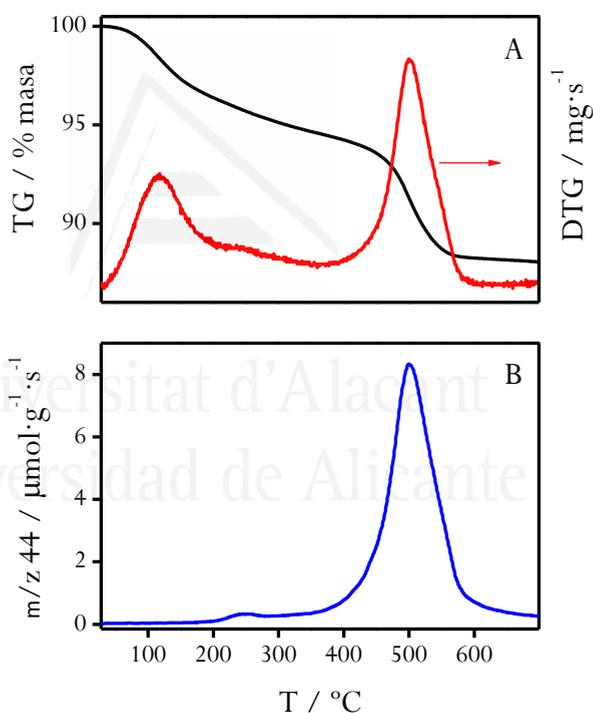


Figura 3.12. (A) Curva termogravimétrica (TG, línea negra) y su primera derivada (DTG, línea roja). (B) Señal obtenida por espectrometría de masas para m/z 44 (CO₂) para una muestra de sílice 10I preparada electroquímicamente.

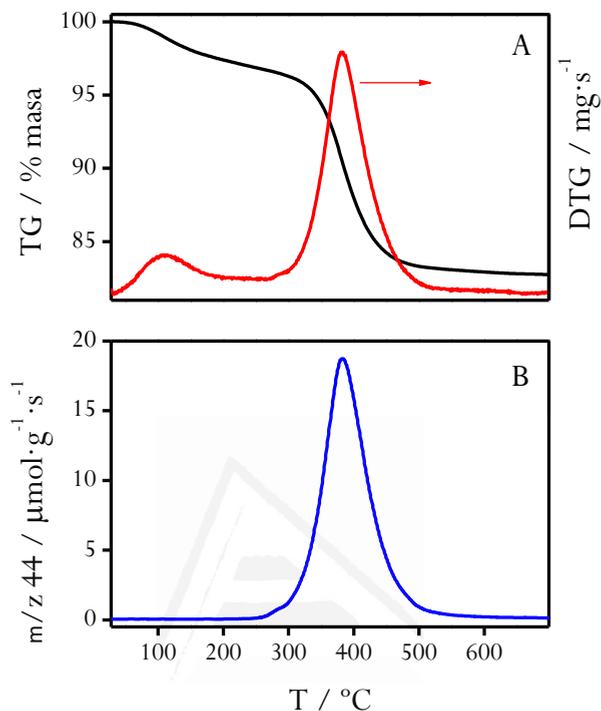


Figura 3.13. (A) Curva termogravimétrica (TG, línea negra) y su primera derivada (DTG, línea roja). (B) Señal obtenida por espectrometría de masas para m/z 44 (CO_2) para una muestra de sílice 10O preparada electroquímicamente.

En la figura 3.13A podemos observar el TG y el DTG para una muestra de sílice modificada con el 10% de octil-trimetoxisilano en la disolución precursora del gel (10O). Se observan dos disminuciones en la masa una a 100°C y otra próxima a 400°C, ésta última mayor que la anterior. El DTG (línea roja) nos indica que tienen lugar dos procesos en los que se pierde masa a los valores de temperatura indicados. El primero de ellos supone una pérdida de masa del 2.60%, y podría corresponder a la pérdida de moléculas de H_2O . Con ayuda de

la señal obtenida por espectrometría de masas (figura 3.13B) podemos confirmar que la segunda pérdida de masa (400°C) se relaciona con la oxidación de los grupos orgánicos de la sílice con la formación de CO₂. La cuantificación del pico de CO₂ detectada en el espectrómetro de masas está relacionada con una pérdida de masa del 15.1%. La pérdida de masa observada en este caso es del 14.86%, lo que implica que la composición molar de grupos octilo en el gel es del 9.27%.

La figura 3.14A, muestra el termograma (línea negra) y su primera derivada (línea roja) para una muestra de sílice modificada partiendo de una disolución precursora con el 10% de fenil-trietoxisilano (10F). Conforme aumenta la temperatura podemos observar una primera pérdida de masa a 100°C y una segunda disminución de masa alrededor de 500°C. Al observar la primera derivada (línea roja) observamos dos picos, uno a 100°C que podría relacionarse con la pérdida de H₂O, este proceso supone una pérdida de masa del 3.84%; el segundo pico que aparece alrededor de 500°C está relacionado con la descomposición de materia orgánica, como puede observarse en la señal obtenida por espectrometría de masas (figura 3.14B). A diferencia de las señales obtenidas por espectrometría de masas para los demás geles, la banda obtenida para CO₂ para sílice modificada con grupos fenilo es más ancha y presenta varios picos, lo que indica que la combustión de la materia orgánica tiene lugar de forma diferente con la presencia de diferentes grupos. Esto podría deberse a que el grupo fenilo se encuentra unido por diferentes sitios a la sílice y, dependiendo de la fortaleza de estas uniones se oxida a distinta temperatura. La pérdida de masa que tiene lugar en este proceso es del 11.16%, lo que implica que la composición molar de grupo fenilo en este gel es del 9.69% que corresponde con la cuantificación del CO₂ detectado por masas.

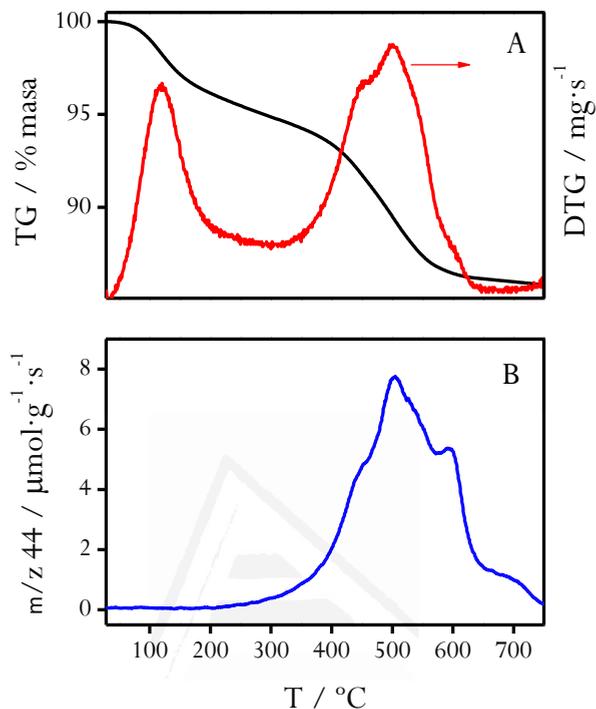


Figura 3.14. (A) Curva termogravimétrica (TG, línea negra) y su primera derivada (DTG, línea roja). (B) Señal obtenida por espectrometría de masas para m/z 44 (CO_2) para una muestra de sílice 10F preparada electroquímicamente.

En la tabla 3.2 se recogen los resultados obtenidos por análisis termogravimétrico para sílice modificada orgánicamente usando el 10% del alcóxido correspondiente en la disolución precursora. Se observa que los valores calculados de concentración de grupo orgánico (R), expresada en % molar, no difieren mucho del teórico (10%), los geles que más se alejan de este valor son los modificados con grupos metilo (10M) y propilo (10P). En cuanto a la temperatura que ocurre la descomposición de los grupos orgánicos, se observa

que para sílice modificada con grupos metilo (10M) y octilo (10O) ésta ocurre a una temperatura próxima a 400°C mientras que para sílice modificada con grupos propilo (10P), isobutilo (10I) tiene lugar a 500°C. Para sílice modificada con grupos fenilo, como se indicó anteriormente la descomposición de los grupos orgánicos tiene lugar en un intervalo de temperatura comprendido entre 250 y 650°C.

Tabla 3.2. Resultados del análisis termogravimétrico para sílice modificada con el 10% de grupos orgánicos (10R): M=metilo, P=propilo, I=isobutilo, O=octilo y F=fenilo, % molar de R en el gel, temperatura a la que se produce la emisión de CO₂.

Muestra	% molar R calculado	Temperatura (°C)
SC		250-525
10M	13.7	200-600
10P	7.8	400-600
10I	9.1	400-600
10O	9.3	300-500
10F	9.7	250-700

Las pérdidas de masa producidas en función de la temperatura varían en relación a las modificaciones realizadas en la sílice. Por tanto, calculando, mediante análisis termogravimétrico la cantidad de masa perdida podríamos conocer la cantidad real de grupos orgánicos incorporados en la sílice.

Para cuantificar la cantidad de grupo orgánico presente en las muestras de sílice modificada usando distinta concentración de precursor de grupos orgánicos (xR) en la disolución precursora se realizaron análisis termogravimétricos en las condiciones siguientes:

-Atmósfera $N_2:O_2$ en relación 4:1

-Flujo: $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

-De 25°C hasta 200°C aumento de la temperatura con una rampa de $30^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

-Isotermo a 200°C durante 25 min

-Rampa de temperatura de $60^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 800°C

Para sílice convencional (SC), en la figura 3.15 se muestra el termograma, como se observa, con el aumento de la temperatura se produce una pérdida de masa del 3.5% entre 200 y 800°C . Esta pérdida de masa puede ser debida a la presencia grupos EtO sin hidrolizar, es decir, precursor TEOS parcialmente hidrolizado, lo que supondría aproximadamente un 1.7% de EtO en el gel.

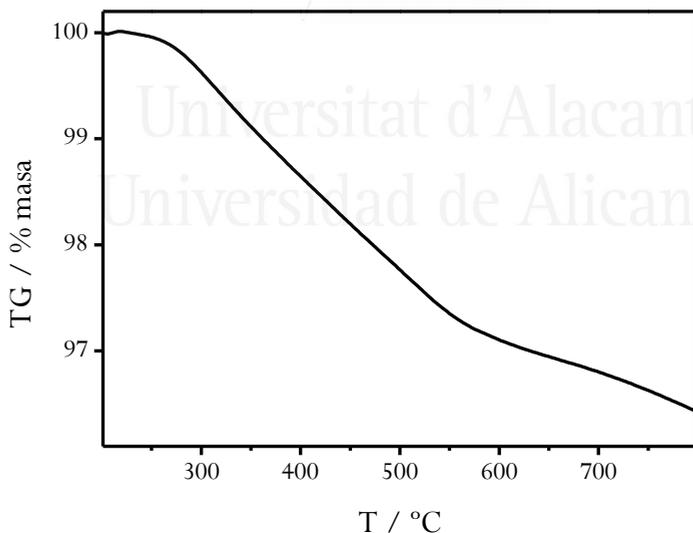


Figura 3.15. Curva termogravimétrica de una muestra de sílice convencional (SC) sintetizada electroquímicamente.

En la figura 3.16 están recogidos los termogramas para sílice modificada con distintas concentraciones de metil-trietoxisilano (MTES) en la disolución precursora (xM): 1% (1M), 5% (5M), 10% (10M) y 20% (20M) tal y como se mostró en la tabla 3.1.

Se observa que al aumentar la temperatura la pérdida de masa para la sílice xM es bastante similar, la pérdida de masa oscila entre el 2.5 y el 3% en todos los casos. Además, en todos los casos no se observan procesos definidos a temperaturas por encima de 300°C.

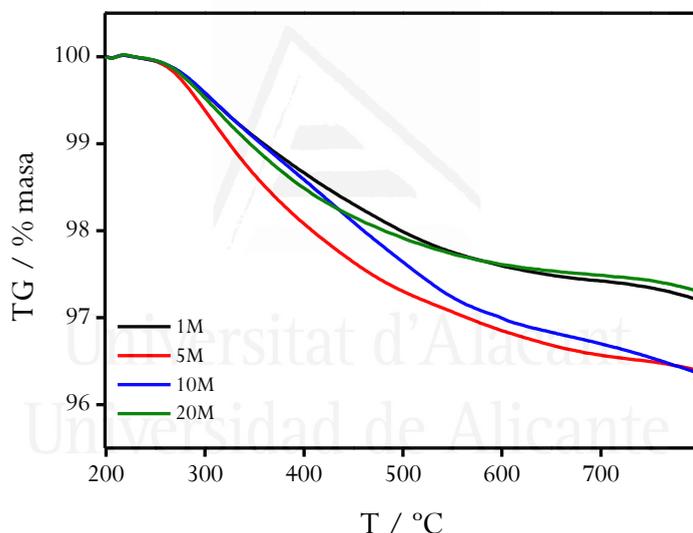


Figura 3.16. Curvas termogravimétricas de diferentes muestras de sílice modificada con grupos metilo (xM) sintetizada electroquímicamente: 1M (negro), 5M (rojo), 10M (azul) y 20M (verde).

En la tabla 3.3 se muestran los valores de % molar de grupo orgánico calculado a partir de la pérdida de masa (TG) para geles sintetizados usando el 1%, 5%, 10% y 20% de metil-trietoxisilano (MTES) en la disolución precursora.

Se observa que la concentración de grupo orgánico en el gel se mantiene más o menos constante, no depende de la concentración del precursor utilizado, siempre se incorpora la misma cantidad de grupos orgánicos al gel, por lo que las fórmulas medidas para cada gel son bastante similares.

Tabla 3.3. Resultados del análisis termogravimétrico para muestras de sílice modificadas con distintas concentraciones de grupos metilo (xM) en la disolución precursora, % molar de grupos metilo (M), fórmula teórica (obtenida de la disolución precursora) y fórmula medida por TG.

Muestra	% molar M calculado	Fórmula teórica	Fórmula medida
1M	11.2	$\text{SiO}_{1.995}(\text{CH}_3)_{0.01}$	$\text{SiO}_{1.944}(\text{CH}_3)_{0.112}$
5M	14.5	$\text{SiO}_{1.975}(\text{CH}_3)_{0.05}$	$\text{SiO}_{1.928}(\text{CH}_3)_{0.145}$
10M	14.7	$\text{SiO}_{1.95}(\text{CH}_3)_{0.1}$	$\text{SiO}_{1.927}(\text{CH}_3)_{0.147}$
20M	11.0	$\text{SiO}_{1.9}(\text{CH}_3)_{0.2}$	$\text{SiO}_{1.945}(\text{CH}_3)_{0.110}$

Se observa, en todos los casos, que entre 11 y 15 % de grupos metilos han sido incorporados independientemente de la concentración de precursor usada en la disolución precursora.

En la figura 3.17 se muestran los termogramas para sílice xP, es decir, modificada usando distintos valores de concentración de n-propil-trietoxisilano (PrTES) en la disolución precursora, tal como puede verse en la tabla 3.1 (epígrafe 3.2). Se observa que la pérdida de masa, con el aumento de la temperatura, se hace mayor al aumentar la concentración de grupo propilo en el gel. En este caso el segundo proceso está muy bien definido a diferencia de lo observado con el gel de sílice con grupos metilo.

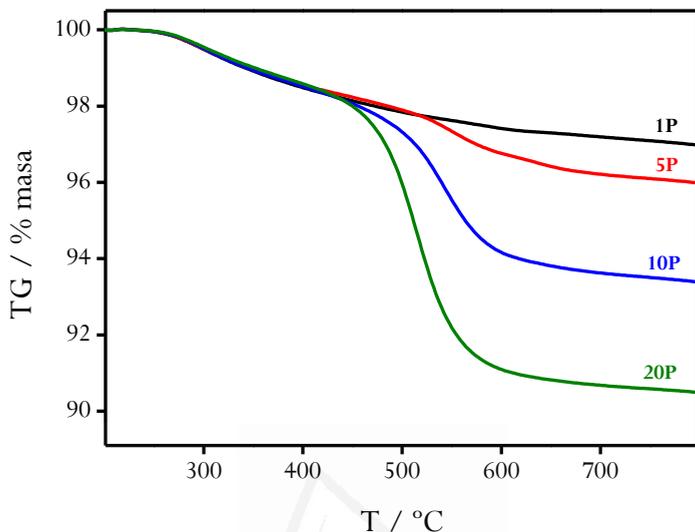


Figura 3.17. Termogramas para sílice xP sintetizada electroquímicamente: 1P (negro), 5P (rojo), 10P (azul) y 20P (verde).

Tabla 3.4. Resultados del análisis termogravimétrico para muestras de sílice modificadas con distintas concentraciones de grupos propilo (xP) en la disolución precursora, % molar de grupos propilo (P), fórmula teórica (obtenida de la disolución precursora) y fórmula medida por TG.

Muestra	% molar P calculado	Fórmula teórica	Fórmula medida
1P	4.2	$SiO_{1.995}(C_3H_7)_{0.01}$	$SiO_{1.979}(C_3H_7)_{0.042}$
5P	5.8	$SiO_{1.975}(C_3H_7)_{0.05}$	$SiO_{1.971}(C_3H_7)_{0.058}$
10P	9.8	$SiO_{1.95}(C_3H_7)_{0.1}$	$SiO_{1.951}(C_3H_7)_{0.098}$
20P	14.8	$SiO_{1.9}(C_3H_7)_{0.2}$	$SiO_{1.926}(C_3H_7)_{0.148}$

En la tabla 3.4 se muestran los valores de % molar de grupo orgánico calculado a partir de la pérdida de masa (TG) para sílice modificada con distintas

concentraciones de n-propil-trietoxisilano en la disolución precursora (xP): 1%, 5%, 10% y 20%.

Se observa que la cantidad de grupos propilo incorporada al gel aumenta al aumentar la cantidad de éste en la disolución precursora.

Para la sílice modificada con grupos propilo, su oxidación tiene lugar a temperaturas comprendidas entre 500 y 750°C y este proceso tiene lugar a valores más bajos de temperatura conforme aumenta la cantidad de grupo orgánico en la sílice, es decir, se obtienen geles más estables frente a la oxidación usando concentraciones más bajas de precursor orgánico.

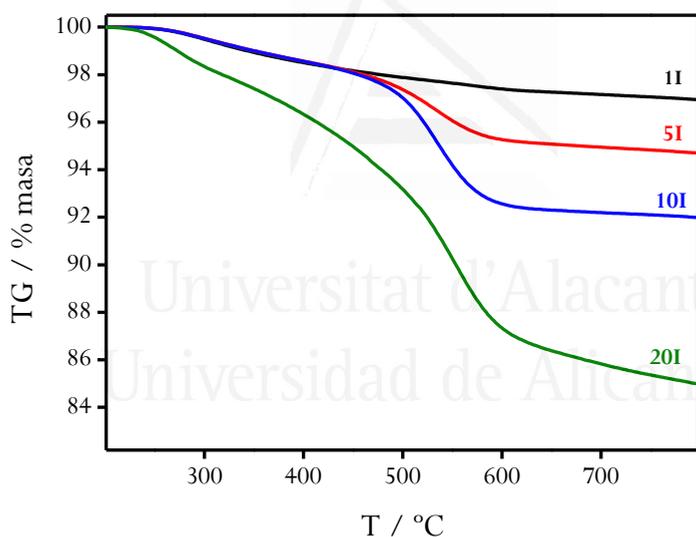


Figura 3.18. Termogramas para sílice modificada con grupos isobutilo (xI): 1I (negro), 5I (rojo), 10I (azul) y 20I (verde), sintetizada electroquímicamente.

Al modificar sílice con distintas concentraciones de isobutil-trietoxisilano (isoBTES) en la disolución precursora (xI) obtenemos los termogramas mostrados en la figura 3.18. Se observa que al aumentar la

temperatura se produce una pérdida de masa mayor al aumentar la concentración de grupo orgánico, isobutilo en este caso.

En la tabla 3.5 se muestran los valores obtenidos mediante análisis termogravimétrico para sílice modificada utilizando distintas concentraciones de isobutil-trietoxisilano (xI) en la disolución precursora: 1%, 5%, 10% y 20% de isoBTES.

Tabla 3.5. Resultados del análisis termogravimétrico para muestras de sílice modificadas con distinta concentración de grupo isobutilo (xI) en la disolución precursora, % molar de grupos isobutilo (I), fórmula teórica (obtenida de la disolución precursora) y fórmula medida por TG.

Muestra	% molar I calculado	Fórmula teórica	Fórmula medida
1I	3.3	$\text{SiO}_{1.995}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.01}$	$\text{SiO}_{1.984}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.033}$
5I	5.8	$\text{SiO}_{1.975}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.05}$	$\text{SiO}_{1.971}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.058}$
10I	9.1	$\text{SiO}_{1.95}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.1}$	$\text{SiO}_{1.955}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.091}$
20I	18.4	$\text{SiO}_{1.9}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.2}$	$\text{SiO}_{1.908}(\text{C}_4\text{H}_9)_{0.184}$

Se observa que los valores de % molar calculados mediante análisis termogravimétrico aumentan al aumentar la concentración de isoBTES, coincidiendo en la mayoría de los casos con los valores de % molar que tienen las disoluciones precursoras.

Para la sílice modificada con isoBTES, la oxidación de los grupos orgánicos tiene lugar a temperaturas comprendidas entre 530 y 600°C y disminuye conforme aumenta la cantidad de grupo isobutilo en la matriz de sílice.

En la figura 3.19 se muestran los termogramas de sílice modificada con distintas concentraciones de octil-trimetoxisilano (OTMS) en la disolución

precursora (xO). Se observa que conforme aumenta la temperatura se producen pérdidas de masa cada vez mayores conforme aumenta la concentración de grupo octilo en el gel y aparece un proceso de pérdida de masa muy definido a temperaturas por encima de 300°C.

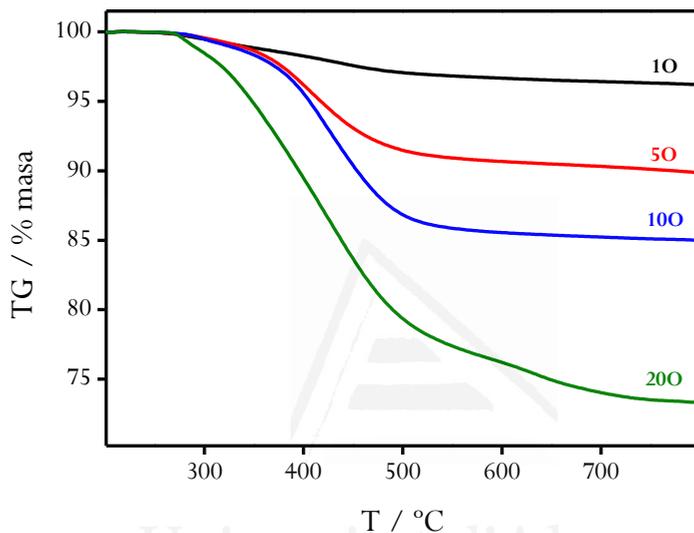


Figura 3.19. Termogramas para sílice modificada con distinta concentración de grupos octilo (xO): 1O (negro), 5O (rojo), 10O (azul) y 20O (verde) sintetizada electroquímicamente.

En la tabla 3.6 se muestran los valores % molar de grupo orgánico calculados por análisis termogravimétrico para sílice modificada con distinta concentración de octil-trimetoxisilano (OTMS) en la disolución precursora (xO): 1%, 5%, 10% y 20%.

Tabla 3.6. Resultados del análisis termogravimétrico para muestras de sílice modificadas con distinta concentración de grupo octilo (xO) en la disolución precursora, % molar de grupos octilo (O), fórmula teórica (obtenida de la disolución precursora) y fórmula medida por TG.

Muestra	% molar O calculado	Fórmula teórica	Fórmula medida
1O	2.1	$\text{SiO}_{1.995}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.01}$	$\text{SiO}_{1.989}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.021}$
5O	5.9	$\text{SiO}_{1.975}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.05}$	$\text{SiO}_{1.971}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.059}$
10O	9.4	$\text{SiO}_{1.95}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.1}$	$\text{SiO}_{1.953}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.094}$
20O	19.1	$\text{SiO}_{1.9}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.2}$	$\text{SiO}_{1.905}(\text{C}_8\text{H}_{17})_{0.191}$

Se observa que los valores de % molar calculados mediante análisis termogravimétrico aumentan al aumentar la concentración de grupo octilo, en definitiva de OTMS en la disolución precursora, coincidiendo en todos los casos, menos para el 1% (se obtiene el doble), con los valores de % molar que tienen las disoluciones precursoras. También se observa que conforme aumenta la concentración de grupo orgánico en el gel la temperatura a la cual tiene lugar la oxidación de la materia orgánica es más baja. Por tanto, se obtienen geles más inestables térmicamente al aumentar la concentración de grupos orgánicos en la matriz de sílice.

En la figura 3.20 se pueden observar los termogramas para sílice modificada con distintas concentraciones de fenil-trietosilano (PhTES) en la disolución precursora (xF). Se observa que al aumentar la temperatura se producen pérdidas de masa que aumentan conforme aumenta la concentración de grupo fenilo en la disolución precursora del gel. Se observa, además, que el perfil termogravimétrico cambia cuando aumenta la concentración de grupos fenilos en el precursor de sílice. Así cuando la concentración está entre el 1 y el

5% el perfil es muy parecido, sin embargo, cuando aumenta a 10% se produce una pérdida de masa bien definida a una temperatura de aproximadamente 450°C, y esta pérdida se desplaza a 550°C cuando aumenta la concentración al 20%. Esto puede deberse a un cambio en la estructura de la sílice modificada.

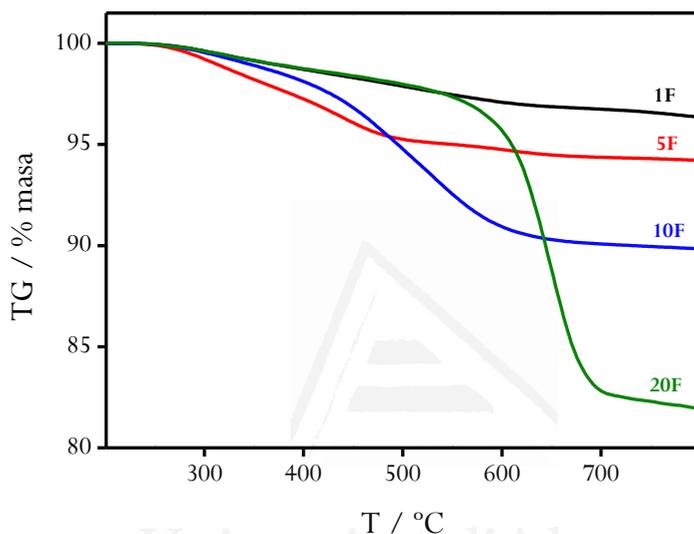


Figura 3.20. Termogramas para sílice sintetizada electroquímicamente y modificada con distinta concentración de grupos fenilo (xF): 1F (negro), 5F (rojo), 10F (azul) y 20F (verde) en la disolución precursora.

En la tabla 3.7 se muestran los valores % molar de grupo orgánico calculados por análisis termogravimétrico para sílice modificada con distinta concentración de fenil-trietoxisilano (PhTES) en la disolución precursora (xF): 1%, 5%, 10% y 20%.

Se puede observar que los valores de % molar calculados mediante análisis termogravimétrico aumentan al aumentar la concentración de grupo

fenilo, obteniéndose valores cercanos al teórico (10%) excepto para el 1% que se obtiene el triple.

Tabla 3.7. Resultados del análisis termogravimétrico para muestras de sílice modificadas con distinta concentración de grupo fenilo (xF) en la disolución precursora, % molar de grupos fenilo (F), fórmula teórica (obtenida de la disolución precursora) y fórmula medida por TG.

Muestra	% molar F calculado	Fórmula teórica	Fórmula medida
1F	2.9	$\text{SiO}_{1.995}(\text{Ph})_{0.01}$	$\text{SiO}_{1.986}(\text{Ph})_{0.029}$
5F	4.8	$\text{SiO}_{1.975}(\text{Ph})_{0.05}$	$\text{SiO}_{1.976}(\text{Ph})_{0.048}$
10F	8.8	$\text{SiO}_{1.95}(\text{Ph})_{0.1}$	$\text{SiO}_{1.956}(\text{Ph})_{0.088}$
20F	17.3	$\text{SiO}_{1.9}(\text{Ph})_{0.2}$	$\text{SiO}_{1.914}(\text{Ph})_{0.173}$

3.3.3 Caracterización por espectroscopia infrarroja en modo transmisión

Con la espectroscopia infrarroja en modo transmisión con transformada de Fourier (FTIR) se es capaz de detectar las energías de vibración de tensión y de deformación dentro de la red sólida de la sílice [152]. La asignación de estas vibraciones a los grupos químicos específicos permite la identificación cualitativa y cuantitativa de los grupos químicos que están en la red sólida, lo que nos proporciona una mejor comprensión de la estructura de la sílice en diferentes entornos.

Los precursores de sílice convencional contienen cuatro grupos alcóxido idénticos que son hidrolizables (enlaces Si–O), normalmente grupos etóxido; mientras que para obtener sílice modificada orgánicamente se usan precursores que contienen grupos alquilo no hidrolizables (enlaces Si–C): metilo (M), n-propilo (P), isobutilo (I), octilo (O) y fenilo (F). Con el uso de la espectroscopia

infrarroja se pone de manifiesto la existencia de películas químicamente diferentes y comparables según la naturaleza de los precursores utilizados.

Las muestras analizadas se sintetizaron tal y como se describió en la parte experimental de este capítulo, en el epígrafe 3.2.

En la figura 3.21 se muestran los espectros FTIR para las muestras de sílice convencional (SC, negro) y de sílice ORMOSIL para concentraciones del 10% en la disolución precursora (10R). Aunque se registró el espectro completo desde 4000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} , nos interesan dos zonas fundamentalmente.

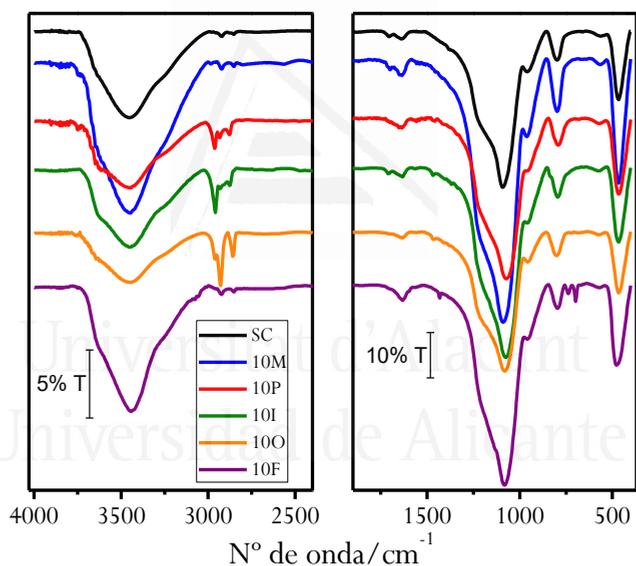


Figura 3.21. Espectros FTIR de sílice convencional (SC, negro) y sílice modificada con el 10% de grupo orgánico: 10M (azul), 10P (rojo), 10I (verde), 10O (naranja) y 10F (violeta).

