



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

"Estudio de sistemas poliméricos y autoensamblados de polielectrolitos para la construcción de dispositivos de reconocimiento molecular."

Doris E. Grumelli

Director de Tesis: Ernesto J. Calvo

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y
Química Física – INQUIMAE

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires

2006

Agradecimientos

...A Juan, por ser quien más conoce de lo que fue esta tesis para mí y por escuchar, escuchar y escuchar.

...A mis viejos, porque soy el producto de ellos, a Marcelo, Transito y Alicia por estar siempre (sobre todo en las malas) y en los últimos tiempos por los mensajitos “q haces loquita?”, “pones plata para el regalo de la mami?”, “cuando venis?”, a Javier, Gigio y Carina (en orden de llegada)...a Cati, Agus, Nico, Vicky, Santito y Camila...porque me hacen bien...

...A los Bonoras por ser mi segunda familia, a Raúl por los agasajos culinarios, a Marta porque siempre es mi ejemplo, a las chicas (la Nati y la La) por el aguante de la ultima semana, a German, por ser parte de los bonoras y a la Pamelucha por ser mi reina.

...Al Carlos y a la Yeya, por hacerme sentir como su nieta y sentirse orgullosos de mi

...A Ernesto por hasta último momento estar haciendo lo mejor para esta tesis y por tener siempre esa visión global de las cosas.

...A César, por ser mi papá científico.

...A la gente de la UNRC, porque allá nací científicamente y por el excelente recibimiento cada vez que vuelvo.

...A Ariana, Lorena y Rodrigo, por las siempre disculpas de los mails no escritos y por las juntadas una vez por año...

...A Fernando Battaglini, por los préstamos de material, la buena memoria, y por ser un buen consejero de estudios.

...A Erica Forzani, por su sobreprotección, por ser la verdadera cordobesa, por la guía experimental y espiritual en los primeros tiempos, y por algunos pdf's y más ayuda espiritual desde la distancia.

...A Marcelo y Fran, mis primeros amigos porteños, por tantos largos almuerzos compartidos y por que me quedaron re lindos recuerdos de esa época.

...A Ceci Bonazzola, muy pero muy especialmente por las lecturas exhaustivas de esta tesis. Por los espectros de IR, por la compañía en más de un congreso, por los almuerzos, y por su capacidad de divertirse. Ahhh...me olvidaba GRACIAS CECI!!!!!!

...A Gabriel “GG” Gordillo, por las sugerencias electroquímicas de pasillo.

...A la ex gente de mi futuro ex labo: Ale W., por haber hecho buenos experimentos con los productos de mis síntesis. A Pablo, Martín y Leandro por los primeros tiempos, a Claudia Danilowicz por el apoyo logístico durante mis etapas sintéticas, a Lili Trevani, por las carcajadas estridentes. Y toda esa gente que pasó que compartimos algún almuerzo, experimento o charla: Carlota, Mariano, Fede, Luciana, Jacqueline, Ema, Ariel, Norman....Al canadiense Wheeldon, por una amistad a prueba del tiempo.

...A la gente actual de mi labo y muchos de ellos “MIS AMIGOS”:

...A Aleka porque en la diferencia es donde más aprendo. Por ofrecerme tantas chances para estar siempre mejor.

...A Vic, porque conozco a la vieja y a la nueva y porque no sabes como lamento irme ahora. Por la buena predisposición a compartir cine, amigos y fiestas.

...A Silvina por ser mi oído, aguantarse mis cambios y ni hablar por haberme dedicado ese fin de semana de esa manera, no se de que manera hacer notar mi agradecimiento en semejante ayuda...GRACIAS SIL!!!!

...A Marito, por las ayudas inteligentes, por la memoria y el increíble criterio químico, por las próximas pizzas. También por los silicios y siempre algún material del labo extra.

...A Migue, aunque por sus manos mágicas no se lo merece, por asustarse de mi locura cuando me escucha.

...A Edgar por la PANI+SECM, por todo lo aprendido acerca de jueguitos durante los almuerzos, por nuestro gusto por la música (no compartida) y algunas veces la compañía de regreso

...A Vero porque es el ejemplo de que los biólogos son muy buenos químicos, por el ultimo enero compartido y por la fiesta de PhD.

...A la gente nueva del lab, Churcas (por las cajas de faraday), Andrea (por ser una mamá), Ale R (por el índice), Cinthya, Claudio y Hongyu, por integrarse fácilmente, y porque pese a ser nuevos ya escucharon la charla del transistor seis veces cada uno.

...A Phil, por tener un acento tan *British* y por la estadia en Southampton y por las vacaciones en London!.

... A Nicolás Mano por los polimeros que tanto contribuyeron a la discusión de esta tesis.

... A Claudia por las fotitos de último momento.

... A Diego por hacer las perfilometrias en momentos como estos...como hiciste?

...A la gente de abajo, Graciela, Diego y Erica por la buena bienvenida.

...A la gente de al lado, de en frente y de la vuelta: Sole, Yanina y Ana (sobre todo el aguante en esta ultima parte)

...A mis compañeros de docencia, especialmente a Laura Perisinotti y Paula Longinotti.

...A la gente de Inorgánica y FQ: Ana, Walter y Nancy por hacer la docencia más fácil.

...A Alejandra de secretaría por hacer su trabajo con tantas ganas, a las chicas del INQUIMAE, Andrea y María, por la buena onda cuando llego cansada al tercer piso, a Alicia y Celia por dejarme ver por la ventana la costanera.

...Al CONICET, por la beca doctoral que facilitó la realización de esta tesis.

...Al DQIAQF-INQUIMAE, por el lugar de trabajo, a toda la gente que alguna vez colaboró de alguna manera en esta tesis y muy especialmente a los que me ayudaron a empezar a sentirme parte de este ámbito de trabajo.

RESUMEN

El presente trabajo de Tesis Doctoral se refiere al diseño de un dispositivo de reconocimiento molécula específico a β -D-glucosa en solución y generación de una señal eléctrica por conmutación del estado aislador a conductor de una película delgada de polianilina autodopada por poliestirensulfonato (PSS) o por sulfonación electroquímica de polianilina (SPAN). Este dispositivo actúa como un transistor o llave molecular. El transistor diseñado constituye el primer ejemplo de un dispositivo de llave molecular donde se integran totalmente las etapas de reconocimiento molecular y generación de señal eléctrica sin necesidad de agregar reactivos.

La película de reconocimiento molecular está compuesta por la enzima glucosa oxidasa (GOx) y un polímero medidor redox (PAH-Os) y una capa de conmutación formada por un polianilina modificada (PANI(PSS) o SPAN) integradas sobre la superficie de una compuerta formada por dos microbandas de oro sobre silicio. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre ellas, el sistema responde específicamente a glucosa en solución mediante el cambio abrupto en varios órdenes de magnitud de la resistencia de la capa de conmutación entre ambos contactos.

Se desarrolló un método de autodopado de polianilina por sulfonación bajo control electroquímico (SPAN) que permite extender el intervalo de pH de trabajo de polianilina entre 5-7, condición requerida por las biomoléculas empleadas. Los resultados son similares a los obtenidos mediante el dopado de la polianilina con poliestirensulfonato (PANI(PSS)).

Se estudió la dinámica de películas autoensambladas capa por capa de polielectrolitos redox de un sistema modelo de PAH-Os/PSS mediante balanza de cristal de cuarzo, elipsometría, absorción por reflexión FTIR-RAS, y deflectometría por gradiente de concentración.

Se desarrolló y construyó una llave o microtransistor molecular totalmente integrado y se caracterizó su respuesta. Se demostró que los mecanismos de funcionamiento son los esperados de acuerdo al diseño del dispositivo. Es decir la conmutación de la resistencia entre los contactos debido a reacciones redox de la enzima con glucosa y con el polímero redox; y de éste con la película conmutadora de polianilina modificada.

Finalmente se analizaron los factores que determinan la velocidad de respuesta del dispositivo y la estabilidad del mismo en el tiempo.

La siguiente tesis se encuentra organizada de la siguiente manera:

En el capítulo 1 se describen antecedentes e historia de los transistores electroquímicos basados en películas poliméricas conmutadoras, sistemas químicos de reconocimiento molecular y mediadores redox solubles. El capítulo 2 trata sobre los fundamentos teóricos de los métodos experimentales utilizados, el equipamiento empleado y los métodos de preparación de los electrodos: electropolimerización y autoensamblado molecular.

Los capítulos 3 a 5 describen los resultados experimentales: desarrollo de un método de autodopado de la polianilina por sulfoión bajo control electroquímico con soluciones de sulfito de sodio y las propiedades de las películas resultantes; estudio de la dinámica de la oxidación y reducción de películas autoensambladas capa por capa de polielectrolito redox –polialilamina derivatizada con un complejo de osmio di-bipiridina bipiridina y poliestirensulfonato de sodio y finalmente la fabricación, caracterización y evidencias del funcionamiento del dispositivo de la capa de reconocimiento molecular y de la capa de conmutación completamente integrados. Finalmente en el capítulo 6 se encuentra una discusión global de los resultados y las conclusiones.

SUMMARY

The present Doctoral Thesis describes the design of a molecular recognition device specific to β -D-glucose in solution and the generation of an electrical signal by switching from insulating to conducting state a thin film of polyaniline self-doped by polystyrene sulfonate (PSS) or by electrochemical sulfonation of polyaniline (SPAN). The device works as a transistor or molecular switch. This is the first example of a molecular switch device where the molecular recognition and the signal generation steps are fully integrated with no need to add reagents (reagentless).

The molecular recognition layer comprises the enzyme glucose oxidase (GOx) and a redox mediator polymer (PAH-Os) while the switching layer is a modified polyaniline film (PANI-PSS or SPAN) on a surface gate with two gold microbands on silicon. When a potential difference is applied across the micro bands, the device responds specifically to glucose in solution with a sharp change of several orders of magnitude in the electrical resistance of the switching layer across the gap between the microbands.

A method for self-doping polyaniline by sulfonation under electrochemical control (SPAN) has been developed and this extends the working pH range of polyaniline to 5-7, this condition is required by the biomolecules employed. The results are similar to those obtained by doping polyaniline with polystyrene sulfonate (PANI-PSS).

The dynamics of layer-by-layer self assembled redox poly-electrolytes in the model system PAH-Os/PSS was studied using quartz crystal microbalance, ellipsometry, reflection-absorption IR-FTIR and probe beam deflection.

A fully integrated molecular switch or micro-transistor was developed, built and its response was fully characterized. It has been demonstrated that the mechanisms of operation are those expected according to design. That is, the switch of resistance across the microband contacts due to redox reactions of the enzyme with glucose and with the redox polymer; and reaction of this polymer with the switching layer of modified polyaniline. Finally, the factors that determine the rate of response of the device and its stability have been analyzed.

The following Thesis is organized as follows:

A description of background and history of electrochemical transistors based on switching polymer films, chemical recognition layers and soluble redox mediators are described in Chapter 1. Chapter 2 deals with the fundamentals and the theory of the experimental methods employed, the equipment and electrode preparation: electro-polymerization and molecular self-assembly.

Chapters 3 to 5 describe the experimental results: development of a self-doping method by sulfonation of aniline under electrochemical control in sodium sulfite solutions and the properties of the resulting films; the study of the oxidation-reduction dynamics of layer-by-layer self-assembled films comprised of redox polyelectrolyte (poly-allylamine derivatized with a complex of di-bipyridine-pyridine osmium and polystyrene sulfonate). Finally the fabrication, characterization and evidence of operation of the molecular recognition and switching layers fully integrated in the device. Chapter 6 contains a general and critical discussion of results and conclusions.

Este trabajo de tesis dió lugar a las siguientes publicaciones:

"Probe Beam Deflection study of ion exchange in self-assembled redox polyelectrolyte thin films", D.E. Grumelli, A. Wolosiuk, E. Forzani, G.A. Planes, C. Barbero, E.J. Calvo, *Chem. Comm.*, **2003**, 3014-3015.

"Microgravimetry of nucleophilic addition of sulfite to poly(aniline)"
D.E. Grumelli, E.S. Forzani, G.M. Morales, C.A. Barbero, E.J. Calvo, *Langmuir*, **2004**, 20, 2349-2355.

"Oxidation-reduction dynamics in layer-by-layer self-assembled redox polyelectrolyte multilayer modified electrodes", M. Tagliazucchi, D. Grumelli, C. Bonazzola, E.J. Calvo, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, en prensa, Febrero **2006**.

"Dynamics of ion exchange between self-assembled redox polyelectrolyte multilayer modified electrode and liquid electrolyte", D. Grumelli, E.J. Calvo, F. Garay, C. Barbero, en preparación, Febrero **2006**.

"Redox switching dynamics in LBL self-assembled Redox Active Polyelectrolyte Multilayers", D.E. Grumelli, E. Forzani, C. Bonazzola, E.J. Calvo, en preparación, Febrero **2006**.

Capítulo 1.- Introducción

1.1.	Transistores microelectroquímicos: un poco de historia	2
1.2.	Estrategia para el desarrollo de un transistor enzimático integrado	6
1.3.	Polímeros electroactivos	7
1.3.1.	Polímeros redox	9
1.3.2.	Polímeros iónicos	10
1.3.3.	Polímeros conductores	10
1.4.	La capa de reconocimiento molecular	14
1.4.1.	Componentes	15
1.4.2.	Construcción: autoensamblado electrostático capa por capa	17
1.4.3.	Comportamiento fisicoquímico de la película de reconocimiento	19
1.5.	La capa de conmutación	22
1.5.1.	Polianilina	22
1.5.2.	Propiedades electroquímicas	23
1.6.	Referencias	28

Capítulo 2.- Materiales y Métodos

2.1.	Técnicas empleadas. Fundamentos	34
2.1.1.	Técnicas electroquímicas	34
2.1.1.1.	Conceptos generales	34
2.1.1.2.	Celda electroquímica	34
2.1.1.3.	Potenciostato	35
2.1.1.4.	Cronoamperometría	36
2.1.1.5.	Voltametría cíclica	38
2.1.2.	Técnicas ópticas y espectroscópicas	44
2.1.2.1.	Elipsometría	44
2.1.2.2.	Deflectometría por gradiente de concentración (PDB)	48
2.1.2.3.	Espectroscopía infrarroja de absorción por reflexión por transformada de Fourier (FTIR-RAS)	51
2.1.3.	Técnicas gravimétricas	52
2.1.3.1.	Microbalanza de Cristal de Cuarzo (EQCM)	52

2.2.	Equipamiento empleado	56
2.2.1.	Potenciostato	56
2.2.2.	Microbalanza de Cristal de Cuarzo	56
2.2.3.	Elipsómetro	57
2.2.4.	Deflectómetro por gradiente de concentración (PBD)	57
2.2.5.	Espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier	58
2.2.6.	Perfilómetro	59
2.2.7.	Microscopio óptico	59
2.2.8.	Microscopio electroquímico de barrido	59
2.3.	Reactivos químicos, soluciones	59
2.4.	Electrodos y celdas	60
2.4.1.	Electrodos	60
2.4.2.	Celdas electroquímicas	61
2.5.	Procedimientos experimentales	62
2.5.1.	Limpieza de los electrodos de oro	62
2.5.2.	Polimerización de anilina y caracterización	62
2.5.2.1.	Caracterización de la polimerización y la sulfonación de anilina por EQCM	63
2.5.2.2.	Medidas de resistencia de la películas de PANI	63
2.5.3.	Construcción de la película de reconocimiento molecular y su caracterización	64
2.5.3.1.	Autoensamblado electrostático sobre PANI(PSS) y SPAN ...	64
2.5.3.2.	Evidencia EQCM del autoensamblado electrostático de (PAH-Os)/GOx	64
2.5.4.	Evidencia de funcionamiento del sistema químico integrado PANI(PSS)/PAH-Os/GOx o SPAN/PAH-Os/GOx	65
2.5.5.	Respuesta del transistor integrado	65
2.5.6.	Dinámica de la película de reconocimiento	65
2.5.6.1.	Preparación de las muestras para medidas elipsométricas, EQCM, PBD y FTIR-RAS	65
2.5.6.2.	Determinación de espesor del autoensamblado	66
2.5.6.2.	Medidas electroquímicas combinadas con elipsometría, EQCM, PBD y FTIR-RAS	66
2.6.	Referencias	66

Capítulo 3.- Polianilina Sulfonada (SPAN): Capa de Conmutación

3.1.	Introducción	70
3.2.	Electropolimerización de anilina	72
3.3.	Adición nucleofílica de iones bisulfito a polianilina	74
3.3.1.	Análisis de la presencia de sulfito por FTIR	77
3.3.2.	Determinación de la masa molar de la especie adicionada	77
3.3.3.	Velocidad de adición nucleofílica	78
3.3.4.	Determinación del grado de sulfonación	78
3.4.	Efecto de la sulfonación sobre las propiedades del polímero	79
3.4.1.	Respuesta electroquímica	79
3.4.2.	Intercambio iónico	80
3.4.3.	Efecto del pH sobre los procesos redox	83
3.4.4.	Electroactividad a pHs cercanos a la neutralidad	86
3.5.	Conclusiones	87
3.6.	Referencias	87

Capítulo 4.- Dinámica de la Película de Reconocimiento

4.1.	Introducción	91
4.2.	Caracterización de las películas autoensambladas	92
4.2.1.	Elipsometría durante la formación del autoensamblado PAH-Os/ PSS.	93
4.2.2.	Voltametría cíclica de las películas (PAH-Os)/ (PSS)	93
4.3.	Estudio de la dinámica de oxidación-reducción de las películas autoensambladas	94
4.3.1.	Intercambio iónico: resultados de PBD	95
4.3.2.	Cambios de masa: resultados de EQCM	104
4.3.3.	Cambios de espesor: resultados de elipsometría	108
4.3.4.	Incremento de la banda de agua en FTIR	110
4.4.	Conclusiones	111
4.5.	Referencias	112

Capítulo 5.- Fabricación, Caracterización y Funcionamiento del Dispositivo de Reconocimiento Molecular: "Transistor Molecular"

5.1.	Introducción	115
5.2.	Fabricación del transistor molecular.....	115

5.2.1.	Limpieza y caracterización electroquímica de las microbandas de oro	116
5.2.2.	Capa de conmutación: polimerización de anilina (modificación electroquímica de las microbandas de oro)	118
5.2.3.	Capa de reconocimiento molecular: autoensamblado electrostático capa por capa de PAH-Os- Gox	120
5.3.	Caracterización del transistor molecular	120
5.3.1.	Caracterización de la capa de conmutación: PANI(PSS) o SPAN depositadas sobre microelectrodos de oro	120
5.3.2.	Evidencia de autoensamblado de PAH-Os/ GOx sobre películas de polianilina	126
5.3.3.	Evidencia de la comunicación eléctrica entre PAH-Os en el autoensamblado y polianilinas	129
5.3.4.	Medidas de resistencia de películas de SPAN y SPAN/ PAH-Os/GOx.	130
5.4.	Funcionamiento del sistema químico integrado	134
5.4.1.	Medidas de potencial a circuito abierto	134
5.4.2.	Mediciones de corriente catalítica a distintas concentraciones de glucosa para el sistema integrado	137
5.4.3.	Medida de corriente de drenaje del sistema integrado	139
5.4.4.	Velocidad de respuesta y estabilidad del transistor	140
5.5.	Conclusiones	141
5.6.	Referencias	142

Capítulo 6.- Discusión y Conclusiones

6.1.	Discusión	144
6.1.1.	Integración de los componentes para la construcción de un transistor molecular	144
6.1.1.1.	Propagación de la carga dentro de la película de SPAN	144
6.1.1.2.	Reacción interfacial [Os(II)/SPAN(ox)]. Influencia de distintos mediadores (mediador inmovilizado y en solución)	149
6.1.1.3.	Carga inyectada por la reacción catalítica.	160
6.2.	Conclusiones	163
6.3.	Referencias	164

En el presente capítulo se hará una breve descripción de los antecedentes e historia de los transistores químicos y su extensión a la utilización de los mismos con sistemas biológicos. Se describirá una nueva estrategia de construcción de un transistor molecular completamente integrado que responde a glucosa y en base a ello se detallarán aspectos generales de los componentes que conforman el dispositivo: polímeros conductores (polianilina), polímeros redox (polialiamina modificada con un complejo de osmio) y enzimas (glucosa oxidasa).

1.1.- Transistores microelectroquímicos: un poco de historia.

Los transistores convencionales son dispositivos electrónicos ampliamente utilizados desde su aparición en 1947, la que cambió radicalmente el interés en esta área. Básicamente se trata de dispositivos de estado sólido contruidos con materiales semiconductores de tipo n y de tipo p. Poseen tres terminales siendo una de ellas la que controla a las otras dos. Existen distintos tipos de transistores, a) transistor de unión bipolar (BJT) que puede ser npn o pnp, y b) transistor de efecto de campo (FET) que a su vez puede ser, de unión (JFET) o de semiconductor metal-óxido (MOSFET). El primer transistor químico fue desarrollado en el año 1984 por Mark Wrighton y sus colaboradores [1]. Informaron la fabricación de un arreglo de microelectrodos derivatizados que puede funcionar como un transistor cuando se encuentra inmerso en una solución electrolítica. En la figura 1 se muestra un esquema del dispositivo y los elementos del circuito externo para caracterizarlo. La capa de SiO_2 posee $0,45 \mu\text{m}$ de espesor y el sustrato de Si, $0,3 \text{ mm}$ de espesor. Los electrodos fuente (source), puerta (gate) y drenaje (drain) consisten en una película de oro de $3 \mu\text{m}$ de ancho, $140 \mu\text{m}$ de largo y $0,12 \mu\text{m}$ de espesor, recubiertos por una capa de polipirrol. Este arreglo de contraelectrodo y de electrodo de referencia, se encuentran sumergidos en una solución electrolítica.

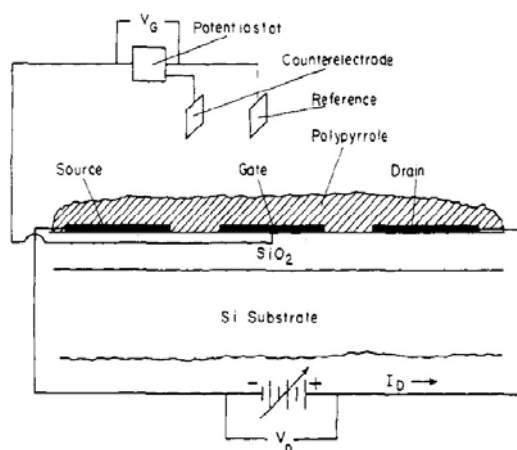


Figura 1

Corte transversal del primer transistor químico y representación de los elementos del circuito que lo caracterizan.

Este transistor químico consiste en una película de polipirrol depositada a lo largo de tres microelectrodos de oro separados entre si por $1,5\ \mu\text{m}$. Por analogía con un FET los tres electrodos se refieren a drenaje, puerta y fuente (drain, gate y source, respectivamente). Entonces, utilizando el electrodo central como "gate" (es indistinto usar cualquiera de los tres) puede cambiarse el estado redox de la películas y así cambiar la conductividad del polímero conductor. Esto es, cuando E_{gate} es 200 mV vs ECS, el polipirrol está en su estado aislante y no fluye corriente entre los electrodos "source" y "drain" a una dado E_{drain} entre ellos. Entonces el dispositivo está apagado. Cuando el E_{gate} se cambia a valores más positivos el polipirrol empieza a conducir, al aplicar una diferencia de potencial entre el drenaje y la fuente, circula una corriente I_{drain} entre dichos electrodos a través de la película de polipirrol. En este momento se dice que el dispositivo está encendido. En estos dispositivos, una pequeña señal aplicada al electrodo compuerta conduce a un gran cambio de corriente de drenaje que fluye a través del polímero. El dispositivo amplifica la señal como lo hace un FET.

Posteriormente Wrighton extendió la idea de activar el dispositivo molecular mediante reacciones químicas [2] y por lo tanto usarlo como biosensor químico; en lugar de cambiar el estado redox del polímero mediante un circuito eléctrico externo, hacerlo mediante la oxidación-reducción de especies en solución y sensar el cambio midiendo la I_{drain} . En este caso, la reacción química cambia el dispositivo entre las formas apagado-encendido.

Los primeros ejemplos de este tipo de sensores fueron desarrollados para detectar O_2 y/o H_2 utilizando, además, partículas de platino para acelerar la reacción. En estos ejemplos, las partículas catalizadoras de platino no funcionan de manera selectiva como lo pueden hacer las enzimas; que son los catalizadores biológicos selectivos por excelencia.

El primer transistor enzimático fue desarrollado por Matsue [3]. En dicho dispositivo depositaron un copolímero de pirrol y N- metil pirrol conteniendo la enzima diaforasa entre un par de microbandas. Como mediador entre la enzima y el copolímero utilizaron en solución antraquinona-2-sulfonato y luego $\beta\text{-NADH}$. La acción catalizadora de la enzima reduce al co-polímero cambiando su estado de conducción y, por lo tanto, pasando al dispositivo del estado apagado a encendido. Bartlett y sus colegas [4] desarrollaron un transistor de polianilina con glucosa oxidasa inmovilizada sobre otro polímero aislante y usando como mediador tetratíofulvaleno (TTF) en solución. Depositaron una película de polianilina (PANI) desde una solución ácida entre un par de microbandas de carbono separadas $20\ \mu\text{m}$. La enzima Glucosa Oxidasa (GOx) fue inmovilizada sobre una película aislante de poli-1,2- diminobenceno electropolimerizada sobre PANI. Esta película cumple la doble función de inmovilizar la enzima sobre la superficie de PANI y proveer algún tipo de selectividad sobre posibles

interferencias de especies en solución. En la figura 2 se esquematiza la construcción y el modo de operación del transistor microelectroquímico enzimático sensible a glucosa [5].

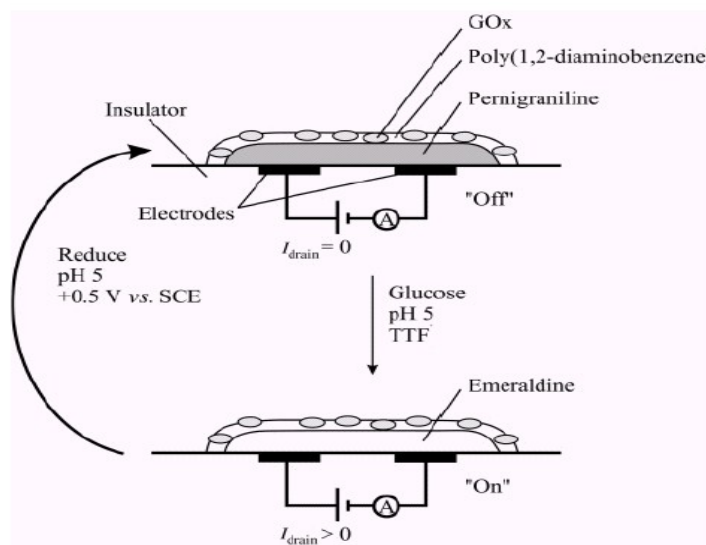
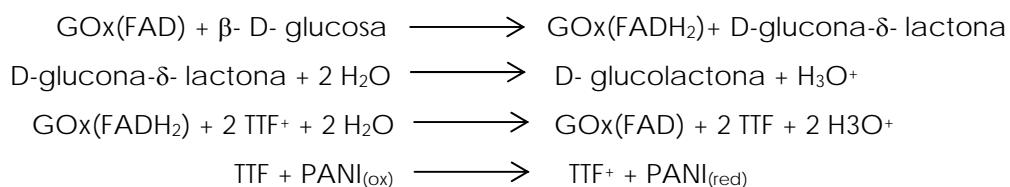


Figura 2

Construcción y modo de operación del transistor microelectroquímico enzimático sensible a glucosa a pH 5. En presencia de glucosa, el dispositivo pasa de su forma apagada a encendida y puede volverse al estado inicial bajo oxidación electroquímica.

Al agregar glucosa al sistema, ocurre la siguiente secuencia de reacciones:



Donde PANI_(ox) representa la forma completamente oxidada, aislante, de PANI (pernigranilina), PANI_(red) es estado de oxidación intermedio, conductora, (emeraldina). GOx(red) y GOx(ox) es la enzima glucosa oxidasa en los estados reducidos y oxidados respectivamente; mientras que el mediador utilizado es Tetratiofulvaleno (TTF). De esta forma, la enzima que cataliza la reacción de oxidación de glucosa produce la apertura del dispositivo. Finalmente el dispositivo puede volverse a su estado inicial mediante la oxidación electroquímica de PANI a su estado pernigranilina.

Entre cada medida el dispositivo se regresa a su estado inicial mediante oxidación electroquímica. Las medidas se realizaron a un E_{drain} de 20 mV en buffer pH 5. La adición de glucosa en cada caso se realizó a tiempo cero. Cuando no hay

glucosa en el medio, la i_{drain} que fluye entre los dos microelectrodos es muy baja y no se observa cambio en su valor. Al agregar glucosa se incrementa la corriente con el tiempo hasta llegar a un *plateau*. El tiempo en el cual el dispositivo cambia su estado y la velocidad máxima de cambio S_{max} (pendiente máxima del gráfico de corriente vs. tiempo) depende de la concentración de glucosa. El gráfico insertado en la figura 3 corresponde a una curva de calibración para este dispositivo.

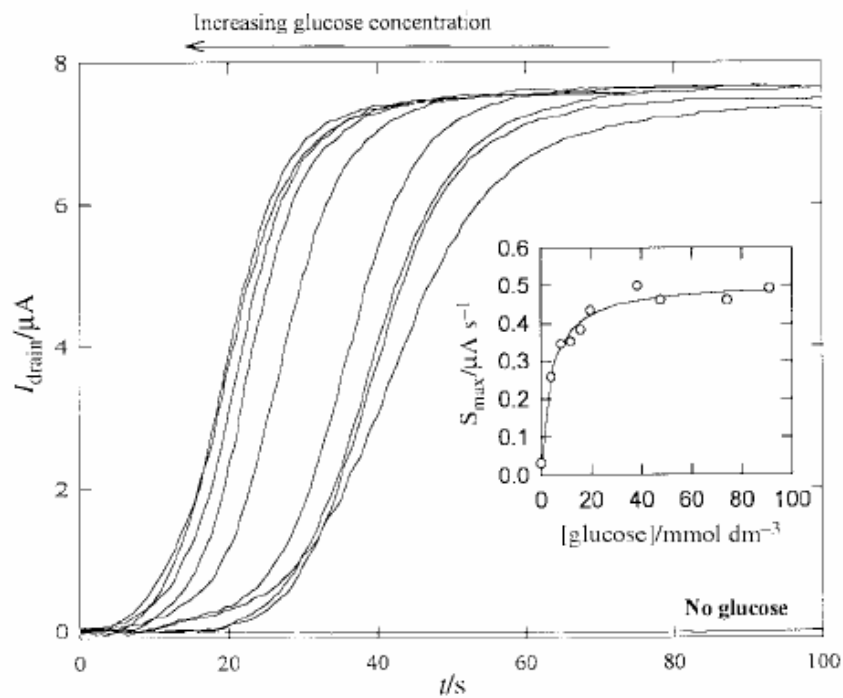


Figura 3

Conjunto de curvas i_{drain} vs t para distintos agregados de glucosa. El grafico insertado corresponde a la curva de calibración del dispositivo. Extraído de referencia [6].

La velocidad a la cual aumenta la i_{drain} cuando se expone el transistor a glucosa y el tiempo que demora el mismo en pasar de la forma apagado/ encendido, dependen de la concentración de analito. En la figura 3 se muestra un conjunto de curvas de transitorios de i_{drain} a diferentes concentraciones de glucosa para el mismo dispositivo [6].

Lo más importante para destacar en este punto es que el dispositivo puede ser reutilizado al menos nueve veces sin pérdida apreciable en su capacidad de funcionamiento.

1.2.- Estrategia para el desarrollo de un transistor enzimático integrado.

El transistor microelectroquímico enzimático propuesto en este trabajo tiene la particularidad de contener todos los componentes: el polímero conductor, la enzima y el mediador entre ambos, completamente integrados en un mismo dispositivo.

Como se representa esquemáticamente en la figura 4, el dispositivo consiste en una capa de reconocimiento molecular, una capa de conmutación y una reacción química que comunica las dos capas entre sí.

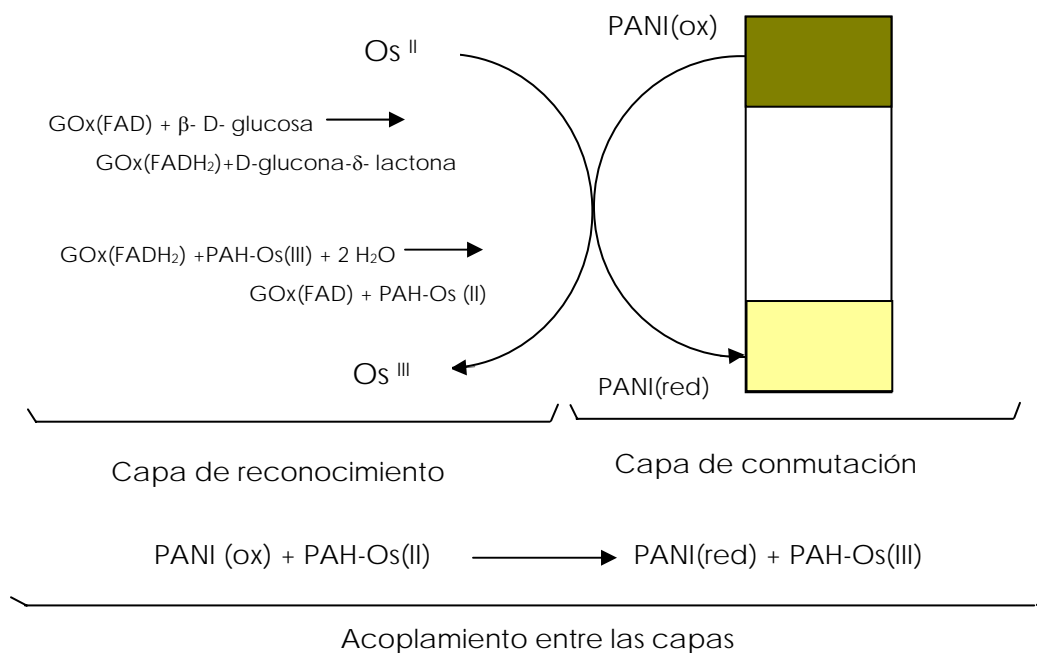
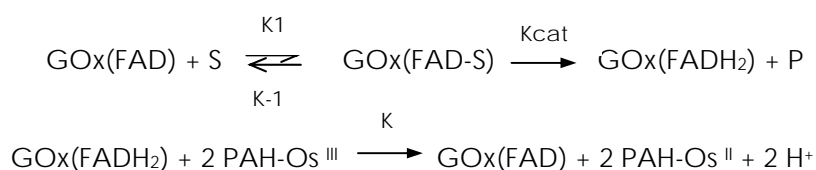


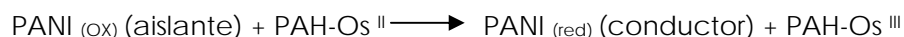
Figura 4
Estrategia para la construcción del transistor molecular

La **capa de reconocimiento molecular** consta del sistema enzimático y un polímero redox que actúa como cable molecular. Más precisamente, se compone de la enzima glucosa oxidasa (GOx) y polialiamina modificada con un complejo de Osmio-piridina (PAH-Os). Cuando se agrega glucosa (sustrato de la enzima, S) a la capa de reconocimiento, ésta reduce los grupos FAD de la enzima glucosa oxidasa a la forma FADH₂ y se forma ácido glucónico como producto P. La enzima es regenerada a partir de la reacción con el mediador presente en la misma película siguiendo el siguiente esquema de reacción.



La **capa de conmutación** está compuesta por un polímero conductor que tiene la propiedad de cambiar varios órdenes de magnitud su conductividad al cambiar su estado de oxidación. Cuando esta capa recibe el "mensaje" de la capa de reconocimiento molecular, conmuta de la forma "off" a la forma "on", con lo cual el dispositivo es activado, y de esta manera puede detectarse una corriente relacionada con la cantidad de sustrato adicionada. El polímero conductor en nuestro sistema es polianilina en sus formas completamente oxidada aislante (pernigranilina) y en una forma intermedia conductora (emeraldina). PANI cambia del estado oxidado (aislante) al estado intermedio (conductor) cuando el sustrato se adiciona al medio.

El acoplamiento entre las capas de reconocimiento molecular y de conmutación se realiza mediante la reacción entre PAH-Os en la capa de reconocimiento y PANI en la capa de conmutación. La reacción que ocurre es la siguiente:



Esto es, los grupos Os(II) formados en la capa de reconocimiento reaccionan con PANI en el estado oxidado para generar Os(III) y PANI en un estado más reducido en el cual es conductora. Como resultado circula una corriente que al ser detectada puede relacionarse con la concentración de glucosa que desencadenó esta serie de cambios.

1.3.- Polímeros electroactivos.

Los polímeros electroactivos pueden dividirse en tres clases: los *polímeros redox* que consisten en una matriz polimérica electrónicamente aislante a la cual se encuentran unidos grupos redox [7-10], los *polímeros conjugados* tales como polianilina, polipirrol, etc. que poseen un sistema extendido de electrones π los que pueden removerse o agregarse de acuerdo a inyecciones externas [11-17] y los *polímeros iónicos* que incorporan especies redox por intercambio iónico.

Los polímeros electroactivos suelen depositarse sobre electrodos formando películas con características muy particulares. Durante la oxido-reducción de esta película la matriz debe mantener la electroneutralidad, y esto se logra por el movimiento de los iones de la solución de electrolito, desde ó hacia la película polimérica. Las propiedades de los polímeros como membranas quedan definidas por el tipo, la concentración y la movilidad de los iones dentro de la película [18].

En la figura 5 se muestra el estado de equilibrio eléctrico de un electrodo (Me) cubierto por una película de un polímero con carga fija. El electrolito presente es

electroinactivo; el potencial E del electrodo se mide con respecto a un electrodo de referencia, esto es, el potencial medido es la diferencia de potencial entre el electrodo (ϕ_{Me}) y la solución (ϕ_s): $E = \phi_{Me} - \phi_s$. La película polimérica actúa como una membrana y divide esta caída de potencial en dos regiones: (1) ($\phi_{Me} - \phi_{poli}$) que corresponde a la doble capa eléctrica formada entre el electrodo y el polímero, y (2) ($\phi_{poli} - \phi_s$) que se refiere a la diferencia de potencial entre la película y la solución; esta diferencia de potencial recibe el nombre de Potencial Donnan, $\Delta\phi_D$ [19-22].

Si se aplica un potencial E sobre el electrodo, éste será polarizado. Suponiendo que no hay circulación de corriente, la diferencia de potencial $\phi_{poli} - \phi_s$ se mantiene prácticamente constante. Variando el potencia E variará la diferencia de potencial entre el electrodo y el polímero $\Delta E = \phi_{Me} - \phi_{poli}$. Si el polímero es electroactivo, puede ser oxidado y reducido y así la reacción de transferencia de carga ocurre en la interfase electrodo/ polímero [23-25].

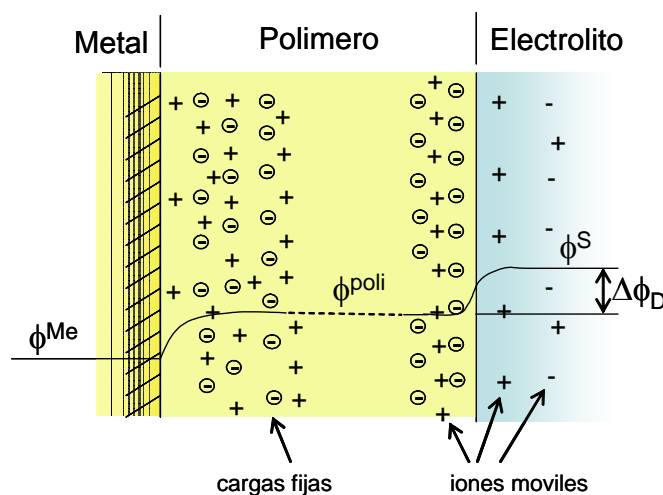
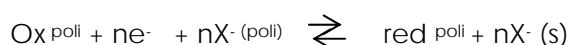


Figura 5

Perfiles de potencial eléctrico (ϕ) a lo largo de un electrodo cubierto con un polímero electroactivo en contacto con una solución de electrolito. Las cargas negativas fijas corresponden a potencial Donnan ($\Delta\phi_D$) negativo en la interfase polímero/solución.

La reacción de transferencia de carga entre el sustrato metálico (Me) y los sitios redox del polímero (ox^{poli} , red^{poli}) involucra la incorporación/ expulsión de iones para compensar la carga:



donde $n = Z_{ox} - Z_{red}$. El estado de equilibrio del sistema queda definido por los potenciales electroquímicos igualados.

$$\mu_{ox}^{poli} + n\mu_{e^-}^{Me} + n\mu_X^{poli} = \mu_{red}^{poli} + n\mu_X^s \quad (1)$$

Y de la definición de potencial electroquímico se obtiene:

$$\phi^{Me} - \phi^{poli} = \frac{1}{nF} (\mu_{ox}^{poli} + \mu_{e^{-}}^{Me} - \mu_{red}^{poli}) \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}^{poli}}{a_{red}^{poli}} \quad (2)$$

El potencial (medido con un electrodo de referencia sumergido en el electrolito) de un electrodo cubierto con una película de un polímero electroactivo es:

$$E = (\phi^{Me} - \phi^{poli}) + (\phi^{poli} - \phi^s) - \phi_{ref} \quad (3)$$

Donde ϕ_{ref} es la diferencia de potencial entre el electrodo y la solución a $E=0$. De aquí se ve que si se mantiene constante $(\phi^{Me} - \phi^{poli})$, entonces el potencial de equilibrio del polímero tiene una dependencia lineal con el potencial Donnan $(\phi^{poli} - \phi^s)$. Para polímeros electroactivos con carga fija, el potencial Donnan es un parámetro muy importante para evaluar las propiedades de membrana de los mismos cuando están en contacto con una solución de un electrolito.

El potencial formal de polímeros electroactivos, $E^{0'}$, cambia con la concentración de electrolito, y esto produce variaciones en $\Delta\phi_D$; a partir del signo del potencial Donnan se puede determinar el tipo de intercambio iónico del polímero. Por ejemplo, cuando la concentración del electrolito disminuye $|\Delta\phi_D|$ aumenta, si $E^{0'}$ se desplaza a valores más positivos, el polímero intercambia cationes; mientras que si $E^{0'}$ se desplaza hacia valores mas negativos el polímero intercambia aniones.

1.3.1.- Polímeros redox.

Los polímeros redox son cadenas poliméricas electroquímicamente inactivas que poseen grupos activos redox unidos covalentemente. En estos materiales la transferencia de electrones ocurre a través de un proceso secuencial de auto intercambio de electrones entre grupos redox vecinos. Esto se conoce como "*electron-hopping*". Los polímeros redox presentan conductividad sólo en un pequeño intervalo de potencial y el máximo de conductividad ocurre cuando las formas oxidadas y reducidas poseen la misma concentración. Esta situación tiene lugar al potencial formal de reducción de los centros redox en el polímero. El "*electron-hopping*" en una película formada por un polímero redox puede ser considerado como un proceso de dos etapas que involucran el transporte de carga a través de la película. En la primera etapa ocurre la inyección de carga en la interfase electrodo/polímero. La segunda etapa involucra la penetración de la carga por

medio de auto intercambio o salto de electrones a través de las capas. Estos procesos ocurren entre sitios redox que se encuentran cercanos entre sí [7].

1.3.2.- Polímeros iónicos.

Los polímeros iónicos poseen especies redox activas incorporadas electrostáticamente. En estos polímeros el sitio redox activo es un contraión (anión o catión). En este caso la conductividad viene dada por el movimiento de los electrones entre los sitios redox fijos, que permanecen inmóviles o por medio de difusión de las moléculas redox incorporadas, seguido por "*electron-hopping*" [20].

1.3.3.- Polímeros conductores.

Los polímeros conductores o "metales sintéticos" son materiales poliméricos orgánicos que poseen las mismas propiedades eléctricas, electrónicas, magnéticas y ópticas de los metales pero que retienen las propiedades mecánicas y de procesabilidad asociadas a los polímeros [27]. Los polímeros conductores más conocidos se muestran en la figura 6.

Desde la aparición de los primeros polímeros conductores, surgió un nuevo campo de investigación que experimentó un rápido crecimiento. Esto se encuentra estimulado por el interés interdisciplinario (tanto de químicos, electroquímicos, bioquímicos, físicos teóricos y experimentales como ingenieros entre otros) que despierta este campo por las importantes aplicaciones tecnológicas que poseen dichos materiales. Ellos ofrecen una combinación de propiedades no conocidas en otros materiales.

Todos los polímeros conjugados pueden ser dopados ya sea química o electroquímicamente. Aquellos que incrementan su conductividad en varios órdenes de magnitud al ser dopados reciben el nombre de *polímeros conductores*. La figura 7 ilustra el incremento en la conductividad obtenido por dopado.

El proceso de dopado involucra una adición (reducción) o remoción (oxidación) parcial de los electrones desde o hacia el sistema π de la cadena polimérica. El concepto de dopado es el único aspecto que distingue a los polímeros conductores del resto de los polímeros electroactivos. Durante el proceso de dopado un polímero experimenta un cambio muy brusco en su conductividad (pasando desde $10^{-10} / 10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ al régimen metálico con conductividades del orden de $1 / 10^4 \text{ S cm}^{-1}$). La inyección de carga por dopado conduce a una amplia variedad de importantes e interesantes fenómenos. Por lo tanto, el tipo de dopado de un polímero



Estructura química de los polimeros conjugados mas conocidos. Extraído y modificado de referencia [28].

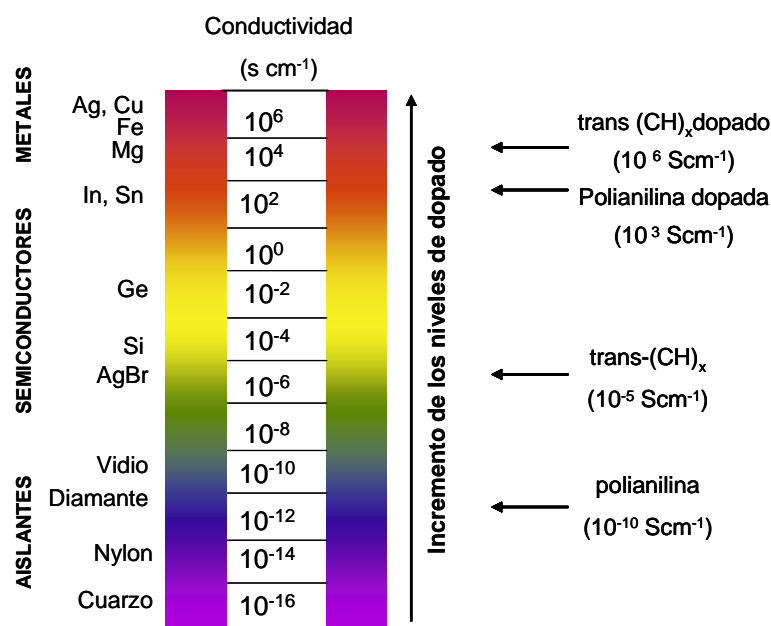


Figura 7

Escala de valores de conductividad de distintos materiales. Demostración grafica del incremento de conductividad con el dopado. Figura extraída y modificada de referencia [27]

El proceso de dopado involucra una adición (reducción) o remoción (oxidación) parcial de los electrones desde o hacia el sistema π de la cadena polimérica. El concepto de dopado es el único tema que distingue a los polímeros conductores del resto de los polímeros electroactivos. Durante el proceso de dopado un polímero experimenta un cambio muy brusco en su conductividad (pasando desde 10^{-10} a 10^{-5} S cm⁻¹ al régimen metálico con conductividades del orden de 1 a 10^4 S cm⁻¹). La inyección de carga por dopado conduce a una amplia variedad e importantes e interesantes fenómenos. Por lo tanto, el tipo de dopado de un polímero determina su posible aplicación. En la figura 8 se muestran los posibles tipos de dopado y las posibles aplicaciones del polímero conjugado dopado de esta manera [28].

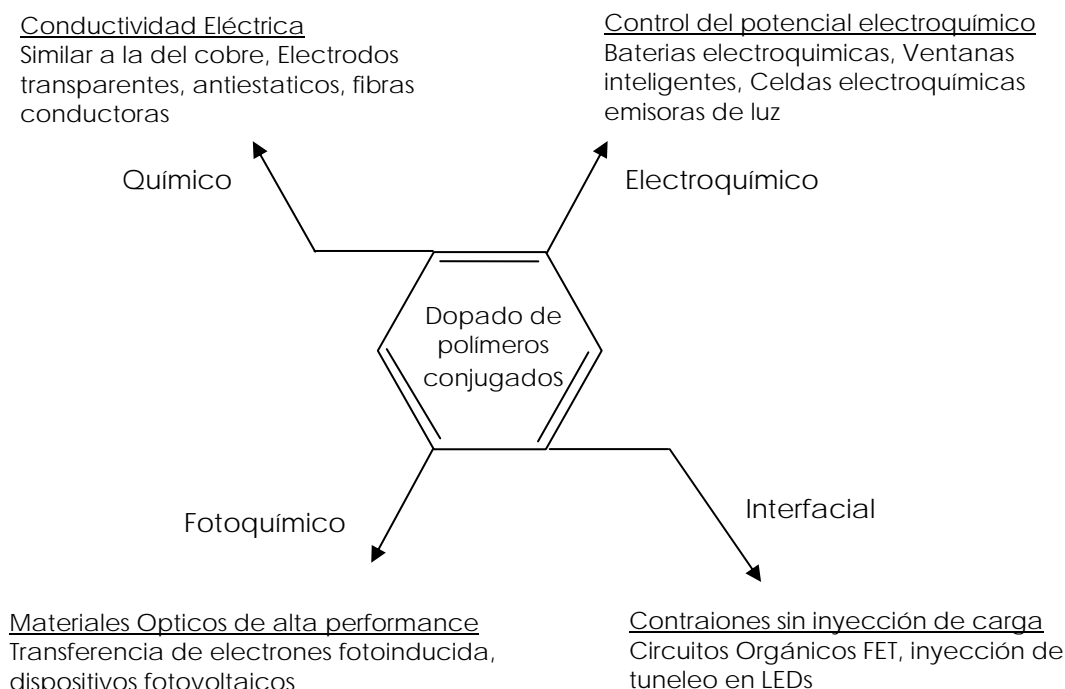


Figura 8

Distintos tipos de dopado de polimeros conjugados y sus aplicaciones según la forma de dopado. Figura extraida y adaptada de referencia [28].

La **conducción eléctrica en polimeros conductores** es el resultado de la existencia de portadores de carga (que aparecen en el dopado) y de la habilidad que poseen estos portadores de carga para desplazarse a lo largo del sistema π conjugado. Los polimeros conjugados cuando se encuentran dopados son buenos conductores eléctricos por las siguientes razones:

a) por la introducción de portadores dentro de la estructura electrónica, ya que cada unidad repetitiva del polímero conjugado es un sitio redox activo, puede ser dopado tipo p (oxidación) o tipo n (reducción).

b) los enlaces π - π conjugados conducen a la deslocalización de los electrones π a lo largo de la cadena del polímero y a la posibilidad de mover los portadores de carga en la misma, lo cual se extiende a un transporte en tres dimensiones debido a la transferencia electrónica entre cadenas [29].

Los polímeros saturados son aislantes porque no es posible el movimiento libre de los electrones. La promoción de electrones de un orbital π a un orbital π^* involucra una cantidad tan alta de energía, que antes de movilizarse este electrón el polímero se degrada por ruptura de los enlaces σ . En cambio en los polímeros con dobles enlaces conjugados la situación es diferente: tres de los cuatro electrones de valencia

de un átomo de carbono forman los enlaces σ (estados híbridos sp^2). Por otro lado, cada átomo de carbono posee un orbital p ; las funciones de onda de los electrones p se solapan formando una nube π deslocalizada. La deslocalización de carga en el estado conductor no se extiende a la totalidad de la cadena polimérica, si no sólo a pequeñas regiones p . Dado que cada átomo de carbono tiene un electrón π , esta banda debería estar la mitad llena y mitad vacía, esperando de esta manera un comportamiento metálico en este tipo de polímeros. No obstante la energía del sistema disminuye si se incrementa la densidad electrónica entre pares de átomos de carbono alternados. Aparece entonces una brecha en el medio de la banda π , separando ésta en estados enlazantes ocupados (banda π) y estados antienlazantes desocupados (banda π^*). Esto es conocido como dimerización de la cadena [30]. Se tendrá un comportamiento metálico cuando existan enlaces conjugados asociados con electrones de valencia relativamente libres, y en el caso de que pueda eliminarse la brecha entre los estados ocupados y desocupados, esto puede lograrse por medio del dopado; lo cual forma una densidad finita de estados metálicos. La teoría que explica esta manera de conducir de los polímeros conductores, recibe el nombre de Teoría de Bandas.

Sin embargo, la teoría de bandas no tiene en cuenta las zonas amorfas de los polímeros a través de las cuales debe pasar también la corriente. O sea, para explicar la conductividad de los polímeros conductores es necesario también tener en cuenta que las cadenas poliméricas no se encuentran alineadas en su totalidad, si no que solo lo están en pequeñas regiones. La primera evidencia acerca de la naturaleza heterogénea de la conducción fue reportada por Park y Col [31], posteriormente desarrollada por Epstein [32] y Travers y Col [33].

1.4.- La capa de reconocimiento molecular.

El sistema compuesto por la enzima glucosa oxidasa y polialiamina modificada con el complejo de osmio-piridina fue exhaustivamente estudiado previamente en el laboratorio. A continuación se hará un breve resumen acerca de los componentes que lo integran, la forma de construcción de esta capa y su funcionamiento como capa de reconocimiento molecular.

1.4.1.- Componentes.

La **enzima glucosa oxidasa (GOx)** (β -D glucosa 1- oxidoreductasa, EC 1.1.3.4) cataliza la reacción de β -D-Glucosa a ácido D-Glucónico y H_2O_2 , siendo el oxígeno molecular el aceptor de electrones. En la figura 9 se muestra la estructura química del sustrato y la reacción catalizada por GOx.

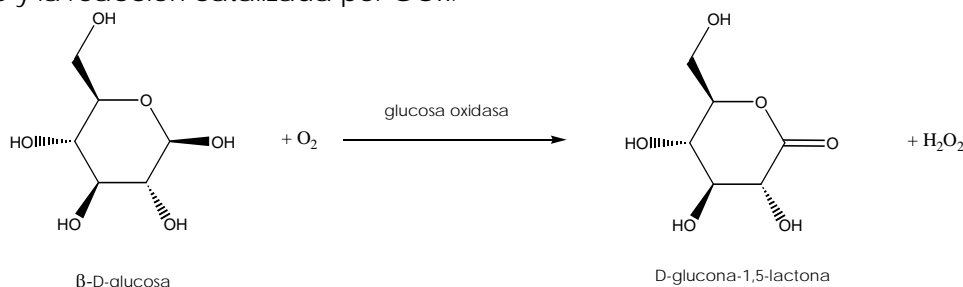


Figura 9

Reacción que cataliza la enzima glucosa oxidasa.

La enzima glucosa oxidasa (GOx) es una proteína dimérica de peso molecular 160 KDa. Posee dos subunidades idénticas (cada una de 80 KD). Los monómeros no están ligados entre sí por uniones covalentes sino por una larga pero angosta área de contacto. Posee una unión fuerte, no covalente ($K = 10^{-10}$) con un grupo de flavina adenina dinucleótido (FAD) por monómero que actúa como co-factor. Se encuentra altamente glicosilada con un contenido de carbohidratos de 16 % (p/p) aproximadamente, siendo manosa el 80 % p/p de los carbohidratos.

La molécula monomérica es un esferoide compacto y sus dimensiones son $60 \text{ \AA} \times 52 \text{ \AA} \times 37 \text{ \AA}$, aproximadamente. El monómero se pliega en dos dominios estructurales de los cuales uno se encuentra unido a FAD y el otro está involucrado con la unión al sustrato. El dímero posee dimensiones de $70 \text{ \AA} \times 55 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA}$. En la figura 10 se muestran las estructuras de la enzima.

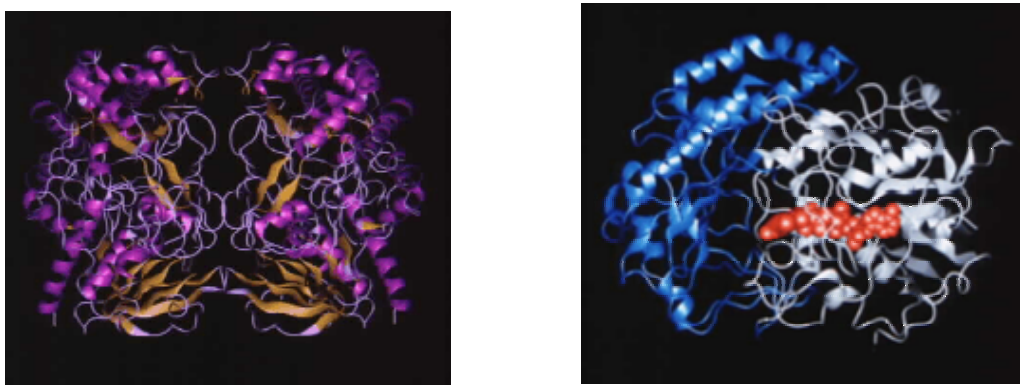


Figura 10

Estructura cristalina de glucosa oxidasa de *A. Niger*. a) Estructura del homodímero. b) Vista central del área de contacto entre monómeros. En rojo se detalla la ubicación del grupo prostético FAD.

La proteína se solubiliza en buffer fosfato 0,1 M pH 7 dando una solución de color amarillo clara. El coeficiente de extinción es $1,26 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm. El punto isoeléctrico (pI) de la proteína es 4,5, lo cual muestra que la enzima es ácida.

