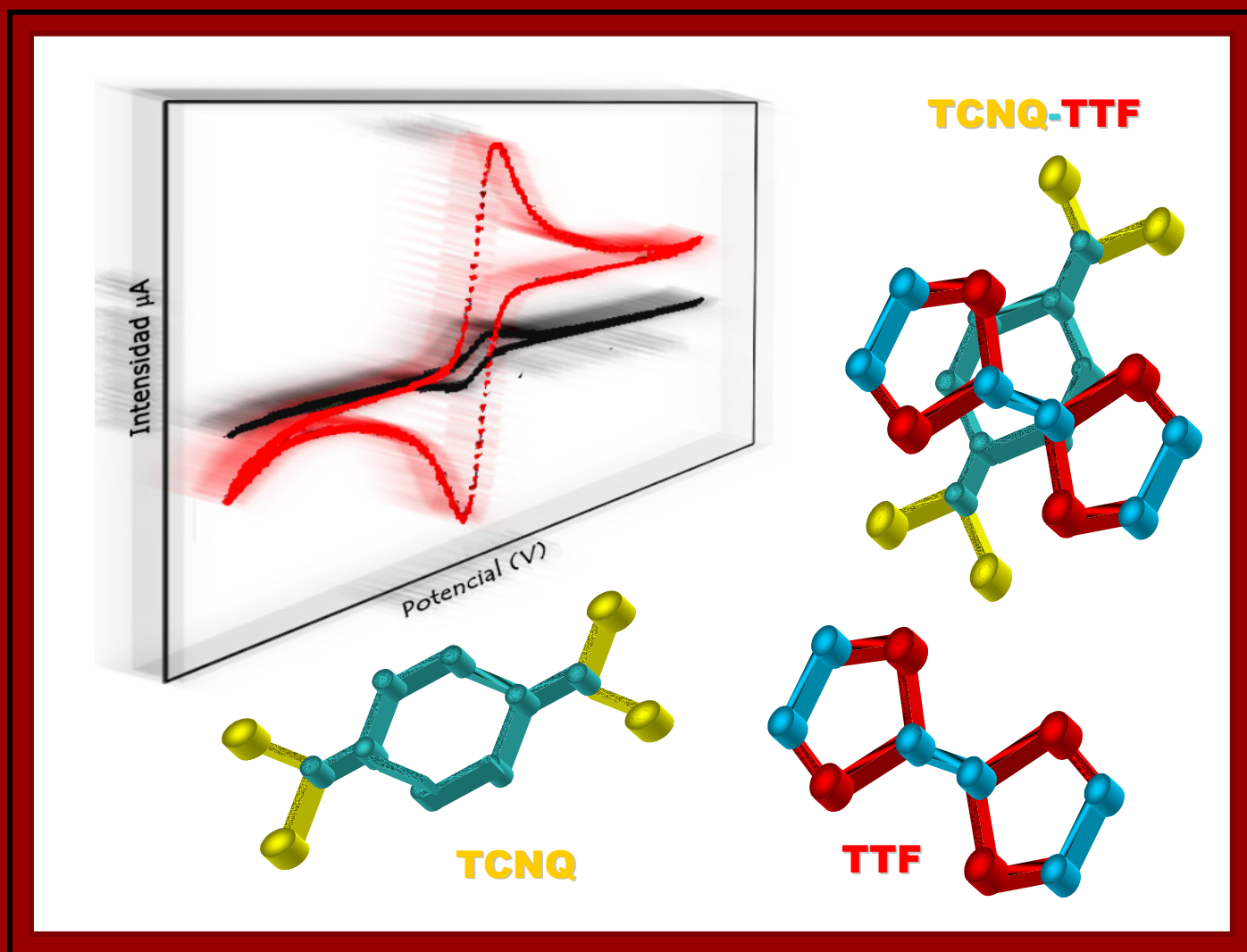


Tesis Doctoral

Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras



Manuel Cano Luna

**Departamento de Química Física y
Termodinámica Aplicada**

Noviembre 2008

TITULO: *Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras*

AUTOR: *MANUEL CANO LUNA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2008
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-7801-931-1
D.L.: CO-118/2009



**Departamento de Química Física
y Termodinámica Aplicada
Universidad de Córdoba**

**DISEÑO Y APLICACIÓN
DE SENSORES ELECTROQUÍMICOS
BASADOS EN MOLÉCULAS ORGÁNICAS CONDUCTORAS**

**Tesis Doctoral
Manuel Cano Luna**

Córdoba, Noviembre 2008

DISEÑO Y APLICACIÓN
DE SENSORES ELECTROQUÍMICOS
BASADOS EN MOLÉCULAS ORGÁNICAS CONDUCTORAS

DIRECTOR,

Fdo.: Rafael Rodríguez Amaro
Profesor Titular del Departamento de
Química Física y Termodinámica
Aplicada de la Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Fdo.: Manuel Cano Luna
Licenciado en Ciencias Químicas



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
Y TERMODINÁMICA APLICADA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D. Rafael Rodríguez Amaro, Profesor Titular del Departamento del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba.

INFORMA:

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral por D. Manuel Cano Luna, titulado “*Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras*”, ha sido realizada bajo mi dirección en los laboratorios de este Departamento, así como en las instalaciones del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid y del Laboratorio de Electroquímica, Materiales Inteligentes y mecanismos (CEMI) de la Universidad Politécnica de Cartagena, y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Y para que conste, firmo el presente en Córdoba a veintinueve de septiembre de dos mil ocho.

Fdo.: Rafael Rodríguez Amaro



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
Y TERMODINÁMICA APLICADA
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D. Luis Camacho Delgado, Catedrático y Director del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba

INFORMA:

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral por D. Manuel Cano Luna, titulado “*Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras*”, ha sido realizada en los laboratorios de este Departamento, así como en las instalaciones del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid y del Laboratorio de Electroquímica, Materiales Inteligentes y mecanismos (CEMI) de la Universidad Politécnica de Cartagena, y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Y para que conste, firmo el presente en Córdoba a veintinueve de septiembre de dos mil ocho.

Fdo.: Luis Camacho Delgado

El trabajo que engloba la presente Memoria se ha realizado durante el periodo de disfrute de un Contrato de Investigación a jornada parcial con cargo al Proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia titulado “*Sales Orgánicas Conductoras. Formación y Empleo como material electródico*” (CTQ2004-01677). Ha sido financiado por los Proyectos CTQ2004-01677 y CTQ2007-60387 del Ministerio de Educación y Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mi director, D. Rafael Rodríguez Amaro, que me ha sabido orientar durante el desarrollo de esta tesis. Mi agradecimiento.

A Beatriz y Antonio porque sin ellos esta tesis no hubiera sido posible. A Loren por su inestimable ayuda. También a todas las personas que forman o han formado parte de este Departamento, por su colaboración y por ser mi familia durante todo este tiempo.

A Rafa y a Juanjo, mis compañeros de piso, por los buenos momentos vividos. A los compañeros de la Universidad Pablo Olavide con los que he compartido este último año. Especialmente a José María por confiar en mí y apoyarme en todo momento.

Finalmente, a todos los miembros de mi familia, que nunca han dejado de animarme, gracias por vuestro apoyo incondicional. Y a Aurora, por todo.

Bueno, si estás leyendo esto, es muy posible que merezcas estar en esta página. Si no estás, no lo tengas en cuenta, así que GRACIAS.



A mis padres

Y a mi hermana

Índice

OBJETIVOS.....	1
RESUMEN.....	4
Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	8
1. Moléculas Orgánicas Conductoras.....	10
2. Sensores Químicos y Biosensores.....	19
3. Electrodo Compósito.....	41
4. Electrodo Modificado Químicamente.....	45
5. Técnicas Electroquímicas.....	52
Capítulo II. EXPERIMENTAL.....	67
Capítulo III. SENSORES DE DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA.....	73
1. Preparation and Characterization of a PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode..	75
2. A PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode for use as Detector in Flow Injection Analysis.....	90
3. Simultaneous determination of ascorbic and uric acid by using a PVC/TTF- TCNQ composite electrode as detector in FIA system.....	98
4. A new, third generation, PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination.....	110

Capítulo IV. SENSORES DE DETECCIÓN VOLTAMÉTRICA.....	124
1. A TTF-TCNQ Electrode as Voltammetric Analogue of an Ion-Selective Electrode.....	126
2. Use of Butler-Volmer treatment to assess the capability of voltammetric ion sensors. Application to a PPy/DBS film for cations detection.....	140
3. A new method based in the Butler-Volmer equation to evaluate Voltammetric cation and anion sensors.....	152
DISCUSIÓN CONJUNTA.....	177
CONCLUSIONES.....	182
APÉNDICES.....	186

OBJETIVOS

El trabajo desarrollado en la presente Memoria se encuadra en la línea de investigación “Sales Orgánicas Conductoras. Formación y empleo como material electródico” de los Proyecto CTQ2004-01677 y CTQ2007-60387 del Ministerio de Educación y Ciencia de España. Los objetivos globales que se han marcado son:

- a) La formación de las Sales Orgánicas Conductoras (OCS), y su empleo como material electródico, bien a escala policristalina (polvo) o monocristalina, o bien como películas delgadas (thin film).
- b) Para obtener las OCS se emplean los métodos de precipitación-cristalización, de electrocristalización, o de autoensamblamiento (SAMs). Una vez formadas, se emplean en la fabricación de electrodos tipo composite, electrodos modificados, o electrodos óptimamente transparentes (OTEs).
- c) Como constituyente de las OCS se utilizan diferentes derivados de tetracianoquinodimetanos (TCNQ), tetratiofulvalenos (TTF) y viológenos (alquil bipyridinas).
- d) Los procesos de nucleación y crecimiento de las sales, así como su comportamiento electroquímico son analizados mediante diferentes técnicas electroquímicas, tales como Voltamperometría cíclica, Cronoamperometría y Curvas capacidad-potencial.
- e) Los tipos de complejos de transferencia formados en las OCS y la orientación molecular en ellos se estudian mediante técnicas espectroscópicas, empleando espectroscopia de reflexión y/o transmisión de Infra-Rojo y UV-visible.
- f) Los electrodos formados con las OCS se ensayan posteriormente como posibles mediadores catalíticos redox o biosensores.

A estos objetivos hay que añadir además, aquellos que en la búsqueda de nuevas formas de estudio y aplicación, han surgido durante el desarrollo del presente trabajo. Así, fruto de la colaboración con otros grupos de investigación, hecho habitual en el desarrollo de la investigación científica, se han marcado nuevos objetivos tales como:

- g) Desarrollo de electrodos metálicos modificados con polímeros orgánicos conductores, dada la gran versatilidad que presentan estos materiales.

h) Aplicación de estos electrodos en la detección voltamperométrica de iones en disolución.

RESUMEN

La presente Memoria pretende avanzar en el conocimiento de los materiales orgánicos conductores, y su potencial aplicación como electrodos de trabajo, sensores o biosensores electroquímicos, tanto en sistemas en continuo (FIA) como en discontinuo.

La organización de los resultados experimentales se ha realizado de acuerdo con una modalidad establecida por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Córdoba, según la cual, la Tesis doctoral podrá ser constituida por el conjunto de trabajos publicados, o pendientes de publicación, por el Doctorando. En esta modalidad de Tesis se deben incluir además, otras secciones tales como objetivos, resumen, introducción, discusión conjunta de los resultados y conclusiones.

