

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA Y ESPECTROFOTOMÉTRICA DEL
ÁCIDO 2,2'-AZINO-BIS-(3-ETILBENZOTIAZOLIN-6-SULFÓNICO) (ABTS) Y
SUS DOS ESTADOS DE OXIDACIÓN, EMPLEANDO DMSO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

JUAN GONZÁLEZ VELASCO

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. VÍCTOR MANUEL UGALDE SALDÍVAR

VOCAL: DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDES

SECRETARIO: MC. ROSA ISELA DEL VILLAR MORÁLES

1ER SUPLENTE: MC. AGUSTÍN PALMA DE LA CRUZ

2° SUPLENTE: MC. ERNESTO SÁNCHEZ MENDOZA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DR. VÍCTOR MANUEL UGALDE SALDÍVAR

SUSTENTANTE:

JUAN GONZÁLEZ VELASCO

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo su apoyo;

A mis padres Ma. Esther Escobar Rosas y María Elvira Velasco Escobar.

A mis hermanos Roxana América Corrales Velasco y José Roberto Corrales Velasco.

A mis tíos Ma. de Lourdes Velasco [†], Roberto Velasco y Ernestina Velasco.

A todos mis primos.

LOS AMO.

Al Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar y su familia

Gracias por todo su apoyo.

A todos mis compañeros y amigos;

Sería difícil poner a todos en estas líneas, una disculpa de antemano; en especial a José Orsuna, Alfredo Linares, Norma Quiroz, Norma Ortega, Dr. Rafael Moreno, Ramón Montuy, Fernando Estrada, Paris Paredes, Luz López, Sergio y Gaby, Gabriel Elías y Cata, Almita a todos los que falta mencionar o los que ya no están.

GRACIAS.

Me celebro y me canto a mí mismo.
Y lo que yo diga ahora de mí, lo digo de ti,
porque lo que yo tengo lo tienes tú
y cada átomo de mi cuerpo es tuyo también.

Vago...e invito a vagar a mi alma.
Vago y me tumbo a mi antojo sobre la tierra
para ver cómo crece la hierba del estío.
Mi lengua y cada molécula de mi sangre nacieron
aquí,
de esta tierra y de estos vientos.
Me engendraron padres que nacieron aquí,
de padres que engendraron otros padres que nacieron
aquí
de padres hijos de esta tierra y de estos vientos también.

Tengo treinta y siete años. Mi salud es perfecta.
Y con mi aliento puro
comienzo a cantar hoy
y no terminaré mi canto hasta que me muera.
Que se callen las escuelas y los credos.
Atrás. A su sitio.
Sé cuál es su misión y no lo olvidaré;
que nadie lo olvide.
Pero ahora yo ofrezco mi pecho lo mismo al bien
que al mal,
dejo hablar a todos sin restricción,
y abro de par en par las puertas a la energía original
de la naturaleza desenfrenada.

Whitman W.

1819-1892

INDICE

Símbolos y abreviaturas

Introducción

I.	Antecedentes	5
I.1	Fundamentos	5
I.2	Electroquímica de moléculas orgánicas	5
I.3	Mediadores redox	9
I.4	Mediador ABTS	13
I.4.1	Propiedades fisicoquímicas del ABTS	13
I.4.2	Propiedades espectroscópicas del ABTS	15
I.4.3	Propiedades electroquímicas del ABTS	17
I.4.4	Usos del ABTS	19
II.	Hipótesis y objetivos	22
II.1	Hipótesis	22
II.2	Objetivo general	22
II.2.1	Objetivos Específicos	23
III.	Resultados y discusión	25
III.1	Espectrofotometría	26
III.1.1	Caracterización espectrofotométrica del ABTS en DMSO	26
III.2	Electroquímica	28
III.2.1	Voltamperogramas del DMSO	28

III.2.2	Caracterización electroquímica del ABTS	29
III.2.3	Estudio de velocidades v_B de barrido del ABTS	32
III.2.4	Caracterización espectroelectroquímica del sistema ABTS/ABTS ^{•+} /ABTS ⁺⁺	34
III.2.4.1	Electrólisis de ABTS	34
III.2.4.2	Electrólisis de ABTS ^{•+}	35
III.3	Caracterización espectroscópica	37
III.3.1	¹ H RMN del ABTS	37
III.3.2	¹³ C RMN del ABTS	37
III.3.3	¹ H RMN del ABTS ⁺⁺	38
IV.	CONCLUSIONES	44
V.	Sección experimental	47
V.1	Materiales	47
V.1.1	DMSO	47
V.1.2	Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio	47
V.1.3	ABTS	48
V.2	Equipos	48
V.2.1	Caracterización espectrofotométrica	48
V.2.2	Caracterización electroquímica	48
V.2.3	Producción electroquímica	49
V.2.4	Resonancia magnética nuclear	49

Apéndice

A.1	Voltamperometría	51
A.1.1	Instrumentación en voltamperometría	52
A.2	Voltamperometría cíclica	53
A.3	Espectroelectroquímica	56
A.4	Espectroelectroquímica de capa fina	58
	Bibliografía	61

Símbolos y Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ABTS ^{•+}	Radical monocatión
ABTS ²⁺	Dicatión
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
Ox	Especie oxidada
Red	Especie reducida
ϵ	Coefficiente de absorptividad molar
λ	Longitud de onda
λ_{max}	Longitud de máxima absorción
Uv	Ultravioleta
Vis	Visible
Fc ⁺ -Fc	Sistema de referencia ferricinio-ferroceno
E _{+λ}	Potencial de inversión anódico
E _{-λ}	Potencial de inversión catódico
E _{i=0}	Potencial de corriente nula
E _{1/2}	Potencial de media onda
E _p	Potencial de pico
E _{pc}	Potencial de pico catódico
E _{pa}	Potencial de pico anódico
v _B	Velocidad de barrido

RMN	Resonancia magnética nuclear
^1H RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrogeno 1
^{13}C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbón 13
TMS	Tetrametilsilano
δ	Desplazamiento químico
ppm	Partes por millón
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
OTTLE	Electrodo de capa delgada ópticamente transparente
HPAs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos

INTRODUCCIÓN

La demanda actual de la sociedad por un sin número de bienes de consumo, es uno de los factores que han influido en el incremento de diversos procesos industriales, estos a su vez afectan al medio ambiente debido a los desechos que se generan. Lo anterior plantea a la comunidad científica en su conjunto retos importantes en el estudio, caracterización y tratamiento de las materias primas, catalizadores, productos y derivados de dichos procesos. Dos de estas industrias son la de papel y la textil. Por ejemplo, en el proceso de blanqueo de la pulpa de papel se emplean grandes cantidades de cloro para la remoción de la lignina residual, esto conlleva a la formación de derivados clorados altamente tóxicos que son difíciles de tratar. Por lo que toca a la industria textil, durante el proceso de teñido se emplean colorantes que generalmente son compuestos químicamente muy complejos, una vez que han sido utilizados, estos y sus residuos, son vertidos a los efluentes constituyendo una fuente importante de contaminación, ya que son difíciles de degradar o tratar en forma convencional.

Desde la década de los 80's inicia el auge en la investigación de sistemas biológicos con capacidad para degradar desechos y colorantes que son utilizados en diversas industrias, se puso particular interés en la degradación de la lignina que es la responsable de la coloración marrón de la madera y celulosa. El uso de hongos de podredumbre blanca para el blanqueo, no mostró al inicio resultados alentadores en el posible uso a nivel industrial, pero las investigaciones arrojaron información acerca de la participación de tres grupos de enzimas principalmente, presentes en *P. Chrysosporium* y *T. Versicolor* que son capaces de degradar una gran variedad de colorantes recalcitrantes y polímeros complejos de la lignina. Las enzimas identificadas se conocen como: *lignina peroxidasas*, *manganeso peroxidasas* y *lacasas*.

A mediados y finales de los 90's se propuso la eliminación de los colorantes residuales en la industria textil, los métodos biológicos propuestos utilizaban bacterias en condiciones anaerobias pero este proceso resultó costoso y poco eficiente, por lo que se recurrió a la búsqueda de enzimas que realizaran la remoción, siendo la *lacasa* la más utilizada para la biodegradación.

Las *lacasas* son glicoproteínas extracelulares que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, debido a que su potencial oxido-reducción no es muy alto, su acción se limita a los fragmentos fenólicos de la lignina por lo que se considera que no pueden llevar a cabo la deslignificación completa de la pulpa de papel por sí solas. No obstante, se sabe que al utilizar en forma conjunta a la enzima y sustancias de bajo peso molecular, conocidas como mediadores, se tiene la capacidad de reaccionar con los sustratos no fenólicos de la lignina. Esta aplicación ha permitido el uso de las *lacasas* en diversas áreas como blanqueo de jugos y vinos, decoloración de textiles, oxidación de contaminantes orgánicos y como componentes de biosensores, entre otros.

Diferentes procesos industriales y de investigación han propuesto el uso de más de 100 mediadores, aunque el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) es uno de los más utilizados, ya que posee bajo peso molecular comparado con la enzima y esto le permite una mayor difusión en los procesos de degradación y es capaz de reaccionar con sustratos no fenólicos debido a los potenciales redox asociados al sistema ABTS/ABTS^{•+}/ABTS⁺⁺. Todo lo anterior le confiere gran relevancia al estudio de mediadores, sin embargo se han realizado pocos trabajos para conocer las características estructurales que hacen de un mediador un eficiente complemento en el mecanismo de interacción con la enzima.

En el presente trabajo se decidió realizar el estudio electroquímico del ABTS, en el disolvente dimetil sulfóxido (DMSO), el cual es informado en la literatura como un medio capaz de estabilizar especies radicales y/o reactivas, debido a sus propiedades fisicoquímicas. Uno de los objetivos principales fue comparar las características electroquímicas del ABTS en DMSO con lo informado por diversos autores que han trabajado en disolución acuosa, lo que permitió establecer las condiciones para el análisis espectroelectroquímico. Posteriormente se realizaron electrólisis exhaustivas, cuyos productos fueron caracterizados por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) y resonancia magnética nuclear (RMN).

Se pretende aportar evidencias espectrofotométricas, electroquímicas y espectroscópicas acerca del comportamiento de este mediador en DMSO, que abonen en la solución de controversias que informan diversos autores en el estudio del ABTS. De especial interés resulta el estudio de las propiedades del radical catión ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) y del dicatión (ABTS^{++}) que es donde se localizaron las mayores discrepancias, de acuerdo a la revisión bibliográfica, las cuales se discuten en el capítulo destinado para ese propósito.

CAPÍTULO

I. Antecedentes

I. Antecedentes

I.1 Fundamentos

En una reacción redox se transfieren electrones de una especie química en disolución a otra, se dice entonces que dicha especie se oxida cuando *pierde electrones* y que se reduce cuando *gana electrones*. De manera análoga afirmamos que un agente oxidante también llamado *oxidante*, toma electrones de otra sustancia y se reduce, por lo que un agente reductor también llamado *reductor*, cede electrones a otra sustancia y se oxida en ese proceso.

I.1.1 Reacción electroquímica

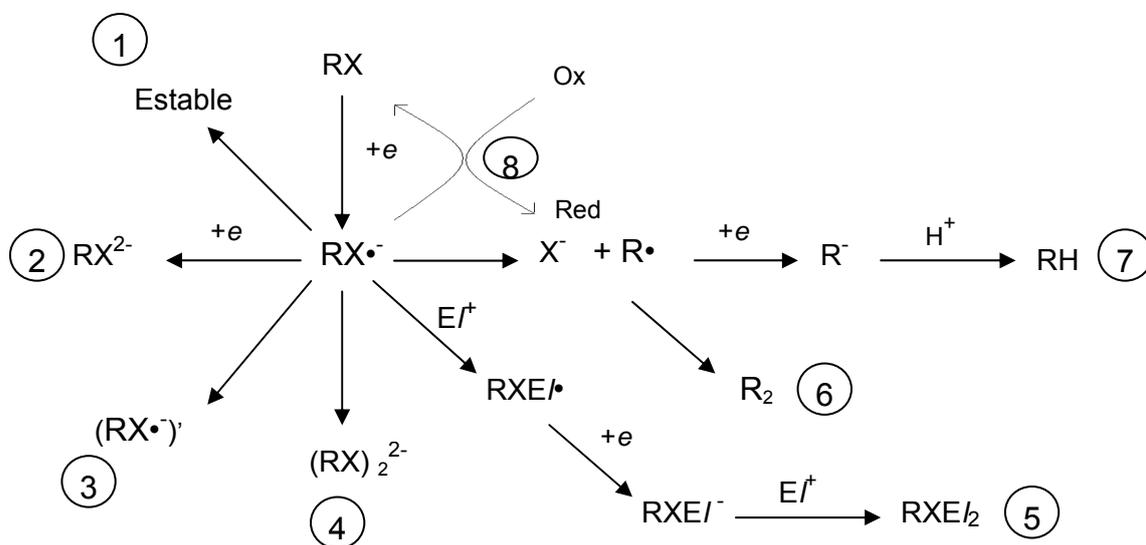
Una reacción electroquímica la podemos definir como el cambio químico producido por la transferencia de electrones realizada, entre un electrodo y un aceptor o donador de electrones en una disolución; es en realidad una reacción de oxidación o de reducción en la que el intercambio de electrones tiene lugar en un electrodo [1].

I.2 Electroquímica de las moléculas orgánicas

Si una molécula orgánica toma electrones de un electrodo se reduce y si cede electrones se oxida, el producto de electro transformación podría reaccionar con diversas especies en forma *acoplada*. Es posible determinar *a priori* las condiciones químicas para favorecer alguna de las reacciones acopladas, dependiendo del producto que se desea obtener, es decir es posible dirigir el mecanismo de electro transformación.

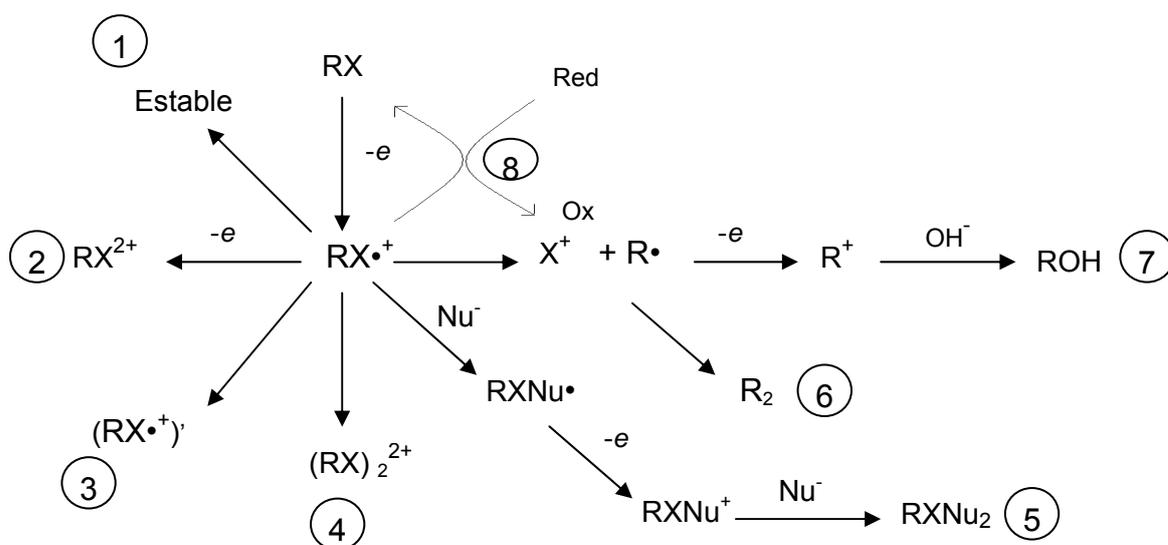
Una molécula orgánica (RX) según los esquemas 1 y 2, puede ganar o perder un electrón, transformándose en una especie aniónica ($RX^{\bullet-}$) en el caso de una electroreducción o en una especie catiónica ($RX^{\bullet+}$) si se tratara de una electrooxidación.