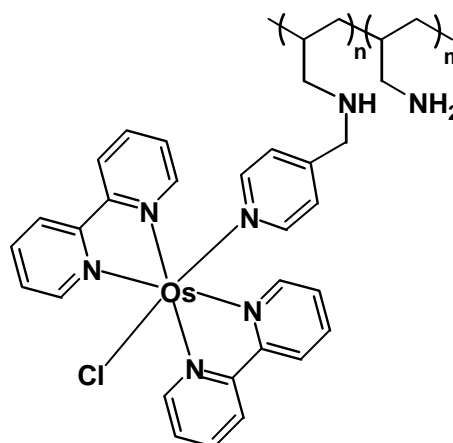
Su cofactor, FAD, junto con el FMN (flavina adenin mononucleotido) son las coenzimas redox mas versátiles. Son fuertes agentes oxidantes que pueden ser reducidas por procesos que involucran uno o dos electrones. La forma reducida del cofactor (FADH_2) puede ser reoxidado a FAD por oxígeno molecular. El centro activo redox de FAD es el sistema de anillo de la isoaloxacina.

GOx es excretada por el hongo *Apergillus Niger* y por *Penicillum*. Es ampliamente utilizada para la determinación de glucosa en los fluidos corporales y para remover glucosa y oxígeno de bebidas y productos alimenticios. Además se utiliza para la producción de ácido glucónico.

La enzima muestra ser muy específica para β - D- Glucosa aunque también 2-desoxi -D- glucosa, D- manosa y D- fructuosa pueden ser oxidadas, aunque a una velocidad menor [34].

Otro componente de la capa de reconocimiento molecular es un complejo de osmio unido covalentemente a un polímero (PAH), **polialiamina -Osmio-Piridina (PAH-Os)**. La síntesis de este polímero redox ha sido desarrollada en el laboratorio previamente y se ha realizado varias veces obteniendo resultados reproducibles. Se obtiene un polímero redox constituido por una matriz aislante con grupos redox (complejo de osmio) covalentemente unidos a la matriz [35].

Este polímero redox tiene doble ventaja. En primer lugar se trata de un material polimérico que posee una carga asociada con lo cual puede ser utilizado para la construcción de películas autoensambladas electrostáticamente. En segundo lugar PAH-Os posee un centro redox compuesto por la cupla Os (II)/ Os (III). Esta característica es muy útil para utilizarlo como cable molecular que actúa entre la reacción enzimática y el electrodo o la capa de conmutación.



La voltametría cíclica de PAH-Os presenta cierta dependencia con el pH, sin embargo, PAH-Os es usada en este trabajo y en la mayoría de las aplicaciones en

biosensores y su electroquímica es básicamente estudiada a pH cercanos a la neutralidad.

En la figura 11 se muestra la respuesta electroquímica típica de PAH-Os en solución buffer pH 7, autoensamblada sobre un electrodo de oro previamente modificado con ácido 3-mercaptopropansulfonato.

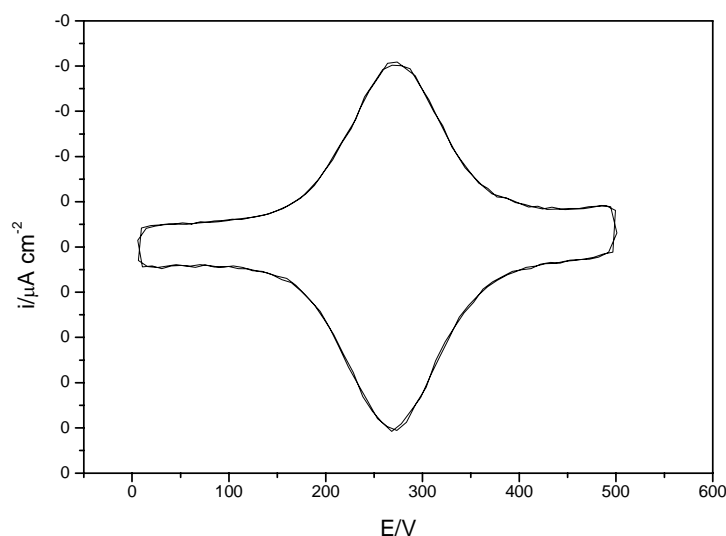


Figura 11

Voltametría cíclica de una monocapa de PAH-Os sobre un electrodo de oro, realizada a 50 mV/seg en una solución buffer pH 7

1.4.2. – Construcción: autoensamblado electrostático capa por capa.

Esta técnica fue incorporada por Decher en el año 1992 [36-37] e involucra la adsorción alternada de polielectrolitos cargados desde soluciones acuosas de los mismos. En la figura 12 se muestra un esquema simplificado del proceso de autoensamblado electrostático capa por capa. Se comienza con un sustrato que tiene una cierta densidad de carga superficial, los pasos 1 y 3 representan la adsorción del polianión y del polianión (suponiendo negativa la carga inicial del sustrato) mientras que los pasos 2 y 4 representan etapas de lavado. Así es posible obtener multicapas de dos componentes.

La técnica de deposición capa por capa básicamente involucra la adsorción de una sola especie en cada paso dando lugar a la formación de una película en multicapas con una secuencia definida o sea que la película multicomponente se fabrica a partir de varios pasos de adsorción. El hecho de que puedan fabricarse películas multicapas se basa en el fenómeno de sobrecompensación de carga que ocurre durante el autoensamblado. Cuando se adsorbe una molécula, ésta

interacciona electrostáticamente con las cargas de la superficie, pero también deja expuesto un exceso de carga, así la capa de carga opuesta que se pegará seguidamente tendrá carga superficial opuesta y expondrá también un exceso de carga. De esta manera se logra la formación de multicapas.

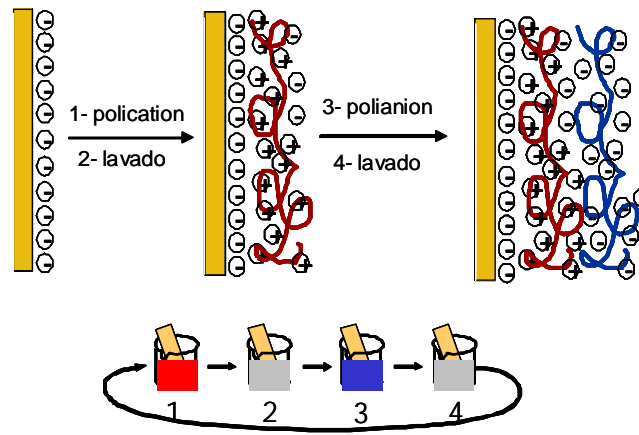


Figura 12

Representación esquemática del proceso de autoensamblado electrostático capa por capa.

Muchos materiales pueden ser usados para la deposición capa por capa; desde pequeñas moléculas a macromoléculas, biomacromoléculas como proteínas o ADN y coloides. La fuerza impulsora para la construcción de la mayoría de las películas multicapa es la atracción electrostática de los materiales empleados; pero también pueden utilizarse exitosamente otro tipo de interacciones tales como interacción donador/aceptor [38- 39], enlaces puente de hidrógeno [40- 43], enlaces covalentes [44- 50], reconocimiento específico [51- 55], etc. En general se necesita sólo un tipo de interacción, pero puede ocurrir que se presenten varios tipos de interacciones entre los dos componentes al ser incorporados dentro de la película multicapa.

La estructura precisa de cada capa depende de un conjunto de parámetros de control tales como concentración, tiempos de adsorción, fuerza iónica, etc. [56- 57].

De acuerdo a los materiales utilizados para la construcción de la película se obtienen distintas aplicaciones que van desde capas protectoras de la corrosión [58], recubrimientos antireflectivos [59], cubrimientos antiestáticos [60], antifloculantes [61- 63], películas con propiedades antibacterianas, y películas de reconocimiento molecular, [64- 69] hasta dispositivos tales como diodos emisores de luz [70- 80], guías

de ondas complejas y películas de separación de membranas [69-80-84]. Estas multicapas han sido ampliamente estudiadas desde su aparición [85].

En esta tesis, se comienza con la modificación de la superficie de electrodos de oro con una monocapa que posee grupos terminales cargados, por ejemplo, un tiol cargado negativamente. A partir de esta superficie cargada se empieza la construcción del autoensamblado electrostático de capas de un polímero redox cargado positivamente y de una enzima cargada negativamente o de un polianión. Con esta técnica es posible obtener estructuras en multicapas en las cuales la mediación la proveen los sitios redox del polímero catiónico. El sistema se encuentra autocontenido y no es necesaria la adición de un mediador en solución ni la modificación covalente de la enzima.

1.4.3. - Comportamiento fisicoquímico de la película de reconocimiento.

La respuesta catalítica de la película de reconocimiento depende de varios factores entre los que se encuentra la construcción del autoensamblado (pH, concentración, fuerza iónica), el número de capas, la ubicación y terminación de las mismas, etc. La optimización de estos factores han sido estudiados en nuestro laboratorio con el objeto de mejorar la respuesta catalítica [86]. En estos experimentos se determinaron las condiciones óptimas de tiempos y condiciones de adsorción (concentración, pH, etc) para la enzima mediante microbalanza de cristal de cuarzo y para el polímero redox por voltametría cíclica para el caso del polímero redox.

La interacción electrostática entre PAH-Os y GOx está fuertemente influenciada por la concentración de electrolito y por el pH. Por ello es muy importante seleccionar el pH de trabajo para lograr la mejor eficiencia en el proceso de formación de las capas.

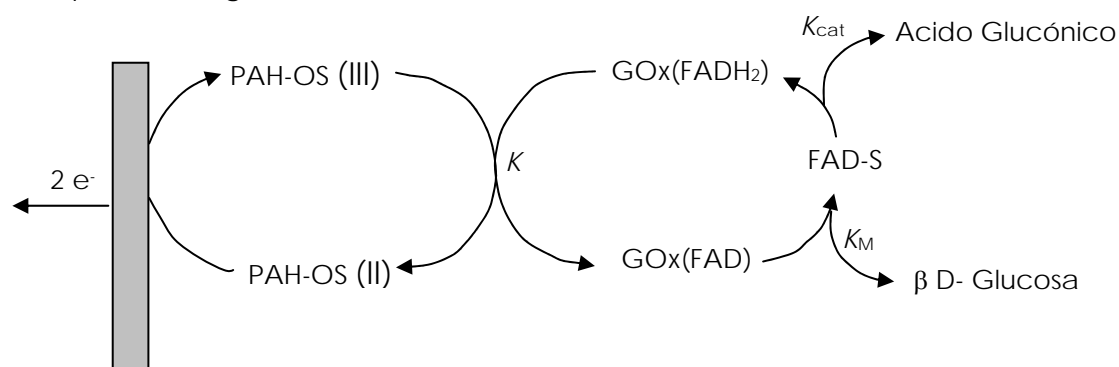
El punto isoeléctrico (pI) de la enzima GOx es de 4,5 [87] por lo que la enzima a pH mayores que pI estará cargada negativamente y esta carga se incrementa al aumentar el pH de la solución. Por otro lado, la carga de PAH también se encuentra fuertemente influenciada por el pH. La titulación de los grupos amino en PAH muestra una transición entre la forma completamente protonada a una completamente desprotonada a medida que incrementa el pH [88- 90]. Así, la elección del pH de construcción de las capas es un compromiso entre el pH requerido por el polímero y el óptimo para la enzima.

En estas estructuras autoensambladas, el mediador, PAH-Os en nuestro caso, es el encargado de comunicarse con el grupo prostético de GOx y trasladar los electrones desde el FADH₂, dentro de la proteína, hasta el electrodo. Por lo tanto la posición que ocupa el polímero y la enzima en el autoensamblado juega un rol muy

importante. La ventaja de contar con un sistema formado por adsorción electrostática capa por capa de dos componentes (PAH-Os y GOx) es que permite variar la distribución espacial de la enzima y del cable molecular de manera controlada. Esto permite construir distintas arquitecturas y estudiar los mecanismos de generación de carga eléctrica.

Uno de los resultados más relevantes al respecto es la importancia de la posición de la enzima glucosa oxidasa (GOx) en el autoensamblado respecto al mediador. Se ha demostrado [91] que la posición relativa de GOx en la multicapa determina la eficiencia del "cableado molecular" independientemente de la carga redox. Esto se debe a que el flujo de electrones está más limitado por difusión que por la propagación de la carga en la multicapa.

La oxidación de glucosa catalizada por GOx y mediada por PAH-Os puede ser descrita como sigue [92- 93]:



donde GOx(FADH₂) y GOx(FAD) representan la forma reducida y oxidada de la enzima, PAH-OS (III) y PAH-OS (II) son las formas oxidadas y reducidas del mediador, la β- D-glucosa es el sustrato y el ácido glucónico, el producto.

Para una película delgada, podemos despreciar la difusión del sustrato, y considerar la siguiente dependencia de la corriente catalítica de oxidación de glucosa [92- 93]:

$$i_{cat} = \frac{2FK_{cat}\Gamma_{enz}}{1 + \frac{K_{cat}}{K} + \frac{K_s}{[S]}} \quad (4)$$

donde Γ_{enz} es la concentración total de enzima superficial, $[S]$ es la concentración de β - D- glucosa, F es la constante de Faraday. A partir de la densidad de corriente de oxidación electrocatalítica de glucosa es posible obtener los parámetros K [Os(III)] y Γ_{enz} ; suponiendo para K_{cat} y K_M los respectivos valores en solución [95] (700 s⁻¹ y 25 mM).

La figura 13 a) muestra la respuesta electroquímica de PAH-Os adsorbido sobre un electrodo en ausencia de glucosa. La voltametría cíclica muestra la oxidación y

reducción reversible de los grupos Os(II) y Os(III). Por otro lado, la figura 13 b) muestra curvas de corriente-potencial típicas para un electrodo con la configuración PAH-Os/GOx/ PAH-Os a varias concentraciones de glucosa. A medida que el potencial se incrementa, [Os(II)] se oxida a [Os(III)] y se observa una corriente catalítica de oxidación de glucosa conforme a la ecuación 4.

Este mismo experimento se realizó para autoensamblados con diferentes estructuras espaciales: a) PAH-Os/GOx, b) GOx/PAH-Os, c) PAH/GOx/ PAH-Os y PAH-Os/GOx/PAH-Os al fin de comparar los parámetros catalíticos obtenidos en cada caso. Los resultados más importantes sugieren que si bien la constante bimolecular de oxidación de FADH_2 o la "eficiencia del cableado" permanece aproximadamente constante para las diferentes estructuras autoensambladas, la fracción de moléculas de enzima que están efectivamente conectadas con los sitios redox activos en PAH-Os depende fuertemente de la relación $[\text{Os}]/[\text{GOx}]$ [96].

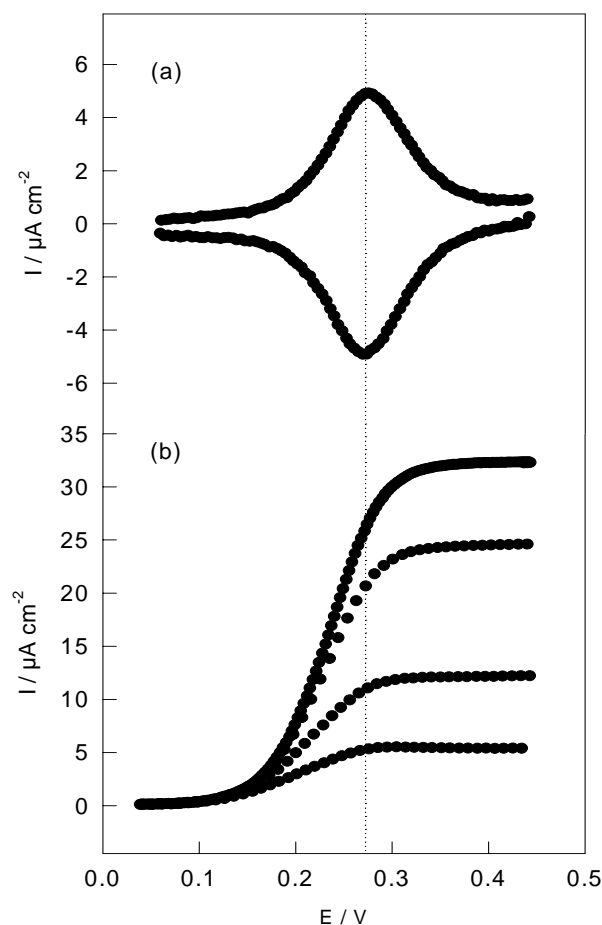


Figura 13

a) Voltametría cíclica a 50 mV s^{-1} en ausencia de glucosa para PAH / GOx / PAH-Os en buffer TRIS 0,1 M de pH 7,5, 0,2 M KNO_3 . b) Dependencia de la corriente catalítica estacionaria de la oxidación de glucosa con el potencial del electrodo a 5 mV s^{-1} en las mismas condiciones, concentración de glucosa creciente (2,5; 7,5; 25 y 60 mM). La línea punteada representa una guía visual para localizar el potencial formal de PAH-Os.

1.5.-La capa de conmutación.

La capa de conmutación básicamente es la capa que se encuentra en contacto directo con el electrodo y cambia al ocurrir el fenómeno de recononocimiento del sustrato por la enzima en la capa anterior.

1.5.1.- Polianilina.

La polianilina (PANI) ha sido uno de los polímeros conductores más estudiados por varias razones entre las que se puede citar que posee un monómero de bajo costo, la reacción de polimerización es sencilla, presenta un alto porcentaje de rendimiento y por sobre todo presenta una excelente estabilidad.

PANI posee básicamente tres estados redox bien diferenciados. El estado redox completamente reducido recibe el nombre de *leucoemeraldina* y en este estado se trata de una poliarilamina. El estado completamente oxidado es una poliquinonimina y recibe el nombre de *pernigranilina*. El tercer estado redox es un estado de oxidación intermedio entre ambos y recibe el nombre de *emeraldina*. Este es el estado de PANI conductor cuando se encuentra protonada [27].

En la figura 14 se muestran las estructuras químicas de los distintos estados con sus respectivos nombres.

El polímero puede existir en estados de oxidación continuos desde el estado completamente reducido al estado completamente oxidado, pero hay suficientes evidencias de que son tres los estados de PANI realmente estables y distinguibles.

Otra importante característica que diferencia a PANI del resto de los polímeros conductores es que puede alcanzarse el estado conductor del polímero por medio de dos rutas completamente independientes; mediante oxidación de leucoemeraldina (química o electroquímicamente) o por protonación de emeraldina base a través de una reacción ácido-base. Ambas rutas involucran la incorporación de contraiones: PANI conductora es una sal (es un polication con un anión por cada unidad repetitiva).

El dopado por protonación ácida se realiza por exposición de leucoemeraldina en soluciones acuosas de HCl 1M con lo cual los átomos de nitrógeno iminicos se protonan completamente para dar la sal de emeraldina.

El dopado químico del PANI (dopado p) se obtiene por oxidación (química o electroquímica) de leucoemeraldina base. A diferencia de lo que ocurre usualmente en los dopados tipo p [27], donde la oxidación ocurre en el sistema π ; en este caso, involucra el sistema σ - π .

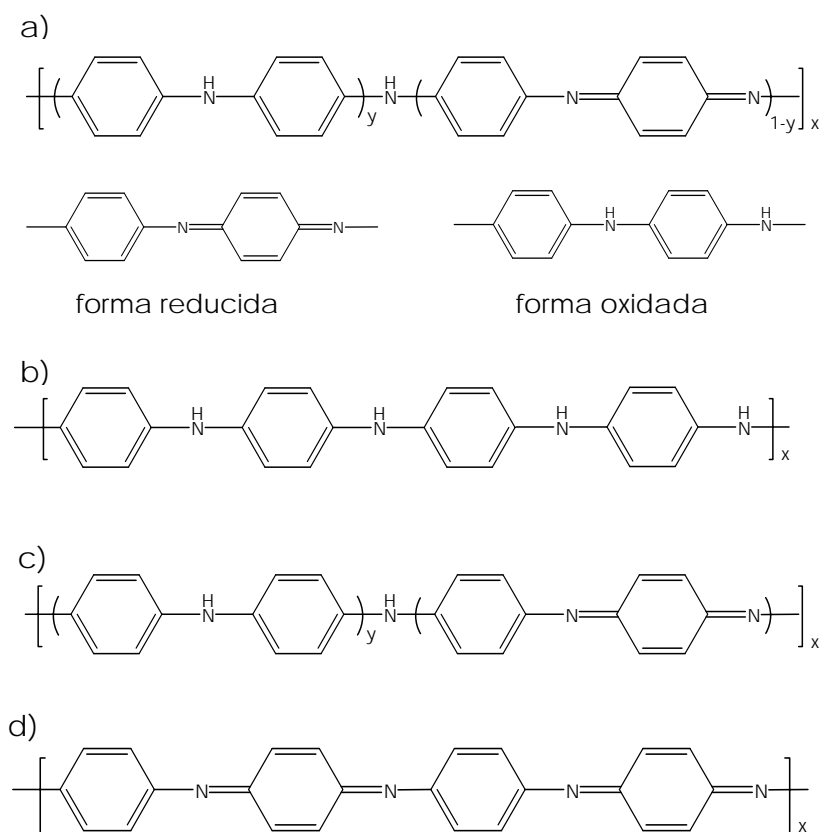


Figura 14

Esquema químico de los estados de oxidación que presenta polianilina (PANI).

a) Forma general de representar el polímero. Unidades repetitivas de la forma reducida y de la forma oxidada. b) Leucoemeraldina, forma completamente reducida de PANI. c) Emeraldina, forma intermedia de oxidación. d) Pernigranilina, forma completamente oxidada de PANI.

1.5.2.- Propiedades Electroquímicas.

PANI puede ser sintetizada electroquímicamente sobre un electrodo partiendo de una solución ácida del monómero. La ventaja de la síntesis electroquímica de PANI radica en el hecho de que se trata de un proceso localizado sobre la superficie de un electrodo y que se puede controlar la cantidad de polímero depositada a través de la carga empleada. Luego la polianilina puede ser oxidada y reducida repetidas veces por ciclado del potencial del electrodo en una solución con electrolito soporte. La síntesis electroquímica puede realizarse potencioestáticamente o galvanostáticamente. Potencioestáticamente puede realizarse por ciclado del potencial (voltametría cíclica) o por aplicación de un potencial adecuado (cronoamperometría). La película de polímero obtenida en ambos casos difiere en la morfología.

La voltametría cíclica de PANI en solución fuertemente ácida es muy característica. En la figura 15 se muestra una voltametría cíclica de PANI clásica crecida por voltametría cíclica en una solución de H_2SO_4 2 M, en la cual se pueden diferenciar los tres estados redox.

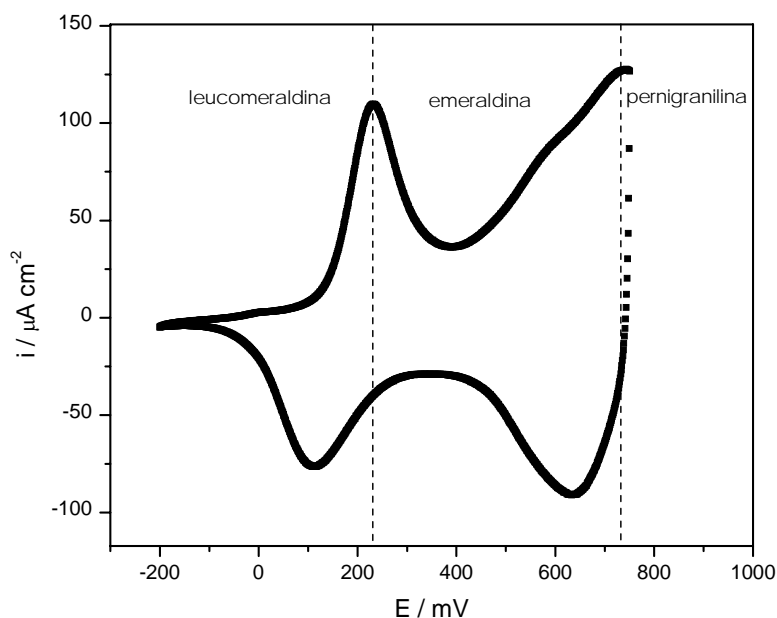


Figura 15

Voltametría cíclica de una película de PANI en solución H_2SO_4 2 M a 50 mV/seg crecida por voltametría cíclica. En la figura se muestran claramente los tres estados redox bien diferenciados con sus respectivos nombres.

Ha sido demostrado que PANI sintetizada químicamente y luego depositada de manera conveniente sobre un electrodo presenta las mismas propiedades electroactivas que PANI depositada por vía electroquímica [96].

La voltametría cíclica de PANI es muy característica y es ampliamente utilizada para caracterizar el polímero a través de los potenciales de pico y de la carga de oxidación del primer cambio redox (leucoemeraldina a emeraldina). Sin embargo es muy importante tener en cuenta el pH al cual se realiza la voltametría cíclica ya que **el potencial de pico de PANI presenta dependencia con el pH.**

Un estudio muy detallado de los cambios electroquímicos de PANI con el pH fue presentado por MacDiarmid en 1986 [96]. En dicho trabajo se muestra de que manera se da el corrimiento de potencial de pico de cada proceso en función del pH. En la figura 16 se muestran gráficamente los corrimientos de los picos con el pH. En la figura 17a) se ve claramente que el primer potencial de pico anódico (y el correspondiente pico catódico) son casi independientes del pH y del electrolito (a pH mayores que 1), mientras que a pH inferiores a 1 (hasta pH -0,2) se observan cambios

con el pH; mientras que en la figura 17b) se observa que los potenciales del segundo pico anódico (y el correspondiente pico catódico) depende fuertemente del pH en un rango que va desde -0,2 a 4.

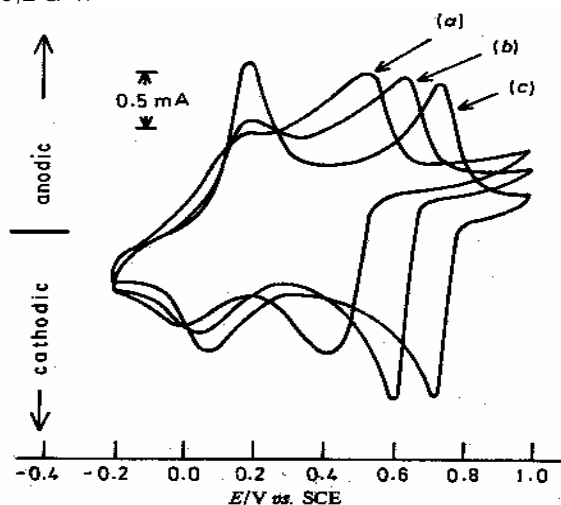


Figura 16

Voltametría cíclica de polianilina en electrolitos de (a) pH 2, (b) pH 1 y (c) pH -0.2 (HCl 1 M). Figura extraída de referencia [96].

La dependencia de los potenciales de pico con el pH produce también un cambio en las transiciones aislante-conductor de PANI. Mc Manus et. al. [97], correlacionaron los cambios de conductividad de PANI con los cambios en las estructuras electrónicas a través de espectros de absorción electrónica. Demostraron que hay tres formas espectroscópicamente distinguibles. A partir de estas formas identificadas realizaron mediciones de conductividad a diferentes pHs y demostraron que a pHs más altos, el potencial electroquímico para la transición aislante-conductor (leucoemeraldina-emeraldina) se corre hacia valores más positivos.

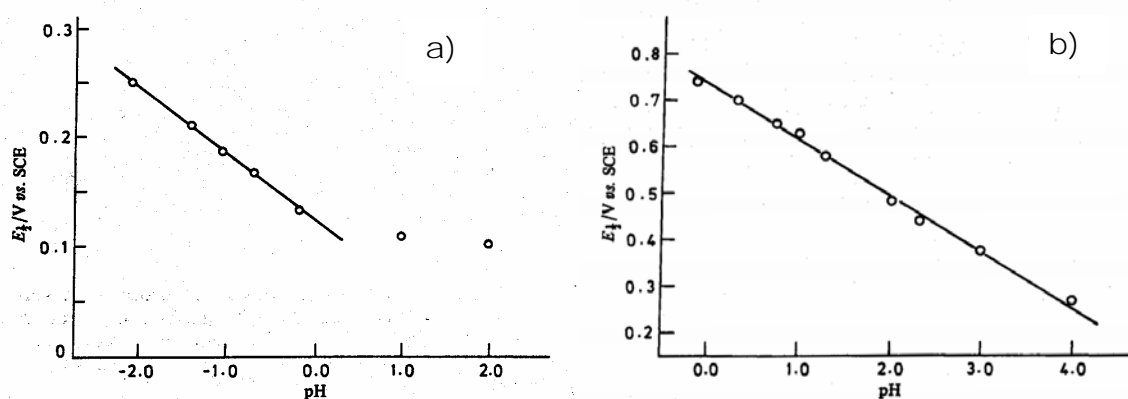


Figura 8

Relación del $E_{1/2}$ de los procesos redox de PANI con respecto al pH. a) Dependencia del $E_{1/2}$ del primer proceso redox de PANI con el pH (entre -2,12 y 2), pendiente = -58 por unidad de pH. b) Dependencia del $E_{1/2}$ para el segundo proceso redox con el pH (entre -0,2 y 4), pendiente = 120 mV por unidad de pH. Figura extraída de referencia [96].

El pH no sólo causa un desplazamiento de los picos correspondientes a los estados redox de PANI, sino que también afecta su **estabilidad electroquímica**. Estudios previos [98] revelan que esto no se debe probablemente a la desprotonación de la sal de emeraldina; sino más bien a una lenta degradación de la forma completamente oxidada de PANI, pernigranilina. Se ha observado que realizando un barrido de potencial entre los estados leucoemeraldina y emeraldina, la película mantiene la actividad incluso hasta pH 9.

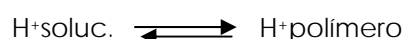
La influencia de la protonación sobre la conductividad también ha sido ampliamente estudiada [97, 99-100]. Se ha demostrado que el intervalo de potencial en el cual PANI es conductora, se hace más estrecho cuando se cambia el pH de 1 a 7 y se desplaza hacia valores más positivos.

Para aplicaciones prácticas de PANI en sensores biológicos es fundamental extender el intervalo de trabajo de PANI en soluciones neutras o alcalinas. Se han sugerido varias formas de lograr PANI activa a pH neutros. Las películas de PANI formadas electroquímicamente a partir de soluciones que contienen aniones pequeños, tales como cloruros o bisulfatos, pierden rápidamente la electroactividad cuando son expuestas a soluciones neutras. Sin embargo, películas de PANI sintetizadas desde soluciones que contiene polianiones tales como poliestirensulfonato (PSS), polivinilsulfonato (PVS) o Nafion, son electroactivas a pH 7. La evidencia de que PSS se adsorbe selectivamente sobre la superficie de PANI se vió por estudios de análisis elemental por espectroscopía electrónica (ESCA), ya que se comprobó que existe una fuerte interacción entre PSS y los átomos de nitrógeno presentes en PANI [101]. Kang et al [102] estudiaron la electroactividad de PANI sintetizadas en presencia de poliestirensulfonato. Asturias et al [103] llegaron a obtener películas de PANI con polivinilsulfonato que mantenían su conductividad hasta pH 9. El grupo de Sawai [104] logró trabajar con películas de PANI(PSS) a pH 4 sin pérdida de conductividad. Ghosh et. al. [105] prepararon PANI con carboximetilcelulosa y encontraron que la película tenía una conductividad aceptable en soluciones neutras. Otra forma de mantener la conductividad de PANI, que no incluye polimerización usando polianinones, es la sulfonación posterior de la polianilina. Esto fue realizado por Yue and Epstein [101, 103] obteniendo una buena conductividad a pH 7. En este trabajo de tesis se ha estudiado una alternativa electroquímica, diferente a la propuesta por Epstein, para sulfonar polianilina de manera altamente controlada. En el capítulo 5 se explica en detalle este procedimiento.

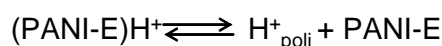
A continuación se discutirá la influencia que producen las modificaciones del polímero en sus **propiedades de membrana**. La incorporación de contraiones poliméricos dentro de polianilina (o la sulfonación de la misma) extienden el intervalo de pH en el cual PANI es conductora. El procedimiento de incorporación de

contraiones dentro de la película de PANI, o la sulfonación, crea un potencial Donnan positivo entre la película de polímero y la solución. El tratamiento se hace considerando la película de PANI como una membrana [103].

PANI en su estado oxidado es un intercambiador aniónico ya que durante el proceso de oxidación se forman sitios catión-radical (polarones). Introduciendo dentro de la cadena polimérica grupos aniónicos (ya sea por modificación química o por polimerización en presencia de polianiones) puede modificarse la propiedad de membrana de PANI. Considerando el equilibrio entre los estados emeraldina (PANI-E) y emeraldina sal (PANI-E)H⁺, se tiene el equilibrio de partición:



Y luego el equilibrio de protonación/desprotonación de PANI-E:



De acuerdo a esta ecuación, (PANI-E)H⁺ constituye un ácido de Bronsted, cuyo equilibrio de disociación se encuentra caracterizado por un pK_a ≈ 5.

Cuando PANI se prepara en presencia de contraiones poliméricos aniónicos (como polivinilsulfonato), la mezcla PANI-E/PVS constituye un intercambiador de cationes, aun en el estado protonado.

En la figura 18 se muestra esquemáticamente los equilibrios de protonación/desprotonación para PANI(a) y (PANI-E/PVS) (b), junto con las correspondientes caída de potencial a lo largo de la interfase polímero/solución; el potencial Donnan. En la figura 18a) puede verse que PANI-E posee un potencial Donnan positivo como consecuencia de que el polímero es intercambiador de aniones. En cambio, en el caso de PANI-E /PVS, figura 18 b), el potencial Donnan es negativo ya que la reacción de protonación ocurre a menor concentración de H⁺_{soluc} debido a que existe carga negativa fija en la matriz del polímero.

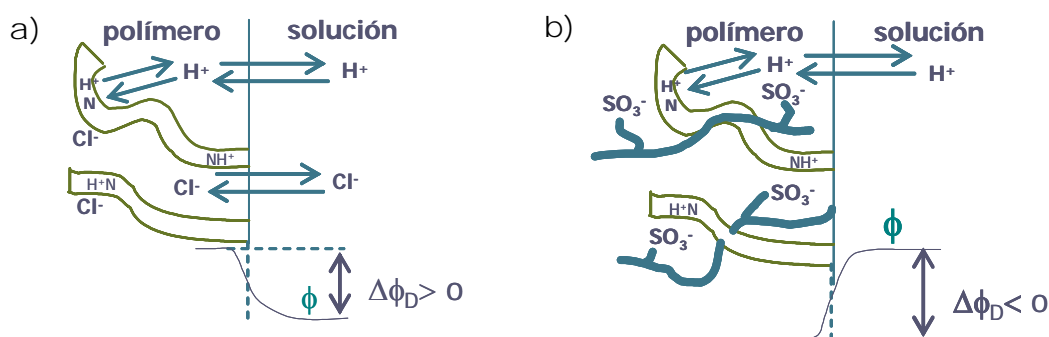


Figura 18

Estados de equilibrio de a) PANI-E y b) PANI-E/PVS en equilibrio con soluciones de HCl. Están esquematizados los equilibrios de partición de protón y de la reacción de protonación. Δφ_D representa el Potencial Donnan.

Al aumentar la concentración del electrolito manteniendo el pH, el potencial Donnan (positivo o negativo) decrece, y como consecuencia de ello, disminuye el equilibrio de partición de protones.

1.6.- Referencias

- [1] H. S. White, G. P. Kittlesen, M. S. Wrighton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 5375-5377.
- [2] J.W. Thackeray, M.S. Wrighton, *J. Phys. Chem.*, **1986**, *90*, 6674.
- [3] T. Matsue, M. Nishizawa, I. Uchida, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1991**, 1029.
- [4] P. N. Bartlett, P. R. Birkin, *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 1552.
- [5] P.N. Bartlett, Y. Astier, *Chem. Comm.*, **2000**, 105.
- [6] P.N. Bartlett, P.R. Birkin, *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 1118.
- [7] R.W. Murray, *Molecular Design of Electrode Surfaces*, (Ed. Wiley & Sons), New York, **1992**, pag. 1-48.
- [8] M. Kaneko, D. Wohrle, *Advances in Polymer Science 84*, (Ed. H.J. Cantow), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1998**, pag. 143-228.
- [9] H.D. Abruña, *Electroresponsive Molecular and Polymeric Systems*, vol 1, (Ed. T.A. Skotheim) Marcel Dekker, New York, **1998**, pag. 98-160.
- [10] I. Rubinstein, *Applied Polymer Analysis and Characterization*, vol 2, (Ed. J. Mitchell, Jr., ed), Carl Hanser Verlag, Munich, **1992**, pag. 233-258.
- [11] G.P. Evans, *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, vol 1, (Eds. H. Gerischer, C.W. Tobias), VCH Verlag, Weinheim, Germany, **1990**, pag. 1-74.
- [12] J. Heinze, *Topics in Current Chemistry*, vol 152, (Ed. E. Streckham), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1990**, pag 2-47.
- [13] *Handbook on Conducting Polymers*, vols 1, 2. (Ed. T.A. Skotheim), Marcel Dekker, New York, **1986**.
- [14] C.C. Ku, R. Liepins, *Electrical Properties of Polymers*, Carl Hanser Verlag, Munich, Vienna, **1987**.
- [15] *Conjugated Polymers*, (Eds. J.L. Brédas and R. Silbey), Kluwer Academics Publishers, Dordrecht, Germany, **1991**.
- [16] *Elektrisch leitende Kunststoffe*, (Eds. H.H. Mair and S. Roth), Carl Hanser Verlag, Munich, **1989**.
- [17] *Electronic Properties of Conjugated Polymers III (Basic Models and Applications)*, (Eds. H. Kuzmany, M. Mehring, and S. Roth), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1989**.
- [18] *Conjugated Conducting Polymers*, (Ed. H.G. Kiess), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1992**.
- [19] K. Doblhofer, M. Vorotyntsev, *Electroactive Polymer Electrochemistry, Part. 1, Fundamentals*, (Ed. Michael E.G. Lyons). Plenum Press, New York, **1994**, pag 375.

- [20] F. Helfferich, *Ion Exchange*, vol 1. McGraw-Hill, New York, **1962**.
- [21] S. Ohk, H. Oshima, *Electrical Double Layers in Biology*, (Ed. M. Blank), Plenum, New York, **1986**, pag 1-16.
- [22] A. Mauro, *Biophys. J.* **2**, **1962**, 179.
- [23] T. Forland, T. Ostvold, *Acta Chem Scand. A28*, **1974**, 607.
- [24] C.P. Andrieux, J.M. Dumas- Bouchiat, J.M. Savéant, *J. Electroanal. Chem.*, **1982**, *131*, 1.
- [25] N. Oyama, T. Osaka, *Molecular Design of Electrode Surfaces*, (Ed. R.W. Murray), Wiley & Sons, New York, **1992**, pag. 333- 402.
- [26] V. E. Kazarinov, M. D. Levi, A.M. Skundin, M.A. Vorotyntsev, *J. Electroanal. Chem*, **1989**, *271*, 193.
- [27] A. G. MacDiarmid, *Angew. Chem. Int*, **2001**, *40*, 2581.
- [28] A. Heeger, *Nobel Lecture*, **dic. 2000**.
- [29] A.B. Kaiser, *Reports on Progress in Physics*, **2001**, *64*, 1.
- [30] S. Roth, *One- Dimensional Metals*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [31] Y. W. Park, A.J. Heeger, M. A. Druy, A. G. MacDiarmid, *J. Chem. Phys.*, **1980**, *73*, 946.
- [32] A.J. Epstein, J. Joo, R.S. Colman, S. Du, A.G. MacDiarmid, E.J. Oh, Y. Min, J. Tsukamoto, H. Kaneco, J.P. Pouget, *Synth. Met.*, **1994**, *65*, 149.
- [33] J.P Travers, B. Sixou, D. Berner, A. Wolter, P. Rannou, B. Beau, B. Pepin-Donat, C. Barthet, M. Guglielmi, N. Mermilliod, B. Pilles, D. Djurado, A.J. Attias, M. Vautrin, *Synth. Met.*, **1999**, *101*, 359.
- [34] R. Wilson, A.P.F. Turner, *Biosensors and Bioelectronics*, **1992**, *7*, 165.
- [35] C. Danilowicz, E. Cortón, F. Battaglini, *J. of Electroanal. Chem.*, **1998**, *445*, 89.
- [36] G. Decher, J.D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films*, **1992**, *210/211*, 831.
- [37] J. Schmitt, T. Grunewald, K. Kjaer, P. Pershan, G. Decher, M. Losche, *Macromolecules*, **1993**, *26*, 7058.
- [38] Y. Shimazaki, M. Mitsuishi, S. Ito, M. Yamamoto, *Langmuir*, **1997**, *13*, 1385.
- [39] Y. Shimazaki, R. Nakamura, S. Ito, M. Yamamoto, *Langmuir*, **2001**, *17*, 953.
- [40] E. C. Hao, T.Q. Lian, *Chem. Mater.*, **2000**, *12*, 3392.
- [41] W.B. Stockton, M.F. Rubner, *Macromolecules*, **1997**, *30*, 2717.
- [42] L. Y. Wang, S.X. Cui, S.Q. Wang, X. Zhang, M. Jiang, L. F. Chi, H. Fuchs, *Langmuir*, **2000**, *16*, 10490.
- [43] S.L. Clark, P. T. Hammond, *Langmuir*, **2000**, *16*, 10206.
- [44] M.M.Fang, D.M. Kaschak, A.C. Sutorik, T.E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 12184.
- [45] I. Ichinose, T. Kawakami, Kunitake , *Adv. Mater.*, **1998**, *10* , 535.

- [46] J.Q. Sun, T. Wu, Y.P. Sun, Z.Q. Wang, X. Zhang, X. Shen, W.X. Cao, *Chem. Comm.*, **1998**, 1853.
- [47] M. Koetse, A. Laschewsky, A.B. Mayer, O. Rolland, E. Wischerhoff, *Macromolecules*, **1998**, *31*, 9316.
- [48] L. Yan, W. T. S. Huck, X. M. Zhao, G.M. Whitesides, *Langmuir*, **1999**, *15*, 1208.
- [49] D.M. Kaschak, J.T. Lean, C.C. Waraska, G.B. Saupe, H. Usami, T.E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 3435.
- [50] W. T. S. Huck, A.D. Stroock, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.*, **2000**, *39*, 1058.
- [51] K. Spaeth, A. Brecht, G. Gauglitz, *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, *196*, 128.
- [52] J. Anzai, Y. Kobayashi, N. Nakamura, M. Nishimura, T. Hoshi, *Langmuir*, **1999**, *15*, 221.
- [53] J. Anzai, Y. Kobayashi, *Langmuir*, **2000**, *16*, 2851.
- [54] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake, *Chem. Comm.*, **1995**, 2313.
- [55] T. Cassier, K. Lowack, G. Decher, *Supramolecular Science*, **1998**, *5*, 309.
- [56] S.S. Shiratori, M. F. Rubner, *Macromolecules*, **2000**, *33*, 4213.
- [57] K. Buscher, K. Graf, H. Ahrens, C.A. Helm, *Langmuir*, **2002**, *18*, 3585.
- [58] T. Farhat, J.F. Schlenoff, *Solid State Let.*, **2002**, *5*, B13.
- [59] H. Hattori, *Adv. Mater.*, **2001**, *13*, 5355.
- [60] T.W. Graul, J.F. Schlenoff, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 4007.
- [61] M. Muller, T. Rieser, K. Lunkwitz, J. Meirehaack, *Macromol. Rapid Commun.*, **1999**, *20*, 607.
- [62] J. Meirehaack, T. Rieser, W. Lenk, D. Lehmann, S. Berwald, S. Schwarz, *Chem. Ing.-Tech.*, **1999**, *71*, 839.
- [63] T. Rieser, K. Lunkwitz, S. Berwald, J. Meierhaack, M. Muller, F. Cassel, Z. Dioszeghy, F. Simon, *ACS Symp. Ser.*, **2000**, *744*, 189.
- [64] F. Caruso, K. Niikura, D.N. Furlong, Y. Okahata, *Langmuir*, **1997**, *13*, 3427.
- [65] T. Chen, K.A. Friedman, I. Lei, A. Heller, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 3575.
- [66] S.H. Lee, J. Kumar, S.K. Tripathy, *Langmuir*, **2000**, *16*, 10482.
- [67] J.F. Rusling, L.P. Zhou, B. Munge, J. Yang, C. Estavillo, J.B. Schenkman, *Faraday Discuss.*, **2000**, *116*, 77.
- [68] E.J. Calvo, R. Etchenique, L. Pietrasanta, A. Wolosiuk, C. Danilowicz, *Anal Chem*, **2001**, *73*, 1161.
- [69] J.H. Dai, A.W. Jensen, D.K. Mohanty, J. Erndt, M. L. Bruening, *Langmuir*, **2001**, *17*, 931.
- [70] M. Ferreira, M.F. Rubner, B.R. Hsieh, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, **1994**, *328*, 119.
- [71] M. Onoda, K. Yoshino, *J. Appl. Phys.*, **1995**, *78*, 4456.

- [72] J. Tian, C.C. Wu, M.E. Thompson, J.C. Sturm, R.A. Register, *Chem. Mater.*, **1995**, *7*, 2190.
- [73] J. K. Lee, D. S. Yoo, E.S. Handy, M.F. Rubner, *Appl. Phys. Let.*, **1996**, *69*, 1686.
- [74] F.J. Arregui, Y.J. Liu, I.R. Matias, R.O. Claus, *Sens. Actuators*, **1999**, *59*, 54.
- [75] A. Wu, D. Yoo, J.K. Lee, M.F. Rubner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 4883.
- [76] M.Y. Gao, C. Lesser, S. Kirstein, H. Mohwald, A. L. Rogach, H. Weller, *J. Appl. Phys.*, **2000**, *87*, 2297.
- [77] H. Mattoussi, M.F. Rubner, F. Zhou, J. Kumar, S.K. Tripathy, L.Y. Chiang, *Appl. Phys. Let.*, **2000**, *77*, 1540.
- [78] T. Piok, C. Brands, P.J. Neyman, A. Erlacher, C. Soman, M.A. Murray, R. Schroeder, W. Graupner, J.R. Heflin, D. Marciu, et. al., *Synth. Met.*, **2001**, *116*, 343.
- [79] M.F. Durstock, B. Taylor, R.J. Spry, L. Chiang, S. Reulbasch, K. Heitfeld, J. W. Baur, *Synth. Met.*, **2001**, *116*, 373.
- [80] M. Eckle, G. Decher, *Nanoletters*, **2001**, *1*, 45.
- [81] P. Stroeve, V. Vasques, M.A.N. Coelho, J.F. Rabolt, *Thin Solid Films*, **1996**, *284/285*, 708.
- [82] L. Krasemann, B. Tieke, *Langmuir*, **2000**, *16*, 287.
- [83] J.J. Harris, M.L. Bruening, *Langmuir*, **2000**, *16*, 2006.
- [84] T. R. Farhat, J.B. Schlenoff, *Langmuir*, **2001**, *17*, 1184.
- [85] *Multilayers Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*. (Ed. G. Decher, J. B. Schlenoff), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2003**.
- [86] J. Hodak, R. Etchenique, E.J. Calvo, K. Singhal, P.N. Bartlett, *Langmuir*, **1997**, *13*(10), 2708.
- [87] J.C Voet, J. Coe, J. Epstein, V. Matossian, T. Shipley., *Biochemistry*, **1981**, *20*, 7182.
- [88] J. Suh, H. Paik, B.K. Hwang, *Bioorg. Chem*, **1994**, *22*, 318.
- [89] M. Dawson, D.C. Elliot, W.H. Elliot, K.M Jones, *Data for Biochemical Research*, 3rd edition, Oxford University Press, Oxford, **1986**.
- [90] Y. Yoshikawa, H. Matsuoka, N. Ise, *Br. Polym. J.*, **1986**, *18*, 242.
- [91] E. J. Calvo, C. Danilowicz, A. Wolosiuk, *J. Am. Chem. Soc. Comm.*, **2002**, *124*(11), 2452.
- [92] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moix, J.M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 10328.
- [93] P.N. Bartlett, K.F.E. Pratt, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, *397*, 61.
- [94] R. Wilson, A.P.F. Turner, *Biosens. Bioelectron.*, **1992**, *7*, 165.
- [95] E. J. Calvo, A. Wolosiuk, *Chem. Phys. Chem*, **2004**, *5*, 235.
- [96] W.S. Huang, B.D. Humphrey, A.G. MacDiarmid, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **1986**, *82*, 2385.
- [97] P.M. McManus, R. J. Cushman, S. Cheng Yang, *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 774.

- [98] L. Nyholm, L.M. Peter, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **1994**, 90, 149.
- [99] A.G. MacDiarmid, J. C. Chiang, M. Halpern, W.S. Huang, S. L. Mu, N.L.D. Somasiri, W. Wu, S. I. Yaniger, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1985**, 121, 173.
- [100] J. P. Travers, J. Chroboczek, F. Devreux, F. Genoud, M. Nechtschein, A. Syed, E.M. Genies, C. Tsintavis, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1985**, 121, 195.
- [101] J. Yue, A.J. Epstein, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1992**, 1540.
- [102] Y. Kang, M-H. Lee, S.B. Rhee, *Synth. Met.*, **1992**, 52, 319.
- [103] G.E. Asturias, G.W. Jang, A.G. MacDiarmid, K. Doblhofer, C. Zhong, *Bunsen_Ges. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 1381.
- [104] T. Sawai, H. Shinahara, Y. Ikariyama, M. Aizawa, *J. Electroanal. Chem*, **1990**, 283, 221.
- [105] S. Gosh, B. Vishalakshi, V. Kalpagam, *Synth. Met.*, **1992**, 46, 349.
- [106] J. Yue, A.J. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 2800.

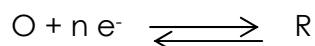
2.1.- Técnicas empleadas. Fundamentos.

Durante la realización de este trabajo de tesis han sido empleadas una amplia gama de técnicas las que permitieron caracterizar los distintos sistemas estudiados y ayudan a elucidar los mecanismos complejos propios del funcionamiento de un transistor molecular enzimático integrado. A continuación se desarrollará una breve descripción del fundamento teórico de las mismas, el tipo de información que brinda cada una de ellas, las ventajas y limitaciones en cada caso y el tipo de instrumentación requerido.

2.1.1.- Técnicas electroquímicas.

2.1.1.1.-Conceptos generales.

Una reacción de electrodo es un proceso químico heterogéneo que involucra la transferencia de electrones desde o hacia una superficie conductora. Se trata de un proceso anódico si las especies son oxidadas perdiendo electrones; o bien es un proceso catódico si las especies son reducidas en la interfaz, ganando electrones. Las especies electroactivas pueden ser especies disueltas en solución, el solvente mismo, una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo en sí mismo. Una reacción de electrodo de la forma general



involucra una secuencia de pasos que puede incluir el transporte de reactivos hasta la superficie del electrodo, la transferencia de electrones y la remoción del producto de la superficie del electrodo; por lo que la velocidad del proceso estará determinada por la velocidad del paso más lento de la secuencia [1].

2.1.1.2.- Celda electroquímica.

Para estudiar una reacción de electrodo comúnmente se utiliza una celda que posee tres electrodos. Se llama **electrodo de trabajo (WE)** a aquel en el cual se producen los cambios electroquímicos de interés. **Electrodo auxiliar** o **contraelectrodo (CE)** es el electrodo sobre el cual se realiza la medición de corriente del proceso que está ocurriendo en la celda electroquímica (la corriente circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo a través de la solución de electrolito). El contraelectrodo debe tener un área mucho mayor que el electrodo de trabajo para evitar la

polarización y que la reacción en éste interfiera en la respuesta del electrodo de trabajo. El tercer electrodo es el **electrodo de referencia (RE)** por el que no circula corriente y que sólo controla el potencial del electrodo de trabajo. Para optimizar su función se lo coloca lo más cerca posible del electrodo de trabajo. Con esta configuración se minimiza la caída de potencial, iR , llamada también caída óhmica.

2.1.1.3.- Potenciostato.

El potenciostato es el instrumento encargado de controlar el potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo. La configuración más simple que ilustra el principio de funcionamiento se ve en la figura 1. La celda electroquímica se representa como un circuito equivalente muy simple: la resistencia de la solución (R_s) en serie con la capacitancia de la doble capa (C_{dl}). El dispositivo es un seguidor de voltaje que mantiene el voltaje de salida entre el electrodo de referencia (RE) y el electrodo de trabajo (WE) a un determinado potencial E_1 (el electrodo de trabajo tiene un potencial $-E_1$ relativo al electrodo de referencia, por lo tanto el voltaje de entrada queda invertido en la celda).

Este arreglo sólo es capaz de aplicar un potencial pero no es capaz de medir la corriente. Otros diseños más complicados incluyen amplificadores operacionales en los modos sumador o diferenciador con lo cual es posible variar el potencial en el tiempo y medir la corriente que circula el circuito [1].

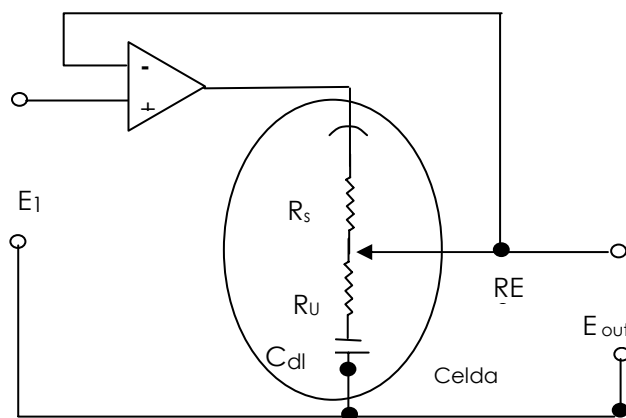


Figura 1

Esquema que ilustra el principio de funcionamiento de un potenciostato.

Los procesos electroquímicos generalmente no son sencillos, involucran varios pasos que incluyen desde procesos heterogéneos de transferencia de electrones y transporte de masa hasta reacciones químicas homogéneas que pueden estar acopladas, procesos superficiales tales como adsorción, entre otras. Un análisis

completo de cualquiera de estos procesos electroquímicos, requiere conocer cada paso individual. Como mínimo es necesario conocer la constante de velocidad estándar, los coeficientes de los procesos que involucran transferencia de electrones, la determinación del número de electrones involucrados y, si hay especies en solución, los correspondientes coeficientes de difusión.

Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar los parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de las reacciones de electrodo. Dependiendo del sistema químico y de la información que se quiera obtener, se utilizará la técnica adecuada.

En este trabajo de tesis se usaron principalmente dos técnicas electroquímicas básicas: cronoamperometría y voltametría cíclica. A continuación se describirá el principio de cada una. Para mayores detalles se puede consultar la bibliografía citada [1-3].

2.1.1.4.- Cronoamperometría.

La cronoamperometría es una técnica en la cual el potencial del electrodo de trabajo se cambia instantáneamente y se mide la corriente en función del tiempo. En la figura 2 se muestra esquemáticamente la perturbación de potencial aplicada al electrodo de trabajo en función del tiempo.

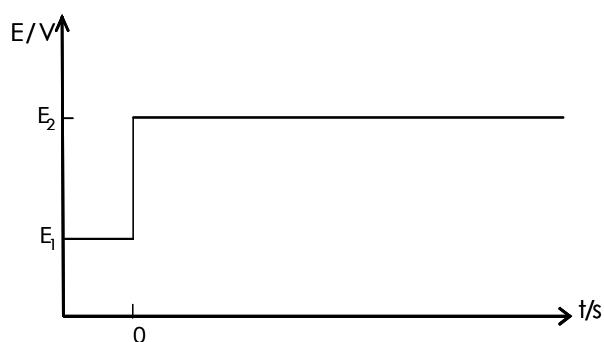
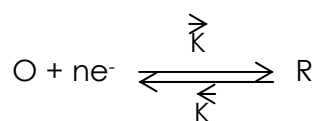


Figura 2

Perfil de potencial en función del tiempo (E vs t) para un experimento de cronoamperometría (salto de potencial).

Para una reacción donde O y R son las especies oxidadas y reducidas respectivamente, ambas solubles en la solución:



y E_2 es tal que la reducción de O transcurre a una velocidad controlada por difusión, el proceso queda caracterizado por las leyes de Fick.

Imponiendo las condiciones de contorno adecuadas:

A $t=0$ y para todo x , $C_O = C_O^\infty$

Para $t > 0$, a $x=0$, $C_O^0=0$

Para $x=\infty$, $C_O = C_O^\infty$

esto es, inicialmente ($t=0$) la concentración de O es uniforme ($C_O = C_O^\infty$), luego de aplicada la perturbación, la concentración de O se agota sobre la superficie del electrodo y en todo momento $C_O = C_O^\infty$ lejos del electrodo (difusión lineal semi infinita). Resolviendo las ecuaciones matemáticas correspondientes se llega a la expresión teórica de la corriente en función del tiempo, denominada Ecuación de Cottrell:

$$|i| = \frac{nFD^{1/2}C_o^\infty}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (1)$$

Esta ecuación relaciona la densidad de corriente i con $t^{-1/2}$. A partir de un gráfico de i vs. $t^{-1/2}$ puede obtenerse el coeficiente de difusión de la especie O. Para obtener datos confiables es recomendable analizar los datos de corriente en un amplio intervalo de tiempo. Teniendo en cuenta que a tiempos cortos aquellos están dominados por los procesos de carga de la doble capa electroquímica y a tiempos largos están determinados por convección natural y posibles vibraciones.

La forma del transitorio de corriente depende del tipo de proceso que esté controlando la velocidad de la reacción de electrodo. En la figura 3 se muestran distintos tipos de transitorios posibles.

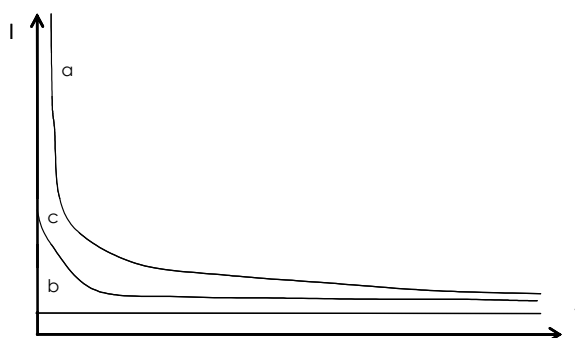


Figura 3

Corriente vs tiempo para experimentos de salto de potencial. a) Control difusional, b) control cinético, c) control mixto.

Cuando la reacción está controlada por difusión, se tiene una respuesta corriente-tiempo según la curva a. Cuando la reacción está controlada cinéticamente la respuesta de corriente es del tipo representado en la curva b, esto ocurre cuando la constante de la velocidad de la reacción es pequeña (o cuando el valor de E_2 impone un sobrepotencial muy bajo para la reacción), entonces la concentración de la especie O no cambia de manera significativa ya que el potencial aplicado no es muy grande y por lo tanto la difusión no juega un rol muy importante para determinar la velocidad de la reacción. En una situación intermedia entre los casos a y b tenemos el transitorio correspondiente a la curva c en la cual la velocidad de transferencia de carga y la velocidad de difusión son comparables y la corriente cae en el tiempo, pero de una manera más suave, se dice que el sistema se encuentra bajo control mixto.