En la **Introducción**, que constituye el *Capítulo I*, se ha profundizado en aquellos aspectos que pueden ser interesantes, y que se han tratado en los artículos de una manera más somera. Así, la Introducción queda dividida en cinco bloques principales. En el primero de ellos se hace una revisión general de las moléculas orgánicas conductoras conocidas. En el segundo, se desarrolla con profundidad el concepto de sensor electroquímico y los tipos existentes, haciendo más hincapié en los biosensores amperométricos. En tercer lugar, se explica el concepto de electrodos compósitos y el interés que presentan este tipo de metodologías. En el bloque cuatro, se describen los electrodos modificados así como sus posibles aplicaciones. Finalmente, se tratan brevemente los fundamentos teóricos de las técnicas electroquímicas empleadas en el desarrollo de esta tesis.

En el *Capítulo II*, denominado **Experimental**, se describen los aspectos técnicos de los diferentes montajes empleados a lo largo de la presente memoria.

La relación de trabajos publicados se ha distribuido en 2 capítulos atendiendo a los sistemas de detección empleados en dichos artículos, es decir, por un lado detección amperométrica y por otro detección voltamétrica. A continuación, se describe de manera resumida cada uno de ellos.

El *Capítulo III*, titulado **Sensores de detección amperométrica**, comprende cuatro artículos en los que se va desarrollando un nuevo electrodo compósito de PVC/TTF-TCNQ que será aplicado en la determinación electroanalítica de distintos analitos de interés en el ámbito de los análisis clínicos.

En el primero de ellos, se describe la metodología seguida para la preparación y caracterización del electrodo compósito final. Partiendo del electrodo conocido de PVC/Grafito se obtienen varios compósitos diferentes, mediante el reemplazamiento progresivo de la fase conductora de grafito por la sal orgánica conductora TTF-TCNQ. Una vez obtenida la mejor composición se estudiará también la proporción de PVC (fase no conductora) empleada con el objetivo de mejorar las propiedades electrónicas del compósito obtenido. Todo ello aplicando la voltamperometría cíclica como técnica electroquímica.

En el segundo de ellos, se lleva a cabo un estudio comparativo de las propiedades electroanalíticas de dos compósitos, el conocido de PVC/Grafito y el obtenido en el trabajo anterior de PVC/TTF-TCNQ, con respecto a la determinación de Ácido Ascórbico. El estudio se lleva a cabo tanto en sistemas en continuo como en discontinuo. En este caso se empleará además la Amperometría como técnica de determinación.

En el tercero, el electrodo compósito de PVC/TTF-TCNQ propuesto se aplica en la determinación simultánea y amperométrica de dos analitos que suelen aparecer de manera conjunta en fluidos biológicos, como son los Ácidos Ascórbico y Úrico. Se propone un nuevo método que, mediante la medida amperométrica a dos potenciales distintos, permite la cuantificación de ambos analitos en una mezcla.

En el cuarto, se llevan a cabo distintas estrategias para la inclusión de la enzima glucosa oxidasa en el compósito de PVC/TTF-TCNQ. Una vez obtenida la más adecuada se aplica a la determinación de glucosa, tanto en sistemas en continuo como en discontinuo, y se estudia el efecto de los posibles interferentes.

Mientras que el *Capítulo IV*, se titula **Sensores de detección voltamétrica**, y comprende tres artículos en los que se desarrolla una nueva metodología para la determinación selectiva de iones en disolución, la cual, se llevará a cabo mediante diferentes electrodos de trabajo. Por un lado, se emplea el compósito de PVC/TTF-TCNQ y por otro, electrodos metálicos modificados con distintos polímeros de pirrol.

En el primero, se utiliza el compósito de PVC/TTF-TCNQ y tiene lugar la activación separada de cada uno de los componentes del complejo de transferencia de carga de la

sal orgánica conductora (TTF-TCNQ). Posteriormente, la oxidación-reducción del componente activado genera una deficiencia de carga que es compensada por los iones de la disolución y dicho fenómeno se utiliza para determinar la concentración de iones en disolución. Se finaliza con el estudio de posibles interferentes.

En el segundo, se propone un desarrollo de la ecuación de Butler-Volmer para explicar la pendiente obtenida en la calibración de los sensores voltamétricos y se aplica en la determinación voltamétrica de cationes monovalentes mediante un electrodo modificado Pt/PPyDBS. La ecuación que se empleaba anteriormente, de Nicolsky-Eiseman, era incapaz de explicar el valor de la pendiente obtenida en la calibración de los electrodos selectivos de iones.

Por último, basándonos en las ecuaciones descritas en el artículo anterior se lleva a cabo un estudio más exhaustivo de dos posibles sensores voltamétricos. Se proponen los electrodos de Pt/PPyDBS para sensor de cationes y el de Pt/PPyClO₄ para aniones. Resulta especialmente interesante el uso de la propiedad de los polímeros de pirrol de cambiar las características superficiales de los electrodos metálicos, al variar la sustancia dopante utilizada durante la síntesis polimérica.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. Moléculas Orgánicas Conductoras.

1.1 Fundamentos Teóricos y Antecedentes Bibliográficos.

1.2 Clasificación.

1.3 Propiedades y Aplicaciones.

2. Sensores Químicos y Biosensores.

2.1 Fundamentos Teóricos y Antecedentes Bibliográficos.

2.2 Definición y Clasificación.

2.3 Sensores Electroquímicos.

2.4 Receptores biológicos.

2.5 Métodos de Inmovilización.

2.6 Biosensor Amperométrico Enzimático.

3. Electroodos Compósitos.

3.1 Clasificación y Generalidades.

4. Electroodos Metálicos Modificados con Polímeros Conductores.

4.1 Fundamentos Teóricos y Antecedentes Bibliográficos.

4.2 Recubrimientos Poliméricos.

5. Métodos Electroquímicos.

5.1 Voltamperometría Cíclica.

5.2 Amperometría.

1. MOLÉCULAS ORGÁNICAS CONDUCTORAS

1.1 Fundamentos Teóricos y Antecedentes Bibliográficos.

Cuando en 1729 Stephen Gray, junto con G. Wheeler y J. Godfrey, efectuó la clasificación de los materiales en eléctricamente conductores y aislantes, nada hacía suponer que, dos siglos más tarde, la idea de que los metales eran los conductores por excelencia y que los compuestos orgánicos estaban situados dentro del grupo de los aislantes iba a ser profundamente transformada.

Los compuestos orgánicos han sido considerados, durante mucho tiempo, como representantes de los materiales aislantes. Esta concepción comenzó a cambiar de forma significativa con la descripción, en 1954, de un complejo de bromo-perileno que presentaba una conductividad de 1 S cm^{-1} [1]. Este tipo de compuesto, en el que las unidades orgánicas de perileno, al ser combinadas con moléculas de halógeno, presentan una conductividad comparable a la de los semiconductores inorgánicos dopados, dio lugar a la aparición de un nuevo término: “metal orgánico”. Sin embargo, la búsqueda de conductores orgánicos no se intensificó hasta el descubrimiento, en 1973, del complejo de transferencia de carga (CTQ) que forman el potente aceptor de electrones tetraciano-p-quinodimetano (TCNQ), sintetizado en 1960 [2], y el potente dador electrónico tetratiofulvaleno (TTF), sintetizado en 1970 [3]. El complejo TTF-TCNQ presenta una conductividad de tipo metálico con un máximo de 10^4 S cm^{-1} a 59 K [4].

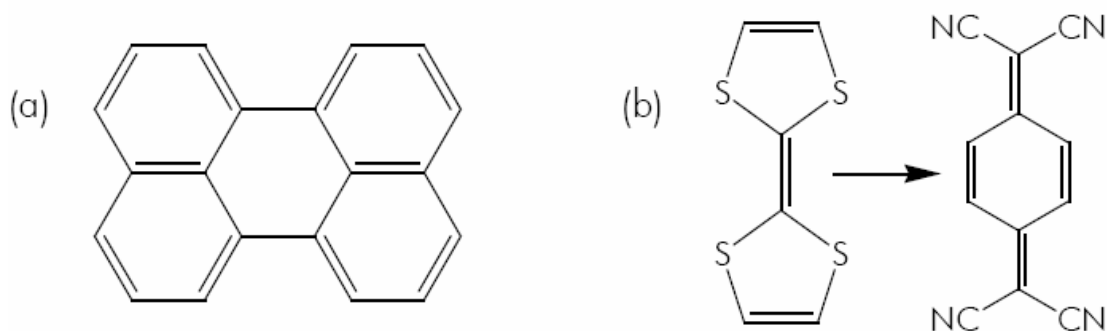


Figura: 1. Estructura del perileno (a) y del complejo TTF-TCNQ (b).

Durante este mismo periodo, William A. Little, basándose en observaciones de sistemas biológicos, propuso un modelo de superconductor que implicaba conducción eléctrica a lo largo de cadenas de hidrocarburos lineales [5]. El interés sobre los hidrocarburos poliméricos con una extensa deslocalización de los electrones de tipo π fomentó el estudio de sistemas como el poliacetileno, $(CH)_x$. Sintetizado a finales de los años 50 por Natta y col. [6], se había observado que la baja conductividad que presentaba a temperatura ambiente (el poliacetileno en estado puro es un aislante) podía incrementarse por exposición a aceptores de electrones. Años más tarde, en 1967, un error fortuito en la síntesis de Natta condujo a Shirakawa y col. a la obtención de láminas de poliacetileno que presentaban brillo metálico [7]. Pero hubo que esperar hasta 1977 para observar cómo la conductividad de las láminas de poliacetileno aumentaba de 10^{-9} a 500 S cm^{-1} a temperatura ambiente al exponerlo a fuertes aceptores de electrones como el yodo [8]. H. Shirakawa, A.G. MacDiarmid y A.J. Heeger habían descubierto los polímeros conductores, hecho por el cual les fue otorgado el Premio Nobel de Química en el año 2000.

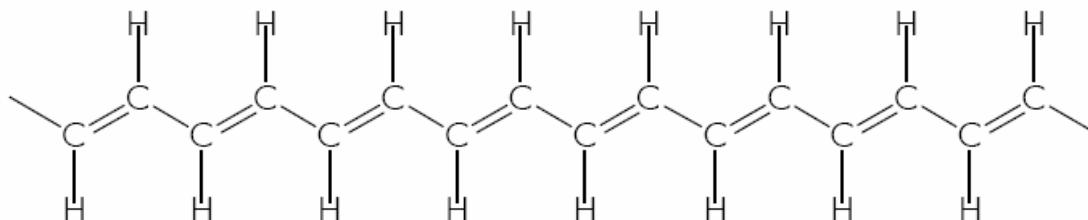


Figura: 2. Estructura del trans-poliacetileno.

El estudio del poliacetileno dopado contribuyó en gran medida a la comprensión del proceso de conducción, introduciendo nuevos conceptos que más tarde reaparecerían en los modelos utilizados para explicar el fenómeno de la superconductividad. Esta propiedad fue encontrada por primera vez en un compuesto orgánico en 1980. Jérôme y col. descubrieron que las sales de tetramiltetraselenofulvaleno o TMTSF, $[(TMTSF)_2PF_6]$, son superconductoras con una temperatura de transición de 0.9 K a 12 kbar de presión [9]. En la actualidad se ha sintetizado un gran número de superconductores orgánicos con temperaturas de transición más elevadas a presión

atmosférica. Más reciente es el descubrimiento de superconductividad en sales de fullereno C_{60} , con temperaturas de transición en el intervalo de 10 a 45 K [10].