En la zona entre 4000 cm^{-1} y 2500 cm^{-1} (parte izquierda de la figura 3.21) observamos que todas las muestras presentan una banda amplia centrada alrededor de $3470\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al solapamiento de las bandas de

vibración de tensión, “*stretching*”, en el enlace O–H de las moléculas de H₂O (H–O–H···H) y las bandas del mismo tipo debidas a los enlaces O–H de los grupos silanol de la sílice (SiO–H···H₂O) [68]. Alrededor de 2900-2800 cm⁻¹ aparecen unas bandas de vibración en la mayoría de las muestras correspondientes a bandas de tensión simétricas y anti-simétricas de los enlaces C–H de grupos alifáticos, –CH₂ y –CH₃.

En la parte derecha de la figura 3.21 observamos la zona del espectro entre 1800 cm⁻¹ y 400 cm⁻¹. Las bandas correspondientes a las vibraciones de deformación, “*bending*”, de las moléculas de H₂O adsorbida aparecen alrededor de 1653-1634 cm⁻¹ [153]. La adsorción de moléculas de agua en la superficie de sílice se debe a la existencia de los grupos silanol superficiales y por tanto, a la naturaleza hidrófila de estos materiales. Las vibraciones correspondientes a los enlaces covalentes Si–O aparecen principalmente en el intervalo comprendido entre 1200 y 1000 cm⁻¹. Puede observarse que aparece una banda muy intensa y amplia, para todas las muestras, entre 1095-1089 cm⁻¹ que se asigna a la vibración de tensión (*stretching*) antisimétrica de la estructura Si–O–Si. Alrededor de 930-950 cm⁻¹ se observa un hombro en la banda anterior que se asigna a EtO⁻ sin hidrolizar [154]. Esto confirma lo anteriormente visto por TG-MS, que parte de los grupos orgánicos en sílice convencional, se debe a los grupos EtO⁻ sin hidrolizar. Por otro lado, las vibraciones de tensión (*stretching*) simétricas correspondientes a la estructura Si–O–Si aparecen a 800 cm⁻¹ [68]. Entre 469 y 470 cm⁻¹, se observa una banda que corresponde con la vibración de deformación (*bending*) en el plano por balanceo, “*rocking*” de la estructura Si–O–Si [155]. La banda que se observa alrededor de 560 cm⁻¹ se asigna a defectos por tensión, “*stretching*”, en la red SiO₂ [68].

Cuando se trata de sílice modificada con grupos fenilo (10F, línea violeta) se observan dos bandas características, una aparece a 700 cm^{-1} y se relaciona con la vibración de deformación de los enlaces C–H fuera del plano del anillo aromático (Si–Ph); la otra banda, propia de este grupo orgánico, se observa a 740 cm^{-1} y se asigna a la vibración de deformación de los enlaces C–H fuera del plano en modo cabeceo, “*wagging*” [139,156].

La lista completa con todas las frecuencias de vibración y su asignación se recogen en la tabla 3.8.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 3.8. Número de onda (cm^{-1}) de vibración características en espectros FTIR de sílice modificada orgánicamente [139,152,153].

Modo vibración	Número de onda / cm^{-1}						Asignación
	TE	10 ME	10 PE	10 IE	10 OE	10 FE	
$\nu\text{O-H}$	3452	3447	3447	3451	3445	3443	O-H/Si-OH
$\nu_s\text{C-H}$	-	-	2962	2958	2959	-	-CH ₃
$\nu_{as}\text{C-H}$	2921	2922	2934	-	2928	2923	-CH ₂
$\nu_{as}\text{C-H}$	-	-	2877	2875	-	-	-CH ₃
$\nu_s\text{C-H}$	2851	2852	-	-	2857	2852	-CH ₃ terminal
$\delta\text{H-O-H}$	1639	1635	1635	1632	1633	1632	H ₂ O
$\delta_{as}\text{C-H } \delta_s\text{C-H}$	-	-	1458	1467	1465	-	-CH ₃ -CH ₂
$\nu\text{C=C} + \delta\text{C-H}$ en plano $2 \nu\text{Si-C}$	-	-	-	-	-	1431	Si-fenilo
$\delta_s\text{C-H}$	1379	-	-	1383	-	-	-CH ₂
$\delta_s\text{C-H}$	-	-	-	1368	-	-	-CH ₃
$\nu_{as}\text{Si-O-Si}$	1092	1089	1073	1076	1081	1081	Si-O-Si
$\nu\text{Si-O}$	<i>sh</i>	<i>sh</i>	<i>sh</i>	<i>sh</i>	<i>sh</i>	<i>sh</i>	EtO ⁻ sin hidrolizar
$\nu_s\text{Si-O}$	798	798	792	795	801	796	Si-O-Si
$\omega_{\delta,\gamma}\text{C-H}$	-	-	-	-	-	737	Si-fenilo
$\Phi\text{C-H}$	-	-	-	-	-	698	Si-fenilo
$\nu\text{Si-O}$	561	565	573	573	573	568	Defectos SiO ₂
$\delta\text{O-Si-O}$	466	466	465	466	465	477	O-Si-O

ν =vibración de tensión (*stretching*); ν_s =vibración de tensión simétrica; ν_{as} =vibración de tensión antisimétrica; δ =deformación (bending); δ_s =deformación simétrica; δ_{as} =deformación antisimétrica; $\omega_{\delta,\gamma}$ =cabeceo (wagging) fuera del plano; Φ =vibración de deformación del anillo aromático fuera del plano

Algunas muestras (tabla 3.8) no muestran bandas o éstas son muy débiles para las vibraciones C–H, 1380 cm^{-1} , que se asignan a la deformación simétrica de los grupos $-\text{CH}_2$ [157]. Esto se puede deber a grupos alcoxi ($-\text{OR}$) residuales que no se han hidrolizado y que se encuentran en la superficie de la sílice. Podría decirse entonces que la ausencia de estas bandas es una prueba de que el etanol producido durante la hidrólisis ha sido totalmente eliminado del gel en el proceso de secado, antes de la preparación de las pastillas.

En la figura 3.22 se muestran los espectros de infrarrojo para sílice modificada con distintas concentraciones de metil-trietoxisilano (MTES) en la disolución precursora (xM): 1M (negro), 5M (rojo), 10M (azul) y 20M (verde). Se observa que la intensidad de las bandas de vibración varía dependiendo de la concentración de grupo metilo, pero no existe ninguna relación directa entre la concentración de grupo orgánico y la intensidad de las bandas. Ya se había observado por TG que no existía una relación entre la cantidad de grupos metilo incorporados y la cantidad de grupos metilos presentes en la disolución precursora, y ahora se confirma por FTIR.

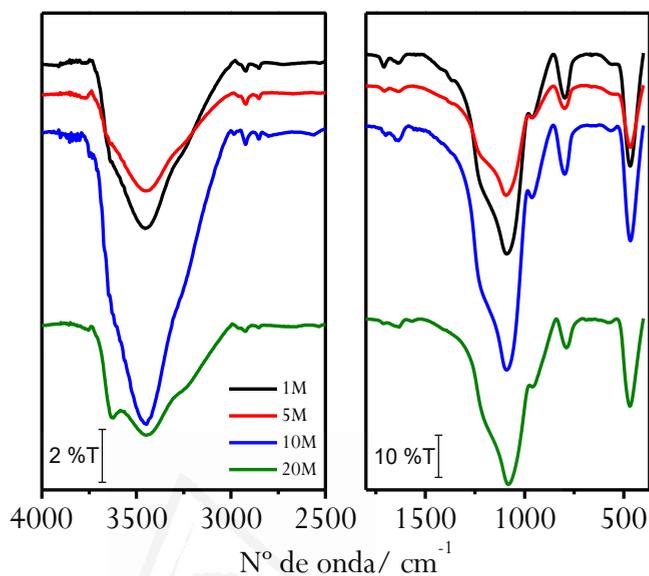


Figura 3.22. Espectros FTIR de sílice modificada con distinta concentración de grupos metilo en la disolución precursora: 1M (negro), 5M (rojo), 10M (azul) y 20M (verde) sintetizada electroquímicamente.

Para sílice modificada con grupos propilo, xP, se muestran los espectros de infrarrojo en la figura 3.23. Al variar la concentración de grupo orgánico en la disolución precursora (1P (negro), 5P (rojo), 10P (azul) y 20P (verde)) la intensidad de las bandas de vibración que aparecen alrededor de 2900-2800 cm^{-1} , asignadas a tensiones simétricas y anti-simétricas de los enlaces C-H de grupos alifáticos ($-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$), aumentan con la concentración de grupo orgánico en la disolución precursora.

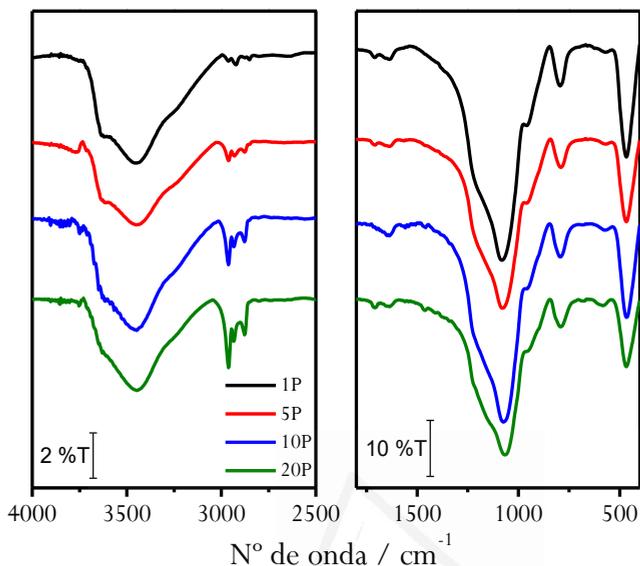


Figura 3.23. Espectros FTIR de sílice sintetizada electroquímicamente y modificada con distinta concentración de grupos propilo (xP): 1P (negro), 5P (rojo), 10P (azul) y 20P (verde).

La figura 3.24 muestra la relación existente entre el valor de la intensidad de las bandas a 2960 cm^{-1} correspondiente a la vibración simétrica del enlace C–H y la banda de vibración simétrica del enlace Si–O–Si que se observa sobre 1080 cm^{-1} en función de la concentración de grupos propilo calculada por análisis termogravimétrico (tabla 3.4).

Se observa que existe una relación lineal de esta relación con la concentración de grupo propilo en la disolución precursora. El mismo resultado se observa si se realiza con las bandas a 2920 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} .

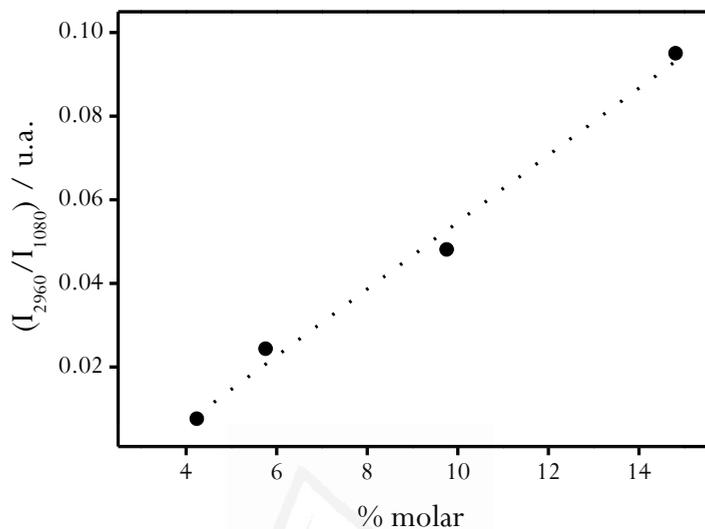


Figura 3.24. Relación de intensidad $\nu_{\text{C-H}}$ (2960 cm^{-1}) / $\nu_{\text{Si-O-Si}}$ (1080 cm^{-1}) en función de la concentración de grupos propilo calculada por TG.

En la figura 3.25 se muestran los espectros de infrarrojo para sílice modificada usando distinta concentración de grupos isobutilo (xI) en la disolución precursora: 1I (negro), 5I (rojo), 10I (azul) y 20I (verde). Se observa que la intensidad de las bandas de vibración, asignadas a tensiones simétricas y anti-simétricas enlaces C-H de grupos alifáticos, que aparecen entre 2800 y 2900 cm^{-1} , aumenta al aumentar la concentración de grupos isobutilo en la disolución precursora del gel.

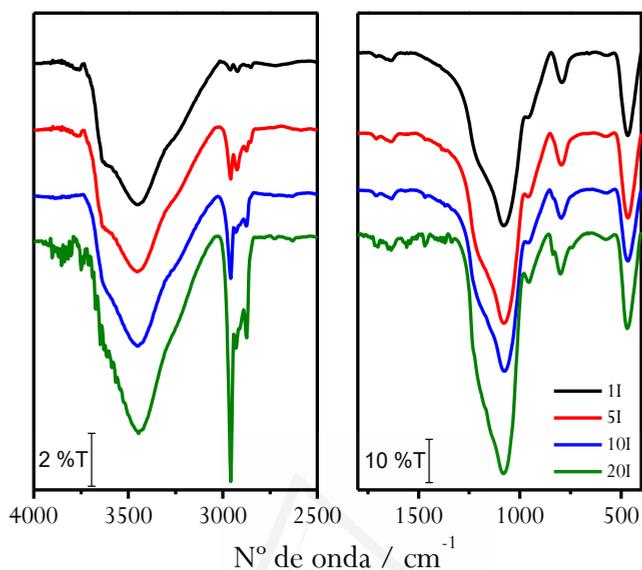


Figura 3.25. Espectros FTIR de sílice sintetizada electroquímicamente y modificada con distinta concentración de grupos isobutilo en la disolución precursora: 1I (negro), 5I (rojo), 10I (azul) y 20I (verde).

La figura 3.26 muestra la relación existente entre el cociente entre las intensidades de la banda de vibración simétrica del enlace C–H que aparece a una frecuencia de 2960 cm^{-1} y la banda de vibración simétrica del enlace Si–O–Si que se observa sobre 1080 cm^{-1} en función de la concentración, expresada en % molar, de grupos isobutilo y calculada por análisis termogravimétrico (tabla 3.5).

Se observa que existe una relación lineal con la concentración de grupos isobutilo en estos geles, determinada por TG. También se observa el mismo comportamiento para la relación de intensidades de las bandas a 2920 y 2850 cm^{-1} con la banda a 1080 cm^{-1} .

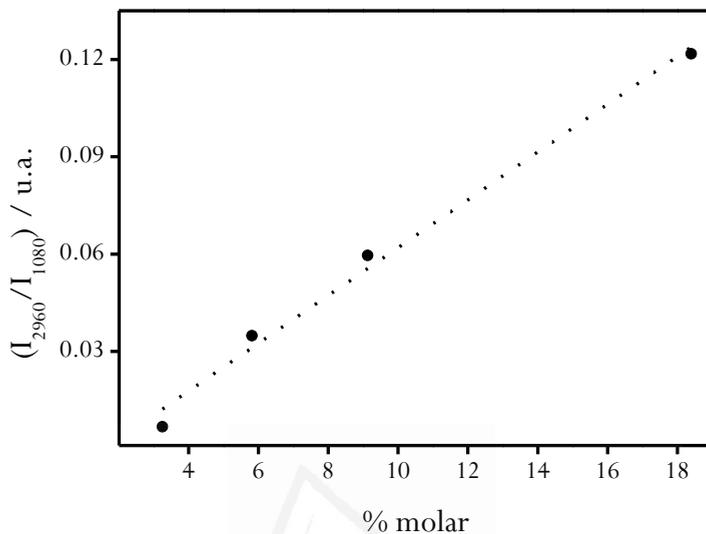


Figura 3.26. Relación de intensidad $\nu\text{sC-H}$ (2960 cm^{-1}) / $\nu\text{s Si-O-Si}$ (1080 cm^{-1}) en función de la concentración de grupos isobutilo calculada por análisis termogravimétrico.

En la figura 3.27 se muestran los espectros de infrarrojo para la sílice modificada usando distintas concentraciones de grupo octilo en la disolución precursora: 1O (negro), 5O (rojo), 10O (azul) y 20O (verde). Se observa que al aumentar la concentración de grupo orgánico en la disolución precursora del gel la intensidad de las bandas de vibración que se observan entre 2800 y 2900 cm^{-1} , correspondientes a la vibración de tensión simétrica y anti-simétrica de enlaces C-H de grupos alifáticos, aumenta.

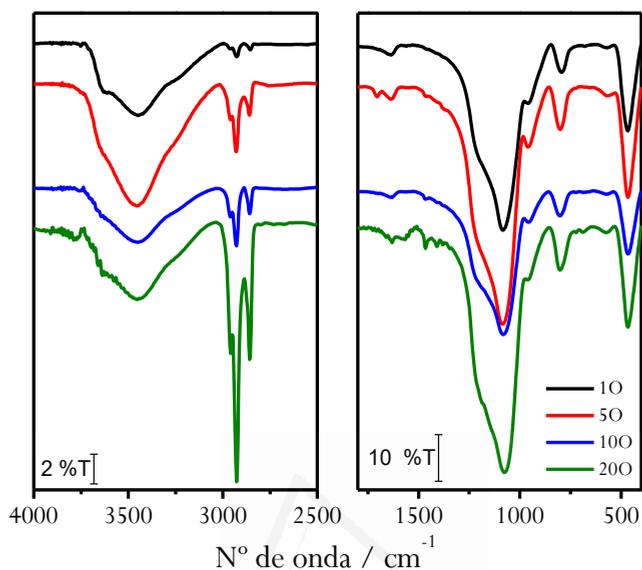


Figura 27. Espectros FTIR de sílice sintetizada electroquímicamente y modificada con distinta concentración de grupos octilo (xO): 1O (negro), 5O (rojo), 10O (azul) y 20O (verde).

La figura 3.28 muestra la relación del cociente entre las intensidades de la banda de vibración simétrica del enlace C–H que aparece a una frecuencia de 2960 cm^{-1} y la banda de vibración simétrica del enlace Si–O–Si que se observa sobre 1080 cm^{-1} en función de la concentración, expresada en % molar, de grupos octilo en el gel calculada por análisis termogravimétrico (tabla 3.6). También se obtienen los mismos resultados para la relación de intensidades con las bandas que aparecen a 2920 y 2850 cm^{-1} .

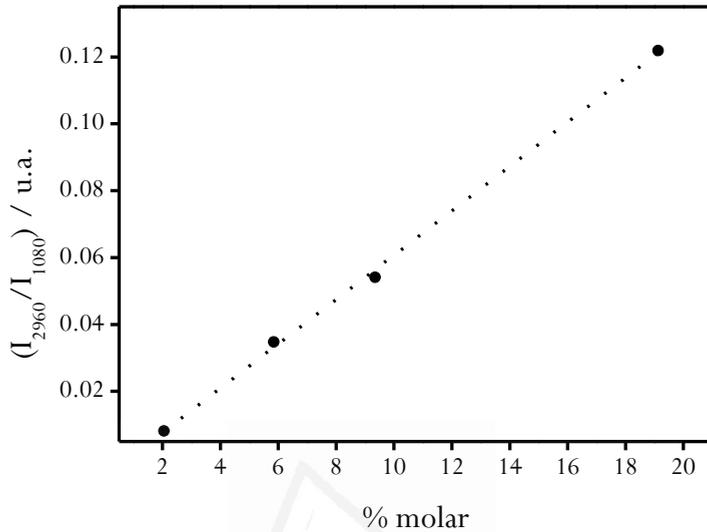


Figura 3.28. Relación de intensidad $\nu_{\text{C-H}}$ (2960 cm^{-1})/ $\nu_{\text{Si-O-Si}}$ (1080 cm^{-1}) en función de la concentración de grupo octilo calculada por análisis termogravimétrico.

En la figura 3.29 se pueden observar los espectros infrarrojo para sílice modificada con distinta concentración de grupos fenilo (xF): 1F (negro), 5F (rojo), 10F (azul) y 20F (verde). Se observa que la intensidad de las bandas de vibración varía dependiendo de la concentración de grupo orgánico.

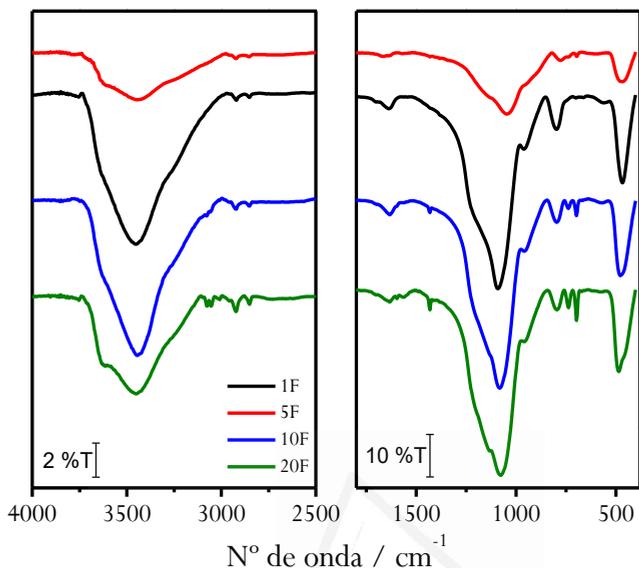


Figura 3.29. Espectros FTIR de sílice sintetizada electroquímicamente y modificada con distinta concentración de grupos fenilo: 1F (negro), 5F (rojo), 10F (azul) y 20F (verde).

La figura 3.30A muestra la relación entre el valor de intensidad de la banda de vibración de deformación del anillo aromático fuera del plano para los enlaces C–H, que aparece a 700 cm^{-1} y la intensidad de la banda de vibración simétrica del enlace Si–O–Si que se observa a 1080 cm^{-1} en función de la concentración de grupo fenilo calculada por análisis termogravimétrico (tabla 3.7). En la figura 3.30B está representada la relación entre el valor de absorbancia del cociente de dos bandas de vibración: la relacionada con la deformación del enlace C–H fuera del plano en modo cabeceo (740 cm^{-1}) y la correspondiente con la vibración simétrica del enlace Si–O–Si (1080 cm^{-1}).

Se observa que no existe buena relación lineal entre este cociente de intensidades de estas bandas de vibración y la concentración de grupos fenilo calculada por análisis termogravimétrico.

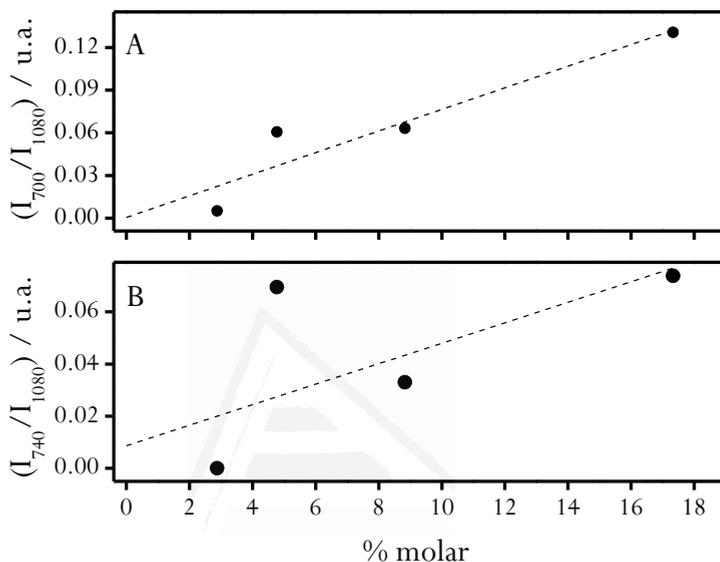


Figura 3.30. (A) Relación de intensidades $\Phi\text{C-H}$ (700 cm^{-1}) / $\nu_s\text{Si-O-Si}$ (1080 cm^{-1}) y (B) $\omega_{\delta,\gamma}\text{C-H}$ (740 cm^{-1}) / $\nu_s\text{Si-O-Si}$ (1080 cm^{-1}) en función de la concentración de grupos fenilo calculada por análisis termogravimétrico.

Los parámetros de todos los ajustes, para cada composición, se pueden consultar en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Parámetros de ajuste para la relación entre el cociente de intensidades de las bandas medidas por FTIR y la concentración de los distintos grupos orgánicos (R) calculada por análisis termogravimétrico.

R	Relación de bandas	Pendiente	Ordenada	R ²
METILO	$\nu_{as}C-H$ (2920 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	No hay ajuste		
	$\nu_{as}C-H$ (2850 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)			
	$\nu_{as}C-H$ (2920 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)			
	$\nu_s C-H$ (2960 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)			
PROPILO	$\nu_{as}C-H$ (2920 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	4.39·10 ⁻³	-8.43·10 ⁻³	0.964
	$\nu_{as}C-H$ (2850 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	3.99·10 ⁻³	-1.11·10 ⁻²	0.976
	$\nu_s C-H$ (2960 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	8.00·10 ⁻³	-2.50·10 ⁻²	0.987
	$\nu_{as}C-H$ (2920 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	2.78·10 ⁻³	3.99·10 ⁻³	0.851
ISOBUTILO	$\nu_{as}C-H$ (2850 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	3.05·10 ⁻³	-5.94·10 ⁻³	0.996
	$\nu_s C-H$ (2960 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	7.37·10 ⁻³	-1.12·10 ⁻²	0.987
	$\nu_{as}C-H$ (2920 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	1.39·10 ⁻²	-1.43·10 ⁻²	0.997
	$\nu_{as}C-H$ (2850 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	7.09·10 ⁻³	-1.03·10 ⁻²	0.983
OCTILO	$\nu_s C-H$ (2960 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	6.63·10 ⁻³	-5.56·10 ⁻³	0.998
	$\omega_{\delta,\gamma}C-H$ (740 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	3.30·10 ⁻³	1.58·10 ⁻²	0.073
	$\Phi C-H$ (700 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)	7.55·10 ⁻³	1.02·10 ⁻³	0.831
	$\nu_s C-H$ (2960 cm ⁻¹)/ $\nu_s Si-O-Si$ (1080 cm ⁻¹)			

3.4 Conclusiones

Tanto la sílice convencional como la sílice modificada orgánicamente pueden ser depositadas electroquímicamente dando lugar a capas homogéneas y coherentes de un espesor aproximado de $\sim 2 \mu\text{m}$.

Las capas de sílice modificada orgánicamente presentan una estructura más porosa que la sílice convencional.

Cuando se usan concentraciones altas de precursor orgánico ($\sim 20\%$ molar R-Si(OEt)_3) en la disolución precursora de sílice se forman agregados posiblemente debido a la segregación de fases. La sílice modificada orgánicamente, utilizando concentraciones molares bajas de precursor orgánico ($\sim 1\%$ R-Si(OEt)_3), está enriquecida en grupos orgánicos.

La sílice modificada orgánicamente, utilizando bajas concentraciones de precursor orgánico, es más estable térmicamente ya que la oxidación de los grupos orgánicos tiene lugar a temperaturas más altas a medida que se aumenta el porcentaje de éstos en la disolución precursora.

La incorporación de grupos metilo en el gel de sílice no sigue la tendencia esperada de acuerdo a la concentración en el precursor, y esto se ha observado tanto por FTIR como por TG-MS. Para los demás grupos orgánicos (propilo, isobutilo, octilo y fenilo) un aumento de grupo orgánico en la disolución precursora implica un aumento progresivo en la concentración de grupos orgánicos presentes en el depósito de sílice por TG-MS e IR.

Por tanto, en estos casos, es posible el uso de FTIR para cuantificar el contenido de grupos orgánicos introducidos en la sílice obtenida mediante depósito electroasistido.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

The background of the slide is decorated with numerous grey, 3D-rendered spheres of varying sizes. Some are scattered across the page, while a dense vertical column of spheres runs along the right edge. In the center, there is a faint, light-colored logo of the Universitat d'Alacant, which consists of a stylized 'A' shape with horizontal bars inside. Below the logo, the text 'Universitat d'Alacant' is visible in a light grey font.

**4. Sílice impresa molecularmente
para la detección selectiva de dopamina**

4.1 Introducción

La impresión molecular es una de las técnicas mejor conocidas para sintetizar polímeros con sitios de reconocimiento a nivel molecular. La producción de nuevos polímeros impresos molecularmente se realiza sintetizando polímeros con elevado poder de entrecruzamiento en presencia de moléculas molde que se quedan atrapadas en el interior del polímero, es decir, se imprimen. La posterior eliminación de las moléculas molde permite usar el polímero como una matriz selectiva para las moléculas molde o moléculas análogas estructuralmente [158]. Se ha investigado intensamente en desarrollar una aplicación directa de estos materiales impresos molecularmente, para emplearlos como sensores de diversos tipos [104,108,159–166].

Aunque estos materiales son considerados de gran importancia para el desarrollo de diferentes sensores químicos, hay solo unos pocos estudios sobre la aplicación de estos materiales en sistemas de transducción en dispositivos diferentes piezoeléctricos, luminiscentes o electroquímicos [158,167–169].

Lo normal, para aplicaciones electroquímicas, es encontrar polímeros impresos molecularmente utilizando materiales acrílicos, vinílicos o siloxanos depositados sobre sustratos electrónicos adecuados. Los métodos habituales de depósito son *spin-coating*, *photografting*, silanización, autoensamblado, etc. [104,108,159,161,162,164,165,170]. Estas películas o capas delgadas normalmente tienen pequeños orificios, comúnmente llamados *pinholes*, porque las películas no crecen uniformemente sobre el electrodo utilizando técnicas habituales [171], lo que conduce a un mal funcionamiento del sensor. Por tanto, con el uso de métodos de depósito electroasistido o depósito electroquímico se obtienen películas o capas con elevada homogeneidad con lo que se mejora el comportamiento de los electrodos [134].