En los casos en los que las especies electroactivas se encuentran adsorbidas sobre la superficie del electrodo, los transitorios de corriente adquieren formas diferentes, como se observa en la figura 4.

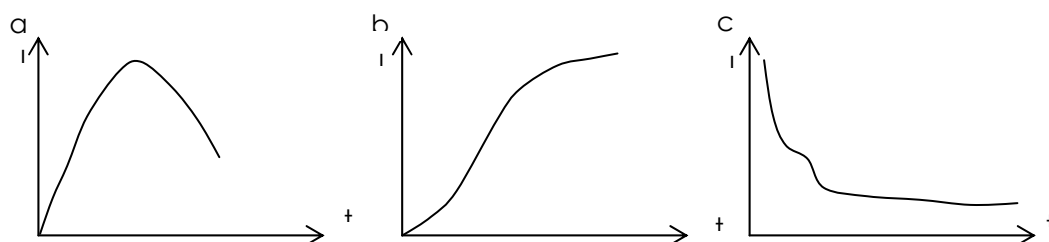


Figura 4.

Distintos tipos de transitorios de corriente. a) formación de monocapa con nucleación instantánea. b) proceso de crecimiento y nucleación en tres dimensiones. c) adsorción de producto.

Este tipo de respuestas se observa en polimerizaciones, en deposición de metales, en corrosión, etc. El análisis de estos gráficos involucra el tratamiento de I en función de t^n donde n depende del tipo de nucleación, de la geometría de la fase en crecimiento y de la velocidad del paso que determina la formación de la fase, entre otras variables [1-3].

2.1.1.5.- Voltametría cíclica.

Por su sencillez, la voltametría cíclica (VC) ha sido una de las técnicas electroquímicas más utilizadas y conocidas para la exploración preliminar de un sistema electroquímico. Es el espectro electroquímico de una sustancia, muestra a que potenciales ocurren los procesos redox, pueden detectarse reacciones químicas

acopladas y hasta es posible identificar fenómenos de adsorción. En la figura 5 se muestra la forma en la que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo en función del tiempo.

El potencial se puede variar linealmente con el tiempo (a una dada velocidad de barrido, v , desde un valor E_1 a un valor E_2 , luego se puede regresar al mismo valor inicial E_1 o a otro valor E_3 y así sucesivamente. La velocidad de barrido usada generalmente se encuentra entre los pocos mV/s hasta 100 V/s. La respuesta en corriente se grafica en función del potencial y el eje de potencial es también un eje de tiempo. Dependiendo de la forma de la VC se podrá saber si se trata de una reacción reversible, irreversible o si se trata de una especie adsorbida electroquímicamente activa. Otras respuestas características se obtienen cuando existen reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga.

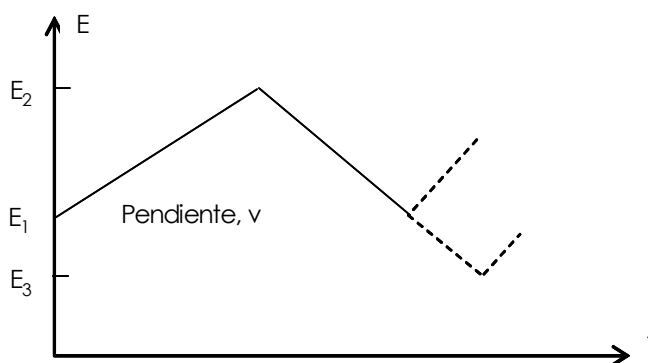
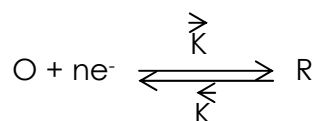


Figura 5.
Perfiles de potencial en función del tiempo para voltametría cíclica

Nuevamente, para el proceso:



donde O y R son las especies oxidadas y reducidas respectivamente solubles, el tratamiento matemático requiere la resolución de las leyes de Fick con las correspondientes condiciones de contorno.

Para un **proceso reversible**, la velocidad de transferencia de electrones a cualquier potencial es significativamente mayor que la velocidad de transporte de masa y por lo tanto se mantiene sobre la superficie del electrodo un equilibrio Nerstiano.

Las correspondientes condiciones de contorno para la VC de un proceso reversible son:

$$t=0 \quad x > 0, \quad C_O = C_{O^\infty} \quad C_R=0 \quad D_O=D_R=D$$

$$t > 0, \quad x=\infty, \quad C_O = C_{O^\infty} \quad C_R=0$$

$$t > 0 \quad x=0, \quad D \frac{dC_O}{dx} + D \frac{dC_R}{dx} = 0$$

$$\left(\frac{C_O}{C_R} \right)_{x=0} = \exp \left(\frac{nF}{RT} (E - E^0) \right)$$

$$-i = nFD \left(\frac{\partial C_O}{\partial x} \right)_{x=0}$$

Y para la perturbación:

$$0 < t < \lambda \quad E = E_1 - v t$$

$$t > \lambda \quad E = E_1 - 2v t + v t$$

donde, E_1 es el potencial inicial y λ es el tiempo en el cual se invierte la velocidad de barrido.

A 25 °C, la ecuación para el proceso catódico tiene la siguiente forma:

$$i_p = -0.4463 nF \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} C_{O^\infty} D^{1/2} v^{1/2} \quad (2)$$

donde i_p ($A \text{ cm}^{-2}$) es la densidad de corriente de pico; D ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) es el coeficiente de difusión, v ($V \text{ s}^{-1}$) es la velocidad de barrido y C_{O^∞} (mol cm^{-3}) la concentración de la especie electroactiva.

La corriente de pico es proporcional a la concentración de la especie electroactiva y a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y del coeficiente de difusión.

La figura 6 muestra una voltametría cíclica clásica para un proceso reversible [1-3].

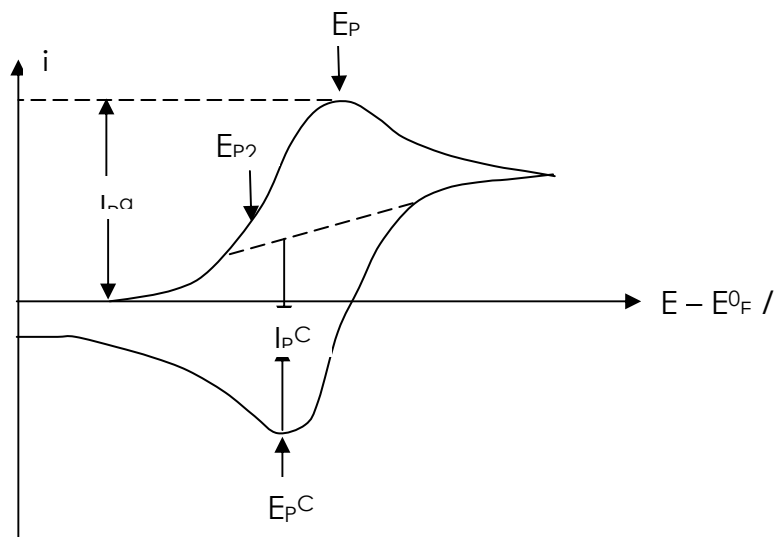


Figura 6.

Voltametría cíclica para un proceso reversible. En la figura E_P^C y E_P^A corresponden a los potenciales de picos catódicos y anódicos respectivamente. I_{pC} y I_{pA} son las corrientes de pico catódicas y anódicas. $E_{P/2}$ es el potencial de media onda.

Realizando la voltametría cíclica a diferentes velocidades de barrido para un sistema y graficando i_p vs. $v^{1/2}$ se obtendrá una línea recta que pasa por el origen si el sistema se comportara reversiblemente. Otro tipo de diagnósticos pueden hacerse para asegurarnos que se trata de un proceso reversible. Entre ellos:

a) la diferencia entre el potencial de pico anódico y catódico debe ser de 59 mV dividido el número de electrones (n). $\Delta E_P = E_P^A - E_P^C = 59/n$ mV.

b) el módulo de la diferencia entre el potencial de pico y el potencial a media altura de pico debe ser de 59 mV dividido por el número de electrones (n). $|E_P - E_{P/2}| = 59/n$ mV.

c) la relación de las densidades de corriente de pico debe ser 1 ($|i_{pA}/i_{pC}| = 1$).

d) la linealidad de i_p con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, $i_p \propto v^{1/2}$, indica si el proceso es controlado por difusión y en este caso, los potenciales de pico son independientes de la velocidad de barrido.

En los **procesos irreversibles**, la velocidad de transferencia de electrones es insuficiente para mantener las especies en equilibrio en la interfase electrodo/ solución, entonces, la forma de la voltametría cíclica es distinta. A baja velocidad de barrido el sistema se comporta reversiblemente ya que la velocidad de transferencia de electrones es mayor a la velocidad de transporte de masa. Sin embargo a medida que la velocidad de barrido se incrementa, la velocidad de transporte de masa es cada vez más similar a la velocidad de transferencia de carga y la forma de la voltametría cíclica comienza a distorsionarse y los picos, a separarse.

Si el proceso es irreversible, la resolución de las ecuaciones con las condiciones de contorno apropiadas:

$$t > 0 \text{ y } x = 0$$

$$\frac{I}{nF} = D_o \left(\frac{\partial C_o}{\partial x} \right)_{x=0}$$

conduce a la siguiente ecuación a 25°C:

$$i_p = - (2,99 \times 10^{-5}) n (\alpha_c n_\alpha)^{1/2} C_o^\infty D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (3)$$

donde n_α representa el número de electrones transferidos e incluye el paso determinante de la velocidad de transferencia de electrones y α_c , el coeficiente de transferencia del proceso catódico.

Si el proceso es completamente irreversible se observa la ausencia de pico cuando se invierte el barrido de potencial. Además el potencial de pico, E_p , depende de la velocidad de barrido. También cambia $\Delta E_p = E_p^A - E_p^C$ que en este caso y a 25°C es $48/\alpha_c n_\alpha$ mV.

En **procesos electroquímicos superficiales** tales como nucleación o en el caso de especies adsorbidas, la voltametría cíclica es una técnica muy usada para investigarlos y cuantificarlos.

Para el caso de *especies adsorbidas*, consideremos el caso más simple en el cual solamente las formas O y R se encuentran adsorbidas sobre el electrodo y son electroquímicamente activas en el intervalo de potencial de trabajo. Podemos despreciar los efectos de transporte de masa ya que las especies están confinadas en la interfaz. Si se tratara de un **proceso reversible**, la forma de VC se muestra en la figura 7. La principal diferencia entre VC de especies adsorbidas y la de especies en solución es que los picos son simétricos y más agudos.

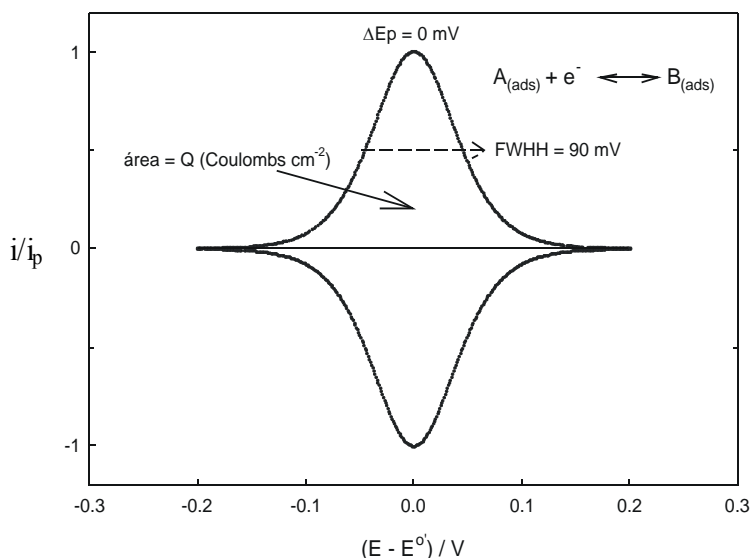


Figura 7

Voltametría cíclica teórica para la oxidación-reducción de una especie adsorbida donde las energías libres de adsorción de las especies O y R son iguales y la adsorción sigue la isoterma de Langmuir.

La corriente aumenta desde cero hasta la corriente de pico y cae nuevamente a cero. Las cargas asociadas con los procesos anódicos y catódicos son iguales. La simetría de los picos ocurre porque solamente puede ser reducida la cantidad de reactante(O) presente sobre la superficie del electrodo. Los valores de I_p , E_p y el ancho a media altura de los picos depende del tipo de isoterma de adsorción que posea el sistema y de las fuerzas relativas de adsorción de las especies O y R. Cuando la adsorción puede ser descripta por una Isoterma de Langmuir , se llega a que $E_p^A = E_p^C$ y la densidad de corriente de pico esta dada por la ecuación:

$$|i_p^c| = \frac{n^2 F^2 \Gamma^0}{4RT} V \quad (4)$$

donde Γ_0 corresponde al exceso superficial de la especie O antes de comenzar el barrido. Puede observarse en la ecuación 4 que la corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido y no a la raíz cuadrada de la misma, como en el caso de especies en solución. El área bajo el pico de reducción corresponde a la carga asociada con el proceso de reducción de la especie O adsorbida, por lo que es posible obtener la cantidad de exceso superficial de O mediante la ecuación 5:

$$\Gamma_0 = \frac{Q}{nF} \quad (5)$$

En el caso de un **sistema irreversible**, el pico de ida no es simétrico y no se observa pico para el proceso inverso. Si el sistema fuera cuasirreversibles, existe pico de vuelta, pero ninguno de los dos son simétricos y no coinciden los potenciales de pico.

Cuando una especie se encuentra unida al electrodo químicamente, éste recibe el nombre de **electrodo químicamente modificado**. Este tipo de electrodos han sido extensivamente estudiados por su aplicación en catálisis. Su comportamiento es similar al mencionado anteriormente y su voltametría cíclica puede ser analizada de la misma manera.

Los procesos superficiales debidos a especies adsorbidas pueden estar combinados con procesos debidos a especies que difunden desde la solución. Un ejemplo de este tipo es la reducción de protones sobre el electrodo de platino.

Los procesos de deposición también presentan una voltametría cíclica característica donde se observan entrecruzamiento de los picos y el pico de vuelta es agudo y simétrico debido a que el material electroactivo esta siendo depositado sobre el electrodo.

2.1.2.- Técnicas Ópticas y Espectroscópicas

2.1.2.1.-Elipsometría.

La elipsometría es el arte de medir y analizar la polarización elíptica de la luz. Hoy en día se ha convertido en un método para medir parámetros ópticos de películas delgadas por análisis de la luz polarizada reflejada. Los parámetros ópticos son: el índice de refracción, n , el coeficiente de extinción, K , y el espesor de una película depositada sobre un sustrato, d .

Paul Drude, que estudiaba propiedades ópticas de la luz reflejada sobre sólidos, reconoció que un material óptico como un metal, se comporta simultáneamente como un polarizador y un desplazador de fase y que por lo tanto en general la luz reflejada sobre la superficie óptica de un metal, es luz elípticamente polarizada.

Drude en dos publicaciones de los años 1889 y 1890 derivó los fundamentos y las ecuaciones de la elipsometría [4, 5].

La **luz linealmente polarizada** es luz en la cual el campo eléctrico oscilante de la radiación forma el mismo ángulo respecto al plano de incidencia. Todo haz de luz linealmente polarizada que incide sobre una superficie puede considerarse como una combinación de haces separados, uno vibrando paralelo al plano de incidencia y otro perpendicular a dicho plano. La orientación del vector campo eléctrico resultante posee un ángulo de polarización constante.

Cuando un haz de luz linealmente polarizada se refleja desde una superficie, generalmente, la componente paralela y perpendicular sufren cambios diferentes en fase y amplitud. Entonces, el vector campo eléctrico de la radiación no forma un ángulo fijo (como lo realizara el haz incidente), y en lugar de ello, a medida que se propaga la onda va trazando una trayectoria espiralada. La proyección de la espiral es una elipse, de ahí deriva el nombre de **luz elípticamente polarizada**. En la figura 8 se muestra esquemáticamente la conversión de luz linealmente polarizada a elípticamente polarizada [6].

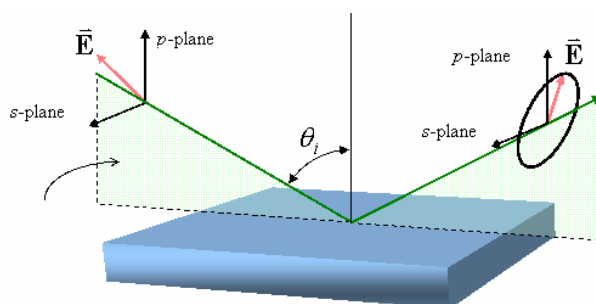


Figura 8

Demostración esquemática de la conversión de la luz linealmente polarizada a elípticamente polarizada.

La forma de la elipse queda determinada por las amplitudes relativas y las diferencias de fase de los dos componentes de la luz (paralela, p, y perpendicular, s).

La elipse queda descrita por dos ángulos característicos, ψ y Δ . El ángulo Δ representa la diferencia de fase entre la componente incidente y reflejada y el ángulo ψ es la relación de amplitud de las componentes del campo eléctrico.

$$\Delta = \varepsilon_p - \varepsilon_s \quad \varepsilon: \text{ángulo de fase,}$$

$$\tan \Psi = |\varepsilon_s|/|\varepsilon_p|$$

En la figura 9 se muestran gráficamente estos ángulos.

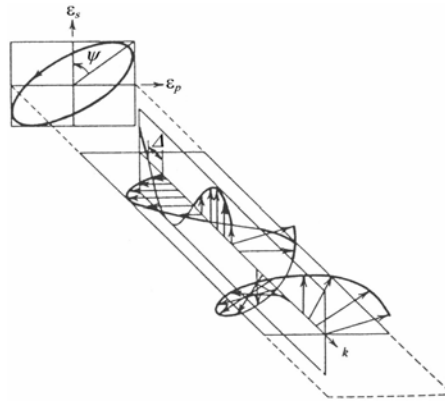


Figura 9

Representación esquemática de las variables que describen el estado de polarización de la luz, ángulos elipsométricos ψ y Δ . Figura extraída de referencia [6].

En elipsometría podemos considerar dos partes importantes:

- a) La configuración experimental para determinar ψ y Δ .
- b) La teoría que relaciona los parámetros ópticos de la película con los valores obtenidos de ψ y Δ .

- a) Configuración experimental para determinar ψ y Δ .

Básicamente los componentes utilizados para la medición de los ángulos elipsométricos son un polarizador, un compensador y un analizador (que es también un polarizador). En la figura 10 se muestra esquemáticamente la forma de medición de un elipsómetro. La luz linealmente polarizada (P) proveniente del polarizador incide sobre la muestra (S). La reflexión produce luz elípticamente polarizada (E) la cual pasa a través de un compensador (C) que se ajusta para reestablecer la condición inicial (luz linealmente polarizada, A'). La posición del compensador es una medida del valor de Δ . Para lograr la condición de extinción se ajusta el analizador A con su eje de

transmisión en ángulo recto con el plano de polarización del haz. La posición angular del analizador es una medida de Ψ .

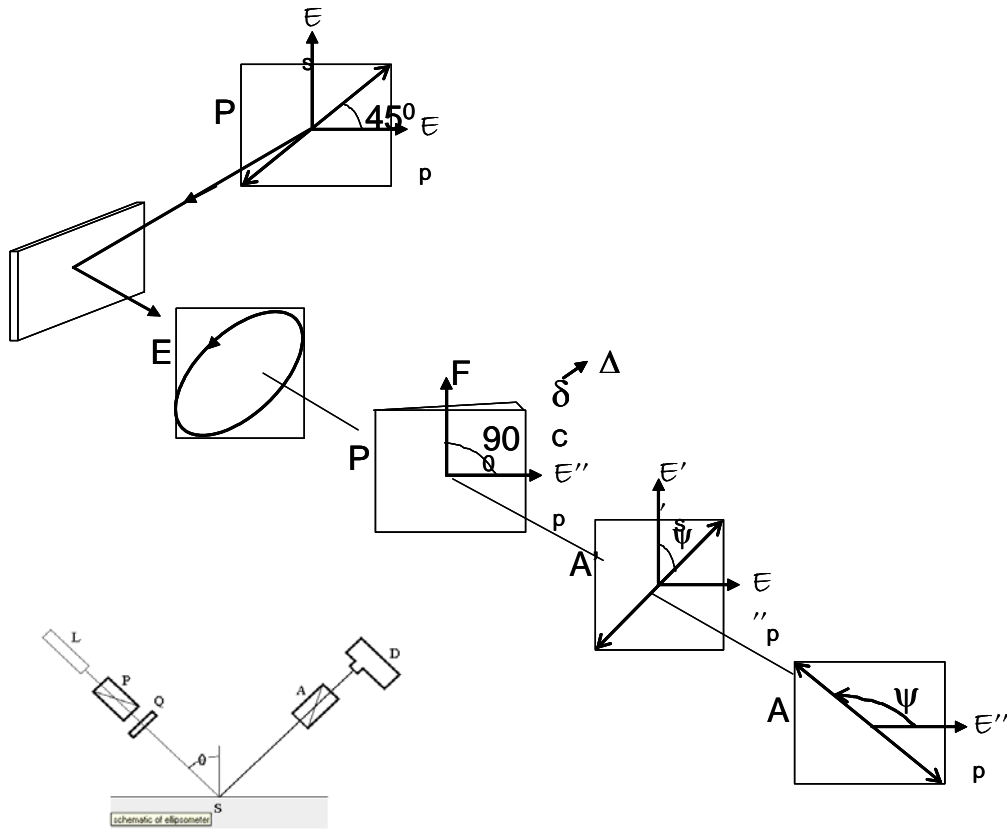


Figura 10

Disposición esquemática de un tipo de elipsómetro. El gráfico más pequeño es un esquema de un elipsómetro mostrando los componentes: L, laser del elipsómetro; P, polarizador; Q, retrasador de longitud de onda; A, es el analizador y finalmente D es el detector. Figura extraída de referencia [6]

b) Relación entre ψ y Δ para obtener los parámetros ópticos n , K , d . (índice de refracción, coeficiente de extinción y espesor de la película respectivamente).

El análisis matemático basado en las ecuaciones de reflexión de Fresnel relaciona los parámetros elipsométricos ψ y Δ con los parámetros ópticos n , K y d en la ecuación básica de la elipsometría:

$$\rho = \tan \psi e^{i\Delta} = f(n, k, d) \quad (7)$$

donde $\rho = \frac{r_p}{r_s}$ es el coeficiente de reflexión complejo.

Usando las ecuaciones de Fresnel:

$$r_p = \frac{n \cos \phi_i - \cos \phi_f}{n \cos \phi_i + \cos \phi_f} \quad (8a)$$

$$r_s = \frac{\cos \phi_i - n \cos \phi_f}{\cos \phi_i + n \cos \phi_f} \quad (8b)$$

Y considerando un sistema de tres fases como el mostrado en la figura 11:

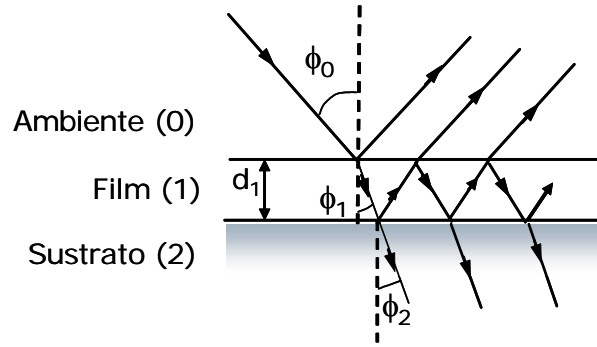


Figura 11

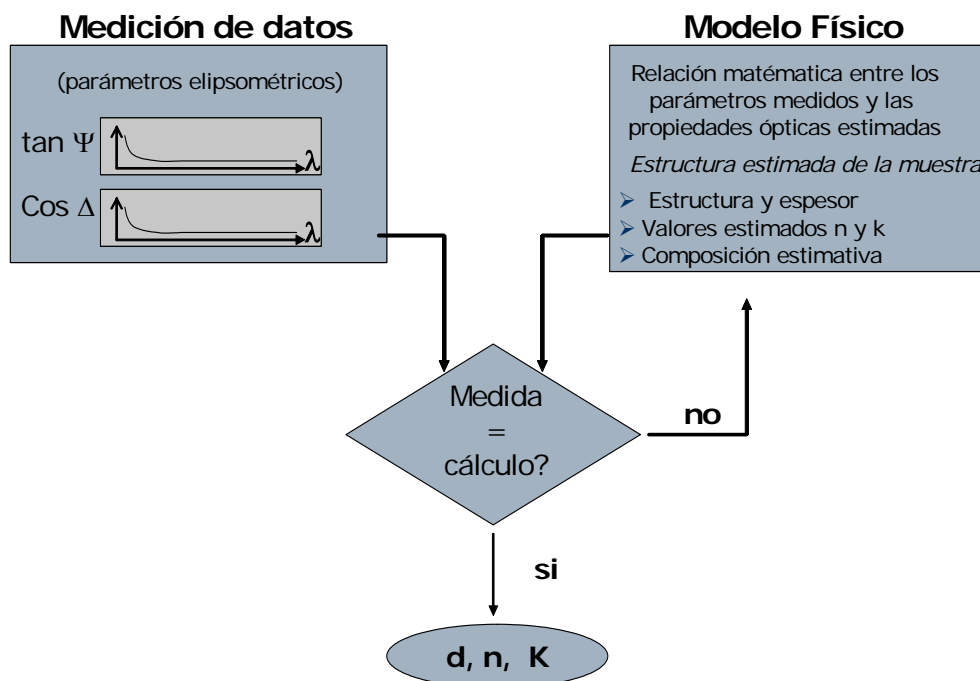
Representación de un sistema de tres fases

Se obtiene la siguiente relación:

$$\rho = \tan \psi e^{i\Delta} = \frac{r_{o1p} + r_{12p} e^{-i\Delta\phi}}{1 + r_{o1p} r_{12p} e^{-i\Delta\phi}} \frac{1 + r_{o1s} r_{12s} e^{-i\Delta\phi}}{r_{o1s} + r_{12s} e^{-i\Delta\phi}} \quad (9)$$

El lado derecho de la ecuación 9 es la forma específica de $f(n, k, d)$. La ecuación relaciona los parámetros elipsométricos ψ y Δ (a la derecha de la ecuación) con los parámetros ópticos de un sistema de tres fases: el índice de refracción del ambiente (n_0), del film (n_1) y del sustrato (n_2); el espesor de la película (d_1) para una determinada longitud de onda (λ) del haz del elipsómetro y el ángulo de incidencia en el ambiente (ϕ_0).

En el esquema I se muestra el procedimiento a seguir para la obtención de datos y el análisis de los mismos en elipsometría:



Esquema I

Representación esquemática de la forma de proceder para obtener las propiedades ópticas de una película.

2.1.2.2.-Deflectometría por gradientes de concentración (PBD).

Desde hace más de 50 años se ha demostrado la posibilidad de utilizar fenómenos ópticos de interferencia y refracción para la detección de perfiles de concentración en interfases sólido/líquido y líquido/líquido. R. Muller [8] ha escrito un artículo que resume las técnicas interferométricas aplicadas al estudio de interfases electrodo/ electrolito. Ya en 1937, Lamm [9] describió la aplicación de métodos de refracción (deflexión) para el estudio de gradientes de concentración y para determinar coeficientes de difusión.

Los métodos de refracción han sido más explotados que los métodos interferométricos quizás debido a que estos últimos requieren un arreglo experimental más complejo. Por otro lado, los métodos de deflexión tienen la ventaja de que pueden usarse fuentes de láser económicos que proveen un haz estrecho y altamente estable, además de poseer un desarrollo de detectores de posición económicos y fáciles de implementar. Royce [10], Pawliszyn [11, 12, 13] y Russo [14] y sus colegas estudiaron la aplicación de los métodos de refracción para la investigación de interfases electrodo/ electrolito. Esta técnica recibe el nombre de Efecto Mirage o deflectometría por gradientes de concentración (PBD). La espectroscopia fototérmica de deflexión (PDS) es la técnica precursora a PBD.

Mandeleis y Royce [15] realizaron un cálculo detallado del camino de un haz láser sobre el perfil de concentración en la interfase electrodo/ electrolito. Por otro lado, Decker y sus colaboradores [16, 17, 18] desarrollaron una descripción teórica de la técnica PBD aplicada a experimentos galvanodinámico ac y dc, principalmente para aplicaciones fotoelectroquímicas. Barbero y sus colaboradores [19] desarrollaron un modelo teórico para describir el comportamiento de PBD en procesos discontinuos, tales como la aplicación de saltos de potencial para determinar coeficientes de difusión iónica. Las reacciones discontinuas representan casos típicos de procesos electroquímicos tales como el intercambio iónico de películas electroactivas y la formación y disolución de monocapas [19]. Este tratamiento incluye descripciones teóricas simples basadas en óptica geométrica.

Tanto las técnicas de deflexión como de interferencia dedicadas a describir la interfase electrodo/ electrolito utilizan los perfiles de índice de refracción que se establecen cerca de la superficie del electrodo como consecuencia del consumo o de la generación de especies solubles en el electrolito. Como consecuencia del cambio en el índice de refracción, se altera el recorrido óptico con lo cual cambia el patrón de interferencia. En el caso de PBD, los cambios en el índice de refracción causan la deflexión del haz de prueba que se encuentra alineado y paralelo a la superficie de un electrodo plano. Debido a que la concentración del electrolito y el índice de refracción son directamente proporcionales, la generación de iones produce un aumento en el índice de refracción cerca de la superficie del electrodo el cual decae hacia el seno de la solución. En este caso, el haz de prueba es deflectado hacia la region con mayor índice de refracción, esto es, hacia la superficie del electrodo. Esta situación se muestra esquemáticamente en la figura 12. Según los ejes coordenados x, y y z, una deflexión hacia la superficie del electrodo queda definida como una deflexión negativa Ψ (-).

La deflexión de un haz láser que viaja paralelo y muy cerca de la superficie del electrodo, esta dado por la ecuación 10:

$$\Psi = \frac{w}{n} \frac{\partial n}{\partial c} \frac{\partial c}{\partial z} \quad (10)$$

donde $\partial n / \partial c$ describe la relación entre el índice de refracción n y la concentración del electrolito, c ; w representa el camino óptico sobre el cual el haz de láser interactúa con el perfil de concentración y $\partial c / \partial z$ es la variación de la concentración con la

distancia (gradiente de concentración). La ecuación se cumple para ángulos pequeños y bajo consideraciones de la óptica geométrica [8].

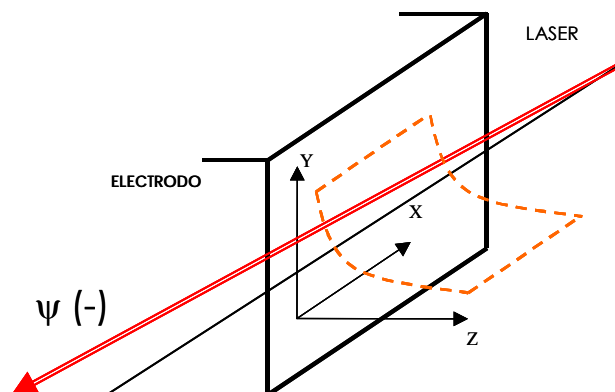


Figura 12

Esquema de deflexión de un haz y definición de los ejes coordenados

El signo de la deflexión del haz da idea acerca del tipo de flujo neto (desde o hacia la superficie del electrodo) que acompaña a la reacción electroquímica [20, 21]. Combinando el signo con la medida simultánea de la corriente en la voltametría cíclica o el transitorio de corriente debido a un salto de potencial puede definirse el tipo de carga de ion (anión o catión) que se está intercambiando principalmente.

Muchas reacciones electroquímicas son discontinuas, esto es, la transferencia de carga está limitada por el número de sitios de reacción disponibles sobre la superficie del electrodo, como ocurre por ejemplo en la disolución de películas metálicas delgadas sobre un electrodo, en las reacciones de carga y descarga de polímeros electroactivos y en particular en la óxido-reducción de multicapas de polielectrolitos redox. Para un salto de potencial en un proceso discontinuo, la deflexión tendrá la siguiente expresión[18]:

$$\psi(x,t) = \left(\frac{l}{n} \frac{\partial n}{\partial C} \right) \frac{C_s}{\sqrt{\pi D_o t}} \frac{z}{2 D_o t} e^{-z^2/4 D_o t} \quad (11)$$

donde C_s es la concentración de los sitios de reacción sobre la superficie del electrodo y por lo tanto la concentración de los iones asociados; D_o es el coeficiente de difusión de las especies móviles; z es la distancia del haz al electrodo; l es la longitud de camino recorrido por el haz; n es el índice de refracción en el seno de la solución; y $\partial n/\partial c$ es el cambio del índice de refracción con la concentración de las especies móviles.

La derivada de la ecuación 11 con respecto al tiempo nos lleva a la condición de máximo del transitorio en PBD:

$$t_{\max} = \frac{z^2}{6D} \quad (12)$$

De la pendiente de la gráfica $\sqrt{t_{\max}}$ vs. la distancia se determina el coeficiente de difusión.

2.1.2.3.- Espectroscopía Infrarroja de absorción por reflexión por transformada de Fourier (FTIR-RAS).

Esta técnica es una espectroscopía vibracional útil para la identificación de especies químicas. En la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Fouier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR), un haz de luz infrarrojo incide sobre un divisor de luz (beam splitter) donde es parcialmente transmitido hacia un espejo fijo y parcialmente reflejada hacia un espejo móvil. Esta descripción se encuentra esquematizada en la figura 13. Los haces reflejados se vuelven a combinar en el divisor, donde se produce interferencia, que depende de la longitud de onda y de la diferencia (δ) en las distancias recorridas por la luz reflejada en ambos espejos. La intensidad en función de δ constituye el interferograma. Luego, la transformada de Fourier del interferograma produce el espectro, es decir, el gráfico de intensidad (transmitida o reflejada) en función del número de onda. Los interferogramas se obtienen promediando un gran número de barridos a fin de aumentar la relación señal/ ruido.

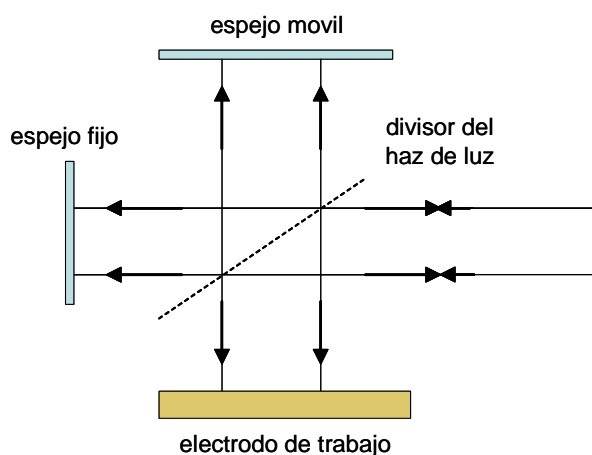


Figura 13

Esquema de la trayectoria del haz de luz para un instrumento FTIR-RAS.

Para estudiar procesos que ocurren en una interfase se utiliza la técnica en el modo absorción-reflexión (FTIR-RAS). En esta técnica el haz infrarrojo incidente es reflejado por la superficie en estudio (metal, semiconductor, etc) resultando un espectro debido a especies presentes en dicha superficie [22]. En particular, en la técnica de FTIR-RAS externa el haz incide desde un medio con menor índice de refracción (aire ó vacío) a uno con mayor índice de refracción. Dicha técnica permite determinar la orientación de las especies adsorbidas sobre superficies [23]. Esta técnica ha sido extendida al estudio de interfases durante un proceso electroquímico [24].

Las mediciones se realizan con luz polarizada paralela al plano de incidencia, *p*, y luz polarizada perpendicular al mismo, *s*. La componente paralela interacciona con la superficie y con el electrolito mientras que la componente perpendicular lo hace sólo con el electrolito. La técnica proporciona un espectro diferencial de las especies presentes en la superficie que puede correlacionarse con el cambio en el potencial aplicado y con la concentración.

Como la mayoría de los solventes, y en particular el agua, absorben la radiación infrarroja, en FTIR-RAS *in situ* se trabaja habitualmente en celdas especiales en las que el electrodo de trabajo es usualmente un disco colocado muy próximo a una ventana transparente a la radiación infrarroja. Para mediciones en soluciones acuosas, la capa de electrolito entre la superficie del disco y la ventana, generalmente de CaF_2 , tiene un espesor de $0,2 - 2 \mu\text{m}$.

2.1.3.- Técnicas gravimétricas.

2.1.3.1.- Microbalanza de Cristal de Cuarzo.

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) es un detector de masa que utiliza una oblea (disco) de cuarzo con oro depositados en ambas caras de la misma. Puede ser usada en solución y sirve para estudiar fenómenos interfaciales en electroquímica. Esta técnica es muy sensible a los cambios de masa en una interfase solución-sólido.

La oblea de cuarzo es un material piezoeléctrico que se deforma suavemente como respuesta a un campo eléctrico aplicado [25, 26]. Hay muchos materiales que se comportan de esta manera, sin embargo el cuarzo tiene propiedades químicas, eléctricas y mecánicas que lo hacen el material piezoeléctrico más utilizado [27]. Los electrodos en ambas caras del disco se usan para inducir una oscilación de campo eléctrico perpendicular a la superficie de la oblea. Esta oscilación produce una oscilación mecánica en toda la oblea de cuarzo, como se muestra en la figura 14.

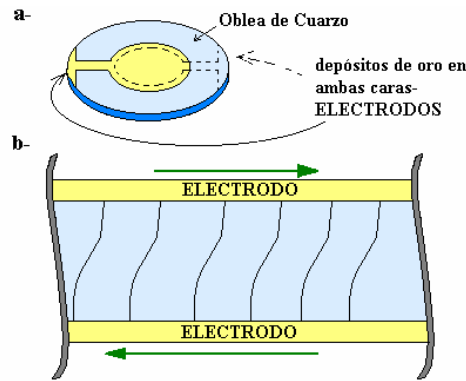


Figura 14

a) Cristal de cuarzo con los depósitos de oro en ambas caras (electrodos) b) Deformación mecánica durante la oscilación del campo eléctrico a la frecuencia fundamental.

Para que la información obtenida con EQCM se refiera sólo a cambios de masa, la monocapa o la película delgada depositada sobre el cristal de cuarzo debe tener un comportamiento rígido. Las películas rígidamente acopladas, se mueven sincrónicamente con el cristal de cuarzo y la frecuencia del dispositivo piezoeléctrico disminuye linealmente con la masa depositada sobre el cristal [28]. Cuando la película no se acopla rígidamente al cristal de cuarzo, la respuesta del cristal depende del espesor y de las propiedades viscoelásticas de la capa depositada debido a una desigualdad en la velocidad de propagación de la onda acústica en el cuarzo y en la película superficial [27] y a la atenuación de la onda resonante.

En 1959, Sauerbrey [27] relacionó el cambio de frecuencia de resonancia (Δf_s) de un cristal de cuarzo piezoeléctrico con la masa depositada sobre la superficie del cristal [28] mediante la relación mostrada en la ecuación 13, válida cuando $\Delta f_s \ll f_s$:

$$\Delta f_s = \frac{2 f_s^2 \Delta m}{\sqrt{\mu_Q \rho_Q} A} \quad (13)$$

donde Δf_s es el cambio de frecuencia medido, f_s es la frecuencia resonante del cristal, Δm es el cambio de masa, A el área activa piezoeléctrica, ρ_Q es la densidad del cuarzo ($2,684 \text{ g cm}^{-3}$) y μ_Q es el coeficiente elástico ($2,947 \times 10^{11} \text{ dina cm}^{-2}$).

La ecuación de Sauerbrey supone una película rígida con densidad de velocidad de transmisión de la onda acústica idéntica a la del cristal de cuarzo. También supone que el depósito es uniforme, y que la sensibilidad de EQCM no es uniforme a lo largo de la dirección radial del cristal de cuarzo resonante, con

sensibilidad máxima en el centro del mismo [29]. Esta aproximación ha sido muy usada en medidas gravimétricas en fase gaseosa, como en la evaporación de metales.

Los dispositivos piezoeléctricos sumergidos en líquidos viscosos [30] también responden a cambios de masa. La frecuencia de resonancia de resonadores de cuarzo de corte AT sumergidos en líquidos depende de las propiedades globales del líquido (densidad, viscosidad y conductividad) y de las propiedades interfaciales de la interfaz sensor-líquido (mojabilidad, rugosidad de la superficie, módulo de corte, etc). Además de los cambios de masa en la superficie del cuarzo y de densidad y viscosidad del líquido, la frecuencia resonante también puede ser afectada por otros factores como la conductividad del líquido [31], la diferencia de presión hidrostática entre las dos superficies del cristal y la tensión lateral en la película subyacente [32], la rugosidad de la superficie [33], las ondas longitudinales en el líquido [34] y las propiedades viscoelásticas y cambios de volumen de las películas inmovilizadas sobre el cristal de cuarzo[35].

Las propiedades eléctricas del cristal de cuarzo sin carga pueden ser descritas por un circuito equivalente conocido como Butterworth, Van y Dyke (BVD) [25, 26] mostrado en la figura 15. Este circuito está formado por una rama móvil que consta de un circuito RLC en paralelo con una rama estática formada por una capacidad C_0 . La equivalencia eléctrica al modelo mecánico (masa, respuesta elástica y pérdidas de fricción del cristal de cuarzo) son la inductancia L , la capacidad C y la resistencia R , respectivamente.

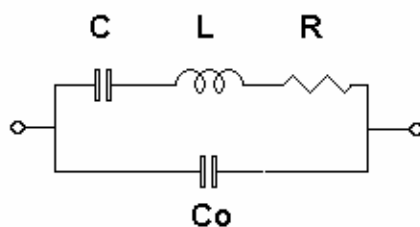


Figura 15

Representación gráfica del circuito equivalente de Butterworth-Van Dyke (BVD)

La capacitancia estática en paralelo con la rama móvil, C_0 posee tres contribuciones: la capacidad eléctrica del compensador de placas paralelas formado por ambos electrodos que intercalan al cristal de cuarzo (C''), la capacitancia parásita de pérdida debido a los conectores (C_p) y la capacidad de la doble capa eléctrica (C_{dl}) cuando el metal de los electrodos está en contacto con una solución electrolítica acuosa .

En la rama serie del circuito eléctrico equivalente, L es proporcional a la masa inercial del cristal, C es la energía que guarda el cristal de cuarzo durante la oscilación y R representa las pérdidas por fricción del cristal de cuarzo.

Como ya dijimos, los cristales de cuarzo de corte AT sumergidos en líquidos, también son afectados por la viscosidad, densidad y conductividad del líquido. Para un líquido Newtoniano es necesario agregar una inductancia L_1 y una resistencia R_1 adicionales en la rama serie del circuito BVD. Algunos valores típicos para los elementos equivalentes eléctricos de un cristal de 10 MHz de corte AT montado en la celda de medición son: $C = 30$ fF, $R = 100 \Omega$, $L = 8,4$ mH, $C_0 = 1$ -10 pF y $L_1 = 3,5$ μ F y $R_1 = 214 \Omega$ para agua.

Mason [36] estudió las propiedades viscoelásticas de un fluido en contacto con cristales de cuarzo y cómo éstas pueden afectar sus propiedades resonantes. Sin embargo, no hubo estudios sobre dispositivos de onda acústica piezoeléctrica hasta que Nomura y Okuhara [37] encontraron una expresión empírica que describe los cambios en la frecuencia resonante del cuarzo como función de la densidad, viscosidad y la conductividad de la solución en la que el cristal está sumergido. Luego, las observaciones empíricas de Nomura fueron descritas en términos de modelos físicos por Kanazawa [35] y Bruckenstein [38]. Estos autores derivaron la ecuación que describe los cambios en frecuencia resonante de un cristal de cuarzo en contacto con un líquido infinito, newtoniano y no conductor. Ambos tratamientos predicen que el cambio de frecuencia es proporcional a la raíz cuadrada del producto entre la densidad y la viscosidad de acuerdo con el acercamiento empírico de Nomura y Okuhara [37]:

$$\Delta f_1 = \frac{f_s^{3/2}}{\pi \mu_Q \rho_Q} \sqrt{\rho_l \eta_l} \quad (14)$$

donde ρ_l y η_l son la densidad y viscosidad del líquido, respectivamente.

En muchos casos el cambio de frecuencia producido por el líquido se suma al cambio de frecuencia debido a un cambio de masa en la superficie del cristal. En esos casos ha sido posible seguir la adsorción de biomoléculas, electrodeposición y stripping, permitiendo llevar a cabo microgravimetrías en contacto con líquidos.

Más recientemente, el tratamiento se extendió a dispositivos piezoeléctricos en contacto con medios viscoelásticos: líquidos y polímeros. Se comprendió entonces que si la masa depositada no se encuentra acoplada rígidamente al cristal de cuarzo durante la oscilación, no es posible la separación de la masa inercial y de las medidas de pérdida de energía realizando mediciones sólo a la frecuencia de resonancia. La impedancia del cristal de cuarzo en el intervalo de frecuencias acústicas fue

introducida para estudiar la masa y los cambios viscoelásticos y para ello se realizó una caracterización eléctrica completa del comportamiento del cristal cerca de la resonancia empleando analizadores de impedancia o analizadores de redes que operan en el intervalo de frecuencias de MHz [39]. Dado que la onda acústica transversal penetra la película superficial y el líquido viscoso, la aditividad de los elementos eléctricos equivalentes en el circuito de BVD es sólo válida bajo ciertas condiciones particulares. Martin y colaboradores estudiaron la impedancia cerca de la resonancia de cristales cubiertos con películas poliméricas, en aire, con un modelo BVD modificado para considerar las propiedades viscoelásticas de la película [40, 41].

El uso de las técnicas de impedancia acústica para describir los cambios de volumen y los cambios viscoelásticos en películas de polímeros, en aire o en contacto con líquido, electrolitos y bajo transformaciones electroquímicas simultáneas ha sido ampliamente discutido en la bibliografía [41-61].

2.2.- Equipamiento empleado.

2.2.1. - Potenciostato.

La mayoría de los experimentos electroquímicos fueron realizados con un potenciosato comercial AUTOLAB PGSTAT 30 potentiostat/galvanostat, capaz de trabajar también como bipotenciostato, o un potenciostato más simple construido en Argentina: TEQ 02.

También se utilizó un multímetro digital: Digit MULTIMETER Agilent 34401A con conexión RS 232 a la computadora.

2.2.2. - Microbalanza de Cristal de Cuarzo.

Para medir la frecuencia de resonancia y los componentes del circuito equivalente modificado Butterworth, Van y Dyke (BVD) del cristal de cuarzo se utilizó un divisor de tensión compleja. Este equipo se basa en aplicar al cristal de cuarzo un voltaje sinusoidal (5 mV pico a pico) generado por un oscilador de control de tensión (VCO) conectado a la salida D/A de un sistema de adquisición de datos Keithley 575. Ambos voltajes, V_i de entrada y V_o de salida son amplificados, rectificados y las señales resultantes son medidas con un conversor analógico/digital controlado por computadora. Se representa el cociente V_o/V_i vs. la frecuencia de salida de VCO y se ajustan a la ecuación analítica no lineal de la función de transferencia (ecuación 15) obteniéndose los elementos del circuito equivalente del BVD: L, R, C y C_0 del ajuste,

con C_0 como la capacidad paralela total que corresponde a las tres capacidades en paralelo ya mencionadas.

$$\left| \frac{V_0}{V_i} \right| = \frac{\sqrt{\left(\omega L - \frac{1}{\omega C} \right)^2 + R^2}}{\sqrt{\left(\omega L - \frac{1}{\omega C} + \frac{\omega L C_0}{C_m} + \frac{C_T}{\omega C C_m} - \frac{1}{\omega C_m} \right)^2 + \left(R + \frac{R C_0}{C_m} \right)^2}} \quad (15)$$

donde C_m es el capacitor de medición.

2.2.3. – Elipsómetro.

Las medidas elipsométricas fueron realizadas con un elipsómetro comercial de la compañía Sentech Instruments GMBH; SENTECH SE 400 provisto con un laser He-Ne (longitud de onda de 632,8 nm) y 10 mW de potencia como fuente lumínica. Se llevaron a cabo con un ángulo de incidencia de 70° empleando una celda comercial de teflón cuando las medidas se realizaron bajo líquido. Los parámetros elipsométricos (Ψ y Δ) se colectan y los valores de espesor se obtienen a partir de ajustes no lineales con programas comerciales.

2.2.4. – Deflectómetro por gradiente de concentración (PBD).

Los componentes básicos de un sistema de PBD son un láser He-Ne de 2 mW (Uniphase model 1103P) y un detector de posición (UDT model PIN- LSC/ 5D) como se esquematiza en la figura 16.

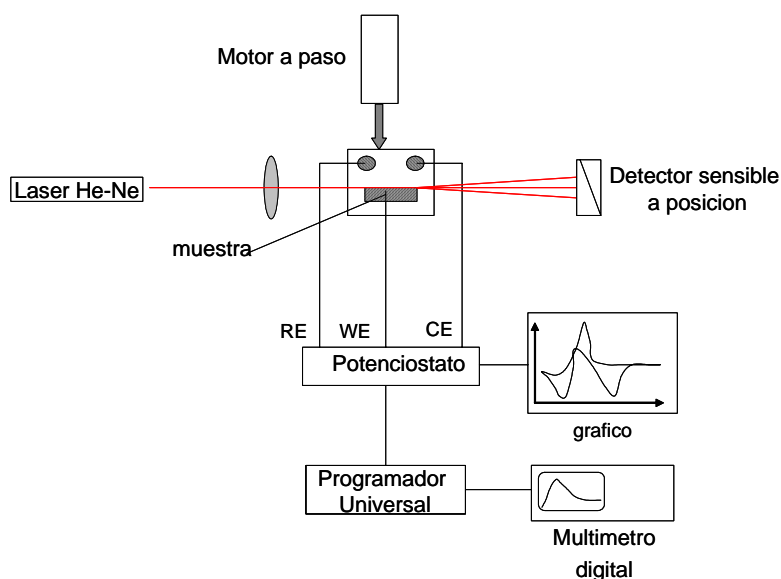


Figura 16

Esquema del arreglo experimental de PBD.

El haz del láser es focalizado por medio de una lente de 50 mm a un ángulo de diámetro similar y una rugosidad de 60 μm enfrente de un electrodo plano. La celda electroquímica (cubeta de cuarzo de 2 cm) esta montada sobre una base de traslación que permite el movimiento en las tres direcciones del espacio. Un motor de paso conectado a la base de traslación z permite posicionar de manera controlada la muestra con respecto al haz del láser en pasos de 1 μm . De esta manera la distancia más cercana a la que puede acercarse un haz de 60 μm de diámetro a un electrodo es de 30 μm . El detector de posición esta colocado a 25 cm aproximadamente detrás de la celda electroquímica y tiene una sensibilidad de 3mV/1 μm , lo que equivale a 1 μrad / mV. Para monitorear la señal de deflexión del haz y la respuesta electroquímica durante los experimentos de salto de potencial se utilizó un multímetro digital Agilent 34401.

2.2.5. - Espectrómetro Infrarrojo por transformada de Fourier.

Las mediciones de espectroscopía FTIR fueron realizadas en el modo absorción-reflexión (FTIR-RAS). Los espectros fueron registrados con un espectrómetro de transformada de Fourier Nicolet Magna 560 provisto de un generador de purga de gas Whatman 72-52 y equipado con un detector MCTA refrigerado con N_2 líquido.

En la figura 17 se muestra un esquema de la celda utilizada en las medidas in-situ. Los experimentos electroquímicos (in-situ) se realizaron alineando el electrodo de oro (WE) a la ventana de CaF_2 dejando muy poco volumen en el paso óptico para minimizar la absorción debida a la delgada película de agua. Se registraron espectros colectando 200 interferogramas por experimento a cada potencial con una resolución de 4 cm^{-1} .

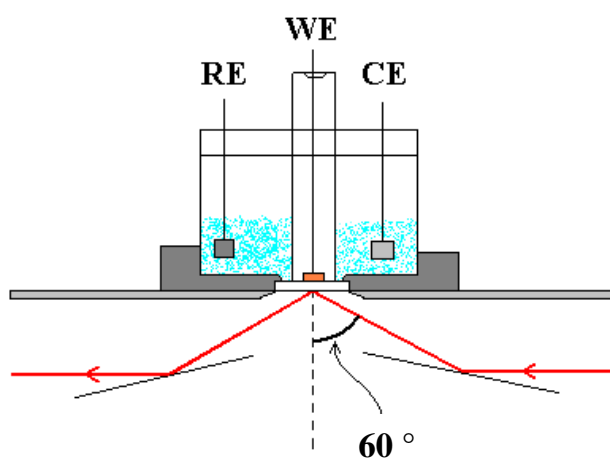


Figura 17

Esquema de la celda utilizada en las mediciones de FTIR-RAS *in situ*.

2.2.6.- Perfilómetro.

Las mediciones de perfilometría fueron realizadas en el Centro Atómico Bariloche en el laboratorio del Dr. Hernán Pastoriza con la ayuda del Dr. Diego Shalom. Se trata de un perfilómetro de la marca Tencor Instruments modelo Alpha-Step 100.

2.2.7.- Microscopio Óptico.

Las micrográficas ópticas fueron realizadas empleando un microscopio óptico convencional marca Leica modelo DMRX.

2.2.8- Microscopio electrónico de barrido

Las micrográficas electrónicas fueron realizadas mediante un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo Leo Zeiss DSM 982 Gemini en el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

2.3.- Reactivos químicos, soluciones.

Las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua Milli Q (Milli Pore). La anilina (Riedel De Haen ó Merck) fue siempre destilada a presión reducida y mantenida a -18 °C en freezer. Se utilizaron los siguiente reactivos: poliestirensulfonato (MW CA 70.000, 200.000, Aldrich); polivilsulfonato (25% en agua, peso molecular promedio estimado entre 980-1000 g/mol, Aldrich); ácido sulfúrico (98 %, Merck); ácido clorhídrico (37 % Merck); ácido perclórico (Mallinckrodt); ácido cítrico (para análisis, Riedel De Haen); fosfato de potasio (monobásico y di básico) (ACS Sigma- Aldrich); bisulfito de sodio (pro análisis, Merck); glucosa oxidasa (de Aspergillus Níger, Fluka). Las sales CsCl, NaCl, LiCl, TEAClO₄ y LiClO₄ fueron Merck de calidad analítica.

El pH de las soluciones buffer fue ajustado usando un pH metro (WTW, pH 540 GLP Multical).

Algunos experimentos fueron llevados a cabo usando soluciones preparadas con agua ultra pura obtenida por destilación bajo permanganato de potasio.

2.4.- Electroodos y Celdas.

2.4.1.-Electrodos.

Como **electrodo de trabajo** se utilizaron dos tipos de electrodos. Un tipo fue preparado por evaporación de oro sobre obleas de silicio: las obleas de silicio fueron cortadas de acuerdo al tamaño de electrodo requerido (1,5 cm x 2 cm para experimentos electroquímicos clásicos, 2 cm x 3 cm para experimentos de elipsometría y 1 cm x 1,5 cm para los experimentos de PDB). Los silicios cortados fueron cuidadosamente desengrasados con acetona usando un equipo Soxhlet durante 8 horas. Una vez terminado este proceso los electrodos fueron enjuagados en una solución 10 % HF para extraer posibles trazas de SiO₂ formadas sobre la superficie, finalmente fueron enjuagados con isopropanol y colocados en la máquina evaporadora (Edwards AUTO 306). Para mejorar la adherencia del oro sobre el sustrato de silicio se evaporó primero 10 nm de Ti, luego 20 nm Pd y finalmente 200 nm de Au 99,9999 % de pureza. Para las mediciones de FTIR-RAS *in situ* se utilizó un electrodo de oro circular montado sobre un sostén de Teflon pulido a 0,5 µm con alúmina. Para verificar la limpieza superficial de dichos electrodos se realizó una voltametría cíclica del mismo en ácido sulfúrico 2 M en todos los casos.

Otro tipo de electrodos empleados está montado en un dispositivo que contiene cuatro microbandas de oro de 10 µm de ancho y 0,4 µm de espesor, separadas entre sí por 10 µm de un material aislante. Como puede observarse en la figura 18, estas microbandas se encuentran montadas sobre un soporte aislante que permite el manejo de las mismas. Estas microbandas se adquirieron de la firma Windsor Scientific Limited (www.windsor-ltd.co.uk). Para verificar la limpieza del oro de estas microbandas también se realizó la voltametría cíclica de las mismas en ácido sulfúrico 2 M, según consejo del fabricante.



Figura 18

Microbandas de oro comerciales utilizadas como electrodo de trabajo.

Los electrodos empleados en las medidas de microbalanza de cristal de cuarzo fueron cristales de cuarzo de corte AT de 10 MHz y 14 mm de diámetro, 0,168 mm de espesor (ICM, Oklahoma City, OK, cat. 31210) y depósito de oro de 10 nm con un área activa de 0,196 cm².

Se utilizaron como **electrodos de referencia**, electrodos de plata/cloruro de plata sumergidos en una solución de Cloruro de potasio 3M saturado con cloruro de plata. Los electrodos fueron preparados en el laboratorio mediante la deposición de AgCl sobre un alambre de plata por electrólisis en una solución de HCl. El potencial de los electrodos de referencia es de 0.22 mV respecto al electrodo normal de hidrogeno (ENH). La estabilidad de los electrodos fue verificada con frecuencia midiendo la diferencia de potencial frente a un electrodo comercial tomado como patrón.

Como **electrodo auxiliar o contraelectrodo** se usaron mallas de platino las cuales aseguran un área expuesta mucho mayor (más de 100 veces mayor) que la correspondiente a los electrodos de trabajo utilizados.

2.4.2.- Celdas electroquímicas.

En los experimentos electroquímicos clásicos se utilizó una celda especial construida en teflón, capaz de contener un volumen de 5 ml y mantener siempre la misma área de electrodo de trabajo expuesta a la solución mediante un pequeño o-ring de diámetro interno tal que el área geométrica del electrodo de trabajo sea 0,228 cm².