El esquema 1 muestra el comportamiento de la molécula orgánica (RX), para el caso de un proceso de electroreducción. Se observa la posibilidad de que la especie ($RX^{\bullet-}$); sea estable (1), gane otro electrón (2), tenga un cambio en su conformación (3), que forme un dímero aniónico (4), que reaccione con un electrófilo (E^+) en forma sucesiva (5), se disocie y forme una cadena hidrocarbonada con el doble de carbonos (R_2) al de la molécula inicial (6), experimente reacciones de sustitución (7) ó incluso que regenere la especie inicial (8).



Esquema 1. Panorama general de electroreducción de una molécula orgánica.

Para el proceso de electrooxidación, que se muestra en el esquema 2, la molécula orgánica (RX) pierde un electrón en primera instancia para transformarse en (RX \cdot^+); esta especie puede ser estable (1), perder otro electrón para volver a oxidarse (RX $^{2+}$) (2), sufrir un cambio en su conformación (3), formar un dímero catiónico (4), reaccionar con un nucleófilo (Nu $^-$) para formar una radical (RXNu \cdot) el cual puede perder un electrón y reaccionar de nuevo con un nucleófilo (5), disociarse y formar una cadena hidrocarbonada con el doble de carbonos (R $_2$) que la molécula inicial (6), experimentar reacciones de sustitución (7) o ganar un electrón (reducirse) para regenerar la especie original (RX) según la ruta (8). Para ambos casos ya sea la electroreducción o la electrooxidación, todas estas posibilidades se deben a diversos factores.



Esquema 2. Panorama general de electrooxidación de una molécula orgánica.

Los factores que permitirían dirigir la electro transformación, pueden ser: el tipo de electrodo, la naturaleza de RX o de sus grupos sustituyentes, la polaridad del disolvente y si éste es prótico o aprótico, el tipo de oxidante, el tipo de reductor, el nivel de acidez o el potencial impuesto, entre otros.

Los eventos subsecuentes a la electroreducción o electrooxidación de la especie (RX), ocurren en distintas etapas y velocidades, por lo que es necesario emplear técnicas electroanalíticas a diferentes velocidades de sondeo y combinarlas entre sí. Los métodos electroanalíticos como parte de los métodos fisicoquímicos de análisis, se basan en los mismos principios de estimulación del sistema químico en estudio, el cual responde en función de sus características estructurales, reactivas y de concentración, como se presenta a continuación:

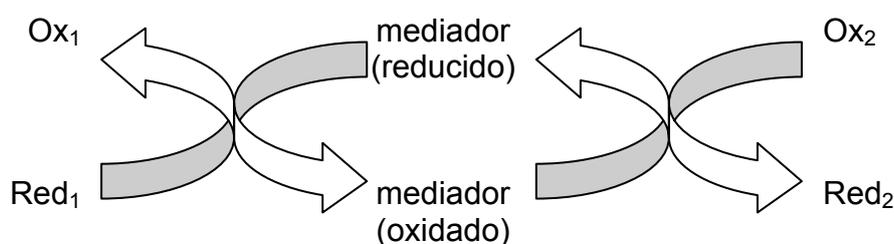
ESTÍMULO → SISTEMA → RESPUESTA ANALÍTICA

El estímulo puede ser la imposición de un potencial eléctrico o la imposición de una corriente eléctrica. Los sistemas están constituidos por cualquier interfase polarizada o electrodo. La interfase más conocida es la constituida por un conductor sumergido en una solución iónica, pero existen los electrodos constituidos por dos disoluciones iónicas no miscibles, las membranas celulares o las microestructuras metálicas que sufren corrosión [2].

La respuesta analítica depende del tipo, magnitud y duración del estímulo eléctrico empleado, que puede imponerse en pulsos o de manera continua (barridos) en un solo sentido o de manera cíclica. El tiempo es una variable muy útil toda vez que es posible técnicamente aplicar el estímulo eléctrico desde milisegundos hasta horas en función del evento que quiere detectarse al electrodo [2].

I.3 Mediadores redox

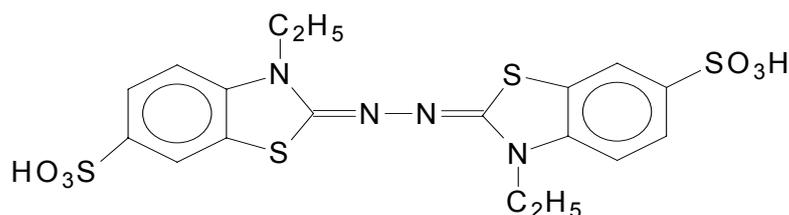
Se considera un mediador oxido-reducción o redox, como un compuesto o especie química, que actúa como un transportador (intercambiador) de electrones para una reacción oxido-reducción, su accionar en forma general se muestra en el esquema 3, en donde se observa que el mediador reducido interactúa en primera instancia con una especie oxidada (Ox_1), la cual se reduce (Red_1), el mediador ya oxidado puede reaccionar con una segunda especie reducida (Red_2), para dar una segunda especie oxidada (Ox_2), regenerándose el mediador a su forma original.



Esquema 3. Forma general en la que interviene un mediador en una reacción redox.

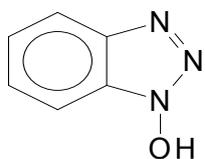
El interés en el estudio de los mediadores redox, surgió de inicio como una necesidad en mejorar los análisis químicos cuantitativos especialmente los coulombimétricos, en estos, se define a un mediador como una especie que transporta electrones entre el analito y el electrodo de trabajo, en donde no sufre una reacción neta. Una condición necesaria para que se pueda hacer un análisis coulombimétrico es que la reacción analítica transcurra con una eficiencia electroquímica al 100%. Es decir, todos los electrones que pasan a través del circuito deben intervenir en una oxidación o reducción del analito. Si se perdieran electrones en reacciones laterales, la medida de los coulombios totales no tendría sentido. Aunque algunas reacciones cumplen esta condición, la mayoría necesitan incorporar un mediador para mejorar la eficiencia [1].

Diversos compuestos informados como mediadores en procesos redox de interés científico, comercial e industrial son el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), 1-hidroxibenzotriazol, benzotriazol, azul brillante de ramazol, cloropromazina, ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfónico, ácido 2-nitroso-1-naftol-4-sulfónico, ácido 4-hidroxibencensulfónico y la anilina. Las estructuras de algunos de ellos se muestran en la figura 1.



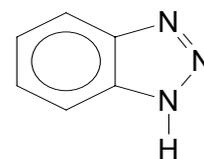
ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)

ABTS



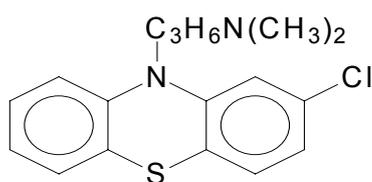
1-hidroxibenzotriazol

HBT



benzotriazol

BT



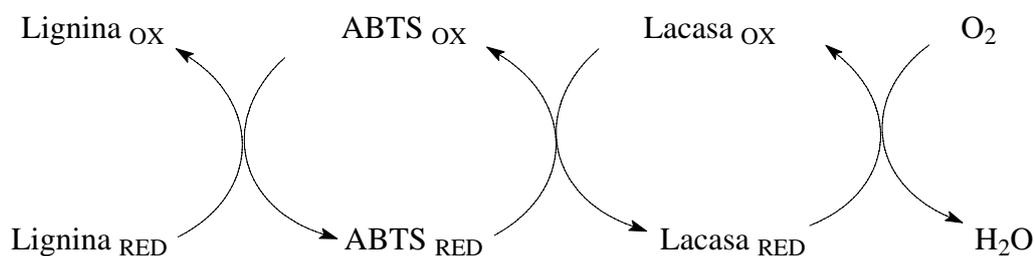
cloropromazina

CPZ

Figura 1. Estructuras químicas de algunos mediadores redox.

Existen sistemas enzimáticos presentes en la naturaleza que emplean mediadores o “acarreadores” de electrones, por ejemplo; la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación celular [3]. En este tipo de reacciones, la enzima le puede sustraer electrones al mediador convirtiéndolo en una especie cargada o en un radical libre que tiene la capacidad de oxidar a otros compuestos. Este hecho, fue y sigue siendo utilizado por el hombre para desarrollar un gran número de procesos con aplicación industrial. Se ha informado que los mediadores aumentan significativamente la catálisis enzimática y también que modifican el espectro de acción de la enzima para oxidar indirectamente a compuestos que normalmente no son sus substratos [4-20].

En la década de los 90’s Bourbonnais y col., [5-7] revisaron las propiedades electroquímicas y de reactividad de al menos 100 mediadores aplicados a la deslignificación en la industria del papel. Concluyeron que el más eficiente en este proceso es el ABTS porque incrementa la eficiencia catalítica debido a su potencial oxido-reducción y a su reducido tamaño en comparación con la enzima y la lignina. El esquema 4, propuesto por Bourbonnais en sus trabajos, presenta la forma en que actúa uno de los mediadores en este tipo de sistemas.



Esquema 4. Representación de la degradación de lignina por la acción de la enzima lacasa y el mediador ABTS.

Este tipo de compuestos son utilizados en procesos de blanqueo enzimático libre de cloro, para la obtención de pastas de alta calidad, estos métodos están basados en el tratamiento con una enzima lignolítica del tipo *lacasa* en presencia de estos mediadores redox. Los altos costos de la enzima y en el caso del mediador ABTS, resultan económicamente asumibles por el elevado precio de este tipo de pastas que son utilizadas en la fabricación de papeles especiales; incluyendo filtros para cafetera, bolsitas de té, papel moneda, papeles dieléctricos y papel para cigarrillos.

Las principales ventajas del uso de mediadores en este proceso, es la mejora en la calidad de las pastas obtenidas (mayor blancura y bajo contenido de lignina), el ahorro de reactivos químicos para el blanqueo y las ventajas medio ambientales que resultan de la eliminación de reactivos clorados (con potencial de toxicidad alto), en la secuencia de blanqueo, que eran vertidos a los efluentes [21].

Otros ejemplos del uso de mediadores, son:

- Procesos de desulfuración biológica (biorefinación del petróleo) [22].
- Tratamiento de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes en el petróleo, estos son oxidados indirectamente a través de los radicales generados por la *lacasa* cuando actúa con los mediadores; la anilina, la metionina, el HBT y principalmente el ABTS son los más utilizados [17,22].
- Adicionalmente el ABTS es utilizado como sustrato de la *lacasa*, para determinar la actividad enzimática y diversos parámetros cinéticos [23].

I.4 Mediador ABTS

Más de cien compuestos, incluido el ABTS, han sido estudiados como mediadores [17], sin embargo este es el más utilizado y está ampliamente informado en la literatura.

I.4.1 Propiedades fisicoquímicas del ABTS

El ABTS es una molécula orgánica, cuya estructura está constituida por la dihidrazona de un derivado de la 2,3-dihidrobenzotiazolona, la cual contiene un grupo etilo unido al nitrógeno y un grupo sulfonato unido al anillo aromático. El ABTS disponible comercialmente está en forma de sal de amonio (Figura 2), con una fórmula molecular $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ y una masa molar de 548.7 g/mol [23]. En lo que corresponde a este trabajo, se hará referencia simplemente como ABTS.

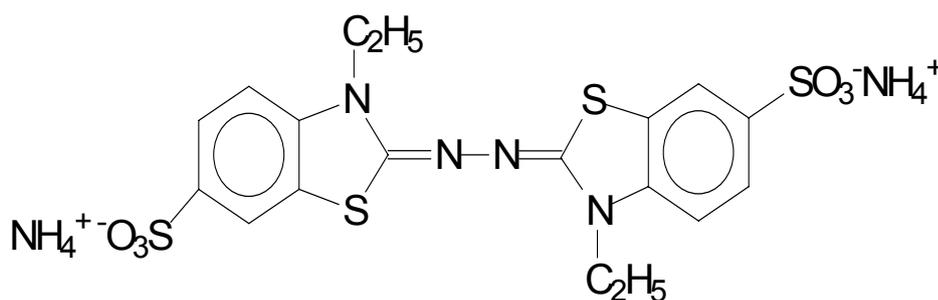


Figura 2. Estructura química de la sal de amonio de ABTS.

El ABTS en disolución es una especie incolora, la oxidación de este mediador sucede en dos etapas (figura 3), se observa que al perder un electrón se convierte en un radical monocatión y si este pierde otro electrón se transforma en el dicatión. En 1998 Bourbonnais y col., [24] informaban que el radical monocatión ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) es de color verde oscuro en disolución, mientras que la especie dicatiónica (ABTS^{++}) es púrpura. Barreca y col., [25] indicaban que el $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se caracteriza por ser azul y cambia a rojo cuando se oxida al ABTS^{++} .

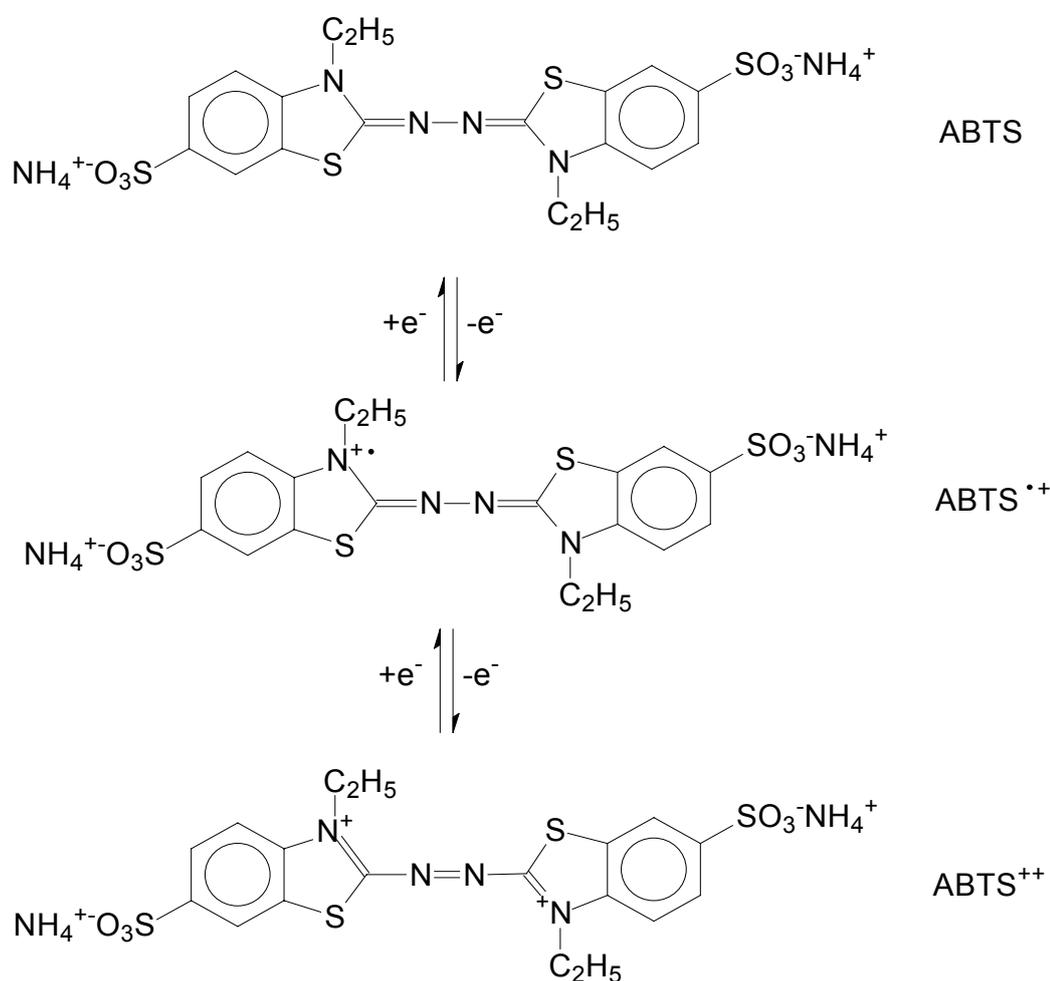


Figura 3. Reacciones de oxidación del ABTS a radical monocatión ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) y dicatión (ABTS^{++}), con la transferencia de dos electrones en cada etapa.