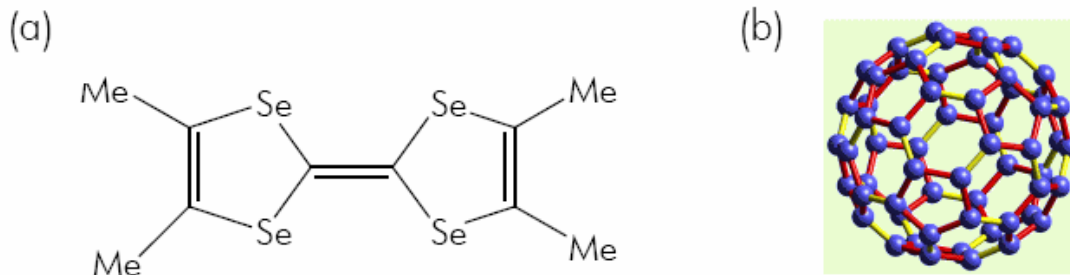


Figura: 3. Estructura del TMTSF (a) y del fullereno C_{60} (b).

De este modo, las tablas de conductividad de los distintos materiales tuvieron que recoger un nuevo tipo de materiales orgánicos en la zona de los semiconductores y los conductores, hasta entonces ocupada únicamente por metales (Figura: 4).

La gran cantidad de actividad científica desarrollada en el campo de los “metales orgánicos” es indicativa del gran interés que han suscitado estos nuevos materiales, que presentan propiedades muy atractivas tanto desde el punto de vista científico como tecnológico. Un reflejo de tal actividad e interés es el gran número de publicaciones y artículos de revisión y divulgación relacionados con este nuevo campo de la ciencia que aparecieron durante la pasada década [11-14].

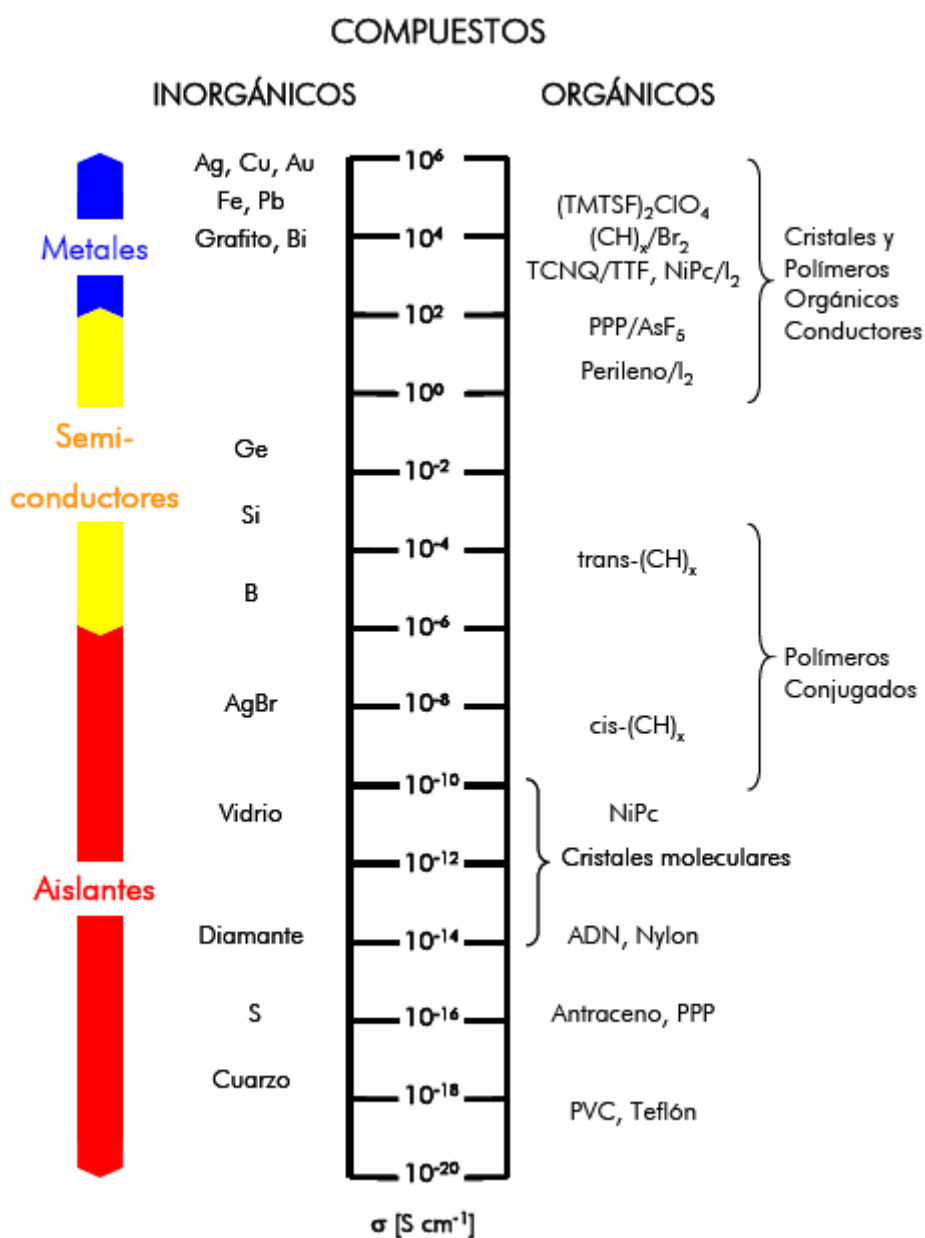


Figura: 4. Valores de conductividad de distintos materiales.

1.2 Clasificación

En general, los denominados “metales orgánicos” se suelen clasificar en cuatro tipos fundamentales: polímeros conjugados, complejos o sales de transferencia de carga, metalomacrociclos y fullerenos (Figura: 5).

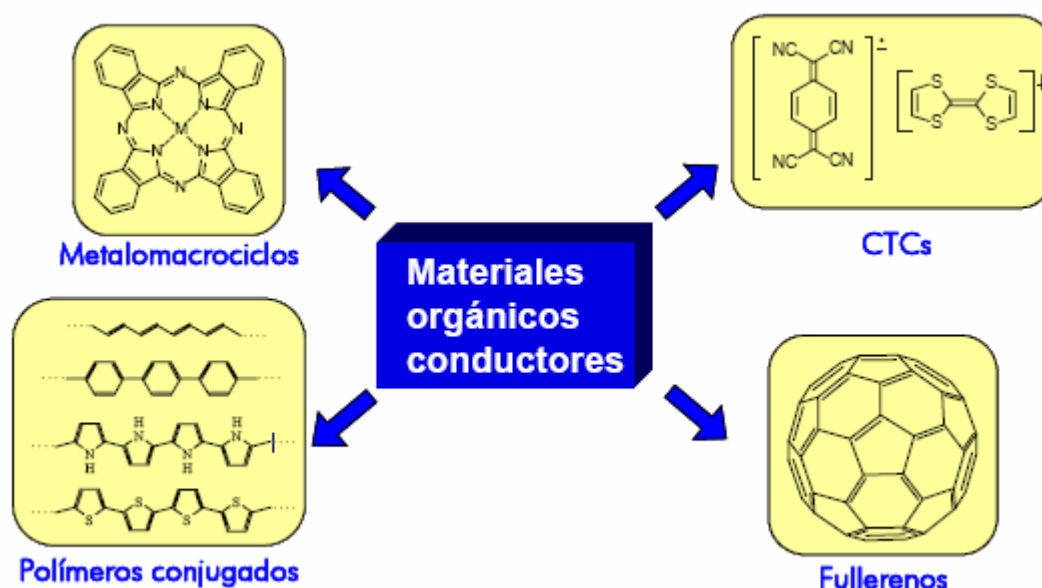


Figura: 5. Metales orgánicos.

a) Polímeros conjugados: idealmente, los polímeros conductores son sistemas lineales infinitos, perfectamente ordenados, construidos por repetición de unidades que contienen electrones de tipo π , de tal forma, que no exista interrupción de la conjugación. Todos los polímeros conjugados son semiconductores o aislantes que, por inyección de cargas positivas (huecos) o negativas (electrones) en las cadenas (dopado), se transforman en conductores. El descubrimiento de las propiedades conductoras del poliacetileno dopado propició la síntesis de otros polímeros conjugados de mayor estabilidad, solubilidad y procesabilidad. Disponemos, por tanto, de unos materiales que combinan las propiedades eléctricas y ópticas de los metales y los semiconductores, con las propiedades mecánicas (ligereza, flexibilidad y moldeabilidad), bajo coste y procesabilidad de los plásticos [15]. A estas ventajas, hay que añadir, además, la versatilidad química de estos materiales, que permite modificar sus propiedades mediante síntesis química. En la mayoría de ellos, la unidad que se repite es un ciclo,

como el benceno, o un heterociclo, como el pirrol, el furano o el tiofeno, dando lugar a polifenileno, polipirrol, polifurano o politiofeno, respectivamente, cuyas conductividades en estado dopado son del orden de 10^2 - 10^3 S cm⁻¹ [13].

b) Metalomacrociclos: son complejos metálicos formados por un sistema macrocíclico, como ftalocianinas o tetrabenzoporfirinas, coordinado con un metal de transición capaz de hexacoordinarse (Fe, Co, Cr, etc.). Conectando estos complejos a través de un ligando unido al metal del metalomacrociclo se obtienen polímeros que, tras el dopado con un aceptor electrónico, se transforman en polímeros conductores cuyas propiedades se pueden modular variando la naturaleza del metalomacrociclo, del átomo metálico central o del ligando puente [16]. Por otro lado, los macrociclos cristalizan formando columnas en las que las moléculas se disponen paralelamente a lo largo del eje de apilamiento. El solapamiento de orbitales tipo π permite una deslocalización de los electrones a lo largo del apilamiento, dando lugar a materiales conductores quasi-unidimensionales. En estos casos, no es necesaria la presencia del átomo metálico para lograr conductividades elevadas [17]. A pesar de que su conductividad es menor que la del poliacetileno, su estabilidad es mucho mayor.

c) Fullerenos: constituyen la tercera forma alotrópica del carbono, siendo las otras dos el grafito y el diamante. Son moléculas discretas formadas por un número definido de átomos. Una de ellas, el C₆₀, es una molécula constituida por 60 átomos de carbono situados sobre la superficie de una esfera, en la que cada átomo está unido a tres vecinos mediante un enlace tipo sp². Así, el electrón de tipo π que queda por cada átomo de carbono se encuentra deslocalizado sobre la superficie de la esfera en orbitales moleculares de tipo π . La molécula de C₆₀ en estado neutro posee una estructura electrónica de capa cerrada dando lugar a un sólido molecular aislante. Sin embargo, el dopado con metales alcalinos o alcalinotérreos da lugar a una banda de conducción parcialmente llena con la estequiometría M₃C₆₀ (siendo M₃ = K₃, Rb₃, Cs₂Rb, etc.) [18]. La conductividad en los fullerenos se debe al solapamiento de los orbitales π de moléculas vecinas cercanas. La forma de las moléculas, junto con la estructura cristalina, hace de los M₃C₆₀ conductores tridimensionales. Esta nueva familia de conductores moleculares presenta, además, el fenómeno de superconductividad [19].

d) Complejos y sales de transferencia de carga: con esta denominación se pretende incluir a los compuestos en los que se produce una transferencia parcial de carga de una molécula dadora a una molécula aceptora, formando un cristal de tipo iónico en el que los aniones, los cationes, o ambos son grupos químicos de alguna complejidad. El arquetipo de complejo de transferencia de carga conductor es el TTF-TCNQ, que será la sal orgánica conductora empleada en esta tesis para la creación de un nuevo electrodo compuesto (*Capítulo III*). Dicho complejo presenta una estructura cristalina en la que las unidades de TTF y TCNQ se disponen paralelamente formando pilas separadas de moléculas dadoras yceptoras [20]. Experimentalmente se comprueba que, aunque la estequiometría dador/aceptor en el cristal es 1:1, hay una transferencia de carga fraccionaria entre ambos apilamientos ($0.59e$, es decir, hay 59 electrones deslocalizados sobre cada 100 moléculas en cada pila de TCNQ), dando lugar a un sistema de valencia mixta en el que coexisten moléculas cargadas y moléculas neutras. El solapamiento entre las nubes electrónicas π de moléculas vecinas da lugar a bandas electrónicas parcialmente llenas y proporciona un camino de deslocalización que permite la movilidad de los electrones desapareados a través de los apilamientos. De este modo, los cristales de TTF-TCNQ presentan una conductividad eléctrica de tipo metálico que aumenta de 500 S cm^{-1} , a temperatura ambiente, hasta un máximo de 10^4 S cm^{-1} a 59 K.