Para las medidas realizadas con microbandas de oro se diseñó una celda especial de teflón de manera tal que sólo quedara expuesta a la solución el área activa de las mismas y evitar posibles contaminaciones superficiales por la exposición del material (epoxi) usado por el fabricante para fijar el silicio al soporte.

Para los experimentos de elipsometría combinados con electroquímica se utilizó una celda especial diseñada para contener el electrodo de trabajo que permite que el haz del láser del elipsómetro incida sobre el electrodo con un ángulo de 70°.

La celda de microbalanza de cristal de cuarzo tiene un diseño especial para contener el cristal de cuarzo y exponer el oro a la solución.

La celda de PBD es simplemente una celda de cuarzo de 2cm x 2cm en la cual el electrodo de trabajo se coloca paralelo a las paredes de la misma.

La celda del FTIR-RAS *in situ* tiene un diseño especial que se esquematiza en la figura 17.

2.5.- Procedimientos experimentales.

2.5.1.- Limpieza de los electrodos de oro.

Los electrodos de oro; tanto los depósitos de Au sobre Si, como las microbandas; fueron limpiados electroquímicamente antes de su uso como ya se mencionó. La limpieza de oro por voltametría cíclica ha sido ampliamente estudiada. Se realiza un ciclado entre 0 y 1600 mV (vs Ag/AgCl/Cl⁻ 3M) a 100 mV/seg en una solución ácida, por ejemplo, H₂SO₄ 2 M. La forma de la voltametría cíclica de oro es muy característica y su comparación es un buen parámetro de limpieza. Si la superficie se encuentra muy contaminada es posible realizar ciclados a mayor velocidad de barrido (100 V/seg); otro procedimiento un poco más enérgico consiste en mantener el electrodo a 1600 mV por un tiempo no mayor a 1 minuto y luego reducir la película para eliminar las especies oxidadas. Ambos procedimientos aseguran obtener una superficie limpia para posteriores mediciones electroquímicas.

2.5.2.- Polimerización de anilina y caracterización.

La anilina fue polimerizada electroquímicamente de distintas maneras de acuerdo al tipo de experimento a realizar. Para caracterizaciones básicas del polímero, se polimerizó por ciclado del potencial a una velocidad de barrido de 50 mV/seg. Los primeros ciclos fueron realizados entre -150 y 850 mV y los siguientes ciclos se realizaron sólo hasta 730 mV (para evitar la degradación de polímero). Se realizaron la cantidad de ciclos necesarios para llegar a la cantidad de polianilina (PANI) deseada, según el experimento.

La polimerización de PANI sobre microbandas de oro, se realizó por salto de potencial desde circuito abierto a 900 mV durante el tiempo necesario para obtener una carga de 1 mC (carga mínima necesaria para cubrir la separación entre las microbandas).

Para sintetizar PANI utilizando PSS como contraanión (PANI(PSS)) se partió de soluciones 0,44 M de monómero y de 10 mg/ml de PSS de masas molares de 70000 ó 200000 en H₂SO₄ 2 M.

Para la síntesis de PANI sulfonada (SPAN), primero se sintetizó polianilina (0,44 M de anilina en H₂SO₄ 2M) y luego se procedió a la sulfonación mediante saltos de potencial entre -150 mV y 200 mV durante 15 y 3 segundos respectivamente. La solución de sulfonación contiene HNaSO₃ 4M a pH 2 ajustado con solución de HClO₄ 1M. El polímero fue caracterizado por balanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM).

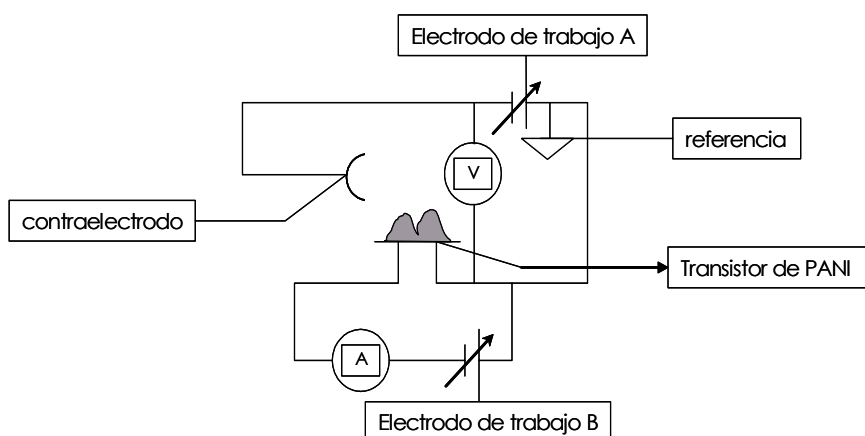
Luego de obtener el polímero, ya sea por voltametría cíclica o por salto de potencial, éste fue caracterizada por voltametría cíclica en solución de H_2SO_4 2 M. Esto se realizó entre -150 mV y 450 mV a 50 mV/s. Entre estos límites de potencial sólo se observa la transición emeraldina/ leucoemeraldina del polímero.

2.5.2.1.- Caracterización de la polimerización y la sulfonación de anilina por EQCM.

La electropolimerización de anilina se realizó por voltametría cíclica como se mencionó en la sección anterior al igual que la sulfonación. Ambas fueron estudiadas simultáneamente por EQCM.

2.5.2.2.- Medidas de resistencia de la película de PANI

La medida de la resistencia de polianilina (PANI(PSS) o SPAN) sobre las microbandas se realizó utilizando un bipotenciostato. En el esquema II se muestra el arreglo experimental para la medida de resistencia. Uno de los electrodos de trabajo es una de las microbandas y se aplica una diferencia de potencial. El otro electrodo de trabajo es otra microbanda y se usa para ciclar el potencial unos ± 20 mV respecto al potencial aplicado a la primera.



Esquema II

Esquema que muestra la medición de resistencia del transistor molecular utilizando un bipotenciostato para aplicar un potencial a una de las microbandas (electrodo A) y ciclar la segunda microbanda alrededor del potencial de la primera (electrodo B).

2.5.3.- Construcción de la película de reconocimiento molecular y su caracterización.

2.5.3.1- Autoensamblado electrostático sobre PANI(PSS) y SPAN.

Tanto las películas de PANi(PSS) como las de SPAN poseen una densidad neta de carga negativa; esto permite comenzar con el autoensamblado electrostático de los demás componentes del dispositivo: el mediador redox PAH-Os y la enzima glucosa oxidasa (GOx); como se mencionó en el Capítulo 1, PAH-Os tiene un exceso de densidad de carga positiva, mientras que GOx posee densidad de carga negativa en las condiciones de autoensamblado. Entonces, se expone la película de SPAN o PANi(PSS) a una solución acuosa de PAH-Os (10 mM) por 10 minutos, luego se enjuaga con abundante agua Milli Q y se expone a una solución acuosa de la enzima (1mg/ml) durante 10 minutos, se enjuaga con agua Milli Q y se repite el proceso con la solución de PAH-Os y de GOx sucesivamente hasta alcanzar el número de capas deseado.

2.5.3.2 - Evidencia EQCM del autoensamblado electrostático de (PAH-Os/GOx).

Primero se realizó la electropolimerización de anilina sobre el electrodo de oro del cristal de cuarzo, desde una solución 0,45 M del monómero en H_2SO_4 2 M y usando una solución acuosa de PSS dializado (10 mg/ml). La electropolimerización se realizó por salto de potencial desde circuito abierto a 950 mV hasta alcanzar una carga de polianilina equivalente a $2,7 \times 10^{-8}$ mol/cm². La construcción del autoensamblado se realizó a partir de la película de PANi(PSS) o SPAN. La película se expuso por 10 minutos a una solución acuosa de PAH-Os (0,5 mM). El electrodo fue lavado y enjuagado con abundante agua y luego fue expuesto directamente a 5 ml de agua donde se comenzó la medición de la respuesta de EQCM. Una vez obtenida una línea de base bajo agitación, se agregaron 50 μl de una solución 11 μM de la enzima glucosa oxidasa (concentración final: 1,1 μM). Luego de enjuagar el electrodo con abundante agua se procedió de la misma manera para seguir con la adsorción de la segunda capa de PAH-Os y luego de GOx. Se registraron los cambios de impedancia sólo durante la adsorción de la enzima ya que la absorción de PAH-Os posee un comportamiento viscoelástico y no se obtiene información de masa directamente, como ya se mencionó anteriormente. Esto se repitió hasta obtener películas de PANi(PSS)/(PAH-Os)₃/(GOx)₃ ó SPAN/(PAH-Os)₃/(GOx)₃.

2.5.4.- Evidencia de funcionamiento del sistema químico integrado PANI(PSS)/ PAH-Os /GOx o SPAN/ PAH-Os /GOx.

Estas medidas se realizaron sobre electrodos de oro convencionales (silicio con depósito de oro). El electrodo contiene todo el sistema químico de interés, PANI(PSS) o SPAN con la película de reconocimiento molecular autoensamblada (PAH-Os y GOx). El electrodo es mantenido a 500 mV por 10 minutos de manera de llevar a PANI a su estado aislante. Pasado este tiempo, se desconecta el potencióstato y se mide el potencial a circuito abierto. Una vez que el potencial se ha estabilizado, se procede al agregado de glucosa. El polímero conductor cambia su potencial como consecuencia de la reacción que cataliza la enzima.

2.5.5.- Respuesta del transistor integrado.

La respuesta del transistor se realizó sobre el arreglo de microbandas conteniendo el polímero conductor y la capa de reconocimiento molecular. Esta película fue oxidada a 500 mV por 10 minutos para llevar al polímero conductor a su estado aislante; luego, el dispositivo se desconecta del potencióstato, se aplica una diferencia de potencial de 30 mV entre las microbandas y se mide la corriente que circula entre ellas. Si el polímero se encuentra en su estado aislante la corriente será muy baja. Una vez que se obtiene una línea de base estable, se agrega glucosa a la solución y se registra el cambio de la corriente que indica que el polímero está cambiando su estado de conducción. Simultáneamente se mide el potencial de la película frente a un electrodo de referencia.

2.5.6.- Dinámica de la película de reconocimiento.

2.5.6.1.- Preparación de las muestra para medidas elipsométricas, EQCM, PBD y FTIR-RAS.

El electrodo de oro utilizado depende de la técnica que se va a emplear: para elipsometría se usa un electrodo de oro depositado sobre Silicio: Si-Ti-Pd-Au de 2 cm x 3 cm. Para Microbalanza de cristal de cuarzo se utiliza el cristal de cuarzo descrito en la sección experimental que se refiere a electrodos y para PBD si utiliza el mismo tipo electrodo que se utiliza en elipsometría solo que con diferente tamaño (1 cm x 1,5 cm). Finalmente para FTIR-RAS *in situ* se utilizó un electrodo de oro circular montado sobre un sostén de teflón pulido a 0,5 μm con alúmina. Para comenzar con el autoensamblado se procedió a la adsorción de ácido 3-mercaptopropanosulfónico (33 mM en H₂SO₄

10 mM) por media hora. Una vez transcurrido este tiempo, el electrodo fue enjuagado con abundante agua Milli Q y luego fue expuesto a una solución acuosa de PAH-Os por el período de 10 minutos, nuevamente el electrodo fue enjuagado con agua Milli Q y colocado en la solución acuosa del polianión PSS (10 mg/ml). Esto se realizó la cantidad de veces necesaria para obtener una película final con 15 capas de PAH-Os y 14 de PSS ó 15 de PAH-Os y 15 de PSS.

2.5.6.2.- Determinación del espesor del autoensamblado.

Para obtener el espesor del autoensamblado, se determinaron los parámetros elipsométricos Ψ y Δ durante la construcción del mismo. Esto es, luego de adsorber la primera capa de PAH-Os se realizó una determinación de sus parámetros elipsométricos, luego se realizó el mismo procedimiento con la primera capa de PSS. Se continuó realizando determinaciones de los parámetros elipsométricos en las bicapas impares (tercera, quinta, séptima, etc. capa de PAH-Os y PSS).

2.5.6.3.- Medidas electroquímicas combinadas con elipsometría, EQCM, FTIR y PBD.

Las medidas combinadas de electroquímica con las diferentes técnicas se realizaron sobre los electrodos modificados con (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ y (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₅. Los experimentos electroquímicos realizados consistieron en saltos de potencial desde 150 a 600 mV con una duración de 50 segundos en cada potencial acoplados simultáneamente según la técnica utilizada. También se realizaron barridos de potencial entre los mismos límites a 2 mV/s. Este procedimiento se repitió en diferentes soluciones: HCl, LiCl, NaCl, CsCl, TEAClO₄ y LiClO₄, todas 0,01 M.

2.6.- Referencias.

- [1] R. Pletcher, R. Greef, R. Peat, L.M. Peter, J. Robinson, Southampton Electrochemistry Group, University of Southampton, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, 2nd. edición, Horwood Publishing, Chemical Science Series, Inglaterra, **2001**.
- [2] A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods, fundamentals and applications*, cap. 1, 2, 2nd. edition, John Wiley &Son, INC, New York, **2001**, pag. 1-86.
- [3] H.M. Villullas, E.A. Tiacianelli, V.A. Macagno, E.R. Gonzalez, *Electroquímica: Fundamentos y Aplicaciones en un enfoque interdisciplinario*, Editorial Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, **2000**.
- [4] P. Drude, *Ann. Phys. Chem.*, **1889**, 36, 352.
- [5] P. Drude, *Ann. Phys. Chem.*, **1890**, 39, 481.

- [6] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods, fundamentals and applications*, cap. 17, 2nd. edition, John Wiley & Son, INC, New York, **2001**, pag. 680-735.
- [7] E. Collet, *Polarized Light, Fundamentals and Applications*, Chapter 25: Ellipsometry, Ed. M. Dekker, Inc., **1993**.
- [8] R.H. Muller, *Advances in Electrochemisrty and Electrochemical Engineerring*, vol. 9, (Ed. P. Delahay, C. W. Tobias), John Wiley & Sons, INC, New York, **1973**, pag. 281.
- [9] O. Lamm, *Nova Acta Regiae Scientiarium Upsaliensis*, **1937**, Sr. IV, 10, 1.
- [10] B.S.H. Royce, D. Voss, A. Bocarsly, *Journal de Fisique C6*, 1983, **44**, 325
- [11] J. Pawliszyn, M.F. Weber, M.J. Dignam, A. Mandelis, R.D. Venter, S. M. Park, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 236.
- [12] J. Pawliszyn, M.F. Weber, M.J. Dignam, S. M. Park, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 239.
- [13] J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 1751.
- [14] R.E. Russo, F.R. McLarnon, J.D. Apear, E.J. Cairros, *J. Electrochem. Soc.*, **1987**, 134, 2783.
- [15] A. Mandelis and B.S.H. Royce, *Applied Optics*, **1984**, 23, 2892.
- [16] F. Decker, R.T. Neuenschwander, C.L. Cesar, A.F.S. Fenna, *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, 228, 481.
- [17] F. Decker, M. Fracastoro- Decker, *J. Electroanal. Chem.*, **1988**, 243, 187.
- [18] M. Fracastoro-Decker, F. Decker, *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, 266, 215.
- [19] C. Barbero, M.C. Miras, R. Kötz, *Electrochimica Acta*, **1992**, 37(3), 429.
- [20] C. Barbero, M.C. Miras, O. Hass, R. Kötz, *J. Electrochem. Soc.*, **1991**, 138, 669.
- [21] O. Hass, *Faraday Disc. Chem. Soc.*, **1989**, 88, 123.
- [22] M.W. Urban, *Vibrational Spectroscopy of Molecules and Macromolecules on surfaces*, cap. 3, Willey Interscience, **1994**.
- [23] D. L. Alara, J.D. Swallen, *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86, 2700.
- [24] T. Iwasita, F. Nart, *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, vol. 4, (Ed. H. Gerischer, C. Tobias), John Willey and Sons, INC, VCS, **1995**, pag. 123.
- [25] D. A Buttry, M. D. Ward, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1355.
- [26] M. D. Ward, *Physical Electrochemistry*, cap. 7., (Ed. J Rubinstein), Marcel Dekker, **1995**.
- [27] G. Sauerbrey, *Z. Phys.*, **1959**, 155, 206.
- [28] M. Yang, M. Thomson, W. C. Duncan Hewitt, *Langmuir*, **1993**, 9, 802.
- [29] H. D. Hillier, M. D. Ward, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2539.
- [30] K. K. Kanazawa, J. G. Gordon, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 175, 99.
- [31] F. Josse, Z. A. Shana, D. E. Radke, D. T. Haworth, *IEEE Trans. Ultrasound, Ferro-electrics, Freq. Control* 37, **1990**, 359.
- [32] K. E. Heusler, A. Grzegorzewski, L. Jackel, J. Pietrucha. *Ber. Bunsen. Ges., Phys. Chem.*, **1988**, 92, 1218.

- [33] S. J. Martin, H. E. Hager, *J. Appl. Phys.*, **1989**, 65, 2627.
- [34] Z. Lin, M. D. Ward, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 685.
- [35] C. E. Reed, K. K. Kanazawa, J. G. Gordon, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 1770.
- [36] W. P. Mason, W. O. Baker, H. J. McSkimin, J. H. Heiss., *Phys. Rev.*, **1949**, 75, 936.
- [37] R. Nomura, M. Okuhara., *Anal. Chim. Acta*, **1982**, 147, 365.
- [38] S. Bruckenstein, M. Shay, *Electrochim. Acta*, **1985**, 30, 1295
- [39] A. Janshoff, H. J. Galla, C. Steinem, *Angew. Chem. Int.*, **2000**, 39, 4004.
- [40] S. J. Martin, G. C. Frye. *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.*, IEEE, N. York, **1991**, p. 393.
- [41] S. J. Martin, V. E. Grastaff, G. C. Frye, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 2272.
- [42] H. Muramatsu, K. Kimura, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2502.
- [43] H. Muramatsu, A. Egawa, T. Ataka, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, 388, 89.
- [44] V. Grastaff, S. Martin, *J. Appl. Phys.*, **1994**, 75, 1319.
- [45] R. Lucklum, C. Behling, R. W. Cernosek, S. J. Martin, *J. Appl. Phys.*, **1997**, 30, 346.
- [46] S. Martin, V. Grastaff, G. Frye, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 2272.
- [47] M. A.M. Noel, P. A. Topart, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 484.
- [48] P. A. Topart, M. A.M. Noel, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 2926.
- [49] D. M. Kelly, J. G. Vos, R. A. Hillman, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1996**, 92, 4121.
- [50] N. Oyama, T. Tatsuma, K. Takahashi, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 10504.
- [51] S. Ikeda, N. Oyama, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 1910.
- [52] N. Oyama, K. Takada, T. Tatsuma, K. Naoi, T. Okajima, T. Oksaka, *Sens. Actuators B*, **1993**, 13-14, 372.
- [53] S. Yamaguchi, T. Shimomura, T. Tatsuma, N. Oyama, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 1925.
- [54] H. Inaba, M. Iwaku, T. Tatsuma, N. Oyama, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, 71, 387.
- [55] C. Frubose, K. Doblhofer, D. M. Soares. *Ber. Bunsenges, Phys. Chem.*, **1993**, 97, 475.
- [56] D. M. Soares, W. Kautek, C. Frubose, K. Doblhofer. *Ber. Bunsenges, Phys. Chem.*, **1994**, 98, 219.
- [57] D. Johannsmann, K. Mathauer, G. Werner, W. Knoll, *Phys. Review B*, **1992**, 46, 7808.
- [58] D. Johannsmann, J. Grüner, J. Wesser, K. Matlhauer, G. Wegner, W. Knoll, *Thin Solid Films*, **1992**, 210/211, 662.
- [59] E. J. Calvo, C. Danilowicz, R. Etchenique, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1995**, 91, 4083.
- [60] R. A. Etchenique, E. J. Calvo, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4833.
- [61] E. J. Calvo, R. Etchenique, P. N. Bartlett, K. Singhal, C. Santamaria, *Faraday Discuss.*, **1997**, 107, 141.

3.1.- Introducción.

Polianilina (PANI) comenzó a ser un material ampliamente usado en aplicaciones biológicas tales como sensores químicos o biosensores por sus excepcionales propiedades: rápida polimerización electroquímica, alta reproducibilidad en la deposición y excelente estabilidad ambiental. PANI tiene además la característica de cambiar su conductividad en varios órdenes de magnitud simplemente por cambios redox o por cambios en el pH de la solución. Sin embargo, para poder usarla en aplicaciones biológicas es necesario mejorar la estabilidad electroquímica del polímero a pHs cercanos a la neutralidad.

Como se mencionó en el Capítulo 1 se han realizado varios intentos para mejorar la función de polianilina en pH fisiológicos. Varios de ellos apuntan a la polimerización de anilina en presencia de contraiones poliméricos. Las películas de polianilina sintetizadas en presencia de pequeños contraiones, como cloruro o sulfato, se convierten rápidamente en películas electroquímicamente inactivas en soluciones neutras. Por otro lado, las películas formadas por deposición del polímero partiendo de soluciones de monómero de anilina en presencia de aniones poliméricos como poliestirensulfonato (PSS) [1], polivinilsulfonato (PVS) [2] o Nafión [3], mantienen la electroactividad a pH neutros. Bartlett and Wang [4] realizaron un estudio detallado de la actividad electroquímica de polianilina – poliestirensulfonato y en particular de su aplicación práctica a pH neutros. Por otro lado, Yue and Epstein [5, 6] han demostrado que la sulfonación posterior de polianilina produce una película conductora en soluciones acuosas de pH menores o iguales a 7. Además, esta película difiere del polímero precursor en varios aspectos tales como la alta solubilidad en soluciones acuosas alcalinas, la propiedad de ser un polímero autodopado y que la conductividad ($\sigma = 0,1 \text{ Scm}^{-1}$) no cambia demasiado cuando se expone a soluciones de pH neutros [7, 8, 9]. Evidencias indirectas sugieren que la electroneutralidad en estas películas compuestas se debe a la transferencia de protones desde o hacia la solución más que a intercambio de aniones [10]. Por otro lado, para películas sulfonadas del modo sugerido por Epstein [11] queda demostrado que la conductividad se debe a un efecto de autodopado del polímero resultante luego de la sulfonación; haciendo que la conductividad de la película sea independiente del pH hasta valores cercanos a 7.

La polianilina sulfonada (SPAN) también puede aplicarse biosensores enzimáticos [12]. Ha sido propuesta para crear estructuras conductoras en superficies mediante técnicas litográficas [13]. Su uso ha sido considerado en baterías de litio en las cuales la transferencia de cationes ocurre durante el almacenamiento de la carga [14].

Un factor de control clave en el fenómeno electroactivo, el procesamiento y las potenciales aplicaciones del polímero es el grado de sulfonación de la película de PANI, esto es la relación azufre/ nitrógeno, S/N. Se han desarrollado un gran número de alternativas para lograr una alta relación S/N. Las formas de PANI emeraldina base (EB) y pernigranilina base (PNB) se usaron como materiales iniciales mientras que ácido sulfúrico fumante, ácido clorosulfónico y complejos de trietilfosfato/trióxido de azufre fueron los agentes de sulfonación empleados en la síntesis de SPAN. Todos estos métodos producen un grado de sulfonación no mayor al 50% [15]. Partiendo de la forma leucoemeraldina y ácido sulfúrico fumante fue posible obtener un polímero (HSPAN) con un 75% de los anillos fenilos sustituidos [16]. Otra alternativa para obtener polianilina sulfonada consiste en la copolimerización oxidativa de anilina con ácido 2-aminosulfónico [17] o ácido 3-aminosulfónico [18]. Sin embargo los grupos ácido sulfónico parecen no ser necesariamente incorporados dentro de la cadena polimérica, como lo evidencia la muy baja conductividad lograda con respecto a los otros tipos de polianilinas sulfonadas [19].

Recientemente se encontró que los anillos quinoimínicos de PANI reaccionan con nucleófilos [20] entre los cuales se encuentran los iones sulfito [21], obteniéndose productos de adición. Ya que estos nucleófilos son capaces de atacar solamente a los anillos quinoimínicos presentes en emeraldina base (EB), la cantidad máxima de grupos que pueden incorporarse como sustituyente esta limitada por la concentración de estas unidades en la cadena (25% mol por unidades repetitivas de PANI). Para aumentar la cantidad de sustituyentes por encima de este nivel, se aplicó exitosamente la reoxidación química [21] o electroquímica in-situ [22]. De esta manera se ha logrado obtener polianilinas sulfonadas con grados de sulfonación que van desde 16% a 66% [21]. La velocidad de reacción depende del estado de oxidación del polímero [21, 22]. El estado reducido (leucoemeraldina) es significativamente menos reactivo que el estado oxidado. En este sentido, la química en la superficie de las películas conductoras de polianilina puede ser controlada cinéticamente. Sin embargo, el control cinético debe ser determinado empíricamente en cada caso. Por otro lado, si la adición nucleofílica puede llevarse a cabo electroquímicamente in-situ, debería ser posible controlar la modificación cuantitativamente a través de la carga de oxidación. En este capítulo se presentan resultados de la adición nucleofílica de sulfito a PANI controlado electroquímicamente y monitoreado usando microbalanza de cristal de cuarzo. Recordemos que para que haya una relación lineal entre la masa y la frecuencia, la capa de polímero debe ser acústicamente delgada, ya que de otra forma los corrimientos de frecuencia pueden atribuirse también a cambios viscoelásticos [23]. Las medidas fueron realizadas en modo electroacústico debido a que durante la electropolimerización puede ocurrir la incorporación de solvente

dentro de la red de polímero y el hinchamiento de la película puede provocar cambios viscoelásticos que influyen en la masa determinada [24].

A continuación se presenta un estudio detallado del proceso de sulfonación de películas de polianilina mediante la aplicación de saltos de potencial desde -150 mV a 200 mV y volviendo al potencial inicial, en una solución de NaHSO₃ empleando EQCM como sensor gravimétrico (para más detalles experimentales, Capítulo 2, sección 2.5.2.1.). El método permite un delicado control del grado de sulfonación de PANI que no es fácil de lograr empleando otros métodos informados en la bibliografía.

3.2.- Electropolimerización de anilina.

Como ya se mencionó, el primer paso es determinar si los cambios observados en la frecuencia durante la electropolimerización de anilina están relacionados con cambios de masa. En trabajos previos, efectuados con películas de polianilina en los que se empleó EQCM, se demostró que los cambios de masa se encontraban relacionados linealmente con los cambios de frecuencia durante la electropolimerización [25] así como durante la óxido- reducción de estas películas [26]. El uso de impedancia electroacústica junto con EQCM permite verificar la validez de dicha interpretación analizando los parámetros de impedancia del cristal de cuarzo según el circuito equivalente de Butterworth, Van y Dyke (BVD) y aplicando la condición de Sauerbrey [27]. Si se cumple que $\Delta X_{Lp} \gg \Delta R_p$, donde ΔX_{Lp} y ΔR_p son los cambios de impedancia inductiva y de la resistencia de la película, respectivamente, se puede aplicar la ecuación de Sauerbrey, según:

$$\Delta m \cong \frac{A \sqrt{\mu_Q \rho_Q}}{8\pi f_o^2 L_Q} \cdot \Delta X_{Lp} \quad (1)$$

donde $L_Q \approx 7.5$ mH para cristales de cuarzo de 10 MHz de corte AT, Δm es la variación de masa, A el área activa del piezoeléctrico, ρ_Q la densidad del cuarzo (2.648 g cm⁻³) y μ_Q el módulo de corte para un cristal de cuarzo de corte AT (2.947×10^{11} dina cm⁻²), siendo f_o la frecuencia fundamental del cristal de cuarzo.

En la figura 1 se muestra la variación de los parámetros electroacústicos (ΔX_{Lp} y ΔR_p) en función del tiempo durante la electropolimerización de anilina sobre el electrodo de oro. Se observa que el cambio de inductancia, ΔX_{Lp} , crece continuamente durante el ciclado que lleva a la polimerización mientras que los cambios en la resistencia, ΔR_p , permanecen casi constantes. Sin embargo puede observarse que en cada ciclo de la voltametría cíclica ΔX_{Lp} aumenta durante la

oxidación y disminuye durante la reducción de la película. Esto está relacionado con el intercambio de iones y solvente durante los cambios redox.

Ya que la pérdida viscosa se mantiene en un nivel bajo comparada con los cambios en la impedancia inductiva o en la frecuencia debido a la masa de polímero depositada, es posible utilizar la ecuación (1) para relacionar los cambios de masa con los cambios de frecuencia (cambios de inductancia). La película de PANI se obtuvo electroquímicamente hasta un espesor final equivalente a una variación de inductancia de $50 \Omega^{-1}$ (531 Hz) lo cual equivale a un valor de masa de $2,44 \mu\text{g cm}^{-2}$. Si consideramos $90,6 \text{ g mol}^{-1}$ como la masa molar de una unidad de monómero de PANI, la concentración final por unidad de monómero será 25 nM cm^{-2} .

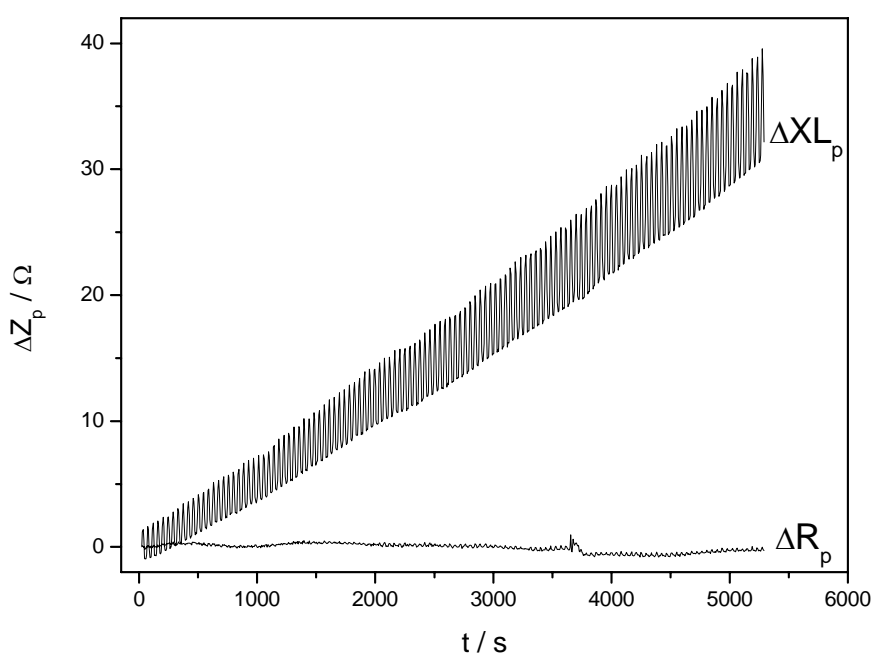


Figura 1

Parámetros electroacústicos en función del tiempo durante la electropolimerización de anilina. La electropolimerización se realizó por barridos de potencial a 50 mV s^{-1} entre -150 mV y 850 mV vs. Ag/AgCl/Cl^- durante los tres primeros ciclos y entre -150 mV y 730 mV en los siguientes ciclos. Anilina $0,1 \text{ M}$ en HClO_4 1 M .

Se observa en la Figura 1 que existe una relación lineal entre el cambio de masa y el número ciclos de oxidación-reducción en HClO_4 1 M . Durante la polimerización de PANI en presencia de polivinilsulfonato, el aumento de masa se relaciona cuadráticamente con el número de ciclos [25]. Debido a que la velocidad de electropolimerización en presencia de iones perclorato es lenta [28], sólo se observa la porción lineal en este caso.

3.3.- Adición nucleofílica de iones bisulfito a polianilina.

En la figura 2 se observa la variación de los parámetros electroacústicos ΔX_{LP} y ΔR_p en función del tiempo para una película de PANI sometida a ciclos de oxidación y reducción en NaHSO_3 4M a pH 2. Como en el caso de la síntesis de la película, el cambio en la resistencia, ΔR_p , es pequeño (menor al 3%) con respecto a los cambios de inductancia, ΔX_{LP} , y por lo tanto, la pérdida por viscosidad es baja y los cambios de masa pueden ser directamente estimados a partir de los cambios de la frecuencia según la ecuación (1).

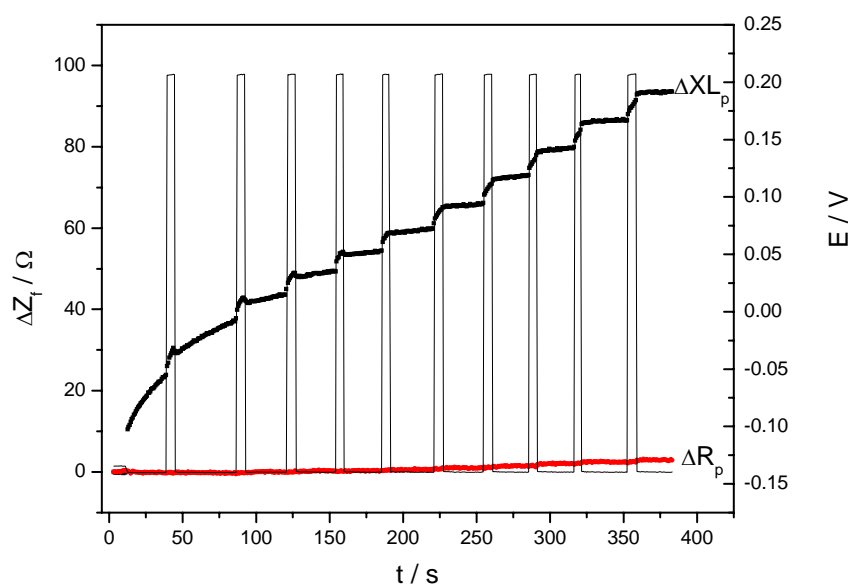


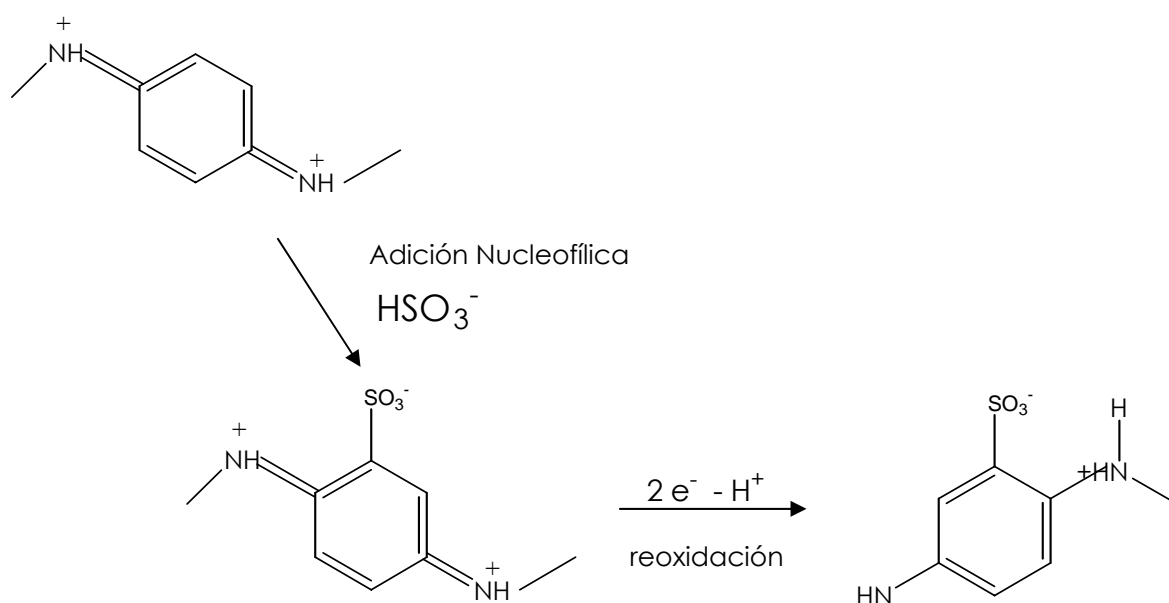
Figura 2

Variación de los parámetros electroacústicos ΔR_p y ΔX_{LP} durante los saltos de potencial desde -150 mV a 200 mV y volviendo a -150 mV aplicados sobre una película de PANI en contacto con una solución de NaHSO_3 4 M ajustado a pH 2 con HClO_4 1 M. Masa equivalente de la película de PANI = $2 \mu\text{g cm}^{-2}$.

Puede observarse que la masa permanece constante cuando la película se encuentra en el estado reducido (a -150 mV) y aumenta cada vez que la película es oxidada (a 200 mV). Este resultado indica que no hay reacción en el estado reducido mientras que el aumento de masa se observa cuando PANI se encuentra en su estado oxidado. Solamente en los tres primeros pasos de la modificación la masa aumenta aún a -150 mV. Pareciera que la lenta relajación de PANI en el estado reducido se revelara como un aumento de masa. Cuando la modificación del polímero alcanza

un cierto grado, el comportamiento de relajación cambia y la masa se mantiene constante a -150 mV.

En el estado reducido PANI sólo contiene unidades amino que no son reactivas respecto a la adición nucleofílica mientras que en el estado oxidado contiene unidades quinoniminas que pueden ser atacadas por nucleófilos (iones sulfito en este caso) dando lugar a un polímero sulfonado como se muestra en el esquema I.



Esquema I

Representación de la reacción de sulfonación

En la figura 3 se muestra para un salto de potencial típico (desde -150 mV a 200 mV y volviendo a -150 mV): la corriente (en la parte superior), el aumento de masa (en el medio) y la carga integrada (parte inferior de la figura) en función del tiempo durante la reacción de adición nucleofílica.

La comparación de la carga integrada, Q , con el cambio de masa, Δm , muestra un retraso del aumento de masa con respecto al rápido incremento de la carga. Podemos considerar que al principio la carga es usada para oxidar la película reversiblemente y que no involucra incremento de masa por adición de sulfito. Inmediatamente después de que la película es oxidada, ocurre la adición nucleofílica y recíprocamente, cuando la película es llevada nuevamente a su estado reducido el incremento de masa se detiene. Cabe notar que aún cuando se regrese al potencial en el cual se espera que la película se encuentre en el estado reducido, el incremento en la masa continua, indicando la existencia de especies reactivas sobre la superficie después de cambiar el potencial del electrodo.

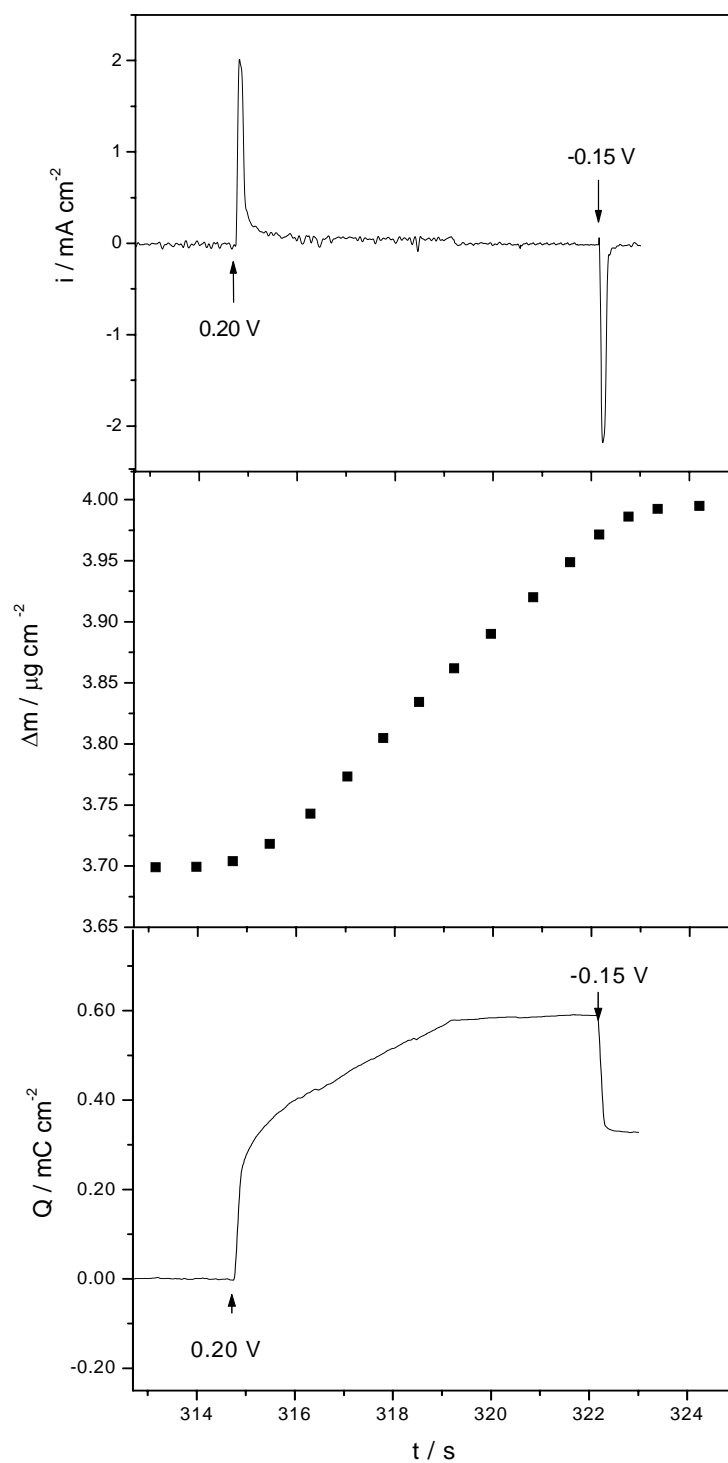


Figura 3

Transitorios de corriente (arriba), cambio de masa (medio) y carga integrada (abajo) durante uno de los saltos de potencial aplicado a una película de PANI de $2 \mu\text{g cm}^{-2}$ en NaHSO_3 4 M ajustado a $\text{pH } 2$ con HClO_4 1 M .

3.3.1- Análisis de la presencia de sulfito por FTIR.

Para asegurarnos que se han incorporado grupos sulfónicos a la película de PANI, se realizaron espectros infrarrojo en el modo absorción-reflexión ex situ (FTIR-RAS) antes y después de la sulfonación como se muestra en la figura 4. La comparación de los espectros infrarrojo muestra la aparición de nuevas bandas a 1074 y 1019 cm^{-1} asignadas a los modos de estiramiento simétrico y asimétrico de SO_3^- , respectivamente. La intensidad de estas señales aumenta con el tiempo de reacción confirmando la incorporación de grupos SO_3^- dentro de la película de PANI.

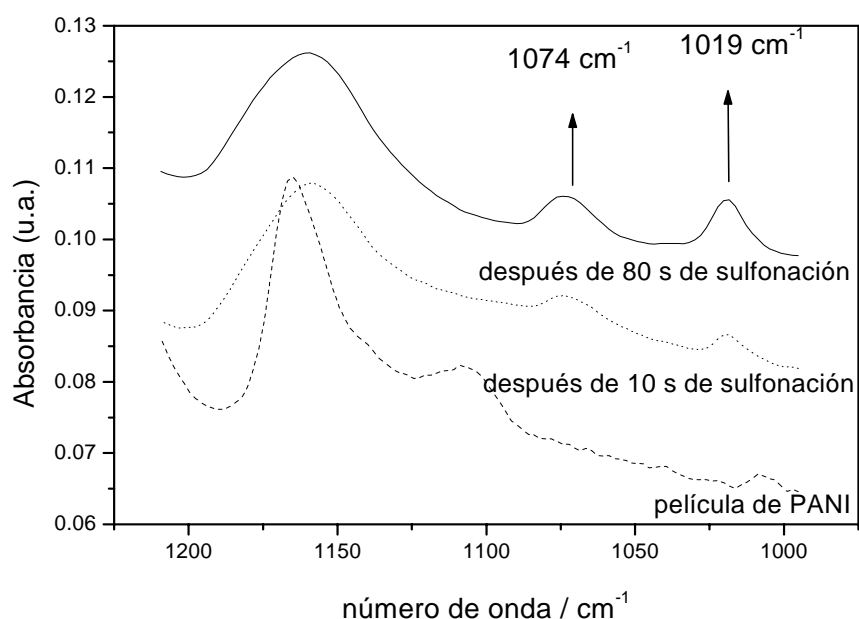


Figura 4

Espectros infrarrojo correspondientes a una película de polianilina depositada sobre un electrodo y a la misma luego de 10 y 80 segundos de oxidación a 200 mV en una solución de NaHSO_3 4M de pH 2. (Los espectros se muestran desplazados verticalmente. Gentileza del Dr. Gustavo Morales, Universidad Nacional de Río Cuarto).

5.3.2.- Determinación de la masa molar de la especie adicionada.

En la figura 5 se muestran los cambios de masa en función de la carga en estado estacionario (tomados de los datos representados en la figura 2). Se observa una relación aproximadamente lineal con pendiente $6,36 \times 10^{-4}\text{ g C}^{-1}$. Usando la ley de Faraday, es posible estimar la masa molar de la especie adicionada a la película de PANI. Se obtuvo un valor de $122,7\text{ g. mol}^{-1}$ que excede el valor de la masa molar correspondiente a la adición de un grupo sulfónico ($\text{PM} = 80\text{ g. mol}^{-1}$) por anillo de

anilina. Se podría especular que este exceso de masa correspondería a las moléculas de agua de solvatación que acompañan a los grupos sulfónicos. Es importante mencionar que el potencial elegido para que ocurra la reacción es el correspondiente al comienzo del pico de oxidación, con lo cual solo una pequeña cantidad de polímero es oxidada inicialmente, asegurando que la pérdida de masa por intercambio aniónico sea mínima.

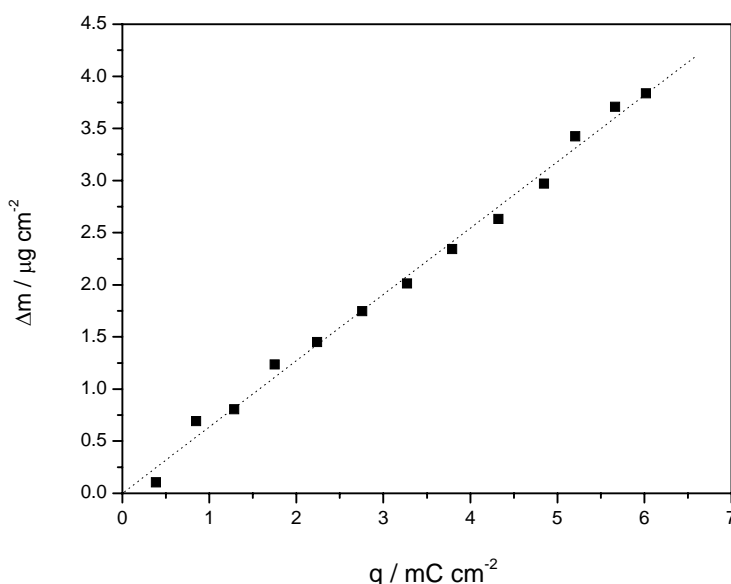


Figura 5

Cambio de masa vs. carga en el estado estacionario obtenidos a partir de los datos en figura 2. Ajuste representado en línea de puntos, pendiente: $6,36 \times 10^{-6}$ g. C⁻¹.

3.3.3.-Velocidad de adición nucleofílica.

A partir de los cambios de masa en función del tiempo (figura 3) es posible analizar la rapidez de la adición nucleofílica en cada ciclo. Esta permanece prácticamente constante hasta que se inyecta cierta cantidad de carga y luego se observa una rápida caída (esto ocurre después de 13 ciclos consecutivos de óxido reducción). Se trata de un comportamiento típico y puede explicarse como un agotamiento de los sitios de reacción sobre la superficie del polímero a medida que ocurre la adición de sulfito con la posterior caída en la velocidad de reacción.

5.3.4.-Determinación del grado de sulfonación.

Es posible estimar el grado de sulfonación obtenido como función del tiempo de reacción relacionando el número de unidades de monómero presentes en la

película (que se obtiene a partir de la masa de polímero depositada durante la electropolimerización) y el número de grupos sulfónicos incorporados en cada ciclo (que se obtienen a partir de la relación masa-carga). En la figura 6 se muestra que es posible sulfonar alrededor del 50% de los anillos aromáticos disponibles en la película y que el grado de sulfonación es proporcional a la carga inyectada para la oxidación

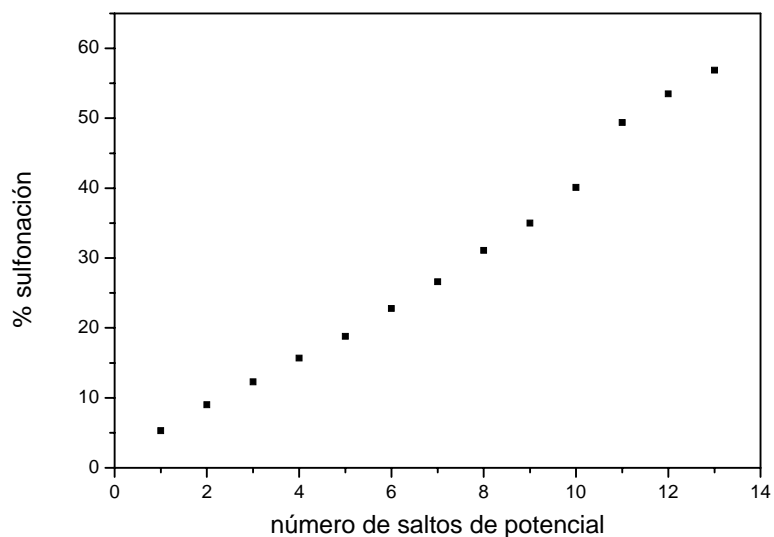


Figura 6

Porcentaje de sulfonación en función del número de saltos de potencial de -150 mV, 200 mV a -150 mV (a partir de datos en la figura 2).

de la película.

La sulfonación podría inducir un cambio de volumen de la película pero la técnica EQCM no tiene en cuenta estos cambios. Es importante mencionar que la resistencia viscoelástica prácticamente no varía indicando que los cambios en las propiedades volumen/viscosidad son pequeños o éstas no son alteradas por la modificación química.

3.4.- Efecto de la sulfonación sobre las propiedades del polímero.

3.4.1.- Respuesta electroquímica.

La figura 7 muestra la voltametría cíclica de películas de PANI antes (a) y después (b) de la adición nucleofílica de sulfito bajo control electroquímico. La respuesta voltamétrica de la película sulfonada es similar a la observada para SPANe [5] (polímero preparado por sulfonación electrofílica de sulfito a emeraldina, 50% de sulfonación), SPANn [21] (polímero preparado por adición nucleofílica de iones sulfito a

polianilina con grados variables de sulfonación) y SPANc [29] (polímero preparado por copolimerización de ácido aminosulfónico y anilina con grado variable de sulfonación) ya sea sintetizadas química ó electroquímicamente [30]. A diferencia de las películas de PANI sin modificar, el potencial del pico de oxidación aparece a potenciales más positivos, lo cual se podría deber a la combinación de un efecto estérico y un efecto inductivo de los grupos sulfónicos que incrementarían la energía necesaria para llevar al polímero a su estado oxidado.

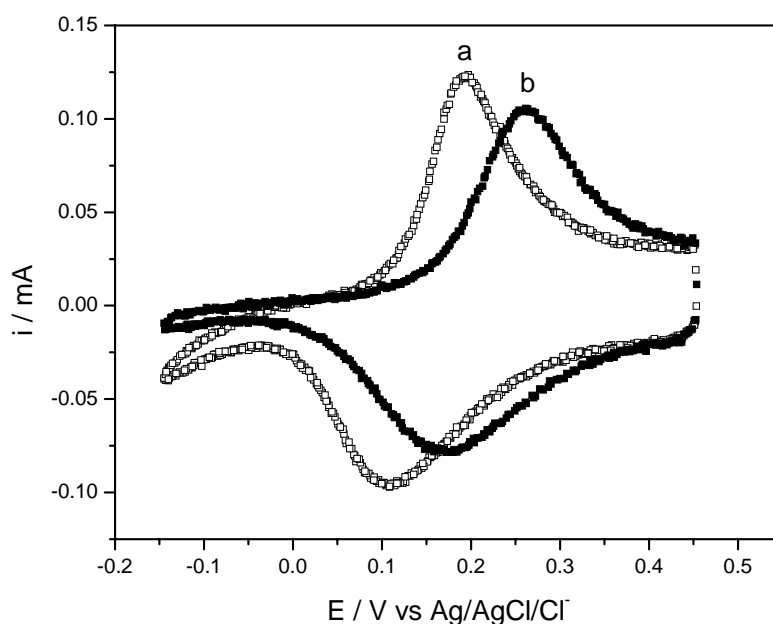


Figura 7

Voltametrías cíclicas obtenidas en HClO_4 1 M a 50 mV/s de: (a) PANI , (b)SPAN.

3.4.2.- Intercambio iónico.

Para mantener la electroneutralidad y el potencial químico de la película, durante la oxidación de polímeros conductores se intercambian iones con la solución externa. Se ha demostrado [31] que el intercambio iónico en PANI es bastante complejo y ocurriría una partición simultánea de contraiones y protones. Por otro lado, se ha postulado que el intercambio iónico en películas de SPANe y SPANc involucraría principalmente protones [32]. Además, medidas realizadas con EQCM de películas de SPANe [33] en las cuales se ha observado aumento de masa durante la oxidación, sugieren la incorporación de aniones. Sin embargo, si se realiza el experimento con diferentes aniones, el cambio de masa observado es prácticamente el mismo. La combinación de medidas de EQCM y PBD muestran que los protones son

intercambiados pero que un flujo de solvente en sentido opuesto es el responsable de los cambios de masa observados.

La figura 8 muestra los parámetros electroacústicos para PANI (a) y para PANI modificada (b) durante la oxidación de la película. Las pérdidas viscosas (ΔR_p) son despreciables comparadas con los cambios en la inductancia (ΔX_{Lp}), por lo tanto, éste último parámetro puede correlacionarse directamente con los cambios de masa en ambos casos.

La relación masa-potencial para PANI está de acuerdo con resultados publicados recientemente [31, 34]. Durante el barrido anódico pueden observarse dos efectos: a potenciales menores a 250 mV la carga anódica aumenta y no se observan cambios significativos en la masa mientras que a potenciales mayores a 250 mV ambas se incrementan.

Para interpretar estos resultados, se supone que los protones son expulsados desde la película a bajo potenciales positivos y el solvente que solvata a los protones expulsados debería ser compensado por un flujo contrario de solvente que resultaría en una cantidad de agua por debajo del límite de detección de la técnica. Sólo a elevadas concentraciones de ácido el protón intercambiado puede ser detectado por EQCM [28]. A potenciales más altos, puede haber incorporación de aniones ya que se observa aumento en la masa.

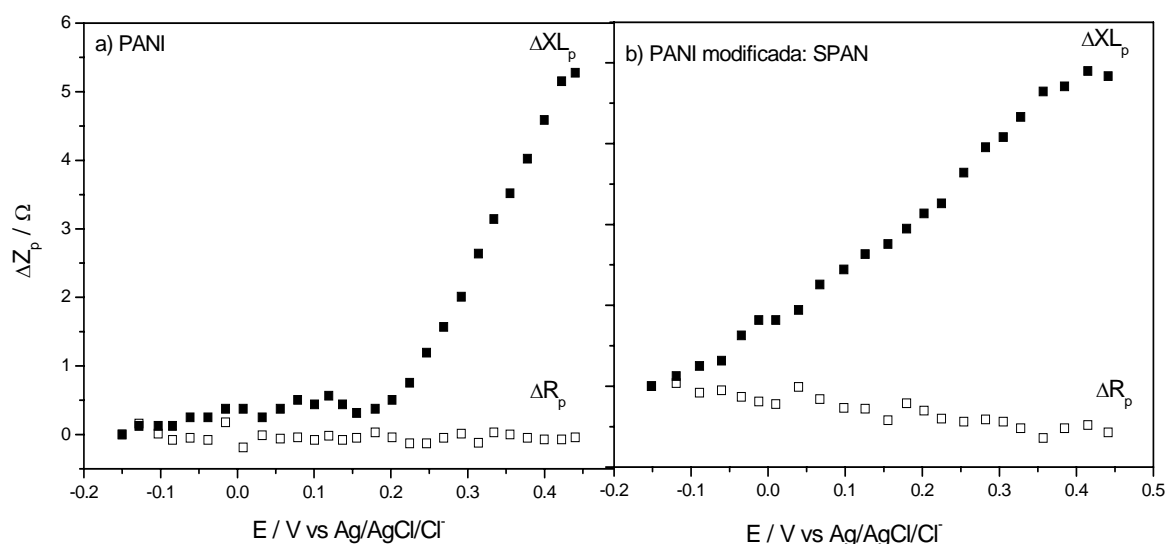


Figura 8

Parámetros electroacústicos ΔR_p y ΔX_{Lp} para películas de (a) PANI y para (b) SPAN durante la perturbación potenciodinámica en $HClO_4$. Velocidad de barrido 50 mV/seg.

Como se observa en la figura 8, la dependencia masa-potencial para la película sulfonada es similar a aquella medida para películas de SPANe: sólo se observa aumento de masa durante el proceso de oxidación. Como se discutió antes, puede interpretarse este resultado como un flujo contrario de solvente que domina el cambio de masa observado. Medidas de PBD en películas de SPANn [35] indican que los protones son los iones intercambiados mayoritariamente, como lo es para películas de SPANe [33].

En la figura 9 se muestra la relación entre la masa y la carga obtenida a partir de la dependencia masa-potencial y la correspondiente carga integrada por voltametría cíclica. Los cambios de masa se encuentran relacionados con el flujo de electrones y usando la ley de Faraday es posible calcular la masa molar de las especies intercambiadas durante el proceso redox en la película. En la figura 9 puede verse que en el caso PANI (círculos vacíos) se observan dos tipos de regímenes: uno con pendiente cercana a cero relacionado con el bajo nivel de detección del intercambio de protones y otro con pendiente $151,4 \text{ g mol}^{-1}$ ($r = 0,906$, $n=7$) correspondiente a la incorporación de aniones ($\text{ClO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). En el caso SPAN (círculos completos) se observa un solo fenómeno con una pendiente de $28,8 \text{ g.mol}^{-1}$ que corresponde a una inserción neta de 1,6 moléculas de agua por molécula de protón expulsado.