La detección y cuantificación de neurotransmisores en fluidos biológicos es una rama importante en el campo del electroanálisis. Los neurotransmisores pertenecientes a la familia de las catecolaminas pueden ser detectados por oxidación electroquímica usando electrodos convencionales [172–176]. Sin embargo, la presencia de otras especies, que se encuentran en altas concentraciones en estos fluidos, enmascara fuertemente la oxidación de estos neurotransmisores. Un paradigma, en este sentido, es la detección de dopamina (DA) en presencia de ácido L-ascórbico (AA). La dopamina es fácilmente oxidable con electrodos convencionales, como carbón vítreo, grafito, platino, oro, etc. [177–183]. Sin embargo, la detección electroquímica de dopamina conlleva varios problemas relacionados con la reacción de oxidación de este compuesto. Uno de los principales problemas es, como se ha indicado anteriormente, la presencia de otras especies en fluidos biológicos que se oxidan a potenciales similares a los que lo hace la dopamina, siendo el principal interferente el ácido L-ascórbico o el ácido úrico. Otro de los problemas está relacionado con la concentración de dopamina en los fluidos extracelulares, que es extremadamente baja (0.01-1 μ M) para individuos sanos, mientras que la concentración de los principales interferentes es varios órdenes de magnitud mayor (30-90 μ M para AA). Por tanto, la relación de concentraciones para DA:AA en plasma sanguíneo es aproximadamente 1:10000 o menor [184,185]. Por ende, para mejorar la selectividad de los electrodos para detectar DA se han hecho grandes esfuerzos usando diferentes estrategias para modificar electrodos: incluyendo grafeno, nanopartículas, polímeros conductores, monocapas autoensambladas (*self-assembled monolayers*, SAM), etc. [186–189]. Estos electrodos modificados tienen buena selectividad para relaciones de concentración DA:AA de 1:1000 en el mejor de los casos [188,190–192].

En este capítulo se presenta un método diferente y novedoso para la modificación de electrodos. Estos se modifican con Sílice Impresa Molecularmente (*Molecularly Imprinted Silice*, MIS) consiguiendo la detección electroquímica selectiva de dopamina. La capa de sílice impresa molecularmente fue preparada sobre un electrodo de carbón vítreo mediante el método de depósito electroquímico. Este método se ha empleado para la preparación de electrodos modificados para un número amplio de aplicaciones, incluyendo nanolitografía, inmovilización de enzimas, intercambiadores iónicos y electroanálisis, entre otros [90,129,147,193,194].

La aplicación de una corriente negativa para la reducción del disolvente conteniendo los precursores de sílice en presencia de una molécula molde produce una película de sílice con dichas moléculas encapsuladas. La posterior eliminación de las moléculas molde, también llevada a cabo mediante un método electroquímico, produce una capa de sílice impresa molecularmente.

En este capítulo se expone cómo se ha llevado a cabo la modificación de un electrodo mediante la síntesis electroasistida de MIS usando la metodología sol-gel e impresa con dopamina.

4.2 Experimental

Para este capítulo los reactivos utilizados fueron: tetraetoxisilano (TEOS), etanol (EtOH), cloruro potásico (KCl), dopamina hidrocloreto (DA), ácido L-ascórbico (AA), ácido clorhídrico (HCl) pureza del 37%, dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4), hidrógeno fosfato de dipotasio (K_2HPO_4), y ácido sulfúrico (H_2SO_4). Todas las disoluciones fueron preparadas usando agua ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenida de un sistema *ELGA Lab Water Purelab*. Para más detalles ver el capítulo 2.

Los experimentos electroquímicos fueron realizados en una celda electroquímica de vidrio convencional, como la mostrada en el capítulo 2. Como electrodo de trabajo se utilizó una barra de carbón vítreo (GC) (área geométrica de 0.07 cm²). Este electrodo fue cuidadosamente pulido con papel de lija y posteriormente sonicado durante 10 minutos para eliminar los restos adheridos durante el pulido. Como contra-electrodo se utilizó un hilo de platino y como electrodo de referencia un electrodo reversible de hidrógeno.

La morfología superficial de los electrodos modificados en este capítulo se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM), usando un microscopio electrónico de barrido de la marca *JEOL JSM*.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Depósito electroquímico de sílice

La disolución precursora de sílice fue preparada mezclando 6 mL de TEOS, 8.2 mL de EtOH y 5.8 mL de una disolución que contiene 0.01 M HCl + 0.46 M KCl en un vial de vidrio. El KCl es necesario para proporcionar conductividad a la disolución y así, posteriormente, poder realizar el depósito electroquímico de la sílice. La disolución precursora se agitó durante 1 h para producir la hidrólisis del TEOS. Para realizar el depósito electroquímico de sílice, sobre el electrodo, ya pulido, se sumergió en la disolución precursora y se aplicó una corriente de reducción. Como ya se explicó en el capítulo 3 aplicando al electrodo una corriente de reducción se induce la formación de hidrógeno molecular y como consecuencia se produce un aumento del pH cerca de él y el depósito de sílice sobre éste. Este método proporciona una película delgada y uniforme de sílice evitando la formación de *pinholes* [183,195].

Cuando el depósito se realiza usando una disolución en ausencia de molécula molde (en este caso dopamina) la película obtenida la llamamos Sílice No Impresa (*Non Imprinted Silica*, NIS). Se comprobaron diferentes condiciones a la hora de realizar el depósito electroasistido con valores de densidad de corriente aplicada comprendidos entre -5 y $-21 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. Después de la preparación de la película NIS el electrodo se enjuagó con abundante agua ultrapura y se introdujo en una disolución blanco de 0.5 M de H_2SO_4 . El electrodo modificado fue sometido a 10 ciclos voltamperométricos desde 0.3 a 1 V con el objeto de limpiar su superficie.

4.3.2 Caracterización morfológica y electroquímica de sílice electrodepositada

En la figura 4.1 se muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para un electrodo de carbón vítreo modificado con Sílice No Impresa (NIS). La capa depositada con una densidad de corriente de $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ (carga transferida $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$, corriente aplicada -0.175 mA durante 60 s) está compuesta por coloides de sílice agregados con forma esférica. Las películas formadas aplicando densidades de corriente más negativas ($-21 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, corriente aplicada -0.35 mA durante 60 s) presentan una superficie con grietas debido al elevado burbujeo de hidrógeno producido en la superficie como consecuencia de la reducción de protones. El gel depositado utilizando este valor de corriente es más heterogéneo formando películas con partículas de sílice con un diámetro comprendido entre 80 y 700 nm .

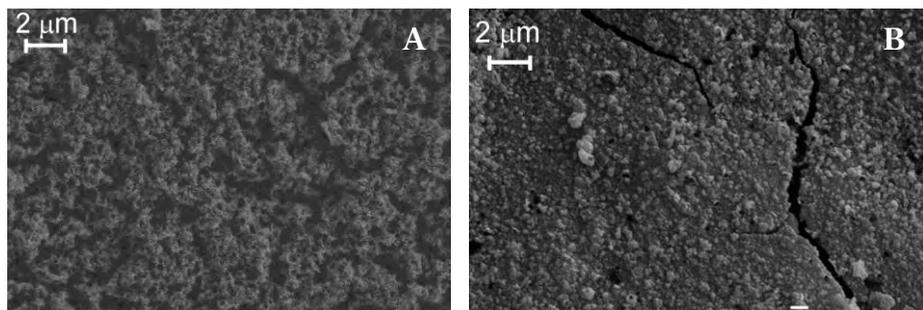


Figura 4.1. Micrografías SEM de un electrodo modificado con NIS sintetizado a diferentes densidades de corriente. (A) NIS preparado a $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$; (B) NIS sintetizado a $-21 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Otras capas fueron depositadas de igual forma pero usando dopamina como molécula molde. Para ello se empleó la misma disolución precursora de sílice pero adicionando dopamina 0.1 M. Estas capas fueron etiquetadas como MIS (Sílice Impresa Molecularmente). El depósito de estas películas fue realizado galvanostáticamente en condiciones similares a las fijadas para las capas NIS. Después de la preparación de la capa, el electrodo fue enjuagado con abundante agua ultrapura. Sin embargo, la sílice depositada retiene moléculas de dopamina dentro de sus poros, como lo demuestra voltamperometría cíclica en la figura 4.2A para un electrodo modificado y sumergido en una disolución 0.5 M H_2SO_4 . Como puede observarse en el voltamperograma, durante el primer barrido hacia valores positivos de potencial aparece una corriente de oxidación desde +0.5 V correspondiente a la oxidación de la dopamina. Durante el barrido inverso, hacia valores menos positivos, se observa un pico de reducción a +0.79 V.

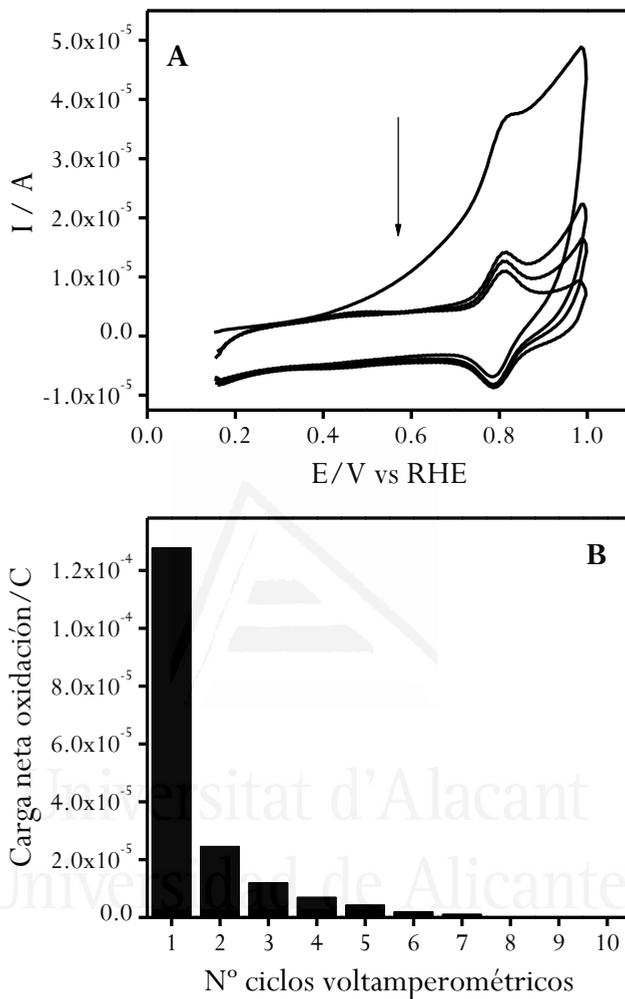


Figura 4.2. (A) Ciclos voltamperométricos sucesivos para un electrodo modificado con MIS inmerso en una disolución de 0.5 M H_2SO_4 . Velocidad de barrido $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (B) Diagrama de barras correspondiente a la representación de los valores de carga de oxidación neta frente al número de ciclos.

Los ciclos voltamperométricos después del primer ciclo aún presentan el proceso redox, una corriente anódica a un potencial de $+0.82 \text{ V}$ y su

correspondiente reducción a +0.79 V (figura 4.2A). La carga anódica es siempre mayor que la carga catódica durante los primeros 8 ciclos, indicando una oxidación degradativa de las moléculas de dopamina atrapadas. La figura 4.2B muestra la diferencia entre la carga de oxidación y la carga de reducción de cada ciclo voltamperométrico, es decir, la carga neta de oxidación, que como puede observarse decrece tras cada ciclo y después de 9 ciclos se llega a un estado estable donde la carga neta de oxidación es 0, lo que indica que se ha eliminado la DA del interior de la capa de sílice. Este tratamiento electroquímico es propuesto y utilizado para extraer las moléculas molde de la capa de sílice impresa molecularmente (MIS).

En la figura 4.3 se muestran las imágenes SEM para electrodos de carbón vítreo modificados con películas de sílice impresa molecularmente (MIS) fabricadas aplicando una densidad de corriente de reducción de $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 60 s. La presencia de dopamina durante la etapa de gelificación produce un aspecto más heterogéneo en la capa de sílice y la forma de los coloides de sílice está menos definida. En general, se observan películas más compactas para la sílice impresa (MIS) que para la no impresa (NIS).

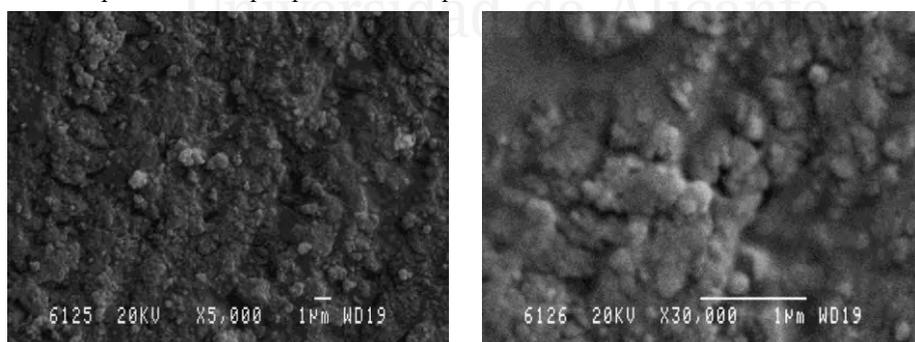


Figura 4.3. Micrografía SEM de un electrodo de carbón vítreo modificado con una película MIS usando una densidad de corriente de reducción de $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 60 s.

4.3.3 Comportamiento electroquímico de la dopamina y el ácido L-ascórbico

La figura 4.4 muestra el primer voltamperograma cíclico para un electrodo de carbón vítreo sin modificar inmerso en una disolución que contiene 1 mM DA en una disolución de tampón fosfato (pH 7). Hacia valores positivos de potencial se observa un pico de oxidación a +0.82 V correspondiente al proceso de oxidación de la dopamina a dopamina-o-quinona (DAQ). El pico de reducción de dopamina-o-quinona se observa a +0.76 V durante el barrido inverso.

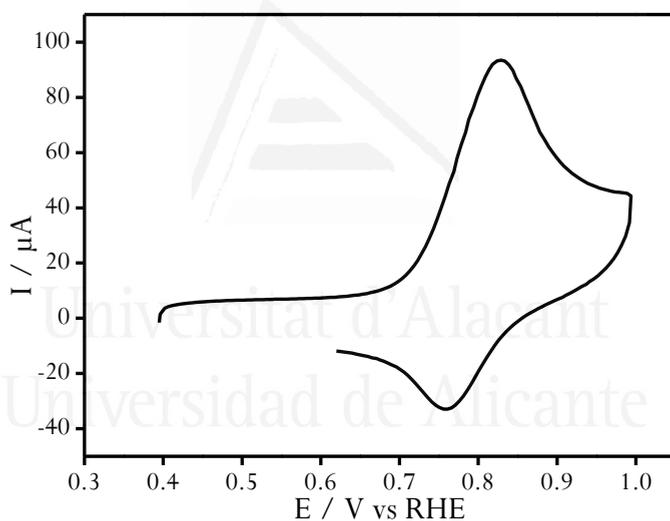


Figura 4.4. Primer voltamperograma cíclico de un electrodo de carbón vítreo sin modificar en una disolución 1 mM DA en tampón fosfato (pH 7). Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A la oxidación de la dopamina le sigue un mecanismo típico ECE (esquema 4.1) [196]. En un mecanismo de este tipo se produce una primera etapa electroquímica de transferencia electrónica (E) seguida de una etapa química (C)

y posteriormente, se produce una reacción electroquímica (E) debido a que el producto formado es electroactivo. Inicialmente la dopamina es oxidada a dopamina-o-quinona (DAQ) en el barrido hacia valores positivos de potencial. Esta dopamina-o-quinona sufre una reacción de ciclación química dando lugar a dopaminocromo. Los procesos redox correspondientes a la transición dopaminocromo/leucodopaminocromo aparecen a potenciales menores de +0.4 V, como puede observarse en la figura 4.5, aparece un pico de reducción a +0.34 V correspondiente a la reducción de dopaminocromo a leucodopaminocromo. El contraproceto se observa a +0.4 V.

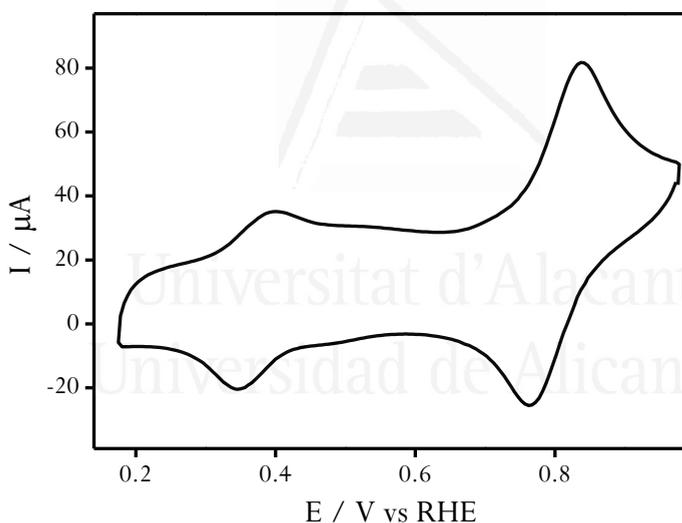
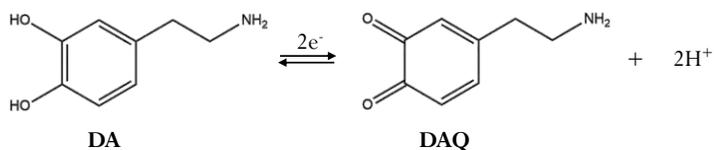
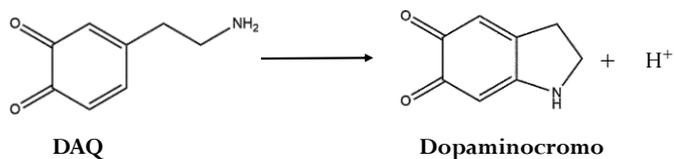


Figura 4.5. Voltamperograma cíclico estabilizado de un electrodo de carbón vítreo sin modificar en una disolución 1 mM DA en tampón fosfato (pH 7). Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

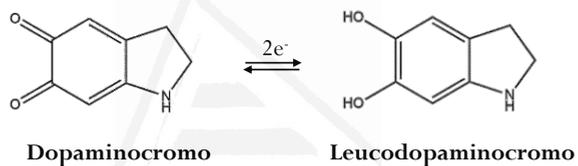
Oxidación electroquímica de la DA (Etapa E)



Reacciones químicas de la DA y DAQ (Etapa C)



Reducción electroquímica del dopaminocromo (Etapa E)



Esquema 4.1. Mecanismo ECE de la dopamina.

La figura 4.6 muestra el voltamperograma cíclico para un electrodo de carbón vítreo sin modificar inmerso en una disolución que contiene ambos, dopamina y ácido L-ascórbico, en concentración 0.1 mM DA + 10 mM AA en disolución tampón fosfato (pH 7). Se observa que además de los picos propios de la dopamina aparece un pico en torno a +0.6 V que se corresponde a la oxidación irreversible de ácido L-ascórbico.

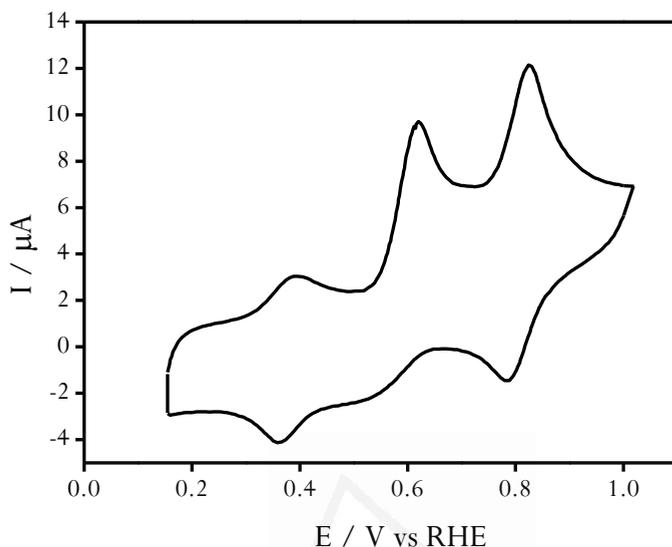


Figura 4.6. Voltamperograma estabilizado para un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución que contiene 0.1 mM DA + 1 mM AA en una disolución tampón fosfato (pH 7). Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

La figura 4.7A muestra el voltamperograma cíclico para un electrodo de carbón vítreo sin modificar inmerso en una disolución que contiene dopamina y ácido L-ascórbico en concentración 0.1 mM DA + 10 mM AA en disolución tampón fosfato (pH 7). Hacia valores positivos de potencial se observan dos picos de oxidación uno a +0.7 V y otro a +0.82 V correspondientes al proceso de oxidación irreversible del ácido L-ascórbico y de la dopamina a dopamina-o-quinona (DAQ), respectivamente. El pico de reducción de dopamina-o-quinona a dopamina se observa a +0.79 V durante el barrido inverso. Los procesos redox correspondientes a la transición dopaminocromo/leucodopaminocromo aparecen a potenciales menores de +0.4 V, un valor de potencial más bajo del

seleccionado como límite anódico en los voltamperogramas cíclicos que se muestran en la figura 4.7.

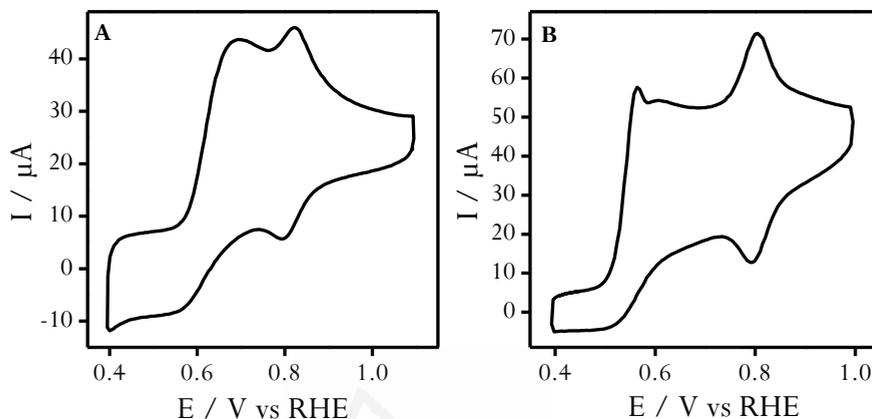


Figura 4.7. (A) y (B) Respuesta electroquímica para un electrodo de carbón vítreo sin modificar en una disolución que contiene 0.1 mM DA + 10 mM AA en tampón fosfato (pH 7) y 0.5 M H₂SO₄, respectivamente. Velocidad de barrido 100 mV·s⁻¹.

La figura 4.7B muestra el voltamperograma cíclico para un electrodo de carbón vítreo sin modificar inmerso en una disolución que contiene DA y AA en una disolución 0.5 M de H₂SO₄. En este caso, la respuesta de la dopamina no es tan compleja, ya que la formación de leucodopaminocromo es mucho más lenta en pH ácido que en medio neutro [171,178,197].

Como puede observarse, en el barrido hacia valores positivos de potencial se observa un pico de oxidación a +0.57 V que corresponde a la oxidación irreversible del ácido L-ascórbico, y el pico de oxidación correspondiente a la dopamina aparece a +0.81 V, que aparece superpuesto con la cola de difusión de la oxidación del ácido L-ascórbico. En el barrido inverso, la dopaminocromo es reducida en un único pico que aparece a +0.79 V.

A continuación, en la figura 4.8A podemos ver el voltamperograma cíclico para un electrodo de carbón vítreo modificado con sílice no impresa (NIS) aplicando una densidad de corriente de $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 60 s inmerso en una disolución que contiene DA y AA en una disolución de tampón fosfato (pH 7). En el barrido hacia valores positivos de potencial se puede observar un pico de oxidación a $+0.57 \text{ V}$ que corresponde con la oxidación irreversible de ácido L-ascórbico, el pico correspondiente a la oxidación de la dopamina aparece a $+0.8 \text{ V}$ y la reducción asociada a $+0.76 \text{ V}$ se observa en el barrido inverso. Puede observarse que los procesos redox debidos a la dopamina aparecen poco definidos para este electrodo, posiblemente debido a la formación de una película de poli-dopamina que bloquea los poros de sílice [196], empeorando de este modo la respuesta del electrodo modificado para la detección de dopamina.

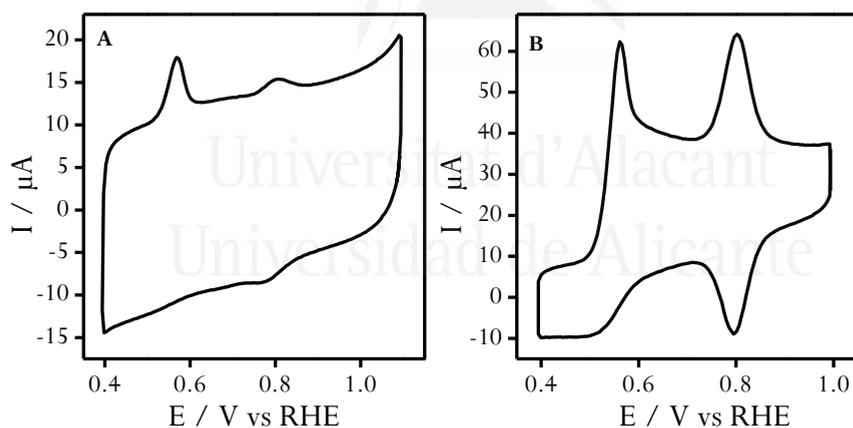


Figura 4.8. (A) y (B) Respuesta electroquímica para un electrodo modificado con Sílice No Impresa (NIS) ($-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) en una disolución que contiene $0.1 \text{ mM DA} + 10 \text{ mM AA}$ en tampón fosfato (pH 7) y $0.5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, respectivamente. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

En la figura 4.8B se muestra la respuesta electroquímica para un electrodo modificado con Sílice No Impresa (NIS) aplicando una corriente de reducción de $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 60 s sumergido en una disolución que contiene dopamina y ácido L-ascórbico en medio ácido (0.5 M H_2SO_4). En el barrido de oxidación se observa un pico a +0.57 V correspondiente a la oxidación irreversible del ácido L-ascórbico y a +0.8 V aparece un pico correspondiente a la oxidación de la dopamina, la reducción de ésta aparece en el barrido inverso a +0.78 V. Este último proceso aparece bien definido y claramente separado de la oxidación de AA.

Comparando los voltamperogramas correspondientes a un electrodo sin modificar (carbón vítreo) (figura 4.7) y los electrodos modificados con sílice electrodepositada (figura 4.8) tanto en medio ácido como en medio neutro, puede observarse que en medio ácido los picos de oxidación correspondientes al ácido L-ascórbico y la dopamina presentan una buena separación pico a pico, además de estar mejor definidos que en medio neutro (figura 4.8B).

4.3.4 Optimización de la impresión molecular: Selectividad y efecto de impresión

Con el fin de optimizar la modificación de los electrodos en cuanto a selectividad para la detección de dopamina en presencia de ácido L-ascórbico, se definió el Parámetro de Selectividad (SP) a partir de los voltamperogramas obtenidos, como la relación entre el valor de corriente farádica correspondiente a la oxidación de DA y la correspondiente a la oxidación de AA calculada a partir del voltamperograma obtenido del electrodo inmerso en una disolución que contiene una relación de concentración DA:AA de 1:100.

$$SP = \frac{i_{DA}}{i_{AA}} \quad (4.1)$$

Por ejemplo, para el electrodo NIS presentado en la figura 4.8B este SP tiene un valor de 0.48. El SP se calculó para películas de Sílice Impresa Molecularmente (MIS) preparadas usando diferentes valores de densidad de corriente, comprendidos estos entre -5 y $-21 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 60 s.

Posteriormente, para estudiar el efecto de impresión se adicionaron diferentes concentraciones de molécula molde (dopamina), comprendidas entre 10^{-3} y 0.2 M , en la disolución precursora de sílice. El SP de la película impresa molecularmente (MIS) (SP_{MIS}) fue comparado con el SP de películas no impresas (NIS) electrodepositadas en las mismas condiciones, pero en ausencia de molécula molde (SP_{NIS}). Esta relación fue definida como Parámetro Efecto de Impresión (IEP):

$$IEP = \frac{SP_{MIS}}{SP_{NIS}} \quad (4.2)$$

Por lo tanto, $IEP=1$ indica que, para los electrodos preparados en las mismas condiciones electroquímicas, el SP para electrodos impresos molecularmente es el mismo que para electrodos preparados en ausencia de molécula molde (no impresos molecularmente), por tanto, no se observa ningún efecto de la impresión.

En la figura 4.9 se puede observar una gráfica de contorno para los valores de IEP de diferentes capas de sílice preparadas por depósito electroasistido para un valor de densidad de corriente de $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ y a diferentes tiempos, es decir, cargas transferidas.

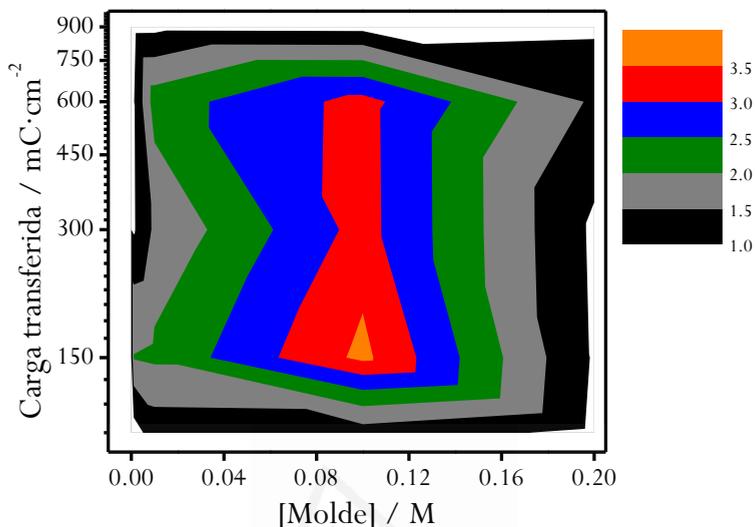


Figura 4.9. Gráfica de contorno para Parámetro Efecto de Impresión (IEP) para películas de sílice en función de la concentración de molécula molde, (DA en este caso) y el valor absoluto de carga usada en el electrodeposición (carga transferida).
Densidad de corriente $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$.

El valor de IEP se representa como función de dos variables: la concentración de molécula molde (DA) en el eje de abscisas y la cantidad de sílice electrodepositada representada como la cantidad de carga eléctrica que atraviesa el electrodo durante el electrodeposición, en el eje de ordenadas.

Se observa que para valores de concentración de dopamina inferiores a 0.04 M en la disolución precursora de sílice los valores de IEP son bajos. Para estas películas los valores de IEP son menores de 2, indicando que el comportamiento para películas impresas (MIS) es similar a las películas no impresas (NIS) y, por tanto, no hay un efecto importante de la impresión molecular. En la gráfica de contorno podemos observar un valor de IEP óptimo

(y por tanto, de selectividad), se corresponde con un valor de concentración de molécula molde próximo a 0.1 M para todos los valores de carga electrodepositada.

En la figura 4.9 podemos observar que el máximo para IEP es obtenido para un valor de carga de $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ y que este valor sigue siendo elevado hasta un valor de carga de $600 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Películas depositadas empleando valores de carga superiores conducen a una peor selectividad, esto puede ser debido a la pérdida de coherencia en la capa, ya que debe haber una cantidad crítica de sílice que se electrodeposite, es de suponer que la película de sílice debe presentar una adherencia limitada al electrodo de carbón vítreo y capas muy gruesas pueden desprenderse parcialmente de la superficie del electrodo.