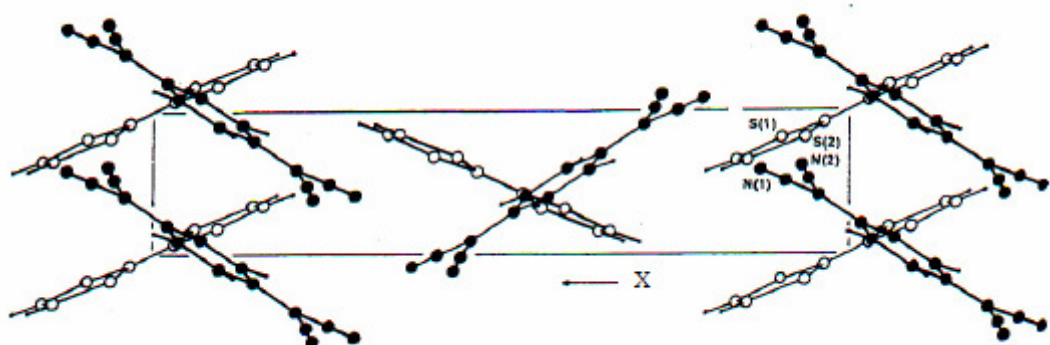


Figura: 6. Proyección de la estructura cristalina del complejo TTF-TCNQ a lo largo del eje X [20]. Los apilamientos separados del TTF y TCNQ se disponen a lo largo del eje Y. Las moléculas de TCNQ (círculos negros) están en primer plano.

Para formar complejos orgánicos de transferencia de carga (CTC) conductores, se necesita que, en el sólido, las moléculas de dadores y aceptores se ordenen en apilamientos segregados, en los que los orbitales HOMO de las moléculas dadoras

interaccionen por una parte, y los orbitales LUMO de las moléculasceptoras lo hagan por otra, dando lugar a la formación de bandas electrónicas que permitan la deslocalización de los electrones y, en consecuencia, a conductividades elevadas. Por otra parte, para obtener sistemas conductores estables son necesarias moléculas capaces de formar radicales estables. Además, la transferencia de carga entre las moléculas dadoras yceptoras en el sólido ha de ser parcial para conseguir compuestos de valencia mixta con conductividad de tipo metálico.

En la Figura: 6 se puede ver cómo las moléculas de dador y aceptor se disponen en apilamientos separados en el complejo TTF-TCNQ, situándose las moléculas de TCNQ en primer plano (círculos negros) y las moléculas de TTF en un segundo plano.

1.3 Propiedades y Aplicaciones

Los materiales orgánicos conductores constituyen una nueva generación de materiales funcionales con numerosas aplicaciones ligadas a las propiedades que presentan (Figura: 7). Una de las grandes ventajas que ofrece este tipo de compuestos es la posibilidad de modular dichas propiedades mediante la introducción de sustituyentes y heteroátomos, así como con el nivel de dopado. Por otra parte, en el caso de los polímeros conductores, se combinan las propiedades electrónicas y ópticas de los metales y los semiconductores con las interesantes propiedades mecánicas y las ventajas de procesamiento de los polímeros.

Propiedades como la conductividad eléctrica, con transiciones metal-aislante a bajas temperaturas, y la posibilidad de ser dopados reversiblemente hacen de estos materiales componentes electrónicos útiles para el desarrollo de baterías, sensores (narices y lenguas electrónicas), dispositivos electrónicos (diodos, transistores...) o células fotovoltaicas [21].

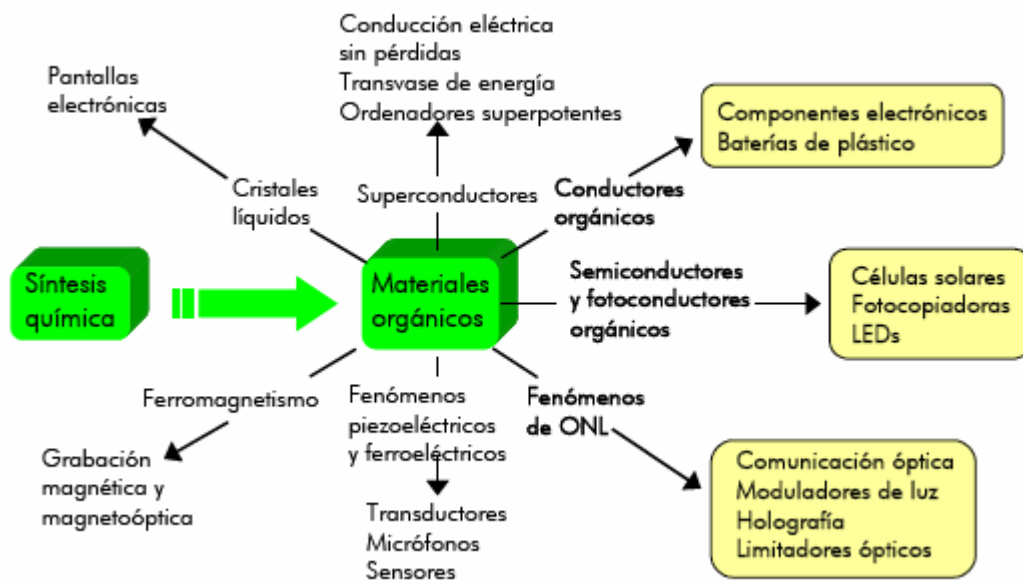


Figura: 7. Relación entre la síntesis química, los nuevos materiales orgánicos eléctrica, magnética y/u ópticamente activos que de ella resultan y las enormes posibilidades tecnológicas que de ellos derivan [13].

2. SENSORES QUÍMICOS Y BIOSENSORES

2.1 Fundamentos Teóricos y Antecedentes Bibliográficos.

El creciente interés por realizar análisis de forma rápida y económica, así como por optimizar la producción mediante análisis en continuo (“on-line”), ha dirigido la investigación hacia la puesta a punto de métodos analíticos que sean compatibles con sus necesidades.

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que pueda ser procesada y, por tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos [22].

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

Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que sean capaces de transformar [22]:

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

Actualmente, la mayor parte de sensores utilizados para el control de procesos industriales son físicos [23], pero la necesidad de obtener información química ha favorecido la investigación y el desarrollo de este tipo de sensores.

Desde que se describieron los primeros sensores químicos a principios del siglo XX [24,25], estos dispositivos han dado lugar a una gran producción científica. Sin embargo, su aplicación es muy limitada ya que su fabricación se suele realizar manualmente, y por tanto lleva asociado un elevado coste.

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

Por este motivo, en estos últimos 30 años, los biosensores electroquímicos han cobrado gran importancia, especialmente en sus aplicaciones industriales. Esto ha sido debido a la aplicación de tecnologías de miniaturización en la fabricación de electrodos, lo que facilita la producción en masa de biosensores, reduciendo así los costes en su fabricación, y asegurando una gran reproducibilidad. De esta manera, es posible la integración en un área pequeña [26] de los dos o tres electrodos requeridos habitualmente para la realización de medidas voltamperométricas.

Otra de las ventajas que presenta el uso de biosensores miniaturizados es el mínimo consumo de reactivos. Disponer de un área de trabajo mucho menor requiere menos cantidad de material biológico en la fabricación, a la vez que permite trabajar con volúmenes de muestra más pequeños. Por otra parte, estas dimensiones reducidas permiten realizar análisis rápidos y hacer un seguimiento de los productos incluso en continuo (“on-line”) e in situ. Como inconveniente, la instrumentación que se requiere ha de ser mucho más sensible, ya que la señal que se debe tratar es mucho menor.

2.2 Definición y Clasificación.

En el campo de la Química Analítica, la tendencia es simplificar el protocolo de análisis de una muestra determinada, reduciendo así los tiempos de análisis y su coste. Tradicionalmente se ha utilizado instrumentación analítica muy sofisticada, tal como cromatógrafos, espectrofotómetros, ICP-masas, etc., de coste elevado y que requiere especialización por parte del operario. Además, este tipo de equipos son incompatibles con análisis en continuo o pruebas de campo.

Si bien los sensores químicos se presentan como una clara alternativa, ya que permiten realizar análisis on-line, en cambio, su sensibilidad y fiabilidad es mucho menor que la ofrecida por la instrumentación analítica convencional.

Los campos donde los sensores químicos han tenido una mayor implantación son principalmente, la biomedicina, el medioambiente y, en los últimos años, en la industria alimentaria, si bien en otros sectores, como la bioseguridad, se están desarrollando de forma exponencial.

Entre este tipo de sensores caben destacar los biosensores, ya que son los dispositivos con más selectividad y por tanto, con más aplicaciones potenciales en Química Analítica. Desde hace varios años, algunos de ellos ya han sido comercializados, como por ejemplo, los utilizados para los análisis de glucosa en sangre, de vital importancia en pacientes diabéticos.

Un sensor químico es un dispositivo capaz de traducir la información química de una muestra en una señal analítica útil [22]. Los sensores químicos constan de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor, sobre el que se encuentra conectado el primero.

El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra, y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor. Éste la transforma, a su vez, de una señal primaria a una señal secundaria procesable fácilmente, generalmente eléctrica u óptica. Existen tres tipos de receptores [27],

- Físicos, cuando no hay reacciones químicas involucradas en la detección, un ejemplo son los materiales piezoeléctricos utilizados para detectar cambios de masa.
- Químicos, la señal proviene de una reacción química, por ejemplo agentes quelatantes, ionóforos, etc.
- Biológicos, cuando el material receptor tiene una procedencia biológica. Por ejemplo, enzimas, anticuerpos, ADN, células, etc. En este caso, los sensores químicos son denominados biosensores (Figura: 8),

La clasificación de los sensores y biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado, siendo ésta la más aceptada [28]. En la tabla 1 se recogen los distintos tipos de sensores y biosensores según este criterio.