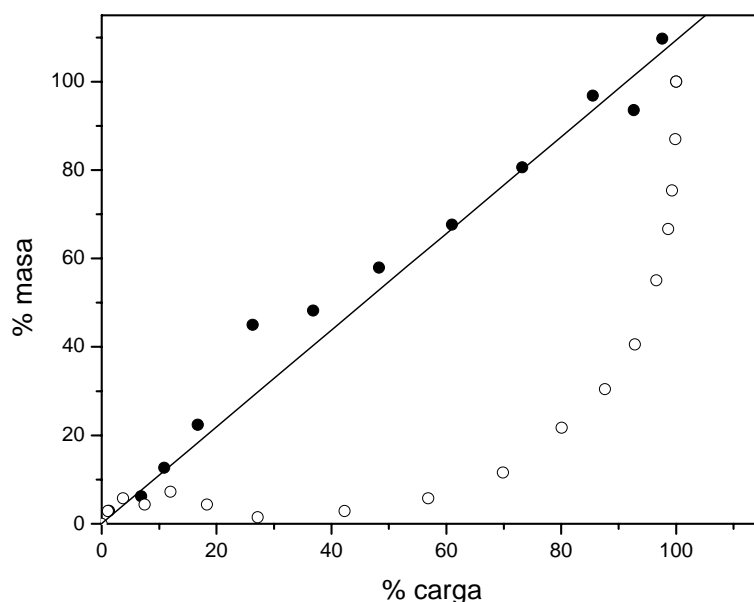


Figura 9

Porcentaje masa-carga obtenido bajo las condiciones de la figura 8 para PANI(○) y para SPAN(●).

3.4.3.- Efecto del pH sobre los procesos redox.

Ya se mostró que como resultado de la presencia de los grupos sulfónico en la cadena, el potencial de pico anódico (y catódico) correspondiente al primer proceso redox en SPAN se desplaza hacia potenciales más positivos con respecto a PANI. Los potenciales de pico se ven afectados también por el pH. Para PANI, el pico correspondiente al primer proceso redox es independiente del pH en el intervalo 1-4, y se desplaza 59 mV/pH hacia potenciales menos positivos cuando el pH aumenta en el intervalo -0,2-0. El pico anódico (y el catódico) correspondiente al segundo proceso redox en PANI se desplaza (n) 120 mV/pH hacia potenciales menos positivos cuando el pH aumenta [36].

En la figura 10 se muestra la voltametría cíclica de una película de SPAN expuesta a soluciones de electrolito de diferentes pH. Como puede observarse, en SPAN los potenciales de los picos correspondientes a ambos procesos redox se desplazan a valores más negativos a medida que el pH aumenta.

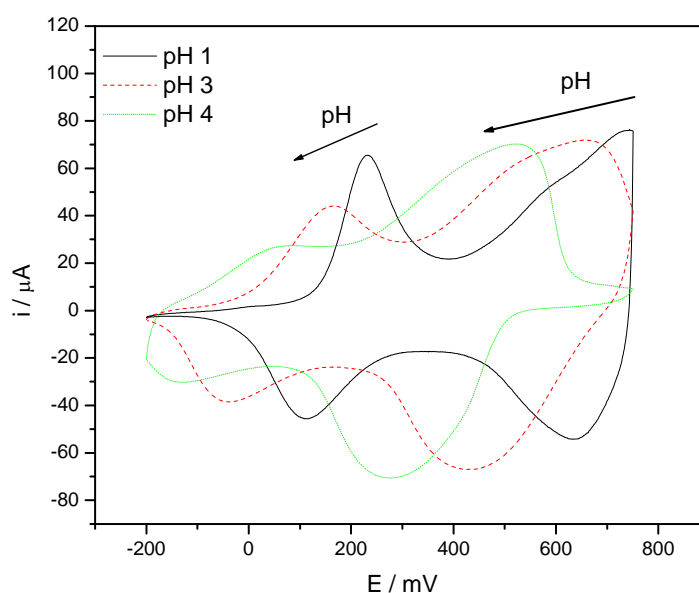


Figura 10

Voltametrías cíclicas de una película de SPAN a 50 mV/seg en diferentes soluciones buffer: pH 1 (—), pH 3 (.....) y pH 4 (- - -). Todas las soluciones contienen NaCl 2M.

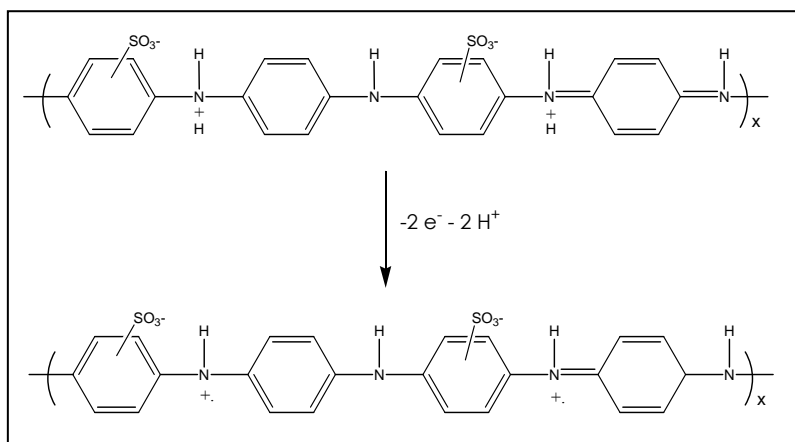
En los esquemas II y III se muestran los procesos electroquímicos asociados con el primer y el segundo proceso observado en la voltametría, respectivamente. La ecuación de Nernst para este sistema puede escribirse de la siguiente forma [37]:

$$E_p = E^0 + \frac{0,059}{n_e} \log \left(\frac{[P_{ox}]}{[P_{red}]} \right) + \frac{0,059}{n_e} \log ([A^-]^{n_A} [C^+]^{n_C}) - 0,059 \frac{n_H}{n_e} \log [H^+] \quad (2)$$

Com la fuerza iónica es alta, las concentración de A^- (aniones) y C^+ (cationes) son altas y constantes (en nuestro caso, 2 M). Si suponemos que en el potencial de pico la concentración superficial de las forma oxidada (P_{ox}) es igual a la de la forma reducida (P_{red}), la ecuación se reduce a:

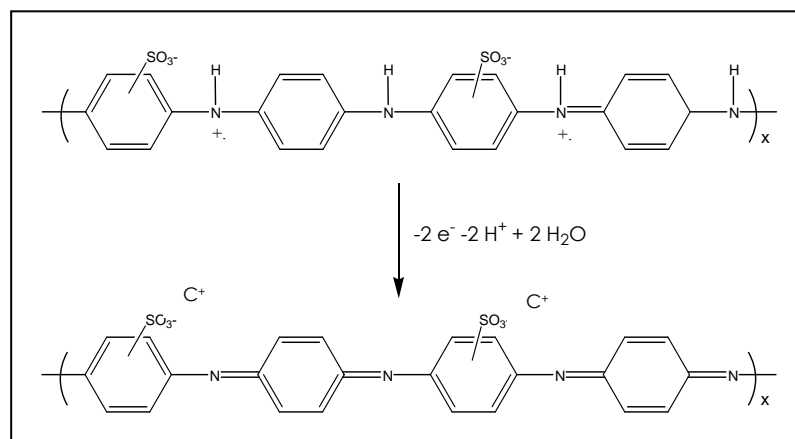
$$E_p = E_f - 0,059 \frac{n_H}{n_e} pH \quad (3)$$

donde E_f contiene todos los términos de potencial que no dependen del pH. Así, a partir de la pendiente E_p vs pH es posible calcular la relación nH^+/n_e^- .



Esquema II

Esquema que representa el primer proceso redox de SPAN



Esquema III

Esquema que representa el segundo proceso redox de SPAN.

En la figura 11 se muestran las pendientes de los gráficos de E_p vs. pH para ambos procesos redox. Para el primero de ellos de acuerdo con el esquema II, los protones asociados con el nitrógeno amínico son expulsados y la carga del catión radical generado queda compensada por los grupos sulfónicos. La velocidad de cambio de potencial con el pH para este primer proceso es 55,5 mV/pH, lo que implica que se pierden igual número de protones que de electrones, esto es, $nH^+/ne^- = 1$. En el segundo proceso redox, representado en el esquema III, el polímero se deprotona a la forma quinonimina expulsando dos H^+ y otros dos pueden quedar en la matriz del polímero para compensar la carga negativa de los grupos sulfónicos. Mientras en el estado reducido, los cationes retenidos deben ser protones, en la forma completamente oxidada la carga de los grupos sulfónicos puede ser compensada por cualquier catión. En las condiciones experimentales (soluciones de pH entre 0 y 5 y NaCl 2 M) se observa que la pendiente E_p vs. pH (figura 11) es -98 mV/pH mientras que para la polianilina sulfonada obtenida por Epstein y MacDiarmid [8] la pendiente es -118 mV/pH que corresponde a la pérdida de 4 protones por cada 2 electrones intercambiados. Como la pendiente obtenida para SPAN es menor a la informada por estos autores, los cationes Na^+ no pueden descartarse como iones compensadores de carga en nuestro caso.

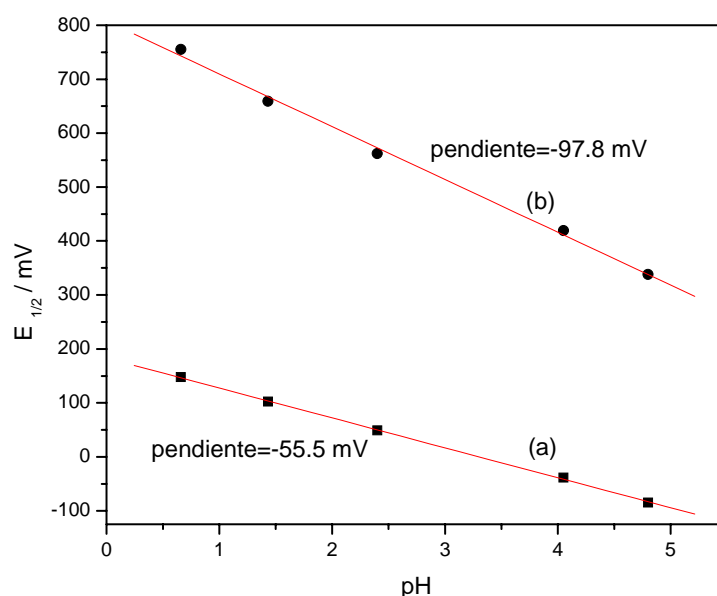
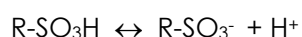


Figura 11

Variación de los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) de SPAN para los dos procesos redox (asociados a los esquemas II y III). (a) Primer proceso redox (■) asociado al cambio de leucoemeraldina a emeraldina. (b) Segundo proceso redox (●) asociado al cambio de emeraldina a pernigranilina.

3.4.4.- Electroactividad a pHs cercanos a la neutralidad.

Desde el punto de vista de las aplicaciones, la obtención de polianilina sulfonada tiene como objetivo disponer de un polímero con alta estabilidad y buena conductividad a pH cercano a la neutralidad. En la figura 12 se muestra la voltametría cíclica de SPAN obtenida en solución de pH 5. Claramente se observan dos picos anódicos con sus respectivos picos catódicos correspondientes a los procesos redox descritos. El buen comportamiento electroquímico observado se debe a la presencia de los grupos SO_3^- en la cadena de PANI. Estos grupos pueden ionizarse según:



Los protones producidos en este proceso son utilizados por la reacción de electrodo de SPAN y juegan un papel clave en el aumento de la actividad electroquímica de SPAN. Este aumento de actividad se puede deber al aumento de la fuerza dopante de los protones provenientes de los grupos sulfónicos sobre los átomos de nitrógeno imínicos en la cadena de SPAN; estos grupos imino son ahora más difíciles de dedopar [38].

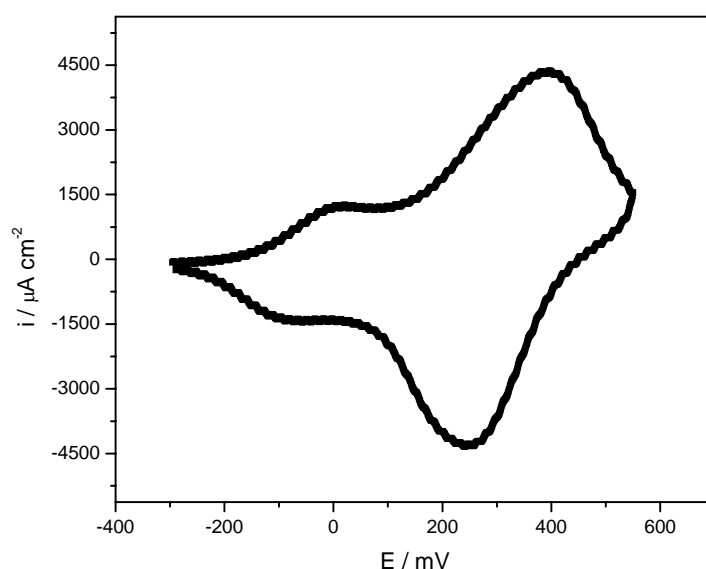


Figura 12

Voltametría cíclica de SPAN en solución buffer (ácido cítrico/ NaH_2PO_4) de pH 5. Barrido de potencial a 20 mV/s. Película obtenida por salto de potencial hasta una carga de 62 μC sobre microbandas de oro ($4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$).

Si bien la conductividad de SPAN es inferior a la de PANI, se trata aún de un buen polímero conductor. Las razones para esta disminución de la conductividad fueron expuestas por Epstein [11] y están relacionadas con una mayor localización de los electrones debido a una disminución de la difusión de los portadores de carga entre cadenas provocada por la separación entre las mismas debida a la presencia de los grupos sulfónicos. También estos grupos provocan una torsión de la cadena disminuyendo el solapamiento entre los orbitales a lo largo del sistema conjugado.

3.5.- Conclusiones.

Las películas delgadas de polianilina sintetizadas sobre electrodos de oro depositado sobre los cristales de cuarzo y en contacto con soluciones acuosas obedecen la ecuación gravimétrica de Sauerbrey durante la electropolimerización, al cambio redox del polímero resultante y a la adición nucleofílica de iones sulfito. Las evidencias electroquímicas y gravimétricas muestran que la reacción de sulfonación está controlada por el estado de oxidación del polímero. Esto es lo que se espera para un mecanismo de reacción en el cual solamente las unidades quinoniminas en PANI son reactivas a la adición nucleofílica de iones sulfito. Además, se ha demostrado que el grado de incorporación de grupos sulfonato en la película está controlado por la inyección de la carga y puede ser mayor al 50%. La velocidad de sulfonación es siempre constante a bajos niveles de conversión (< 50%) y cae a cero para altas conversiones.

La evidencia experimental muestra que el mecanismo de intercambio iónico durante el proceso de óxido-reducción del polímero sulfonado es similar al que ocurre en el polímero producido por sulfonación electrofílica de polianilina o por copolimerización de anilina con ácido aminosulfónico y contrario al intercambio iónico observado para PANI sin modificar. El resultado práctico de este estudio es la posibilidad de poder fabricar de manera controlada una película de polianilina que sea electroactiva y mantenga buena conductividad en soluciones de pH cercano a la neutralidad. En este sentido es necesario controlar los niveles de sulfonación para que la película modificada además de ser electroactiva sea estable y pueda ser utilizada en el desarrollo de transistores.

5.6.- Referencias.

- [1] Y. Kang, M-H. Lee, S.B. Rhee, *Synth. Met.*, **1992**, 52, 319.
- [2] G.E. Asturias, G.W. Jang, A.G. MacDiarmid, K. Doblhofer, C. Zhong, *Bunsen_Ges. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 1381.

- [3] T. Sawai, H. Shinahara, Y. Ikariyama, M. Aizawa, *J. Electroanal. Chem*, **1990**, 283, 221.
- [4] P. N. Bartlett, J.H. Wang, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1996**, 92(20), 4137.
- [5] J. Yue, A.J. Epstein, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1992**, 1540.
- [6] J. Yue, A.J. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 2800.
- [7] J. Yue, A.J. Epstein, A.G. MacDiarmid, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1990**, 189,255.
- [8] J. Yue, Z.H. Wang, K.R. Cromack, A.J. Epstein, A.G. MacDiarmid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 2655.
- [9] J. Yue, A.J. Epstein, *Macromolecules*, **1991**, 24, 4441.
- [10] M. Morita, S. Miyazaki, H. Tanoue, M. Ishikawa, Y. Matsuda, *J. Electrochem. Soc.*, **1994**, 141, 1409.
- [11] J. Yue, A.J. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 2665.
- [12] J. Yue, A.J. Epstein, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 21, 1540.
- [13] (a) T. Namiki, E. Yano, K. Watabe, Y. Igarashi, Y. Kuramitsu, T. Maruyama, K. Yano, T. Nakamura, S. Shimizu, T. Saito, Patent, JP 07179754 A2 950718, Heisei. (b) K. Watabe, Y. Yoneda, T. Maruyama, K. Yano, T. Nakamura, S. Shimizu, T. Saito, Patent, JP 06003813.
- [14] (a) C. Barbero, M.C. Miras, B. Schnyder, O. Haas, R. Kötzt, *J. Mat. Chem.*, **1994**, 4, 1775-83. (b) C. Barbero, M.C. Miras, R. Kötzt, O. Haas, *Lithium Batteries in Proc. Electrochem. Soc.*, **1994**, 94-4, 281.
- [15] J. Yue, G. Gordon, A.J. Epstein, *Polymer*, **1992**, 33, 4410.
- [16] a) X. Wei, A. Epstein, *J. Synth. Met.*, **1995**, 74, 123. (b) X. Wei, Y.Z. Wang, S. M. Long, C. Bobeczko, A. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2545.
- [17] (a) J. Y. Lee, C.Q. Cui, X.H. Su, M.S. Zhou, *J. Electroanal. Chem.*, **1993**, 360, 177. (b) J.Y. Lee, X.H. Su, C.Q. Cui, *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, 367,71. (c) J.Y. Lee, C.Q. Cui, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 403, 109, (d) A.A. Karyakin, I.A. Maltsev, L.V. Lukachova, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 402, 217.
- [18] a) C. Barbero, R. Kötzt, *Adv. Mater.*, **1994**, 6, 577. (b) P.A. Kilmartin, G.A. Wright, *Synth. Met.*, **1997**, 88, 153.
- [19] C.C. Han, S.P. Hong, K.F. Yang, M.Y. Bai, C.H. Lu, C.S. Huang, *Macromolecules*, **2001**, 34, 587.
- [20] C.C. Han, R.C. Jeng, *Chem. Commun.*, **1997**, 553.
- [21] H. Salavagione, G.M. Morales, M.C. Miras, C. Barbero, *Acta Polym.*, **1999**, 50,40.
- [22] C.C. Han, W.D. Hseih, J.Y. Yeh, S.P. Hong, *Chem. Mater.*, **1999**, 11(2),480.
- [23] P.A. Topart, M.A. Noel, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 2926.
- [24] E.J. Calvo, C. Danilowicz, R. Etchenique, *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, **1995**, 91, 4083.
- [25] C. Barbero, M.C. Miras, O. Haas, R. Kötzt, *J. Electrochem. Soc.*, **1997**, 144, 4170.

- [26] (a) D. Orata, D. Buttry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 3574. (b) H. Daifuku, T. Kawagoe, N. Yamamoto, T. Ohsaka, N. Oyama, *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, *274*, 313. (c) M.C. Miras, C. Barbero, R. Kötz, O. Haas, *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, *369*, 203.
- [27] D.A. Buttry, *Electrochemical Interfaces*, (Ed. H.D. Abruña), Weinheim, VCH Publishers, **1991**.
- [28] G. Zotti, S. Cattarin, N. Comisso, *J. Electroanal. Chem.*, **1988**, *239*, 387.
- [29] R.M.Q. Mello, R.M. Torresi, S.I. Cordoba de Torresi, E.A. Ticianelli, *Langmuir*, **2000**, *16*, 7835.
- [30] (a) C. Barbero, M.C. Miras, B. Schnyder, O. Haas, R. Koetz, *J. Mat. Chem.*, **1994**, *4*, 1775. (b) C. Barbero, M.C. Miras, R. Kotz, O. Haas, *Lithium Batteries. in Proc. Electrochem. Soc.*, **1994**, *94-4*, 281.
- [31] (a) C. Barbero, M.C. Miras, O. Haas, R. Kötz, *J. Electrochem. Soc.*, **1991**, *138*, 669. (b) R.M. Torresi, S.I. Córdoba de Torresi, C. Gabrielli, M. Keddah, H. Takenouti, *Synth. Met.*, **1993**, *61*, 291. (c) M. Kalaji, L. Nyholm, L.M. Peter, *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, *313*, 271. (d) G. Horányi, G. Inzelt, *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, *264*, 259. (e) K. Koziel, M. Lapkowski, E. Vieil, *Synth. Metals*, **1997**, *84*, 91.
- [32] (a) C. Barbero, M.C. Miras, O. Haas, R. Kötz, *Synth. Met.*, **1993**, *55*, 1539, (b) C. Barbero, R. Kötz, *Adv. Mater.*, **1994**, *6*, 577.
- [33] C. Barbero, M.C. Miras, R. Kötz, *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, *191*, 437.
- [34] C. Barbero, M.C. Miras, R. Kötz, *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, *369*, 203.
- [35] G.M. Morales, *Tesis de Doctorado*, UNRC, Rio Cuarto (Argentina), **2002**.
- [36] W.S. Huang, B.D. Humphrey, A.G. MacDiarmid, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **1986**, *82*, 2385.
- [37] H.J. Salavagione, D.F. Acevedo, M.C. Miras, C. Barbero, *Portugaliae Electroch. Acta*, **2001**, *21*, 245.
- [38] X.L. Wei, Y.Z. Wang, S.M. Long, C. Bobeczko and A.J. Epstein. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2545.

4.1.- Introducción.

La capa de reconocimiento molecular que forma parte del transistor integrado, como ya ha sido mencionado, está compuesta por autoensamblado electroestático capa por capa de un polielectrolito redox y la enzima glucosa oxidasa. La técnica que explica como preparar películas multicapas delgadas fue desarrollada por Decher et. al. [1]. En particular, uno de los componentes de la capa de reconocimiento molecular es un polielectrolito redox (PAH-Os). En este tipo de multicapas autoensambladas uno o más de los componentes poseen funcionalidades redox cuya carga puede ser cambiada por medio de reacciones electroquímicas en la interfase de la multicapa en contacto con el electrodo. De este cambio resulta el transporte de carga dentro de la película por intercambio electrónico entre los sitios redox adyacentes [2,3]. En los sistemas autoensamblados capa por capa, la masa, el espesor y la carga incrementa en cada paso de adsorción durante la construcción por adsorción electrostática.

La estructura y la dinámica de multicapas autoensambladas de polielectrolitos redox activos y enzimas ha sido estudiada por microbalanza de cristal de cuarzo [4], elipsometría [5,6], espectroscopía FTIR [7], y espectroscopía Raman resonante [8]. De estos estudios surge que una característica general de las multicapas es el intercambio de iones y especies neutras con el electrolito durante la oxidación y la reducción de la película de polímero para mantener la electroneutralidad dentro de ella. Hillman et. al. [9] reportaron la influencia del fenómeno de hinchamiento en la transferencia de especies móviles durante la modulación redox del potencial de éste tipo de películas depositadas sobre electrodos. Se ha observado que durante dicha modulación, aniones o cationes presentes en la solución electrolítica, ingresan o abandonan la película. La fracción de carga redox compensada por cada ión no puede ser determinada solamente por experimentos electroquímicos [10,11] dado que sólo miden la diferencia de cargas intercambiadas.

Previamente en el laboratorio se llevaron a cabo estudios de permselectividad Donnan en multicapas autoensambladas de polialilamina modificada con un complejo de osmio, PAH-Os, y poliestirensulfonato (PSS). Se determinó que la naturaleza de la última capa de polielectrolito, el pH y la fuerza iónica determinan el potencial redox aparente de la cupla Os(II)/Os(III) [12].

Mediante la técnica de deflectometría por gradiente de concentración (PBD) es posible determinar la proporción de aniones y cationes intercambiados durante la oxidación y reducción de la película [13]. En este tipo de películas redox, el hecho de poder alterar la carga de los polielectrolitos que la forman mediante oxidación o reducción de los centros redox se refleja en cambios de la población de iones y sales dentro de la película, esto se denomina compensación extrínseca de carga [14,15].

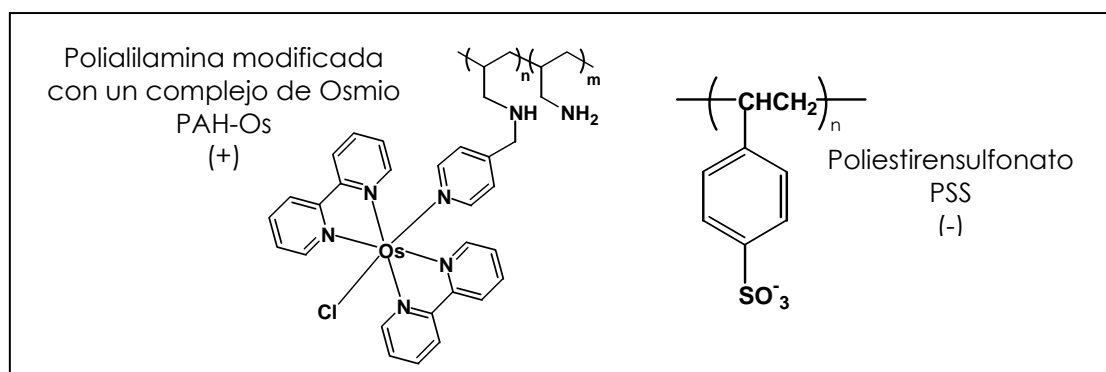
4.- Dinámica de la película de reconocimiento

Por otro lado la compensación intrínseca se da mediante las interacciones poli-ión/poli-ión con un exceso de carga localizada en la interfase electrolito/última capa de la película compensada por las especies iónicas móviles en solución [11].

A continuación se describe la dinámica de la oxidación-reducción de multicapas autoensambladas electrostáticamente de PAH-Os/PSS utilizando técnicas complementarias como: voltametría cíclica, cronoamperometría, microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo, elipsometría, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y deflectometría por gradiente de concentración. Se decidió estudiar la dinámica de este sistema modelo y luego extenderlo a enzimas.

Las películas autoensambladas fueron preparadas como se describió en la sección experimental. Se realizaron experimentos de voltametría cíclica y elipsometría para caracterizar la fabricación y luego se realizaron experimentos de oxidación y reducción, acoplados simultáneamente a las distintas técnicas, en diferentes soluciones de electrolitos.

En el esquema I se muestran las estructuras químicas de los componentes de las películas autoensambladas que se describirán en este capítulo.



Esquema I

Representación de la estructura química de los componentes de las películas autoensambladas electrostáticamente capa por capa, estudiadas en este capítulo. En la figura se indica la carga neta de los componentes.

4.2.- Caracterización de las películas autoensambladas.

Las películas autoensambladas fueron preparadas como se describió en el capítulo 2 (sección 2.5.6.1.). Durante la formación se determinó el espesor de las capas mediante elipsometría y luego fueron caracterizadas por voltametría cíclica.

4.2.1.- Elipsometría durante la formación del autoensamblado PAH-Os/ PSS.

Mediante la medición del espesor elipsométrico durante la fabricación de la película es posible obtener información del porcentaje en que contribuye cada capa al espesor total. Se determinaron los parámetros elipsométricos entre pasos alternados de adsorción después de sumergir el electrodo en PAH-Os y en PSS. En la figura 1 se muestra como crece el espesor de una película de PAH-Os/ PSS a medida que aumenta el número de capas.

De dicha figura puede verse que tanto la adsorción de PAH-Os como la de PSS contribuyen al incremento del espesor capa a capa y que dicho aumento es lineal. De la pendiente de la recta obtenemos que la contribución de cada capa es de 3 nm al espesor total. El espesor de una película formada por (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₅ alcanza un valor de de 80 nm.

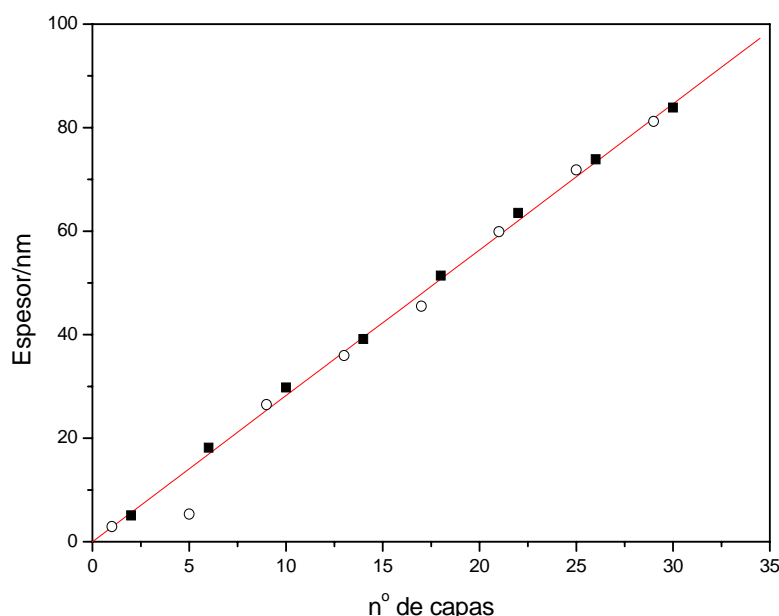


Figura 1

Espesor elipsométrico en función del número de capas durante la construcción de una película autoensamblada de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₅. La medición se realizó bajo agua después de pasos alternados de adsorción tanto para PSS (■) como para PAH-Os(○).

4.2.2.- Voltametría cíclica de las películas (PAH-Os)/ (PSS).

Esta técnica permite cuantificar la carga depositada sobre el electrodo una vez formadas las películas. En la figura 2 se muestra una voltametría cíclica típica de una película de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ en CsCl 0,01 M. La altura de corriente anódica y catódica es proporcional a la velocidad de barrido (no mostrado) indicando que la

transferencia de electrones para este tipo de películas autoensambladas es rápida. La separación de potenciales de pico depende de las condiciones de formación de la película, la velocidad de barrido y la fuerza iónica y el pH del electrolito. Su estudio detallado excede el presente trabajo de tesis. El ancho del pico a media altura (FWHH), mayor que el esperado para un sistema Nernstiano ideal, 90 mV, indica interacciones repulsivas.

Otras observaciones de interés son: a) la carga redox adsorbida aumenta al agregar capas de PAH-Os con una leve disminución de la misma luego de sumergir el electrodo en la solución de PSS. Esto se debe a que, o bien algunos centros redox dejan de ser accesibles electroquímicamente, o existe cierta desorción por complejación al sumergir el electrodo en solución acuosa del polielectrolito de carga opuesta. El mismo tipo de comportamiento se obtiene al autoensamblar PAH-Os con enzimas [12]; b) existe un pronunciado desplazamiento del potencial redox aparente, $E_{1/2 \text{ app}}$ (definido como el promedio del $E_{p, \text{ anod.}}$ y $E_{p, \text{ catod.}}$), dependiendo de la capa terminal, relacionado con el exceso de carga superficial en las capas externas.

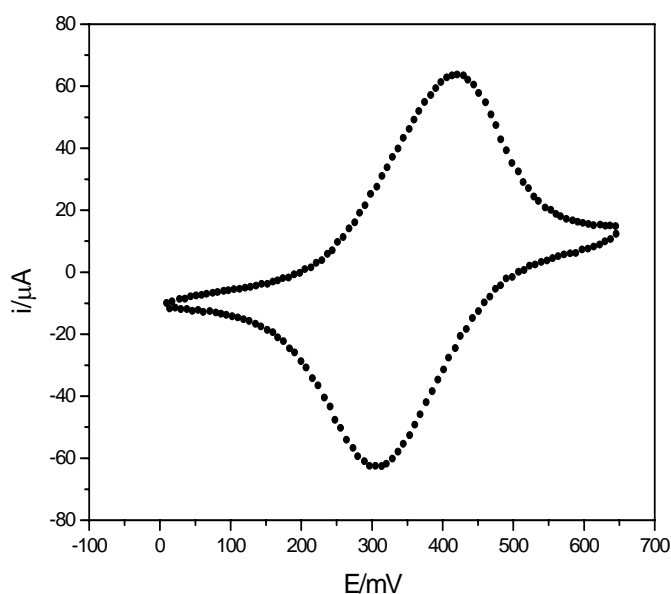


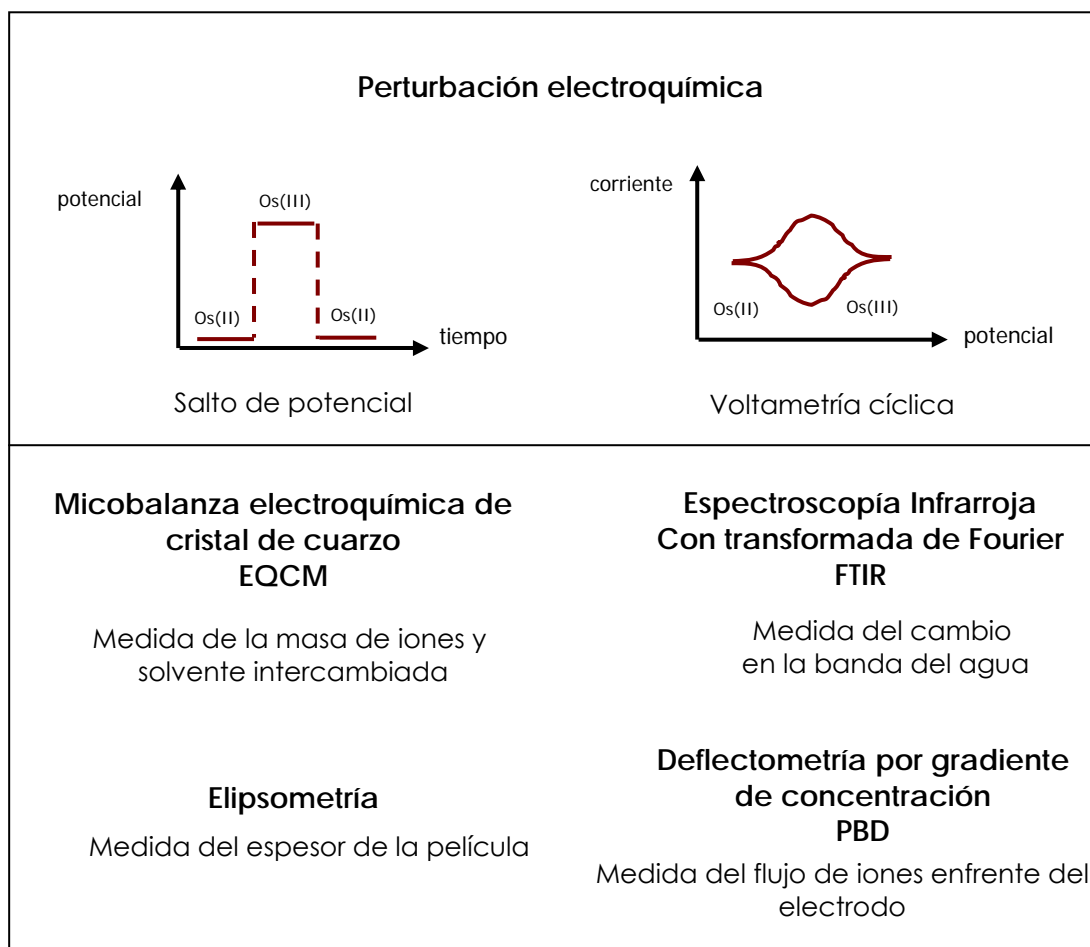
Figura 2

Voltametría cíclica de un electrodo de oro modificado con (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ en HCl 0,1 M a 50 mV/seg.

4.3.- Estudio de la dinámica de oxidación-reducción de las películas autoensambladas.

El estudio de la dinámica de oxidación-reducción de películas de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₅ o (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ en diferentes electrolitos (HCl, LiCl, NaCl, CsCl, N(Et)₄ClO₄)

y NaClO_4 0,01 M) se llevó a cabo utilizando diversas técnicas para obtener información del intercambio iónico, el cambio de masa, el cambio de espesor, el intercambio de solvente, durante la aplicación de un salto de potencial de 0 a 600 mV durante un minuto (conversión de Os(II) a Os(III)) o de un barrido lineal de potencial entre los mismos límites. El esquema II muestra gráficamente los procedimientos y la información esperada.



Esquema II

Representación gráfica de las perturbaciones electroquímicas realizadas y de las técnicas acopladas simultáneamente al experimento electroquímico. Se detalla también la información que se obtiene de cada técnica.

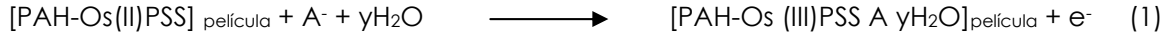
4.3.1.- Intercambio iónico: resultados de PBD.

Como se mencionó en el capítulo 2, la técnica de deflectometría por gradiente de concentración permite identificar y cuantificar la dirección del flujo

4.- Dinámica de la película de reconocimiento

iónico producido en una superficie durante un fenómeno transitorio, o sea detectar la entrada o salida de iones de la película autoensamblada desde o hacia la solución de electrolito durante el proceso redox.

El intercambio iónico que implica ingreso de iones (señal positiva de PBD) durante la oxidación electroquímica de películas de PAH-Os/PSS puede ser descripta por:



o



donde A^- y C^+ corresponden aniones y cationes, respectivamente. En este trabajo se decidió utilizar electrolitos binarios tales como: HCl, HCl, LiCl, NaCl, CsCl, para simplificar la interpretación de los resultados.

La reacción de óxido-reducción de multicapas de polielectrolitos redox es una reacción discontinua y la carga redox está limitada por el número de sitios disponibles sobre la superficie del electrodo. En el capítulo 2, se presentó una ecuación general (ecuación 11) para una señal de deflexión experimental durante un pulso de potencial con respuesta discontinua. Considerando que en el proceso pueden ocurrir simultáneamente la entrada y la salida de iones, la ecuación puede modificarse teniendo en cuenta ambos procesos de la siguiente forma:

$$\theta(x,t) = \left(\frac{\ell}{n} \frac{\partial n}{\partial C} \right) \left[\frac{C_{C+}}{\sqrt{\pi(D_o t)}} \frac{x}{2D_o t} \exp\left(\frac{-x^2}{4D_o t} \right) + \frac{C_{A-}}{\sqrt{\pi D_o(t+\Delta)}} \frac{x}{2D_o(t+\Delta t)} \exp\left(\frac{-x^2}{4D_o(t+\Delta t)} \right) \right] \quad (3)$$

donde dn/dC y D_o corresponden al electrolito binario presente en la solución (HCl, CsCl, etc.) y el ΔT es el desfase temporal de ambos procesos (ver más adelante). El coeficiente de difusión binario está dado por la ecuación:

$$D_{A-C+} = \frac{2D_{A-}D_{C+}}{D_{A-} + D_{C+}} \quad (4)$$

La naturaleza de carga del polielectrolito en la última capa adsorbida determina el exceso de carga en la película. Se estudiaron películas de: $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$ y $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$. Las primeras terminan en PSS, o sea la carga de la última capa es negativa (-), mientras que el segundo tipo de películas terminadas en PAH-Os poseen una carga neta positiva (+) en la última capa. Se estudiaron cronopotenciometrías en solución HCl 0,01 M para ambos tipos de películas.

Cuando una película autoensamblada recién preparada se coloca en solución de electrolito y se realizan ciclos sucesivos de oxidación-reducción se observa el fenómeno de *"break-in"*. Durante este proceso los policationes (PAH-Os) y los polianiones (PSS) intrínsecamente compensados experimentan un incremento de la carga positiva a medida que Os(II) se oxida a Os(III) por lo cual aniones y agua se introducen en la película. Los aniones unidos al policatione rompen los pares iónicos formados en la película. Por otro lado, durante la reducción, los aniones salen de la película o entran cationes desde la solución para compensar la carga negativa. En este último caso, los dos iones móviles del electrolito forman un nuevo par iónico separando las cadenas de policatione y polianión con el ingreso simultáneo de solvente, con lo cual la película se hincha. El fenómeno es similar al proceso de *"break-in"* descrito en películas de polímeros redox, como polivinilferroceno, depositados por evaporación del solvente al ser sumergidas en el electrolito acuoso. Generalmente se necesitan varios ciclos para equilibrar estas películas con la solución y durante los primeros ciclos se observa un incremento en la masa por la entrada de solvente e iones a la película [16], con un hinchamiento de la misma. El efecto de *"break-in"* en películas hidrofóbicas es más complejo y probablemente involucre defectos de la película para comenzar la oxidación.

En la figura 3 se muestra la respuesta PBD y de corriente para una película $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$ recién preparada y expuesta a ciclos de oxidación-reducción en CsCl 0,01 M. Se observa que tanto la corriente como la señal de PBD cambian con el tiempo. El primer ciclo de oxidación involucra una mayor corriente y señal de deflexión y éstas disminuyen progresivamente en los siguientes ciclos a medida que el electrodo evoluciona al estado estacionario. Puede notarse que el comienzo del transitorio de corriente corresponde a la señal de PBD, un pre-pico angosto seguido de un pico más ancho y que el máximo del pico está corrido en tiempo. Se observa que durante la oxidación a tiempos cortos hay salida de iones hacia la solución (deflexión negativa) seguida por una incorporación de iones desde la solución hacia la película (deflexión positiva). Para la reducción ocurre el proceso inverso.

A partir de la estequiometría (ecuaciones 1 y 2) puede decirse que ocurre primero la salida de cationes y luego la entrada de aniones para compensar el exceso

de carga de los sitios Os(II) oxidados en la película junto con el ingreso de solvente. Esto contribuye en un aumento de masa como se verá más adelante con EQCM.

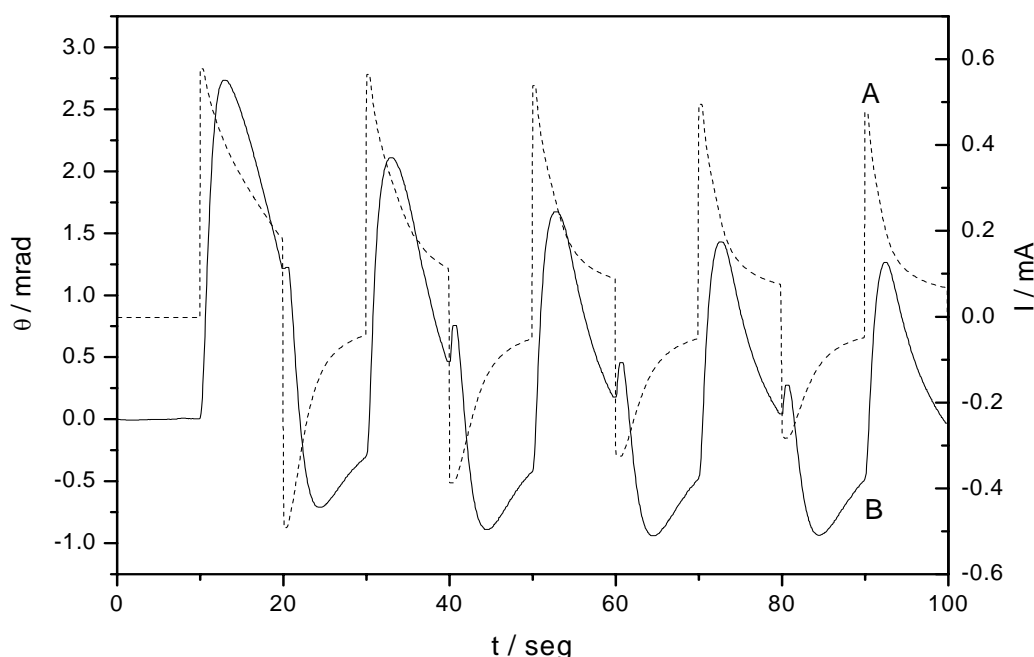


Figura 3

Transitorios de PBD (—) y de corriente (-----) durante la oxidación-reducción de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$ en CsCl 0,01 M. Saltos de potencial (mostrados en la figura) desde 150 a 600 mV vs Ag/AgCl/Cl^- (3 M).

A medida que los pares iónicos de policationes y polianiones se van rompiendo, las señales de corriente y PBD disminuyen porque hay menos sitios que pueden ser compensados por intercambio iónico con el electrolito, con lo cual el flujo iónico decrece: la película se convierte en un intercambiador anfotérico renuente [11].

En la figura 4 se muestran dos experimentos sucesivos de salto de potencial para la misma película de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$ en HCl 0,01 M a una distancia del haz de láser de $75 \pm 10 \mu\text{m}$ con respecto a la superficie del electrodo. Tanto los transitorios de corriente como de PBD evolucionan a lo largo de siete ciclos seguidos y al final de los cuales el electrodo se mantuvo en el estado reducido por un algún tiempo. Al comenzar nuevamente con otra serie de 7 ciclos de oxidación y reducción, se observa nuevamente el efecto de “break-in”. Esto comúnmente es llamado memoria de la película y significa que la película vuelve a su estado inicial no cargado y deshidratado [17]. Puede notarse menos carga en los pulsos sucesivos de oxidación-reducción lo cual indica la transformación redox en el electrodo recién preparado en

comparación con un electrodo que ya ha sido expuesto a ciclos continuos de oxidación y reducción.

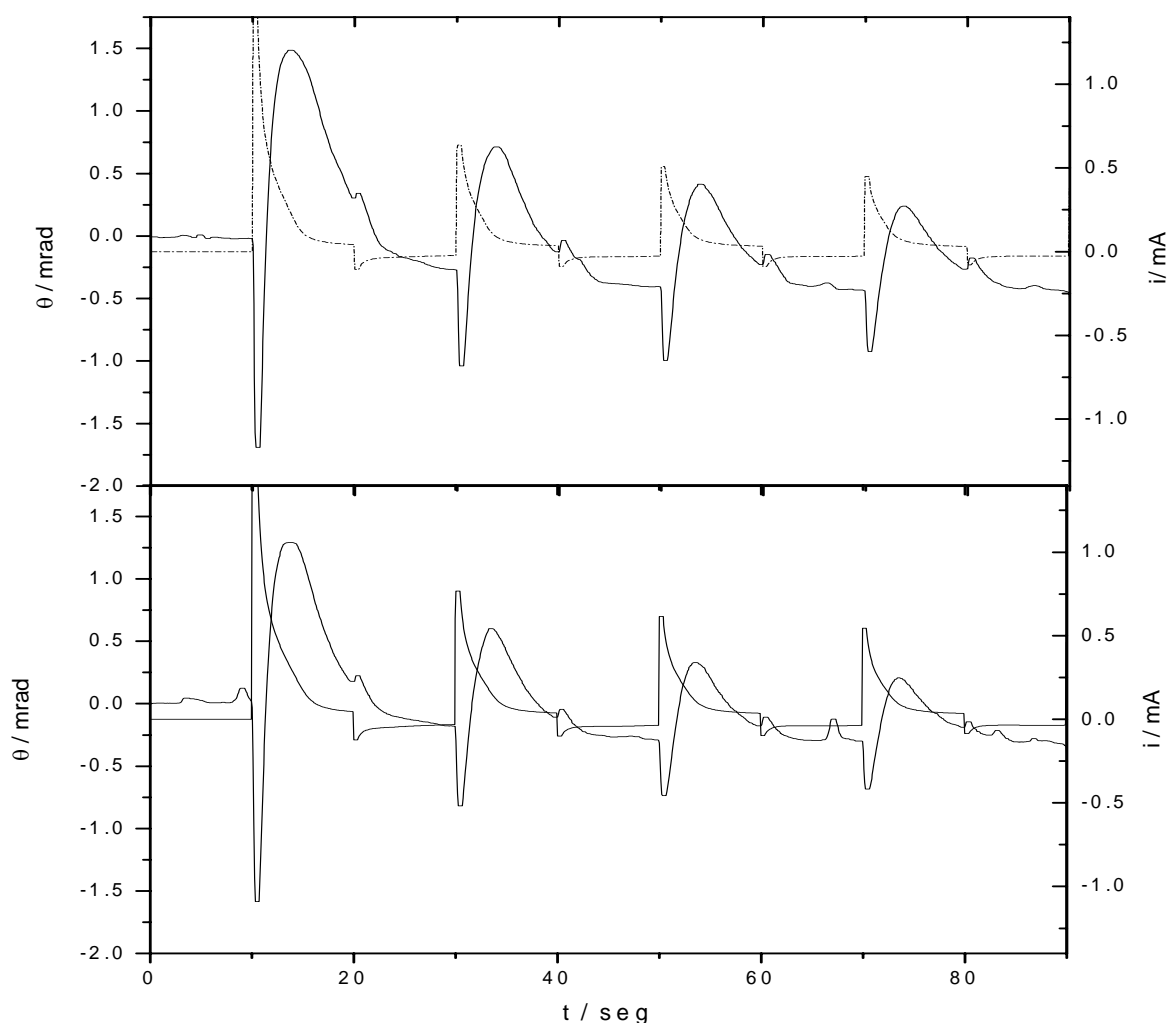


Figura 4

Efecto memoria. Transitorios de PBD durante la oxidación-reducción de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$ en $\text{HCl } 0,01 \text{ M}$. Saltos de potencial desde 150 a 600 mV vs Ag/AgCl/Cl^- (3 M). Entre la figura a) y b) se redujo la película a 150 mV por 30 min. en la misma solución de electrolito.

Más evidencias de este efecto surgen de los experimentos de gravimetría (EQCM) y elipsometría que describiremos más adelante.

La figura 5 muestra transitorios de PBD simulados con la ecuación 3 para diferentes condiciones: a) cuando solamente una clase de iones se intercambian (relación anión/catión = 0) donde el perfil de cronodeflectometría muestra sólo un pico, b) cuando dos clases de iones se intercambian (relación anión/catión = 0,5) ocurriendo ambos procesos simultáneamente ($\Delta t = 0$) con lo cual se observa un sólo

pico que resulta del balance de ambos términos en la ecuación 4 y c) cuando dos clases de iones se intercambian (relación anión/catión = 1,5) y con un retraso entre ellos ($\Delta t \neq 0$) apareciendo un pre-pico y luego un segundo pico. El signo de estos picos refleja los gradientes de índice de refracción en la solución adyacente debido al ingreso o egreso de especies iónicas en la interfase película/electrolito.

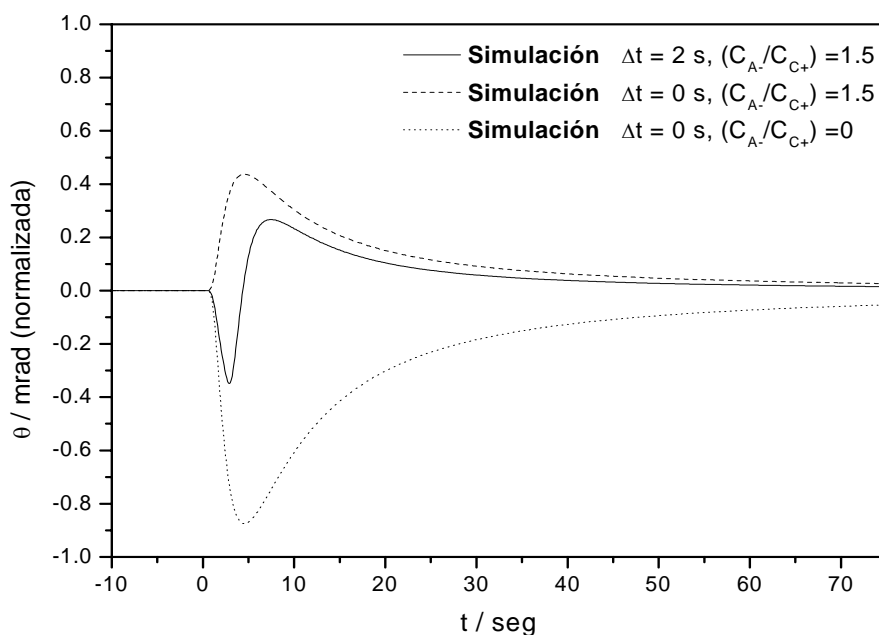


Figura 5

Simulación de cronodeflectometrías utilizando la ecuación para igual concentraciones de aniones y cationes, para mayor relación de aniones que cationes sin retraso de aparición en los picos y para la misma relación de flujos aniónicos y catiónico pero con un retraso de picos de 2 segundos.

En la figura 6 se muestran los transitorios experimentales durante la oxidación y la reducción de películas terminadas en distinta carga: $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$ y $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ en HCl 0,01 M (círculos). Durante los transitorios hay deflexión positiva como negativa a diferentes tiempos y las intensidades dependen de la naturaleza de la última capa. Las líneas llenas corresponden al mejor ajuste de la ecuación 1, y en las líneas punteadas es la contribución individual de cada término (aniones y cationes). Es importante destacar que estos transitorios corresponden a un “estado estacionario” luego de haber realizado una serie de ciclos previos.

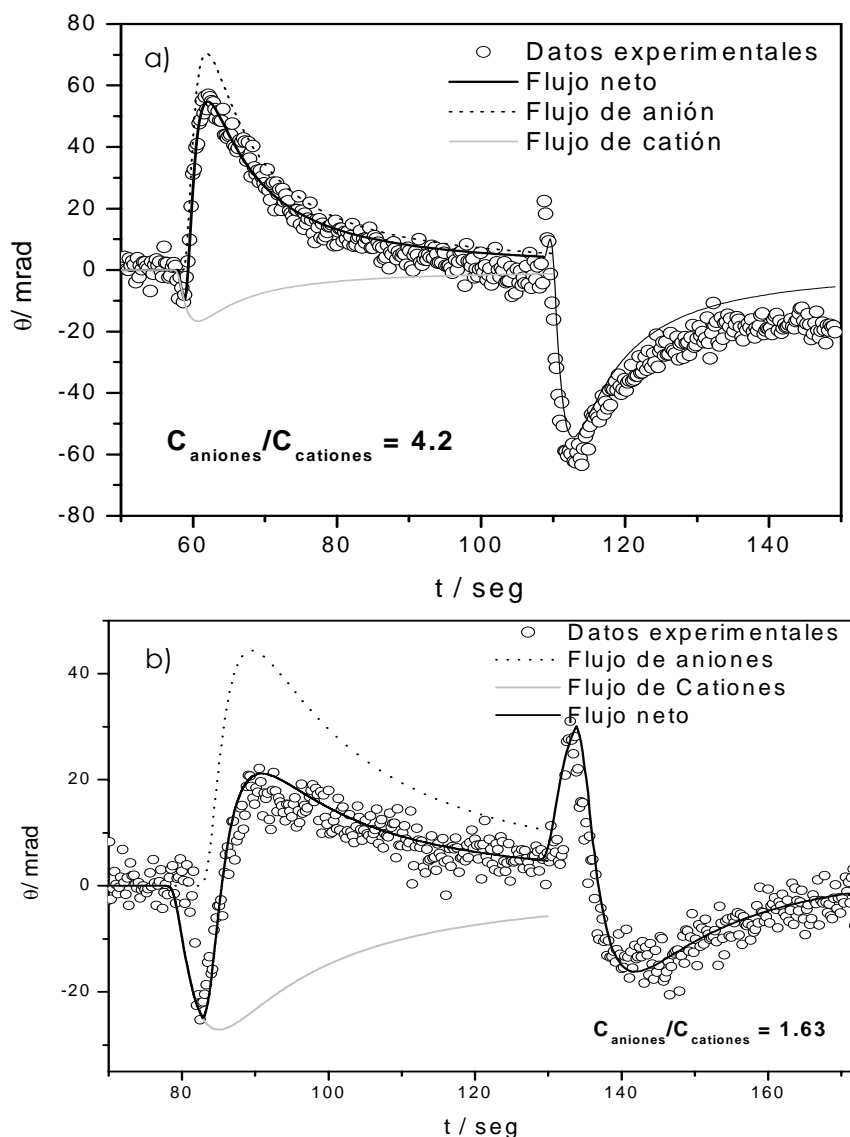


Figura 6

Transitorios de PBD durante la oxidación y reducción de PAH-Os en HCl 0,01 M. (O) Datos experimentales, (—) mejor ajuste de la ecuación 1 para el flujo iónico total y (.....) mejor ajuste de la ecuación 1 para flujos de aniones y cationes individuales. a) $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ y b) $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$. Saltos de potencial desde 150 a 600 mV vs Ag/AgCl/Cl⁻ (3 M).

Los perfiles individuales (línea punteada) de PBD fueron ajustados usando el correspondiente x (distancia), el mismo coeficiente de difusión D_0 y el tiempo de demora entre los pulsos iónicos.

Para películas cargadas positivamente (terminadas en PAH-Os) en la figura 6a durante la oxidación de Os(II), la contribución principal es la entrada de aniones con una pequeña salida de cationes. La relación de anión/catión ($C_{\text{anión}}/C_{\text{catión}}$) es de 4,2. Se observa en la figura 6b que para películas cargadas negativamente

(terminadas en PSS) el transitorio es marcadamente diferente. En este caso, si bien la entrada de aniones sigue siendo la principal contribución al intercambio iónico a tiempos cortos, la salida de cationes cobra una significativa importancia, y ahora $C_{\text{Sanión}}/C_{\text{Scatión}}$ es de 1,4. Durante la reducción del Os(III) presente en la película, se observa exactamente la tendencia opuesta, con ingreso de protones y salida de aniones con relaciones diferentes dependiendo de la carga de la última capa. Es importante notar que los pasos de oxidación- reducción de la figura 6 fueron ajustados según la ecuación 3 utilizando los mismos parámetros (D_0 , Δt). Estos resultados sugieren que el intercambio de iones es reversible.

El intercambio iónico mixto puede ser explicado por dos tipos de mecanismos: uno de ellos supone que los iones dentro de la película poseen movilidades similares que en solución, por lo tanto, dentro de la película, la movilidad del protón es mayor que la de cloruro, entonces éste es el primer tipo de proceso que aparece, seguido de un gran intercambio de aniones. Sin embargo este tipo de mecanismo no explica las diferencias debidas a la naturaleza eléctrica de la última capa. El segundo mecanismo supone que existe una acumulación de iones móviles en la interfase película/solución, con carga opuesta a la de la última capa. Así, películas que poseen un exceso de carga positiva en la última capa (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ moverán aniones hacia la película no sólo por compensar la carga dentro de la película sino también en la interfase película/solución. Para películas terminadas en carga negativa (PAH-Os)₁₄(PSS)₁₅ habrá entonces un exceso de cationes en la interfase y se moverán aniones como respuesta a la oxidación, pero también se expulsarán más cationes de las capas más externas.

La cantidad relativa de polímero aniónico y catiónico podría afectar el mecanismo de intercambio iónico; sin embargo, estos resultados muestran que un cambio de una capa en 15 (6%) induce un cambio de 4,2 a 1,4 en la relación de catión a anión intercambiado. Por lo tanto es la carga de la última capa y no la cantidad relativa de carga la que afecta el mecanismo de intercambio iónico.