El voltamperograma cíclico para un electrodo modificado con sílice impresa (MIS) preparado en las condiciones optimizadas: carga $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $[\text{DA}]=0.1 \text{ M}$, inmerso en una disolución $1 \text{ mM DA} + 100 \text{ mM AA}$ se muestra en la figura 4.10, presentando un valor para IEP de 3.62. Además, en esta figura se compara con el voltamperograma obtenido para un electrodo modificado con sílice no impresa (NIS) (línea discontinua) preparado en las mismas condiciones.

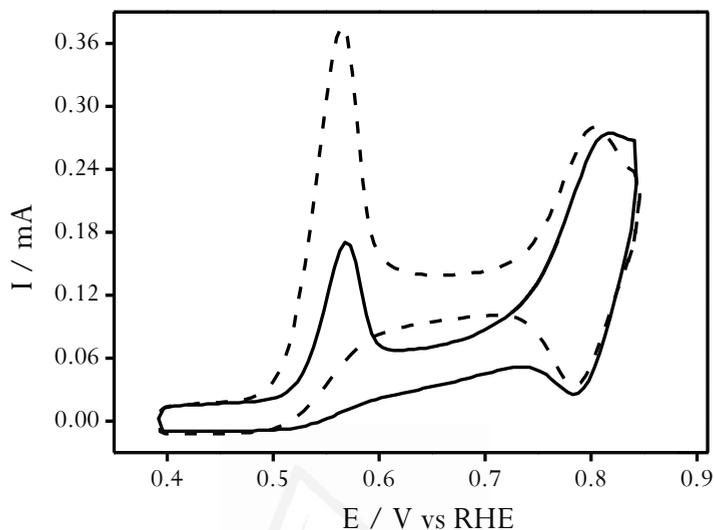


Figura 4.10. Voltamperogramas cíclicos estabilizados para un electrodo modificado con NIS (densidad de corriente $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$; carga $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$; línea discontinua) y para un electrodo modificado con MIS (densidad de corriente $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$; carga $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ y 0.1 M DA molde; línea continua) en una disolución que contiene $1 \text{ mM DA} + 100 \text{ mM AA}$ (relación DA:AA 1:100) en $0.5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

El electrodo modificado con MIS presenta mejor selectividad para la detección de DA que el electrodo modificado con NIS. Mientras que el valor de corriente para la oxidación de DA es similar en ambos electrodos, NIS y MIS, la diferencia más importante se debe a la disminución en la intensidad de corriente para el pico de oxidación de AA en el electrodo modificado con sílice impresa, lo que indica que esta película actúa como filtro molecular para DA, excluyendo parcialmente el paso de las moléculas de ácido L-ascórbico.

4.3.5 Sílice impresa molecularmente como sensor electroquímico de dopamina

El electrodo modificado con sílice puede ser usado adecuadamente como sensor voltamperométrico para la detección de dopamina. La figura 4.11A muestra los voltamperogramas para un electrodo modificado con MIS para sucesivas adiciones de dopamina. Se observa que un incremento en la concentración de dopamina va acompañada con un incremento en la corriente de oxidación que aparece sobre +0.8 V.

La figura 4.11B muestra las curvas de calibrado obtenidas para un electrodo de carbón vítreo sin modificar, para un electrodo modificado con NIS y para un electrodo modificado con MIS.

Cabe destacar que el electrodo sin modificar presenta una respuesta sensible a dopamina para concentraciones inferiores a 250 μM pero este electrodo pierde sensibilidad para concentraciones más elevadas de dopamina. La recta de calibrado para concentraciones inferiores a 250 μM se puede ajustar a una línea recta ($R^2=0.999$) y la sensibilidad de este electrodo es de $0.83 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$. Como puede observarse, la presencia de sílice no impresa (NIS) sobre el electrodo de carbón vítreo mejora la sensibilidad hacia la dopamina, debido a la afinidad de la sílice por estas moléculas [183] aumentando el rango lineal, y por tanto, la sensibilidad hasta 500 μM . La sensibilidad para el electrodo modificado con sílice no impresa se incrementa presentando un valor de $2.21 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$.

Los electrodos modificados con sílice impresa molecularmente (MIS) presentan una mejora en el comportamiento con respecto al electrodo de carbón vítreo sin modificar y al electrodo modificado con sílice no impresa (NIS), como puede observarse en la figura 4.11B, para un electrodo modificado con MIS en las condiciones óptimas (concentración de dopamina molde 0.1 M), la

sensibilidad para concentraciones por debajo de 250 μM es ligeramente mayor, con respecto al electrodo modificado con NIS (sensibilidad $2.24 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$) pero además, el electrodo modificado con MIS presenta una buena sensibilidad para concentraciones de dopamina mayores de 2 mM.

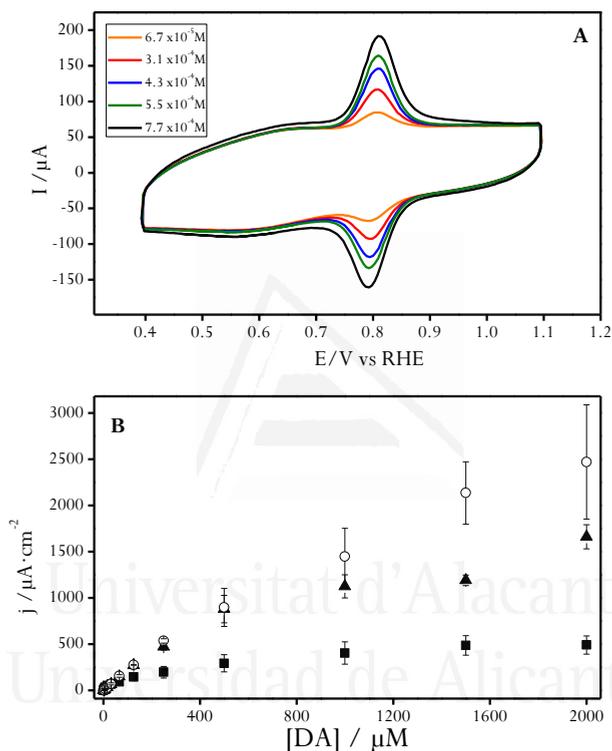


Figura 4.11. (A) Respuesta electroquímica para un electrodo modificado con MIS en las condiciones óptimas (densidad de corriente $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, carga $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ y 0.1 M DA (molde) en una disolución de $0.5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ después de la adición de diferentes cantidades de dopamina. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Curvas de calibrado para la cuantificación de dopamina con diferentes electrodos: carbón vítreo sin modificar (cuadrados), carbón vítreo modificado con NIS (densidad de corriente $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, carga $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$, triángulos) y carbón vítreo modificado con MIS (densidad de corriente $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, carga $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ y 0.1 M DA , círculos).

La impresión molecular de sílice tiene un efecto positivo en términos de sensibilidad en la detección de dopamina. En la figura 4.12 se observan las curvas de calibrado para electrodos modificados con MIS preparados usando diferentes concentraciones de dopamina molde, 10^{-4} M (círculos huecos) y 10^{-2} M (triángulo invertido). A medida que aumentamos la concentración de DA con la que se imprime aumenta la sensibilidad.

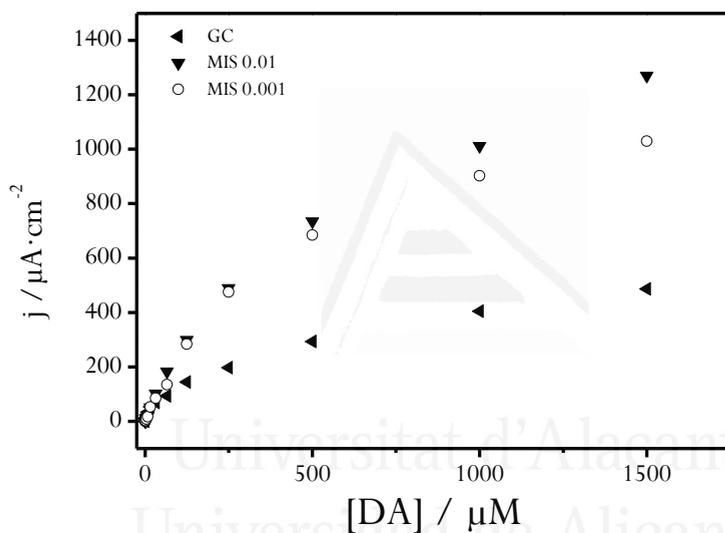


Figura 4.12. Curvas de calibración para diferentes electrodos: electrodo de carbón vítreo sin modificar y electrodo modificado con sílice impresa molecularmente utilizando diferentes valores de [DA] molde.

El límite de detección (LOD), calculado como 3 veces la desviación estándar de la señal del blanco, según el criterio de la IUPAC [198], para el electrodo modificado con MIS es de $5.51 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ para dopamina.

La figura 4.13 muestra el voltamperograma cíclico de un electrodo modificado con MIS después de una elevada adición de AA, comprobando así la

efectividad de la capa MIS. La concentración de dopamina se mantuvo constante en $10\ \mu\text{M}$ mientras que la concentración de ácido L-ascórbico era superior a $0.1\ \text{M}$. La adición de interferente (en relación molar DA:AA 1:10000) afecta muy ligeramente a la medida de la corriente correspondiente a la dopamina.

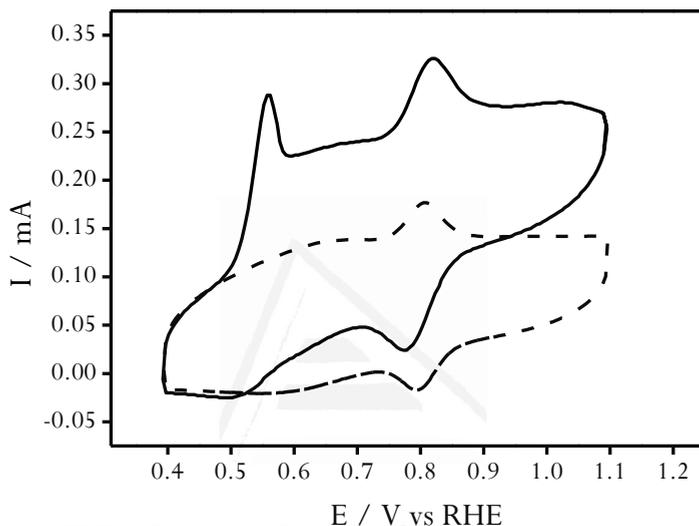


Figura 4.13. Voltamperograma cíclico estabilizado para un electrodo modificado con MIS (densidad de corriente $-10.5\ \text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, carga $150\ \text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $0.1\ \text{M}$ DA) en una disolución que contiene $10\ \mu\text{M}$ de dopamina (línea discontinua) y en una disolución de $10\ \mu\text{M}$ DA + $0.1\ \text{M}$ AA (línea continua) en $0.5\ \text{M}$ H_2SO_4 . Velocidad de barrido $100\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Estos electrodos modificados con MIS también pueden ser usados como sensor para la detección amperométrica de dopamina en presencia de ácido L-ascórbico. La figura 4.14 muestra la respuesta cronoamperométrica registrada para un electrodo modificado con MIS en una disolución que contiene $50\ \text{mM}$ de ácido L-ascórbico. El potencial aplicado en el electrodo de trabajo se fijó a $+0.9\ \text{V}$ durante las sucesivas adiciones de dopamina. Después de la adición del

neurotransmisor puede observarse un incremento en la corriente, proporcional a la concentración de dopamina.

Además, la adición de una elevada cantidad de ácido L-ascórbico (1 μM) no afecta a la intensidad de corriente medida durante el experimento. La adición final de ácido L-ascórbico es 3 órdenes de magnitud mayor que la cantidad previamente añadida de dopamina, sin afectar significativamente a la medida. Se considera que la película de sílice es un filtro molecular efectivo para el ácido L-ascórbico. Se observa una respuesta lineal para un intervalo de concentraciones de dopamina comprendido entre 100 nM y 1 μM , en una disolución que contiene 50 mM de interferente (AA).

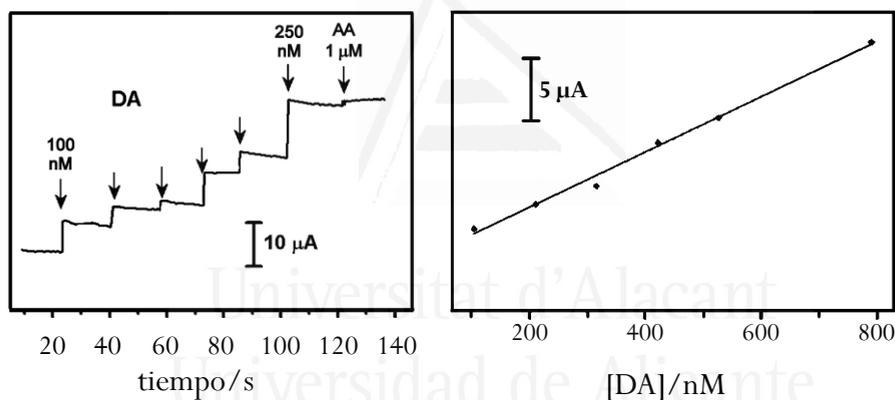


Figura 4.14. Respuesta cronoamperométrica para un electrodo modificado con MIS (densidad de corriente $-10.5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, carga $150 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ y 0.1 M DA molde) para la adición de cantidades crecientes de dopamina. Potencial de detección +0.9 V. Disolución de 50 mM de ácido L-ascórbico en tampón fosfato (pH 7).

La regresión lineal conduce a un valor de sensibilidad de $22.3 \mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ con un coeficiente de correlación, $R^2=0.994$. El límite de detección (LOD), calculado fue de 14 nM para la dopamina en estas condiciones.

Estos experimentos de cronoamperometría fueron realizados de forma similar en medio ácido (0.5 M H₂SO₄) proporcionando una respuesta lineal para un intervalo de concentraciones comprendidas entre 100 nM y 1 μM para dopamina en presencia de ácido L-ascórbico. Se obtuvo un valor de sensibilidad de 21.0 μA·μM⁻¹ y R²=0.996. El límite de detección (LOD) obtenido fue de 57 nM para la dopamina en esas condiciones.

En la tabla 4.1 se recogen diferentes parámetros analíticos obtenidos para diferentes electrodos modificados que se encuentran en la literatura científica reciente para la detección de dopamina en presencia de ácido L-ascórbico. Como puede observarse, en el mejor de los casos, en todos los trabajos consultados, la relación molar DA:AA es de 1:1000 mientras que en el sensor propuesto se puede usar en una relación 1:50000, cantidad de ácido L-ascórbico próxima a la que se encuentra en fluidos biológicos.

Finalmente, conviene indicar que los electrodos modificados con sílice son estables durante varios días si la película de sílice se mantiene húmeda. De esta manera, el electrodo modificado con sílice puede ser reutilizado después de someterlo a un procedimiento de limpieza similar al presentado en la figura 4.2A de este modo, se usó el mismo electrodo hasta en 7 ocasiones para realizar medidas en las mismas condiciones.

Tabla 4.1. Comparación entre diferentes electrodos modificados recogidos en literatura para la detección electroquímica de dopamina en presencia de ácido L-ascórbico.

Electrodo modificado	LOD μM	Sensibilidad $\mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$	Relación molar DA:AA	Ref.
Nanotubos de carbono- polipirrol	0.06	0.086	1:50	[199]
Au- Sílice <i>core shell</i>	0.02	0.0417	-	[189]
Óxido de grafeno-sílice	0.03	0.0047	-	[200]
Nanopartículas Au- polímero	0.0078	0.2443	1:100	[201]
Grafeno-rojo congo	0.11	0.025	-	[202]
Grafeno	2.64	0.0659	1:250	[203]
β -ciclodextrina-grafeno	0.005	-	1:1000	[204]
Amino- β -ciclodextrina- nanotubos de carbono	0.5	0.514	1:100	[205]
Poly- β -ciclodextrina	4.1	-	1:33	[109]
Grafeno-Au,Ag	0.205	0.03	1:1000	[188]
Poly- <i>o</i> -aminofenol	0.00198	0.2369	1:1000	[191]
Cisteamina-SAM	2.31	0.014	1:500	[206]
Nanotubos de carbono- líquido iónico	0.1	0.237	1:5	[207]
L-cisteína-SAM	0.02	-	1:4	[187]

Continuación tabla 4.1.

Electrodo modificado	LOD μM	Sensibilidad $\mu\text{A}\cdot\mu\text{M}^{-1}$	Relación molar DA:AA	Ref.
Poli-EDOT-co-(5-amino-2-ác. naftalensulfónico)	0.5	1	1:500	[186]
<i>Au nanorods</i>	0.0055	3.28	1:1000	[192]
Ác. fítico-nanotubos de carbono	0.08	-	1:250	[208]
Array microelectrodos	0.454	5.21×10^4	1:220	[209]
Poli(nicotinamida)/CuO	0.08	0.236	1:25	[210]
Poli-o-fenilendiamina	0.58	-	1:50	[211]
PSS-nanotubos de carbono	15.7	12.37	1:500	[212]
Grafeno silanizado	0.01	-	1:1000	[190]
Poli-metiltofeno-Pd, Pt	0.008	1.44	1:100	[213]
Au nanoporoso	0.017	-	1:500	[214]
Sílice Impresa Molecularmente	0.014	22.3	1:50000	Este trabajo

4.4 Conclusiones

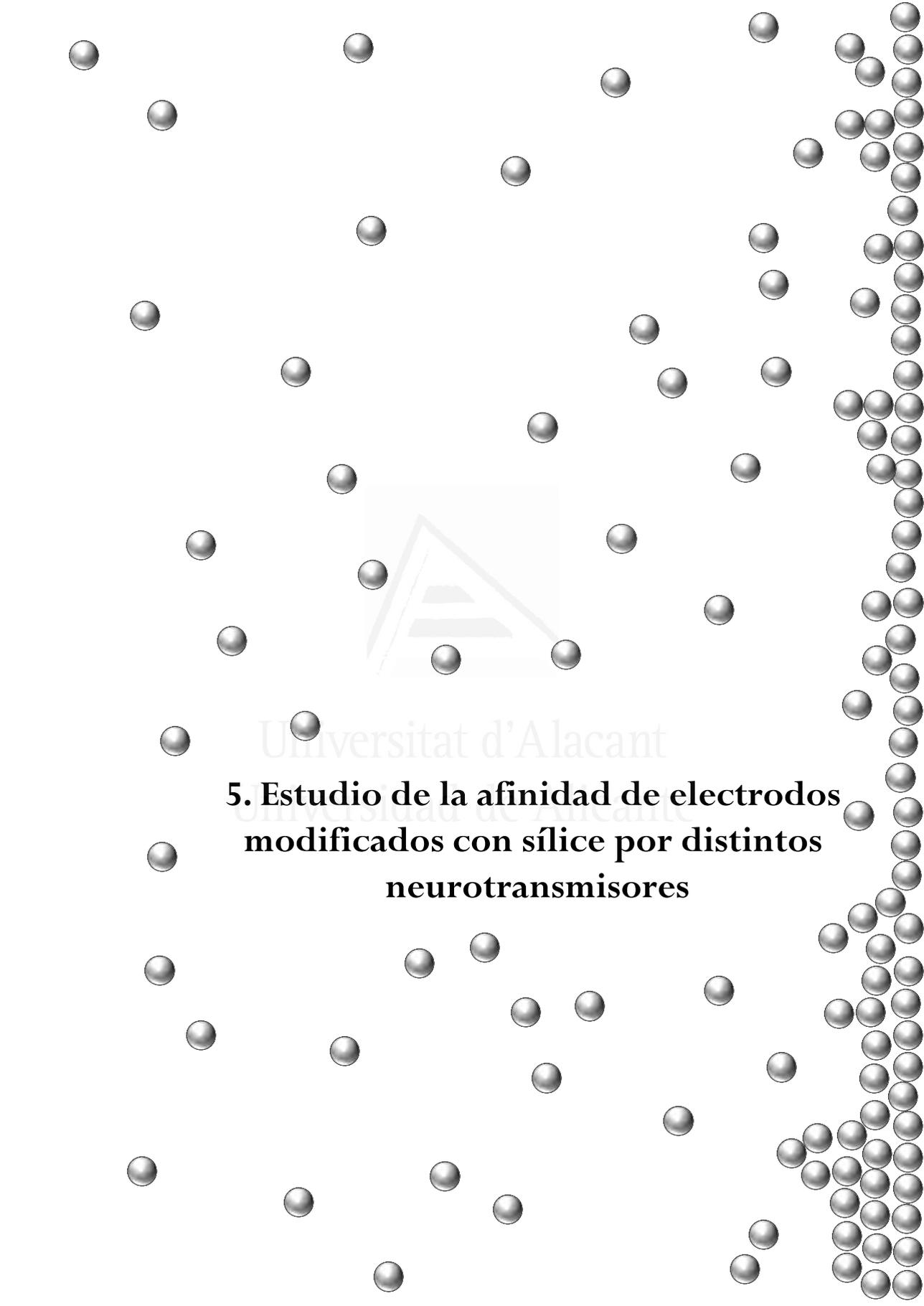
En el presente capítulo se prepararon electrodos de carbón vítreo modificados con películas de sílice preparadas por depósito electroasistido usando una disolución precursora de sol-gel. Con el uso de este método se pueden controlar fácilmente las propiedades del electrodo.

Las películas de sílice impresas molecularmente (MIS) con dopamina fueron preparadas para la detección electroquímica de ésta en presencia de ácido L-ascórbico.

Las capas de sílice electrodepositadas presentan una elevada coherencia y homogeneidad actuando como filtro a nivel molecular. Los electrodos de carbón vítreo modificados con sílice pueden usarse en la detección electroquímica selectiva de dopamina en presencia de una elevada cantidad de AA (DA:AA relación molar de 1:50000), siendo estos niveles de interferente similares a los que se encuentran en muestras fisiológicas.

Se ha obtenido un sensor de dopamina con un límite de detección de $0.014 \mu\text{M}$ y una sensibilidad de $22.3 \mu\text{A} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, valor superior al obtenido por otros autores con electrodos químicamente modificados.

El método electroquímico desarrollado para la fabricación del sensor es muy versátil y puede ser aplicado para la detección de otras moléculas de interés, simplemente modificando en el método propuesto la molécula molde empleada.

The background of the slide is decorated with numerous grey, 3D-rendered spheres of varying sizes. Some are scattered across the page, while a dense vertical column of spheres runs along the right edge. In the center, there is a faint, light-colored logo of the Universitat d'Alacant, which consists of a stylized 'A' shape with horizontal bars inside. Below the logo, the text 'Universitat d'Alacant' is written in a light, semi-transparent font.

**5. Estudio de la afinidad de electrodos
modificados con sílice por distintos
neurotransmisores**

5.1 Introducción

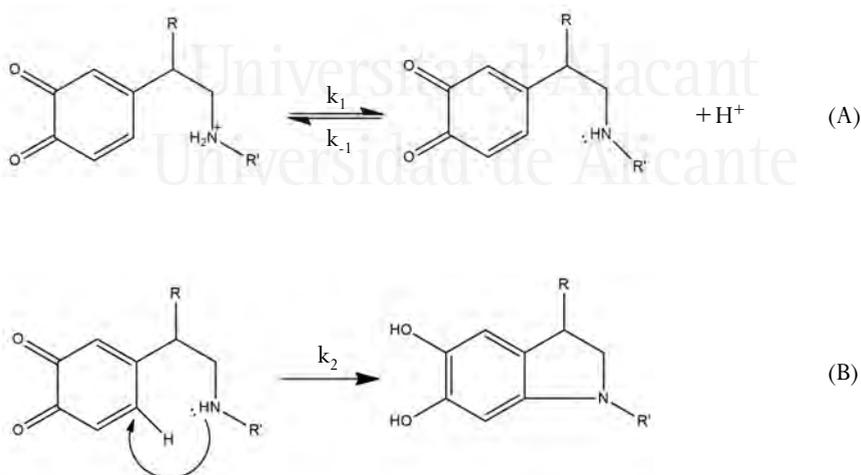
La identificación y cuantificación de neurotransmisores (NT) en fluidos fisiológicos, como plasma u orina, es fundamental para la detección y el diagnóstico de enfermedades [33], ocupando un lugar importante en el campo del electroanálisis. Por ejemplo, niveles anormales de concentración de estos compuestos pueden estar relacionados con diversas de enfermedades incluyendo: esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer, carcinomas, depresión, entre otras [215–217]. Por lo tanto, el seguimiento de las concentraciones de estos neurotransmisores es una buena estrategia para la detección precoz de estas enfermedades, para el estudio de patologías y para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Como ya se expuso en la introducción de esta tesis, se han utilizado, para la detección de neurotransmisores, gran variedad de técnicas: espectrofotométricas, radioenzimáticas, cromatográficas (GC y HPLC) o inmunoensayos [34,35]. Sin embargo, estos métodos de análisis suelen ser caros, complejos y necesitan etapas de preparación de la muestra.

Al tratarse de moléculas electroactivas, su detección electroquímica también es posible, solventando varios de los problemas que presentan las técnicas antes mencionadas. Con el uso de sensores electroquímicos se consigue la detección con dispositivos en miniatura y reducir costes, además la respuesta del análisis es rápida presentando buena sensibilidad.

Al tratarse de moléculas tan similares siguen un mecanismo de oxidación casi idéntico. En el capítulo 4 ya se explicó el mecanismo tipo ECE para las catecolaminas [196], que consiste en 3 etapas: oxidación electroquímica para dar catecolamina-o-quinona (etapa E_1), ciclación química de catecolamina-o-quinona a leucoaminocromo (etapa C) y finalmente otra etapa electroquímica donde se

da la oxidación del leucoaminocromo a aminocromo (etapa E_2). Para los 3 neurotransmisores la oxidación electroquímica para dar catecolamina-o-quinona, es decir, la etapa E_1 es casi idéntica y se oxidan a potenciales bastante cercanos. Debido a esta similitud la detección electroquímica de estas moléculas presenta baja selectividad. Además, éstas se encuentran en concentraciones bajas en fluidos fisiológicos y coexisten entre ellas y con otros interferentes, como ácido ascórbico y ácido úrico que son también electroactivos. Sin embargo, se observan diferencias, para los 3 neurotransmisores, en la velocidad de la etapa C. En el esquema 5.1 se muestra el mecanismo para la etapa química (etapa C). La especie generada en la etapa E_1 , la catecolamina-o-quinona, tiene un anillo deficiente de electrones y un grupo amino electrón-donor. En primer lugar ocurre la desprotonación del grupo amino (A), la molécula desprotonada es capaz de producir un ataque nucleófilo (B) y tras la rearomatización se obtiene la especie ciclada conocida como leucoaminocromo.



Esquema 5.1. Mecanismo etapa C del mecanismo ECE de las catecolaminas (para DA R y $R' = H$; para NE $R = OH$ y $R' = H$; y para EP $R = OH$ y $R' = CH_3$).

La velocidad de ciclación se puede calcular según la ecuación siguiente:

$$k_c = \frac{k_1 k_2}{k_{-1}[H^+] + k_2} \quad (5.1)$$

Donde k_c es la constante de velocidad para la etapa química, k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad de asociación y disociación para la protonación relacionada con K_a de la amina y k_2 es la constante de velocidad del ataque nucleófilo (esquema 5.1B).

Modificando electrodos de manera que éstos interactúen de forma diferente con cada uno de los neurotransmisores se podría resolver el problema de selectividad de la detección electroquímica de estos neurotransmisores (NT).

La modificación de electrodos mediante la metodología sol-gel nos proporciona un amplio abanico de posibilidades. El uso de precursores con grupos orgánicos (ORMOSIL) para modificar la sílice nos permite introducir grupos orgánicos en ella y por tanto, modular así las propiedades químicas de ésta, como la porosidad o la polaridad de los poros. Esto hará que las interacciones entre sílice y neurotransmisor se puedan modular.

Con este objetivo, la composición de la sílice fue modificada con grupos orgánicos diferentes: metilo, propilo, isobutilo, octilo y fenilo.

En bibliografía se encuentran estudios sobre la interacción de la sílice con neurotransmisores, en columnas cromatográficas [218–220], en concreto de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*). En este tipo de cromatografía la fase móvil utilizada normalmente es de naturaleza orgánica, generalmente acetonitrilo, con un porcentaje pequeño de disolvente acuoso. Se emplean columnas que tienen la propiedad de retener y separar compuestos polares, éstas se caracterizan por su

grado de hidrofiliidad y normalmente están compuestas de sílice sin modificar, o bien modificada con grupos aniónicos, catiónicos o zwitteriones [219]. En bibliografía se encuentran ejemplos en los que usando columnas de sílice modificadas con grupos amida consiguen determinar catecolaminas (dopamina, norepinefrina, epinefrina) en orina [220] e incluso detectar hasta 20 neurotransmisores en 20 minutos utilizando HILIC acoplada a espectrometría de masas [218].

En esta tesis el estudio de afinidad de la sílice por estos neurotransmisores fue realizado por métodos electroquímicos. Comparando la cantidad de neurotransmisor adsorbido en cada capa de sílice podemos evaluar la habilidad de la sílice para discriminar entre estas moléculas.

La adsorción depende de la interacción entre la superficie del adsorbente y las especies adsorbidas. En los fenómenos de adsorción hay que tener en cuenta la superficie del adsorbente, ya que ésta determina la naturaleza de las uniones con los neurotransmisores. Como ya se expuso en el capítulo 3, se utilizaron diferentes técnicas para evaluar el comportamiento de la superficie de sílice: análisis termogravimétrico acoplado a espectrometría de masas para evaluar el comportamiento térmico y cuantificar el contenido de materia orgánica. La espectroscopia FTIR y las microscopías TEM y FESEM se utilizaron para caracterizar morfológicamente y conocer mejor las propiedades superficiales de la sílice.

En este capítulo vamos a estudiar en detalle las interacciones entre los neurotransmisores y la sílice, estudiando los procesos de adsorción y desorción.

El fenómeno de adsorción, en la interfase sólido-líquido, implica un cambio en la concentración de la disolución. Las isothermas de adsorción se construyen midiendo la concentración de adsorbato en el medio antes y después

de producirse la adsorción en el adsorbente a un valor de temperatura constante. De esta forma se estudia la interacción entre el adsorbente y el adsorbato, en nuestro caso entre la sílice y los neurotransmisores. La forma de la isoterma de adsorción proporciona información cualitativa y cuantitativa de la naturaleza de la interacción NT-sílice. La clasificación más aceptada de los distintos tipos de isothermas de adsorción es la propuesta por Giles [221] y mostrada en la figura 5.1. Se observa que existen 4 tipos: tipo S, tipo L o Langmuir, tipo H o de alta afinidad y tipo C o de partición constante, de acuerdo con la forma de su parte inicial; cada uno de estos tipos se subdivide en cinco subgrupos (1-4 y mx) de acuerdo con el grado de recubrimiento superficial y con la forma del tramo final de las isothermas.