Tabla: 1. Clasificación de sensores químicos y biosensores según el transductor utilizado.

Tipos de transductores	Descripción
Ópticos	Transforman los cambios producidos en una señal óptica por la interacción de un analito con el receptor.
Electroquímicos	La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo.
Piezoeléctricos	Dispositivos que transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado con materiales con propiedades piezoelectrónicas.
Térmicos	Dispositivos capaces de medir cambio de calor sobre la superficie del electrodo.

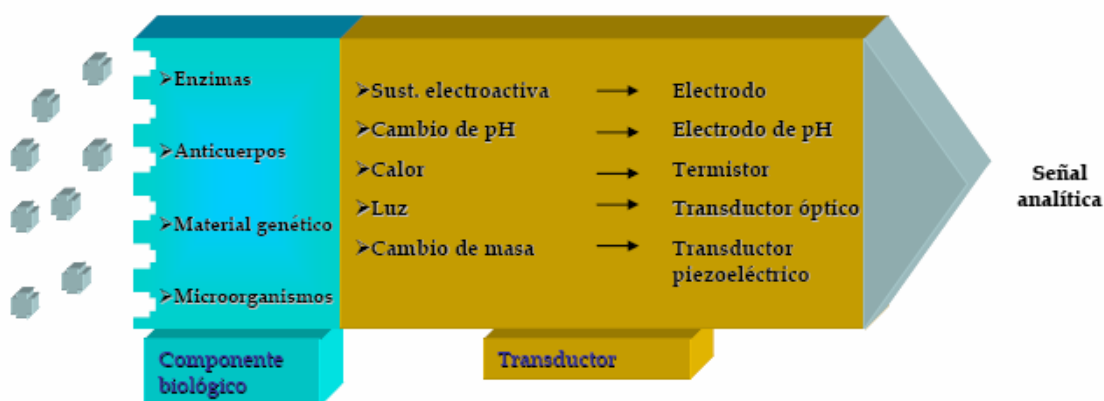


Figura: 8. Esquema genérico de un biosensor.

A continuación se describe, con más detalle, el grupo de sensores electroquímicos, ya que son los utilizados a lo largo del presente trabajo.

2.3 Sensores Electroquímicos

Durante la pasada década, los sensores basados en transductores electroquímicos fueron los que más publicaciones científicas generaron (Figura: 9) [29-31]. Hecho que

estaba claramente ligado al hecho de que estos dispositivos son más robustos, su fabricación es más simple y económica que la del resto de transductores, y además, poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos. Así mismo, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potencióstatos y conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis.

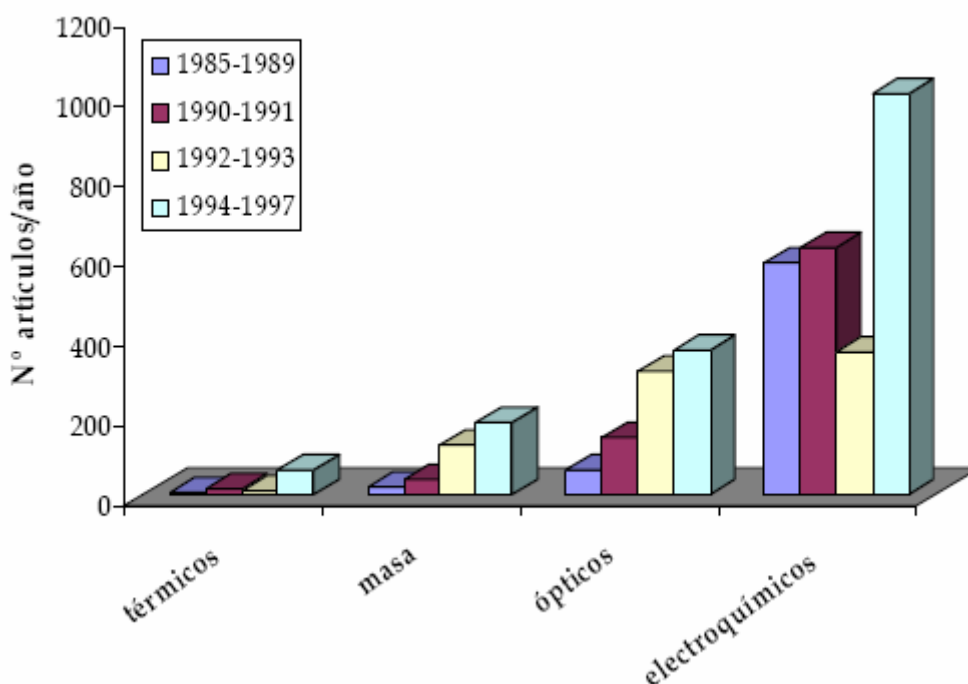


Figura: 9. Número de publicaciones en sensores químicos durante la pasada década.

Existen tres grandes grupos de transductores electroquímicos clasificados según la técnica electroquímica utilizada para obtener la información de la muestra; conductimétricos, potenciométricos y amperométricos.

Transductores Conductimétricos

Este tipo de transductores se basan en la medida de cambios de conductividad (o alguna propiedad asociada a ésta) provocados por el analito, ya sea en la solución de

medida o en la membrana selectiva. En algunos casos, se pueden llegar a medir incluso cambios de conductividad del propio analito [29].

La conductividad es proporcional a la concentración de iones según la ecuación:

$$\Lambda = \frac{k}{C}$$

siendo k la conductividad específica ($S\text{ cm}^{-1}$), y C la concentración de iones (mol cm^{-3}).

Las medidas de resistividad en corriente continua son las más comunes para el funcionamiento de estos sensores, aunque para registrar medidas de impedancia se utiliza corriente alterna [32]. Estas medidas de impedancia se suelen utilizar para caracterizar algunos líquidos y/o superficies de electrodos modificadas [33,34].

Estos dispositivos tienen una configuración muy simple, consistente en dos electrodos que pueden ser de diferentes materiales. Generalmente, son de algún metal noble sin modificar, tal como oro, que puede detectar cambios de concentración del ácido sulfhídrico; o como platino, paladio o rutenio, que pueden ser utilizados para la detección de hidrógeno [35].

También se han desarrollado diferentes biosensores conductimétricos [36,37] mediante la modificación de electrodos con material biológico atrapado en polímeros conductores.

Transductores potenciométricos

Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia.

La diferencia de potencial medida entre los electrodos se relaciona con la concentración del analito de acuerdo con la ecuación de Nernst,

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(a_i + \sum_{i,j} k_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{Z_i/Z_j} \right) \quad (1)$$

Donde a_i es la actividad del ion principal, a_j la actividad del ion interferente, Z_i y Z_j son las cargas de los iones principal e interferente, y $k_{i,j}^{pot}$ es el coeficiente de selectividad [38].

Los transductores potenciométricos son el grupo de dispositivos electroquímicos más desarrollados y estudiados durante la pasada década (Figura: 10). Históricamente, el origen de los sensores químicos se remonta a principios del siglo XX con el desarrollo del electrodo de vidrio [4], uno de los sensores potenciométricos más utilizados.

La mayor aplicación de este tipo de sensores es la fabricación de *electrodos selectivos de iones* (ISE's) [39,40], donde se modifica el electrodo de trabajo con una membrana selectiva a un ión determinado.

Los transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET's) [41] y su modificación con membranas selectivas (CHEMFET's) también se incluyen dentro del grupo de sensores potenciométricos.

Recientemente han aparecido un nuevo tipo de sensores selectivos de iones denominados “*Sensores Voltamperométricos*”. Las curvas intensidad-potencial generadas proporcionan analíticamente mas información que las curvas de potencial de equilibrio obtenidas bajo condiciones potenciométricas; además, el potencial reversible puede calcularse a partir de datos obtenidos bajo condiciones dinámicas. Requiere preparar un electrodo por ion a determinar y se basa en ecuaciones tipo Nernst, adaptadas por Bond y col. [42,43], que establecen una relación directa entre el potencial reversible (4) y el logaritmo de la concentración del ion en el electrolito (2 y 3). Las ecuaciones adaptadas de Bond y col. para sensores voltamétricos son:

$$\text{Para cationes: } E_R = E^{0'} + S \log [M^+] \quad (2)$$

$$\text{Para aniones: } E_R = E^{0'} - S \log [X^-] \quad (3)$$

Donde $[M^+]$ y $[X^-]$ son las concentraciones de cationes y aniones, respectivamente. S es la pendiente obtenida a partir de las curvas de calibración, y $E^{0'}$ la ordenada en el origen. El potencial reversible E_R se define como:

$$E_R = \frac{E_p^{red} + E_p^{ox}}{2} \quad (4)$$

siendo E_p^{red} el potencial de pico de reducción y E_p^{ox} el potencial de pico de oxidación. Estas ecuaciones serán las aplicadas más adelante al electrodo selectivo de iones PVC/TTF-TCNQ propuesto en esta tesis.

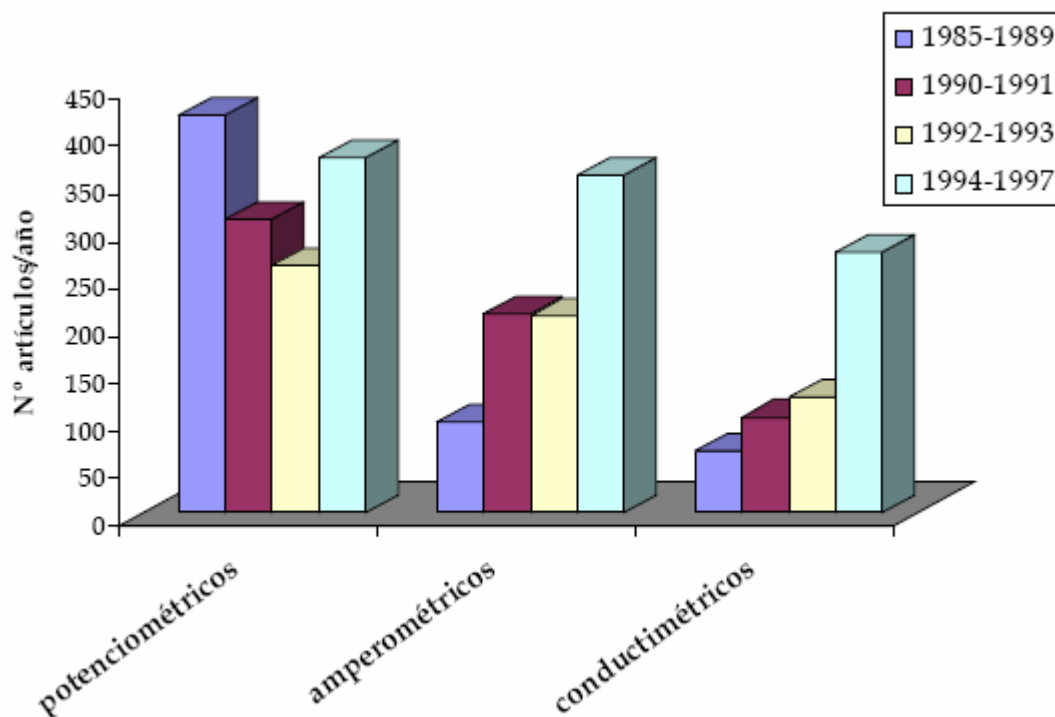


Figura: 10. Número de publicaciones en transductores electroquímicos durante la pasada década.