I.4.2 Propiedades espectroscópicas del ABTS

Así como se encontraron diferencias para el color de las especies oxidadas en el material publicado, también existían discrepancias en los valores de longitud de onda de máxima absorción (λ) y su correspondiente coeficiente de absortividad molar (ϵ) que informaban los autores en la literatura para cada una de las especies del ABTS. En la tabla 1 se presentan los datos para las propiedades espectroscópicas.

	Autor	Referencia, disolvente y pH	λ (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
ABTS	Childs	[26], agua, pH=6	340	36000
	Scott	[27], agua, pH=7	340	36600
ABTS ^{•+}	Kim	[28], agua, pH= 5.3	405	35000
	d` Acunzo	[29], agua, pH=5	414	31500
	Gouka	[30], agua, pH=6	414	35000
	Scott	[27], agua, pH=7	417	34700
	Bourbonnais	[24], agua, pH=5	420	36000
	Muñoz	[32], agua, pH=6	436	29300
ABTS ⁺⁺	Scott	[27], agua, pH=7	518	36000

Tabla 1. Propiedades espectroscópicas que informan diversos autores en el estudio del ABTS y sus estados de oxidación.

Uno de los trabajos que dirigió sus esfuerzos en esclarecer las diferencias existentes, para las propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas del ABTS, especialmente para las especies oxidadas, fue el de Solís y col., [33] en el se informa que el radical monocatión ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) es de color verde oscuro, lo que concuerda con lo informado por Bourbonnais y col., [24] y que presenta máximos de absorción en el espectro visible a $\lambda=394, 414, 646$ y 728 nm y puede ser caracterizado en esta última longitud de onda debido a que se evitan interferencias espectrales, atribuidas a la posible formación de un complejo entre el ABTS y $\text{ABTS}^{\bullet+}$, como lo informaba Johannes y col., [16] y que daba como resultado una estimación menor en la concentración de $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

En lo que se refiere a la especie dicatiónica (ABTS^{++}) Solís y col., informaron que esta no absorbe en la región Uv-Vis, al contrario de lo que indican Bourbonnais y col., [24] y Barreca y col., [25] y que es poco estable ya que en pocos minutos retorna al estado radical monocatión por reacción con el disolvente, esto se debe a que el ABTS^{++} es más reactivo (más oxidante) que el $\text{ABTS}^{\bullet+}$, sin embargo el estudio electroquímico permitió establecer tres longitudes de onda $\lambda=214, 256$ y 298 nm, con coeficientes de extinción molares bajos, $\epsilon=4828, 1846$ y 2002 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente, como característicos del dicatión [33].

Observamos que algunos autores informan diferentes longitudes de onda para la caracterización del ABTS y sus especies oxidadas en el UV-Vis [6, 7, 24, 34]; pero podemos concretar que el ABTS se puede caracterizar en una $\lambda=340$ nm [23, 26, 33] en forma confiable. Por lo que toca al $\text{ABTS}^{\bullet+}$, existe contradicción en la longitud de onda en la que debe detectarse, varios trabajos [31, 32, 33] proponen una $\lambda=414$ nm y por otra parte Sigma[®], la empresa que se encarga de producir y distribuir comercialmente el reactivo, establece una $\lambda=420$ nm, utilizando la metodología recomendada para medir la actividad de enzimas oxidasas [23].

Para la especie dicatiónica (ABTS^{++}), como se ha mencionado, existen discrepancias entre distintos autores [24, 25, 35], pues discuten las características físicas (color) y la longitud de onda en la que se puede determinar su presencia. No obstante, todo lo anterior, el trabajo realizado por Solís y col., [33] ofrece evidencia suficiente acerca del comportamiento del ABTS en disolución acuosa.

I.4.3 Propiedades electroquímicas del ABTS

La eficiencia atribuida al ABTS como mediador se debe a los potenciales redox de los dos procesos de oxidación de los sistemas $\text{ABTS}/\text{ABTS}^{++}$ y $\text{ABTS}^{++}/\text{ABTS}^{++}$. Los estudios realizados por diversos autores, aunque de manera relevante los hechos por Bourbonnais y col., [5, 24] avalan esta propiedad. Ambos sistemas se han caracterizado electroquímicamente y se ha evaluado que los potenciales condicionales estándar son: para $\text{ABTS}/\text{ABTS}^{++}$ $E^\circ = 0.472 \text{ V/AgCl-Ag}$ y para el $\text{ABTS}^{++}/\text{ABTS}^{++}$ $E^\circ = 0.885 \text{ V/AgCl-Ag}$ [24]. Se informa un potencial de media onda para la reacción de oxidación $\text{ABTS}/\text{ABTS}^{++}$ de $E_{1/2} = 0.469 \text{ V/AgCl-Ag}$ [24, 33] y para la segunda oxidación $\text{ABTS}^{++}/\text{ABTS}^{++}$ de $E_{1/2} = 0.870 \text{ V/AgCl-Ag}$ [33] en una disolución amortiguadora de acetatos a $\text{pH}=5$.

Por medio de los estudios en voltamperometría cíclica, se informa que el ciclo de oxidación-reducción para el sistema $\text{ABTS}/\text{ABTS}^{++}/\text{ABTS}^{++}$ presenta dos pares redox, que es un sistema rápido, reversible, además de ser sumamente estable y con un potencial conveniente para oxidar a la lignina cuando ha sido estudiado en presencia de la pulpa Kraft [36].

El hecho de que existan diferencias en lo que informan diversos autores en el estudio espectroscópico (color) del mediador ABTS y sus especies oxidadas, pero sobre todo en las propiedades redox para el $ABTS^{•+}$ y $ABTS^{++}$, abre áreas de oportunidad de trabajo, como:

- El tratar de caracterizar el $ABTS^{•+}$ en un disolvente no acuoso, en donde pueda ser más estable, e incluso ser aislado, ya que algunos estudios informan que se presenta en forma de precipitado café-rojizo [35].
- El estudio del sistema $ABTS/ABTS^{•+}/ABTS^{++}$, en un disolvente no acuoso, que provea un ambiente más estable para especies reactivas, como menciona Solís y col., [33].
- La electrogeneración de $ABTS^{•+}$ y $ABTS^{++}$, en ausencia de enzimas [33] (lacasa, por ejemplo), puesto que la mayoría de los trabajos los informan como productos de la reacción de oxidación con ésta, en disolución acuosa.
- Establecer métodos eficientes en la caracterización de $ABTS^{•+}$ y $ABTS^{++}$, (especies reactivas), que pueden estar en forma acoplada (tandem): voltamperometría cíclica, espectroelectroquímica y RMN, o que puedan complementarse.

I.4.4 Usos del ABTS

Como se ha informado el ABTS es un agente químico con características reductoras, que puede oxidarse en dos etapas, con cambios de color en cada una de ellas, características que son utilizadas en diversas aplicaciones:

- El color característico le confiere las propiedades cromóforas que lo hacen útil en estudios cinéticos de oxidación [6, 24, 34, 35].
- Elaboración de pruebas colorimétricas para la determinación de agentes oxidantes en alimentos y bebidas [23].
- Ensayos enzimáticos (actividad), en donde el ABTS actúa como substrato cromogénico, especialmente para enzimas del tipo *lacasa* [17, 37], *lactoperoxidasa* y en general para pruebas de ELISA [23].
- Tratamiento de HPAs presentes en el petróleo; las oxidaciones de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, se llevan a cabo en forma indirecta cuando las enzimas del tipo *lacasa*, al interaccionar con el mediador ABTS, generan los radicales libres que actúan en el proceso [22].
- Proceso para el tratamiento de pulpa de papel de material reciclado, utilizando una enzima del tipo *lacasa* y el mediador ABTS, mejorando la fuerza mojada, para la obtención de diversos materiales papeleros (patente) [38].

- Nuevo procedimiento para el blanqueo enzimático libre de cloro de pastas de alta calidad obtenidas de plantas herbáceas o arbustivas: invención dirigida a la industria papelera para la producción de pastas de papel de alta calidad para usos especiales. La invención utiliza enzimas (lacasa) que degradan la lignina en presencia de compuestos que potencian la actividad (ABTS) de estas enzimas actuando como mediadores redox (patente) [21].

CAPÍTULO

II. Hipótesis y Objetivos

II. Hipótesis y Objetivos

En el estudio del sistema ABTS/ABTS^{•+}/ABTS²⁺, se han utilizado técnicas electroquímicas y espectroelectroquímicas, en disolución acuosa. Este trabajo pretende realizar el estudio de este sistema en un disolvente favorable para la estabilización de especies reactivas y así poder determinar las características estructurales de las especies electrogeneradas.

II.1 Hipótesis

Debido a que el DMSO (dimetil sulfóxido) es un disolvente que posee una elevada constante dieléctrica y provee un intervalo de potencial de trabajo suficientemente amplio (ΔE), además de ser un medio en el cual especies radicales y/o reactivas suelen ser más estables; será posible determinar las propiedades redox (potenciales de media onda) y espectroscópicas de los productos de electrooxidación del ABTS para indagar sobre su estructura molecular.

II.2 Objetivo general

Realizar el estudio electroquímico y espectroelectroquímico del ABTS y sus dos estados de oxidación en DMSO, caracterizar e identificar las especies formadas durante la electrooxidación, con técnicas adicionales como resonancia magnética nuclear (RMN) y contribuir de esta manera al análisis del funcionamiento de este mediador.

II.2.1 Objetivos específicos

Caracterizar espectrofotométricamente al ABTS en dimetil sulfóxido (DMSO). Establecer las longitudes de máxima absorción (λ_{max}) y sus respectivos coeficientes de actividad molar (ϵ) que presenta el mediador en el disolvente de trabajo.

Evaluar las propiedades óxido-reducción por medio de voltamperometría cíclica del sistema ABTS/ABTS^{•+}/ABTS⁺⁺ en DMSO. Determinar los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) característicos y compararlos con los informados en disolución acuosa.

Establecer parámetros en el método de electrooxidación del ABTS, para la caracterización espectroscópica de los productos en dimetil sulfóxido (DMSO).

Identificar los productos formados por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) en dimetil sulfóxido (DMSO) durante la electrólisis exhaustiva.

CAPÍTULO

III. Resultados y Discusión

III. Resultados y Discusión

El estudio electroquímico se inicio con la caracterización electroquímica del dimetil sulfóxido (DMSO), en una primera etapa se trabajó en presencia de oxígeno molecular (O_2), posteriormente se realizó el estudio en ausencia de éste, creando una atmósfera inerte al burbujear nitrógeno gaseoso (N_2) en la celda. El objeto fue conocer los procesos redox inherentes al disolvente y tener una idea primaria, para el posterior establecimiento del intervalo de potenciales de electroactividad para el trabajo con el ABTS.

En lo que concierne al sistema $ABTS/ABTS^{•+}/ABTS^{++}$, se inicio con la caracterización espectrofotométrica (Uv-Vis) del ABTS en DMSO, con el fin de compararlo con lo informado por diversos autores en disolución acuosa y establecer las posibles coincidencias y/o diferencias, en las longitudes de máxima absorción (λ_{max}) y los correspondientes coeficientes de absortividad molar (ϵ). Posteriormente se realizó la voltamperometría cíclica del ABTS. Las características redox del sistema que se obtuvieron, son: intensidad de pico (I_p), potenciales de pico (E_p) y potenciales de media onda ($E_{1/2}$). Las propiedades redox del ABTS en DMSO, sirvieron para establecer las condiciones del trabajo electroquímico y de la generación de los productos de electrooxidación del ABTS.

En la parte final del trabajo, las especies electrogeneradas, fueron caracterizadas por medio de resonancia magnética nuclear (RMN), a fin de proponer datos estructurales acerca de éstas.

III.1 Espectrofotetría

III.1.1 Caracterización espectrofotométrica del ABTS en DMSO

La determinación espectrofotométrica del ABTS tuvo como finalidad el establecer las longitudes de máxima absorción (λ_{max}), cuando esta disuelto en DMSO, y comparar con lo que algunos autores informan en disolución acuosa.

En la figura 4 se presenta el estudio UV-Vis de una disolución 0.05 mM de ABTS en DMSO, se encontró que el espectro electrónico presenta cuatro máximos de absorción característicos a longitudes de onda de: $\lambda = 260, 330, 346$ y 360 nm, con coeficientes de extinción molar de: $\epsilon_{260nm} = 1.09 \times 10^4$, $\epsilon_{330nm} = 4.12 \times 10^4$, $\epsilon_{346nm} = 5.14 \times 10^4$ y $\epsilon_{360nm} = 3.90 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente.

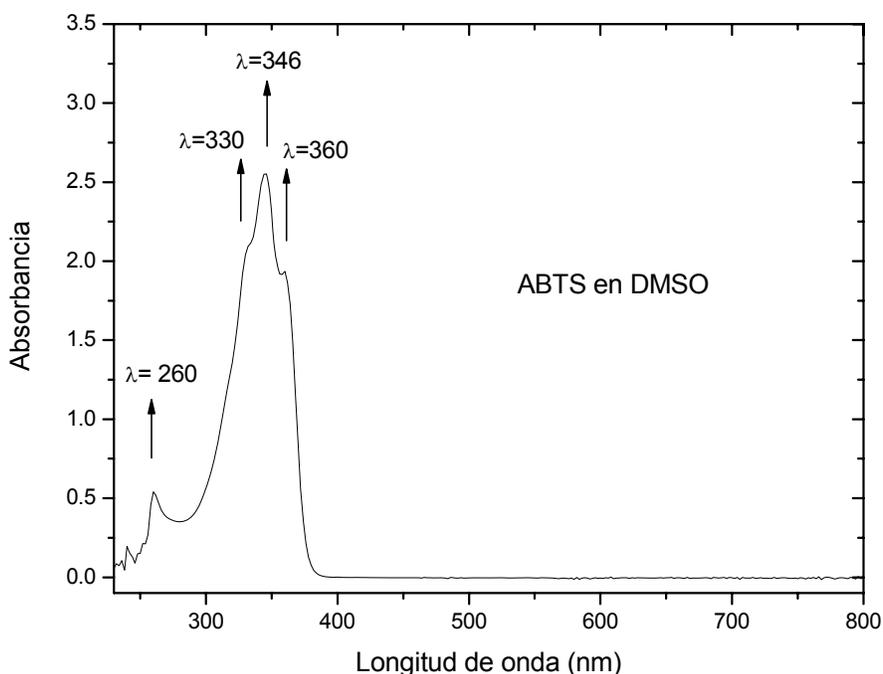


Figura 4. Espectro electrónico de absorción de UV-Vis de una disolución de ABTS en DMSO, 0.05 mM, en una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico.

Algunos autores proponen la caracterización cuantitativa del ABTS, como cromógeno de la enzima peroxidasa en una $\lambda = 340$ nm con un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{340\text{nm}} = 3.66 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [26], incluyendo una longitud de onda adicional $\lambda = 214$ nm y un $\epsilon_{214\text{nm}} = 3.82 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [33] (figura 5).

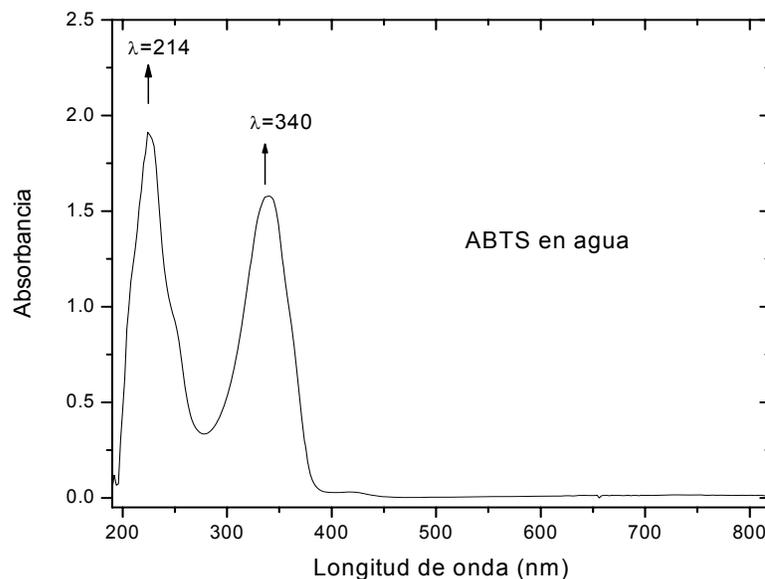


Figura 5. Espectro electrónico de absorción de UV-Vis de una disolución acuosa de ABTS 0.05 mM, en un buffer de acetatos a pH=5 [33].