Las isothermas tipo S son cóncavas respecto al eje de ordenadas, es decir, la adsorción se ve favorecida conforme aumenta la concentración del soluto en la fase líquida, se trata, por tanto de una adsorción cooperativa. Estas curvas se dan cuando existe una fuerte atracción intermolecular entre las moléculas de soluto y cuando existe una competencia por los sitios del adsorbente, entre éstas y las moléculas de disolvente o de otras especies adsorbidas.

Las isothermas tipo L, o tipo Langmuir, son cóncavas respecto al eje de abscisas, es decir cuantos más sitios del adsorbente estén ocupados por el soluto más difícil es para éste encontrar sitios libres donde adsorberse, esto implica que no existe competición fuerte con el disolvente.

Las isothermas tipo H o de elevada afinidad son un caso especial de las tipo L, el soluto tiene tanta afinidad por la fase sólida que en disoluciones diluidas se encuentra totalmente adsorbido; como puede observarse (figura 5.1) la parte inicial de la isoterma es vertical.

Las isothermas tipo C o de partición constante presentan una parte lineal hasta alcanzar la capacidad máxima de adsorción, donde se produce un cambio brusco a un tramo horizontal o meseta. Este tipo de adsorción indica que el adsorbato presenta mayor afinidad por el adsorbente que por el disolvente. La forma lineal de la isoterma indica que el soluto penetra en zonas inaccesibles al disolvente.

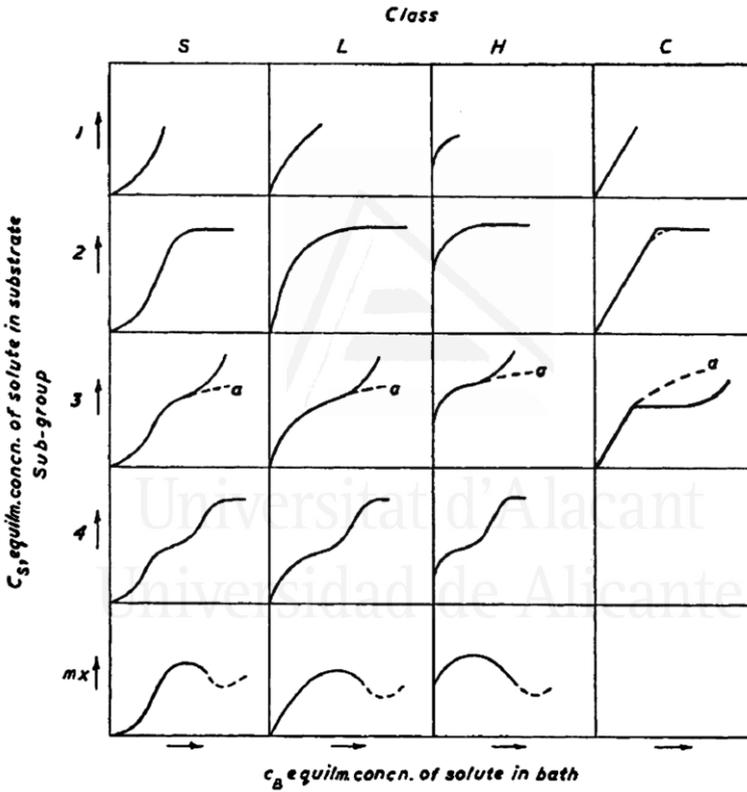


Figura 5.1. Clasificación de Giles de isothermas de adsorción en disolución [221].

Los subgrupos indican la extensión en la que ha ocurrido la adsorción. En las isothermas del subgrupo 1 la saturación de la superficie no se ha completado. En el subgrupo 2 se ha completado la monocapa; los subgrupos 3 y

4, que presentan mesetas, indican que existe una barrera energética que se debe vencer antes de que se pueda producir la adsorción en nuevos sitios (el soluto tiene mucha afinidad por el disolvente pero poca por las moléculas de soluto ya adsorbido sobre la superficie del adsorbente). La segunda subida y segunda meseta (subgrupos 3 y 4) se achacan al desarrollo de una nueva superficie susceptible de adsorber, puede ser debida a la capa de moléculas ya adsorbidas o a regiones del sólido en los que le soluto comienza a penetrar [222].

La adsorción de moléculas orgánicas en sílice ha sido ampliamente estudiada teniendo en cuenta el carácter hidrofílico o hidrófobo de la sílice [223]; por ejemplo, la adsorción de moléculas orgánicas como alcohol bencílico, benzaldehído, ácido benzoico y tolueno desde ciclohexano en sílice. Las moléculas orgánicas polares: alcohol bencílico, benzaldehído y ácido benzoico dan lugar a isothermas tipo L, y el tolueno, molécula apolar presenta una isoterma tipo C [224]. Se analizaron las isothermas de adsorción suponiendo que el enlace de hidrógeno es el responsable de la adsorción y que puede ser debido a (a) los electrones π del anillo de benceno y el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la sílice o, (b) los átomos de oxígeno de los compuestos aromáticos y los átomos de hidrógeno de los grupos silanol o, (c) el átomo de hidrógeno unido al átomo de oxígeno de los compuestos aromáticos y los átomos de oxígeno de los grupos silanol.

5.2 Experimental

Para este capítulo los reactivos utilizados fueron: tetraetoxisilano (TEOS), metil-trietoxisilano (MTES), n-propil-trietoxisilano (PrTES), isobutil-trietoxisilano (isoBTES), octil-trimetoxisilano (OTMS), fenil-trietoxisilano (PhTES), etanol (EtOH), cloruro potásico (KCl), dopamina hidrocloreto (DA),

(-)-epinefrina (EP) y norepinefrina (NE), ácido clorhídrico (HCl) pureza del 37%, dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4), hidrógeno fosfato de dipotasio (K_2HPO_4). Todas las disoluciones fueron preparadas usando agua ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) obtenida de un sistema *ELGA Lab Water Purelab*. Para más detalles ver el capítulo 2.

Como electrodo de trabajo se utilizó una barra de carbón vítreo (GC) (área geométrica de 0.07 cm^2). Este electrodo fue cuidadosamente pulido con papel de lija y a continuación sonificado durante 10 minutos para eliminar los restos adheridos durante el pulido. El área electroactiva de cada electrodo fue calculada en relación a la capacidad de la doble capa eléctrica del voltamperograma cíclico registrado en una disolución blanco (PBS, pH 7).

La modificación de los electrodos se llevó a cabo mediante depósito electroasistido de forma similar a la que se indicó en capítulos anteriores. Un electrodo de carbón vítreo se introdujo en un vial de vidrio que contenía la disolución precursora de sílice: 6 mL (0.0269 moles) TEOS, 8.2 mL EtOH y 5.8 mL de una disolución que contiene 0.01 M HCl + 0.47 M KCl previamente hidrolizada. Se aplicó una corriente de -0.175 mA durante 1 minuto para conseguir una película delgada y uniforme de sílice. El dispositivo experimental utilizado es como el que se mostró en el capítulo 3, epígrafe 3.2.

De igual forma que se indicó en el capítulo 3, en la tabla 5.1 se muestra la nomenclatura utilizada para identificar las distintas capas de sílice sintetizadas. Así, la sílice convencional preparada tal y como se describió anteriormente se etiquetó como SC. Para el caso de las capas modificadas con grupos orgánicos (R) se etiquetaron empleando el término xR, siendo x la fracción molar de precursor orgánico ($\text{R-Si}(\text{EtO})_3$) en la mezcla inicial (expresada como %) y R un identificador del grupo orgánico empleado y sustituido por : M para $\text{R} = -\text{CH}_3$

(metilo); P para R= $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (propilo); I para R= $-\text{CH}(\text{CH}_3)_3$ (isobutilo); O para R= $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ (octilo); y F para R= $-\text{C}_6\text{H}_5$ (fenilo). En general, una película de sílice xR se representa con la fórmula $\text{SiO}_{(2-0.5x)}\text{R}_x$, sustituyendo x por el valor correspondiente para cada concentración se obtiene la composición teórica del gel, tal como se muestra en la tabla. Así por ejemplo, la sílice etiquetada como 5I correspondería a una capa sintetizada a partir de una disolución precursora en la que el 5% de los moles de precursor son de isobutil-trietoxisilano y el 95% restante de tetraetoxisilano ($\text{Si}(\text{EtO})_4$).

Tabla 5.1. Fracción molar expresada como moles de precursor orgánico de silicio entre moles totales de precursor de silicio en las disoluciones precursoras de sílice modificada orgánicamente, xR (moles totales de silicio=0.0269).

Fracción molar R-Si(EtO) ₃ /moles Si totales	Composición teórica del gel	Acrónimo
0	SiO ₂	SC
0.01	SiO _{1.995} R _{0.01}	1R
0.05	SiO _{1.975} R _{0.05}	5R
0.10	SiO _{1.95} R _{0.1}	10R
0.20	SiO _{1.9} R _{0.2}	20R

Los experimentos voltamperométricos fueron realizados en una celda electroquímica de vidrio convencional como la mostrada en el capítulo 2. Como contra-electrodo se utilizó un hilo de platino y como electrodo de referencia un electrodo reversible de hidrógeno.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Comportamiento electroquímico de dopamina, norepinefrina y epinefrina

Como ya se describió anteriormente, las catecolaminas reaccionan electroquímicamente con un mecanismo tipo ECE: una primera etapa electroquímica de transferencia electrónica (E) seguida de una etapa química (C) y a continuación, tiene lugar una reacción electroquímica (E).

En la figura 5.2 se muestra el voltamperograma cíclico estabilizado para un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución que contiene 1 mM DA en PBS (pH 7), se observa que hacia valores positivos de potencial aparece un pico a +0.84 V ($I=24.07 \mu\text{A}$), correspondiente a la oxidación de dopamina a dopamina-o-quinona (DAQ), el pico correspondiente a la reducción de esta especie se observa a +0.70 V durante el barrido inverso ($I=16.89 \mu\text{A}$). La diferencia entre la intensidad del pico de oxidación y reducción ($\sim 7 \mu\text{A}$) se puede deber a la formación del leucodopaminocromo [196]. La separación de picos ($\Delta E_p = E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}$) observada es de 140 mV y el valor de potencial formal ($E^{0'}$) del par redox es de 0.76 V.

La dopamina-o-quinona sufre una reacción de ciclación química dando lugar a dopaminocromo. Los procesos redox correspondientes a la transición dopaminocromo/leucodopaminocromo aparecen a potenciales menores de +0.4 V, como puede observarse en la figura 5.2, aparece un pico de reducción a +0.34 V ($I=9.26 \mu\text{A}$) correspondiente a la reducción de dopaminocromo a leucodopaminocromo. El contraproceto se observa a +0.4 V ($I=9.72 \mu\text{A}$). En este proceso la separación de picos es de 80 mV y el $E^{0'}=0.36 \text{ V}$.

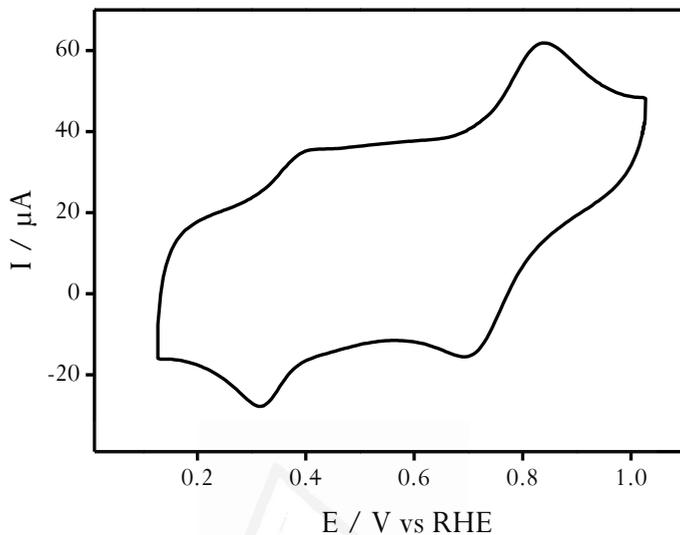


Figura 5.2. Voltamperograma cíclico estabilizado de un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución 1 mM DA en PBS (pH 7). Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

En la figura 5.3 se muestra la respuesta voltamperométrica para un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución 1 mM de norepinefrina en PBS (pH 7). Se observan dos procesos redox. El pico que aparece a $+0.77 \text{ V}$ ($I=17.49 \text{ }\mu\text{A}$) y su contraprocés observado en el barrido inverso a $+0.7 \text{ V}$ ($I=11.29 \text{ }\mu\text{A}$); con una separación de picos de 70 mV y $E^{0'}=0.74\text{V}$, se relacionan con la oxidación-reducción de norepinefrina a norepinefrina-o-quinona. A valores menores de potencial se observa el otro proceso redox, a $+0.36 \text{ V}$ se observa un pico de reducción ($I=13.12 \text{ }\mu\text{A}$) y en el barrido inverso se observa el contraprocés a $+0.42 \text{ V}$ ($I=13.48 \text{ }\mu\text{A}$). Para este par redox la separación de picos es de 60 mV y el $E^{0'}=0.38 \text{ V}$

Se observa que la respuesta electroquímica de la norepinefrina es casi idéntica a la de la dopamina (figura 5.2), los procesos redox implicados aparecen

a potenciales con valores similares, ya que ambas moléculas siguen un mecanismo de tipo ECE similar [178,196,225]. Sin embargo, la intensidad de los picos es diferente, para los picos correspondientes a la oxidación-reducción de la catecolamina a catecolamina-o-quinona son ligeramente más intensos para dopamina que para norepinefrina; pero para los picos correspondientes a la oxidación-reducción de leucoaminocromo a aminocromo son ligeramente más intensos para norepinefrina que para dopamina, es decir, en el caso de la norepinefrina se observa una mayor formación del producto ciclado.

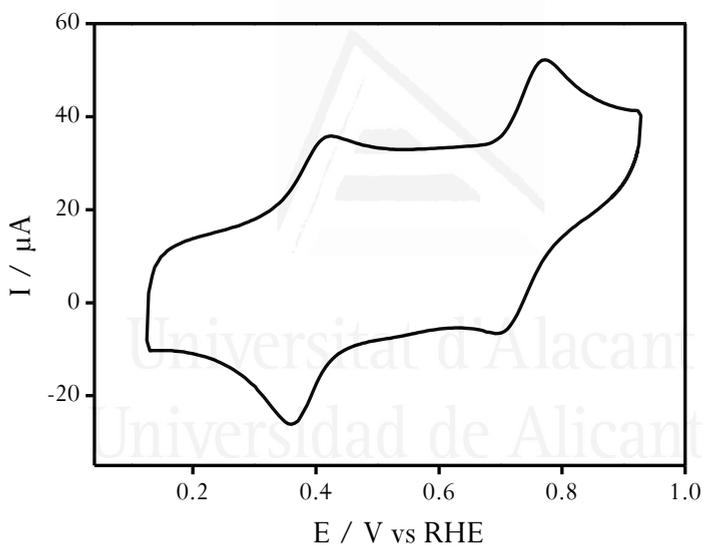


Figura 5.3. Voltamperograma cíclico estabilizado de un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución 1 mM NE en PBS (pH 7). Velocidad de barrido $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Esto puede ser debido a que los valores de pK_a para ambos neurotransmisores son diferentes, siendo 10.63 para dopamina y 9.78 para norepinefrina [226], es decir, en la norepinefrina, al estar más desprotonada que

dopamina, está favorecida la formación de la especie ciclada, véase esquema 5.1, etapa (A).

En la figura 5.4 se muestra el voltamperograma estabilizado para un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución que contiene 1 mM de epinefrina en PBS (pH 7), puede observarse que ésta, al igual que la dopamina y la norepinefrina, reacciona electroquímicamente siguiendo un mecanismo tipo ECE. Hacia valores positivos de potencial se observa un pico a +0.80 V ($I=20.40 \mu\text{A}$) correspondiente con la oxidación de la epinefrina a epinefrina-o-quinona, el pico correspondiente a la reducción de esta especie se observa a +0.73 V durante el barrido inverso ($I=5.46 \mu\text{A}$). La diferencia entre la intensidad del pico de oxidación y reducción es aproximadamente de $15 \mu\text{A}$ y podría estar relacionada con la formación de la especie ciclada. Para este par redox la separación de picos es de 70 mV y el valor de $E^{0'}$ es de 0.77 V. La epinefrina-o-quinona sufre una reacción de ciclación química dando lugar a epinefrinacromo. La oxidación de esta especie se observa a +0.41 V ($I=20.04 \mu\text{A}$) y la reducción a leuco-epinefrinacromo a +0.36 V ($I=26.14 \mu\text{A}$). La separación de picos en este caso es de 50 mV y el $E^{0'}=0.39 \text{ V}$.

La tabla 5.2 resume todos los valores obtenidos en estos voltamperogramas para los 3 neurotransmisores, en ella podemos ver la dificultad de separar la detección de los diferentes NT con un electrodo convencional de carbón vítreo.

Tabla 5.2. Valores de potencial e intensidad de oxidación y reducción, separación de picos y potencial formal para dopamina, norepinefrina y epinefrina con un electrodo de carbón vítreo.

NT	E_{ox}/V	E_{red}/V	$I_{ox}/\mu A$	$I_{red}/\mu A$	$\Delta E_p/mV$	E^0/V
Primer proceso						
DA	0.40	0.34	9.7	9.3	80	0.36
NE	0.42	0.36	13.5	13.1	60	0.38
EP	0.41	0.36	20.0	26.1	50	0.39
Segundo proceso						
DA	0.84	0.70	24.1	16.9	140	0.76
NE	0.77	0.70	17.5	11.3	70	0.74
EP	0.80	0.73	20.4	5.5	70	0.77

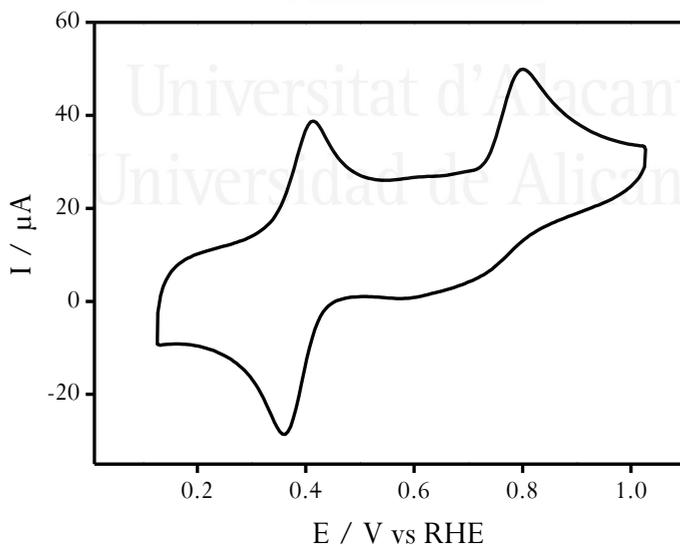


Figura 5.4. Voltamperograma cíclico estabilizado de un electrodo de carbón vítreo inmerso en una disolución 1 mM EP en PBS (pH 7). Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

La epinefrina sigue el mismo mecanismo tipo ECE que dopamina y norepinefrina y su respuesta electroquímica es por tanto similar. Pero se observan diferencias en la intensidad de los picos, si comparamos la intensidad del pico correspondiente a la oxidación de catecolamina a catecolamina-o-quinona con la intensidad del contraprocés se observa que para epinefrina se obtienen valores de intensidad bastante diferentes para estos procesos, siendo mayor la intensidad de pico correspondiente a la oxidación. Si observamos la intensidad de pico para el proceso redox correspondiente a la oxidación-reducción de leucoaminocromo a aminocromo se observan valores de intensidad mayores para epinefrina; esto quiere decir que en la epinefrina se observa más producto ciclado que en norepinefrina y dopamina (tabla 5.2).

Este hecho podría relacionarse con los valores de pKa, que para epinefrina es de 9.90 [226], pero de ser así la respuesta sería más parecida a la de la norepinefrina (pKa 9.78) ya que ambas moléculas están igualmente desprotonadas. Sin embargo, Wightman y colaboradores [226] calcularon los valores de la constante de velocidad de ciclación, k_c , utilizando la ecuación 5.1, para los distintos neurotransmisores en la etapa química del mecanismo, obteniendo valores de 0.49 s^{-1} para norepinefrina y 44 s^{-1} para epinefrina, es decir, la formación de leucoaminocromo para epinefrina es mucho más rápida que para norepinefrina. Por tanto, la diferencia ha de estar relacionada con la velocidad del ataque nucleófilo (esquema 5.1B). Según Hawley [196] el valor de k_2 para epinefrina es 3 órdenes de magnitud mayor que para norepinefrina.

5.3.2 Estudio de la afinidad de electrodos modificados con sílice para distintos neurotransmisores

Los electrodos utilizados en este epígrafe fueron modificados con sílice, tal y como se explica en el epígrafe 5.2, y se estudió su afinidad por los distintos neurotransmisores. Una vez depositada la capa de sílice, el electrodo se enjuagó con abundante agua ultrapura y a continuación se introdujo en una disolución del neurotransmisor correspondiente durante un periodo de tiempo. Transcurrido este tiempo se volvió a enjuagar el electrodo y se introdujo en una celda electroquímica de vidrio convencional como la mostrada en el capítulo 2 (experimental) que contenía una disolución blanco (0.09 L) de PBS (pH 7). Se permite la desorción del neurotransmisor atrapado en los poros de la sílice, mientras registramos voltamperogramas sucesivos. Tal y como se muestra en el en la figura 5.5.

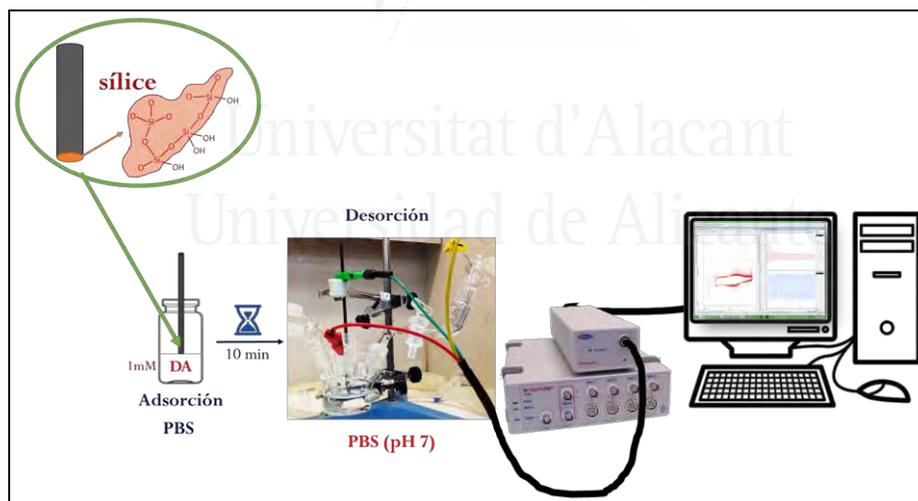


Figura 5.5. Esquema del procedimiento de experimental para el estudio de la afinidad de los distintos electrodos hacia los neurotransmisores.

En el caso de la dopamina, en la figura 5.6 se muestran los voltamperogramas sucesivos para un electrodo de carbón vítreo modificado con sílice convencional (SC) inmerso en una disolución PBS (pH 7) que previamente había estado sumergido en una disolución que contenía 1 mM DA en PBS (pH 7) durante 10 minutos. En la figura 5.6 hacia valores positivos de potencial se observa una corriente anódica alrededor de +0.8 V correspondiente a la oxidación de dopamina atrapada en los poros de sílice. Hacia valores menos positivos de potencial se observa el contraproceto a +0.6 V. Puede observarse que la intensidad del pico correspondiente a la oxidación de la dopamina atrapada, va disminuyendo conforme aumenta el número de ciclos hasta alcanzar un valor estable de intensidad.

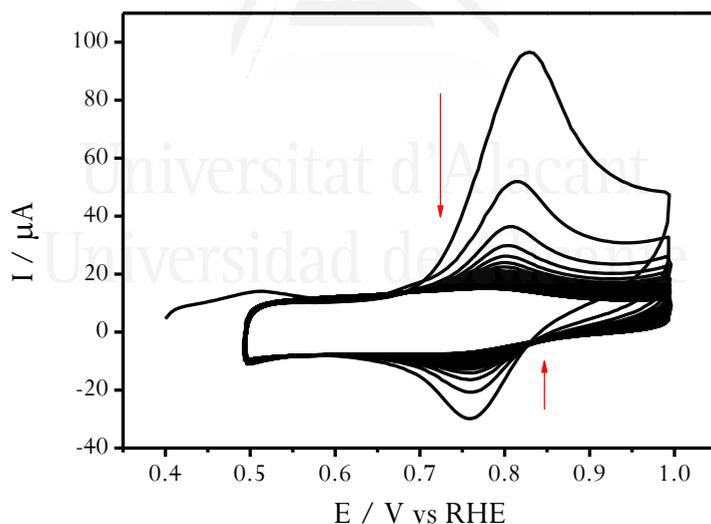


Figura 5.6. Voltamperogramas cíclicos sucesivos para un electrodo modificado con sílice convencional (SC) inmerso en una disolución PBS (pH 7) tras la adsorción de 1 mM dopamina durante 10 minutos. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Se observa que en los ciclos sucesivos la intensidad de pico va disminuyendo hasta llegar a un valor constante prácticamente nulo para 35 ciclos. Si representamos la densidad de corriente, j ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), del pico de oxidación (solo corriente farádica) frente al tiempo, obtenemos una curva que se muestra en la figura 5.7A.

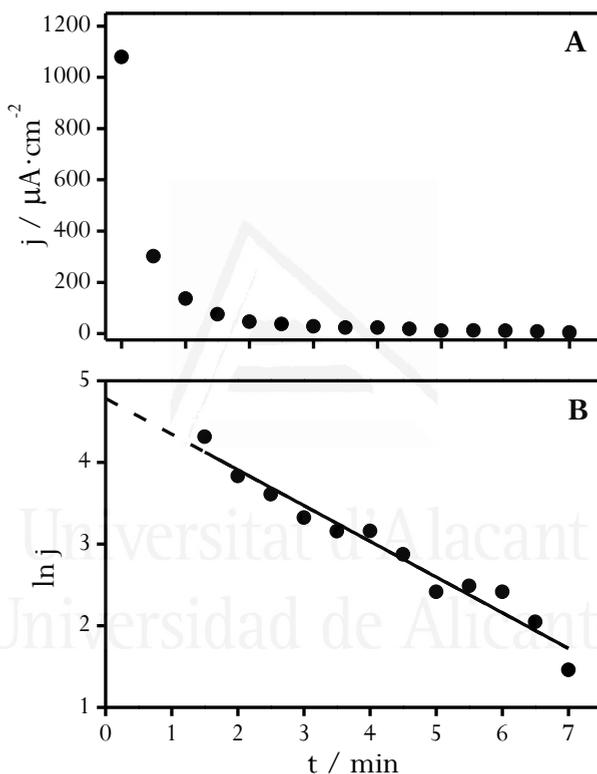


Figura 5.7. (A) Curva de desorción y (B) ajuste de primer orden de los datos de desorción de dopamina atrapada en un electrodo modificado con sílice convencional (SC) que ha sido incubado en una disolución de adsorción $[DA]_{dn}=1$ mM (pH 7) durante 10 minutos.

El descenso de la densidad de corriente puede ajustarse a una curva de decaimiento del tipo:

$$j = j_0 e^{-kt} \quad (5.2)$$

siendo j_0 la densidad de corriente del pico para $t=0$ s. La representación logarítmica se muestra en la figura 5.7B.

El valor j_0 se puede relacionar con la concentración de especie electroactiva atrapada en la sílice, $[NT]_0^{SC}$, empleando la ecuación de Randles-Sevcik [65], aplicable a procesos reversibles en disolución:

$$j_0 = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} D_0^{1/2} [NT]_0^{SC} v^{1/2} \quad (5.3)$$

donde, j_0 es la densidad de corriente ($A \cdot cm^{-2}$) del pico de oxidación de la especie electroactiva,

n es el número de electrones implicados en el proceso,

D_0 es el coeficiente de difusión del neurotransmisor ($cm^2 \cdot s^{-1}$),

v es la velocidad de barrido ($V \cdot s^{-1}$),

$[NT]_0^{SC}$ es la concentración de la especie electroactiva expresada en $mol \cdot cm^{-3}$ y relacionada con la afinidad de la capa de sílice para el neurotransmisor.

Considerando para dopamina $n=2$, $D_0=6 \cdot 10^{-6} cm^2 \cdot s^{-1}$ [141] y $v=0.1 V \cdot s^{-1}$ se va a determinar la concentración aparente de dopamina en la cercanía de la superficie del electrodo de carbón vítreo al inicio del experimento, $[DA]_0^{SC}$ y adsorbida en la capa de sílice.

En este caso concreto, para la dopamina, $[DA]_0^{SC}$, es 82.8 mM, es decir, la concentración aparente medida en la capa de sílice es 82.8 veces mayor que la concentración de dopamina en la disolución de adsorción ($[DA]_{dn}$).

Con el objetivo de optimizar los experimentos se han estudiado dos variables para el proceso de adsorción: el tiempo de adsorción y la concentración de neurotransmisor.

Para determinar el tiempo óptimo de incubación éste se varió desde 30 s hasta 120 min usando la misma concentración $[DA]_{dn}$ (1 mM) y mediante voltamperometría cíclica se registró la corriente de oxidación, que hemos relacionado con la concentración de neurotransmisor en la capa de sílice. En la figura 5.8 se muestra la variación de concentración de dopamina atrapada en los poros de sílice, $[DA]_0^{SC}$, en función del tiempo de adsorción en escala logarítmica. Se observa que para un tiempo de 0 a 10 minutos la cantidad de dopamina atrapada aumenta hasta alcanzar un valor constante; podemos considerar que a este tiempo de 10 minutos se ha alcanzado un equilibrio de adsorción.

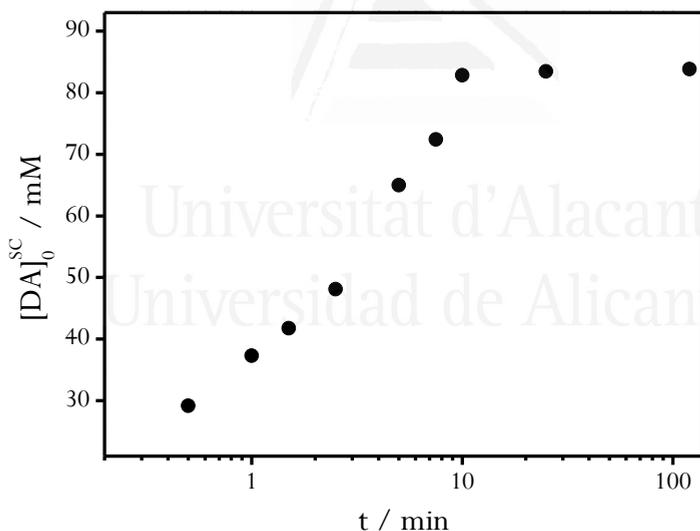


Figura 5.8. Variación de la concentración de DA atrapada, $[DA]_0^{SC}$, en función del tiempo de incubación (1 mM DA en PBS (pH 7)) para un electrodo modificado con sílice convencional (SC).