Transductores amperométricos

Este tipo de dispositivos se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica [44]. También es posible realizar análisis basados en técnicas voltamperométricas, variando el potencial de trabajo de forma controlada.

Los transductores amperométricos se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Esta relación intensidad-concentración se comporta según el siguiente modelo que proviene de la Ley de Fick,

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(o,t))}{\delta x} \quad (5)$$

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D_0 y C_0 son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, y x representa la distancia de la doble capa.

En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que x se mantiene constante y se corresponde con el tamaño de la capa de difusión (δ). Así, la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito,

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} C_0 \quad (6)$$

Los biosensores amperométricos son los que han mostrado un mayor avance debido a su extensa aplicación dentro del campo del análisis médico. Ejemplos significativos de estos avances son los biosensores para medidas en sangre y suero.

En capítulos posteriores se describirá de manera más detallada el funcionamiento de este tipo de dispositivos.

2.4 Receptores Biológicos.

Una de las principales características del material biológico empleado para la fabricación de biosensores es su alta selectividad, permitiendo diferenciar en algunos casos, incluso isómeros de una misma molécula. Esta particularidad hace que estos componentes sean de gran interés en su aplicación como receptores en la fabricación de sensores.

Los biosensores, sobre todo los basados en transductores electroquímicos, son uno de los campos que más ha avanzado en cuanto a investigación en los últimos años.

Existen diferentes tipos de bioreceptores que se pueden inmovilizar sobre transductores electroquímicos:

- Anticuerpos
- Ácidos nucleicos
- Microorganismos
- Tejidos orgánicos
- Enzimas

Los enzimas son los elementos más comúnmente utilizados para la fabricación de biosensores debido a su bajo coste, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación [45].

A continuación se describen los diferentes receptores, haciendo especial énfasis en los enzimas, ya que son los utilizados en el presente trabajo.

Anticuerpos

Los Anticuerpos son, junto al ADN, los agentes biológicos más selectivos que existen. Debido a su estructura tridimensional puede enlazarse con una sustancia (antígeno) de una manera muy específica.

En los últimos diez años, se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar inmunosensores [46]. El inconveniente de este tipo de material para aplicaciones en la fabricación de biosensores es que no tiene capacidad catalítica, lo que implica el empleo de anticuerpos o antígenos marcados, con un isótopo radiactivo, enzimas, partículas luminiscentes, etc. [47].

En el caso de los inmunosensores basados en transductores amperométricos, el marcaje más utilizado es mediante enzimas. La corriente recogida por el transductor es proporcional a la concentración de las especies electroactivas generadas por la reacción enzimática, y por tanto, proporcional a la cantidad de anticuerpos marcados [48].

Ácidos nucleicos

La alta especificidad de los pares de bases (adenina/timina y citosina/guanina) distribuidas a lo largo de la doble hélice que forma la cadena de ADN, hace este material de gran interés en la fabricación de biosensores.

Como en otros biosensores, las cadenas cortas de ADN (sADN) están inmovilizadas sobre superficies en forma de electrodos, chips o cristales según el tipo de transductor utilizado. La hibridación de esta molécula inmovilizada con su par es detectada por el transductor.

Como en el caso de los anticuerpos, este tipo de material no tiene capacidad catalítica, por tanto, para su detección necesita ser marcado [45]. En el caso de utilizar transductores amperométricos, éstos suelen estar modificados con enzimas.

Este tipo de detección es muy reciente [49,50]. Las primeras publicaciones basadas en transductores electroquímicos datan de los años 90 [51-53]. Por tanto, aún no se ha podido aprovechar el gran potencial de este material biológico.

Microorganismos

Los microorganismos tienen una gran importancia en diferentes procesos biotecnológicos, en la industria vitivinícola, en procesos de síntesis de fármacos, o en tratamientos de agua.

Muchos biosensores basados en células han sido desarrollados para el control de dichos procesos [45].

Los microorganismos pueden asimilar compuestos orgánicos y generar un cambio que es detectado por el transductor. Existen publicaciones donde se utilizan sensores amperométricos con microorganismos inmovilizados para el control de calidad de las aguas residuales, basados en el seguimiento de la respiración celular [54,55].

Tejidos orgánicos o celulares

Los tejidos orgánicos pueden ser utilizados como elemento de reconocimiento prácticamente sin preparación. Generalmente, tienen una gran variedad de enzimas inmovilizados, y por tanto, no son tan selectivos como otros materiales biológicos. Por el contrario, están en su medio natural y es más difícil su degradación, lo que aumenta el tiempo de vida del biosensor.

El número de publicaciones existentes en este campo es mínimo comparado con otros receptores bioquímicos [56], aún así, se reportan algunos trabajos [57,58]. Un ejemplo de inmovilización sobre transductores electroquímicos es el publicado por Vieira y col [59], donde se inmoviliza tejido celular de una patata como fuente de peroxidasa, sobre un electrodo de grafito.

Enzimas

Los enzimas son proteínas capaces de catalizar una reacción química. Reaccionan de manera selectiva con un analito o familia de analitos, acelerando la reacción química, y sin consumirse. Si la reacción enzimática involucra un solo sustrato, el mecanismo básico de la catálisis enzimática es el siguiente:



Donde S es el sustrato, E el enzima, ES el complejo enzima-sustrato y P el producto. Para una concentración de enzima, la velocidad de reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{[E_0]V_{max}}{k_M + [S]} \quad (7)$$

donde V_{max} es la máxima velocidad de reacción y K_M es la constante de Michaelis, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima. En la Figura: 11 se muestra la dependencia típica de la velocidad de reacción enzimática de la concentración de sustrato, señalándose los valores de los parámetros K_M y V_{max} , y las zonas donde la señal obtenida es útil para la

determinación del sustrato y para la determinación de la actividad enzimática. Desde el punto de vista analítico, a medida que se tiene una constante de Michaelis más elevada la sensibilidad del método disminuye, pero aumenta el intervalo de linealidad.

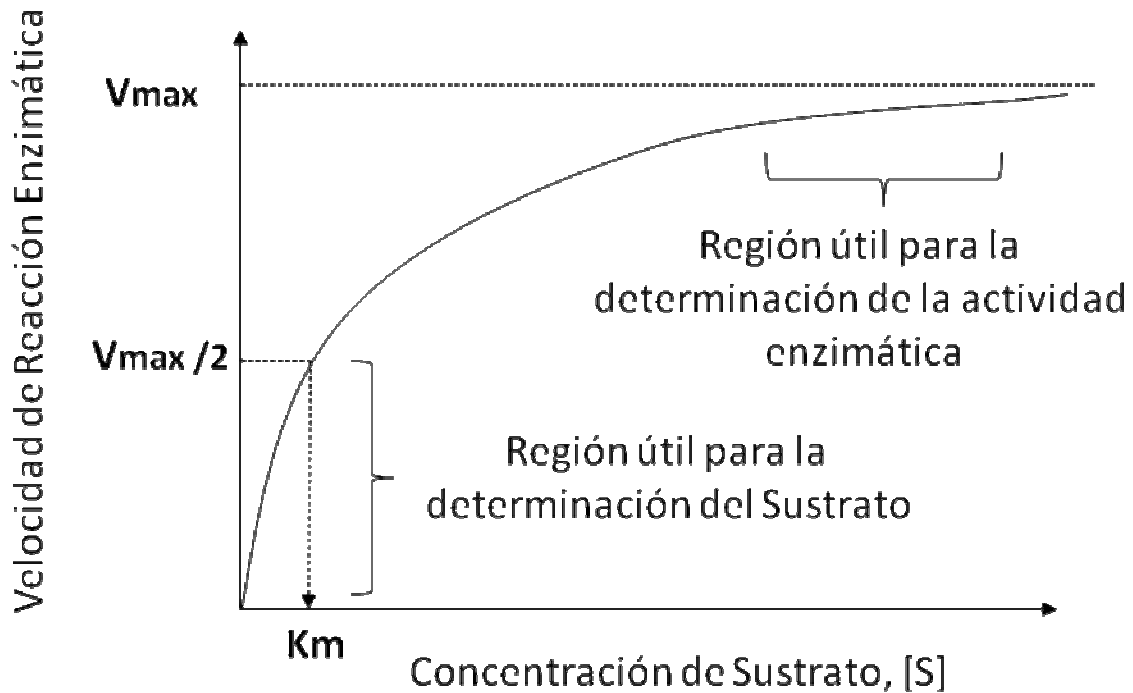


Figura: 11. Dependencia de la velocidad de la reacción enzimática frente a la concentración de sustrato.

La actividad enzimática, está regulada por el pH del medio, la fuerza iónica, la temperatura y, requiere en algunos casos, la presencia de un cofactor. El cofactor es un producto químico no proteico necesario para que la reacción enzimática se lleve a cabo, por ejemplo NAD^+ u oxígeno.

Los enzimas están formados por una estructura tridimensional compuesta por péptidos, con una zona activa que reacciona con el sustrato. Esta zona activa, que confiere especificidad a la enzima, suele estar situada en el interior del enzima.

Existen diferentes tipos de enzimas, clasificados según el tipo de reacción que llevan a cabo,

- Transferasas, catalizan la transferencia de un grupo químico, de un sustrato a otro.
- Hidrolasas, catalizan reacciones de hidrólisis.

-
- Liasas, catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
 - Isomerasas, catalizan la interconversión de isómeros.
 - Ligasas, catalizan la formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP.
 - Oxidoreductasas, catalizan reacciones de oxidoreducción, es decir, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro. Debido a esta capacidad redox, son el candidato ideal para su utilización como bioreceptores en biosensores amperométricos.

Los enzimas fueron los primeros bioreceptores utilizados, y siguen siendo hoy en día los más empleados para la fabricación de biosensores.

Una de las grandes ventajas de la utilización de enzimas, a parte de su alta selectividad, es su menor tiempo de respuesta en relación con los otros tipos de biosensores. Como inconvenientes, se debe tener en cuenta que pierden actividad al ser inmovilizadas sobre la superficie del electrodo y tienen un tiempo de vida relativamente corto.

Dos claros ejemplos de biosensores basados en enzimas son los utilizados para la determinación de glucosa [60,61] y urea [62,63].

2.5. Métodos de Inmovilización.

La inmovilización del material biológico es un proceso mediante el que se confina el bioreceptor sobre el transductor electroquímico, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad.

Es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor, ya que características tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad, dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada.

Como ventajas del empleo de material biológico inmovilizado cabe destacar [64],

- ✓ Aumento de la estabilidad del receptor biológico.
- ✓ Posible reutilización del biosensor, disminuyendo el coste del proceso.

Por otra parte, los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son [65],

- ✓ Alteración de la conformación del material biológico respecto de su estado nativo.
- ✓ En el caso de la utilización de enzimas, pérdidas de su actividad catalítica.

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes grupos [65]; retención física y unión química (Figura: 12).