La línea llena en las figuras 6 a y b corresponde al mejor ajuste de la suma de los dos flujos iónicos (anión y protón) corridos en el tiempo. Las movilidades de protón y de cloruro fuera de la película están ligadas entre sí por la migración de un electrolito binario [14]. La coincidencia del ajuste con los datos experimentales sugiere que el modelo describe correctamente el intercambio en estas películas.

También es interesante analizar si el transitorio del PDB observado en un pulso corto se debe a una relajación del flujo de iones dentro de la multicapa de polielectrolito redox o en el electrolito. El cambio redox en la película está controlado por difusión debido a "*electron-hopping*" entre centros redox adyacentes en la película. El coeficiente de difusión por mecanismo de "*electron-hopping*" para estas películas es $10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [18, 19] y por lo tanto para una película de 100 nm el tiempo de difusión característico es de 0,5 segundos. La difusión en el electrolito adyacente al electrodo en la distancia haz-electrodo es mucho mayor, en el orden de $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Para alcanzar el haz a 300 μm el tiempo sería de 45 seg. Por lo tanto, la película se oxida completamente antes de que el perfil de difusión alcance el haz. Se cumple así la hipótesis de un proceso discontinuo y el haz del láser registra lo que ya ocurrió en la película.

Es importante mencionar que se ha observado que la intensidad del intercambio iónico depende de la distancia del haz láser al electrodo. Generalmente esta distancia se determina experimentalmente mediante cronodeflectometría a diferentes distancias, utilizando la ecuación 12 del capítulo 2. Sin embargo aquí la distancia se determinó del ajuste de la señal experimental ya que el método convencional no tiene en cuenta la difusión de dos especies. En ambas figuras (6a y 6b) las distancias al electrodo determinadas mediante el ajuste son similares.

Experimentos realizados con diferentes electrolitos muestran el mismo tipo de comportamiento respecto a las diferencias observadas de acuerdo a la carga de la última capa. Se estudió también el efecto del catión sobre la señal observada. En la figura 7 se muestran transitorios de oxidación y reducción para películas de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₅ en tres electrolitos diferentes LiCl, NaCl y CsCl 0,01 M.

Analizando las figuras, nuevamente, el primer transitorio de PBD difiere del resto de los transitorios en todas las soluciones de electrolitos (efecto "*break-in*"). También, aquí predomina la incorporación de aniones dentro de la película durante la oxidación mientras que a tiempos cortos se observa la salida de cationes, no observándose diferencias significativas entre sí. En el caso de HCl las movilidades de cloruro y protón son diferentes y por ello las diferencias en los transitorios de PBD son más significativas, en particular, cuando la película termina en carga negativa (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₅ en la que hay un exceso de protones en la interfase película/ solución.

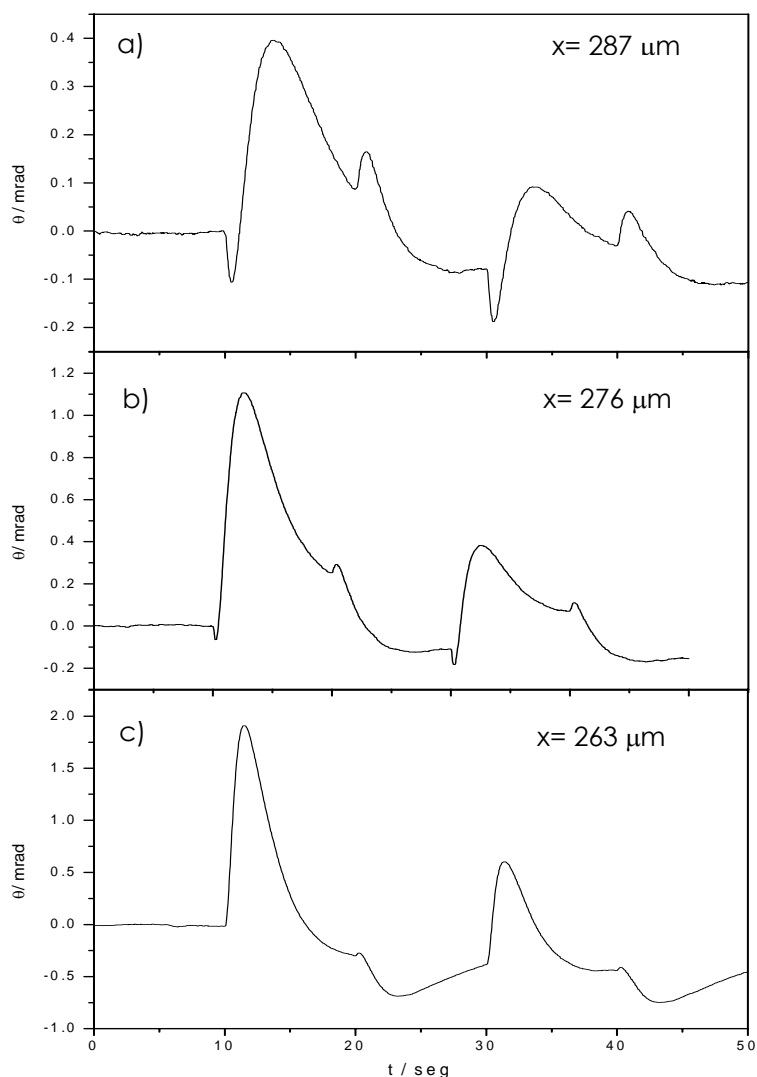


Figura 7

Transitorios de PBD durante la oxidación-reducción (3 ciclos) de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ en (a) LiCl 0,01 M. (b) NaCl 0,01 M y (c) CsCl 0,01 M.. En cada figura se detalla la distancia del electrodo al haz. Saltos de potencial desde 150 a 600 mV vs. Ag/AgCl/Cl⁻ (3 M).

4.3.2.- Cambios de masa: EQCM.

La microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo, descrita en el capítulo 2, permite determinar los cambios de masa durante los ciclos de oxidación y reducción. En la figura 8 se muestra la evolución de la impedancia del resonador de cristal de cuarzo durante sucesivos ciclos de oxidación/reducción para una película de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₅ la variación de masa correspondiente. La primera observación que debe destacarse es el hecho de que se trata de una película acústicamente delgada ($\Delta X_L \gg \Delta R$) con lo cual es posible relacionar directamente los cambios de impedancia inductiva (ΔX_L) con cambios de masa (Δm).

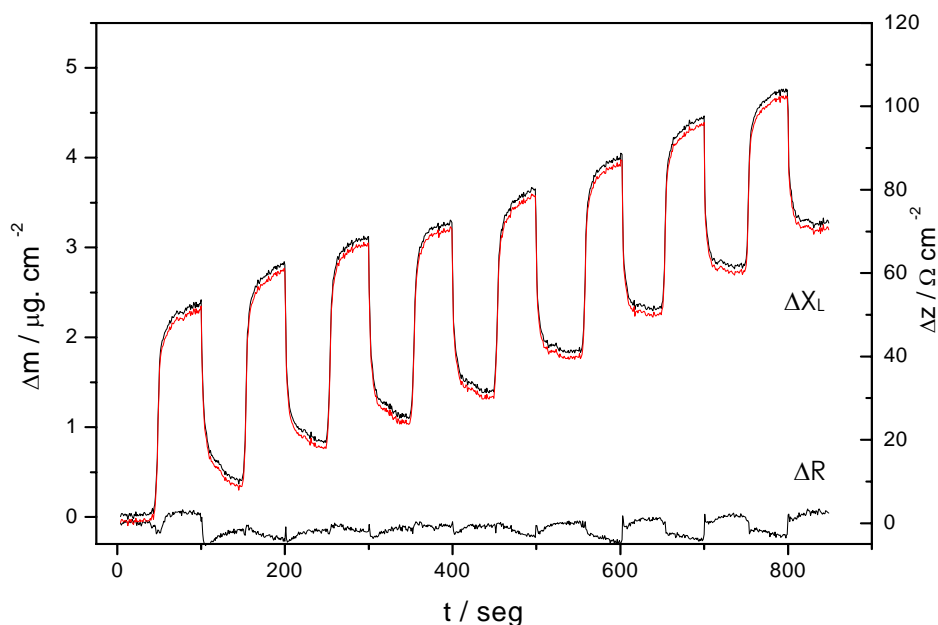


Figura 8

Parámetros electroacústicos (ΔX_L y ΔR) y cambio de masa (Δm) en función del tiempo durante la óxido-reducción (8 ciclos) de una película de $(PAH-Os)_{15}(PSS)_{14}$ en $LiCl$ 0,01 M. Saltos de potencial (ida y vuelta) de 100 a 600 mV por 50 seg en cada potencial.

Otra observación importante que surge de la figura 8 es que la masa crece al oxidar y decrece al reducir la película y la cantidad de masa incorporada ($2 \mu g \text{ cm}^{-2}$) es constante en cada ciclo. Sin embargo, es muy importante notar que la masa original del estado completamente reducido no se recupera y hay un aumento continuo de masa en la película durante varios ciclos de oxidación-reducción. Es decir, una fracción de las especies que entran desde la solución a la película durante la oxidación permanece en la misma en el siguiente ciclo de reducción. Sin embargo, la masa original se recupera si se mantiene el potencial del electrodo a 100 mV (estado reducido de la película) por más de una hora (resultado no mostrado).

De acuerdo a estos resultados y a los expuestos en la sección anterior respecto al "break-in" de la película, es importante tener en cuenta estos cambios en el estado original de la película según las posibles aplicaciones.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, y de acuerdo a la sección de PBD, la naturaleza de la última capa tiene un importante efecto sobre los parámetros fisicoquímicos como el potencial redox de la película, la permselectividad Donnan, el intercambio iónico, etc. Sin embargo, los cambios observados en EQCM al oxidar y reducir las películas terminadas en PAH-Os o en PSS son independientes de la naturaleza de la última capa. Esto puede deberse a una limitación propia de la

técnica, la cual integra la masa, viendo a la película como un todo, mientras que la PBD permite diferenciar los iones intercambiados en la superficie.

En la figura 9 se muestra simultáneamente el transitorio de corriente y de masa para la oxidación-reducción potenciostática.

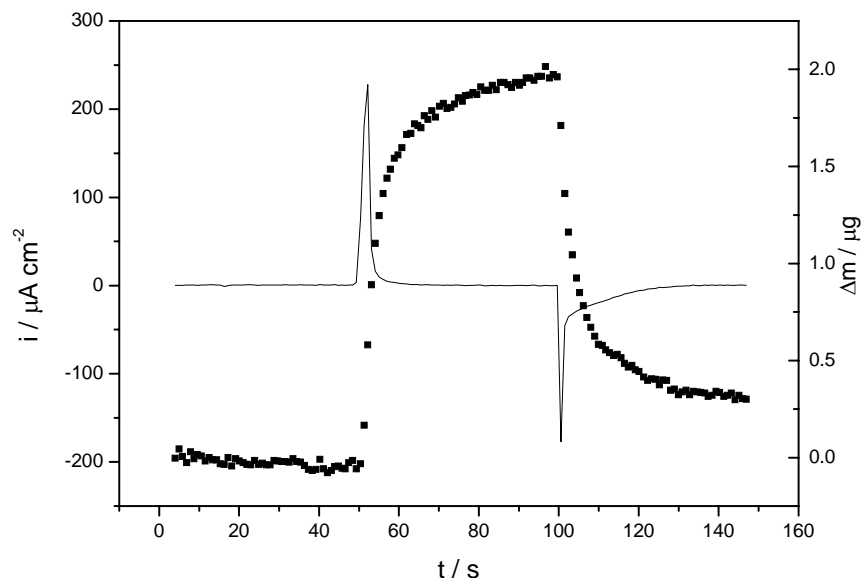


Figura 9

Transitorio de corriente y de masa para un salto de potencial (100 a 600 mV, 50 seg en cada uno) para una película de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ en HCl 0,01 M.

El transitorio de corriente cae a cero, mientras que la masa no regresa al valor inicial. Esto está de acuerdo con los resultados de la figura 3 en cuanto a que el sistema no se recupera en cada ciclo. La respuesta de corriente (flujo de electrones) del estado reducido al oxidado se caracteriza por un pico a tiempos muy cortos que cae rápidamente a cero. En cambio, la respuesta de masa tiene dos componentes: un rápido aumento a tiempos cortos que coinciden con el transitorio de corriente (carga) y luego un aumento más lento cuando cesó la inyección de carga. Durante la reducción también se ve una rápida disminución seguida de una lenta caída a tiempos más largos. El transitorio de corriente y el aumento de masa inicial estaría asociado al pasaje de carga (intercambio de iones y electrones) mientras que el incremento de masa lento se asocia al movimiento de especies neutras (solvente y sal). Sin embargo, un análisis cuantitativo que correlaciona la masa y la carga durante un salto de oxidación, mostrado en la figura 10 revela que Δm y ΔQ están en la misma escala temporal. Esto permite relacionar la masa con la carga y obtener de dicho gráfico lineal la masa molar de la especie incorporada dentro de las películas (gráfico insertado).

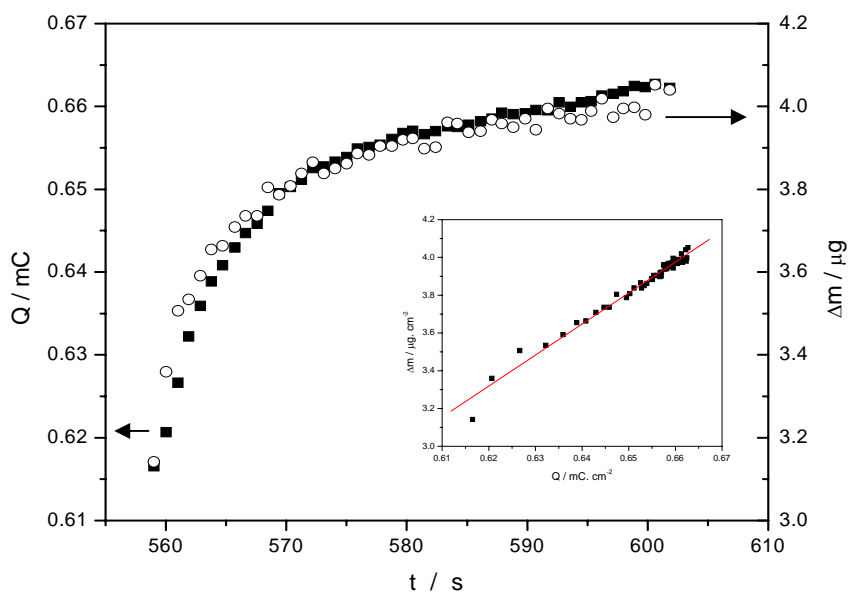


Figura 10

Transitorio de masa (O) y carga (■) en función del tiempo durante un salto de oxidación de una película de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ en LiCl 0,01 M. El gráfico insertado muestra la linealización de la masa-carga.

Esta tendencia de la relación carga/masa se reproduce para todas las soluciones de electrolitos y en la tabla I se muestran los valores obtenidos de las masas molares de las especies incorporadas para soluciones de electrolitos (0,01M), junto a las masas molares de las sales y los números de hidratación de los iones [20].

	HCl	LiCl	NaCl	CsCl	$\text{N}(\text{Et})_4\text{ClO}_4$
masa molar _{exp} (g/mol)	319	280	441	348	470
Anión (g/mol)	35	35	35	35	99
Catión (g/mol)	1	7	23	133	130
nº de hidratación catión		4	4	6	-----

Tabla I

Masa molar de la especie intercambiada durante la oxidación reducción de películas $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ determinada a partir de curvas de carga vs masa. Masa molar de los cationes y aniones y números de hidratación de los diferentes cationes.

Estos resultados muestran que si bien durante la oxidación es necesaria la entrada de aniones (junto a solvente) para compensar el exceso de carga, independientemente del tipo de electrolito empleado, la masa molar de la especie incorporada es mucho mayor que la masa molar del electrolito presente en solución. Por cada mol de electrolito se estarían incorporando alrededor de 20 moléculas de agua lo cual es mucho más que el agua de hidratación de los iones y sugiere que el flujo electrosmótico jugaría un rol importante.

4.3.3.- Cambios de espesor: resultados de elipsometría.

De los parámetros elipsométricos, Ψ y Δ , y la aplicación de modelos ópticos adecuados puede obtenerse información sobre el espesor y el índice de refracción de las películas durante la oxidación y reducción. En la figura 11 se muestran cambios de índice de refracción y espesor durante la oxidación-reducción de una película de (PAH-Os)₁₅(PSS)₁₄ en voltametría cíclica (a) y en cronoamperometría (b) desde el estado completamente reducido (Os(II)) al completamente oxidado (Os(III)). En concordancia con los resultados obtenidos por EQCM, se observa en ambos experimentos que el espesor de la película aumenta al oxidar y disminuye al reducir. El hecho de que el índice de refracción disminuya al aumentar el espesor puede explicarse por el ingreso de agua. El índice de refracción de la película se acerca al valor del agua (1,333) que es menor que el índice de refracción de la película virgen (1,55). Estos resultados y los de EQCM muestran que el solvente se incorpora a la película produciendo un cambio de volumen.

Es importante destacar en la figura 11a) la diferencia entre el comportamiento del índice de refracción y el espesor. Mientras que el primero disminuye durante la oxidación y recupera su valor original en la reducción de la película; el espesor muestra cierta histéresis, no regresando al valor original en la escala de tiempo del experimento. También se ve esto en los transitorios potenciostáticos.

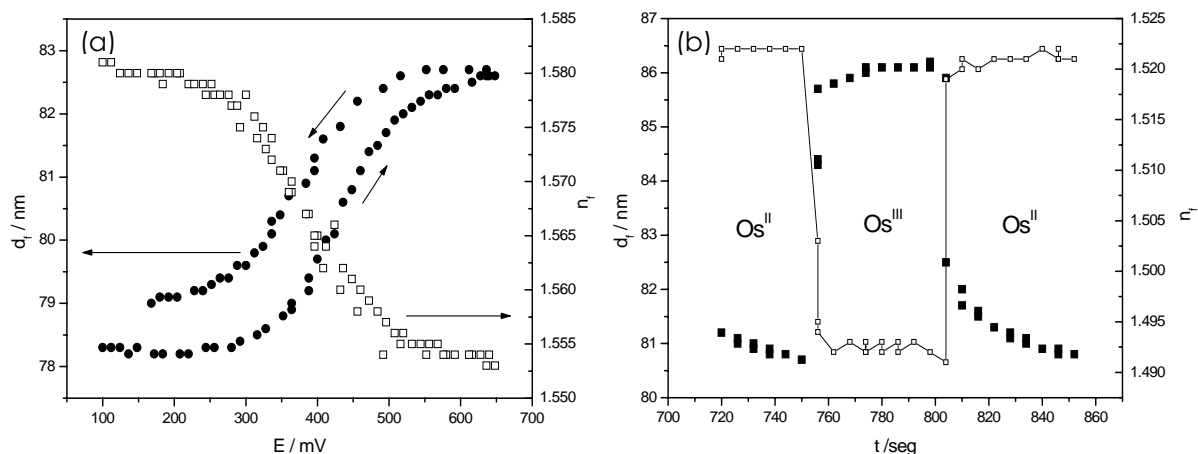


Figura 11

Cambio de espesor y de índice de refracción en función del potencial durante (a) la voltametría cíclica de una película de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ en NaCl 0,01 M. Barrido de potencial entre 100 y 600 mV a 20 mV/seg. (b) salto de potencial (entre 100 y 600 mV, 50 seg en cada uno) de una película de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ en HCl 0,01 M.

En la figura 12 se muestra cómo varía el espesor de la película después de cada ciclo de oxidación y reducción. Es claro que el espesor no vuelve a su estado inicial después de cada ciclo, lo que está de acuerdo con los resultados de EQCM y PBD.

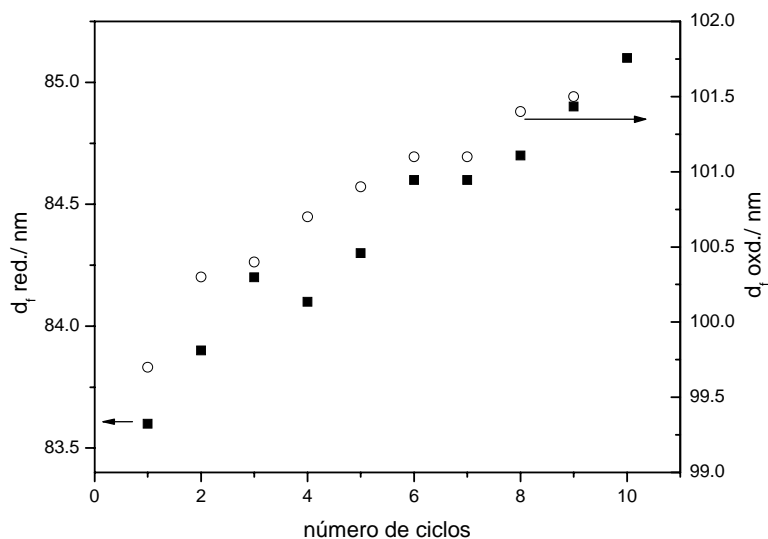


Figura 12

Variación del espesor en función del número de ciclos (entre 100 y 600 mV, 50 seg en cada uno) en los estados reducido y oxidado de una película de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{15}$ en HCl 0,01 M.

En la figura 13 se muestra la variación de espesor en función de la fracción de carga oxidada ($Os(III)$) para diferentes soluciones de electrolitos. Se observa el mismo tipo de pendiente para electrolitos como NaCl y LiCl y una pendiente menor para $N(Et)_4ClO_4$. Para ésta última se obtiene menor cambio en el espesor dado que el $N(Et)_4^+$ es hidrofóbico y ClO_4^- posee un bajo número de hidratación por lo que es menor la cantidad de agua incorporada a la película.

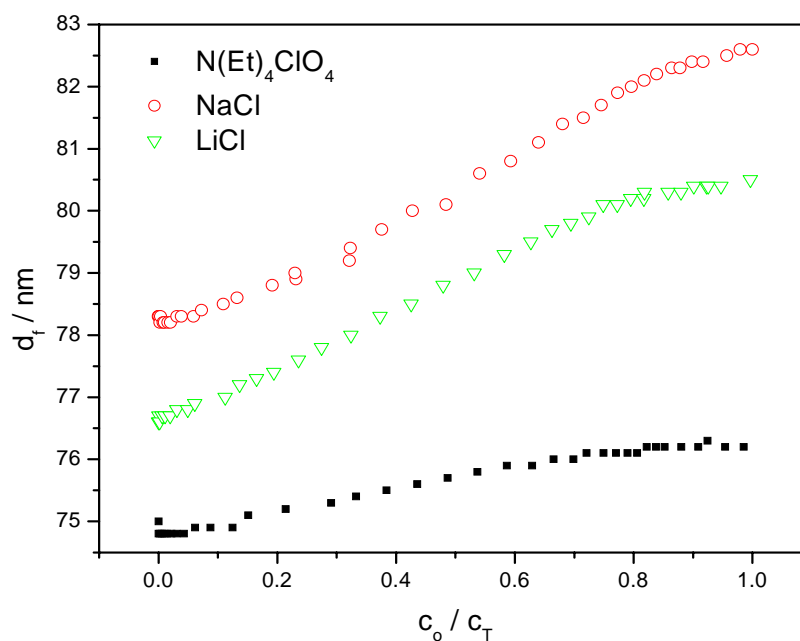


Figura13

Variación de espesor para películas $(PAH-Os)_{15}(PSS)_{14}$ en distintas sales ($N(Et)_4ClO_4$, NaCl, LiCl, 0,01 M) en función de la fracción de carga de oxidación.

4.3.4.- Incremento de la banda de agua en FTIR.

En la figura 14a) se muestra el espectro de absorción por reflexión infrarroja en la región de absorción del agua en 1648 cm^{-1} correspondiente a la vibración O-H, para películas $(PAH-Os)_{15}(PSS)_{14}$ después de cada ciclo de oxidación. En la figura 14b) se muestra el valor de la absorbancia a 1648 cm^{-1} después de oxidación en función del número de ciclos. El valor de la absorbancia aumenta en cada oxidación y no se recupera luego de la siguiente reducción. Esta evidencia molecular de la entrada de agua a la película durante la oxidación y el incremento de la cantidad de agua en la película corrobora los resultados de EQCM y de elipsometría. Dado que se trata de una medición integral para películas terminadas en distintas capas positivas o negativas.

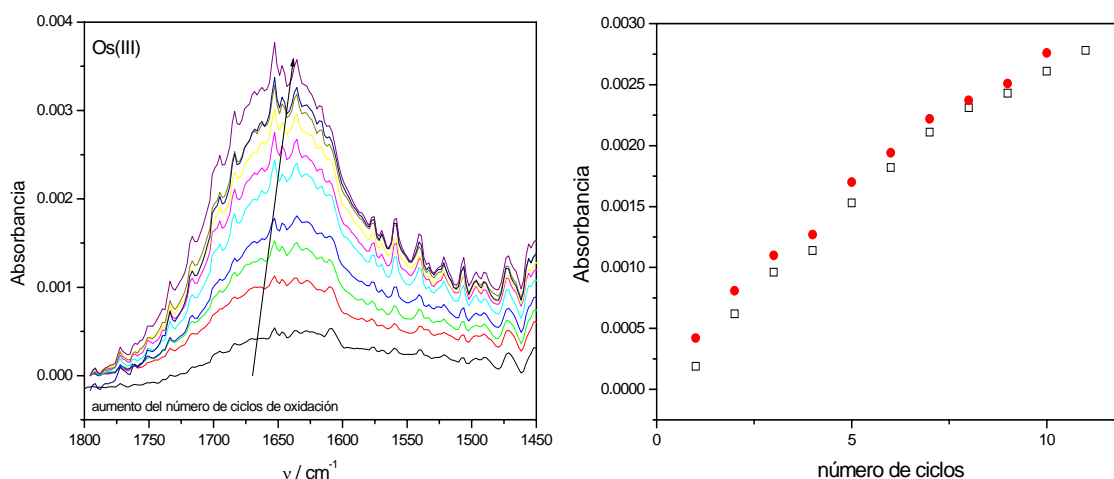


Figura 14

(a) Espectro de absorción por reflexión de FTIR (Absorbancia vs. número de onda) para un película de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ en HCl 0,01 M. Saltos de potencial entre 100 y 600 mV, 50 seg en cada estado. Se muestran los espectros correspondientes al Os(III)(b) Variación de la absorbancia a 1648 cm^{-1} en función del número de ciclos en los estados reducido (\square) y oxidado (\bullet) de la película de $(\text{PAH-Os})_{15}(\text{PSS})_{14}$ en HCl 0,01M.

4.4.- Conclusiones.

Las evidencias presentadas por diferentes técnicas (PBD, EQCM, elipsometría y FTIR-RAS) sobre la dinámica de procesos redox en multicapas de polielectrolitos redox autoensamblas capa por capa $(\text{PAH-Os})/(\text{PSS})$ revelan cambios de masa y de espesor elipsométrico durante sucesivos ciclos de oxidación y reducción debido al intercambio de iones y solvente entre las películas y el electrolito. La masa, espesor y la señal de FTIR del agua muestran un continuo incremento en los sucesivos ciclos de oxidación y reducción cortos en los primeros ciclos de oxidación-reducción de la película recién preparada. La carga "intrínsecamente compensada" (formación de pares iónicos polión-poliión) presenta un proceso de "*break-in*" y el aumento de masa y volumen por la incorporación de iones y solvente desde el electrolito para compensar la carga da lugar a una película con carga "extrínsecamente" compensada. La deflexión por gradiente iónico (PBD) también muestra el proceso de "*break-in*" en los primeros ciclos, al comienzo o luego de un tiempo de descanso de la película reducida (Os(III)). Durante ese tiempo se recupera la masa original. Sin embargo, la PBD muestra además una separación temporal del intercambio de aniones y cationes con marcadas diferencias para películas con exceso de carga positiva o negativa en la interfaz película-electrolito. Del análisis de la relación de la carga de Faraday por mol de iones intercambiados se observó que la masa incorporada es mucho mayor que la masa molar de cualquiera de los electrolitos utilizados. Esto se interpreta por un flujo

electrosmótico durante los transitorios de oxidación-reducción. La incorporación de agua dentro de las películas fue confirmada mediante FTIR-RAS.

Tanto por EQCM como por PBD se observó que la película puede restablecer su estado original si se mantiene suficiente tiempo en el estado reducido, dando lugar nuevamente el fenómeno de “*break-in*” si se somete otra vez a oxidación y reducción.

4.5.- Referencias.

- [1] G. Decher, J.H. Song, *Bunsen Gessellschaft Phys. Chem.*, **1991**, 95, 1430.
- [2] X. Zhang, J. Sun, J. Shen, *Multilayer thin Films*, cap. 11, (Ed. J.B.Schlenoff, G. Decher), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, pág. 301-330.
- [3] B. Tieke, M. Pyrasch, A. Toutianoush, *Multilayer Thin Films*, cap. 15, (Ed. J.B.Schlenoff, G. Decher), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, pág. 427.
- [4] E.J. Calvo, E.S. Forzani, M. Otero, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 3281.
- [5] E.S. Forzani, M.A. Perez, M. Lopez Teijelo, E.J. Calvo, *Langmuir*, **2002**, 18, 9867.
- [6] E.S. Forzani, M.A. Perez, M. Lopez Teijelo, E.J. Calvo, *Langmuir*, **2002**, 18, 4020.
- [7] C. Bonazzola, E.J. Calvo, F. Nart, *Langmuir*, **2003**, 19, 5279.
- [8] N. Tognalli, A. Fainstein, C. Bonazzola, E. Calvo, *J. Chem. Phys.*, **2004**, 120, 1905.
- [9] D.M. Kelly, J.G. Vos, A.R. Hillman, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1996**, 92, 4121.
- [10] J.B. Schlenoff, H. Ly, M. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7626.
- [11] J.B. Schlenoff, S.T. Dubas, *Macromolecules*, **2001**, 34, 592.
- [12] E.J. Calvo, A. Wolosiuk, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 8490.
- [13] D. Grumelli, A. Wolosiuk, E. Forzani, G.A. Planes, C. Barbero, E.J. Calvo, *Chem. Comm.*, **2003**, 3014.
- [14] T.R. Farhat, J.B. Schlenoff, *Langmuir*, **2001**, 17, 1184.
- [15] T.R. Farhat, J.B. Schlenoff, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4627.
- [16] M. Tagliazucchi, D. Grumelli, C. Bonazzola, E.J. Calvo, *J. Nanoscience and nanotechnology*, enviado, **feb. 2006**.
- [17] A.R. Hillman, N.A. Noelle, *J. Electrochem. Soc.*, **1992**, 139, 74.
- [18] E.J. Calvo, C. Dalinowicz, A. Wolosiuk, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2452.
- [19] M. Tagliazucchi, E.J. Calvo, *J. Electroanal. Chem.*, aceptado, **2006**.

[20] F. Cotton y G. Wilkinson, Química inorgánica avanzada, J. Wiley and Sons, INC, Ed. Limusa, México, **1978**, *pág. 444*.

5.1.- Introducción.

Como se mencionó en el capítulo introductorio, a partir de una capa de reconocimiento molecular (sistema PAH-Os/ GOx) y una capa de conmutación (SPAN) es posible desarrollar un dispositivo de reconocimiento molecular que tiene similitudes a los transistores. El primer transistor químico sugerido fue por Wrigthon [1]; el dispositivo imita las características fundamentales de un transistor de estado sólido [2] en el sentido de que la resistencia entre dos contactos puede ser variada por una señal que será luego amplificada. Inicialmente el transistor químico constaba de tres microelectrodos de oro los cuales se cubrían con un polímero conductor. Las características esenciales que deben cumplirse, en estos casos son: a) los tres electrodos independientes deben estar lo más cerca posible para facilitar la medida de la corriente que circulará entre ellos; b) el polímero que los cubre debe presentar un gran cambio de conductividad debido a un cambio redox, c) cada electrodo debe tener una conexión individual. Una diferencia importante con el transistor convencional, es que el transistor químico puede estar formado por solo dos microelectrodos ya que el cambio en el estado redox puede ser ocasionado por una especie química; en este caso no es necesario contar con un tercer electrodo que produzca el cambio en la conductividad del polímero.

En este capítulo se mostraran los detalles de fabricación y caracterización de un dispositivo de reconocimiento molecular conteniendo los componentes completamente integrados en la misma película: SPAN (PAH-Os)_m/(GOx)_n. Hacia el final del capítulo se mostrarán las evidencias respecto al funcionamiento del mismo.

5.2. - Fabricación del Transistor Molecular.

A continuación de detalla la funcionalización de un arreglo de dos microelectrodos con polianilina activa a pH neutro (polimerizada con PSS o sulfonada posteriormente) formada por simple oxidación del monómero, y la combinación de PANI con el sistema de reconocimiento molecular para glucosa, que ocasiona el cambio redox y de conductividad de PANI. La capa de reconocimiento molecular formada por PAH-Os y GOx se deposita sobre PANI mediante la técnica de autoensamblado electrostático capa por capa. Para ello, los pasos claves de la fabricación del transistor molecular son:

- a) Limpieza de las microbandas de oro
- b) Polimerización controlada de anilina sobre las microbandas
- c) Autoensamblado electrostático capa por capa de GOx y PAH-Os sobre la película de PANI.

5.- Fabricación, caracterización y funcionamiento del Transistor Molecular

En la figura 1 se muestra esquemáticamente la secuencia de pasos en la construcción de un transistor molécula integrado.

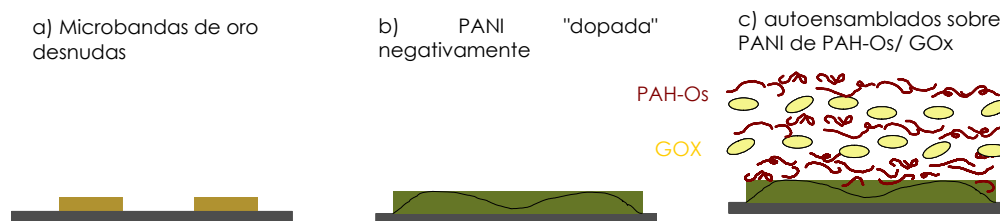


Figura 1

Esquema ilustrativo de los pasos a seguir para la construcción del transistor molecular.

5.2.1.- Limpieza y caracterización electroquímica de las microbandas de oro.

Los microelectrodos utilizados, como se describió en el capítulo 2 (sección 2.4.1) son microbandas de oro de 10 μm de ancho separadas entre sí por 10 μm de un espacio aislante. En la figura 2 se muestra una fotografía obtenida por microscopía óptica y una perfilometría de estos microelectrodos comerciales sin modificación. Puede observarse que las dimensiones de las microbandas son las informadas. Para la limpieza de estos microelectrodos el fabricante (www.windsor-ltd.co.uk) aconseja no realizar pulido ya que este procedimiento puede dañar la estructura del electrodo. Por lo tanto los microelectrodos de oro se limpiaron por voltametría cíclica en soluciones ácidas. En la figura 3 se muestra la voltametría cíclica para las cuatro microbandas presentes en dispositivo comercial.

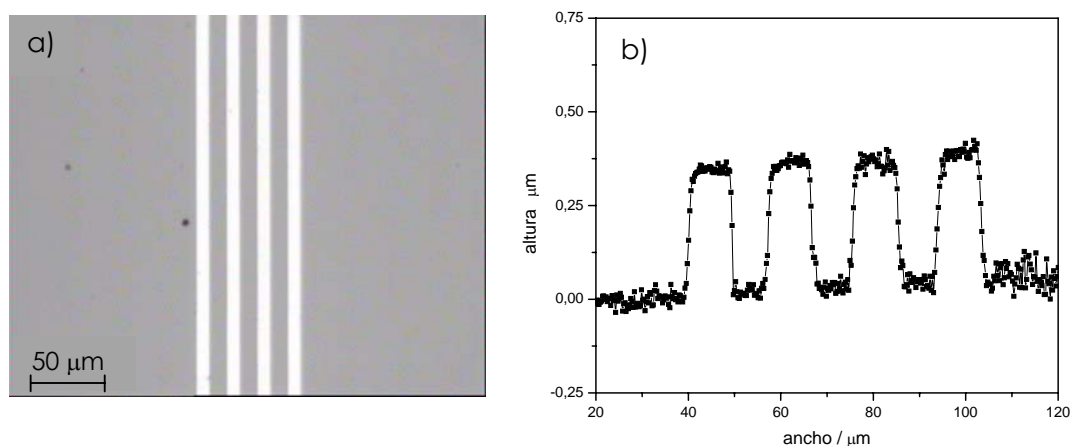


Figura 2

Caracterización de las microbandas comerciales.

a) Micrografía obtenida empleando microscopio óptico (aumento x 10).

b) Perfilometría de las microbandas de oro.

Los electrodos que presentaban menor nivel de limpieza fueron oxidados a mayor velocidad de barrido por no más de 10 ciclos para evitar despegar el depósito de oro. La forma de la voltametría cíclica es la típica para un depósito de oro policristalino. Es importante mencionar que, en cada caso, el pico de reducción del óxido superficial aparece al mismo potencial y tiene la misma intensidad para cada microbanda, en consecuencia, todas las microbandas poseen la misma área activa. El suave incremento de corriente que se observa en el extremo catódico de potencial se debe a la reducción de oxígeno que puede ser eliminada simplemente burbujeando nitrógeno o argón a través de la solución. Una discusión más detallada de la voltametría de oro policristalino en soluciones ácidas puede encontrarse en [3].

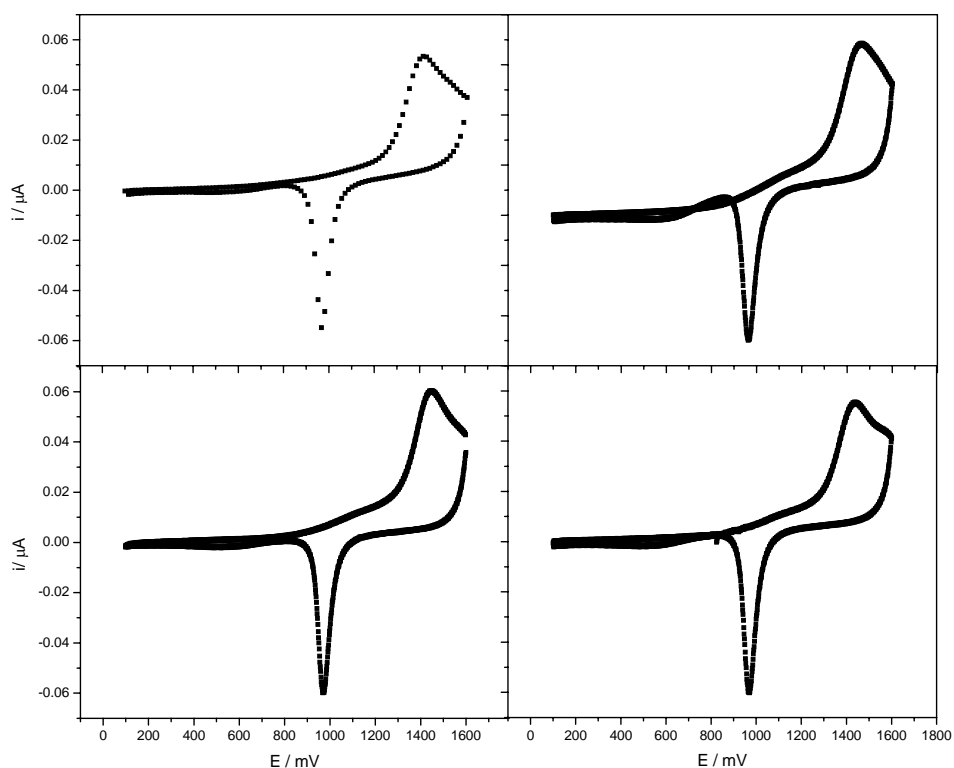


Figura 3

Voltametría cíclica de cuatro microbandas de oro de un mismo dispositivo. Ciclado entre 100 y 1600 mV a 100 mV/ s (vs. Ag/AgCl/Cl⁻ 3M) en H₂SO₄ 2 M.

Además es evidente que cada una de las microbandas por separado puede ser utilizada como electrodo de trabajo para futuras derivatizaciones. En la figura 4 se muestra la voltametría cíclica correspondiente a cada una de las microbandas junto con la voltametría cíclica de las cuatro microbandas conectadas juntas. Puede

observarse que el incremento en el área del pico de reducción del óxido superficial corresponde a la suma de las áreas de los picos de reducción de cada una de las cuatro microbandas.

a)

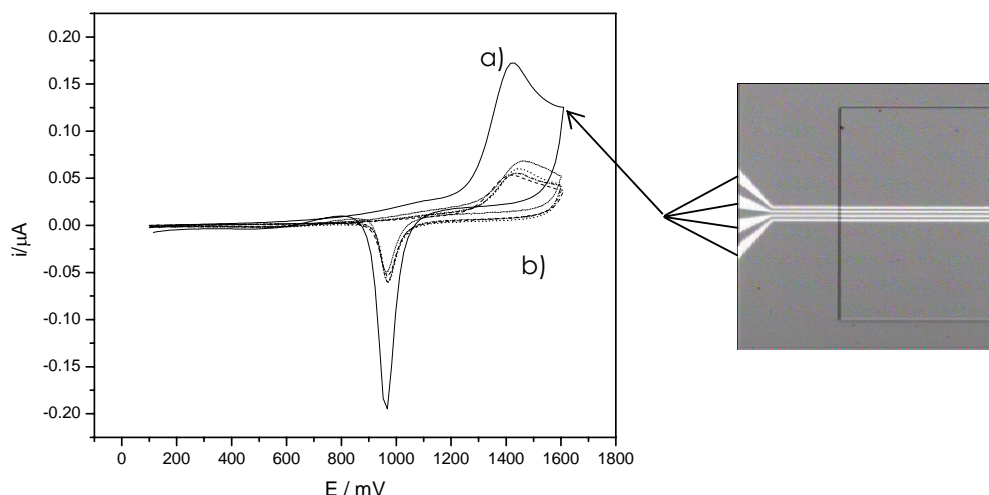


Figura 4

Voltametría cíclica de microbandas de oro; entre 100 y 1600 mV (vs. Ag/AgCl) a 100 mV/seg en H_2SO_4 2 M. a) Las cuatro microbandas conectadas juntas en el mismo experimento. b) cada una de las microbandas conectadas individualmente (De manera ilustrativa se muestra una foto obtenida por medio del microscopio óptico (x10) de las microbandas de oro sin modificar).

5.2.2.- Capa de conmutación: polimerización de anilina (modificación electroquímica de las microbandas de oro).

Es posible depositar electroquímicamente polímeros electroactivos sobre cada una de las microbandas y en cantidades diferentes. La deposición de PANI puede realizarse de manera controlada; esto es, bajo ciertas condiciones es posible derivatizar sólo una microbanda, dos de ellas ó las cuatro microbandas, variando la cantidad de polímero depositado que queda controlado por la técnica y por los tiempos de polimerización utilizados. En la figura 5 se muestran una serie de fotografías obtenidas con microscopio óptico de las microbandas sin modificar y de las microbandas modificadas.

Una de las técnicas disponibles para depositar polianilina en forma controlada es la técnica potenciostática. En ella se puede utilizar una o varias microbandas conectadas juntas como electrodos de trabajo y se aplica un potencial oxidativo en presencia de solución de monómero. El contraelectrodo deberá posicionarse frente a

la microbanda para generar las líneas de campo adecuadas. Si se desea depositar más polímero sólo es necesario aplicar el mismo potencial durante más tiempo.

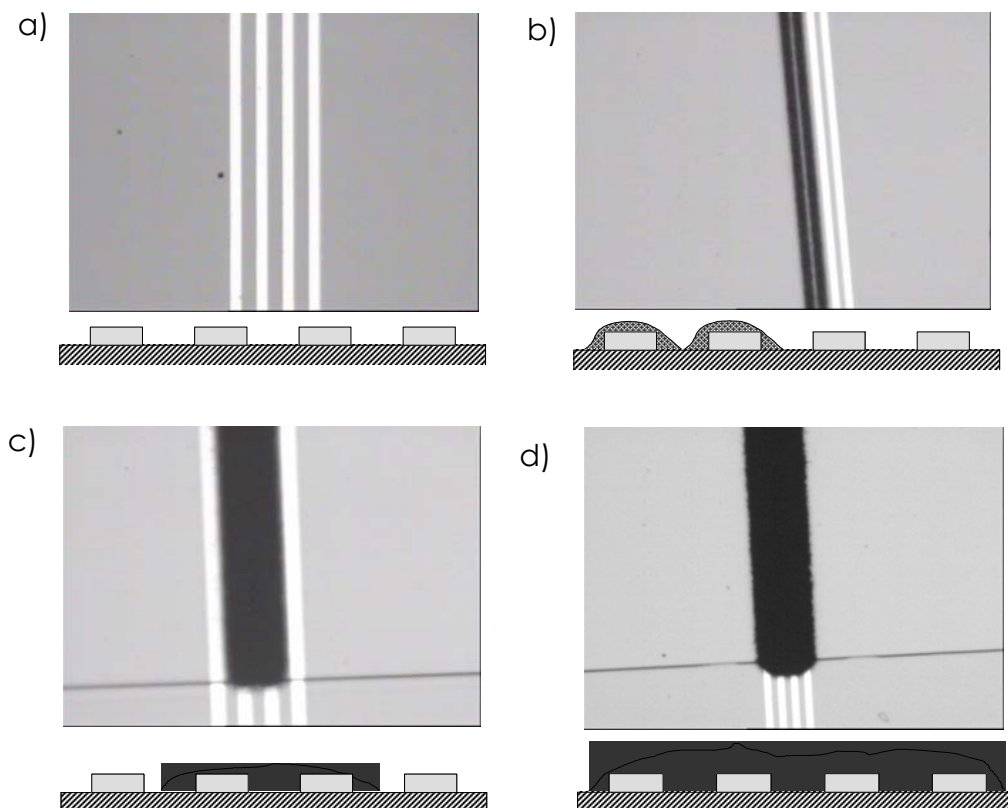


Figura 5

Microbandas fabricadas con polianilina con diferentes cargas finales a) Crecimiento microbanda sin modificar, b) Crecimiento conectado una microbanda y luego la otra pasando menos de 0.1 mC en cada caso, c) Crecimiento hasta pasar una carga de 0.1 mC. d) Crecimiento hasta pasar una carga de 800 mC. Los crecimientos se realizaron potencioestáticamente por salto de potencial a 950 mV en una solución 0,44 M de anilina en H_2SO_4 2 M. Las fotografías fueron tomadas en microscopio óptico con una lente de aumento de 10 veces.

La ventaja de poder polimerizar sobre el arreglo de microbandas de manera controlada es el hecho de utilizarlo para la fabricación de un dispositivo de reconocimiento molecular (transistor). Utilizar un menor espaciamiento entre las microbandas y un menor volumen de polímero conductor requiere menos energía para cambiar la conductividad y este cambio puede realizarse más rápidamente [4].

5.2.3.- Capa de reconocimiento molecular: autoensamblado electroestático capa por capa de PAH-Os- GOx.

PANI sintetizada sobre las microbandas fue polimerizada en presencia de contraiones aniónicos como PSS o sulfonada posteriormente. En ambos casos la película de PANI obtenida posee una densidad de carga negativa. PANI(PSS) posee un exceso de polianiones dentro de la película que le otorga una densidad total de carga negativa. SPAN posee unido a la cadena original de PANI grupos sulfonato cargados negativamente. La película de reconocimiento formada por la polianilina modificada con el polímero de Osmio (PAH-Os) y la enzima Glucosa Oxidasa (GOx) puede ponerse en contacto con PANI por medio de autoensamblado electroestático capa por capa. Como ya se describió en el capítulo experimental, esto se realiza por inmersión alternada del electrodo en soluciones acuosas de PAH-Os y GOx. La formación de la multicapa ocurre por sobrecompensación de la carga.

5.3.- Caracterización del Transistor Molecular.

Los objetivos de la caracterización del transistor durante su fabricación y una vez obtenido el sistema integrado son:

- a) cuantificar la cantidad de polianilina depositada,
- b) mostrar la efectividad del proceso de sulfonación,
- b) comprobar la conexión eléctrica entre las microbandas,
- c) comprobar la buena actividad electroquímica en el pH de trabajo,
- d) mostrar que la capa de reconocimiento está integrada al sistema
- e) comprobar la conexión entre ambas capas
- f) evaluar la resistencia del polímero autoensamblado en función del potencial.

5.3.1.- Caracterización de la capa de conmutación: PANI-PSS ó SPAN depositadas sobre microelectrodos de oro.

La cantidad de PANI depositada puede ser controlada evaluando la carga involucrada durante el proceso de polimerización electroquímica. Esto es muy importante para obtener reproducibilidad en los dispositivos.

Las microbandas derivatizadas con PANI pueden ser completamente caracterizadas por métodos electroquímicos. En la figura 6 se muestra la voltametría cíclica de PANI-PSS en medio ácido (H_2SO_4 2M) que cubre dos microbandas de oro adyacentes. La forma de la voltametría cíclica es la misma que la obtenida para electrodos macroscópicos cubiertos con PANI (insertado en ángulo izquierdo de la

figura 6). Es importante destacar que microelectrodos que no han sido modificados pero que se encuentran cerca de los electrodos modificados muestran, en algunos casos, una pequeña respuesta electroquímica correspondiente a una menor cantidad de PANI depositada. Así, la caracterización electroquímica puede ser utilizada para mostrar que los microelectrodos pueden ser modificados de manera controlada (resultado consistente en todos los casos con las fotografías tomadas).

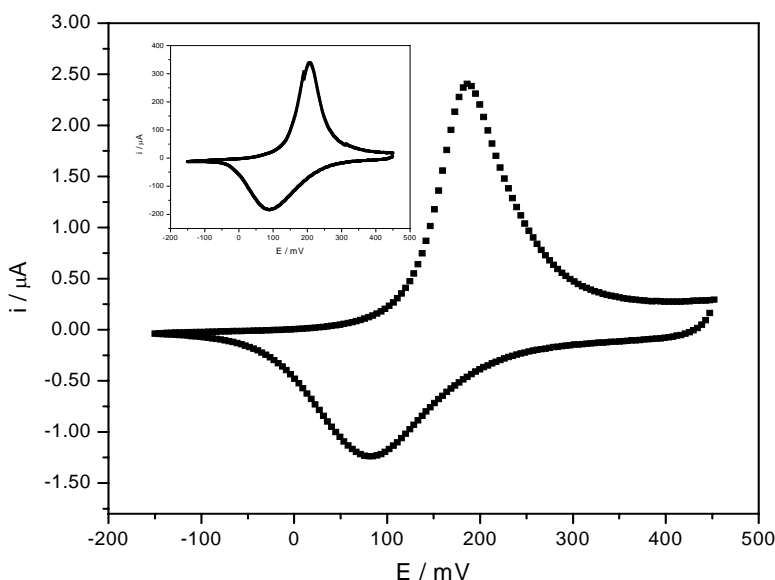


Figura 6

Voltametría cíclica de PANI-PSS cubriendo un par de microbandas adyacentes. Crecimiento obtenido por salto de potencial (950 mV) 0.71 mC. El gráfico insertado muestra la respuesta voltamperométrica bajo las mismas condiciones, para otra película de PANI sintetizada por voltametría cíclica sobre un electrodo convencional de oro (área 1,55 cm²). Carga de la voltametría cíclica: 0,45 mC/cm².

En el caso de la síntesis de SPAN, luego de depositar polianilina, ésta se sulfona (capítulo 3). Una forma rápida y sencilla de comprobar que la sulfonación ha sido exitosa es la realización de la voltametría cíclica del producto obtenido (SPAN). En la figura 7 se muestran ambas voltametrías cíclicas de PANI y de SPAN en H₂SO₄ 2 M. Puede observarse el corrimiento hacia potenciales más positivos del potencial de pico de SPAN con respecto a PANI. Este corrimiento de potencial se debe a que el anillo de anilina ahora sustituido es más difícil de oxidar, por lo tanto es necesario aplicar un potencial más positivo.

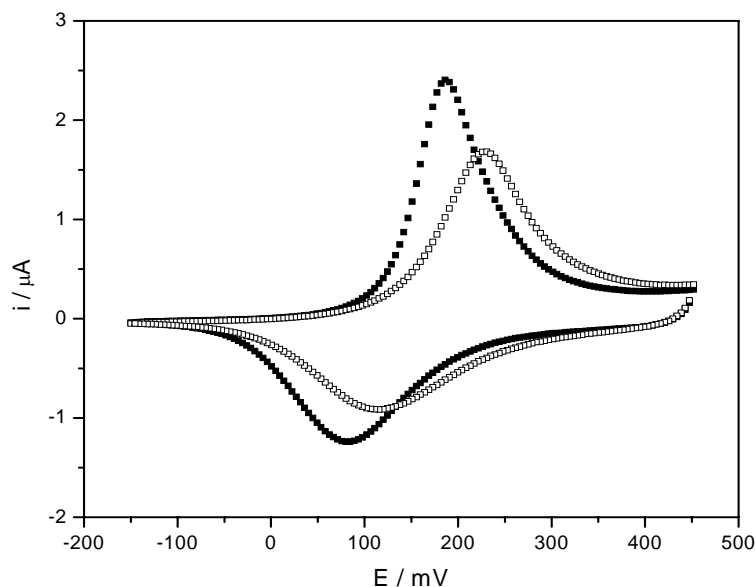


Figura 7

Voltagramas cíclicos en H_2SO_4 2M a 50 mV/s (barrido desde -150 a 450 mV) de PANI (■) carga de 5.85 μC y SPAN (○) carga de 5.19 μC . PANI fue sintetizada sobre microbandas por salto de potencial desde circuito abierto a 950 mV. Carga empleada 0.1 mC/ cm^2 sobre las microbandas.

Además, la voltametría cíclica puede ser usada para establecer si dos (o más) microbandas están conectadas entre sí. En la figura 8 se muestra los resultados de voltametría cíclica para dos microbandas adyacentes. El hecho clave es que la voltametría cíclica correspondiente a la microbanda derecha (a cualquier velocidad de barrido) presenta la misma forma y área que la voltametría cíclica correspondiente a la microbanda izquierda sola y son iguales a aquella obtenida cuando se conectan ambas microbandas juntas. Estos hechos indican que ambas microbandas (derecha e izquierda) están conectadas por un polímero y que todo el polímero es accesible electroquímicamente tanto desde una de las microbandas como de la otra; y ambas conectadas entre si [5].

El hecho de que la microbanda derecha tenga la misma voltametría cíclica que la microbanda izquierda puede deberse simplemente a que cada una contiene la misma cantidad de polímero pero no necesariamente a que se encuentran conectadas entre sí. Si así fuera, al realizar la voltametría cíclica de ambas microbandas conectadas entre sí, el área de la misma sería la suma de las áreas de cada una de las microbandas (derecha e izquierda) por separado. Sin embargo se ve en la figura 8 que cuando ambas microbandas se conectan como un solo electrodo

de trabajo, el área bajo la curva es la misma que en el caso de la microbanda derecha o la microbanda izquierda conectadas por separado. La cantidad mínima de carga necesaria para conectar ambos microelectrodos esta asociada con una carga de electropolimerización por salto de potencial de $90,7 \mu\text{C}$.

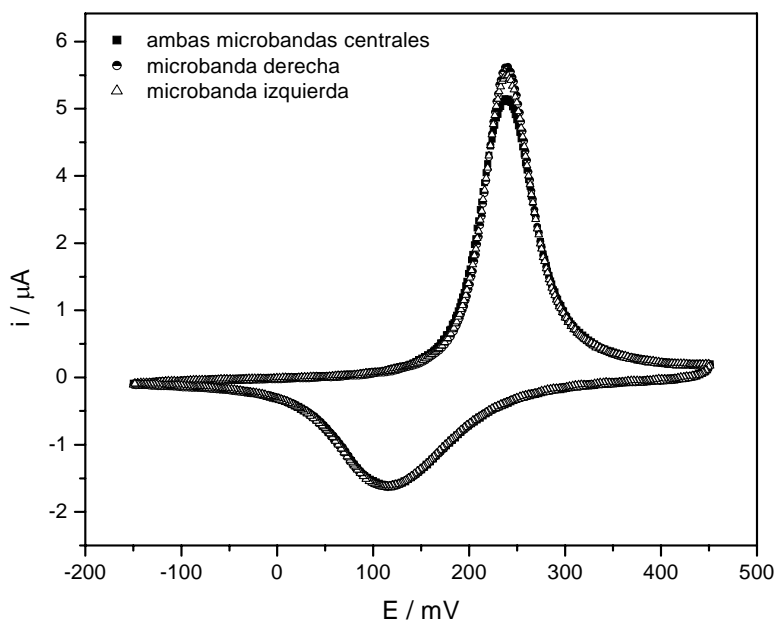


Figura 8

Voltametría cíclica de PANI cubriendo dos microbandas adyacentes a 50 mV/seg en H_2SO_4 2 M . Película crecida por salto de potencial (0.95 V) hasta pasar una carga de 151 mC/cm^2 . (■) Voltametría de ambas microbandas conectadas como un solo electrodo. (●) Voltametría realizada conectando solamente la microbanda derecha, (▲) voltametría obtenida conectando solamente la microbanda izquierda. Carga de la voltametría cíclica $8,96 \mu\text{C}$.

La microscopía óptica fue utilizada para evidenciar el cubrimiento de las microbandas con el polímero. Esto es, una vez formada la película (PANI(PSS) o SPAN) y de comprobar la conexión eléctrica de las mismas empleando voltametría cíclica, se tomaron fotografías del deposito. En la figura 9 se muestran dos casos como ejemplo.

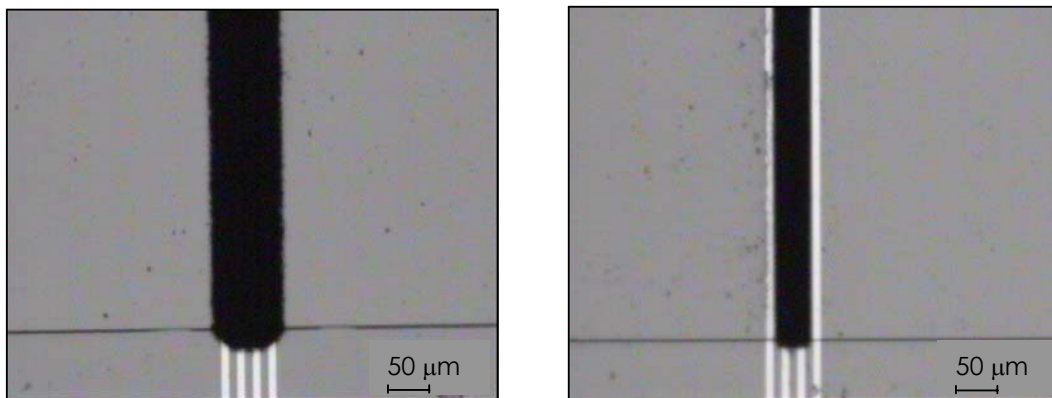


Figura 9

Micrografías ópticas (aumento de 10 x). a) deposito de PANI(PSS); carga de electropolimerización: 0.44 mC (275 mC/ cm²), cuatro microbandas de oro cubiertas. b) deposito de PANI(PSS); carga de electropolimerización: 52,2 μC (87 mC/ cm²), sólo dos microbandas cubiertas.