Por otra parte el fabricante Sigma[®], la empresa que se encarga de producir y distribuir comercialmente el reactivo, establece que la longitud de onda a la cual se detecta la presencia de un pico característico de ABTS es a $\lambda = 340$ nm en disolución acuosa [23].

A manera de resumen; se pudo observar, que el comportamiento del ABTS en DMSO presentó cuatro valores de λ_{max} , a diferencia de Solís y col., [33] en donde informan solo dos. Las longitudes de onda de máxima absorción, en donde el ABTS presenta una respuesta similar, para el espectro Uv-Vis en ambas disoluciones, son $\lambda_{\text{DMSO}} = 346$ nm y $\lambda_{\text{acuosa}} = 340$ nm. Lo anterior permite establecer que la longitud de onda de 346 nm, puede emplearse como referencia para las determinaciones cuantitativas de ABTS en DMSO.

III.2 Electroquímica

III.2.1 Voltamperogramas del DMSO

La figura 6 muestra los voltamperogramas cíclicos típicos del DMSO en ausencia de oxígeno (se burbujeo nitrógeno durante 10 minutos), iniciando el barrido de potencial tanto en sentido positivo (figura 6a) como en sentido negativo (figura 6b). El voltamperograma iniciado en sentido positivo no presenta procesos de oxidación de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$, aunque la barrera anódica se considera un proceso de oxidación, atribuido al disolvente en $E_{+\lambda} \approx 1.70 \text{ V}/\text{Fc}^+ - \text{Fc}$, cuando se invierte el potencial se observa que de $E_{+\lambda}$ a $E_{-\lambda}$ no hay señales de reducción, pero de manera similar, la barrera catódica se considera una reducción, debida al disolvente en $E_{-\lambda} \approx -2.5 \text{ V}/\text{Fc}^+ - \text{Fc}$, lo que permite establecer la ventana de trabajo (dominio de electroactividad) en $\Delta E = E_{+\lambda} - E_{-\lambda} = 1.7 - (-2.5) = 4.2 \text{ V}$. Sucede lo mismo cuando el voltamperograma se inicia en el sentido negativo.

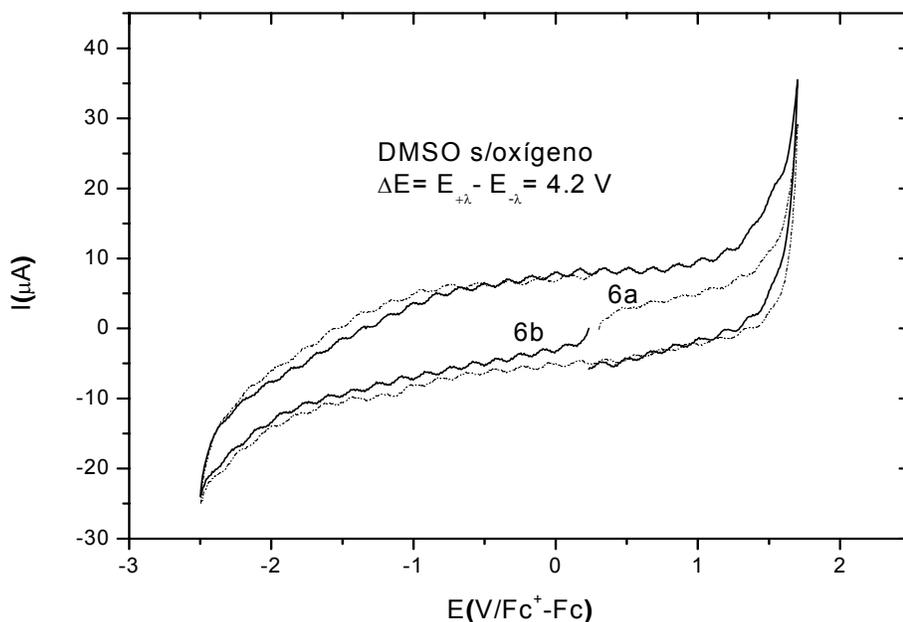


Figura 6. Voltamperogramas cíclicos típicos del DMSO s/oxígeno con Bu_4NPF_6 0.1 M como electrolito soporte a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo, iniciando el barrido de potencial en dirección positiva (6a) y negativa (6b).

III.2.2 Caracterización electroquímica del ABTS en DMSO

La figura 7 muestra los voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 0.2 mM de ABTS obtenidos a 100 mV/s, sobre un electrodo de carbón vítreo (0.0706 cm^2), aunque también fueron obtenidos sobre un electrodo de platino (voltamperogramas no mostrados). El barrido de potencial se inició tanto en sentido positivo (figura 7a) como en sentido negativo (figura 7b). En el voltamperograma iniciado en sentido positivo, en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$ se observan dos procesos de oxidación (I_{pa1} , I_{pa2}) cuyos valores de potencial de pico anódico (E_{pa}) son 0.926 y 1.319 V/AgBr-Ag respectivamente. Cuando se invierte la dirección del barrido, se observan dos procesos de reducción dentro del intervalo de $E_{+\lambda}$ a $E_{-\lambda}$ (I_{pc1} , I_{pc2}) a valores de potencial de pico catódico (E_{pc}) de 0.848 y 1.230 V/AgBr-Ag respectivamente. Cuando el barrido del potencial se inicia en la dirección negativa, no se observan procesos de reducción en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$, lo que resulta consistente con el estado de oxidación del ABTS, cuando se completa el ciclo y se alcanza el valor de potencial de $E_{-\lambda}$, se identifican dos procesos redox reversibles (I_{pa1}/I_{pc1} y I_{pa2}/I_{pc2}) con valores de potencial de pico similares a los obtenidos en el barrido anódico (figura 7).

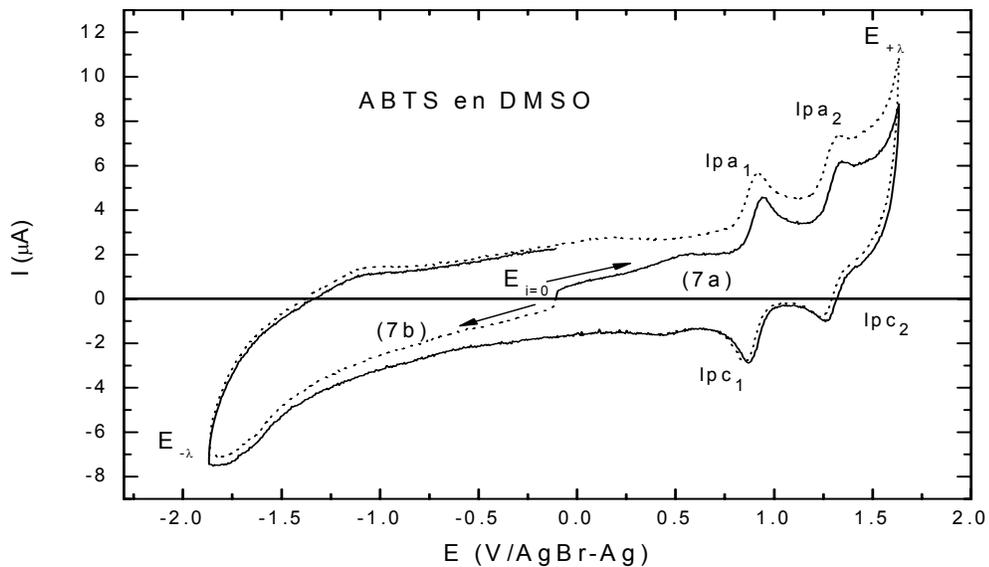


Figura 7. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución de ABTS en DMSO 0.2 mM con Bu_4NPF_6 0.1 M como electrolito de trabajo a 100 mV/s, sobre un electrodo de carbón vítreo, iniciando el barrido de potencial en la dirección positiva (barrido anódico) (7a) y negativa (barrido catódico) (7b).

Los potenciales de media onda que se obtienen a partir de $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$, para cada sistema, presentan los siguientes valores: $E_{1/2} = 0.887$ V/AgBr-Ag, para el primer sistema (ABTS/ABTS^{•+}) y de $E_{1/2} = 1.275$ V/AgBr-Ag para el segundo sistema (ABTS^{•+}/ABTS^{••+}). Los valores determinados de $E_{1/2}$ para ambos sistemas se comportan de forma similar a los informados por otros autores [33, 39, 40]. Las diferencias se presentan en la tabla 2.

$E_{1/2}$ V					
Sistema	Referencia [33] V/AgCl-Ag pH= 5, (H ₂ O)*	Referencia [39] V/AgCl-Ag pH= 5, (H ₂ O)*	Referencia [40] V/AgCl-Ag pH= 4.5, (H ₂ O)*	Este trabajo V/AgBr-Ag (DMSO)*	Este trabajo V/AgBr-Ag (DMSO)**
ABTS/ABTS ^{•+}	0.469	0.440	0.525	0.887	0.329
ABTS ^{•+} /ABTS ^{••+}	0.870	0.843	0.929	1.275	0.733

Tabla 2. Diferentes valores de $E_{1/2}$ del sistema ABTS/ABTS^{•+}/ABTS^{••+} (* mediciones realizadas con electrodo de carbón vítreo y **con electrodo de platino).

Debido a que se requiere de elementos de análisis más precisos en el estudio electroquímico del ABTS, se decidió presentar los resultados de los diversos autores y el de este trabajo con respecto a un sistema estándar de referencia, como es el caso del ferricinio/ferroceno (Fc⁺-Fc), para los sistemas acuosos el valor empleado es de 0.190 V/AgCl-Ag y para el sistema en DMSO el valor medido sobre electrodo de carbón vítreo es de 0.682 V/AgBr-Ag y sobre electrodo de platino es de 0.194 V/AgBr-Ag. Los nuevos valores se muestran en la tabla 3.

$E_{1/2}$ V/Fc ⁺ -Fc					
Sistema	Referencia [33]	Referencia [39]	Referencia [40]	Este trabajo	Este trabajo
ABTS/ABTS ^{•+}	0.279	0.250	0.335	0.205	0.135
ABTS ^{•+} /ABTS ^{••+}	0.680	0.653	0.739	0.593	0.539

Tabla 3. Diferencias encontradas para valores de $E_{1/2}$, en el estudio del sistema ABTS/ABTS^{•+}/ABTS^{••+}, cuando son referidos al ferricinio/ferroceno (Fc⁺-Fc).

Se observa (tabla 3) que para el sistema ABTS/ABTS^{•+} el potencial de media onda es ligeramente menor en DMSO, con respecto a lo que informan otros autores en disolución acuosa; para el sistema ABTS^{•+}/ABTS^{••+} el potencial de media onda es también menor [33, 39, 40]. Se considera que las diferencias que se encontraron son debidas al efecto del DMSO, que es un disolvente aprótico y altamente dipolar, además de que estabiliza radicales por solvatación, hecho atribuido a sus interacciones dipolo-dipolo con trazas de agua [41], proporcionando un medio más estable al ABTS/ABTS^{•+} y desplazando su valor de potencial en comparación con los que se presentan en disolución acuosa. Un efecto similar sucede para el sistema ABTS^{•+}/ABTS^{••+}; por tal motivo la disminución en el valor de los potenciales de pico y por consiguiente también el de los potenciales de media onda correspondientes a cada proceso de oxidación. Adicionalmente se aprecia que la oxidación sobre electrodos de platino resulta más sencilla que en electrodos de carbón vítreo (ver tabla 3).

El estudio voltamperométrico del ABTS, presenta un primer proceso de oxidación identificado como: $ABTS \rightarrow ABTS^{\bullet+} + 1e^-$, a $E_{1/2}=0.205$ V/Fc⁺-Fc, seguido de un segundo proceso de oxidación: $ABTS^{\bullet+} \rightarrow ABTS^{\bullet\bullet+} + 1e^-$, a $E_{1/2}=0.593$ V/Fc⁺-Fc. De acuerdo con informes previos, ambos procesos son monoeléctricos y reversibles en disolución acuosa [17] y el comportamiento como se observa (figura 7) es similar en DMSO. Para verificar lo anterior, se tiene la tabla 4, que muestra los resultados obtenidos:

i_{pa}	i_{pc}	i_{pa}/i_{pc}	$i_{pa}/i_{pc}=1$
2.61 μA	2.54 μA	1.027	Reversible
E_{pa}	E_{pc}	ΔE_p	$\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa} = 0.059/n$
0.244 V/ Fc ⁺ -Fc	0.166 V/ Fc ⁺ -Fc	0.078 V/ Fc ⁺ -Fc	Monoeléctrico
0.633 V/ Fc ⁺ -Fc	0.548 V/ Fc ⁺ -Fc	0.089 V/ Fc ⁺ -Fc	

Tabla 4. Parámetros representativos en voltamperometría cíclica para el estudio del sistema ABTS/ABTS^{•+}/ABTS^{••+} en DMSO.

III.2.3 Estudio de velocidades de barrido (v_B) del ABTS

Como parte de la caracterización del ABTS en DMSO, se procedió con un estudio a diferentes velocidades de barrido, con la finalidad de precisar cambios en la cinética de los procesos redox del sistema. Sabemos que el cambiar la velocidad de barrido equivale a un cambio en el perfil de concentraciones del ABTS al electrodo, dado que una reacción electroquímica se lleva a cabo en la superficie del mismo, de modo que cuando aumenta la velocidad de barrido, aumenta el gradiente de concentraciones de la especie en la superficie del electrodo y por ende las intensidades de pico [42].

La figura 8 muestra los voltamperogramas de una disolución 0.2 mM de ABTS en DMSO a distintas velocidades de barrido, utilizando un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo.

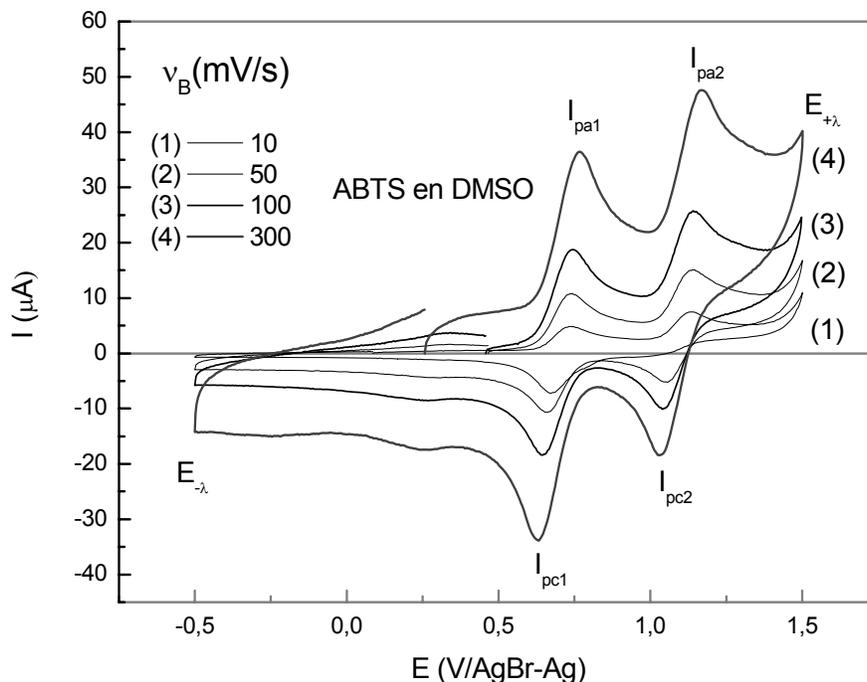


Figura 8. Voltamperogramas de una disolución 0.2 mM de ABTS en DMSO con Bu_4NPF_6 0.1 M como electrolito de trabajo, obtenidos a diferentes velocidades de barrido utilizando un electrodo de carbón vítreo.