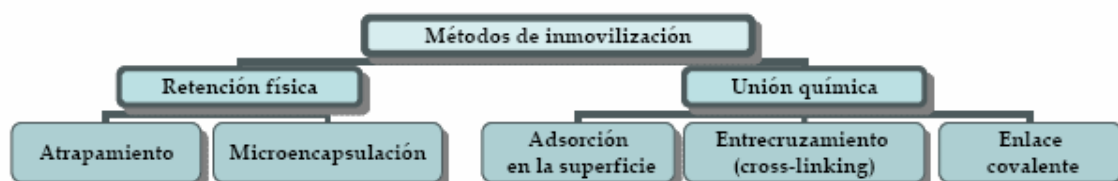


Figura: 12. Clasificación de los métodos de inmovilización.

A continuación se describen, con más detalle, cada uno de los tipos de inmovilización enzimática, ya que es el componente biológico empleado en este trabajo.

Atrapamiento

Consiste en la retención física del enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa (Figura: 13), constituida generalmente por monómeros fotocurables o polímeros del tipo poliacrilamina, PVC, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. También se suelen utilizar hidrogeles [66], como poly(2-hydroxyetil metacrilato) (p(HEMA)), o polímeros conductores, como polipirrol [67].

Es una técnica de gran sencillez desde el punto de vista experimental, y no requiere una gran cantidad de material biológico. Como ventaja adicional, el enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. Uno de los inconvenientes es la gran barrera creada que dificulta la difusión del analito hasta el centro activo de la enzima, aumentando el tiempo de respuesta del sensor [28]. El Atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, ya que pueden alterarse los grupos reactivos de la proteína, lo que provocaría pérdidas en la actividad enzimática.

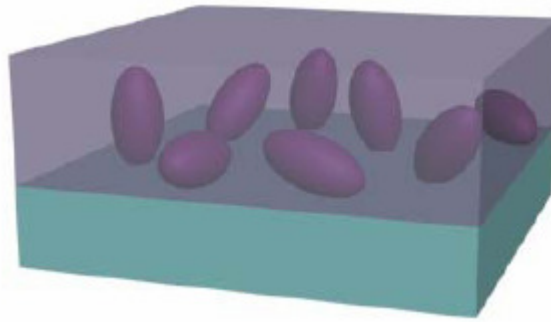


Figura: 13. Inmovilización enzimática por atrapamiento.

Microencapsulación

En esta técnica, los enzimas están rodeados de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no del enzima (Figura: 14).

Este método permite que el material biológico esté en contacto directo con el transductor, manteniendo, a su vez, la alta selectividad de los enzimas puesto que no se ven afectados por los cambios de pH, temperatura o fuerza iónica en el medio [45].

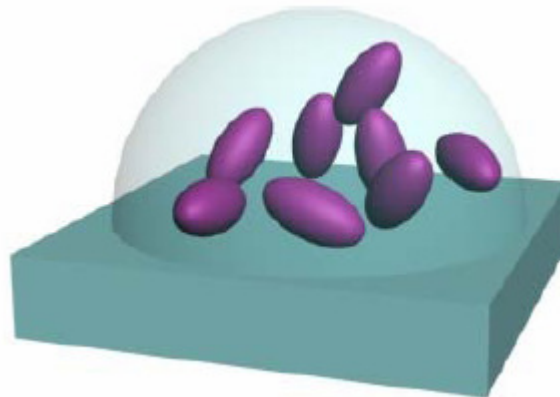


Figura: 14. Inmovilización enzimática mediante microencapsulación.

Adsorción en la superficie

En la adsorción, el enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas (Figura: 15), fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Se suelen utilizar diferentes sustancias con gran capacidad de adsorber material biológico, como por ejemplo alúmina, arcillas, grafito y sílica gel. Los principales factores que influyen en la adsorción son:

-
- El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
 - La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción del enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.
 - El diámetro del poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor del enzima.
 - La presencia de iones que actúen como cofactores del enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Es un método de preparación sencilla, bajo coste y que no implica cambios de especificidad enzimática, pero tiene como inconvenientes que es poco estable desde el punto de vista mecánico, y que la unión con el soporte es débil.

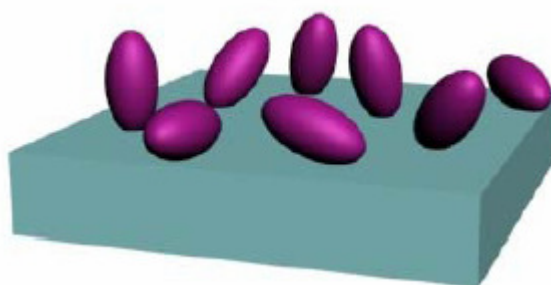


Figura: 15. Inmovilización enzimática por adsorción sobre la superficie.

Entrecruzamiento (cross-linking)

Es la técnica que se ha empleado con éxito en esta tesis para la fijación de la enzima glucosa oxidasa en la superficie del compuesto PVC/TTF-TCNQ (*Capítulo III.4*). En la bibliografía es ampliamente utilizada para la estabilización de enzimas [68]. El método consiste en la utilización de reactivos bifuncionales (dialdehidos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, e incluso, diaminas, si están activadas con carbodiimida) que originan uniones intermoleculares entre moléculas de enzima

(Figura: 16). Los entrecruzadores más utilizados son glutaraldehído, hexametildisocianato y 1,5-dinitro-2,4-diflorobenceno [28].

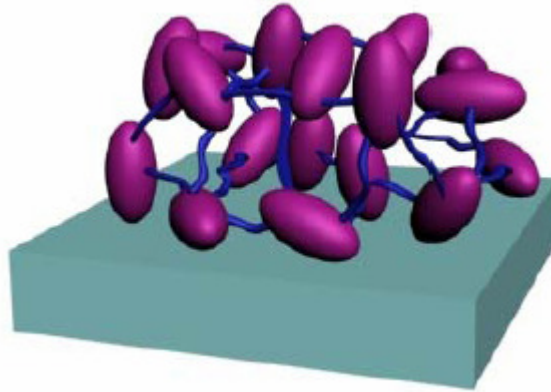


Figura: 16. Inmovilización enzimática mediante entrecruzamiento.

El entrecruzamiento permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, entrecruzando el material biológico con proteínas sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina como, por ejemplo, la seroalbúmina bovina (BSA) [65].

Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar el enzima por adsorción en una matriz polimérica, consiguiéndose así una elevada carga enzimática, y posteriormente modificarlo con entrecruzadores [69].

Unión Covalente

La metodología de la unión covalente entre el transductor y el enzima se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de los enzimas, los más empleados para la formación de enlaces covalentes son principalmente la lisina, la cisteína, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente [45].

Este tipo de inmovilización precisa del control de parámetros como el pH o la fuerza iónica de la solución, así como disponer de una superficie del transductor perfectamente

limpia. La gran ventaja de este método es que permite conseguir tiempos de vida muy largos, entre 4 y 14 meses [28].

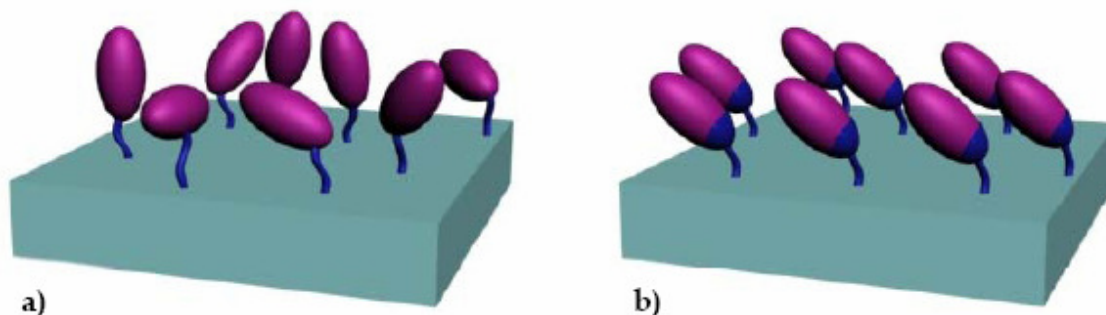


Figura: 17. Inmovilización enzimática mediante unión covalente. a) no orientada, b) orientada.

En la figura: 17 se muestran los dos tipos de inmovilización mediante unión covalente existentes, en función si el enzima está o no orientado.

2.6 Biosensor Amperométrico Enzimático

La primera publicación científica sobre un biosensor amperométrico se remonta a 1962, por Clark y Lions, para la determinación de glucosa en sangre [70]. Desde entonces, estos dispositivos, especialmente los utilizados para la determinación de glucosa, han sido de los más estudiados [71].

Los biosensores combinan la elevada selectividad de los enzimas con la simplicidad de los transductores amperométricos. En la figura: 18 se muestra el funcionamiento básico de este tipo de dispositivos. El analito difunde, primero a través de la solución (*i*) y después a través de la membrana (*ii*) (en el caso de existir), hasta entrar en contacto con el centro activo del enzima, donde reacciona generando un producto, generalmente con propiedades redox (*iii*). Éste es oxidado o reducido sobre el electrodo (*iv*), generando un producto que difunde de nuevo a la solución (*v*) [38].

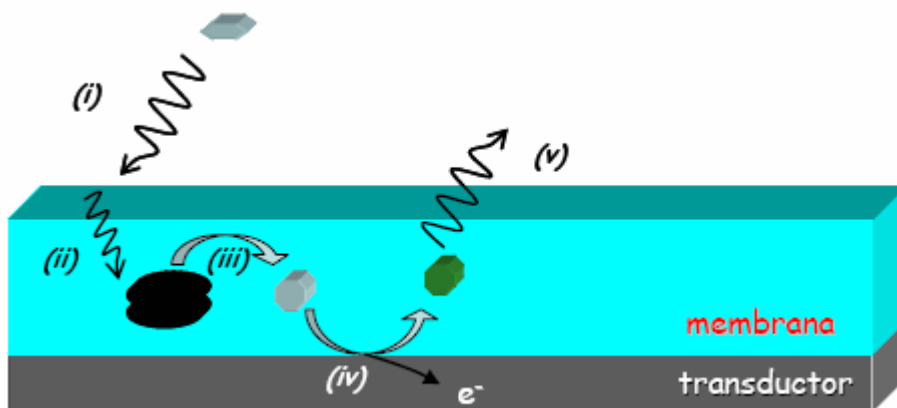


Figura: 18. Esquema de un biosensor de glucosa. (i) Difusión del analito y del cofactor al interior de la membrana; (ii) reacción enzimática; (iii) difusión de los productos hacia el electrodo y fuera de la membrana; (iv) reacción electroquímica; (v) difusión de los productos de la reacción electroquímica hacia la muestra.

La intensidad recogida es proporcional a la concentración del analito según la ley de Faraday (eq. (6)) estando limitada por los pasos (i) (ii) (iii). La reacción electroquímica suele ser mucho más rápida que la enzimática, por tanto no se puede considerar un paso limitante del mecanismo global.

Se han desarrollado diferentes métodos para la transferencia de electrones entre la enzima y el transductor amperométrico, lo que permite diferenciar tres generaciones de biosensores amperométricos (Figura: 19).