La medición de los perfiles de las microbandas modificadas con polímero conductor (perfilometría) permite obtener el espesor y el ancho del polímero depositado. En la figura 10 se muestran los perfiles medidos para depósitos de polianilina sobre cuatro y sobre dos microbandas y las fotografías ópticas correspondientes.

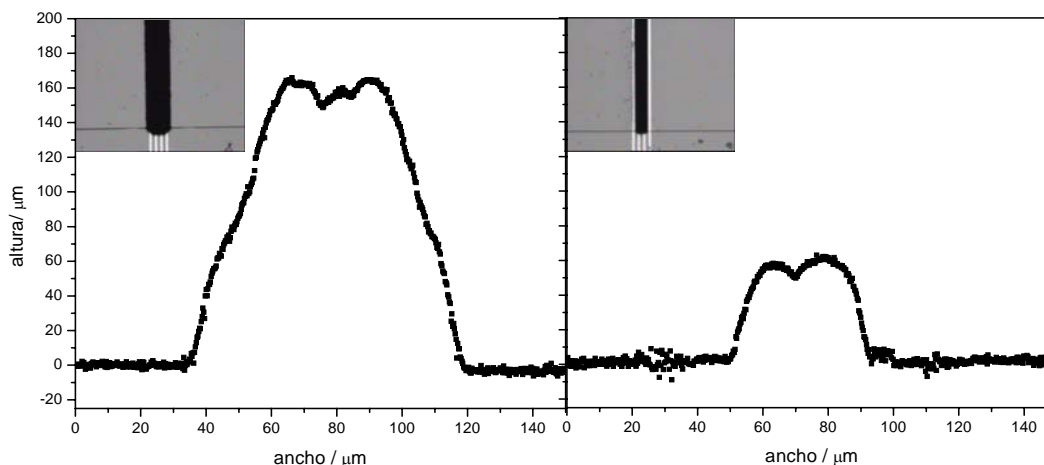


Figura 10

Perfiles de microbandas de oro modificadas con polianilina a) deposito de PANI(PSS)(carga de electropolimerización: 0.44 mC), cuatro microbandas de oro cubiertas. b) deposito de PANI(PSS) (carga de polimerización: 52,2 μC), dos microbandas cubiertas.

De los gráficos puede extraerse información acerca de la geometría del depósito. En el caso en que cuatro microbandas se encuentran cubiertas observamos

que el ancho del polímero depositado es de $80\text{ }\mu\text{m}$; lo cual coincide con el ancho de 4 microbandas ($10\text{ }\mu\text{m} \times 4$), los espacios aislantes entre ellas ($10\text{ }\mu\text{m} \times 3$) y $5\text{ }\mu\text{m}$ más en cada extremo. Lo mismo ocurre para el depósito que cubre solo dos microbandas con un ancho total de $40\text{ }\mu\text{m}$ (dos microbandas más el espacio aislante de entre ellas más $5\text{ }\mu\text{m}$ a cada lado). Por otro lado, el espesor de los depósitos observado es de $160\text{ }\mu\text{m}$ y $60\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente. A partir de estas medidas de espesor y ancho del polímero depositado es posible estimar el volumen del mismo. La electrosíntesis de polianilina en presencia PSS o la sulfonación de PANI para obtener SPAN apunta como dijimos a mantener los protones de la solución electrolítica mayormente dentro de la película cuando se trabaja con el biosensor a pHs menos ácidos a aquel de máxima actividad del polímero.

En la figura 11 se muestran comparativamente las voltametrías cíclicas de PANI, PANI(PSS) y SPAN a pH 5. En los casos PANI(PSS) y SPAN la voltametría cíclica mejora significativamente con respecto a la obtenida para PANI sin ningún tipo de modificación y resulta evidente que el polímero es electroactivo en estos casos. Como veremos también, posee una conductividad aceptable para distintas aplicaciones.

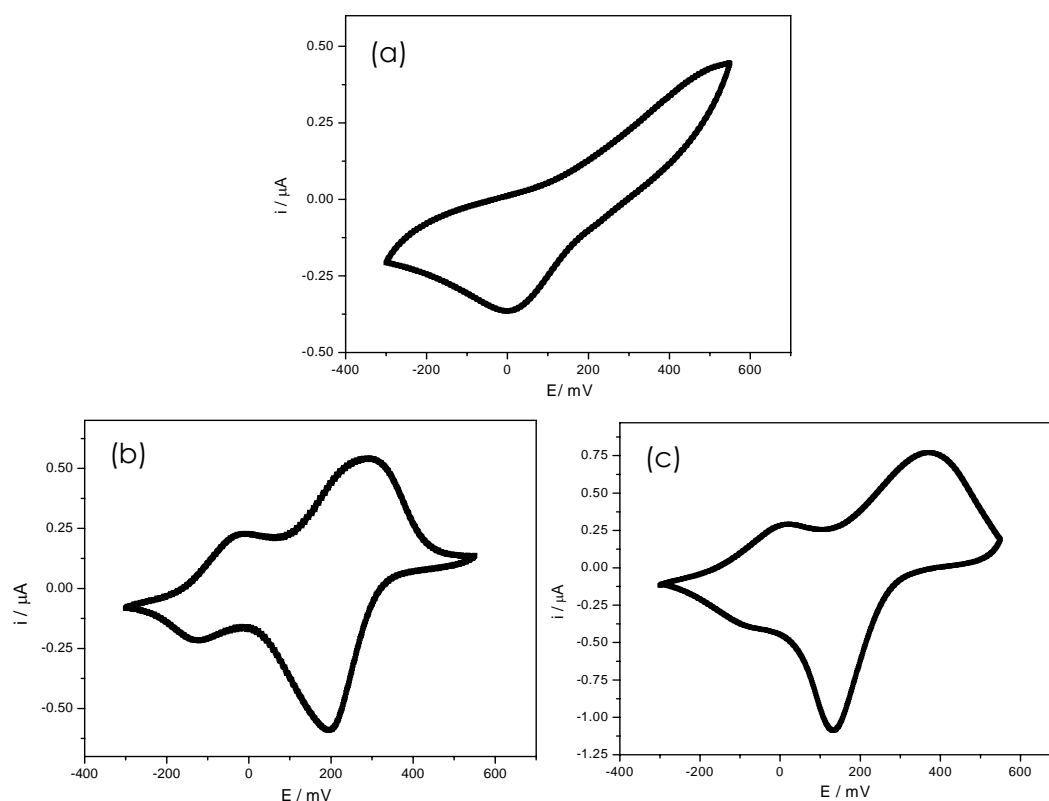


Figura 11

Voltametrías cíclicas a 20 mV/seg . en buffer pH 5 (Acido cítrico/ fosfato ácido de sodio) sobre microbandas de oro a) polianilina sin modificar (PANI), b) polianilina sintetizada a partir de una solución acuosa del monómero en presencia de PSS (PANI-PSS), c) polianilina posteriormente sulfonada con HSO_3^- (SPAN)

5.3.2.- Evidencia de autoensamblado de PAH-Os/ GOx sobre las películas de polianilina.

Luego de obtener la película de conmutación (PANI-PSS ó SPAN) se procede a autoensamblar PAH-Os/GOx capa por capa sobre las microbandas. La microbalanza de cristal de cuarzo (EQCM) puede ser usada para verificar la deposición de moléculas de enzimas en estructuras de multicapas [5]. Dado que PAH-Os presenta un fuerte efecto viscoelástico debido a las propiedades reológicas de sus soluciones, no puede comprobarse su adsorción por esta técnica [6], sin embargo, su presencia en la superficie puede verificarse por voltametría cíclica.

La masa de enzima absorbida se obtiene a partir de los cambios de frecuencia del cristal según la ecuación de Sauerbrey [7].

En la figura 12 se muestran los parámetros electroacústicos durante la adsorción de GOx desde una solución acuosa sobre un electrodo de cristal de cuarzo previamente cubierto con polianilina, luego sulfonada (SPAN) y posteriormente expuesta a una solución acuosa de PAH-Os. En este transitorio de adsorción sobre la superficie de Au/PANI/PAH-Os puede observarse que los cambios de resistencia de la película ΔR_p no son significativos frente a los cambios de inductancia ΔX_{Lp} . A partir de este resultado, podemos referir los cambios en ΔX_{Lp} como cambios de masa.

En la figura 12 también puede observarse que la cantidad de masa adsorbida se mantiene después de quitar la solución conteniendo la enzima, enjuagar y colocar agua, dando evidencia de que la adsorción de la enzima sobre la superficie es muy fuerte.

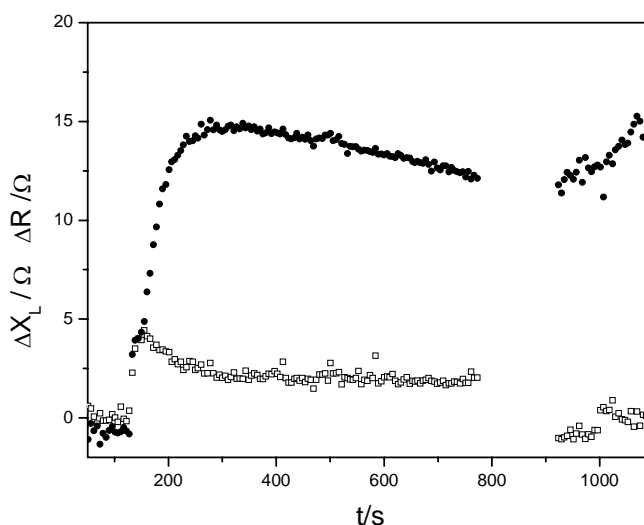


Figura 12

Parámetros electroacústicos (ΔX_{Lp} , ΔR_p) en función del tiempo obtenidos durante la adsorción de GOx sobre Au/ SPAN/ PAH-Os. La enzima fue adsorbida desde una solución acuosa 1 mM

En la figura 13 se muestra la variación de masa para la adsorción de las capas siguientes. Puede verse que en cada paso de adsorción se adiciona la misma cantidad de enzima, excepto en la primera capa. Este comportamiento puede deberse a que la primera adsorción de la enzima se realiza sobre PAH-OS que se encuentra absorbida sobre SPAN. Por el contrario, las capas adsorbidas posteriormente, ya no evidencian los efectos de la superficie de SPAN por lo que la cantidad de enzima absorbida en las dos capas siguientes a la primera adsorción es la misma.

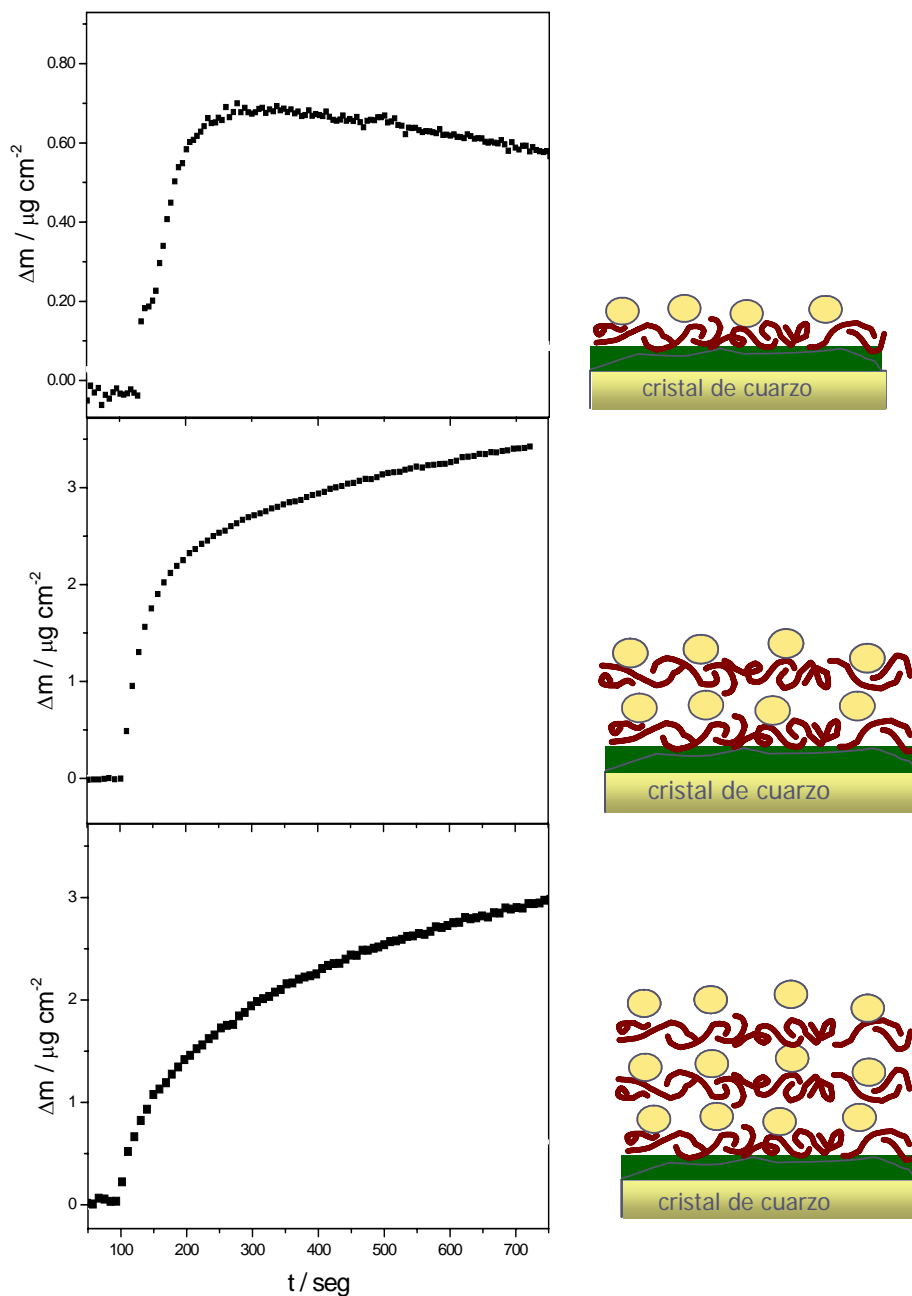


Figura 13

Cinética de adsorción de GOx sobre Au/SPAN/ PAH-OS

La cinética de adsorción de la enzima sigue una ley de doble exponencial [8]. En un trabajo previo [9] se ha demostrado que la mayor parte de la adsorción de la enzima corresponde a una rápida dependencia exponencial simple seguida por una segunda constante mucho menor. Los datos obtenidos en este trabajo siguen este comportamiento también.

En la figura 14 se muestran las cinéticas de adsorción de las tres primeras capas de enzima sobre una película de polianilina polimerizada (PANI(PSS)). No hay gran diferencia entre la cantidad de enzima adsorbida en la primera capa con respecto al resto de las capas como en el caso de SPAN. Esto puede deberse a que la superficie y la densidad de carga de PANI(PSS) sea diferente a la de SPAN.

En estudios previos del laboratorio se ha demostrado que la cinética de adsorción y la cantidad de enzima absorbida dependen fuertemente de la elección de las condiciones experimentales, de la pureza de la enzima, de la concentración y del pH de la solución. Por ejemplo, para lograr una buena eficiencia de adsorción durante el autoensamblado es necesario adsorber la enzima desde soluciones de pH mayores al punto isoelectrónico de la misma (pH 4,5) ya que será en este caso donde la enzima lleva una carga neta negativa sobre su superficie.

Las primeras capas no muestran un aumento constante de la masa, pero luego el crecimiento parece ser lineal. Si bien la cantidad de enzima incrementa a medida que se van formando las multicapas, solamente una pequeña fracción de la enzima autoensamblada se encontrará "eléctricamente cableadas" por el polímero en la estructura química integrada.

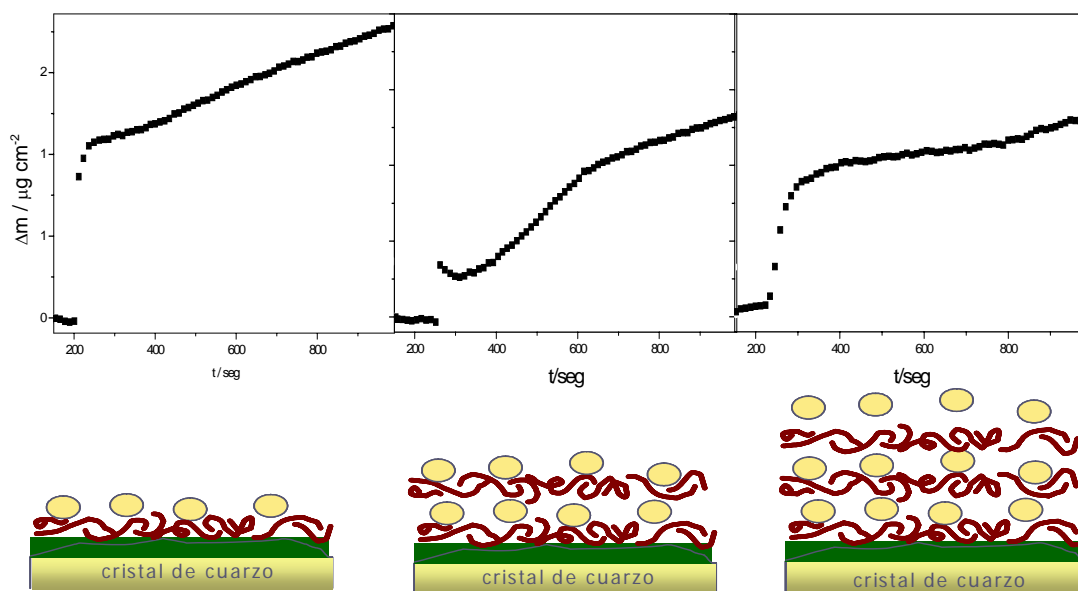


Figura 14

Cinéticas de adsorción de GOx sobre Au/PANI(PSS)/ PAH-Os

5.3.3.- Evidencia de la comunicación eléctrica entre PAH-Os en el autoensamblado (PAH-Os/GOx) y polianilinas.

Empleando voltametría cíclica podemos explorar los procesos redox acoplados a dos especies electroquímicamente activas adsorbidas sobre un electrodo: La película autoensamblada de PAH-Os/GOx y la película de polianilina. Esto ocurrirá solo si hay comunicación eléctrica entre las dos especies que permita el pasaje de electrones entre ellas y hacia el electrodo.

En nuestro caso hemos observado la comunicación eléctrica entre un electrodo de oro cubierto con polianilina y luego de autoensamblar electrostáticamente PAH-Os y enzima GOx podemos detectar la respuesta electroquímica de los grupos Os(II)/Os(III) presentes.

Esto puede verse claramente en la figura 15 que muestra la respuesta voltamétrica de polianilina polimerizada en presencia de PSS [PANI(PSS)] (figura 15 a) y luego de exponer la película al autoensamblado electrostático de 8 capas de PAH-Os/GOx: PANI(PSS)(PAH-Os)₈/(GOx)₇ (figura 15 b).

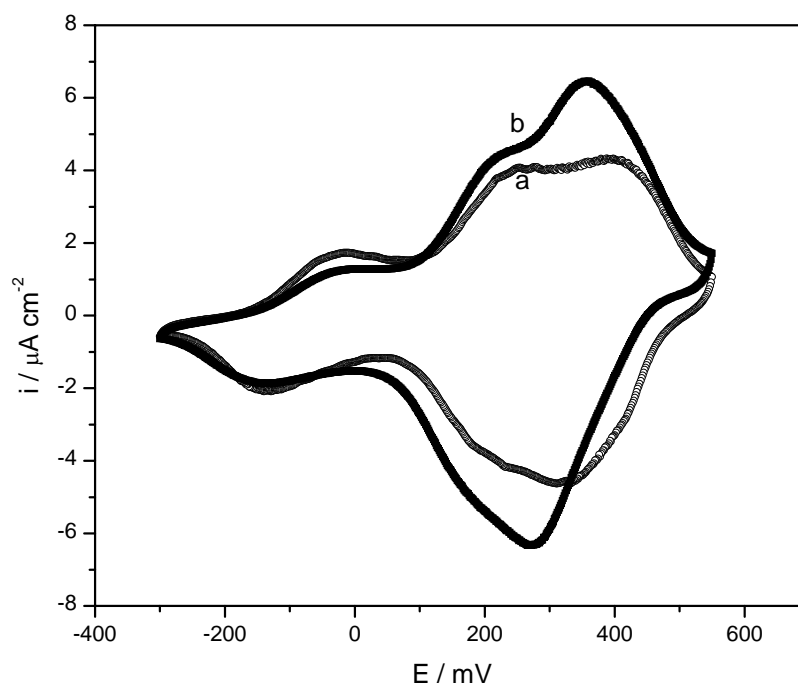


Figura 15

a) Voltametría cíclica de PANI(PSS) sobre un electrodo de oro a pH 5 (buffer ácido cítrico - fosfato ácido de sodio). b) Voltametría cíclica de PANI(PSS)/(PAH-Os)₈(GOx)₈ en la misma solución a 20 mV/seg.

En la figura 15 (a) Se observa la posición característica de los potenciales de pico correspondientes a los dos procesos de PANI(PSS) a pH 5. El primer proceso redox corresponde a la oxidación de la forma leucoemeraldina a la forma esmeraldina al pH de trabajo, este cambio redox ocurre alrededor de -50 mV. El segundo proceso redox corresponde a la oxidación de la forma esmeraldina a pernigranilina, el estado más oxidado del polímero y ocurre a 250 mV. En la figura 15 (b) aparece un pico extra en la zona de 300 mV y esta asociado al proceso de oxidación de la especie Os(II) a Os(III) presentes en la película autoensamblada. Este resultado permite afirmar que existe comunicación eléctrica entre la película de polímero conductor y la cupla redox Os (II)/Os (III) en la película de reconocimiento. Además, este resultado es muy importante a la hora de hacer funcionar el transistor porque revela que es posible la comunicación eléctrica entre estas películas de naturaleza tan distinta, pero esencial a la hora de medir la corriente de drenaje provocada por la adición de glucosa a través de la inyección de carga eléctrico desde el Os(II) a la PANI.

5.3.4.- Medidas de resistencia de películas de SPAN y SPAN/ PAH-Os/GOx.

El hecho de que la voltametría cíclica de polianilina muestre que dos microelectrodos se mantienen conectados aún a elevadas velocidades de barrido, muestra que el polímero conductor posee una alta conductividad. Wrigthon et. Al [5] realizaron medidas de corriente vs. potencial en estado estacionario para demostrar que la carga puede ser transportada directamente desde una microbanda a la otra (conectadas entre sí a través del polímero) y determinaron la resistencia del polímero en función del potencial aplicado al polímero respecto del electrolito. La medición fue descrita en el capítulo 2 (sección 2.5.2.2.) Brevemente, se muestra en la figura 16 un esquema simplificado del procedimiento.

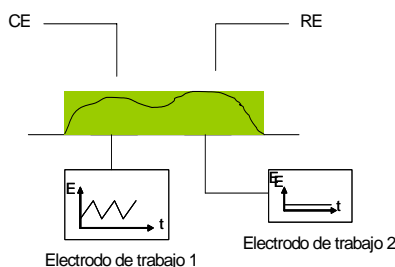


Figura 16

Representación grafica de la manera de medir la resistencia de PANI(PSS) o SPAN. Utilizando un bipotenciostato, el electrodo de trabajo 2 se conecta a una de las microbandas y se le aplica un potencial fijo, el electrodo de trabajo 2 conectado a la segunda microbanda se cicla ± 20 mV alrededor del potencial del electrodo de trabajo 2. Luego se grafica la i que circula vs el potencial y de la pendiente se obtiene el valor de resistencia

La figura 17 muestra los resultados obtenidos para una película de PANI(PSS) crecida en medio ácido (H_2SO_4) y en una solución buffer pH 5 (ácido cítrico - fosfato de sodio), respectivamente. En el caso de PANI(PSS) en medio ácido se alcanza el máximo de conductancia a 450 mV ($0.0075 \Omega^{-1}$ ó 135Ω); mientras que las medidas realizadas para la misma película pero en buffer pH 5 el máximo de conducción se obtiene a 230 mV ($0.0012 \Omega^{-1}$ ó 835Ω). Notese que la película de polianilina pierde conductividad a pH 5, a pesar del dopado con PSS.

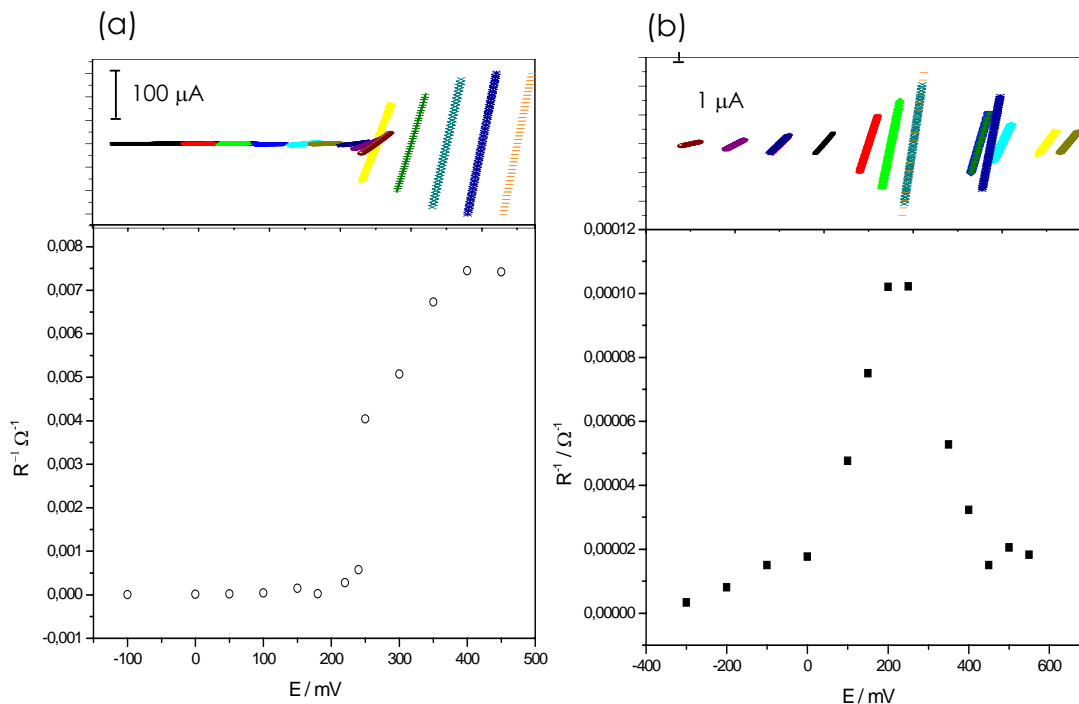


Figura 17

Corriente vs potencial en función del potencial aplicado (arriba) y conductancia en función del potencial aplicado (abajo) para (a) PANI(PSS) en medio ácido (H_2SO_4 2 M) y (b) PANI(PSS) en una solución buffer pH 5 (ácido cítrico fosfato ácido de sodio).

Por otro lado, en la figura 18 se muestran resultados representativos de conductancia ($1/R$) en función del potencial para un par de microbandas cubiertas con SPAN en la solución de pH 5. Puede verse que la conductancia de la película se hace cada vez mayor a medida que aumenta el potencial pero luego de un valor máximo comienza a disminuir. Esto está de acuerdo con el hecho de que la polianilina es aislante en los estados completamente reducidos y oxidados, y que es conductora en el estado de óxido/reducción intermedio. El valor de máxima conductancia alcanzada en este caso es de $6 \times 10^{-4} \Omega^{-1}$ (1660Ω), con un mínimo de resistencia algo mayor que para PANI dopada con PSS.

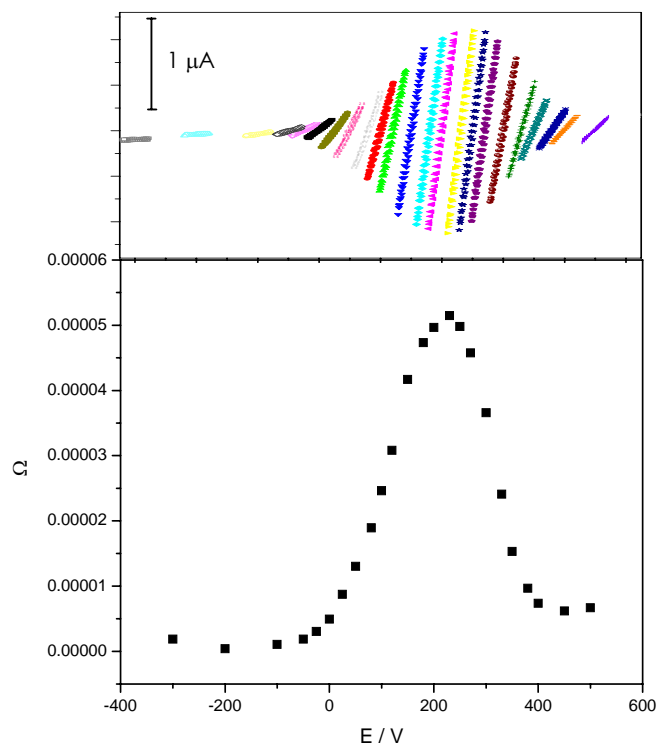


Figura18

Corriente vs potencial en función de V_G (arriba) y conductancia en función del potencial V_G (abajo) para SPAN en una solución buffer pH 5 (ácido cítrico-fosfato ácido de sodio)

También se realizaron medidas de resistencia de SPAN sobre un par de microbandas antes y luego de modificarlas con una película autoensamblada de PAH-Os/GOx. En la figura 19 se muestra conjuntamente la conductancia en función del potencial para una película de SPAN y para la misma película luego de modificarla por autoensamblado electrostático de PAH-Os/GOx. Hay varios hechos importantes para destacar: En primer lugar vemos que las curvas se corresponden en forma, sin corrimiento del potencial del máximo de conductancia luego de autoensamblar la película de reconocimiento sobre SPAN desde una solución a pH 8. O sea, el cambio de conductividad de la película de SPAN antes y después de ser modificada ocurre al mismo potencial indicando que ambas películas poliméricas se equilibraron con los protones del electrolito.

Sin embargo se observa una disminución en el valor final de conductancia obtenido. La resistencia del máximo es de 19 k Ω antes y 110 k Ω después del depósito de PAH-Os/GOx. Esto puede deberse a que la exposición prolongada de la película de SPAN en las soluciones acuosas de PAH-Os (pH 8) y de GOx (pH 5) para llevar a cabo el autoensamblado produce algún tipo de degradación en el polímero conductor.

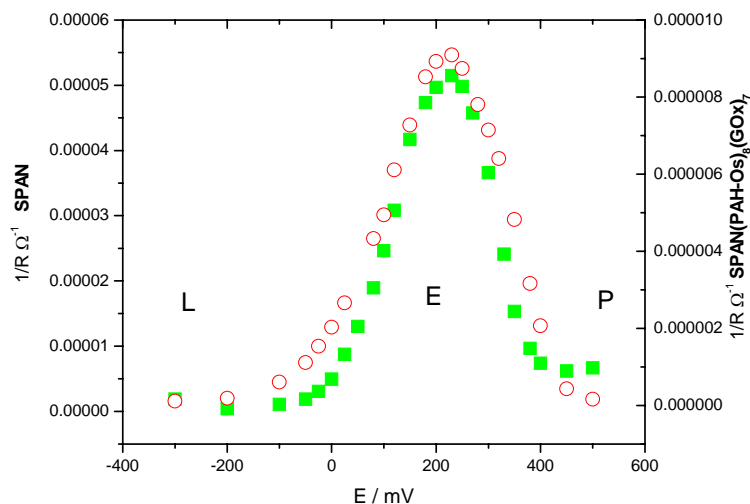


Figura 19

Conductancia en función del potencial para SPAN (○) y para SPAN(PAH-Os)₈(GOx)₇ (■) en una solución buffer pH 5 (ácido cítrico - fosfato ácido de sodio). L, E y P representan los estados leucoemeraldina, emeraldina y pernigranilina respectivamente.

Esta degradación no está asociada con una pérdida de protones de PANI causada por el equilibrio ácido base de la polialilamina ya que el potencial de cambio de conducción de SPAN es el mismo antes y después de autoensamblar y, como es sabido, el potencial al cual PANI cambia de estado a aislante a conductor depende del pH.

En la figura 20 se muestra una curva de conductancia en función del potencial para una película de SPAN a pH 5 y a pH 7.

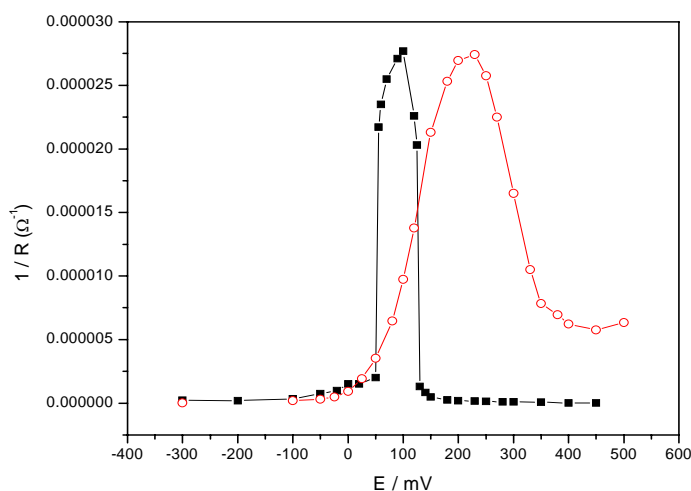


Figura 20

Conductancia en función del potencial para SPAN a pH 5 (○) y pH 7 (■)

Como ya es conocido para PANI, se observa que el potencial al cual la película cambia la conductividad se corre hacia valores más negativos y el pico se hace mas angosto. Por otro lado también se observa que la curva a pH es mas estrecha a medida que incrementa el pH lo cual esta de acuerdo con la bibliografía [11].

5.4.- Funcionamiento del sistema químico integrado.

En las secciones anteriores se ha mostrado el proceso de construcción y los ensayos de caracterización del dispositivo de llave molecular o transistor enzimático que responda a glucosa. A continuación se muestran algunas evidencias electroquímicas de la respuesta del sistema químico integrado y luego ilustrara el funcionamiento del dispositivo como tal.

5.4.1.- Medidas de potencial a circuito abierto.

Para comprobar el funcionamiento del sistema químico integrado se decidió seguir el potencial a circuito abierto de una película de SPAN autoensamblada electrostáticamente con PAH-Os/ GOx (detalle experimental en seccion 2.5.4.) En la figura 20 se muestra la curva de potencial a circuito abierto para una película de PANI(PSS)/(PAH-Os)₈(GOX)₇. La medición de potencial en función del tiempo comienza inmediatamente después de oxidar a la película (550 mV). En un principio el potencial del electrodo comienza a caer lentamente hasta un potencial estacionario 350 mV durante aproximadamente 500 seg. Una vez alcanzado este potencial estacionario se agregó a la solución una alícuota de Glucosa 1 M (la concentración final alcanzada fue de 20 mM: concentración de saturación) Inmediatamente producida la adición del sustrato el potencial cae rápidamente, esto corresponde a que la cadena de reacciones disparada por la glucosa que lleva a PANI-PSS desde el estado aislante oxidado al estado de oxidación intermedio donde es conductora.

Como ya se menciona, antes de realizar el agregado de glucosa el potencial cae desde el potencial de oxidación 550 mV hasta un potencial estacionario de 350 mV. Suponemos que esto se debe a una redistribución de carga en la película de PANI-PSS ya que durante la oxidación quedarían zonas externas de la película sin oxidar. La película tiene zonas con distintos potenciales; seguramente la composición de la región más cercana al electrodo esta ajustada al potencial aplicado de 550 mV. La región más cercana a la solución estará mas reducida dado que la oxidación se

hace cada vez mas lenta por limitaciones de transporte donde la PANI-PSS es mas estable en el estado esmeraldina, alrededor de 100 mV.

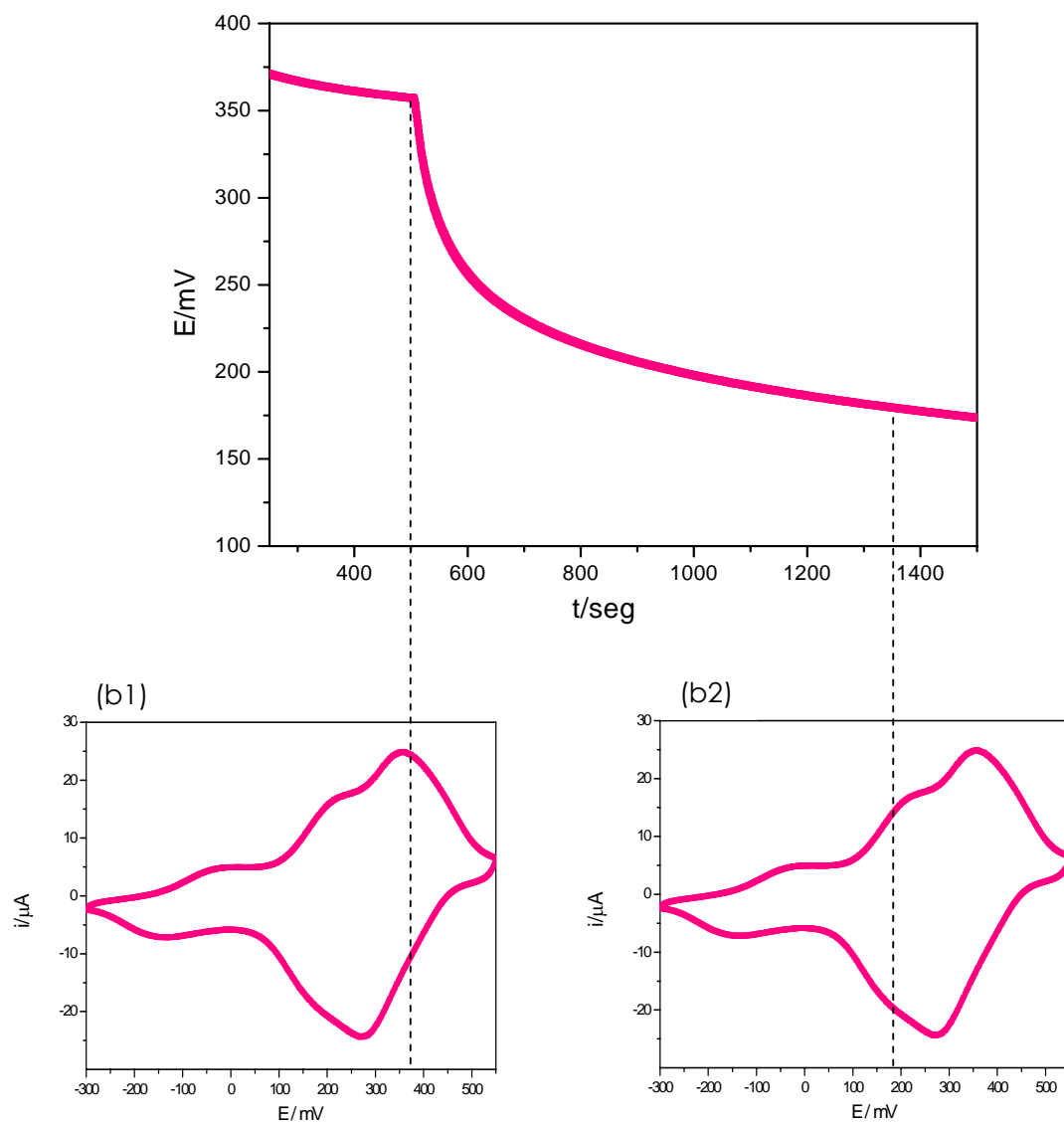


Figura 21

(a) Medición de potencial del electrodo a circuito abierto de una película de PANI(PSS) $(PAH-OS)_8(GOX)_7$ después de ser oxidada 550 mV(PANI-PSS aislante). Agregado de Glucosa a 500 seg. Los gráficos inferiores (b1 y b2) se muestran a modo de señalar el estado redox en el que se encuentra la película de PANI-PSS durante la caída de potencial .b1) Voltametría cíclica mostrando que a 350 mV (momento de realizar el agregado de glucosa) PANI-PSS se encuentra en un estado aislante. b2) Voltametría cíclica mostrando el valor de potencial (150 mV) al cual decae finalmente el dispositivo; señalando que PANI-PSS esta en su estado conductor.

Cuando deja de aplicarse un potencial externamente a la película ambas zonas se equilibran a un estado redox intermedio entre las zonas interna y externa con evolución del potencial de 350 mV que responde a la nueva composición sobre el electrodo, como se ilustra esquemática en el la figura 22.

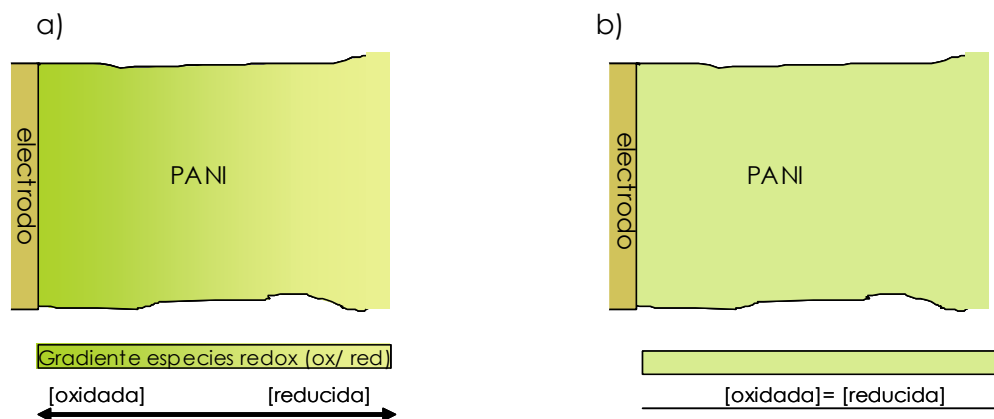


Figura 22

Potencial de una película de PAN-PSSI depositada sobre el electrodo. a) Gradiente de concentración de especies redox después de oxidar potenciales a 550 mV una película de PANI-PSS en buffer pH 5. El gradiente va desde una zona mas oxidada en la cercanía al electrodo hacia una zona mas reducida más hacia la solución. b) Potencial estacionario alcanzado para la película de PANI-PSS.

El tiempo en que se alcanza el potencial de equilibrio depende del espesor de la película, cuanto más gruesa la película será más difícil de oxidar y luego demora más tiempo en alcanzar el potencial estacionario [12]. El valor final de potencial también dependerá de las cantidades relativas de ambas formas de PANI que deben equilibrarse llegando a una composición homogénea.

Luego del agregado de glucosa el tiempo que tarda el potencial del electrodo en evolucionar hasta el estado PANI-PSS conductor es de aproximadamente 15 minutos (1000 segundos). Este tiempo es excesivamente largo si se compara con 20-40 segundos observados con transistores que utilizan mediadores solubles (figura 3, Cap. 1).

En el capítulo 6, analizaremos la lenta conmutación entre estados redox de PANI a problemas de comunicación en la interfase entre la película de reconocimiento y la película de conmutación (PANI), mas precisamente entre los grupos redox de PAH-Os y PANI en la superficie, a la propagación de carga dentro de PANI y a la inyección de carga por la reacción catalítica enzimática en si misma.

5.4.2.- Mediciones de corriente catalítica a distintas concentraciones de glucosa para el sistema integrado.

La figura 23 muestra la respuesta catalítica en función de la concentración de glucosa para un electrodo de Au/(PAH-Os)₄(GOx)₃ preparado en condiciones similares a la película de reconocimiento molecular del experimento descrito en la Fig. 20. Se aprecia que sigue una dependencia de Michaelis-Menten:

$$i_{cat} = \frac{2FK_{cat}\Gamma_{enz}}{1 + \frac{K_{cat}}{K} + \frac{K_s}{[S]}} \quad (1)$$

La ecuación 1 es válida para películas delgadas donde la difusión es rápida. A partir del ajuste de los datos experimentales con esta ecuación, se obtienen valores de los parámetros cinéticos: Γ_{enz} concentración superficial de "enzima cableada", es decir conectada eléctricamente y $k[Os(III)]$ el coeficiente cinético de pseudo primer orden que da una idea de la cinética de reoxidación de la enzima y el mediador redox (PAH-Os/Gox), o sea de la eficiencia del "cableado molecular".

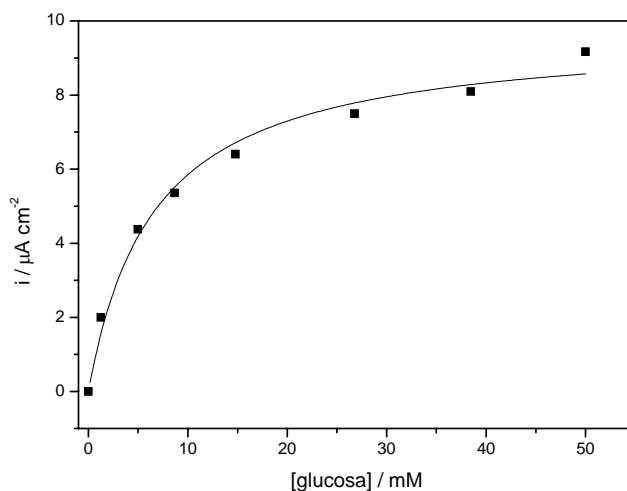


Figura 23

Dependencia de la corriente catalítica con la concentración de glucosa a 450 mV sobre un electrodo de Au/(PAH-Os)₄(GOx)₃ autoensamblado a partir de PAH-Os de pH 8.2 en buffer TRIS de pH 7.4 y 0.2 M de fuerza iónica

La carga redox integrada en una voltametría cíclica en ausencia de glucosa es 98 μC cm⁻² y el espesor de la película de PAH-O/Gox 195 nm (concentración de Os 52

mM). A partir de los valores obtenidos en el ajuste de datos son $k[\text{Os}] = 59 \text{ s}^{-1}$ ($k = 1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y $\Gamma_{\text{enz}} = 1.8 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ [13]

Otro experimento realizado sobre un electrodo de Au consintió en la medición de la corriente catalítica generada al agregar glucosa en dos tipos de películas:

- a) Au/SPAN/(PAH-Os)₆/(GOx)₅
- b) Au/(PAH-Os)₆/(GOx)₅

Las mediciones catalíticas se realizaron aplicando un potencial fijo de 400 mV a la película (capítulo 2). El potencial de trabajo elegido es una situación de compromiso entre el potencial en el cual PANI posee su máximo estado de conducción (250 mV) y el potencial en el cual todos los centros Os del polímero PAH-Os se encuentran es estado oxidado (500 mV). La respuesta de la corriente catalítica de una electrodo de Au/SPAN/(PAH-Os)₆/(GOx)₅ es cualitativamente similar a la que se muestra en la figura 23, pero con un polímero de menor carga redox. Los valores de densidad de corriente dependen de la concentración superficial de glucosa, de la carga redox en el polímero de osmio, de la eficiencia del "cableado molecular", el potencial aplicado y la concentración de glucosa. En este caso se obtuvieron menores densidades de corriente catalítica.

En la tabla 1 se comparan los parámetros cinéticos para Au/SPAN/(PAH-Os)₆/(GOx)₅ y Au/(PAH-Os)₆/(GOx)₅ (sistema autoensamblado sin SPAN). Estos resultados revelan que la reacción catalítica enzimática no parece tener limitaciones y que puede producirse a través de la película de SPAN a 400 mV.

	$\Gamma_{\text{enz.}}$	K[Os(III)]
Sistema SPAN/(PAH-Os) ₆ /(GOx) ₅	8.41×10^{-14}	99,94
Sistema Au/(PAH-Os) ₆ /(GOx) ₅	8.37×10^{-14}	141,7

Tabla 1

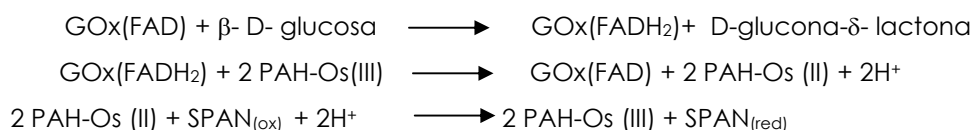
Comparación de parámetros cinéticos obtenidos durante la catálisis de glucosa para un sistema completamente integrado (SPAN/(PAH-Os)₆/(GOx)₅) y para un sistema convencional estudiado en el laboratorio (Au/(PAH-Os)₆/(GOx)₅)

Debe tenerse en cuenta que en el presente experimento se fija el potencial del electrodo, por lo que la composición y la conductividad de la PANI no varía durante el experimento. En tales condiciones la oxidación de glucosa resulta en la inyección de carga en el Au a través de la reacción enzimática, la generación de Os(II) y la oxidación de éste en la película de PANI. Tanto la oxidación/reducción de PANI como

la reacción del mediador Os(III) con GOx involucra el intercambio de protones (ver ecuaciones en la próxima sección).

5.4.3.- Medida de corriente de drenaje del sistema integrado.

En esta sección se mostrará el funcionamiento del sistema integrado sobre el arreglo de microbandas, midiendo la corriente generada al agregar glucosa al sistema SPAN/(PAH-Os)₄(GOx)₃ como se detalló en el capítulo 2. La película de SPAN en el dispositivo se oxida a 550 mV donde es aislante, luego se realiza la medida de corriente de drenaje I_{drenaje} en función del tiempo. En la figura 24 se muestra la respuesta de corriente obtenida tras el agregado de glucosa y la evolución del potencial del electrodo respecto del electrodo de referencia en solución. Se observa que al principio no circula corriente a través de las microbandas (en el punto 1 la resistencia entre microbandas es de 1 MΩ), esto se debe a que SPAN se encuentra en su estado oxidado aislante. Luego de agregar glucosa la corriente aumenta lentamente debido a la conversión de SPAN de aislante a conductora (en el punto 2 la resistencia entre microbandas es 290 kΩ). Este cambio se produce por la reacción enzimática (GOx):



En el punto indicado con 3 se alcanza el valor $i_{\text{max}}/2$ y la resistencia entre microbandas es de 12 kΩ. La SPAN cambia de su estado oxidado aislante a un estado de oxidación intermedio (emeraldina sal) conductora. El aumento de corriente se debe a la mayor proporción de SPAN conductora en la película.

Podemos demostrar que la corriente aumenta debido a la conversión de SPAN siguiendo simultáneamente la evolución del potencial del electrodo como se muestra en la figura 24. Al comienzo la corriente es muy baja y el potencial indica que la SPAN se encuentra en su estado aislante pernigranilina (véase figura 21). Luego del agregado de glucosa el potencial decae lentamente y la película de SPAN comienza a convertirse en conductora. Al alcanzar el punto de inflexión indicado por el punto 3 en la Figura 24, el potencial alcanza 250 mV donde predomina el Os(II) en la película de reconocimiento y emeraldina en la película de conmutación de SPAN.

La corriente sigue aumentando hasta alcanzar un máximo (punto 4), en este punto el potencial corresponde al estado conductor de SPAN ($\cong 175$ mV), consistente con las mediciones de conductividad (sección 5.3.4). A partir de este punto la

corriente de drenaje entre microbandas comienza a disminuir ya que el Os(II) continúa reduciendo la SPAN y se alcanza el estado aislador de leucoemeraldina.

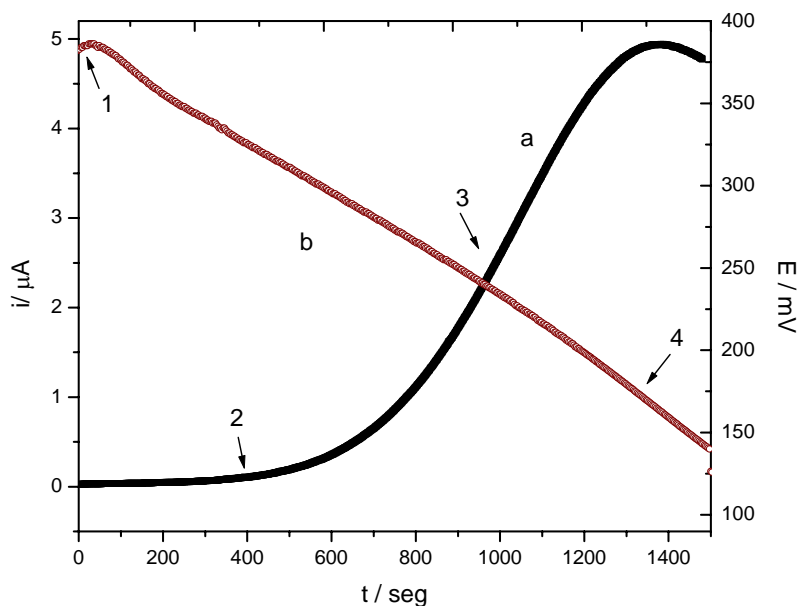


Figura 24

Corriente de drenaje de un microtransistor de SPAN/(PAH-Os)₄(GOx)₃ frente al agregado de glucosa a una concentración final de 40 mM (a); evolución del potencial del electrodo respecto del electrodo de referencia en el electrolito simultáneo a la conmutación de la llave molecular. Potencial aplicado entre los contactos 30 mV.

El hecho de que se vea un máximo de corriente se debe a la baja resistencia de las microbandas de oro ya que las respuestas de transistores con mediador soluble reportados por Bartlett llegan a un *plateau* sin pasar por un máximo debido a que la resistencia de contacto entre PANI y las microbandas de carbono en ese caso es mas alta, 2,2 KΩ, y limita la conductividad y el valor de corriente máximo del dispositivo.

La evidencia presentada en la figura 23 también demuestra que es el cambio de conductividad en SPAN y no cambios locales de pH, lo que producen la conmutación del transistor.

5.4.4.- Velocidad de respuesta y estabilidad del transistor.

Una vez demostrado que el transistor electroquímico integrado funciona de acuerdo a los mecanismos esperados en base a su diseño, pasaremos a analizar dos aspectos importantes: la velocidad de respuesta y la reproducibilidad relacionada a la estabilidad del sistema.

De la comparación del sistema desarrollado en este trabajo con transistores electroquímicos enzimáticos que emplean mediador redox soluble surge que el sistema integrado es entre 25 y 50 veces mas lento con tiempos de respuesta media ($t_{1/2}$) del orden de 1000 segundos (Figuras 21 y 24) frente a 20-40 segundos (figura 3, Cap. 1).

A partir de esto podemos inferir que una de las posibles causas respecto al tiempo de respuesta del transistor puede deberse a que el mediador inmovilizado reacciona de una manera más lenta con los demás componentes debido a su reducida movilidad.

Otro inconveniente que surge de la operación repetitiva del transistor electroquímico integrado es la pérdida de carga redox en la película de conmutación de polianilina. Además, en el estado conductor la resistencia entre los contactos (microbandas) aumenta (disminuyendo la corriente de drenaje) en sucesivos experimentos con un mismo dispositivo.

Sin embargo, si el dispositivo se pone en contacto con una solución ácida, se reactiva obteniéndose la carga redox inicial. Esta evidencia indica que el proceso de degradación tiene lugar como consecuencia de la pérdida de protones en la película de conmutación de PANI(PSS) o SPAN.

Desgraciadamente, el tratamiento ácido también destruye la película enzimática por lo que el dispositivo integrado con biomoléculas y mediador redox no puede ser reactivado por este tratamiento ácido.

5.5. Conclusiones.

En este capítulo se ha demostrado que es posible construir un dispositivo molecular completamente integrado que responde a glucosa. Se mostraron los detalles de fabricación y caracterización de los mismos, lo cual contribuye a la optimización de su funcionamiento. Se demostró que el sistema responde a los mecanismos en los que se basa su diseño. La respuesta del dispositivo a glucosa es muy lenta con respecto a similares dispositivos que utilizan mediador soluble.

La operación repetitiva del transistor resulta en una degradación de la capacidad redox de la capa de conmutación (PANI) que sin embargo puede reactivarse por reprotonación en solución ácida. Esta reactivación es incompatible con la película de reconocimiento molecular (PAH-Os/GOx).

5.6. Referencias.

- [1] H.S. White, G.P. Kittlesen, M.S. Wrigthon, *J.Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 5375
- [2] S.M. Sze, *Physics of Semiconductor Devices*, 2nd ed. J. Willey and Sons, New York, **1981**.
- [3] B. Piel, P. K. Wrona, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, 388, 69.
- [4] E. Tracy Turner Jones, O.M. Chyan, M.S. Wrigthon, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 5526.
- [5] J.W. Thackeray, H. S. White, M. S. Wrigthon. *J.Phys. Chem.* **1985**, 89, 5133
- [6] J. Hodak, R. Etchenique, E.J. Calvo, K. Singhal, P.N. Bartlett, *Langmuir*, **1997**, 13, 2716.
- [7] E.J. Calvo, R. Etchenique, L. Pietrasanta, A. Wolosiuk, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 1161.
- [8] G. Z. Sauerbrey, *Phys.*, **1959**, 155, 206.
- [9] D.H. Purvis, D. Pollard-Knight, P.A. Lowe, *Chemical Biosensors*, Ed. E. Ramsay, John Willey and Sons, INC, New York, **1998**.
- [10] E.J. Calvo, R. Etchenique, L. Pietrasanta, A. Wolosiuk, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 1161.
- [11] P.M. McManus, R. J. Cushman, S. Cheng Yang. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 774
- [12] Peter Birkin, *Tesis Doctoral*, University of Southampton, **1994**.
- [13] V. Flexer, E. Forzani, E.J. Calvo, S. Ludueña, L. Pietrasanta, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 3.99-407
- [14] P.N. Bartlett. J. H. Wang., *J. Chem. Soc., Faraday Discussion*, **1994**, 66, 9.

6.1.- Discusión.