Se observa (figura 8), que los potenciales se desplazaron ligeramente cuando la velocidad de barrido aumento, así como las intensidades de pico correspondientes se incrementaron, lo que concuerda con lo informado en otros trabajos [35, 39]. Bourbonnais y col., [34, 36] había sugerido, que a bajas velocidades de barrido, no es posible apreciar el pico correspondiente al proceso de $ABTS^{++} \rightarrow ABTS^{*+}$, debido a reacciones de comproporción, de acuerdo a la siguiente ecuación química:



Cuando la velocidad de barrido se incremento, las transformaciones electroquímicas al electrodo se realizaron rápidamente y ambos procesos redox se observaron reversibles, la reacción en estas condiciones, sucedió en menor grado; mientras que a baja velocidad de barrido, la transformación se llevo a cabo más lentamente, permitiendo la difusión del ABTS al electrodo, favoreciendo así la reacción de comproporción entre éste y el $ABTS^{++}$ (figura 9).

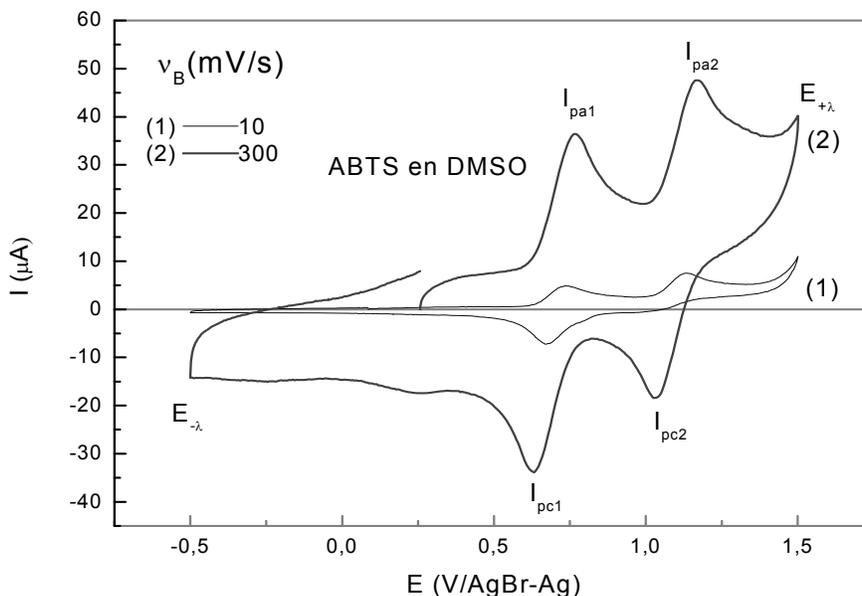


Figura 9. Voltamperogramas de una disolución 0.2 mM de ABTS en DMSO con Bu_4NPF_6 0.1 M como electrolito de trabajo, obtenidos a diferentes velocidades de barrido utilizando un electrodo de carbón vítreo.

III.2.4 Caracterización espectroelectroquímica del ABTS/ABTS^{•+}/ABTS⁺⁺

Se generó electroquímicamente al ABTS^{•+} y ABTS⁺⁺, para obtener los espectros electrónicos en DMSO, a fin de caracterizar espectrofotométricamente ambas especies, así como establecer las longitudes de máxima absorción. La electrólisis del ABTS se realizó con un sistema de “electrodo de capa delgada ópticamente transparente”, OTTLE (por sus siglas en inglés), ésta se llevo a cabo en dos etapas, obteniendo los espectros durante la transformación del ABTS a ABTS^{•+} y de ABTS^{•+} a ABTS⁺⁺.

III.2.4.1 Electrólisis de ABTS

Los cambios espectrales en el sistema OTTLE, durante la electrólisis de ABTS → ABTS^{•+}, se muestran en la figura 10. El experimento se llevo a cabo potencioestáticamente, mediante una cronoamperometría, cuando se aplicó un potencial de trabajo de $E_{imp} = 0.305 \text{ V}/Fc^+ - Fc$ ($0.987 \text{ V}/AgBr-Ag$). Los espectros se obtuvieron a diferentes intervalos de tiempo cada 30 segundos durante una hora.

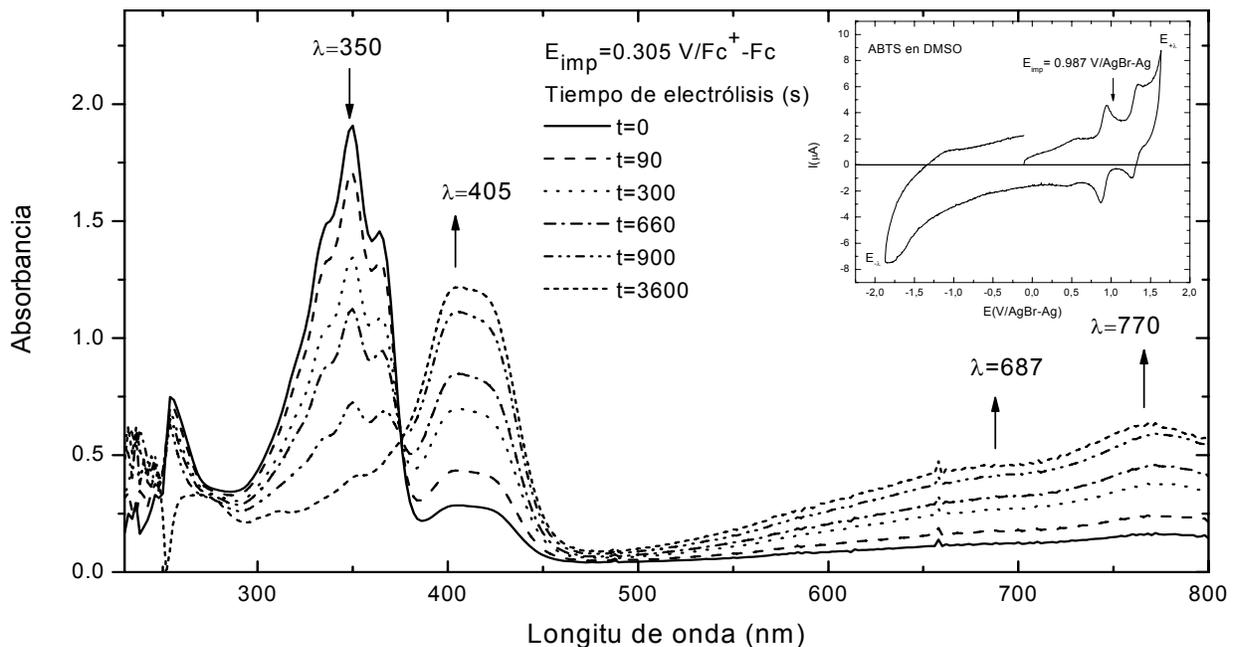


Figura 10. Espectros electrónicos de absorción de ABTS 0.5 mM, obtenidos durante la electrólisis a potencial impuesto (E_{imp}) en un sistema OTTLE, de 1mm de paso óptico, en diferentes tiempos.

Los resultados indican un comportamiento similar a lo informado por Solís y col., [33] y Thomas y col., [42]. La longitud de onda de 350 nm, que se propone para monitorear el avance de la electrólisis, disminuye conforme sucede la reacción, al mismo tiempo se observan incrementos en λ_{max} = 405, 687 y 770 nm, que ahora corresponden a los máximos de absorción característicos del $ABTS^{*+}$, con un coeficiente de absorción molar de ϵ = 2.42×10^4 , 8.6×10^3 y 1.26×10^4 L mol⁻¹ cm⁻¹, respectivamente, esto coincide con el cambio de incoloro a verde oscuro de la disolución, y concuerda con lo informado por Solís y col., [33].

Se sugiere el uso de 687 y 770 nm como longitudes de onda máxima (figura 10), para caracterizar y determinar concentraciones de $ABTS^{*+}$, cuando se trabaja en DMSO, sin interferencias espectrales del ABTS, a diferencia de los 728 nm que sugieren otros autores [33] en disolución acuosa.

III.2.4.2 Electrólisis de $ABTS^{*+}$

En la siguiente etapa, se empleó la disolución de $ABTS^{*+}$ formado en la celda de trabajo. El experimento se llevo a cabo potencioestáticamente, con una cronoamperometría a un potencial de trabajo impuesto de $E_{imp} = 0.605$ V/ $Fc^+ - Fc$ (1.287 V $AgBr - Ag$). Se obtuvieron los espectros electrónicos de absorción de cada 30 segundos durante una hora.

En la figura 11, se muestran algunos de los espectros obtenidos durante la electrólisis de $ABTS^{*+} \rightarrow ABTS^{++}$ en el sistema OTTLE. Como se observa, las longitudes de onda de 405, 687 y 770 nm, disminuyen conforme avanza la reacción, éstos valores corresponden a los máximos de absorción para el radical monocación $ABTS^{*+}$.

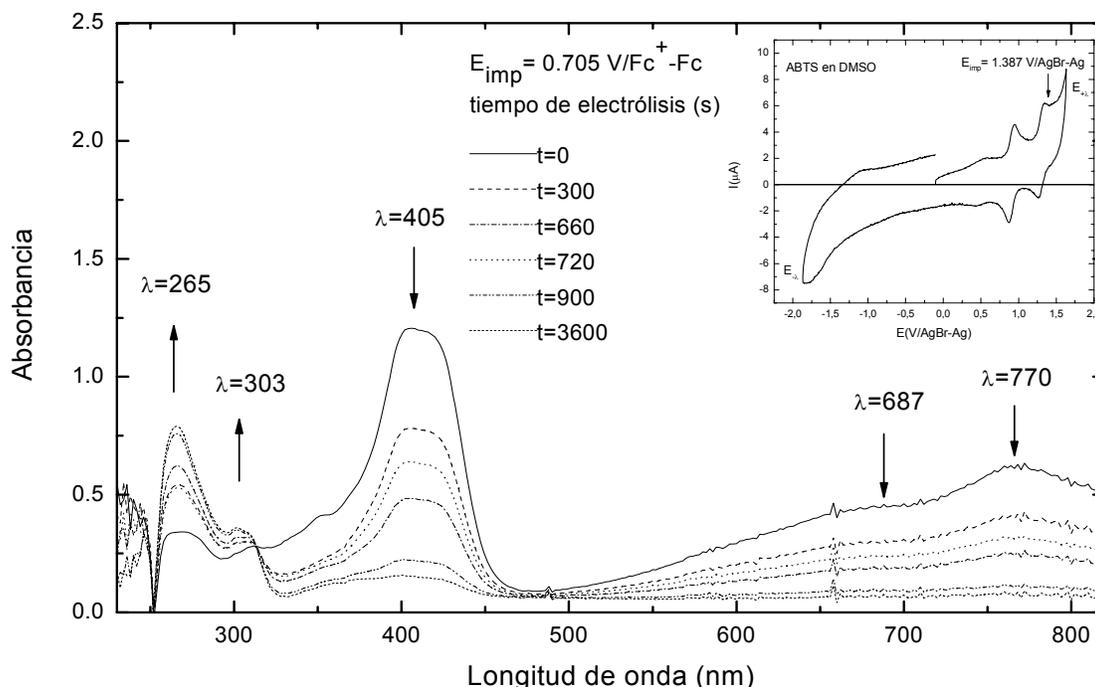


Figura 11. Espectros electrónicos de absorción de $ABTS^{2+}$ obtenidos durante la electrólisis a potencial impuesto (E_{imp}), en un sistema OTTLE, de 1mm de paso óptico, en diferentes tiempos.

Al final de la electrólisis, se observaron dos longitudes de onda características, asociadas a la formación de la especie $ABTS^{2+}$, a $\lambda_{max} = 265$ y 303 nm con coeficientes de absortividad molar de $\epsilon = 1.54 \times 10^4$ y 7×10^3 $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente. Los cambios espectrales observados (figura 11) coinciden con la transformación de la especie colorida $ABTS^{2+}$ al $ABTS^{2+}$ incoloro y la ausencia de alguna otra especie colorida durante la electrólisis. Los resultados son contrarios a lo informado por otros autores para el dicatión, donde afirmaban que dicha especie presentaba una coloración púrpura o roja [24, 25], pero concuerdan con lo informado por Solís y col., [33].

En general, los resultados que presenta la electrólisis del ABTS indican que el radical monocatión $ABTS^{2+}$ puede ser identificado en DMSO en tres longitudes de onda ($\lambda_{max} = 405, 687$ y 770 nm) y el dicatión $ABTS^{2+}$ es incoloro en el disolvente, con dos longitudes de onda característica ($\lambda_{max} = 265$ y 303 nm). Las observaciones electroquímicas mediante el sistema OTTLE, para el ABTS en DMSO, pueden ser utilizadas en estudios posteriores.

III.3 Caracterización espectroscópica

III.3.1 ^1H RMN del ABTS

El espectro de ^1H , figura 14, se realizó empleando DMSO- d_6 como disolvente, en él se observa a un desplazamiento químico (δ) de 1.251 ppm un triplete (t) que integra para 6 hidrógenos, con $J_{9-8}=J_{9'-8'}= 7.2$ Hz, que corresponde a los grupos metilo H-9 y H-9'; a 4.045 ppm un cuarteto (c) que integra para 4 hidrógenos, con $J_{8-9}=J_{8'-9'}= 7.2$ Hz, correspondientes a H-8 y H-8'; a 7.102 ppm un doblete (d) con $J_{4-3}=J_{4'-3'}= 8.4$ Hz que integra para 2 hidrógenos H-4 y H-4'; a 7.490 ppm un doblete (d) con $J_{3-4}=J_{3'-4'}= 8.4$ Hz que integra para 2 hidrógenos H-3 y H-3' y finalmente un singulete (s) a 7.698 ppm que integra para 2 hidrógenos H-6 y H-6'. Estos datos son consistentes con lo informado por el fabricante y tablas de desplazamiento químico [23, 43].

III.3.2 ^{13}C RMN del ABTS

El espectro de ^{13}C del ABTS en DMSO- d_6 se muestra en la figura 15. En él se observan 9 diferentes señales además de la del disolvente. Esto concuerda con lo que se esperaba para los diferentes núcleos del carbón del ABTS. Para realizar una sugerencia de la asignación, se recurre a la información de la bibliografía especializada [43] y a los valores informados para una estructura similar, que corresponde al fragmento benzotiazolona [44]. Con base en esto, la señal con un $\delta=11.693$ ppm en la región de los compuestos alifáticos se propone para C-9 y C-9'; en un $\delta=38.765$ ppm la señal para C-8 y C-8'; a $\delta=108.061$ ppm para C-3 y C-3'; a $\delta=119.941$ ppm para C-6 y C-6'; a $\delta=122.797$ ppm el C-4 y C-4'; a $\delta=124.210$ ppm el C-7 y C-7'; a $\delta=140.612$ ppm el C-2 y C-2'; a $\delta=140.981$ ppm el C-5 y C-5' y finalmente a $\delta=157.355$ ppm al C-1 y C-1'. En la figura 12 se presenta la estructura informada por otros autores [44] con los valores de desplazamiento.

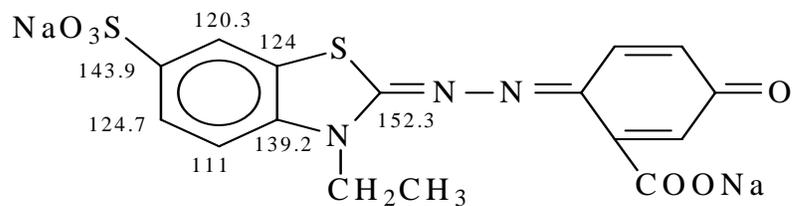


Figura 12. Desplazamientos químicos (δ) en ppm en ^{13}C RMN, para una estructura similar al ABTS.