La otra variable a tener en cuenta durante la incubación es la concentración de neurotransmisor que se emplea, $[DA]_{dn}$. Para ello, se realizará el experimento de adsorción manteniendo constante el tiempo de adsorción y variando la concentración de neurotransmisor. La figura 5.9 muestra el valor de $[DA]_0^{SC}$ en función de la concentración en la disolución de adsorción. Puesto que el tamaño del electrodo es muy pequeño (0.07 cm^2) en comparación con el volumen de la disolución de adsorción (15 mL) podemos considerar que esta concentración no cambia de forma importante por la adsorción en la sílice y podemos considerarla como la concentración en el equilibrio.

Por tanto, la figura 5.9 equivale a una isoterma de adsorción sólido-líquido de dopamina en los poros de sílice ($[DA]_0^{SC}$) realizada a temperatura ambiente (25°C). Teniendo en cuenta la clasificación de isotermas realizada por Giles y colaboradores [221] y expuesta en la introducción de este capítulo, la figura 5.9 se corresponde con una isoterma de tipo L perteneciente al subgrupo 4. Esto significa que cuantos más sitios de la sílice estén ocupados por dopamina más difícil es para ésta encontrar sitios libres donde adsorberse.

Para valores de $[DA]_{dn}$ comprendidos entre 100 y 200 μM se observa una meseta, la aparición de mesetas, y en consecuencia la existencia de un punto de inflexión, está relacionada con la formación de una monocapa. Esta monocapa podría contener disolvente, así como moléculas de soluto, en este caso dopamina. Si seguimos aumentando la $[DA]_{dn}$ observamos una segunda subida en el valor de $[DA]_0^{SC}$, esto es atribuido a que se ha desarrollado una parte de superficie donde se puede producir una nueva adsorción, la segunda meseta observada en torno a 800 μM representa la saturación de la nueva superficie

accesible. También, una segunda meseta puede relacionarse con la formación de una segunda capa formada en la parte superior de la primera.

Para $[DA]_{dn} > 800 \mu\text{M}$ se obtiene un valor máximo y constante de cantidad de dopamina adsorbida en los poros de sílice ($[DA]_0^{SC}$).

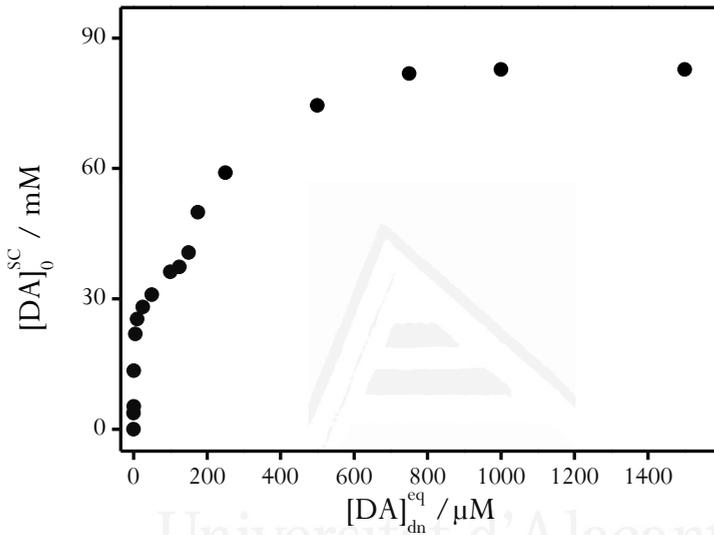


Figura 5.9. Curva de adsorción para un electrodo modificado con sílice convencional para distintas concentraciones de incubación de dopamina ($[DA]_{dn}$) en PBS (pH 7) durante 10 minutos a 25°C.

La forma de la isoterma de adsorción, figura 5.9, se atribuye a una adsorción multicapa, por esto se ha ajustado, utilizando la ecuación 5.4, a una isoterma tipo BET para adsorciones en fase líquida propuesta por Ebadi y colaboradores [227]:

$$[NT]_0^{SC} = [NT]_m \frac{K_S [NT]_{dn}}{(1 - K_L [NT]_{dn})(1 - K_L [NT]_{dn} + K_S [NT]_{dn})} \quad (5.4)$$

siendo $[NT]_m$ la cantidad de neurotransmisor adsorbida correspondiente a la monocapa, expresada en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,

K_S , la constante de equilibrio de adsorción de la primera capa, expresada en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$,

K_L , la constante de equilibrio de adsorción de las siguientes capas, expresada en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Para dopamina los parámetros calculados para la isoterma de adsorción en sílice convencional usando el modelo BET en fase líquida son los siguientes: la cantidad de dopamina adsorbida correspondiente a la monocapa, $[DA]_m$ es de 30.34 mM; la constante de equilibrio de adsorción de la monocapa, K_S , es de $0.54 \mu\text{M}^{-1}$ y la constante de equilibrio de adsorción de la multicapa, K_L , es de $1.37\cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$. La constante de adsorción de la monocapa es 2 órdenes de magnitud mayor que la constante de adsorción de la multicapa, es decir, la dopamina tiene más afinidad por la sílice que por la monocapa de dopamina adsorbida sobre ésta.

Este mismo estudio se realizó para norepinefrina. En la figura 5.10 se muestran los voltamperogramas sucesivos para un electrodo de carbón vítreo modificado con sílice convencional inmerso en una solución PBS (pH 7) tras la adsorción durante 10 minutos en 1 mM de norepinefrina (NE) en PBS (pH 7). Se observa que al aumentar el número de ciclos la intensidad del pico disminuye hasta llegar a un valor constante. Este pico corresponde a la oxidación de norepinefrina atrapada en los poros de sílice.

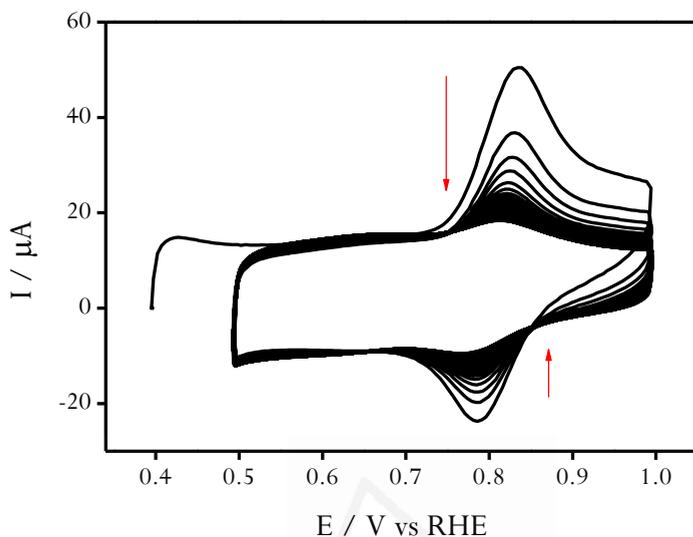


Figura 5.10. Voltamperogramas cíclicos sucesivos para un electrodo modificado con sílice convencional (SC) inmerso durante 10 minutos en una disolución PBS (pH 7) tras la adsorción de 1 mM de norepinefrina. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Si representamos la densidad de corriente, j ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), del pico de oxidación frente al tiempo, obtenemos una curva que se muestra en la figura 5.11A. Se observa un comportamiento similar al observado con la dopamina. En la figura 5.11B se muestra la representación logarítmica, con el ajuste de esta gráfica y la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 5.3), podemos calcular la concentración de norepinefrina en el gel, $[\text{NE}]_0^{\text{SC}}$ que es de 74.7 mM.

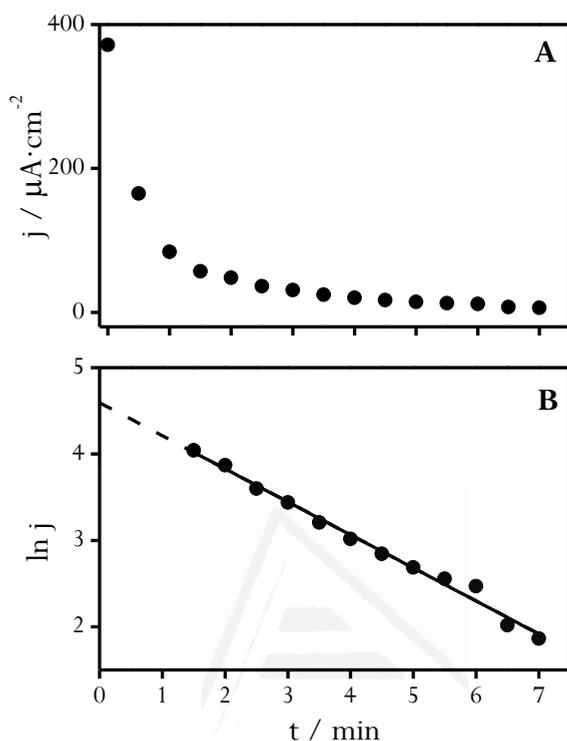


Figura 5.11. (A) Curva de desorción de norepinefrina atrapada en un electrodo modificado con sílice convencional (SC). (B) Ajuste de primer orden para un electrodo modificado con sílice convencional (SC) que ha sido incubado en una disolución 1 mM NE (pH 7) durante 10 minutos.

De igual forma que para dopamina, con este neurotransmisor también se determinó el tiempo óptimo de incubación manteniendo constante la concentración de neurotransmisor (1 mM) en la disolución de incubación. En la figura 5.12 se muestra la variación de cantidad de norepinefrina atrapada en los poros de sílice, $[NE]_0^{SC}$, en función del tiempo de adsorción expresado en escala logarítmica.

Se observa que para tiempos menores de 2 minutos la cantidad de norepinefrina adsorbida en sílice es nula. Para periodos de adsorción entre 2 y 10 minutos se observa que la cantidad de NE atrapada aumenta. Para tiempos de superiores a 10 minutos se llega a la saturación de la capa de sílice. Podemos ver que 10 minutos es suficiente para alcanzar el equilibrio.

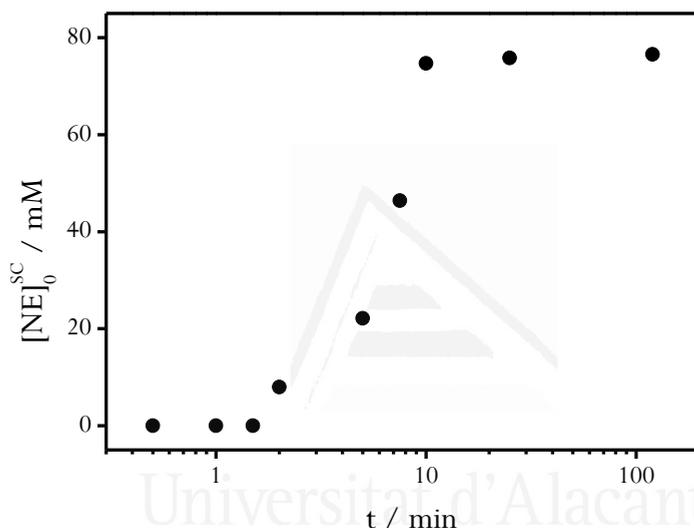


Figura 5.12. Variación de la concentración de NE atrapada, $[NE]_0^{SC}$, en función del tiempo de incubación (1 mM NE en PBS (pH 7)) para un electrodo modificado con sílice convencional (SC).

De forma similar a la dopamina, estudiamos el proceso de adsorción sumergiendo un electrodo modificado con sílice convencional (SC) en disoluciones que contienen distinta concentración de norepinefrina, $[NE]_{dn}$, manteniendo constante el tiempo de adsorción en 10 minutos; obtenemos una curva como la que se muestra en la figura 5.13. La forma de la curva es similar a la obtenida para dopamina (figura 5.9), se trata también de una isoterma tipo L

del subgrupo 4. Para valores de $[NE]_{dn}$ comprendidos entre 70 y 130 μM se observa una meseta, lo que nos indica la formación de una monocapa. Si seguimos aumentando la $[NE]_{dn}$ observamos que la cantidad de norepinefrina atrapada por la sílice, $[NE]_0^{SC}$, aumenta, es decir, se sigue adsorbiendo hasta llegar de nuevo a otra meseta para un valor de $[NE]_{dn}$ de 1 mM.

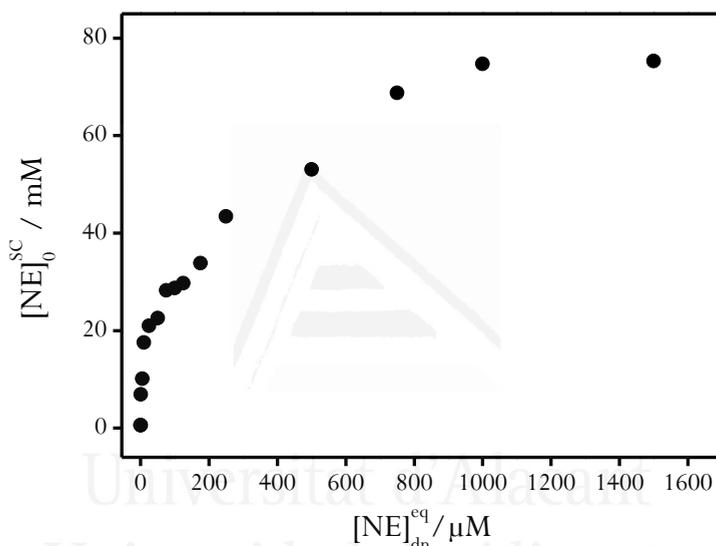


Figura 5.13. Curva de adsorción para un electrodo modificado con sílice convencional para distintas concentraciones de adsorción de norepinefrina ($[NE]_{dn}$) en PBS (pH 7) durante 10 minutos a 25°C.

La forma de la isoterma de adsorción, figura 5.14, se atribuye a una adsorción multicapa, por esto se ha ajustado utilizando el modelo BET para adsorción en fase líquida (ecuación 5.4). Los parámetros calculados para la isoterma de adsorción de NE en sílice convencional se presentan en la tabla 5.3.

Se observa que la cantidad de neurotransmisor adsorbido en la monocapa es ligeramente mayor para dopamina (30.3 mM) que para norepinefrina. Y los

valores de la constante de equilibrio de adsorción para la monocapa (K_S) y multicapa (K_L) también son mayores para dopamina que para norepinefrina.

Experimentos similares fueron realizados para epinefrina. En la figura 5.14 se muestran los voltamperogramas sucesivos para un electrodo modificado con sílice convencional previamente sumergido en una disolución 1 mM de epinefrina en PBS (pH 7) durante 10 minutos. Se observa que, igual que ocurría con la dopamina y norepinefrina (figuras 5.6 y 5.10), la intensidad del pico de oxidación del neurotransmisor atrapado va disminuyendo conforme aumenta el número de ciclos.

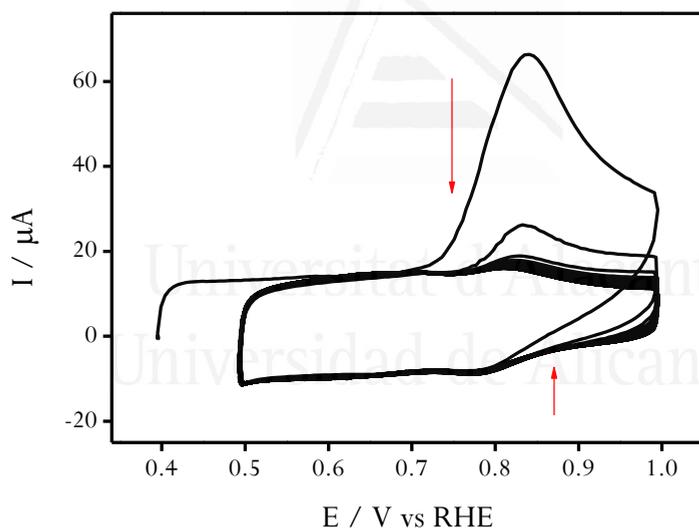


Figura 5.14. Voltamperogramas cíclicos sucesivos para un electrodo modificado con sílice convencional (SC) inmerso durante 10 minutos en una disolución PBS (pH 7) tras la adsorción de 1 mM de epinefrina. Velocidad de barrido $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

En la figura 5.15A se muestra la relación entre la densidad de corriente, j ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$), del pico de oxidación frente al tiempo. En la figura 5.15B se muestra

la representación logarítmica usando la ecuación 5.2, de los datos de la curva mostrada en (A). Con la ordenada en el origen ($\ln j_0$) y usando la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 5.3), podemos calcular la concentración de epinefrina atrapada en el gel, $[EP]_0^{SC}$, y relacionar esta concentración con la afinidad de la capa de sílice para este neurotransmisor. En este caso se obtiene un valor de $[EP]_0^{SC}$ de 16.7 mM.

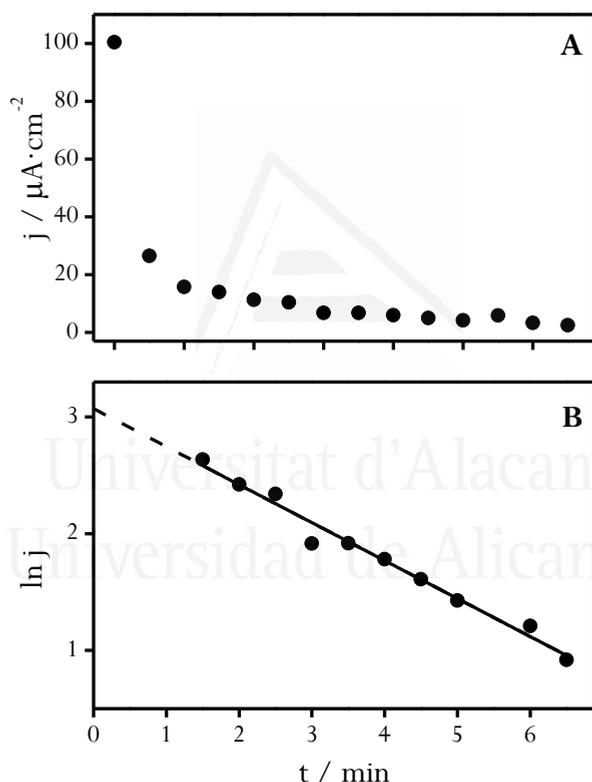


Figura 5.15. (A) Curva de desorción de epinefrina atrapada en un electrodo modificado con sílice convencional (SC). (B) Ajuste de primer orden para un electrodo modificado con sílice convencional (SC) que ha sido incubado en una disolución 1 mM EP (pH 7) durante 10 minutos.

Al igual que para dopamina y norepinefrina, variando el tiempo de incubación desde 30 s hasta 120 min y manteniendo constante la concentración de neurotransmisor (1 mM) en la disolución de incubación se estudió el tiempo óptimo de adsorción, resultados que se muestran en la figura 5.16. Se observa que el tiempo mínimo necesario de incubación para que la epinefrina quede atrapada en los poros de la sílice es de 3 minutos, mayor que para DA y NE. Para valores de tiempo mayores la cantidad de epinefrina atrapada va aumentando hasta que para valores de tiempo mayores de 10 minutos se alcanza un valor constante de $[EP]_0^{SC}$.

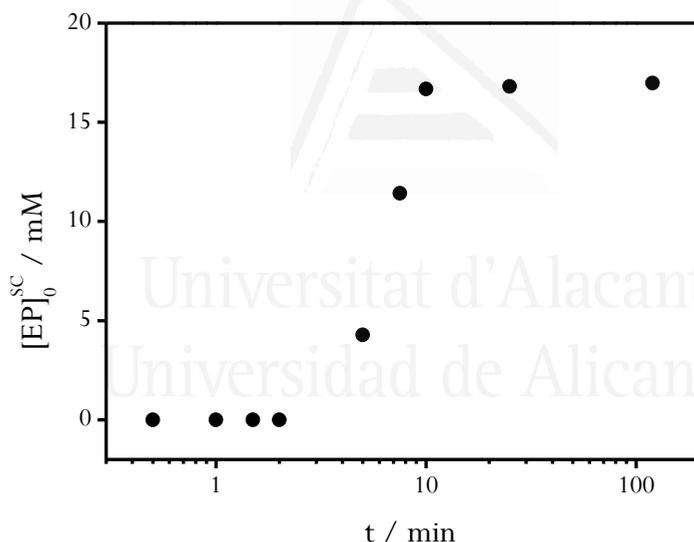


Figura 5.16. Variación de la concentración de EP atrapada, $[EP]_0^{SC}$, en función del tiempo de incubación (1 mM EP en PBS (pH 7)) para un electrodo modificado con sílice convencional (SC).

Si sumergimos un electrodo modificado con sílice convencional (SC) durante 10 minutos en disoluciones que contienen distinta concentración de

epinefrina, $[EP]_{dn}$, obtenemos la curva mostrada en la figura 5.17, es decir, la isoterma de adsorción de epinefrina en sílice. La forma de la curva es igual que la obtenida para dopamina (figura 5.9) y norepinefrina (figura 5.13). En este caso se trata también de una isoterma tipo L o tipo Langmuir del subgrupo 4 (figura 5.1) aunque en este caso la primera meseta no se observa tan claramente, pero se puede considerar que entre 70 y 125 μM se observa la formación de una monocapa y para $[EP]_{dn} > 1000 \mu\text{M}$ se obtiene una segunda meseta.

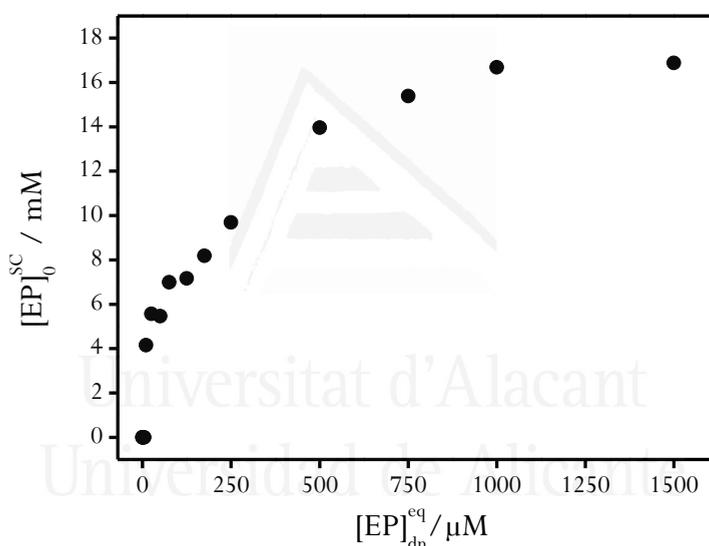


Figura 5.17. Curva de adsorción para un electrodo modificado con sílice convencional para distintas concentraciones de incubación de epinefrina ($[EP]_{dn}$) en PBS (pH 7) durante 10 minutos a 25°C.

La forma de la isoterma de adsorción de epinefrina en sílice convencional mostrada en la figura 5.17, se atribuye a una adsorción multicapa, por esto, al igual que para los demás neurotransmisores se ha ajustado, utilizando la ecuación

5.4. Los valores del ajuste de la isoterma de epinefrina se muestran en la tabla 5.3.

En la tabla 5.3 se muestran los valores de los parámetros calculados para las isotermas de adsorción de DA, NE y EP en sílice convencional usando el modelo BET para adsorción en fase líquida.

Se observa que en relación a dopamina y norepinefrina el valor de neurotransmisor adsorbido en la monocapa, $[NT]_m$, es bastante más bajo para epinefrina. De igual forma las constantes de equilibrio de adsorción tanto para la monocapa (K_S) como para la multicapa (K_L) también son menores para epinefrina, es decir, la dopamina se adsorbe más en sílice convencional que la norepinefrina y ésta más que la epinefrina. El valor de la constante K_S puede considerarse como la constante de interacción entre la molécula adsorbida y el adsorbente. Esta constante es mucho mayor para la dopamina y norepinefrina que para la epinefrina. Esto puede ser debido a su estructura química, la diferencia entre dopamina y norepinefrina es que ésta última tiene un grupo OH, mientras que epinefrina, además de ese grupo OH, también tiene un grupo CH₃. La constante K_L está relacionada con la interacción entre las moléculas adsorbidas y podemos ver que los valores obtenidos son muy parecidos para los 3 neurotransmisores.

Tabla 5.3. Parámetros calculados para las isotermas de adsorción de DA, NE y EP en sílice convencional usando el modelo BET para adsorción en fase líquida y $[NT]_{dn}$ constante (1mM).

Parámetro	Dopamina	Norepinefrina	Epinefrina
$[NT]_m / \text{mM}$	30.3	25.9	8.1
$K_S / \mu\text{M}^{-1}$	0.54	0.17	0.06
$K_L / \mu\text{M}^{-1}$	$1.37 \cdot 10^{-3}$	$8.13 \cdot 10^{-4}$	$1.45 \cdot 10^{-4}$

Con el fin de comparar el comportamiento de los 3 neurotransmisores con distintas matrices de sílice hemos establecido un tiempo de incubación de 10 minutos y una $[NT]_{dn}$ de 1 mM. Del cociente entre el valor de concentración aparente calculada, $[NT]_0^{SC}$, y la concentración de neurotransmisor en la disolución de incubación $[NT]_{dn}$, obtenemos la constante de reparto, que hemos denominado constante de afinidad, K^{SC} (ecuación 5.5):

$$K^{SC} = \frac{[NT]_0^{SC}}{[NT]_{dn}} \quad (5.5)$$

En la tabla 5.4 se muestran los valores de constante de afinidad, K^{SC} , para los tres neurotransmisores estudiados usando un electrodo modificado con sílice convencional (SC) en las condiciones antes descritas. Se observa que la sílice convencional presenta buena afinidad, los valores de K^{SC} son mayores que 1 por los 3 neurotransmisores. El valor más alto es para dopamina y el más bajo para epinefrina en concordancia con el valor obtenido para K_S de la isoterma utilizada.

Tabla 5.4. Valores de constante de afinidad, K^{SC} , de electrodos modificados con sílice convencional (SC) por los distintos neurotransmisores.

Neurotransmisor	K^{SC}
Dopamina	83
Norepinefrina	75
Epinefrina	17

5.3.3 Afinidad de sílice modificada orgánicamente por dopamina

Los electrodos utilizados en este epígrafe fueron modificados con sílice modificada orgánicamente (xR) tal y como se explica en el epígrafe 5.2.

En la figura 5.18 se muestran los voltamperogramas cíclicos sucesivos tras la adsorción en una disolución 1 mM DA en PBS (pH 7) de electrodos modificados con sílice modificada usando el 1% de distintos grupos orgánicos: metilo (1M, azul), propilo (1P, rojo), isobutilo (1I, verde), octilo (1O, naranja) y fenilo (1F, violeta). Como se observa, para los cinco electrodos, al aumentar el número de ciclos la intensidad de pico, correspondiente a la DA atrapada en los poros, va disminuyendo hasta llegar a un valor estable.

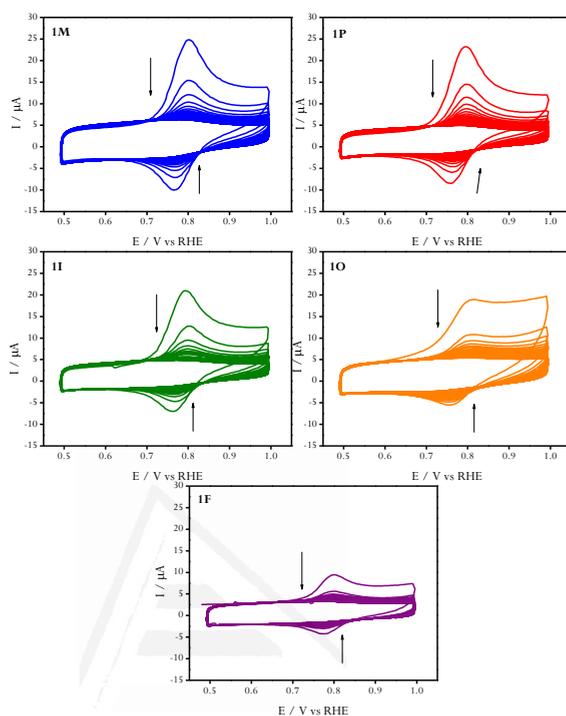


Figura 5.18. Voltamperogramas cíclicos sucesivos para un electrodo modificado con sílice modificada usando el 1% de grupo orgánico: metilo (1M, azul), propilo (1P, rojo), isobutilo (1I, verde), octilo (1O, naranja) y fenilo (1F, violeta), inmersos en una disolución PBS (pH 7) tras la adsorción de 1 mM dopamina durante 10 minutos. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tal y como se mostró anteriormente, para cada electrodo se calculó la concentración aparente de dopamina atrapada en cada gel mediante la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 5.3) que para las sílices modificadas orgánicamente hemos definido como $[NT]_0^{xR}$. De igual forma que con sílice convencional se puede determinar una constante de afinidad (ecuación 5.5) para cada ORMOSIL y que aquí denominaremos K^{xR} .

En primer lugar se estudió el efecto de la naturaleza química del grupo orgánico en la afinidad por la dopamina. Para ello se prepararon distintas capas de ORMOSIL usando una concentración de grupo orgánico del 1%. Los valores de K^{xR} para estos electrodos se muestran en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Valores de constante de afinidad (K^{xR}) hacia dopamina de electrodos modificados con sílice convencional (SC) y sílice modificada orgánicamente con el 1% de los distintos grupos orgánicos (1R).

Electrodo	K^{xR}
SC	83
1M	145
1P	217
1I	231
1O	125
1F	91

Se observa que la sílice modificada con grupos orgánicos presenta valores de K^{xR} mayores que la sílice convencional.

Con el objetivo de poder evaluar cómo afecta a la afinidad el hecho de modificar la sílice con grupos orgánicos, definimos la afinidad relativa (A_r) como el cociente entre K^{xR} y K^{SC} para cada ORMOSIL, esto se corresponde con la relación de concentraciones aparentes del neurotransmisor en la capa de ORMOSIL y en la capa de sílice convencional puesto que la concentración del neurotransmisor en la disolución de adsorción es la misma (ecuación 5.6):

$$A_r = \frac{[NT]_0^{xR}}{[NT]_0^{SC}} = \frac{K^{xR}}{K^{SC}} \quad (5.6)$$

En la tabla 5.6 se muestran los valores de afinidad relativa para dopamina de los electrodos modificados con sílice xR; de esta manera, se ha evaluado el efecto que tiene la concentración de cada grupo orgánico (x, expresada en % molar teórico R en el gel) en la afinidad.