En el capítulo 3 se estudió la optimización de la electroactividad de PANI en soluciones de pH 5 y 7 por autodopado de la polianilina mediante el método de la sulfonación controlada electroquímicamente (SPAN), en el capítulo 4 se estudió la dinámica de un sistema modelo de capa de reconocimiento (PAH-Os/PSS) y en el capítulo 5 se describieron resultados de la combinación de estos sistemas para construir un dispositivo de reconocimiento molecular integrado. A continuación se revisarán las ventajas y desventajas de la integración de los dos sistemas SPAN y PAH-Os /GOx.

6.1.1.- Integración de los componentes para la construcción de un transistor molecular.

En el capítulo 5 se describieron los resultados relacionados a la fabricación, caracterización y funcionamiento de un transistor molecular con todos sus componentes inmovilizados en la superficie. Se observó que posee un tiempo de respuesta más lento que transistores similares que utilizan mediadores redox solubles y menor estabilidad en el tiempo. La velocidad de la reacción de conmutación del transistor, está determinada por tres procesos:

- a) La propagación de la carga dentro de SPAN (capa de conmutación),
- b) La velocidad de la reacción interfacial entre Os (II) y SPAN (ox),
- c) El flujo que es capaz de inyectar glucosa por la reacción catalítica del sistema autoensamblado (PAH-Os)/(GOx) - capa de reconocimiento molecular.

A continuación se discutirán cada uno de estos procesos.

6.1.1.1.- Propagación de la carga dentro de la película de SPAN.

Un factor importante a considerar como limitante de la velocidad del transistor es la propagación de la carga dentro de la película PANI(PSS) o SPAN. En el sistema propuesto aquí, la capa de reconocimiento (sistema catalítico compuesto por el mediador redox y la enzima) reacciona con el sustrato y luego el mediador reducido es el que reacciona con SPAN(ox) cambiando su estado redox y con ello su conductividad. Esta reacción ocurre en la interfaz entre la película de reconocimiento

y SPAN. Luego, la carga debe propagarse dentro de SPAN. Si esta propagación es lenta se reflejará en una lenta respuesta en la corriente de drenaje del transistor.

La voltametría y los transitorios de corriente de oxidación de una película de SPAN permiten estimar la carga eléctrica y la escala de tiempo del proceso. La carga nos dará una medida de SPAN eléctricamente conectada con el electrodo en la escala de tiempo de los experimentos. Se analizarán los resultados sobre dos películas de diferentes espesores: en un caso, el polímero fue depositado sobre dos de las microbandas, con una carga de polimerización de $100 \mu\text{C}$ y el espesor de perfilometría de $60 \mu\text{m}$ (película delgada); en un segundo caso, se tiene una película crecida sobre las cuatro microbandas con una carga de polimerización de $760 \mu\text{C}$ y un espesor perfilométrico de $160 \mu\text{m}$ (película gruesa). En la figura 1 se muestran los transitorios de oxidación de ambas películas junto con los transitorios de carga obtenidos por la integración de la corriente.

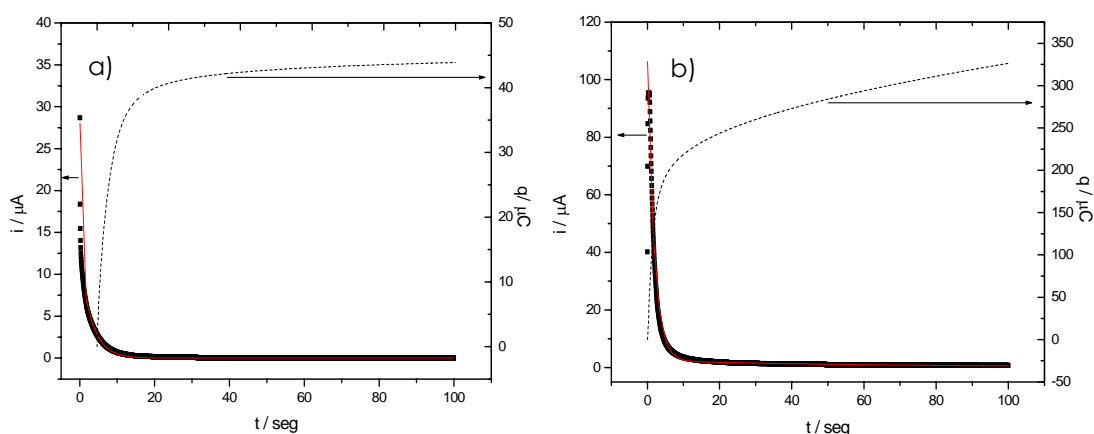


Figura 1

Los puntos representan los transitorios de corriente durante la oxidación a 550 mV de películas de SPAN en buffer pH 5, las líneas sobre los puntos son el mejor ajuste de los mismos utilizando la ecuación 1 (ver texto más abajo) y las líneas punteadas representan la carga para: a) película delgada de $60 \mu\text{C}$ y b) película gruesa de $760 \mu\text{C}$. Las cargas son calculadas según voltametría cíclica en H_2SO_4 2 M.

La carga total de oxidación de las películas es $40 \mu\text{C}$ y $350 \mu\text{C}$, respectivamente. Estas cargas son mucho menores que aquellas correspondientes a la carga inicial depositada a pH 0. Esto se debe fundamentalmente a la pérdida de electroactividad de las películas de SPAN al cambiarlas de pH 0 a 5.

Tratándose de polímeros conductores como PANI podemos utilizar el modelo de Feldberg [1] que considera al polímero conductor como un electrodo poroso con

capacidad compuesta por una capacidad de la doble capa eléctrica en la interfase película/ solución y una pseudocapacidad debida al almacenamiento de carga en la cupla redox inmovilizada en el polímero (SPAN_{ox}/ SPAN_{red}). De acuerdo a esto podemos ajustar los transitorios de corriente de oxidación de SPAN al estado aislante a pH 5 y desde potencial de circuito abierto de 550 mV con una funcion biexponencial de la forma:

$$i = \frac{E_1}{R} e^{-t/RC_1} + \frac{E_2}{R} e^{-t/RC_2} \quad (1)$$

donde el primer término corresponde a la capacidad de la doble capa eléctrica y el segundo término, a la capacidad redox de la película, siendo E_1/R la corriente máxima del primer proceso capacitivo y E_2/R la corriente máxima del segundo proceso, C_1 y C_2 son las capacidades de la doble capa y la capacidad redox de la película respectivamente. Los valores de tiempo de relajación (RC) obtenidos son $RC_1 = 0,07$ seg. y $RC_2 = 3,17$ seg. para la película delgada y $RC_1 = 1,90$ seg y $RC_2 = 68,45$ seg para la película gruesa o sea los procesos de oxidación-reducción completa de la película son rápidos con tiempos característicos de oxidación-reducción de la película mucho menores que los tiempos de conmutación de un transistor de SPAN/ PAH-Os/GOx.

El cambio de conductividad de la película de SPAN del estado aislador a conductor es más rápido que el cambio inverso. En el primer caso el cambio de conductividad de SPAN ocurre por defectos mientras que en el segundo, la transición de conductor a aislador tiene lugar en toda la película conductora [2, 3].

En base a esto analizaremos la variación de la resistencia eléctrica de la película de SPAN entre las microbandas en función de la carga de reducción electroquímica inyectada en una voltametría cíclica a 20 mV/seg. En la figura 2 se muestra la respuesta de corriente de drenaje de microbandas cubiertas con SPAN y el sistema (PAH-Os)₄ (GOx)₃ ante el agregado de glucosa a una concentración final de 90 mM. También se ilustra simultáneamente el decaimiento de potencial respecto de un electrodo de referencia en solución, $E(t)$. A partir del potencial aplicado entre las microbandas (30 mV) y la corriente de drenaje entre ellas se calcula la resistencia eléctrica del transistor ($R(t) = 30 \text{ mV} / i_{\text{drenaje}}(t)$).

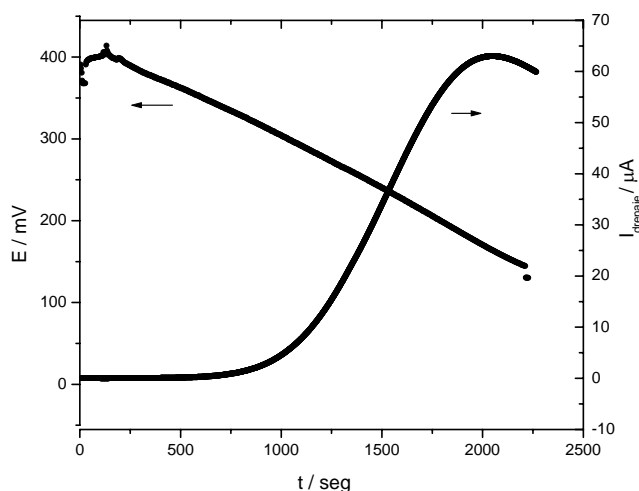


Figura 2

- a) Respuesta de transistor microelectroquímico enzimático ante el agregado de glucosa. Concentración final de glucosa: en solución buffer pH 5 ácido cítrico/ fosfato ácido de sodio. Potencial aplicado entre las microbandas de 30 mV. b) Cambio de potencial del electrodo durante el transitorio de corriente.

A partir del potencial a circuito abierto en cada instante $E(t)$, para el que se conoce la resistencia $R(t)$, se integra la carga de reducción de la voltametría cíclica; esto se observa en la figura 3, que representa la carga inyectada en una película de SPAN al llevarla del estado aislador (pernigranilina) al estado conductor (emeraldina sal). La figura 4 muestra el resultado: la resistencia del transistor no varía en forma lineal con la carga inyectada si no que lo hace abruptamente cuando se supera un umbral de carga (SPAN reducida). Nótese que una pequeña variación de carga en la zona de potenciales de 300-320 mV produce una variación de resistencia de mas de tres órdenes de magnitud (de 842.000 Ω a 500 Ω).

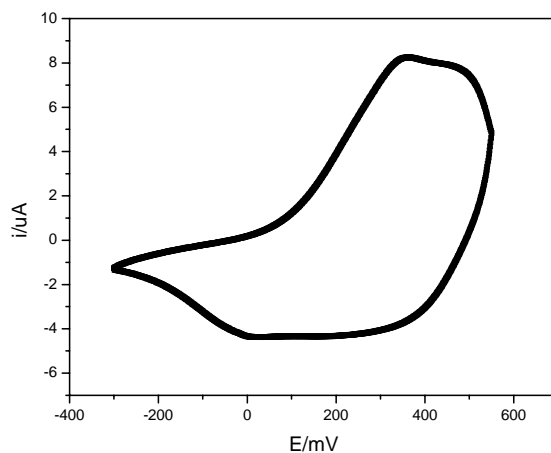


Figura 3

Voltametría cíclica de una película de SPAN en buffer pH 5 a 20 mV/seg depositada sobre microbandas. Carga de polimerización: 1 mC.

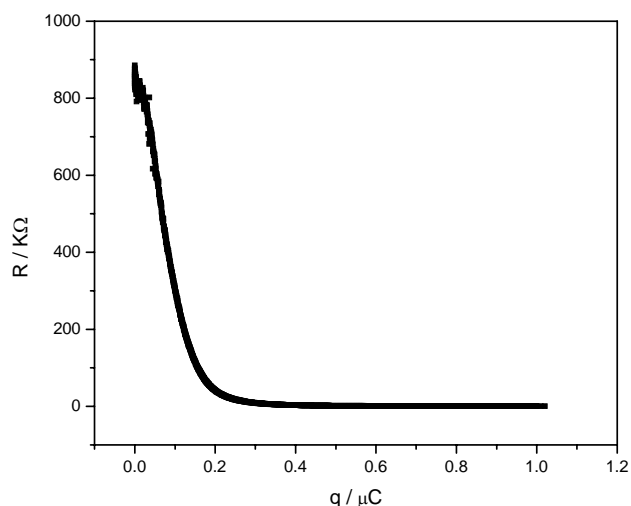


Figura 4

Resistencia del transistor vs carga inyectada por SPAN (calculada a partir de la voltametría cíclica a 20 mV/seg)

Los valores de resistencia determinados por el método descrito son similares en orden de magnitud a los determinados por la técnica indicada en el capítulo 5. En aquel caso se varió linealmente el potencial de ambas microbandas respecto a un electrodo de referencia en solución pero manteniendo una diferencia de 20-30 mV entre ellas; y se registró la corriente de drenaje. En este caso la corriente de drenaje era producida por el reconocimiento molecular de glucosa que lleva a un cambio en la resistencia del dispositivo.

Los valores de carga umbral dependen del espesor de la película de SPAN y de las dimensiones (ancho y largo) del depósito sobre las microbandas de oro. Sin embargo en todos los casos una pequeña variación de carga produce un abrupto cambio de resistencia, ideal para conmutar el dispositivo.

Podemos concluir de la discusión anterior que si bien la película de polianilina puede ser oxidada y reducida rápidamente, la inyección de la carga umbral para conmutar la llave molecular es muy lenta para el sistema PAH-Os/SPAN. En el experimento mostrando en la figura 2 se necesitan cerca de 1000 segundos para alcanzar la conmutación ilustrada en la figura 4 al alcanzar la carga umbral.

6.1.1.2.- Reacción interfacial [Os(II)/SPAN(ox)]. Influencia de distintos mediadores (mediador inmovilizado y mediador en solución).

Una de las principales diferencias del transistor estudiado en este trabajo de tesis con respecto a otros [4,5] es que el mediador se encuentra inmovilizado dentro de la película de reconocimiento y no se trata de una especie móvil en solución. Esta podría ser una de las causas de la respuesta más lenta del transistor integrado. En particular, el mediador inmovilizado podría reaccionar más lentamente con la capa de conmutación (PANI(PSS) o SPAN) debido a su movilidad más reducida. Para ello se realizaron una serie de experimentos usando mediadores con distinto coeficiente de difusión, polímero redox, etc ya sea inmovilizados o en solución.

En primer lugar se analizará la respuesta del sistema (PANI- enzima) usando como mediador el complejo $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}(\text{pyCOOH})^+$ en solución. La síntesis de este complejo fue previamente desarrollada en el laboratorio [6]. En la figura 5 se muestra un esquema de la estructura química del complejo. Una vez sintetizado fue caracterizado mediante técnicas electroquímicas y espectroscopía ultravioleta-visible. Dichos resultados se muestran en la figura 6. Mediante voltametría cíclica a diferentes velocidades de barrido se determinó el coeficiente de difusión del mismo ($1,25 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$).

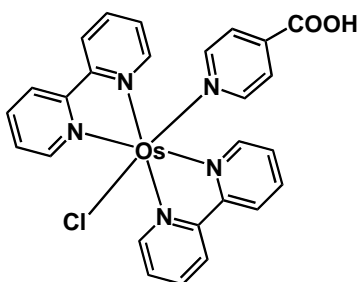


Figura 5

Esquema de la estructura química del complejo $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}(\text{pyCOOH})^+$

En la figura 6a) se muestra la voltametría cíclica 1.35 mM del complejo mencionado en solución buffer pH 7 a diferentes velocidades de barrido. El comportamiento electroquímico del complejo en solución (conversión de Os(II) a Os(III)) condice con lo esperado para una cupla reversible dando una separación de picos de 60 mV. El potencial de media onda se encuentra a 260 mV. El espectro

electrónico mostrado en la figura 6b) corresponde a un espectro característico de un complejo de osmio-piridina, mostrando picos anchos en la región entre 350 y 500 nm.

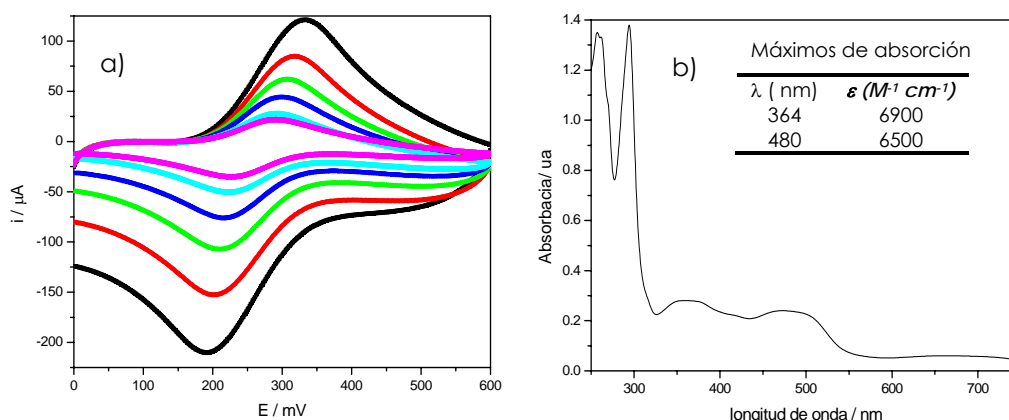


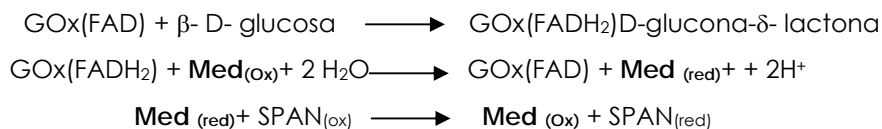
Figura 6

Caracterización del complejo $Os(bpy)_2Cl(pyCOOH)^+$ en buffer fosfato diácido de potasio/fosfato monoácido de potasio 10 mM, pH 7. a) Voltametría cíclica a velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 100, 500 mV/seg. b) Espectro electrónico ultravioleta-visible. Se muestran también los valores de los máximos de absorción característicos con los respectivos coeficientes de absortividad molar.

El osmio en este complejo se encuentra en la forma $Os(II)$, por ello es necesario oxidarlo previamente a $Os(III)$ a fin de tenerlo en este estado en los experimentos a realizar. Se realiza la oxidación química utilizando solución equimolar del complejo y de $Ce(SO_4)_2$ (4 mM en buffer fosfato pH 7) como oxidante. El complejo de osmio pasa de color marrón oscuro a amarillo, característico de los complejos en los estados (II) y (III), respectivamente. El Ce^{+3} formado precipita en medio neutro por lo cual no es una interferencia en la medición.

Se realizaron cronopotenciometrías midiendo el potencial a circuito abierto con agregado de glucosa a la solución (descritos en el capítulo 2) estando el electrodo de trabajo modificado con películas de SPAN autoensambladas con PAH-Os/ GOx, previamente oxidada a 550 mV, con el complejo de osmio(III) en solución.

En la figura 7 se muestran los resultados de las medidas de potencial a circuito abierto para el mediador inmovilizado y para el mediador en solución. En ambos electrodos al realizarse el agregado de glucosa, el potencial del electrodo disminuye como consecuencia de la reducción de SPAN mediante las siguientes reacciones:



donde Med es el mediador, que en la figura 7a) es el complejo de osmio unido covalentemente a polialilamina, integrado en la película autoensamblada y en la figura 7b) es el complejo de osmio en solución que difunde a la superficie de la película de SPAN. En ambos casos la fuerza impulsora del proceso es la misma ($E_{\text{med}} - E_{\text{SPAN}}$) para esas dadas condiciones de concentraciones.

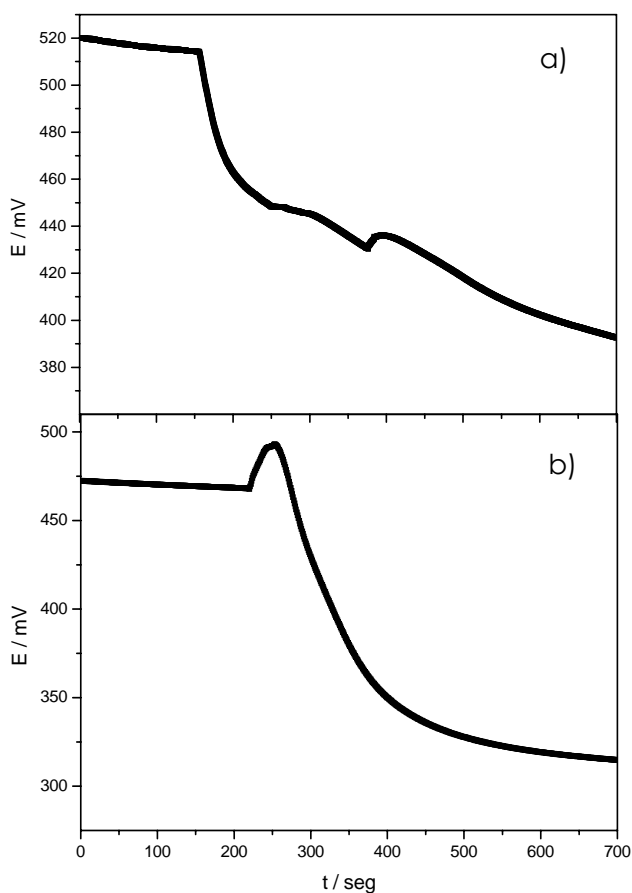
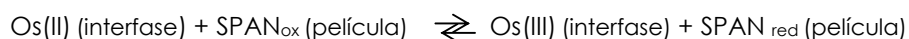


Figura 7

Cambio de potencial a circuito abierto frente al agregado de glucosa (concentración final 20 mM) en solución buffer fosfato pH 7 para películas de:

- a) SPAN/(PAH-Os)₆/(GOx)₅
- b) SPAN/(PAH-Os)₆/(GOx)₅ y 2 mM Os(bpy)₂Cl(pyCOOH)⁺ (previamente oxidado con Ce(SO₄)₂).

El potencial a circuito abierto mide la relación de concentraciones de las formas oxidadas y reducidas del polímero conductor sobre la superficie del electrodo a través de la relación de Nernst: $[\text{SPAN}_{\text{ox}}]_{\text{o}}/[\text{SPAN}_{\text{red}}]_{\text{o}}$. La fracción oxidada de SPAN decrece al agregar glucosa de acuerdo al esquema de reacción anterior y la reducción de SPAN se propaga desde la solución hacia el electrodo. El potencial a circuito abierto es linealmente proporcional a $\ln [\text{SPAN}_{\text{ox}}]_{\text{o}}/[\text{SPAN}_{\text{red}}]_{\text{o}}$. Si consideramos un proceso de pseudo primer orden la reacción interfacial de conversión de:



el potencial a circuito abierto debería decaer exponencialmente con el tiempo. Realizando el ajuste de la figura 7 a una exponencial simple se obtienen constantes de tiempo de 500 y 90 seg^{-1} para los casos a y b, respectivamente.

Comparando los resultados entre el complejo de osmio inmovilizado en la película y el complejo en solución se observa que en el segundo caso la reducción es mucho más rápida. Una ventaja importante para el complejo soluble es que puede penetrar en la estructura porosa de SPAN accediendo a toda la superficie interna del polímero por libre difusión en solución ($D_{\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}(\text{pyCOOH})^+} = 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$). En la figura 12 de este capítulo se muestra una micrografía electrónica de una película de SPAN.

El coeficiente de difusión del complejo de osmio en solución ($D_{\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}(\text{pyCOOH})^+} = 1,25 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg}$) es tres ordenes de magnitud mayor que el correspondiente al complejo unido covalentemente a PAH. El coeficiente de difusión aparente de los electrones en PAH-Os fue determinado en el laboratorio por varios métodos y entre otros factores depende de la cantidad de complejo de osmio que se encuentra unido a la matriz de PAH, variando entre $1,2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{seg}$ [7] y $= 1 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{seg}$ [8, 9]. El polímero redox sólo puede alcanzar la superficie de SPAN mediante movimientos segmentales acotados que resultan en un coeficiente de difusión aparente mucho menor (D_{ap}) [10]. Debido a su movilidad restringida la velocidad de reducción de SPAN sobre el electrodo es menor ya que se trata de una reacción interfacial.

A fin de corroborar esta hipótesis se realizaron experimentos similares de respuesta de potencial a circuito abierto con películas de SPAN autoensambladas con dos polímeros redox de igual potencial redox y diferente coeficiente de difusión aparente de electrones. Se utilizaron: a) un polímero modificado con un complejo de biimidazol- Osmio: poli(4- vinilpiridina)- [N,N'- dialkilo-2,2' biimidazol-Os] $^{+2/+3}$ (Pol. A). El

complejo de Osmio (N,N'- dialkilo-2,2' biimidazol-Os $^{+2/+3}$) se encuentra unido a la matriz polimérica (PVP) por medio de una cadena de 13 átomos de carbono de largo, confiriéndole de esta manera una alta movilidad al complejo redox, b) un complejo de osmio [4,4' diamino- 2,2'- bipyridina -Os] $^{+2/+1}$ unido directamente a la matriz polimérica de poli(4- vinilimidazol) (PVI) (Pol. B) con la movilidad más restringida debido a estar unido a la cadena polimérica por un tentáculo más corto. Ambos polímeros fueron sintetizados en la Universidad de Texas en el laboratorio de Profesor Adam Heller por el Dr. Nicolás Mano [10, 11] y gentilmente cedidos a nuestro laboratorio. En la figura 8 se ilustra un esquema de los dos mediadores poliméricos empleados.

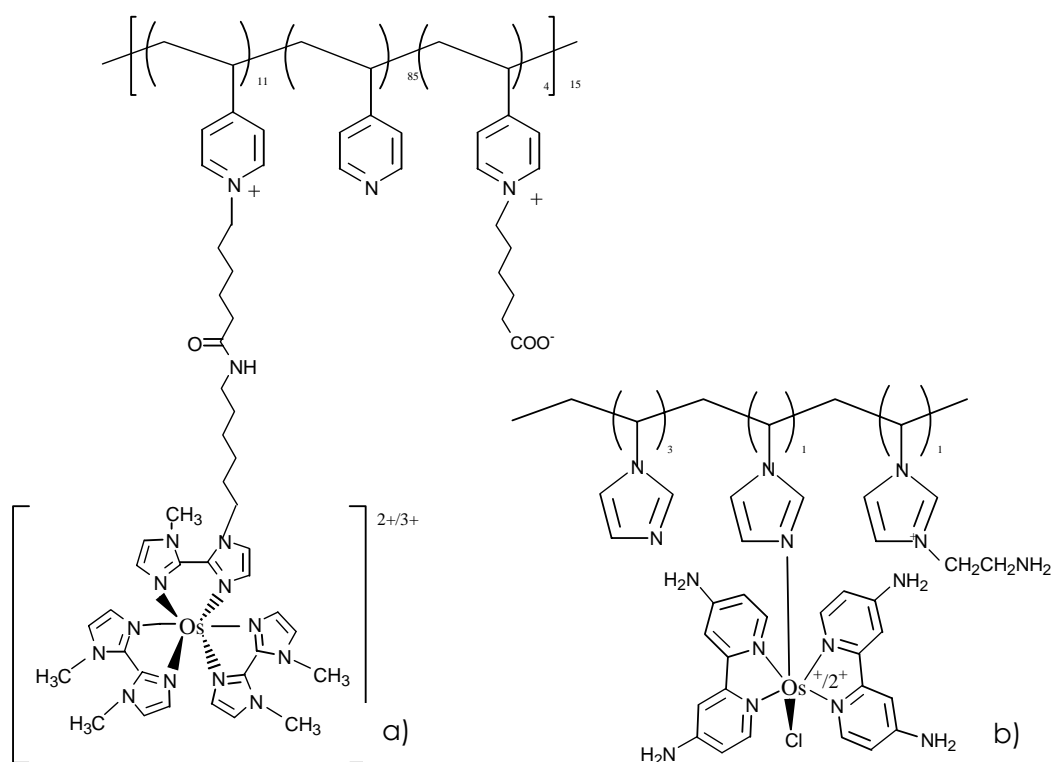


Figura 8

Esquema de las estructuras químicas de los mediadores poliméricos

a) Pol. A, b) Pol. B.

En la figura 9 se comparan los decaimientos de potencial a circuito abierto de películas de SPAN con películas autoensambladas con Pol. A/GOx (a) y Pol. B/GOx (b), respectivamente.

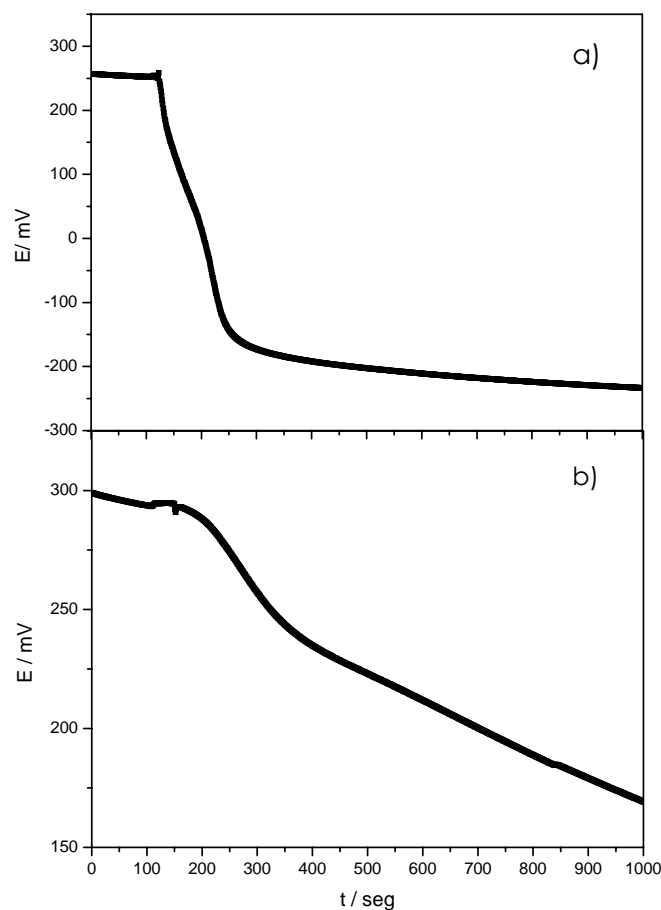


Figura 9

Cambio de potencial a circuito abierto frente al agregado de glucosa (concentración final 20 mM) en solución buffer fosfato pH 7 para películas de: a) SPAN/(Pol. A)₆(GOx)₅. b) SPAN/(Pol. B)₆(GOx)₅

Comparando las figuras a y b se observa claramente que el decaimiento de potencial es mucho más rápido para Polímero A.

Los hidrogeles redox y las películas autoensambladas con polielectrolitos redox constituyen las únicas fases conductoras de electrones en las cuales tanto la permeación de reactivos y productos solubles en agua, de iones y de electrones son rápidas. Estos sistemas permiten el transporte de electrones entre el electrodo y las múltiples capas autoensambladas con enzimas (como en el presente caso), permitiendo la conectividad eléctrica o “cableado molecular” de los centros de reacción enzimáticos.

El transporte de electrones a través de polímeros redox está determinado por su coeficiente de difusión aparente de electrones, D_{ap} . Este coeficiente puede ser determinado por espectroscopía de impedancia electroquímica [12, 13] mediante la

medición de los transitorios de corriente que pasa a través de electrodos cubierto por el polímero cuando se realiza un salto de potencial [14-17] o mediante la medición de la corriente de estado estacionario usando arreglos de microelectrodos interdigitados (IDAs) [15, 18-20].

Hay varios mecanismos por los cuales pueden difundir los electrones en polímeros redox, incluyendo la percolación entre los centros redox inmovilizados, la colisión de centros redox oxidados y reducidos móviles y en algunos polímeros también por la conducción de huecos y electrones a lo largo de cadenas conjugadas [15-21]. En ausencia de cadenas conjugadas y a menos que el polímero tenga una alta concentración de centros redox tal que la precolación sea rápida, la causa dominante de la conducción es la transferencia de electrones colisional entre los centros redox oxidados y reducidos unidos al polímero central. Dado que la velocidad colisional de transferencia de electrones aumenta con la movilidad de los centros redox, cuanto mayor sea la movilidad, más rápida será la difusión de los electrones [22]. Las movibilidades segmentales aumentan con la solvatación del polímero, disminuyen con: el entrecruzamiento, las atracciones coulómbicas, enlaces puente de hidrogeno, interacciones bipolar o bipolar inducida entre los segmentos, entre otros.

La teoría de Dahms-Ruff describe el transporte de carga por "*electron hopping*" (salto de electrones) entre los centros redox de difusión. Blauch y Saveant [23] desarrollaron un modelo difusional acotado que predice D_{ap} . En polímeros con rápido y amplio desplazamiento de los centros redox. De acuerdo al modelo:

$$D_{ap} = 1/6 k_{ex} (\delta^2 + 3\lambda^2) CRT \quad (2)$$

donde k_{ex} es la velocidad de autointercambio de las especies redox en solución, δ es la distancia característica entre sitios redox en el polímero rígido, λ es la distancia que pueden moverse los centros redox unidos al polímero y C es la concentración de las especies redox.

Cuando los centros redox están fijos al polímero y la difusión física no contribuye al transporte de electrones [24], obtenemos de la ecuación 2 el caso límite:

$$D_{ap} = k_{ex} \delta^2 CRT / 6 \quad (3)$$

Los coeficientes de difusión aparentes de electrón informados en hidrogeles redox en equilibrio con soluciones acuosas van entre $10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de coeficientes de difusión aparente para distintos sistemas.

Referencia	Sistema	D _{ap.} ($\text{cm}^2 \text{ seg}^{-1}$)
Forster [25-27]	poli(4 vilipiridina) modificadas con $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{+/2+}$	10^{-9} (en H_2SO_4 en NaCl 1M)
Sirkar y Pishko [28]	hidrogeles de un copolimero de polietilenglicol – diacrilato y vinilferroceno en solución de buffer fosfato [46]	2×10^{-12}
Komura [29]	poli (N, N'- bi (3- pirrol-1- il- propil)- 4,4' bipiridina) en solución acuosa NaCl 0,2 M.	2×10^{-10}
Bu [30]	copolímeros de vinilferroceno, archilamida y <i>N,N</i> -metilenbiacrilamida.	6×10^{-8} and 6×10^{-7}
Cameron[12,13]	complejacion de poli(2-(2-bipiridil)-Bibenzimidazol) con bis(2,2'-bipiridil) Ru^{2+} o bis(2,2'-bipiridyl) Os^{2+}	10^{-8} en acetonitrilo (0 .1 M Et_4NClO_4)
Mao [31]	polypyrrole and poly(1-methyl-3-pyrrol-1-methyl pyridinium)	10^{-8}
Murray [32, 33]	poly $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{vpy})_2]$ intercalada entre un electrodo de Pt y un electrodo de Au poroso secado con N_2 y para poli(benzimidazobenzofenanolina) dopado.	1.7×10^{-6} y 6×10^{-5}

Tabla 1

Coeficientes de difusión aparentes de electrón para distintos sistemas.

El modelo de Blaunich y Saveant (ec. 2) predice que D_{app} [15, 22] debería escalar con el cuadrado del largo del tentáculo que une los centros redox a la matriz polimérica. Por lo tanto a mayor largo del tentáculo, mayor coeficiente de difusión. Esta es la situación de los polímeros desarrollados por Heller y Mano (Pol. A y Pol. B) con coeficientes de difusión aparente $5.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ para Pol. A y $3.4 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ para Pol. B.

La mayor movilidad segmental del polímero A resulta en un mayor coeficiente de difusión aparente de electrones en multicapas e hidrogeles, en una mayor densidad de corriente catalítica de GOx mediada por el polímero redox [11] y es de esperar también que la reacción interfacial entre el Pol. A (II) con SPAN oxidada sea más rápida que con el Pol. B (II), ya que éste presenta menor movilidad segmental. Esto explicaría las diferencias observadas en los resultados presentados en la figura 9. Sin embargo, aun debemos diferenciar las etapas de catálisis enzimática y de reducción de SPAN por contacto con el polímero de Os.

El decaimiento de potencial de un electrodo modificado con 6 capas de polímero A y 5 de GOx a diferentes concentraciones de glucosa que se muestra en la figura 10 indica que el sistema puede responder a la concentración de glucosa en sus dos transiciones pernigranilina/emeraldina (rápido) y emeraldina/leucoemeraldina (lento). En el primer caso se pasa de aislante a conductor y en el segundo de conductor a aislante. La carga necesaria para la conmutación es mayor en el segundo caso por lo que el proceso es más lento.

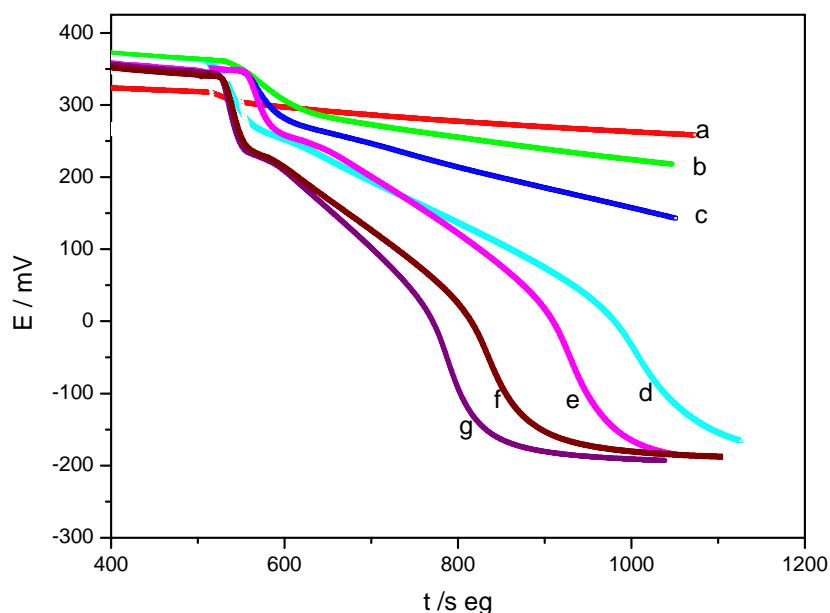


Figura 10

Decaimiento del potencial a circuito abierto frente a concentraciones crecientes de glucosa en solución buffer fosfato pH 7 para película de SPAN(Pol. A)/(GOx)₅. (a) 1, (b) 2, (c) 4, (d) 6, (e) 8, (f) 18, (g) 38 mM de glucosa.

La figura 11 muestra la dependencia de la resistencia de la película de SPAN depositada sobre un par de microbandas de oro en función del potencial aplicado. La línea vertical en la figura representa el potencial formal de transición entre las formas pernigranilina y emeraldina. Este potencial corresponde a una película con igual concentración de pernigranilina y emeraldina. El potencial redox de un mediador eficiente para producir la transición de "off" a "on" inducida enzimáticamente debería caer a la izquierda de esta línea. En nuestro caso el potencial formal de PAH-Os que corresponde a $[Os(III)]/[Os(II)] = 1$ a pH 5 es 300 mV, en la zona de la transición aislador/conductor de SPAN. Si bien a potenciales ubicados a la derecha de la línea

indicada en la fig. 9 se reduce pernigranilina es de esperar que la cinética aumente con la fuerza impulsora dada por la mayor diferencia entre los potenciales redox formales de la polianilina y el mediador. Esto también contribuiría a la respuesta lenta del transistor.

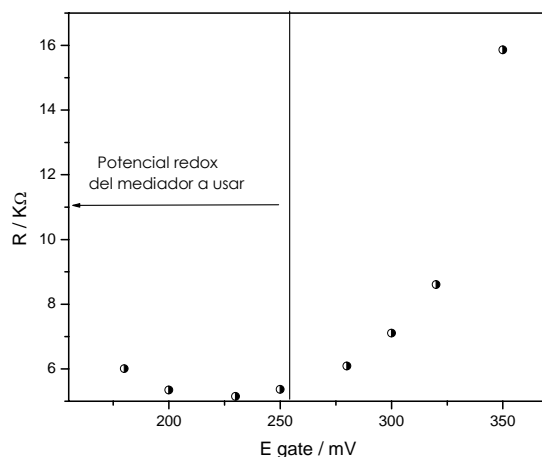


Figura 11

Resistencia de una película de SPAN cubriendo dos microbandas de oro. La película fue depositada potenciostáticamente como se ha descrito anteriormente. La descripción de la medida de resistencia está descrita en la capítulo 2 (sección 2.5.5.2). La línea vertical representa el potencial de transición entre los estados aislante, pernigranilina, y conductor, emeraldina.

Los mediadores poliméricos Pol. A y Pol. B poseen un potencial redox formal similar muy negativo ($E^0_{\text{Pol. A}} = -195 \text{ mV}$ y $E^0_{\text{Pol. B}} = -185 \text{ mV}$). Sin embargo la velocidad de conversión de SPAN es mucho más rápida para el polímero con mayor movilidad segmental, ya que presenta un mayor coeficiente de difusión, como se dijo anteriormente. Por otro lado si la velocidad de reacción interfacial entre Os(II) y SPAN sólo estuviese determinada por el coeficiente de difusión, el complejo de osmio soluble ($\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCOOH}^+$), debería tener un efecto similar sobre la velocidad de reducción de SPAN. Sin embargo el polímero A produce un decaimiento de potencial más rápido que el complejo de osmio soluble (figuras 7b y 9a). El polímero A tiene un E^0 : -195 mV y $D_{\text{ap}} = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$, mientras que el complejo de osmio en solución tiene E^0 : -260 mV y $D_{\text{ap}} = 1,25 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$.

Ahora compararemos dos complejos solubles de similar coeficiente de difusión y diferente potencial redox formal. Para ello se realizaron experiencias con cloruro de

hexamin-rutenio(III), $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}\text{Cl}_3$, que presenta los siguientes valores de interés: $E^0 = -275 \text{ mV}$ y $D_{\text{ap}} = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$.

En la figura 12 se muestra comparativamente el decaimiento de potencial de una película de SPAN/ $(\text{PAH-Os})_6(\text{GOx})_6$ utilizando en un caso $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}\text{Cl}_3$ y en otro el complejo de osmio, $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCOOH}^+]\text{Cl}$, como mediador en solución.

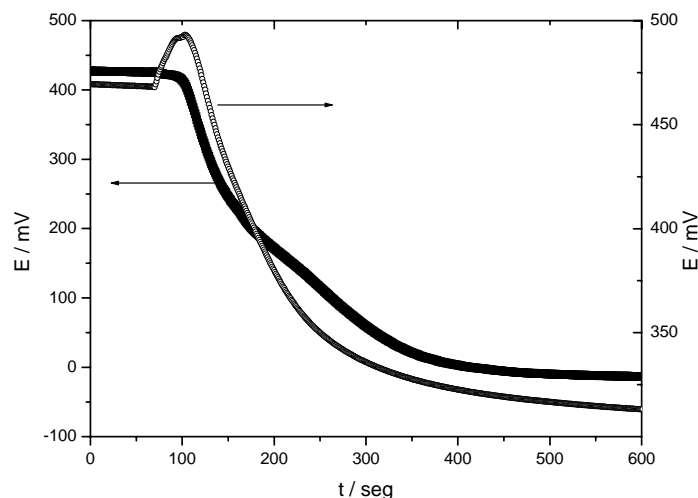


Figura 12

Cambio de potencial a circuito abierto frente al agregado de glucosa (concentración final 20 mM) en solución buffer pH 7 para una película de SPAN/ $(\text{PAH-Os})_6(\text{GOx})_6$.
Mediador en solución: 2 mM de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}\text{Cl}_3$ [■] y 2 mM de complejo de osmio [○].

Se observa que los transitorios ocurren en la misma escala de tiempo. Sin embargo la cupla $\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+}$ lleva a SPAN al estado completamente reducido (emeraldina) en menor tiempo: en 100 segundos se alcanza 250 mV y se convierte SPAN a emeraldina y a 0 mV (400 seg) a leucoemeraldina, mientras que el complejo de osmio convierte SPAN en emeraldina en la escala de tiempo total. Nótese que ambos transitorios se cruzan en 200 segundos y mientras que con $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCOOH}^+]\text{Cl}$ se alcanza 400 mV, el complejo de rutenio lleva el potencial del electrodo modificado con SPAN a 180 mV con mayor conversión a emeraldina, es decir, mayor inyección de carga. Esto también ocurre para el polímero A (figura 9a) que también posee un potencial muy negativo. Nótese que, además, como consecuencia del potencial muy negativo de la cupla $\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{2+}$ con respecto al potencial de SPAN; éste pasa por los dos estados de oxidación. Esto resulta en una transición aislante a conductor y luego de conductor a aislante por lo que en el

decaimiento de potencial se observa un arresto de 100 mV, aproximadamente. Como se explicó anteriormente la segunda transición es más lenta.

6.1.1.3.- Carga inyectada por la reacción catalítica.

La carga inyectada en la película de polianilina que produce la conmutación de la llave molecular depende de la reacción de Os(II) con la superficie de SPAN. El flujo de Os(II) está a su vez determinado por el flujo de oxidación de β -D-glucosa, por la enzima GOx y la reacción de ésta con el Os(II). Si los procesos a) de propagación de carga en la PANI y b) de reducción de este polímero (del estado conductor a aislante) con PAH-Os(II) en la interfaz entre ambos fueran rápidos, entonces el flujo de oxidación de la glucosa determinaría la velocidad de inyección de carga en la película conmutadora y con ello la respuesta del transistor.

Este es el caso deseado en un transistor ideal, que su respuesta sea determinada por el proceso catalítico enzimático y la cantidad total de polianilina que debe ser conmutada.

Para mediadores en solución, las corrientes catalíticas son mayores que para mediadores inmovilizados en películas depositadas capa por capa. Sin embargo dichas corrientes catalíticas no difieren apreciablemente (en orden de magnitud) para los diferentes mediadores utilizados, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCOOH}$, etc. (el primero tiene menor fuerza impulsora con un menor potencial redox).

Asimismo, si bien el polímero A produce mayores corrientes catalíticas que el polímero B [10, 11] y que PAH-Os, las diferencias no superan un orden de magnitud y no permiten explicar la respuesta lenta de los transistores con PAH-Os.

La densidad de corriente catalítica a saturación de glucosa ($C_{\text{gluc}} \gg K_M$) que se genera en la película de reconocimiento molecular de PAH-Os a 550 mV es de unos pocos microamperios por cm^2 . El área geométrica de la película de SPAN que cubre las microbandas de oro es muy pequeña, del orden de $0,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$, pero el área real expuesta a la solución y a la deposición de PAH-Os y GOx es mucho mayor debido a la porosidad de la película de SPAN como se aprecia en la microfotografía SEM de la figura 13. Durante el autoensamblado, la glucosa oxidasa y el polímero redox (MM 70.000) podrían penetrar en la estructura porosa de modo que el área real de la película de reconocimiento molecular $(\text{PAH-Os})_n(\text{Gox})_m$ seguramente es mucho mayor que el área geométrica del polímero expuesta a la solución.

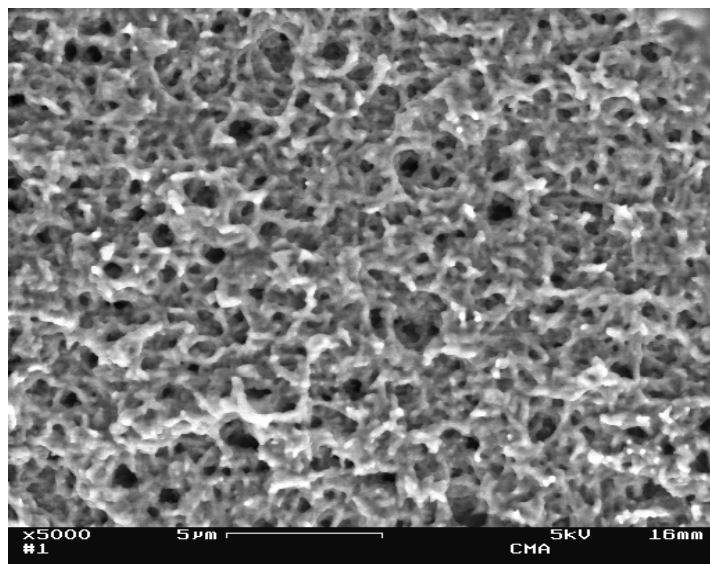
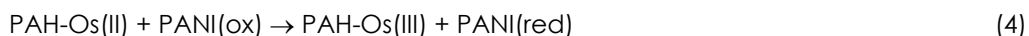


Figura 13

Micrografía obtenida con microscopio electrónico de barrido Leo Zeiss 982 con emisión de campo. En la micrografía se encuentran los detalles de obtención de la misma.

De la evidencia presentada no pareciera que las corrientes catalíticas observadas para estos sistemas permitan explicar los tiempos de respuesta del sistema con PAH-Os de $t_{1/2} = 1000$ s. La limitación de la velocidad de respuesta del dispositivo estaría en la cinética del proceso bimolecular interfacial:



En el capítulo 5 se presentó evidencia de la oxidación de PAH-Os(II) depositada capa por capa sobre una película de polianilina. Es decir, que la reacción interfacial (4) ocurre aún en una región de potenciales donde la resistencia de la película es alta (300-400 mV) según la figura 18 del capítulo 5.

La velocidad del proceso bimolecular dependerá de las concentraciones locales de PAH-Os(II) y PANI(ox) en la interfaz de contacto entre ambos, de la frecuencia de colisión y de la fuerza impulsora dada por la diferencia de potencial entre la cupla redox Os (II)/Os (III) y la cupla pernigranilina/emeraldina.

Por otro lado, si bien la energía de reorganización del complejo de osmio es baja, la participación de contraiones, intercambio de agua y cambios de volumen en la película de reconocimiento han sido mostradas en el capítulo 4. Como en todos los

casos la transformación pernigranilina/emeraldina es la misma, correspondería analizar en detalle el rol del mediador. La sustitución de polialilamina por el complejo de osmio en PAH-Os es baja (1:8 o menor) respecto de las unidades monoméricas de modo que el acceso del complejo de osmio a los anillos aromáticos de pernigranilina estará limitado por movimientos segmentales del polímero (lentos). Esto explica el rol tan importante encontrado en este trabajo en el coeficiente de difusión aparente de electrones que refleja la flexibilidad del polímero y posibilidades del centro redox de difusión acotada, como de la alta difusividad de los mediadores solubles.

El último aspecto que discutiremos es la estabilidad de las películas de PANI y SPAN en contacto con $(\text{PAH-Os})_n(\text{Gox})_m$ a pH 5 y 7. Es conocido que las películas de PANI son estables en medio ácido y que los protones juegan un rol importante en la conductividad. Sin embargo como se explicó precedentemente para aplicaciones en biosensores es necesario trabajar en soluciones de pH cercano al valor fisiológico.

Para ello se introducen grupos SO_3^- que aportan cargas fijas a la PANI de modo que se incluyan protones en la película por efecto Donnan.

En el capítulo 1 se explicó que el contacto de polianilina con soluciones no ácidas lleva a una lenta inactivación de la forma completamente oxidada, pernigranilina; mientras que la emeraldina es estable y mantiene su actividad hasta pH 9. En la figura 18 del capítulo 5 se comparan curvas de conductividad eléctrica versus potencial aplicado para películas de SPAN y las mismas con un depósito auto-ensamblado capa por capa de $(\text{PAH-Os})_n(\text{GOx})_m$ desde soluciones de PAH-Os de pH 8 y de GOx de pH 6. Si bien al llevar dichos sistemas a pH 5 y 7 rápidamente se equilibran con los protones en solución, la exposición prolongada a esos pH y la oxidación a pernigranilina podrían inactivar SPAN resultando en películas más resistivas en el estado conductor y con menor carga redox.

Nótese en la figura mencionada que luego de ensamblar la película de reconocimiento $(\text{PAH-Os})_n(\text{GOx})_m$, la conductividad de SPAN cae significativamente pero el máximo se mantiene al mismo potencial indicando que no ha habido cambio de pH. En la Figura siguiente se muestra que variando el pH de la solución se produce un corrimiento del máximo, se estrecha el intervalo de potenciales donde la conductividad es alta pero no varía la conductividad máxima. El contacto entre la PANI y la polialilamina sería responsable de la inactivación observada. Sin embargo, el contacto con soluciones ácidas reactiva la capacidad redox de la película y su conductividad. Esta es una clara evidencia del importante rol de los protones.

6.2- Conclusiones.

En primer lugar se realizó un estudio detallado de un método alternativo de autodopado de polianilina mediante control electroquímico que permite extender el intervalo de trabajo de pH de PANI para aplicaciones biológicas. La introducción de grupos sulfónicos dentro de PANI mediante oxidación electroquímica produce el mismo tipo de efecto en la electroactividad de la película que la polimerización de anilina mediante polianiones tales como PSS.

Luego se estudió la dinámica redox de un sistema autoensamblado modelo PAH-Os/PSS en el cual se observó la importancia del tratamiento previo de la película y los cambios que sufre la misma cuando se expone a sucesivos ciclos de oxidación-reducción.

Combinando estos dos sistemas (polianilina modificada y película autoensamblada con enzima) se diseñó un transistor o llave molecular con reconocimiento específico de glucosa en solución y generación de una señal eléctrica por conmutación de dos estados: aislador a conductor en una película delgada de polianilina autodopada por PSS o por sulfonación.

El transistor diseñado constituye el primer ejemplo de un dispositivo de llave molecular donde se integran totalmente las etapas de reconocimiento molecular y la generación de señal eléctrica sin necesidad de agregar reactivos.

El diseño de esta llave molecular con respuesta a glucosa consiste en una capa conmutadora de polianilina sulfonada entre dos contactos eléctricos de oro depositados sobre silicio (microbandas de 10 micrómetros de ancho e igual separación de aislador) y una película de reconocimiento molecular depositada sobre la primera. La película de reconocimiento molecular consiste en un film delgado de polialilamina derivatizado por un complejo de osmio y la enzima glucosa oxidasa.

Se demostró que la película delgada de polianilina cambia su resistencia eléctrica abruptamente en varios órdenes de magnitud como respuesta a la inyección de pequeñas cantidades de carga, luego de la reacción de la glucosa con la enzima y la formación de Os(II).

Sin embargo la inyección de carga y la conmutación de la llave molecular resulta muy lenta cuando se la compara con dispositivos similares que emplean mediadores redox solubles. La inyección de carga depende del flujo de electrones que resulta del flujo de la reacción enzimática y de la velocidad de la reacción interfacial entre el Os(II) y la película de polianilina oxidada.

En el mediador polimérico, PAH-Os, el flujo de inyección de carga en la interfaz con la polianilina está limitado por la superficie de contacto y la movilidad segmental de los grupos redox en el polímero, a diferencia del mediador soluble que puede

difundir libremente hacia toda la superficie de la polianilina. Se demostró la importancia de la movilidad segmental medida por el coeficiente de difusión aparente de electrones en los polímeros redox (*"electron hopping"*).

Se obtuvo evidencia del efecto del potencial redox formal del mediador redox sobre la velocidad de inyección de carga y conmutación de SPAN, o sea de la capacidad como reductor de la pernigranilina.

Se concluye que para tener un dispositivo conmutador eficiente se necesita de la convergencia de un mediador muy reductor y una alta movilidad de los sitios redox (D_{ap}) que interactúan con la superficie de la película de polianilina.

Durante la operación, se observó la pérdida de carga y de respuesta del dispositivo por inactivación gradual de la película conmutadora de SPAN (disminución y carga y aumento de resistencia). Sin embargo, la exposición a soluciones ácidas reactiva la capacidad conmutadora y la carga redox de la polianilina. Esta evidencia, junto con la observación de disminución en la conductividad de SPAN luego de auto-ensamblar la película de reconocimiento $(PAH-Os)_n(Gox)_M$ sobre ella, indicaría que la inactivación y el aumento de la resistencia del dispositivo están asociados a la deprotonación de SPAN y a la capacidad buffer de la PAH.

Como conclusión final, se demostró que cada uno de los mecanismos de reconocimiento molecular y conmutación de la resistencia del dispositivo son los esperados de acuerdo al diseño. Se explicaron los factores que determinan la velocidad de respuesta y estabilidad, a partir de los cuales podrán rediseñarse dispositivos más rápidos y estables.

6.3. - Referencias.

- [1] S. W. Feldberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 4671.
- [2] Y. Astier, P.N. Bartlett, *Bioelectrochemistry*, **2004**, 64, 15.
- [3] Y. Astier, P.N. Bartlett, *Bioelectrochemistry*, **2004**, 64, 53.
- [4] P.N. Bartlett, P.R. Birkin, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 1118.
- [5] P.N. Bartlett, Y. Astier, *Chem. Comm.*, **2000**, 105.
- [6] C. Danilowicz, E. Cortón, F. Battaglini, *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, 445, 89.
- [7] E.J. Calvo, C. Danilowicz, A. Wolosiuk, *J. Am. Chem. Soc. Comm*, **2002**, 124(11), 2452.
- [8] M. Tagliazucchi, E. Calvo, *J. Electroanal. Chem.*, aceptado, **2006**.
- [9] M. Tagliazucchi, D. Grumelli, C. Bonazzola, E.J. Calvo, *J. Nanoscience and nanotechnology*, enviado, feb. **2006**.
- [10] F. Mao, N. Mano, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4951.
- [11] H. Kim, N. Mano, Y. Zhang, A. Heller, *J. Electrochem. Soc.*, **2003**, 150, A209.
- [12] C.G.Cameron, P.G. Pickup, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 11773.

- [13] C.G. Cameron, T.J. Pittman, P.G. Pickup, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 8838.
- [14] B.A. Gregg, A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1991**, *95*, 5970.
- [15] R. Rajagopalan, A. Aoki, A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1996**, *100*, 3719.
- [16] R.J. Forster, J.G. Vos, M.E. Lyons, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1991**, *87*, 3769.
- [17] S.M. Oh, L.R. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5613.
- [18] C.A. Goss, M. Majda, *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, *300*, 377.
- [19] B.J. Feldman, R.W. Murray, *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 5844.
- [20] A. Aoki, R. Rajagopalan, A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 5102.
- [21] A. Aoki, A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 11014.
- [22] R. Rajagopalan, A. Heller, *Molecular Electronics : a chemistry for the 21st century monograph*, (Ed. J. Jortner, M. Ratner), Blackwell Science Ltd, **1997**, pp 241.
- [23] D.N. Blauch, J.M. Saveant, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 6444.
- [24] E.J. Laviron, *J. Electroanal. Chem.*, **1980**, *112*, 1.
- [25] R.J. Forster, J.G. Vos, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1991**, *87*, 1863.
- [26] L. Keane, C. Hogan, R.J. Forster, *Langmuir*, **2002**, *18*, 4826.
- [27] R.J. Forster, J.G. Vos, *Langmuir*, **1994**, *10*, 4330.
- [28] K. Sirkar, M.V. Pishko, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 2888.
- [29] T. Komura, K. Kijima, T. Yamaguchi, K. Takahashi, *J. Electroanal. Chem.*, **2000**, *468*, 166.
- [30] H.Z. Bu, A.M. English, S.R. Mikkelsen, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 9593.
- [31] H. Mao, P.G. Pickup, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 1776.
- [32] J.C. Jernigan, R.W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 1738.
- [33] K. Wilbourn, R.W. Murray, *J. Phys. Chem.*, **1988**, *92*, 3642.