III.3.3 ^1H RMN del ABTS^{++}

El ABTS^{++} se obtiene por electrólisis en DMSO sin deutarar y como electrolito de trabajo Bu_4NPF_6 0.1 M. La figura 16 muestra el espectro para el producto de la electrólisis del ABTS, debido a la baja concentración del analito (ABTS^{++}) y la alta concentración del electrolito soporte al inicio del proceso (Bu_4NPF_6 se encuentra 400 veces más concentrado que el ABTS^{++}), se observan solamente, una señal intensa en 2.5 ppm (DMSO sin deutarar) y 4 señales correspondientes al electrolito soporte (señales marcadas con * en el espectro). Sin embargo, no se observan en primera instancia señales correspondientes a la estructura del ABTS electrolizado. Realizando una ampliación de las regiones entre 0.2 y 1.0 ppm, entre 3.5 y 3.8 ppm además de la región de los aromáticos en 6 y 8 ppm, es posible observar las siguientes señales: un singulete en $\delta = 7.229$ ppm, dos posibles dobletes a $\delta = 7.058$ y 6.888 ppm, un cuadruplete centrado en $\delta = 3.525$ y un triplete centrado en $\delta = 0.674$ ppm. Existe un acoplamiento entre el cuadruplete y el triplete con $J = 10$ Hz que sugieren la presencia del grupo $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ en el producto de la electrólisis, este grupo muestra un desplazamiento importante en los valores de δ (menor protección), con respecto al observado para el grupo correspondiente en el ABTS ($\Delta\delta \approx 0.56$ ppm). Las señales en la región de los aromáticos indican la presencia de núcleos de hidrógeno en las posiciones 4, 5 y 7 de un anillo benzotiazolona.

Con la información obtenida por RMN y conociendo que el espectro Uv-Vis del producto electrolizado (ABTS⁺⁺), presenta coeficientes de de extinción muy bajos y exclusivamente en la región del ultravioleta, se sugiere que la estructura del compuesto electrolizado corresponde a dos fragmentos idénticos de un derivado benzotiazolona (figura 13). A partir de la estructura que se informa para el ABTS⁺⁺ se propone la formación de los fragmentos de benzotiazolona, que presentan la migración del grupo -CH₂-CH₃ a la posición 2 del anillo. La reacción puede explicarse pues el benzotiazol funciona como una base débil que forma sales cuaternarias con halogenuros de alquilo [45].

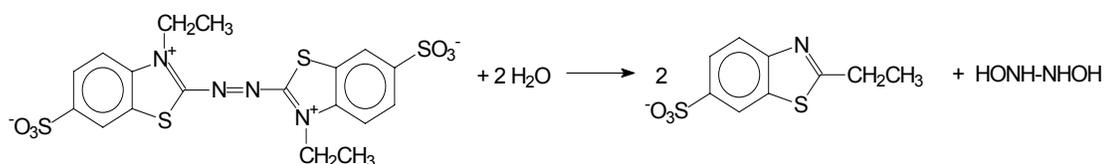


Figura 13. Reacción de descomposición propuesta para la especie ABTS⁺⁺.

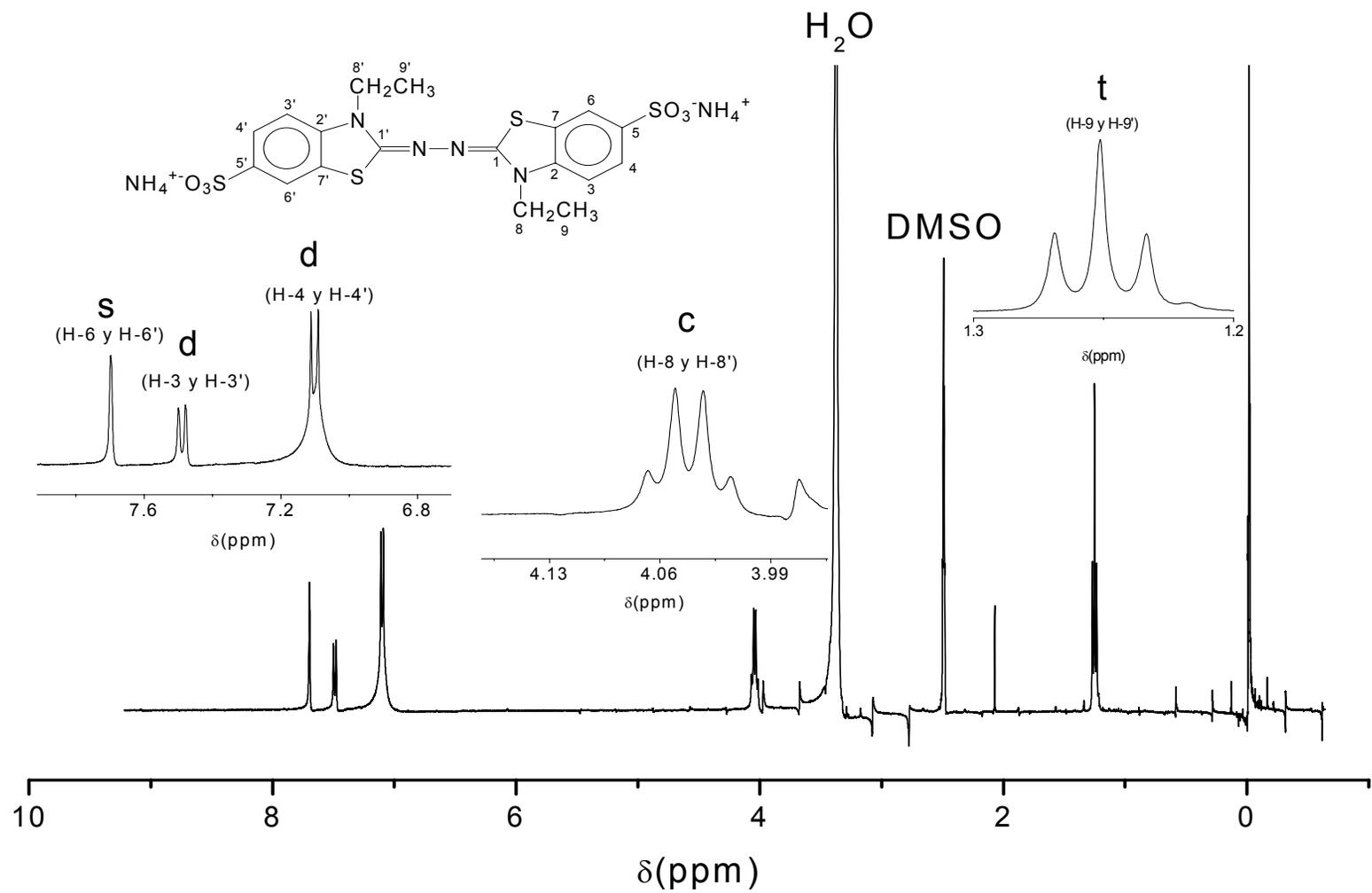


Figura 14. Asignación del espectro ¹H RMN para ABTS a 400 MHZ (298 K), en DMSO-d₆. Referencia interna TMS.

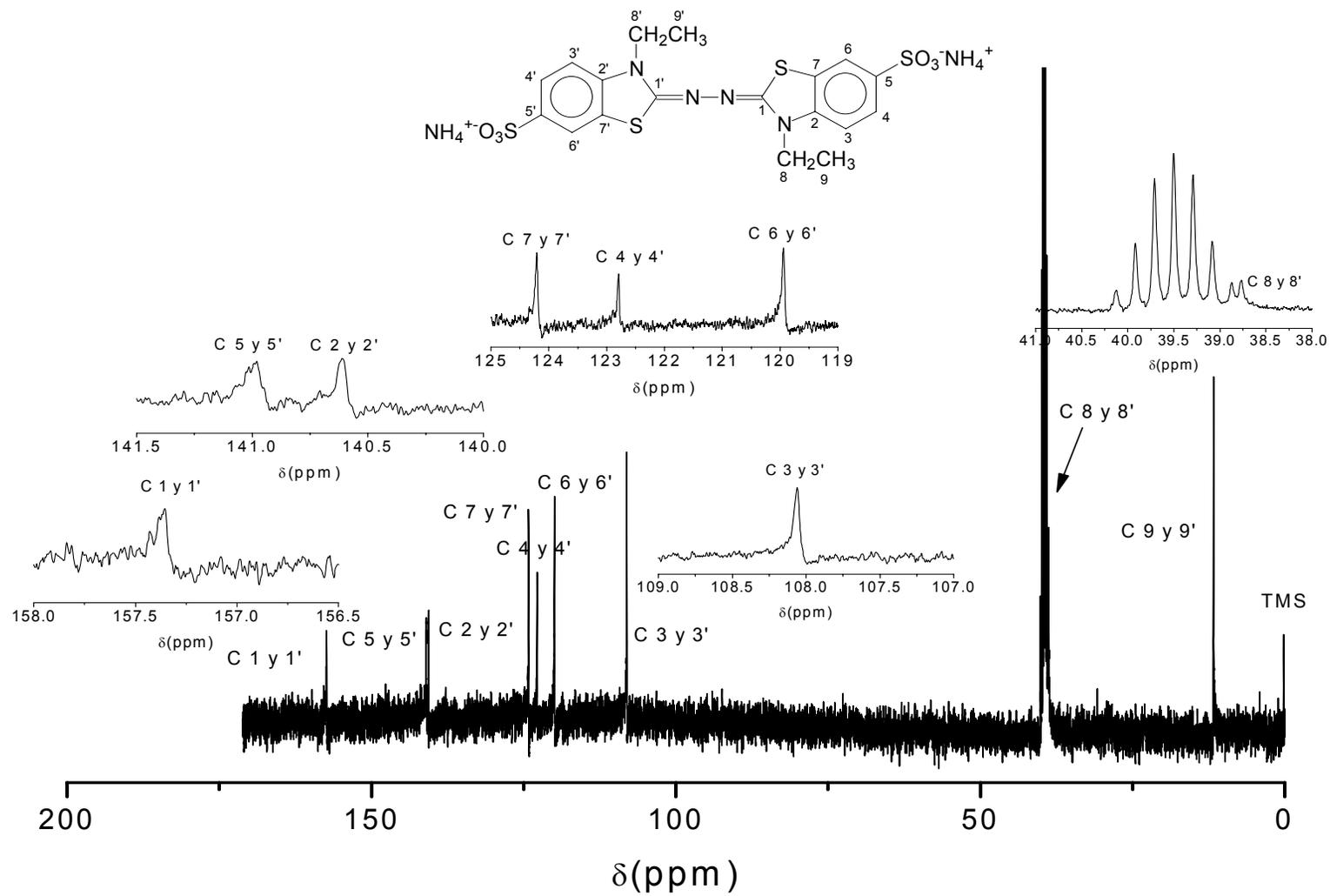


Figura 15. Asignación del espectro ¹³C RMN para ABTS a 125 MHz (298 K), en DMSO-d₆. Referencia interna TMS.

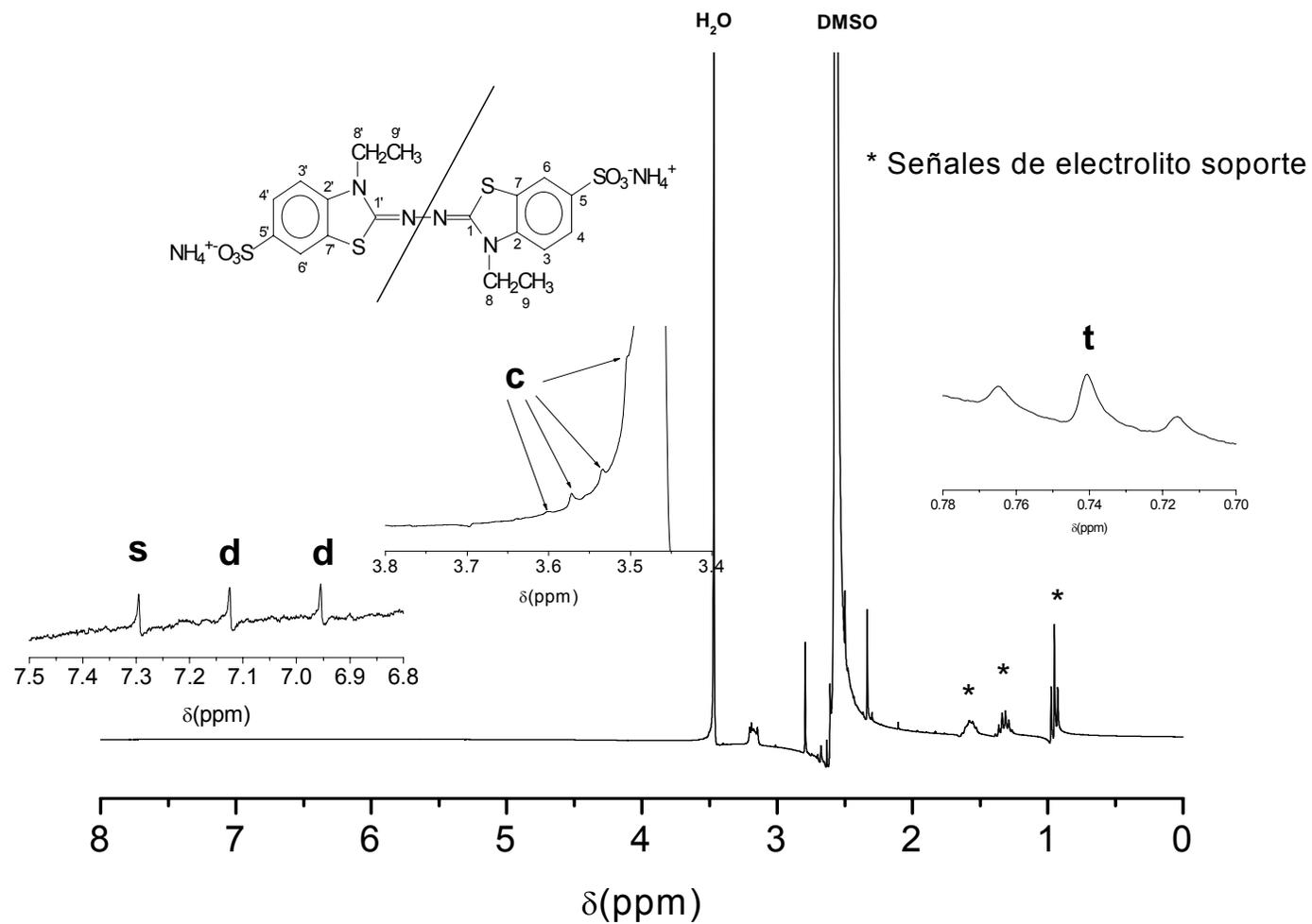


Figura 16. Asignación del espectro ^1H RMN para el producto de la electrólisis del ABTS (posible ruptura), a 400 MHz (298 K), en $\text{DMSO-H}_2\text{O}$ y 0.1M de Bu_4NPF_6 .

CAPÍTULO
IV. Conclusiones

IV. Conclusiones

- En la caracterización por UV-Vis se obtuvieron cuatro longitudes de máxima absorción (λ_{max}) y sus respectivos coeficientes de absortividad molar (ϵ), a diferencia de las dos que se informan en disolución acuosa, las cuales servirán para caracterizar al ABTS en DMSO. Es importante mencionar que se observa una mejor resolución espectral en DMSO que en agua.
- Al evaluar las propiedades electroquímicas del ABTS en DMSO referidas al sistema ferricinio – ferroceno (Fc^+-Fc) y compararlas con lo informado en disolución acuosa por otros autores, se observa una disminución en los potenciales redox del sistema $ABTS/ABTS^{*+}/ABTS^{++}$, efecto que se atribuye a las características del disolvente de trabajo al estabilizar la especie oxidada del par redox correspondiente.
- Los resultados que presenta la electrólisis del ABTS indican que el radical monocatión $ABTS^{*+}$ puede ser identificado en DMSO en tres longitudes de onda ($\lambda_{max}= 405,687$ y 770 nm) y el dicatión $ABTS^{++}$ es incoloro en el disolvente, con dos longitudes de onda característica ($\lambda_{max}= 265$ y 303 nm). Las observaciones espectroelectroquímicas mediante el sistema OTTLE, para el ABTS en DMSO, pueden ser utilizadas en estudios posteriores.
- Se logró establecer parámetros (potencial impuesto y tiempo) (E_{imp} y t) de electrooxidación en el estudio espectroelectroquímico del ABTS en DMSO.