Tabla 5.6. Valores de afinidad relativa (A_r) para dopamina de sílice modificada con distintos grupos orgánicos (R=M, P, I, O y F) usando distintas concentraciones de éstos (x=1, 5, 10 y 20%).

x R	1	5	10	20
M	1.8	1.6	1.1	1.6
P	2.6	1.4	3.1	1.1
I	2.8	1.8	2.0	0.9
O	1.5	0.9	4.7	2.3
F	1.1	0.8	-*	1.1

*A pesar de que este gel adsorbe NT, éste se desorbe rápidamente, obteniéndose una gráfica de corriente frente al tiempo con muy pocos puntos y por tanto, no es posible la determinación de la concentración de NT adsorbido.

En la mayoría de los casos, en la tabla 5.6, se observa que, en general, los valores de A_r son mayores que 1, lo que quiere decir que la sílice convencional (SC) es menos afín por la dopamina que la sílice modificada orgánicamente (xR). Es decir, la concentración de dopamina en la capa de sílice es mayor para la sílice modificada orgánicamente.

Si nos fijamos en los valores obtenidos para sílice modificada con grupos metilo (xM) observamos que todos los valores son mayores o igual que 1. Al aumentar la concentración molar de metil-trietoxisilano en la disolución precursora del gel, la afinidad relativa no se ve muy afectada, salvo para concentración del 10% en el que se produce una disminución de este parámetro.

Para electrodos modificados con sílice modificada con grupos propilo (xP), para concentraciones del 1 y 10% se observa una afinidad bastante mayor que la observada con sílice convencional.

En el caso de sílice modificada con grupos isobutilo (xI) para un 20% de isobutil-trietoxisilano no se observa una mejora del parámetro de afinidad. Se obtiene el mismo valor de concentración de dopamina adsorbida que se obtenía para sílice convencional. Esto puede ser debido a que para concentraciones del 20% de grupo isobutilo se observó, en el capítulo 3, que existía una segregación de fases y los resultados obtenidos pueden no ser representativos. Para las otras concentraciones la afinidad de la sílice modificada es al menos el doble de la que presenta la sílice convencional por la dopamina.

Con electrodos modificados usando sílice modificada con grupos octilo (xO) se obtiene el valor más alto de afinidad para una concentración del 10% octil-trimetoxisilano en la disolución precursora, este gel es casi 5 veces más afín por la dopamina que la sílice convencional.

En el caso de sílice modificada con grupos fenilo (xF) no se consigue mejorar la afinidad de la sílice convencional.

En cualquier caso, los datos son bastante dispersos y no siguen tendencias claras.

5.3.4 Afinidad de sílice modificada orgánicamente por norepinefrina

En la figura 5.19 se muestran los voltamperogramas cíclicos sucesivos tras la adsorción en una disolución 1 mM NE en PBS (pH 7) de electrodos modificados con sílice modificada usando el 1% de distintos grupos orgánicos: metilo (1M, azul), propilo (1P, rojo), isobutilo (1I, verde), octilo (1O, naranja) y fenilo (1F, violeta). Como se observa, para los cinco electrodos, al aumentar

el número de ciclos la intensidad de pico, correspondiente a norepinefrina atrapada en la capa de sílice, va disminuyendo hasta llegar a un valor estable.

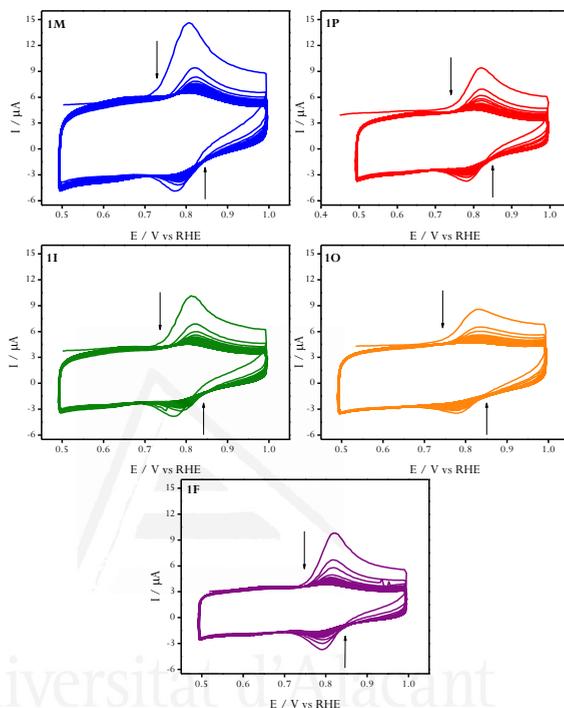


Figura 5.19. Voltamperogramas cíclicos sucesivos para un electrodo modificado con sílice modificada usando el 1% de grupo orgánico: metilo (1M, azul), propilo (1P, rojo), isobutilo (1I, verde), octilo (1O, naranja) y fenilo (1F, violeta), inmersos en una disolución PBS (pH 7) tras la adsorción de 1 mM norepinefrina durante 10 minutos. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tal y como se mostró en epígrafes anteriores, para cada electrodo se calculó la concentración aparente de norepinefrina atrapada en cada gel, $[NE]_0^{xR}$, mediante la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 5.3).

Al igual que se realizó para dopamina, para poder evaluar cómo influye a la afinidad la naturaleza del grupo orgánico en la afinidad por norepinefrina se calculó la constante K^{xR} para las distintas capas modificadas usando el 1% de los distintos grupos orgánicos en la disolución precursora. Los valores de K^{xR} para estos electrodos se muestran en la tabla 5.7. Se observa que cuando se modifica la sílice con grupos orgánicos se obtienen valores de K^{xR} menores que para la sílice convencional, es decir, la sílice SC presenta mayor afinidad por la norepinefrina que la sílice xR.

Tabla 5.7. Valores de constante de afinidad (K^{xR}) hacia norepinefrina de electrodos modificados con sílice convencional (SC) y sílice modificada orgánicamente con el 1% de los distintos grupos orgánicos (1R).

Electrodo	K^{xR}
SC	75
1M	49
1P	48
1I	69
1O	42
1F	59

Para norepinefrina también se ha calculado la afinidad relativa, A_r , para cada ORMOSIL con la ecuación 5.6; de esta manera, se ha evaluado el efecto que tiene la concentración de cada grupo orgánico (x , expresada en % molar teórico R en el gel) en la afinidad. Los valores de A_r se muestran en la tabla 5.8. Se observa que en todos los casos los valores de afinidad relativa son iguales o menores que 1, lo que quiere decir que la sílice convencional es más afín por norepinefrina que la sílice modificada con grupos orgánicos (xR). Si comparamos

los resultados obtenidos para dopamina, las diferencias observadas podrían estar relacionadas con el grupo OH que tiene la norepinefrina.

Tabla 5.8. Valores de afinidad relativa (A_r) para norepinefrina de sílice modificada con distintos grupos orgánicos (R=M, P, I, O y F) usando distintas concentraciones de éstos (x=1, 5, 10 y 20%).

x R	1	5	10	20
M	0.7	0.7	0.5	0.7
P	0.6	0.5	0.7	0.4
I	0.9	0.6	0.4	0.9
O	0.6	0.4	0.6	0.6
F	0.8	0.8	0.3	0.5

Si nos fijamos en los valores obtenidos para sílice modificada con grupos metilo (xM) observamos que los valores de afinidad relativa oscilan entre 0.5 y 0.7, la afinidad no se ve afectada al modificar la concentración de metil-trietoxisilano en la disolución precursora del gel.

Para electrodos modificados con sílice modificada con grupos propilo (xP) los valores de afinidad relativa oscilan entre 0.4 y 0.7 sin seguir una tendencia con la concentración de grupo orgánico.

En el caso de sílice modificada con grupos isobutilo (xI) se observa que, en general, al aumentar la concentración de isobutil-trietoxisilano en la disolución precursora del gel, la afinidad hacia la norepinefrina disminuye para un 10% de isobutilo.

Con electrodos modificados con sílice modificada con grupos octilo (xO) no se observa apenas cambio en la afinidad al modificar la concentración de grupo orgánico.

En el caso de sílice modificada con grupos fenilo (xF) se obtiene el valor más bajo de afinidad por norepinefrina para sílice modificada con el 10% de fenil-trietoxisilano en la disolución precursora.

5.3.5 Afinidad de sílice modificada orgánicamente por epinefrina

Para el estudio de la afinidad por epinefrina, se utilizaron los mismos electrodos que en epígrafes anteriores (5.3.3 y 5.3.4), sintetizados tal y como se explicó la parte experimental de este capítulo (epígrafe 5.2).

En la figura 5.20 se muestran los voltamperogramas cíclicos sucesivos tras la incubación en una disolución 1 mM de epinefrina en PBS (pH 7) de electrodos modificados con sílice modificada usando el 1% de distintos grupos orgánicos: metilo (1M, azul), propilo (1P, rojo), isobutilo (1I, verde), octilo (1O, naranja) y fenilo (1F, violeta). En todos los casos se aprecia que al aumentar el número de ciclos la intensidad de pico, correspondiente a la EP atrapada en la capa de sílice, va disminuyendo hasta llegar a un valor constante.

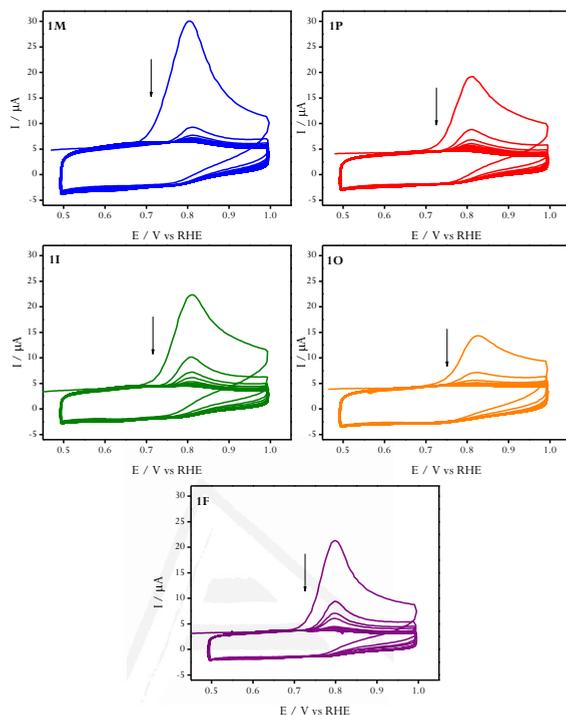


Figura 5.20. Voltamperogramas cíclicos sucesivos para un electrodo modificado con sílice modificada usando el 1% de grupo orgánico: metilo (1M, azul), propilo (1P, rojo), isobutilo (1I, verde), octilo (1O, naranja) y fenilo (1F, violeta), inmersos en una disolución PBS (pH 7) tras la adsorción de 1 mM epinefrina durante 10 minutos. Velocidad de barrido $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tal y como se mostró en epígrafes anteriores para dopamina y norepinefrina, para poder evaluar cómo influye a la afinidad la naturaleza del grupo orgánico en la afinidad por epinefrina se calculó la constante K^{xR} para las distintas capas modificadas usando el 1% de los distintos grupos orgánicos en la disolución precursora. Los valores de K^{xR} para estos electrodos se muestran en la tabla 5.9. Se observa que cuando se modifica la sílice con grupos orgánicos se

obtienen valores de K^{xR} mayores que para la sílice convencional, menos para la sílice modificada con grupos octilo, que a pesar de que este gel atrapa epinefrina, ésta se desorbe rápidamente y no es posible determinar la concentración de epinefrina adsorbida.

Tabla 5.9. Valores de constante de afinidad (K^{xR}) hacia epinefrina de electrodos modificados con sílice convencional (SC) y sílice modificada orgánicamente con el 1% de los distintos grupos orgánicos (1R).

Electrodo	K^{xR}
SC	17
1M	26
1P	59
1I	33
1O	.*
1F	51

Para evaluar el efecto que produce la concentración de cada grupo orgánico (x , expresada en % molar teórico R en el gel) en la afinidad, se ha calculado, con la ecuación 5.6, la afinidad relativa, A_r , para epinefrina de cada ORMOSIL. Los valores de A_r se recogen en la tabla 5.10.

Se observa que en todos los casos en los que se puede calcular la cantidad de epinefrina atrapada, y por tanto, el valor de afinidad relativa, se obtienen valores mayores que 1, es decir, se mejora la afinidad por epinefrina al modificar la sílice con grupos orgánicos. El hecho de que se obtengan valores extremos podría deberse a la presencia de un grupo metilo en la epinefrina.

Tabla 5.10. Valores de afinidad relativa (A_r) para epinefrina de sílice modificada con distintos grupos orgánicos (R=M, P, I, O y F) usando distintas concentraciones de éstos (x=1, 5, 10 y 20%).

x R	1	5	10	20
M	1.5	3.4	2.3	1.9
P	3.5	1.9	.*	.*
I	2.0	2.6	.*	.*
O	.*	.*	.*	.*
F	3.1	1.6	.*	.*

Si nos fijamos en los valores de afinidad obtenidos para sílice modificada con grupos metilo (xM) observamos que para todas las concentraciones de metil-trietoxisilano en la disolución precursora utilizadas presentan afinidad por la epinefrina.

Para electrodos modificados con sílice modificada con grupos propilo (xP), para la concentración del 1% de n-propil-trietoxisilano en la disolución precursora se obtiene el máximo valor de afinidad, casi 3.5 veces más afín por la EP que la sílice convencional. Al aumentar la concentración de grupo propilo en la disolución precursora la afinidad disminuye, incluso desaparece.

En el caso de sílice modificada con grupos isobutilo (xI) al aumentar la concentración de isobutil-trietoxisilano en la disolución precursora se pierde la afinidad por la epinefrina, tan solo muestran afinidad las capas modificadas con el 1 y el 5% de grupos isobutilo.

Para ninguna concentración de grupos octilo (xO) se obtiene afinidad por la epinefrina.

En el caso de sílice modificada con grupos fenilo (xF) solo se puede obtener un valor de afinidad para valores de concentración del 1 y el 5% de grupos fenilo en la disolución precursora.



5.4 Conclusiones

Dopamina, norepinefrina y epinefrina son adsorbidos por la sílice y debido a las diferencias en su estructura química lo hacen de forma diferente. La sílice convencional muestra afinidad similar por dopamina y norepinefrina, sin embargo, por la epinefrina es menos afín.

Al modificar la sílice con grupos orgánicos la afinidad por cada neurotransmisor se ve afectada de forma distinta. La afinidad de la sílice por los distintos neurotransmisores ha sido modulada y cuantificada en los distintos electrodos modificados.

La sílice modificada con grupos orgánicos, en general, presenta más afinidad por dopamina que la sílice convencional, excepto para sílice modificada con grupos fenilo.

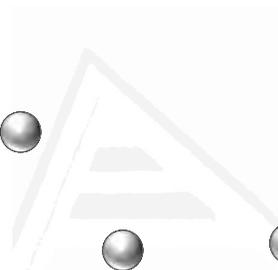
Por norepinefrina, en cambio, es la sílice convencional la que tiene más afinidad que la sílice xR, no se observan diferencias significativas al modificar la sílice con los distintos grupos orgánicos.

En el caso de la epinefrina la sílice modificada orgánicamente es más afín que la sílice convencional pero solo cuando se emplean concentraciones bajas de grupo orgánico (< 5%). Para concentraciones de grupo orgánico >5% la sílice ORMOSIL no adsorbe epinefrina.

Los electrodos modificados con sílice funcionalizada orgánicamente podrían ser utilizados como sensores electroquímicos para la detección de neurotransmisores catecolamínicos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6. Conclusiones generales

Se prepararon electrodos de carbón vítreo modificados con películas de sílice sintetizadas por depósito electroasistido usando una disolución precursora de sol-gel. Con el uso de este método se pueden controlar fácilmente las propiedades del electrodo.

Tanto la sílice convencional como la sílice modificada orgánicamente pueden ser depositadas electroquímicamente dando lugar a capas homogéneas y coherentes de un espesor aproximado de $\sim 2 \mu\text{m}$.

Las capas de sílice sintetizadas mediante electrodeposición fueron caracterizadas mediante análisis termogravimétrico acoplado a espectrometría de masas, microscopía electrónica de barrido y transmisión y por espectroscopía infrarroja.

Cuando se usan concentraciones altas de precursor orgánico, $\sim 20\%$ molar de R-Si(OEt)_3 , en la disolución precursora de sílice se forman agregados posiblemente debido a la segregación de fases. La sílice modificada orgánicamente, utilizando concentraciones bajas de precursor orgánico, $\sim 1\%$ molar de R-Si(OEt)_3 , está enriquecida en grupos orgánicos.

La sílice modificada orgánicamente, utilizando bajas concentraciones de precursor orgánico, es más estable térmicamente ya que la oxidación de los grupos orgánicos tiene lugar a temperaturas más altas a medida que se aumenta el porcentaje molar de éstos en la disolución precursora.

La incorporación de grupos metilo en el gel no sigue la tendencia esperada de acuerdo a la concentración en el precursor, y esto se ha observado tanto por FTIR como por TG-MS. Para los demás grupos orgánicos (propilo, isobutilo, octilo y fenilo) un aumento de grupo orgánico en la disolución precursora implica un aumento progresivo en la concentración de grupos orgánicos presentes en el depósito de sílice, determinada por TG-MS e IR. Por tanto, en estos casos, es posible el uso de FTIR para cuantificar el contenido de grupos orgánicos introducidos en la sílice obtenida mediante depósito electroasistido.

Se pueden sintetizar capas de sílice impresas molecularmente mediante depósito electroasistido. Estas películas impresas con dopamina fueron preparadas para la detección electroquímica de ésta en presencia de ácido L-ascórbico.

Las capas de sílice impresas presentan una elevada coherencia y homogeneidad actuando como filtro a nivel molecular. Los electrodos de carbón vítreo modificados con sílice pueden usarse en la detección electroquímica selectiva de dopamina en presencia de una elevada cantidad de AA (DA:AA relación molar de 1:50000), siendo estos niveles de interferente similares a los que se encuentran en muestras fisiológicas.

Se ha obtenido un sensor de dopamina con un límite de detección de $0.014 \mu\text{M}$ y una sensibilidad de $22.3 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$, valor superior al obtenido por otros autores con electrodos modificados químicamente.

El método electroquímico desarrollado para la fabricación del sensor basado en sílice impresa molecularmente es muy versátil y puede ser aplicado para la detección de otras moléculas de interés, simplemente modificando en el método propuesto la molécula molde empleada.

Los 3 neurotransmisores catecolamínicos estudiados: DA, NE y EP, son adsorbidos por la sílice y debido a las diferencias en su estructura química lo hacen de forma diferente. La sílice convencional muestra afinidad similar por dopamina y norepinefrina, sin embargo, por la epinefrina es menos afín.

Al modificar la sílice con grupos orgánicos la afinidad por cada neurotransmisor se ve afectada de forma distinta. La afinidad de la sílice por los distintos neurotransmisores ha sido modulada y cuantificada en los distintos electrodos modificados.

La sílice modificada con grupos orgánicos, en general, presenta más afinidad por dopamina que la sílice convencional, excepto para sílice modificada con grupos fenilo.

Por norepinefrina, en cambio, es la sílice convencional la que tiene más afinidad que la sílice modificada con grupos orgánicos, no se observan diferencias significativas al modificar la sílice con los distintos grupos orgánicos.

En el caso de la epinefrina la sílice modificada orgánicamente es más afín que la sílice convencional pero solo cuando se emplean concentraciones bajas de

grupo orgánico (< 5% molar). Para concentraciones molares de grupo orgánico >5% la sílice ORMOSIL no adsorbe epinefrina.

Los electrodos modificados con sílice funcionalizada orgánicamente podrían ser utilizados como sensores electroquímicos para la detección selectiva de neurotransmisores catecolamínicos.

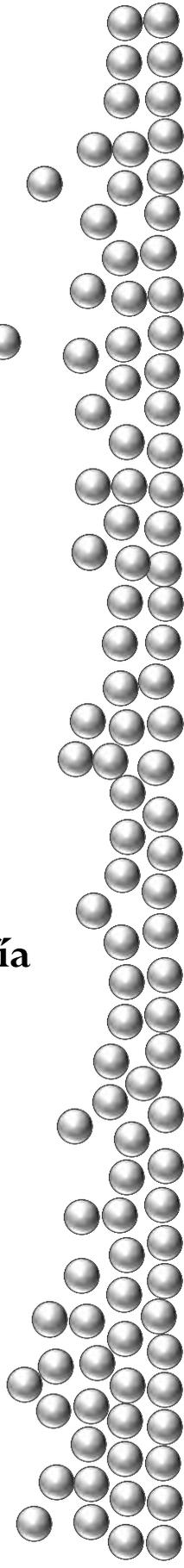


Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

7. Bibliografía



- [1] B. Kolb, I.Q. Whishaw, *Neuropsicología Humana*, 5ª ed., New York, 2006.
- [2] H. Zimmer, Otto Loewi and the chemical transmission of vagus stimulation in the heart, *Clin. Cardiol.* 29 (2006) 135–6.
- [3] K. Cherry, What Is a Neurotransmitter?, (n.d.).
<http://psychology.about.com/od/nindex/g/neurotransmitter.htm>
(accessed February 25, 2016).
- [4] O. Sacks, *Despertares*, 2ª ed., Anagrama, Barcelona, 2011.
- [5] R.N. Adams, Probing brain chemistry with electroanalytical techniques, *Anal. Chem.* 48 (1976) 1126A–1138A.
- [6] B.J. Venton, R.M. Wightman, Psychoanalytical electrochemistry: dopamine and behavior, *Anal. Chem.* 75 (2003) 414 A–421 A.
- [7] S.J. Cragg, J. Baufreton, Y. Xue, J.P. Bolam, M.D. Bevan, Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus, *Eur. J. Neurosci.* 20 (2004) 1788–802.
- [8] G. Barger, H.H. Dale, Chemical structure and sympathomimetic action of amines, *J. Physiol.* 41 (1910) 19–59.
- [9] F.M. Benes, Carlsson and the discovery of dopamine, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 46–47.
- [10] R.J. Beninger, The role of dopamine in locomotor activity and learning, *Brain Res.* 287 (1983) 173–96.
- [11] R. Cools, Role of dopamine in the motivational and cognitive control of behavior, *Neuroscientist.* 14 (2008) 381–95.
- [12] K.C. Berridge, M.L. Kringelbach, Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals, *Psychopharmacology (Berl.)* 199 (2008) 457–80.
- [13] K.C. Berridge, T.E. Robinson, What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?, *Brain Res. Rev.* 28 (1998) 309–369.
- [14] R.A. Bressan, J.A. Crippa, The role of dopamine in reward and pleasure behaviour--review of data from preclinical research, *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* (2005) 14–21.

- [15] F. Giuliano, J. Allard, Dopamine and male sexual function, *Eur. Urol.* 40 (2001) 601–608.
- [16] J.A. Lieberman, J.M. Kane, J. Alvir, Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia, *Psychopharmacol.* 91 (1987) 415–433.
- [17] O. Sacks, *En movimiento*, 1ª ed., Anagrama, Barcelona, 2015.
- [18] J.H. Gaddum, The prefix “Nor” in chemical nomenclature, *Nature.* 177 (1956) 1046–1046.
- [19] M. Tanaka, M. Yoshida, H. Emoto, H. Ishii, Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies, *Eur. J. Pharmacol.* 405 (2000) 397–406.
- [20] E.T. MacKenzie, J. McCulloch, M. O’Kean, J.D. Pickard, A.M. Harper, Cerebral circulation and norepinephrine: relevance of the blood-brain barrier, *Am. J. Physiol.* 231 (1976) 483–8.
- [21] K.H. Lindner, F.W. Ahnefeld, E.G. Pfenninger, W. Schuermann, I.M. Bowdler, Effects of epinephrine and norepinephrine on cerebral oxygen delivery and consumption during open-chest CPR, *Ann. Emerg. Med.* 19 (1990) 249–54.
- [22] C.J. Harmer, S.A. Hill, M.J. Taylor, P.J. Cowen, G.M. Goodwin, Toward a neuropsychological theory of antidepressant drug action: Increase in positive emotional bias after potentiation of norepinephrine activity, *Am. J. Psychiatry.* (2003).
- [23] N. Del Campo, S.R. Chamberlain, B.J. Sahakian, T.W. Robbins, The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Biol. Psychiatry.* 69 (2011) e145–57.
- [24] K.H. Berecek, M.J. Brody, Evidence for a neurotransmitter role for epinephrine derived from the adrenal medulla, *Am. J. Physiol.* 242 (1982) H593–H601.
- [25] J.H. Skalski, J. Kuch, Polish thread in the history of circulatory physiology, *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (2006) 5–41.
- [26] T. Yamashima, Jokichi Takamine (1854-1922), the samurai chemist, and his work on adrenalin, *J. Med. Biogr.* 11 (2003) 95–102.

- [27] M. Bennett, One hundred years of adrenaline: the discovery of autoreceptors, *Clin. Auton. Res.* 9 (1999) 145–159.
- [28] J. Takamine, The isolation of the active principle of the suprarenal gland, *J. Physiol.* (1901) 29–30.
- [29] L. Nelson, M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 2004.
- [30] Epinephrine, *Am. Soc. Heal. Pharm.* (n.d.). <http://www.drugs.com/monograph/epinephrine.html> (accessed February 8, 2016).
- [31] W.F. Young, Adrenal medulla, catecholamines, and pheochromocytoma, in: *Goldman's Cecil Med.*, 25th ed., Elsevier Saunders, 2016.
- [32] H.A. Guber, A.F. Farag, J. Lo, J. Sharp, Evaluation of endocrine function, in: *Henry's Clin. Diagnosis Manag. by Lab. Methods*, Elsevier Saunders, 2011.
- [33] R.T. Peaston, C. Weinkove, Measurement of catecholamines and their metabolites, *Ann. Clin. Biochem.* 41 (2004) 17–38.
- [34] R.C. Causon, M.J. Brown, Catecholamine measurements in phaeochromocytoma: a review, *Ann. Clin. Biochem.* 19 (1982) 396–404.
- [35] T.G. Rosano, T.A. Swift, L.W. Hayes, Advances in catecholamine and metabolite measurements for diagnosis of pheochromocytoma, *Clin. Chem.* 37 (1991) 1854–67.
- [36] J.F. Murphy, D.H. Davies, C.J. Smith, The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenalin and noradrenalin, *J. Immunol. Methods.* 154 (1992) 89–98.
- [37] G. Mellor, G. Gallacher, Fluorescence polarization immunoassay of urinary vanillylmandelic acid, *Clin. Chem.* 36 (1990) 110–112.
- [38] F. Taran, Y. Frobert, C. Créminon, J. Grassi, D. Olichon, C. Mioskowski, et al., Competitive enzyme immunoassay with monoclonal antibody for homovanillic acid measurement in human urine samples, *Clin. Chem.* 43 (1997) 363–8.
- [39] J. Wassell, P. Reed, J. Kane, C. Weinkove, Freedom from drug interference in new immunoassays for urinary catecholamines and

metanephrines, *Clin. Chem.* 45 (1999) 2216–23.

- [40] F. Ghasemi, M.R. Hormozi-Nezhad, M. Mahmoudi, Identification of catecholamine neurotransmitters using fluorescence sensor array, *Anal. Chim. Acta.* 917 (2016) 85–92.
- [41] A. Lund, Simultaneous Fluorimetric Determinations of Adrenaline and Noradrenaline in Blood, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* 6 (2009) 137–146.
- [42] A. Engel, U.S. Von Euler, Diagnostic value of increased urinary output of noradrenaline and adrenaline in Phæochromocytoma, *Lancet.* 256 (1950) 387.
- [43] A. Lund, Fluorimetric Determination of Adrenaline in Blood. III. A New Sensitive and Specific Method, *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* 5 (2009) 231–247.
- [44] J. Haeggendal, An improved method for fluorimetric determination of small amounts of adrenaline and noradrenaline in plasma and tissues, *Acta Physiol. Scand.* 59 (1963) 242–54.
- [45] S. Natelson, J.K. Lugovoy, J.B. Pincus, A new fluorometric method for the determination of epinephrine, *Arch. Biochem.* 23 (1949) 157.
- [46] K. Nyssönen, M.T. Parviainen, Plasma catecholamines: laboratory aspects, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 27 (1989) 211–36.
- [47] A. Mitsui, A. Nohta, Y. Ohkura, High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent, *J. Chromatogr.* 344 (1985) 61–67.
- [48] Y. Yui, T. Fujita, T. Yamamoto, Y. Itokawa, C. Kawai, Liquid-chromatographic determination of norepinephrine and epinephrine in human plasma, *Clin. Chem.* 26 (1980) 194–6.
- [49] J.D. Peuler, G.A. Johnson, Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine, *Life Sci.* 21 (1977) 625–36.
- [50] C. Winkobe, Measurement of catecholamines and their metabolites in urine, *J. Clin. Pathol.* 44 (1991) 269–275.
- [51] A.H. Wu, T.G. Gornet, Preparation of urine samples for liquid-

chromatographic determination of catecholamines: bonded-phase phenylboronic acid, cation-exchange resin, and alumina adsorbents compared, *Clin. Chem.* 31 (1985) 298–302.

- [52] H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura, H. Watanabe, Measurement of catecholamines, their precursor and metabolites in human urine and plasma by solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization, *J. Chromatogr.* 493 (1989) 15–26.
- [53] A. Foti, S. Kimura, V. DeQuattro, D. Lee, Liquid-chromatographic measurement of catecholamines and metabolites in plasma and urine, *Clin. Chem.* 33 (1987) 2209–13.
- [54] T.P. Moyer, N.S. Jiang, G.M. Tyce, S.G. Sheps, Analysis for urinary catecholamines by liquid chromatography with amperometric detection: methodology and clinical interpretation of results, *Clin. Chem.* 25 (1979) 256–63.
- [55] J.M.P. Holly, H.L. Makin, The estimation of catecholamines in human plasma, *Anal. Biochem.* 128 (1983).
- [56] P. Hjemdahl, Interlaboratory comparison of plasma catecholamine determination using several different methods, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 527 (1984) 43–54.
- [57] E. Gerlo, R. Malfait, High-performance liquid chromatography assay of free norepinephrine, epinephrine, dopamine, vanillylmandelic acid and homovanillic acid, *J. Chromatogr.* 9 (1985) 343–347.
- [58] Y.P. Chan, T.S. Siu, Simultaneous quantitation of catecholamines and O-methylated metabolites in urine by isocratic ion-pairing high-performance liquid chromatography with amperometric detection, *J. Chromatogr.* 459 (1988) 251–60.
- [59] T.H. Huang, J. Wall, P. Kabra, Improved solid-phase extraction and liquid chromatography with electrochemical detection of urinary catecholamines and 5-S-L-cysteinyl-L-dopa, *J. Chromatogr.* 452 (1988) 409–18.
- [60] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 3^a ed., Hoboken, 2006.
- [61] E. Bakker, Y. Qin, Electrochemical sensors, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3965–84.