- El estudio de ^1H RMN y de ^{13}C RMN para el ABTS en DMSO, concuerda con lo informado por el fabricante para su identificación; en lo que concierne al estudio de ABTS^{++} no fue posible determinar con certeza que se trataba de la especie que se informa en diversos estudios electroquímicos; debido a las características en el diseño de la electrólisis.
- Sin embargo, con la información que se obtiene del espectro ^1H RMN y compararlo con una posible estructura similar a la que se propone y con la ayuda de tablas para la asignación, es viable determinar que la estructura inicial del ABTS no se conserva durante la electrólisis.
- De forma general se pudo establecer un tándem de técnicas (espectroelectroquímica) para el estudio del ABTS en DMSO.

CAPÍTULO

V. Sección Experimental

V. Sección Experimental

En este capítulo se presentan las materias primas empleadas, así como las características generales de los equipos utilizados en cada una de las etapas del trabajo.

V.1 Materiales

Las características y la calidad de cada uno de los reactivos empleados en este trabajo, se establece con datos del fabricante correspondiente.

V.1.1 DMSO

El dimetil sulfóxido (DMSO) que se utilizó fue de la marca CHROMASOLV® Plus, para HPLC, ≥ 99.7 % de pureza, de la empresa Sigma-Aldrich, con una fórmula molecular $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ y una masa molecular de 78.13 g/mol. Número 200-664-3.

V.1.2 Hexafluorofosfato de tetrabutilamonio

El electrolito de trabajo fue la sal de la marca Fluka, con un grado de pureza electroquímico ≥ 99 %, de la empresa Sigma-Aldrich, con una fórmula molecular $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{N}(\text{PF}_6)$ y una masa molecular de 387.43 g/mol. Número 2214726.

V.1.3 ABTS

El analito ABTS se obtuvo de la marca Sigma[®], con un grado de pureza ~ 98 %, de la empresa Sigma-Aldrich, con una fórmula molecular $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$ y una masa molecular de 548.68 g/mol. Número A-1888.

V.2 Equipos

V.2.1 Caracterización espectrofotométrica

Esta se realizó en un espectrofotómetro con arreglo de diodos, ultravioleta-visible marca Hewlett-Packard HP8452A, las mediciones se hicieron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en el intervalo de longitud de onda (λ) de 190 a 980 nm.

V.2.2 Caracterización electroquímica

Las mediciones fueron realizadas en un potenciostato-galvanostato EG & G PAR modelo 263, con un sistema de tres electrodos, en una solución de hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (0.1M) en DMSO, como electrolito de trabajo. Los electrodos de trabajo fueron un disco de carbón vítreo (0.0706 cm^2) y un disco de platino (0.04 cm^2), como electrodo auxiliar un alambre de platino y como electrodo de cuasi referencia AgBr-Ag en 0.1 M de Bu_4NBr en DMSO. Todos los voltamperogramas fueron iniciados en el potencial de circuito abierto ($E_{i=0}$) y los barridos de potencial fueron realizados en ambas direcciones, positiva y negativa.

V.2.3 Producción electroquímica

El estudio electroquímico, se realizó con un electrodo óptico transparente de capa delgada (OTTLE, por sus siglas en inglés) construido con una malla de platino dentro de una celda de cuarzo de 1 mm de espesor óptico. Ambas oxidaciones del ABTS se monitorearon espectrofotométricamente cada 30 segundos, durante dos horas para obtener ABTS^{++} como producto final de la electrólisis.

V.2.4 Resonancia magnética nuclear

Los espectros del ABTS y de los productos de la electrólisis se realizaron en el espectrómetro de resonancia magnética nuclear marca Varian (Unity Inova) la frecuencia de observación de ^{13}C fue de 100 MHz y a 400 MHz para ^1H , en la unidad de servicios de apoyo a la investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM, utilizando tetrametil silano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm (partes por millón) y la constante de acoplamiento (J) en Hz (hertz). La terminología utilizada para la multiplicidad es: s (singulete), d (doblete), t (tripleto) y c (cuarteto). Las señales de ^1H RMN se asignaron con base al desplazamiento químico y multiplicidad. Las señales de ^{13}C RMN se asignaron calculando el desplazamiento químico.

APÉNDICE

A.1 Voltamperometría

La voltamperometría abarca un conjunto de métodos electroanalíticos en donde la información sobre el analito se deduce midiendo la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización de un electrodo indicador, o de trabajo. Generalmente con el objeto de aumentar dicha polarización los electrodos de trabajo en voltamperometría son microelectrodos que tienen áreas superficiales como máximo de unos pocos milímetros cuadrados y en algunas aplicaciones, unos pocos micrómetros cuadrados o incluso menos [46].

Históricamente, el vasto campo de la voltamperometría se desarrolló a partir de la polarografía, que es un tipo particular de voltamperometría y fue desarrollada por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky a principios de los años veinte, del siglo pasado [47].

La voltamperometría es muy utilizada por los químicos inorgánicos, los fisicoquímicos y los bioquímicos, con objetivos no analíticos que incluyen estudios básicos de procesos de oxidación y reducción en diferentes medios, procesos de adsorción sobre superficies y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados. A mediados de la década de los sesenta se iniciaron diversas modificaciones de las técnicas voltamperométricas que aumentaron significativamente la sensibilidad y selectividad del método. El resultado ha sido la aplicación de estos métodos en la determinación de especies, en particular de aquellas de interés farmacéutico, ambiental y biológico [46, 47]. En el caso particular del ABTS y en general para los compuestos químicos llamados mediadores, es de suma importancia el estudio de los mecanismos por los cuales se transfieren los electrones que participan en los procesos de oxidación-reducción.

A.1.1 Instrumentación en voltamperometría

La celda de trabajo consta de tres electrodos sumergidos en una disolución, la cual contiene al analito problema y también un exceso de un electrolito idealmente “no reactivo” llamado *electrolito soporte*. La configuración consta (figura 16) de un microelectrodo o *electrodo de trabajo*, cuyo potencial se varía linealmente con el tiempo. Sus dimensiones son de tamaño reducido con el objeto de exaltar su tendencia a ser polarizado. El segundo electrodo es un electrodo de referencia (normalmente de la familia de los calomelanos) cuyo potencial permanece constante durante el experimento. El tercer electrodo es un *electrodo auxiliar*, que normalmente es una espiral de alambre de platino, que sirve simplemente para conducir la electricidad desde la fuente de la señal a través de la disolución del microelectrodo y verificar la reacción complementaria que sucede en el electrodo de trabajo [46].

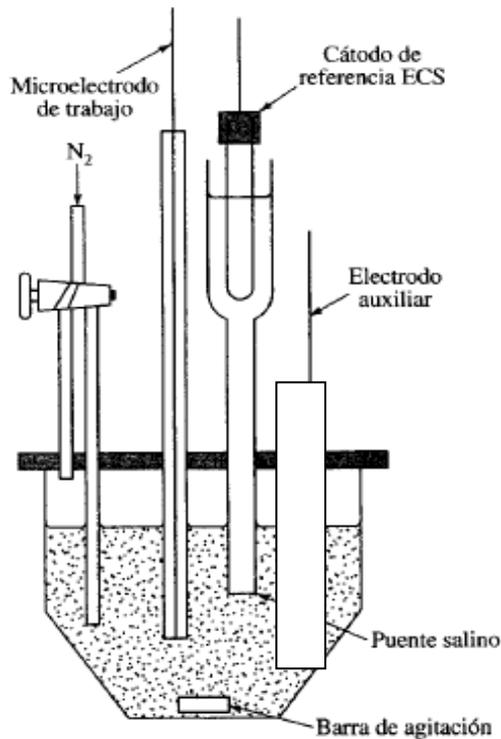


Figura 16. Celda de trabajo en Voltamperometría.

A.2 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica o de barrido triangular, forma parte de las técnicas electroanalíticas, que es utilizada ampliamente, para llevar cabo la caracterización electroquímica de diversas especies [48- 54]. Con esta técnica es posible obtener datos termodinámicos, potenciales rédox, información acerca de la cinética de reacciones de transferencia electrónica así como de las posibles reacciones químicas acopladas a estos procesos.

En voltamperometría cíclica, la información sobre una especie química la podemos deducir a partir de los registros de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado durante un barrido a velocidad constante [43, 54]; esta técnica utiliza, como se ha mencionado, microelectrodos que tienen áreas superficiales como máximo de unos pocos milímetros, por lo que el consumo de la especie química en estudio es mínimo, el barrido de potencial se realiza en forma cíclica entre dos valores: lo que se realiza primero es variar el potencial linealmente en función del tiempo hasta llegar a un valor máximo; cuando se alcanza este valor, el sentido del barrido del potencial se invierte, y entonces el potencial regresa hasta su valor original. Los potenciales a los cuales ocurre la inversión del barrido del potencial se denominan potenciales de inversión ($E_{\pm \lambda}$). La dirección del barrido del potencial puede ser en sentido negativo (barrido catódico) o en sentido positivo (barrido anódico). El intervalo de potenciales de inversión que elegimos para un experimento determinado es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o más analitos, y dependiendo de la composición de la muestra el barrido inicial puede ser en la dirección negativa o positiva (a los barridos en la dirección de los potenciales más negativos a menudo se le denomina *barrido directo*, mientras que uno en la dirección opuesta se le llama *barrido inverso*).

En la técnica de voltamperometría cíclica, dado que se lleva a cabo sin agitación, observamos un régimen de difusión no estacionario. Entonces si el potencial de trabajo o de circuito abierto (OCP, por sus siglas en inglés), cambia con respecto al tiempo desde el potencial de corriente nula ($E_{i=0}$) hacia valores negativos, aparecerá una corriente farádica de reducción, esta dependerá de la transferencia de electrones, hasta llegar a un máximo de corriente o pico; posteriormente la corriente dependerá de la difusión de la especie electroactiva al electrodo. Finalmente, se observará una total dependencia de la corriente con la difusión de la especie al electrodo. Cuando se alcanzan valores de potencial en donde la corriente se encuentra limitada por la difusión, en las cercanías del electrodo solo se encontrará la especie que es el producto de la electrólisis; si al llegar a esos valores de potencial se invierte el sentido del barrido, es posible detectar a dicha especie, obteniéndose así un pico correspondiente a la oxidación de igual magnitud que el primero, el cual se considera como un sistema rápido y/o reversible sin reacciones químicas acopladas, como se observa en la figura 17 [55].

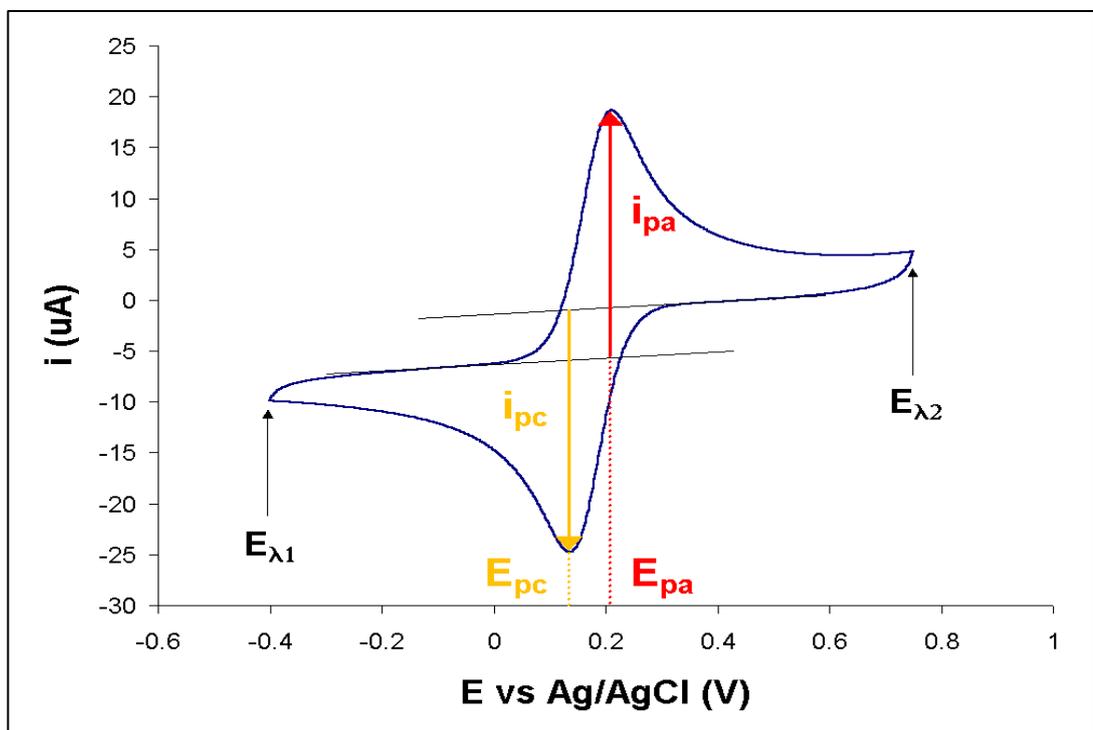


Figura 17. Voltamperograma cíclico típico de un sistema reversible.

Algunos de los parámetros electroquímicos más importantes, que se obtienen en los voltamperogramas cíclicos son:

- El potencial de pico catódico E_{pc}
- El potencial de pico anódico E_{pa}
- La corriente de pico catódica i_{pc}
- Y la corriente de pico anódica i_{pa}

Estos parámetros se definen tal como se indica en la figura 17, partir de los valores de los potenciales de pico es posible obtener el valor de potencial de media onda, $E_{1/2}$, que se relaciona con el potencial rédox del par analizado, que se puede estimar de acuerdo con la expresión:

$$E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$$

Para una reacción electroquímica reversible el potencial de pico (E_p) se define como:

$$E_p = E^{\circ'} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_{ox}^{1/2}}{D_{red}^{1/2}} + 1.109 \frac{RT}{nF}$$

Donde: E° = potencial redox estándar; n= número de electrones intercambiados; D= coeficiente de difusión; R= constante de los gases, F= constante de Faraday y T= temperatura, y por consiguiente $E_{1/2} = E^{\circ'}_{1/2} + 0.285/n$ [55].

Para un proceso electroquímico rápido, en donde no hay reacciones químicas acopladas, las corrientes de pico deben de ser iguales pero de signo opuesto, por lo que la relación entre las intensidades de corriente (i_{pa}/i_{pc}) es igual a 1; y la diferencia entre los potenciales de pico $\Delta E_p = E_{pc} - E_{pa} = 0.059/n$ V, además los valores de E_p no varían con la velocidad de barrido de potencial.

A.3 Espectroelectroquímica

La electroquímica puede proporcionar tanto información termodinámica como cinética sobre una gama de procesos químicos conducidos por la transferencia de electrones. Sin embargo, la electroquímica en pocas ocasiones sin lugar a dudas puede identificar la especie electroactiva; la identidad molecular de un nuevo material electrogenerado, es deducida comúnmente a partir de las mediciones de las propiedades físicas de un sistema estándar conocido. Además, la electroquímica proporciona sólo información limitada e indirecta sobre cambios estructurales que acompañan procesos redox.

En las dos décadas pasadas, las técnicas espectroelectroquímicas (p. ej., el tándem de métodos espectroscópicos y electroquímicos) han sido explotadas a través de usos diversos en los límites de la química inorgánica y orgánica a la bioquímica. Espectroscópicamente se adquiere la información molecular controlando el potencial, incluyendo frecuencias vibracionales, absorptividades molares, intensidades de luminiscencia, y frecuencias de resonancia electrónicas o magnéticas, están ahora disponibles en forma rutinaria. Tales combinaciones de técnicas electroquímicas y espectroscópicas han contribuido a la aclaración de mecanismos de reacción de transferencia de electrones y al entendimiento de estados fundamentales moleculares en interfaces. Por ejemplo, la espectroelectroquímica puede proveer pistas al dilucidar mecanismos de procesos fotoinducidos en la transferencia de electrones que provienen de los productos estáticos que reflejan aquellos que son producidos fugazmente en la transición espectroscópica.

La espectroelectroquímica convencional implica la macroelectrólisis de un analito en una celda de bajo volumen combinada con la investigación espectroscópica *in situ* simultánea o subsecuente. El punto clave es que las investigaciones *in situ* con estudios espectroscópicos emprendidos dentro de una celda electroquímica se realizan controlando el potencial.

Los experimentos espectroelectroquímicos son con frecuencia cualitativos y son usados para caracterizaciones estructurales de una especie redox intermedia. Las medidas cuantitativas pueden ser experimentalmente un reto, porque requieren el arreglo geométrico riguroso de la celda a fin de evitar problemas como la caída óhmica (iR) y la baja densidad de corriente como una consecuencia del tamaño relativo del electrodo de trabajado y su orientación con respecto a otros electrodos.

El diseño de la celda espectroelectroquímica depende en forma crítica de la técnica espectroscópica usada. La mayor parte de las celdas siguen la configuración convencional de tres electrodos: el de referencia, el auxiliar y un electrodo de trabajo sobre el cual el paso óptico generalmente es dirigido. Otro rasgo común de los métodos espectroelectroquímicos es la exigencia de pequeños volúmenes de reactivo para reducir al mínimo el tiempo requerido para que la celda alcance el equilibrio en el potencial aplicado. Pequeños volúmenes de la disolución también pueden reducir al mínimo la interferencia de fondo del disolvente y el electrólito. Las celdas de capa fina son por consiguiente comunes en espectroelectroquímica.

A.4 Electroquímica de capa fina

Un desafío en la utilización de las macroelectrólisis para generar especies redox para investigaciones espectroscópicas *in situ*, es el de reducir al mínimo el tiempo para la electrólisis exhaustiva. El acercamiento más común usa un electrodo grande de trabajo con una proporción área-volumen de la disolución adecuada para crear una transferencia de masa convectiva eficiente.

Una gama extensa de electrodos de capa fina ópticamente transparentes (OTTLE) en diseños electroquímicos ha sido usada para experimentos de transmisión en electroquímica electrónica [56]. Algunos diseños de OTTLE simples, para la espectroscopia electrónica en celdas estáticas y de flujo se muestran en la figura 19.

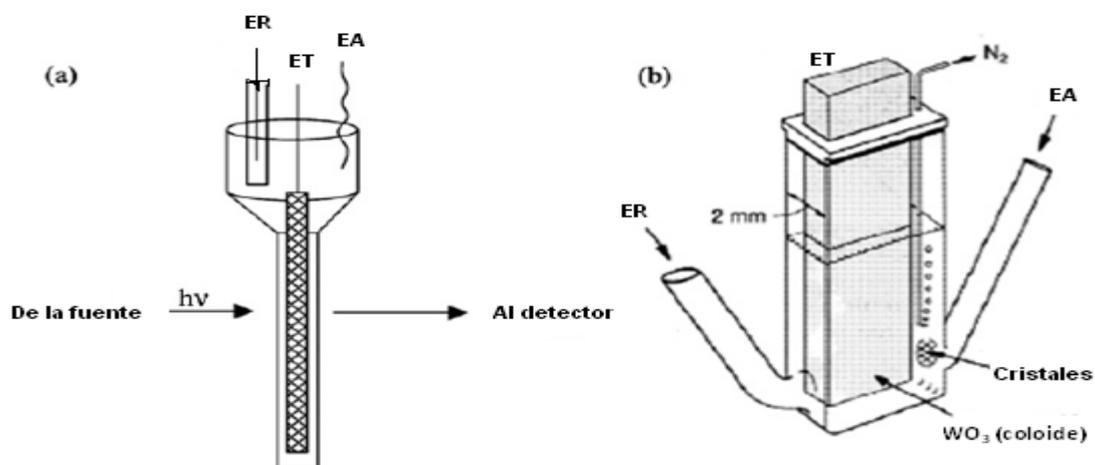


Figura 19. Celdas OTTLE (a) el empleo de un electrodo de trabajo (ET) en forma de red metálica y la cubeta convencional con el depósito para el electrodo auxiliar (EA) y el de referencia (ER), (b) Cubeta con brazos a los lados para el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar. Copyright 1989 and 1993, American Chemical Society.

En el acercamiento más simple, una cubeta de cuarzo de longitud de paso corto es construida con un depósito en lo alto y con brazos a los lados en los cuales los electrodos de referencia y auxiliar pueden ser colocados.

Un arreglo común en la geometría de capa fina es el de emparedado, la disolución se encuentra entre el cristal y un electrodo que usa teflón o un espaciador Kapton; tales celdas están ahora disponibles en forma comercial.

Para un arreglo de capa fina, el ancho de la celda por la cual el rayo de excitación es dirigido esta entre rangos de 50 y 250 μm y la velocidad de electrólisis es controlada por difusión finita.

En electrólisis de tiempos cortos cuando el transporte de masas ocurre vía la difusión lineal, el tiempo aproximado (t), requerido para una electrólisis total en la celda está dada por:

$$t = \delta^2 / \pi D$$

Donde δ es el grosor de capa fina y la D es el coeficiente de difusión del analito. Tomando un coeficiente de difusión típico de $1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, la ecuación (14.1) predice que a 25 μm de paso de longitud para una celda electroquímica común [56] puede realizarse exhaustivamente la electrólisis en ~ 200 ms (milisegundos). Esta electrólisis relativamente rápida puede proporcionar la oportunidad para la colección de información dinámica. En un sistema heterogéneo con la transferencia de electrones lenta, este tiempo puede ser ampliado considerablemente.

La celda por lo general es construida de modo que esta contenga dentro una celda de un espectrómetro convencional o pueda ser usada con un espectrómetro de fibra óptica. Los electrodos de referencia y auxiliar deberían ser suficientemente pequeños para caber en el depósito o pueden ser soldados a la ventana de no conducción de la celda. La eliminación del oxígeno con frecuencia es alcanzada al burbujear un gas inerte como el argón o el nitrógeno en la disolución antes de la electrólisis y manteniendo una capa sobre esta durante la electrólisis.

Bibliografía

- [1] Harris D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*. 2ª Edición. Ed. Reverte. 2001.
- [2] Baeza A. *Tácticas y Estrategias en Electroquímica Orgánica*. Fac. de Química. U.N.A.M.
- [3] Nelson D. L. and Cox M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition. Freeman W. H. 2006.
- [4] Thurston C. F., *The structure and function of fungal laccases.*, Microbiology 1994, 140: 19-26.
- [5] Bourbonnais R., and Paice M. G., *Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for lactase in lignin biodegradation.*, FEBS 1990, 1: 99-102.
- [6] Bourbonnais R., Paice M. G., Reid I. D., Lanthier P., and Yaguchi M., *Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from Trametes versicolor and Role of the Mediator 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization.*, Applied and Environmental Microbiology, 1995,5:1876–1880.
- [7] Collins P. J., Kotterman M. J. J., Field J. A., and Dobson D. W., *Oxidation of Anthracene and Benzo [a] pyrene by Laccases from Trametes versicolor.*, Applied and Environmental Microbiology, 1996, 12: 4563–4567.
- [8] Li K., Xu F., and Eriksson K. E., *Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound.*, Applied and Environmental Microbiology, 1999, 6: 2654–2660.

- [9] Xu H., Lai Y. Z., Slomczynski D., Nakas J. P., and Tanenbaum S. W., *Mediator-assisted selective oxidation of lignin model compounds by laccase from Botrytis cinerea.*, Biotechnology Letters, 1997, 10: 957-960.
- [10] Eggert C., Temp U., Dean J. F. D., and Eriksson K. E., *Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid.*, FEBS Letters, 1995, 376: 202-206.
- [11] Xu F., *Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases.*, The Journal of Biological Chemistry, 1997, 2: 924-928.
- [12] Ahn M. Y., Dec J., Kim J. E., and Bollag J. M., *Bioremediation and Biodegradation. Treatment of 2,4-Dichlorophenol Polluted Soil with Free and Immobilized Laccase.*, J. Environ. Qual, 2002, 31: 1509–1515.
- [13] Xu F., *Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition.*, Biochemistry 1996, 35: 7608-7614.
- [14] Lee K., Nam W. S., and Han G. Y., *Photocatalytic water-splitting in alkaline solution using redox mediator. 1: Parameter study.*, International Journal of Hydrogen Energy, 2004, 29: 1343 – 1347.
- [15] Bechtold T., Burtscher E., and Turcanu A., *Anthraquinones as mediators for the indirect cathodic reduction of dispersed organic dyestuffs.*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 1999, 465: 80-87.
- [16] Johannes C., and Majcherczyk A., *Laccase activity tests and laccase inhibitors.*, Journal of Biotechnology, 2000, 2: 193–199.

[17] Johannes C., and Majcherczyk A., *Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems.*, Applied and Environmental Microbiology, 2000, 2: 524–528.

[18] Soares G. M. B., Pessoa de Amorim M. T., and Costa-Ferreira M., *Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R.*, Journal of Biotechnology, 2001, 89: 123–129.

[19] Claus H., Faber G., König H., *Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases.*, Applied Microbiology Biotechnology, 2002, 59:672–678.

[20] Fabbrini M., Galli C., and Gentili P., *Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase.*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 16: 231-240.

[21] <http://www.irnase.csic.es/users/delrio/repository%20patents/2003-Camarero-WO03052201A1.pdf> (marzo, 2009).

[22] <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/BA/2003/20/1/BA002001057-065.pdf> (marzo, 2009).

[23] www.sigma-aldrich.com (marzo, 209).

[24] Bourbonnais R., Leech D., and Paice M. G., *Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds.*, Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1379: 381-390.

[25] Barreca A. M., Fabbrini M., Galli C., Gentili P., and Ljunggren S., *Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures.*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 26: 105–110.

[26] Childs R. E., and Bardsley W. G., *The steady-State Kinetics of Peroxidase withm 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as Chromogen.*, Biochemistry Journal, 1975, 145: 93-103.

[27] Scott S. L., Chen W. J., Bakac A., and Espenson J. H., *Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions.*, The Journal of Physical Chemistry, 1993, 97: 6710-6714.

[28] Kim Y., Cho N-S., Eom T-J., and Shin W., *Purification and Characterization of a Laccase from Cerrena unicolor and Its Reactivity in Lignin Degradation.*, Bull. Korean Chem. Soc, 2002, Vol. 23, No. 7., 985-989.

[29] d'Acunzo F., Galli C., and Masci B., *Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues.*, Eur. J. Biochem. (2002) FEBS, 269, 5330–5335.

[30] Gouka R. J., Van Der Heiden M., Swarthoff T., and Verrips C. T., *Cloning of a Phenol Oxidase Gene from Acremonium murorum and Its Expression in Aspergillus awamori.*, Applied and Environmental Microbiology, (2001) Vol. 67 No. 6., 2610-2616.

[31] Tiller J., Berlin P., and Klemm D., *A novel efficient enzyme-immobilization reaction on NH₂ polymers by means of l-ascorbic acid.* Biotechnol., Appl. Biochem, 1999, 30: 155-162.

[32] Muñoz C., Guillen F., Martínez A., and Martínez M., *Laccase isoenzymes of Pleurotus eryngu: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn⁺² oxidation.*, Applied and Environmental Microbiology, 1997, 6: 2166-2174.

[33] Solís-Oba M., Ugalde-Saldívar V. M., González I., and Viniegra-González G., *An electrochemical–spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase.*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005, 579: 59–66.

[34] Bourbonnais R., Paice M. G., Freiermuth B., Bodie E., and Borneman S., *Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds.*, Applied and Environmental Microbiology, 1997, 12: 4627-4632.

[35] Majcherczyk A., Johannes C., and Hüttermann A., *Oxidation of aromatic alcohols by laccase from Trametes versicolor mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication.*, Applied Microbiology Biotechnology, 1999, 51: 267-276.

[36] Bourbonnais R., and Paice M., *Voltametric Measurement of Lignin in Pulp and Paper Samples. An Electron Transfer Catalytic Approach with Mediators.*, Journal of Electrochemical Society, 2004, 7: E246-E249.

[37] Call H P., and Mücke I., *Minireview: History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process).*, Journal of Biotechnology, 1997, 53: 163–202.

[38] Lund M., and Claus F., *Process for treating pulp with laccase to increase paper wet strength.*, United States, patent 6 610 172, 2003.

[39] Castro M. A., *Oxidación Enzimática de Substratos Utilizando Diversos Mediadores.*, Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana., 2005.

[40] Torres L., *Deslignificación de Pulpa de Papel Mediante un Sistema de Reciclaje del Mediador ABTS²⁻ y un Proceso Organosolv Acoplados.*, Tesis de Maestría., Universidad Autónoma Metropolitana., 2006.

[41] Sawyer D. T. Sobkowiak A. and Roberts J. L. *Electrochemistry for Chemists*. Wiley-Interscience Publication. Second Edition., New York. 1995.

[42] Thomas J. H., Drake J. M., Paddock J. R., Conklin S., and Johnson J., *Characterization of ABTS at a Polymer-Modified Electrode.*, *Electroanalysis*, 16 No. 7., 2004.

[43] Pretsch E. and Bühlmann P. *Structure determination of organic compounds : tables of spectral data*. Springer. Alemania 2000.

[44] Matsumura E., Yamamoto E., and Murao S., *Structures of the laccase-catalyzed Oxidation Products of Hydroxy-benzoic Acids in the presence of ABTS.*, *Agric. Biol. Chem.*, 50 (5), 1355-1357, 1986.

[45] Acheson R. M. *Química Heterocíclica*. Publicaciones Cultural. México 1985.

[46] Skoog D. A. Holler F. J. y Nieman T. A. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª. Edición. McGraw-Hill. España 2001.

[47] Flato J. B., *The Renaissance in Polarographic and Voltammetric Analysis.*, *Analytical. Chemistry*, 1972, 11, 75A.

[48] Li H., Webb S. P., Ivanic J., and Jensen J. H., *Determinants of the Relative Reduction Potentials of Type-1 Copper Sites in Proteins.*, *Journal American Chemical Society* 2004, 126, 8010-8019.

[49] Armstrong F. A., Hill H. A. O., and Walton N. J., *Direct Electrochemistry of Redox Proteins.*, *Acc. Chem. Res.*, 1988, 11, 407-413.

[50] Neves A., Rossi L. M., Bortoluzzi A. J., Szpoganicz B., Wiezbicki C., and Schwingel E., *Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable Cu-OH(phenol) Moieties.*, Inorganic Chemistry, 2002, 41, 1788-1794.

[51] Belle C., Beguin C., Gautier-Luneau I., Hamman S., Philouze C., Pierre J. L., Thomas F., Torrelli S., Saint-Aman E., and Bonin M., *Dicopper(II) Complexes of H-BPMP-Type Ligands: pH-Induced Changes of Redox, Spectroscopic (^{19}F NMR Studies of Fluorinated Complexes), Structural Properties, and Catecholase Activities.*, Inorg. Chem, 2002, 3, 479-491.

[52] Gagne R. R., Koval C. A., Smith T. J., and Cimolino M. C., Binuclear complexes of macrocyclic ligands. *Electrochemical and spectral properties of homobinuclear CuII CuII , CuII CuI , and CuI CuI species including an estimated intramolecular electron transfer rate.*, J. Am. Chem. Soc, 1979, 101, 4571-4580.

[53] Sosa A. M., Ugalde-Saldívar V. M., González I., and Gasque L., *Electrochemical studies of a dinuclear copper complex with imidazole derivative ligand $\text{H}_3\text{bphenim}$.*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005, 579: 103-111.

[54] Bard A. J. and Faulkner L. R. *Electrochemical Methods*. Wiley. New York. 2001.

[55] González L., *Estudio electroquímico de la reacción de oxidación del H_2DTCB catalizada por el compuesto Cu_2Dimp .*, Tesis., Facultad de Química., UNAM., México., 2008.

[56] Zoski C. G. *Handbook of Electrochemistry*. First edition 2007, Elsevier.