- [62] S.-M.C. Umasankar Yogeswaran, A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material, *Sensors (Basel)*. 8 (2008) 290.
- [63] J.M. Pingarrón, P. Sánchez, *Química electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones*, 1ª ed., Síntesis, Madrid, 1999.
- [64] P.R. Moses, L. Wier, R.W. Murray, Chemically modified tin oxide electrode, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1882–1886.
- [65] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2001.
- [66] A. Walcarius, Analytical applications of silica-modified electrodes -A comprehensive review, *Electroanalysis*. 10 (1999) 1217–1235.
- [67] R.K. Iler, *The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry of silica*, 1ª ed., Wiley, New York, 1979.
- [68] J. Brinker, G.W. Scherer, *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*, 1ª ed., Academic Press, Boston, 1990.
- [69] A.P. Legrand, H. Hommel, A. Tuel, A. Vidal, H. Balard, E. Papirer, et al., Hydroxyls of silica powders, *Adv. Colloid Interface Sci.* 33 (1990) 91–330.
- [70] M.M. Collinson, A.R. Howells, Peer Reviewed: Sol–Gels and Electrochemistry: Research at the Intersection, *Anal. Chem.* 72 (2000) 702 A–709 A.
- [71] D. Avnir, D. Levy, R. Reisfeld, The nature of the silica cage as reflected by spectral changes and enhanced photostability of trapped Rhodamine 6G, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 5956–5959.
- [72] D. Avnir, Organic chemistry within ceramic matrixes: doped sol-gel materials, *Acc. Chem. Res.* 28 (1995) 328–334.
- [73] O. Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovich, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov, et al., Organically modified sol-gel sensors, *Anal. Chem.* 67 (1995) 22A–30A.
- [74] D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi, Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials, *Chem. Mater.* 6 (1994) 1605–1614.
- [75] M.A. Aegerter, R.C. Mehrota, I. Oehme, R. Reisfeld, S. Sakka, O.

Wolfbeis, et al., Optical and electronic phenomena in sol-gel glasses and modern application, Springer, Berlin, 1996.

- [76] B. Dunn, G. Farrington, B. Katz, Sol-gel approaches for solid electrolytes and electrode materials, *Solid State Ionics*. 70-71 (1994) 3–10.
- [77] A. Walcarius, M.M. Collinson, Analytical chemistry with silica sol-gels: traditional routes to new materials for chemical analysis, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2 (2009) 121–43.
- [78] M.M. Collinson, Sol-gel strategies for the preparation of selective materials for chemical analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 289–311.
- [79] D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, Recent bio-applications of sol-gel materials, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 1013–1030.
- [80] O. Lev, Z. Wu, S. Bharathi, V. Glezer, A. Modestov, J. Gun, et al., Sol-Gel materials in electrochemistry, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2354–2375.
- [81] K.S. Alber, J.A. Cox, Electrochemistry in solids prepared by sol-gel processes, *Mikrochim. Acta.* 127 (1997) 131–147.
- [82] M. Kopanica, V. Stará, Silica gel modified carbon composite electrodes, *Electroanalysis*. 3 (1991) 13–16.
- [83] M.A. Ruiz Barrio, J.M. Pingarrón Carrazón, Voltammetric determination of pentachlorophenol with a silica gel-modified carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Chem.* 344 (1992) 34–38.
- [84] R.J. Barrio, Z. Gomez de Balugera, M. Aranzazu Goicolea, Utilization of a silica-modified carbon paste electrode for the direct determination of todralazine in biological fluids, *Anal. Chim. Acta.* 273 (1993) 93–99.
- [85] A. Arranz, S.F. de Betoño, J.M. Moreda, A. Cid, J.F. Arranz, Preconcentration and voltammetric determination of the herbicide metamitron with a silica-modified carbon paste electrode, *Microchim. Acta.* 127 (1997) 273–279.
- [86] A. Arranz, M.F. Villalba, S.F. de Betoño, J.M. Moreda, J.F. Arranz, Anodic voltammetric assay of the herbicide Metamitron on a carbon paste electrode, *Anal. Bioanal. Chem.* 357 (1997) 768–772.
- [87] A. Walcarius, J. Bessiere, Silica-modified carbon paste electrode for

copper determination in ammoniacal medium, *Electroanalysis*. 9 (1997) 707–713.

- [88] A.L. Crumbliss, J. Stonehuerner, R.W. Henkens, J.P. O'Daly, J. Zhao, The use of inorganic materials to control or maintain immobilized enzyme activity, *New J. Chem.* 18 (1994).
- [89] B.C. Dave, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, Sol-gel encapsulation methods for biosensors, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1120A–1127A.
- [90] O. Nadzhafova, M. Etienne, A. Walcarius, Direct electrochemistry of hemoglobin and glucose oxidase in electrodeposited sol-gel silica thin films on glassy carbon, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 1189–1195.
- [91] J. Joseph, G. Gomathi, R. Prabhakara, Electrochemical characteristics of thin films of nickel hexacyanoferrate formed on carbon substrates, *Electrochim. Acta.* 36 (1991) 1537–1541.
- [92] G.A.P. Zaldivar, Y. Gushikem, L.T. Kubota, Tin(IV) oxide grafted on a silica gel surface as a conducting substrate base for cupric hexacyanoferrate, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 318 (1991) 247–254.
- [93] L.T. Kubota, Y. Gushikem, Cyclic voltammetric study of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/4-$ immobilized on silica gel surface coated with titanium(IV) oxide, *Electrochim. Acta.* 37 (1992) 2477–2480.
- [94] Y. Gushikem, C.R.M. Peixoto, U.P.R. Filho, L.T. Kubota, E. Stadler, Electrochemical properties of $[\text{Ru}(\text{edta})(\text{H}_2\text{O})]$ immobilized on a zirconium(IV) oxide-coated silica gel surface, *J. Colloid Interface Sci.* 184 (1996) 236–240.
- [95] E.F. Perez, L.T. Kubota, A.A. Tanaka, G. De Oliveira Neto, Anodic oxidation of cysteine catalysed by nickel tetrasulphonated phthalocyanine immobilized on silica gel modified with titanium (IV) oxide, *Electrochim. Acta.* 43 (1998) 1665–1673.
- [96] M.M. Collinson, Recent trends in analytical applications of organically modified silicate materials, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 31–39.
- [97] S. Dash, S. Mishra, S. Patel, B.K. Mishra, Organically modified silica: synthesis and applications due to its surface interaction with organic molecules, *Adv. Colloid Interface Sci.* 140 (2008) 77–94.
- [98] S.L. Burkett, S.D. Sims, S. Mann, Synthesis of hybrid inorganic-organic

mesoporous silica by co-condensation of siloxane and organosiloxane precursors, *Chem. Commun.* (1996) 1367.

- [99] D.J. Macquarrie, D.B. Jackson, J.E.G. Mdoe, J.H. Clark, Organomodified hexagonal mesoporous silicates, *New J. Chem.* 23 (1999) 539–544.
- [100] D.J. Macquarrie, D.B. Jackson, Aminopropylated MCMs as base catalysts: a comparison with aminopropylated silica, *Chem. Commun.* (1997) 1781–1782.
- [101] C.E. Fowler, S.L. Burkett, S. Mann, Synthesis and characterization of ordered organo–silica–surfactant mesophases with functionalized MCM-41-type architecture, *Chem. Commun.* (1997) 1769–1770.
- [102] J.H. Clark, D.J. Macquarrie, Catalysis of liquid phase organic reactions using chemically modified mesoporous inorganic solids, *Chem. Commun.* (1998) 853–860.
- [103] M.A. Marshall, H.A. Mottola, Synthesis of silica-immobilized 8-quinolinol with (aminophenyl)trimethoxysilane, *Anal. Chem.* 55 (1983) 2089–2093.
- [104] M.E. Díaz-García, R.B. Lainño, Molecular imprinting in sol-gel materials: recent developments and applications, *Microchim. Acta.* 149 (2004) 19–36.
- [105] S. Mudd, A hypothetical mechanism of antibody formation, *J. Immunol.* 23 (1932) 423–427.
- [106] L. Pauling, A theory of the structure and process of formation of antibodies, *J. Am. Chem. Soc.* 62 (1940) 2643–2657.
- [107] L. Ye, K. Mosbach, Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors, *Chem. Mater.* 20 (2008) 859–868.
- [108] E.L. Holthoff, F. V Bright, Molecularly imprinted xerogels as platforms for sensing, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 756–67.
- [109] M. Palomar-Pardavé, S. Corona-Avenidaño, M. Romero-Romo, G. Alarcón-Angeles, A. Merkoçi, T. Ramírez-Silva, Supramolecular interaction of dopamine with β -cyclodextrin: An experimental and theoretical electrochemical study, *J. Electroanal. Chem.* 717-718 (2014) 103–109.

- [110] K. Ensing, Tailor-made materials for tailor-made applications: application of molecular imprints in chemical analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 138–145.
- [111] D. Kriz, O. Ramström, K. Mosbach, Peer reviewed: Molecular imprinting: New possibilities for sensor technology, *Anal. Chem.* 69 (1997) 345A–349A.
- [112] J.E. Lofgreen, G.A. Ozin, Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol-gel silica, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 911–33.
- [113] M. V. Polyakov, Adsorption properties and structure of silica gel, *Zhurnal Fiz. Khimii.* 2 (1931) 799.
- [114] F.H. Dickey, G.H. Cleland, C. Lotz, The role of organic peroxides in the induction of mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 35 (1949) 581–6.
- [115] B. Sellergren, *Molecularly imprinted polymers. Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [116] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, *Molecular Imprinting*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002.
- [117] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, *Molecular imprinting: perspectives and applications*, *Chem. Soc. Rev.* (2016).
- [118] M.F. Lulka, J.P. Chambers, E.R. Valdes, R.G. Thompson, J.J. Valdes, Molecular imprinting of small molecules with organic silanes: fluorescence detection, *Anal. Lett.* 30 (1997) 2301–2313.
- [119] A. Fernández-González, R. Badía Laiño, M.E. Diaz-García, L. Guardia, A. Viale, Assessment of molecularly imprinted sol-gel materials for selective room temperature phosphorescence recognition of nafcillin, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 804 (2004) 247–54.
- [120] R. Wang, U. Narang, P.N. Prasad, F. V. Bright, Affinity of anti fluorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2671–2675.
- [121] M.A. Doody, G.A. Baker, S. Pandey, F. V. Bright, Affinity and mobility of polyclonal anti-dansyl antibodies sequestered within sol-gel-derived biogels, *Chem. Mater.* 12 (2000) 1142–1147.

- [122] P.N. Deepa, M. Kanungo, G. Claycomb, P.M.A. Sherwood, M.M. Collinson, Electrochemically deposited sol-gel-derived silicate films as a viable alternative in thin-film design, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5399–5405.
- [123] M.D. Petit-Dominguez, H. Shen, W.R. Heineman, C.J. Seliskar, Electrochemical behavior of graphite electrodes modified by spin-coating with sol-gel-entrapped ionomers, *Anal. Chem.* 69 (1997) 703–710.
- [124] Y. Huang, K. Chou, Studies on the spin coating process of silica films, *Ceram. Int.* 29 (2003) 485–493.
- [125] C.J. Brinker, G.C. Frye, A.J. Hurd, C.S. Ashley, Fundamentals of sol-gel dip coating, *Thin Solid Films.* 201 (1991) 97–108.
- [126] A. Xu, J. Yu, H. Zhang, L. Zhang, D. Kuang, Y. Fang, Continuous formation of supported unusual mesostructured silica films by sol-gel dip coating, *Langmuir.* 18 (2002) 9570–9573.
- [127] A.R. Di Giampaolo Conde, M. Puerta, H. Ruiz, J.L. Olivares, Thick aluminosilicate coatings on carbon steel via sol-gel, *J. Non. Cryst. Solids.* 147-148 (1992) 467–473.
- [128] J. Puetz, G. Gasparro, M.A. Aegerter, Liquid film spray deposition of transparent conducting oxide coatings, *Thin Solid Films.* 442 (2003) 40–43.
- [129] A. Walcarius, D. Mandler, J.A. Cox, M. Collinson, O. Lev, Exciting new directions in the intersection of functionalized sol-gel materials with electrochemistry, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3663.
- [130] R. Shacham, D. Avnir, D. Mandler, Electrodeposition of methylated sol-gel films on conducting surfaces, *Adv. Mater.* 11 (1999) 384–388.
- [131] A.T. Kuhn, C.Y. Chan, pH changes at near-electrode surfaces, *J. Appl. Electrochem.* 13 (1983) 189–207.
- [132] I. Zhitomirsky, Cathodic electrodeposition of ceramic and organoceramic materials. Fundamental aspects, *Adv. Colloid Interface Sci.* 97 (2002) 279–317.
- [133] A.C. West, Pulse reverse copper electrodeposition in high aspect ratio trenches and vias, *J. Electrochem. Soc.* 145 (1998) 3070.
- [134] A. Gamero-Quijano, Desarrollo de electrodos modificados con matrices

de sílice para posibles aplicaciones en sensores y biosensores electroquímicos, 2014.

- [135] Y. Leng, *Materials characterization: Introduction to microscopic and spectroscopic methods*, 2^a ed., Wiley, Singapur, 2013.
- [136] R. Wiesendanger, *Scanning probe microscopy and spectroscopy*, 1^a ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
- [137] A. Requena, J. Zúñiga, *Espectroscopía*, 5^a ed., Pearson-Pentice Hall, Madrid, 2003.
- [138] D.A. Skoog, T.A. Nieman, F.J. Holler, *Principios de análisis instrumental*, 5^a ed., McGraw-Hill, Madrid, 2001.
- [139] N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley, *Introduction to infrared and raman spectroscopy*, 3^a ed., Academic Press, San Diego, 1990.
- [140] T. Hatakeyama, F.X. Qinn, *Thermal analysis. Fundamentals and applications to polymer science*, 2^a ed., Wiley, West Sussex, 1999.
- [141] C.G. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, Elsevier, 2006.
- [142] K.K. Unger, *Porous sílice*, 1^a ed., Elsevier, New York, 1969.
- [143] G.P. Moss, P.A.S. Smith, D. Tavernier, Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995), *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1307–1375.
- [144] Chromatographyshop, (2016).
http://www.chromatographyshop.com/html/normal_phase_lc.html
(accessed March 22, 2016).
- [145] M.L. Hair, W. Hertl, Adsorption on hydroxylated silica surfaces, *J. Phys. Chem.* 73 (1969) 4269–4276.
- [146] E.F. Vansant, P. Van Der Voort, K.C. Vrancken, *Characterization and chemical modification of the silica surface*, 1^a ed., Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [147] M.M. Collinson, D.A. Higgins, R. Kommidi, D. Campbell-Rance, Electrodeposited silicate films: importance of supporting electrolyte, *Anal. Chem.* 80 (2008) 651–6.
- [148] C. Triantafillidis, M.S. Elsaesser, N. Hüsing, *Chemical phase separation*

strategies towards silica monoliths with hierarchical porosity, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3833–46.

- [149] O. Foussaier, M. Menetrier, J. Videau, E. Duguet, Polydimethylsiloxane-based ORMOSIL microstructure: correlation with compressive behavior, *Mater. Lett.* 42 (2000) 305–310.
- [150] M. Zaharescu, A. Jitianu, A. Brăileanu, J. Madarász, C. Novák, G. Pokol, Composition and thermal stability of SiO₂-based hybrid materials TEOS-MTEOS system, *J. Therm. Anal. Calorim.* 71 (2002) 421–428.
- [151] M. Zaharescu, A. Jitianu, A. Brăileanu, V. Bădescu, G. Pokol, J. Madarász, et al., Thermal stability of SiO₂-based inorganic-organic hybrid materials, *J. Therm. Anal. Calorim.* 56 (1999) 191–198.
- [152] R. Al-Oweini, H. El-Rassy, Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several Si(OR)₄ and R'Si(OR)₃ precursors, *J. Mol. Struct.* 919 (2009) 140–145.
- [153] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*, 3^a ed., Wiley, West Sussex, 2001.
- [154] P. Innocenzi, Infrared spectroscopy of sol–gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview, *J. Non. Cryst. Solids.* 316 (2003) 309–319.
- [155] A. Bertoluzza, C. Fagnano, M. Antonietta Morelli, V. Gottardi, M. Guglielmi, Raman and infrared spectra on silica gel evolving toward glass, *J. Non. Cryst. Solids.* 48 (1982) 117–128.
- [156] D.L. Ou, A.B. Seddon, Near- and mid-infrared spectroscopy of sol–gel derived ormosils: vinyl and phenyl silicates, *J. Non. Cryst. Solids.* 210 (1997) 187–203.
- [157] H. Günzler, H.U. Gremlich, *IR spectroscopy: an introduction*, Wiley-VCH, Berlin, 2002.
- [158] B. Sellergren, Molecularly imprinted polymers: shaping enzyme inhibitors, *Nat. Chem.* 2 (2010) 7–8.
- [159] M.C. Blanco-López, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 36–48.
- [160] M.C. Blanco-López, S. Gutiérrez-Fernández, M.J. Lobo-Castañón, A.J.

Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Electrochemical sensing with electrodes modified with molecularly imprinted polymer films, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1922–8.

- [161] E. Granot, R. Tel-Vered, O. Lioubashevski, I. Willner, Stereoselective and enantioselective electrochemical sensing of monosaccharides using imprinted boronic acid-functionalized polyphenol films, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 478–484.
- [162] F.R.F. Leite, W. de J.R. Santos, L.T. Kubota, Selective determination of caffeic acid in wines with electrochemical sensor based on molecularly imprinted siloxanes, *Sensors Actuators B Chem.* 193 (2014) 238–246.
- [163] C. Malitesta, E. Mazzotta, R.A. Picca, A. Poma, I. Chianella, S.A. Piletsky, MIP sensors-the electrochemical approach, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1827–46.
- [164] S. Marx, A. Zaltsman, I. Turyan, D. Mandler, Parathion sensor based on molecularly imprinted sol-gel films, *Anal. Chem.* 76 (2004) 120–126.
- [165] R. Ouyang, J. Lei, H. Ju, Y. Xue, A molecularly imprinted copolymer designed for enantioselective recognition of glutamic acid, *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 3223–3230.
- [166] A. Turco, S. Corvaglia, E. Mazzotta, Electrochemical sensor for sulfadimethoxine based on molecularly imprinted polypyrrole: study of imprinting parameters, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 240–7.
- [167] K. Haupt, K. Mosbach, Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chem. Rev.* 100 (2000) 2495–2504.
- [168] A. Salinas-Castillo, I. Sánchez-Barragán, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Ballesteros, J.M. González, et al., Iodinated molecularly imprinted polymer for room temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene, *Chem. Commun. (Camb.)* (2005) 3224–6.
- [169] J.L. Urraca, A.J. Hall, M.C. Moreno-Bondi, B. Sellergren, A stoichiometric molecularly imprinted polymer for the class-selective recognition of antibiotics in aqueous media, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45 (2006) 5158–61.
- [170] R. Makote, M.M. Collinson, Template Recognition in Inorganic-Organic Hybrid Films Prepared by the Sol-Gel Process, *Chem. Mater.* 10 (1998) 2440–2445.

- [171] P.S. Sharma, A. Pietrzyk-Le, F. D'Souza, W. Kutner, Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3177–204.
- [172] S. Chen, K. Peng, The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine and their electrocatalytic reactions on cobalt(II) hexacyanoferrate films, *J. Electroanal. Chem.* 547 (2003) 179–189.
- [173] A. Salimi, C.E. Banks, R.G. Compton, Abrasive immobilization of carbon nanotubes on a basal plane pyrolytic graphite electrode: application to the detection of epinephrine, *Analyst.* 129 (2004) 225–8.
- [174] M.L.A. V Heien, M.A. Johnson, R.M. Wightman, Resolving neurotransmitters detected by fast-scan cyclic voltammetry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5697–704.
- [175] C.B. Jacobs, M.J. Peairs, B.J. Venton, Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules, *Anal. Chim. Acta.* 662 (2010) 105–27.
- [176] N.F. Atta, A. Galal, R.A. Ahmed, Simultaneous determination of catecholamines and serotonin on poly(3,4-ethylene dioxythiophene) modified Pt electrode in presence of sodium dodecyl sulfate, *J. Electrochem. Soc.* 158 (2011) F52.
- [177] P. Ramesh, G.. Suresh, S. Sampath, Selective determination of dopamine using unmodified, exfoliated graphite electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 561 (2004) 173–180.
- [178] D.C.S. Tse, R.L. McCreery, R.N. Adams, Potential oxidative pathways of brain catecholamines, *J. Med. Chem.* 19 (1976) 37–40.
- [179] R.L. McCreery, Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2646–87.
- [180] S. Chumillas, M.C. Figueiredo, V. Climent, J.M. Feliu, Study of dopamine reactivity on platinum single crystal electrode surfaces, *Electrochim. Acta.* 109 (2013) 577–586.
- [181] M.A. Cotarelo, F. Huerta, C. Quijada, F. Cases, J.L. Vázquez, The electrocatalytic behaviour of poly(aniline-co-4adpa) thin films in weakly acidic medium, *Synth. Met.* 144 (2004) 207–211.
- [182] H. Zhao, Y. Zhang, Z. Yuan, Study on the electrochemical behavior of

dopamine with poly(sulfosalicylic acid) modified glassy carbon electrode, *Anal. Chim. Acta.* 441 (2001) 117–122.

- [183] A. Gamero-Quijano, F. Huerta, D. Salinas-Torres, E. Morallón, F. Montilla, Electrochemical behaviour of PSS-functionalized silica films prepared by electroassisted deposition of sol–gel precursors, *Electrocatalysis.* 6 (2014) 33–41.
- [184] S.R. Ali, Y. Ma, R.R. Parajuli, Y. Balogun, W.Y.-C. Lai, H. He, A nonoxidative sensor based on a self-doped polyaniline/carbon nanotube composite for sensitive and selective detection of the neurotransmitter dopamine, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2583–7.
- [185] S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *Electroanalysis.* 14 (2002) 317–323.
- [186] A. Balamurugan, S.M. Chen, Poly(3,4-ethylenedioxythiophene-co-(5-amino-2-naphthalenesulfonic acid)) (PEDOT-PANS) film modified glassy carbon electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid, *Anal. Chim. Acta.* 596 (2007) 92–98.
- [187] G. Hu, Y. Liu, J. Zhao, S. Cui, Z. Yang, Y. Zhang, Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid on L-cysteine self-assembled gold electrode, *Bioelectrochemistry.* 69 (2006) 254–257.
- [188] S. Pruneanu, A.R. Biris, F. Pogacean, C. Socaci, M. Coros, M.C. Rosu, et al., The influence of uric and ascorbic acid on the electrochemical detection of dopamine using graphene-modified electrodes, *Electrochim. Acta.* 154 (2015) 197–204.
- [189] D. Yu, Y. Zeng, Y. Qi, T. Zhou, G. Shi, A novel electrochemical sensor for determination of dopamine based on AuNPs@SiO₂ core-shell imprinted composite, *Biosens. Bioelectron.* 38 (2012) 270–277.
- [190] S. Hou, M.L. Kasner, S. Su, K. Patel, R. Cuellari, Highly sensitive and selective dopamine biosensor fabricated with silanized graphene, *J. Phys. Chem. C.* 114 (2010) 14915–14921.
- [191] J. Li, J. Zhao, X. Wei, A sensitive and selective sensor for dopamine determination based on a molecularly imprinted electropolymer of o-aminophenol, *Sensors Actuators B Chem.* 140 (2009) 663–669.
- [192] Z. Jia, J. Liu, Y. Shen, Fabrication of a template-synthesized gold

nanorod-modified electrode for the detection of dopamine in the presence of ascorbic acid, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 2739–2743.

- [193] M.M. Collinson, *Electrochemistry: an important tool to study and create new sol-gel-derived materials*, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 777–83.
- [194] A. Walcarius, E. Sibottier, M. Etienne, J. Ghanbaja, *Electrochemically assisted self-assembly of mesoporous silica thin films*, *Nat. Mater.* 6 (2007) 602–8.
- [195] D. Salinas-Torres, F. Montilla, F. Huerta, E. Morallón, *All electrochemical synthesis of polyaniline/silica sol-gel materials*, *Electrochim. Acta.* 56 (2011) 3620–3625.
- [196] M.D. Hawley, S. V. Tatawawadi, S. Piekarski, R.N. Adams, *Electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines*, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 447–450.
- [197] E. Mazario, J. Sánchez-Marcos, N. Menéndez, P. Herrasti, M. García-Hernández, A. Muñoz-Bonilla, *One-pot electrochemical synthesis of polydopamine coated magnetite nanoparticles*, *RSC Adv.* 4 (2014) 48353–48361.
- [198] G.L. Long, J.D. Winefordner, *Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition*, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A.
- [199] X. Kan, H. Zhou, C. Li, A. Zhu, Z. Xing, Z. Zhao, *Imprinted electrochemical sensor for dopamine recognition and determination based on a carbon nanotube/polypyrrole film*, *Electrochim. Acta.* 63 (2012) 69–75.
- [200] Y. Zeng, Y. Zhou, L. Kong, T. Zhou, G. Shi, *A novel composite of SiO₂-coated graphene oxide and molecularly imprinted polymers for electrochemical sensing dopamine*, *Biosens. Bioelectron.* 45 (2013) 25–33.
- [201] C. Xue, Q. Han, Y. Wang, J. Wu, T. Wen, R. Wang, et al., *Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers*, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 199–203.
- [202] Y. Mao, Y. Bao, S. Gan, F. Li, L. Niu, *Electrochemical sensor for dopamine based on a novel graphene-molecular imprinted polymers composite recognition element*, *Biosens. Bioelectron.* 28 (2011) 291–

- [203] Y. Kim, S. Bong, Y. Kang, Y. Yang, R. Mahajan, J. Kim, et al., Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2366–9.
- [204] L. Tan, K.G. Zhou, Y.H. Zhang, H.X. Wang, X.D. Wang, Y.F. Guo, et al., Nanomolar detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at β -cyclodextrin/graphene nanocomposite platform, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 557–560.
- [205] A. Gaied, N. Jaballah, M. Tounsi, M. Braiek, N. Jaffrezic-Renault, M. Majdoub, Selective detection of dopamine in presence of ascorbic acid by use of glassy-carbon electrode modified with amino- β -cyclodextrin and carbon nanotubes, *Electroanalysis.* 26 (2014) 2747–2753.
- [206] R.K. Shervedani, M. Bagherzadeh, S.A. Mozaffari, Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor, *Sensors Actuators B Chem.* 115 (2006) 614–621.
- [207] Y. Zhao, Y. Gao, D. Zhan, H. Liu, Q. Zhao, Y. Kou, et al., Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode, *Talanta.* 66 (2005) 51–7.
- [208] S. Jo, H. Jeong, S.R. Bae, S. Jeon, Modified platinum electrode with phytic acid and single-walled carbon nanotube: Application to the selective determination of dopamine in the presence of ascorbic and uric acids, *Microchem. J.* 88 (2008) 1–6.
- [209] A. Aggarwal, M. Hu, I. Fritsch, Detection of dopamine in the presence of excess ascorbic acid at physiological concentrations through redox cycling at an unmodified microelectrode array, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3859–69.
- [210] B. Li, Y. Zhou, W. Wu, M. Liu, S. Mei, Y. Zhou, et al., Highly selective and sensitive determination of dopamine by the novel molecularly imprinted poly(nicotinamide)/CuO nanoparticles modified electrode, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 121–8.
- [211] D. Wu, H. Li, X. Xue, H. Fan, Q. Xin, Q. Wei, Sensitive and selective

determination of dopamine by electrochemical sensor based on molecularly imprinted electropolymerization of o-phenylenediamine, *Anal. Methods*. 5 (2013) 1469.

- [212] R. Manjunatha, G.S. Suresh, J.S. Melo, S.F. D'Souza, T.V. Venkatesha, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layer-by-layer technique, *Sensors Actuators B Chem.* 145 (2010) 643–650.
- [213] N.F. Atta, M.F. El-Kady, Novel poly(3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids, *Sensors Actuators B Chem.* 145 (2010) 299–310.
- [214] H. Qiu, G. Zhou, G. Ji, X. Huang, Y. Ding, A novel nanoporous gold modified electrode for the selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 69 (2009) 105–8.
- [215] P.N. Tobler, C.D. Fiorillo, W. Schultz, Adaptive coding of reward value by dopamine neurons, *Science*. 307 (2005) 1642–5.
- [216] P. Burghardt, T. Love, C. Stohler, C. Hodgkinson, P. Shen, M. Enoch, et al., Leptin regulates dopamine responses to sustained stress in humans, *J. Neurosci.* 32 (2012) 15369–76.
- [217] D.L. Robinson, A. Hermans, A.T. Seipel, R.M. Wightman, Monitoring rapid chemical communication in the brain, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2554–84.
- [218] S. Tufi, M. Lamoree, J. de Boer, P. Leonards, Simultaneous analysis of multiple neurotransmitters by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1395 (2015) 79–87.
- [219] R. Chirita, C. West, A. Finaru, C. Elfakir, Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: application to neurotransmitters analysis, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3091–104.
- [220] A. Kumar, J.P. Hart, D. V McCalley, Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 3854–61.

- [221] C.H. Giles, T.H. MacEwan, S.N. Nakhwa, D. Smith, Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids, *J. Chem. Soc.* (1960) 3973.
- [222] G.D. Parfitt, Adsorption from solution at the solid-liquid interface, 1^a ed., Academic Press, New York, 1983.
- [223] S.K. Parida, S. Dash, S. Patel, B.K. Mishra, Adsorption of organic molecules on silica surface, *Adv. Colloid Interface Sci.* 121 (2006) 77–110.
- [224] Z.-G. Zhao, L.-H. Zhang, Y. Lin, Thermodynamics of adsorption of organic compounds at the silica gel/nonpolar solvent interfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 166 (1994) 23–28.
- [225] S. Shahrokhian, S. Bozorgzadeh, Electrochemical oxidation of dopamine in the presence of sulfhydryl compounds: Application to the square-wave voltammetric detection of penicillamine and cysteine, *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 4271–4276.
- [226] E.L. Ciolkowski, K.M. Maness, P.S. Cahill, R.M. Wightman, D.H. Evans, B. Fosset, et al., Disproportionation during electrooxidation of catecholamines at carbon-fiber microelectrodes, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3611–3617.
- [227] A. Ebadi, J.S. Soltan Mohammadzadeh, A. Khudiev, What is the correct form of BET isotherm for modeling liquid phase adsorption?, *Adsorption.* 15 (2009) 65–73.