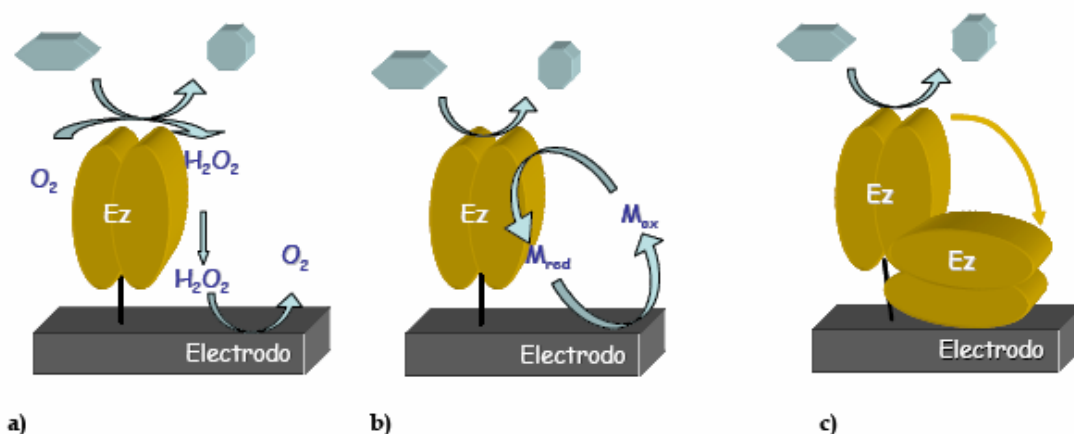
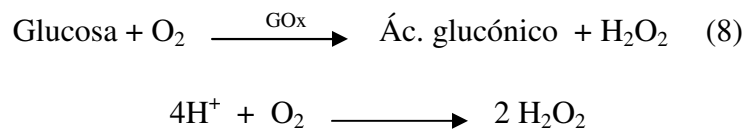


Figura: 19. Esquema de las tres generaciones de biosensores basados en oxireductasas. a) Primera, (b)Segunda y (c) Tercera generación.

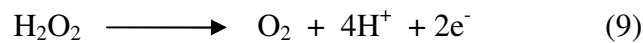
Primera Generación

Están basados en la medida de uno de los productos o del cofactor de la reacción enzimática. Por tanto, es necesario que la sustancia analizada tenga propiedades electroquímicas.

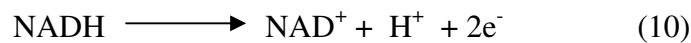
El electrodo de Clark pertenece a este grupo. Consiste en una membrana, compuesta por Glucosa oxidasa (GOx), inmovilizada sobre un electrodo que determina las variaciones de oxígeno en el medio. La concentración de glucosa presente en el medio es cuantificada mediante la reducción del oxígeno en el cátodo de platino a -700 mV, de acuerdo con el siguiente mecanismo,



En 1973, Guilbault y Lubrano [72], desarrollaron un nuevo tipo de biosensor de primera generación basado en la oxidación del agua oxigenada generada por la reacción enzimática,



En el caso de biosensores basados en deshidrogenasas, enzimas que facilitan el paso de protones de una especie a otra; es necesaria la presencia del cofactor nicotamida adenín dinucleótido (NAD^+). El seguimiento de la reacción catalítica se realiza mediante la oxidación de NADH,



El inconveniente de estos cofactores es la necesidad de aplicar sobrepotenciales muy altos, que pueden oxidar o reducir a su vez otros analitos que haya en el medio (interferentes). Además, en este tipo de reacciones se dan procesos de polimerización de los productos de reacción, que suelen pasivar la superficie del electrodo. Todo esto condujo a la utilización de mediadores, lo que dio paso a la segunda generación de biosensores amperométricos [73,74].

Segunda Generación

La segunda generación de biosensores incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo.

El mediador debe reaccionar de manera rápida con el centro activo, minimizando así la competición con el cofactor natural del enzima [71]. Es necesario también que tenga buenas propiedades electroquímicas, por ejemplo un potencial redox próximo a cero, con lo que se consiguen eliminar las reacciones redox de posibles interferentes [75].

Los mediadores más utilizados, libres en disolución o inmovilizados junto con los enzimas, son entre otros el par ferri/ferrocianuro, 1,4-benzoquinona, derivados del ferroceno, TTF, TCNQ, Meldola's blue y azul de metileno [38].

El primer biosensor de segunda generación data de 1984, fue desarrollado por Cass y Davis, con ferroceno como mediador [76].

Tercera Generación

Aquí, la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo se realiza de forma directa (Figura: 19(c)). Este tipo de biosensores muestra una mayor selectividad, puesto que trabajan a potenciales muy próximos a los intrínsecos del enzima, quedando menos expuestos a posibles interferentes [74]. En los últimos años se han desarrollado diferentes trabajos basados en este tipo de transferencia electrónica [77-79] y en esta tesis se presentará uno para la determinación de glucosa.

Una de las mayores dificultades en la construcción de este tipo de biosensores es como optimizar la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo. La gran mayoría de enzimas tiene el centro activo en su interior y hace imposible un contacto directo entre éste y la superficie del transductor. Uno de los enzimas más viables para su utilización en este tipo de biosensores es la Horse Radish Peroxidasa (HRP), ya que su centro activo no está en el interior [38, 80].

3. ELECTRODOS COMPÓSITOS.

3.1 Clasificación y generalidades.

Un electrodo compuesto puede definirse como un material que consta de al menos una fase conductora en conjunción con, al menos, una fase aislante, siendo el caso más usual un material que contiene una fase conductora y una fase aislante.

Los electrodos compósitos ofrecen muchas ventajas potenciales en comparación con los electrodos más tradicionales, consistentes en una fase conductora simple. Por ejemplo, los electrodos compósitos pueden a menudo fabricarse con gran flexibilidad a cuanto al tamaño y forma del material, permitiendo una fácil adaptación a una gran variedad de configuraciones electrónicas. Los electrodos compósitos de metales preciosos ofrecen ventajas en forma de un menor peso y de un menor coste en comparación con los correspondientes electrodos conductores puros. Una ventaja particular en electroanálisis es la mayor relación señal/ruido que a menudo se observa con los electrodos compósitos (con respecto al electrodo conductor puro), lo que generalmente se traduce en mejores (menores) límites de detección. Quizás el aspecto más interesante de los electrodos compósitos es la versatilidad que permiten para incorporar especies que intensifiquen la selectividad y/o la sensibilidad del propio material electrónico, bien mediante modificación química del conductor y/o del aislante antes de la fabricación del compuesto, o mediante incorporación física dentro de la matriz del compuesto. A diferencia de los electrodos modificados superficialmente, estos electrodos compósitos pueden ser regenerados en su superficie sin pérdida de modificador.

Los electrodos compósitos se pueden clasificar según el modo en el que el conductor y el aislante están distribuidos dentro del material compuesto (Figura: 20). Puesto que, por definición, un electrodo compuesto consiste en al menos una fase conductora y al menos una fase aislante entremezcladas de alguna manera, la superficie del electrodo compuesto en contacto con la disolución consiste necesariamente en regiones de conductor separadas por regiones de aislante. La primera clasificación está basada en si la disposición del conductor y del aislante está altamente ordenada (un array) o es aleatorio (un conjunto).



Figura: 20. Clasificación de los electrodos compósitos.

Los electrodos de array pueden clasificarse, posteriormente, dependiendo de si el conductor está confinado en la superficie de un aislador (o de un aislante en la superficie de un conductor), o el conductor ordenado penetra en el seno del material. La mayoría de los electrodos de array utilizados en Electroanálisis son superficiales y pueden encontrarse algunos ejemplos en la revisión de Tallman y Petersen [81]. Estos arrays tienen geometrías bien definidas pero, sin embargo, sus superficies a menudo no son planas y pueden ser también bastantes delicadas de pulir, requiriéndose otra forma de regeneración superficial.

Por lo que se refiere a los electrodos compósitos de conjunto, éstos se pueden clasificar dependiendo de la distribución del conductor a través de la matriz del compósito. Los materiales en los que las partículas de conductor están distribuidas aleatoriamente por todo el aislante se denominan compósitos dispersos. Una partícula de conductor (o un agregado de partículas) tiene una probabilidad idéntica de ocupar cualquier punto en la matriz. En cambio, los compósitos consolidados están formados de tal manera que el conductor se extiende a través del compósito de modo reticulado, aleatorio, con regiones de aislante puro y de conductor puro que no están entremezcladas.

Los compósitos dispersos pueden fabricarse en forma de pasta o bien sólidos. Los compósitos dispersos sólidos pueden prepararse de dos formas. El método más común

(mezclado con monómeros) implica la dispersión uniforme de un conductor en un monómero que es subsiguientemente polimerizado [81]. Alternativamente, el conductor puede dispersarse en un polímero o una cera fundidos o disueltos (mezclado con polímeros) y permitir que la mezcla se endurezca.

Los compósitos consolidados se pueden fabricar también de dos maneras generales. Una implica la impregnación de, o bien de un conductor poroso con un aislante, o bien de un aislante poroso con un conductor dentro del compósito (y por tanto en la superficie del electrodo) está predeterminada por la estructura porosa del conductor o del aislante.

La segunda manera de formar electrodos consolidados implica la mezcla de un conductor en polvo con un polímero en polvo y el moldeado por compresión de la mezcla. Dentro de este grupo se sitúan los electrodos compósitos de grafito y PVC, que serán el punto de partida del nuevo compósito propuesto en este trabajo, y que se trata con más detalle en el *Capítulo III*. Estos materiales se llaman compósitos segregados. En Electroanálisis, los compósitos consolidados en general, y los compósitos segregados en particular, presentan frecuentemente ventajas en comparación con los compósitos dispersos.

Los electrodos de array y los electrodos compósitos impregnados conducen a través de regiones bastantes continuas de conductor, mayoritariamente puro y homogéneo. Por otra parte, los electrodos compósitos segregados y los dispersos conducen a través de regiones bastantes discontinuas, altamente heterogéneas de conductor y aislante entremezclados, un proceso descrito a menudo por modelos de percolación [81]. Para poseer una conductividad adecuada para su uso en Electroanálisis, un material compósito segregado o disperso debe tener una fracción de volumen conductor, f , algo por encima de la composición crítica o umbral de percolación, f_c . Esta composición crítica es significativamente menor para compósitos segregados que para compósitos dispersos. Para ambos tipos de materiales, la mayor fracción de volumen utilizable de conductor está a menudo determinada por la estabilidad mecánica requerida para el material, y varía fuertemente con la naturaleza del aislante y del conductor.

La superficie de un electrodo compósito puede asemejarse a un conjunto de microelectrodos. Es este aspecto el que da lugar a las mejoras en la relación señal/ruido

para muchos electrodos compósitos, cuando se les compara con sus correspondientes fases conductoras puras.

Un electrodo compósito es capaz de producir una corriente mayor por unidad de área activa que la del correspondiente macroelectrodo conductor puro, tanto en disoluciones quiescentes como bajo condiciones hidrodinámicas. Puesto que el ruido y la corriente de fondo (por unidad de área activa) deben ser similares para ambos tipos de electrodos, el electrodo compósito muestra, presumiblemente, la mayor relación señal/ruido. A medida que el recubrimiento fraccional de la superficie geométrica del compósito por el conductor aumenta, la relación señal/ruido tiende a disminuir, aproximándose en el límite a la del electrodo conductor puro. Es por esta razón por la que los compósitos consolidados, que poseen buena conductividad a un bajo valor de f , es presumible muestren una relación señal/ruido superior a la de los compósitos dispersos.

En el *Capítulo III.1* se lleva a cabo la preparación de un nuevo compósito PVC/TTF-TCNQ, basado en el conocido compósito de PVC/Grafito [82]. Este electrodo compósito se encuadra dentro de los que poseen una disposición aleatoria (un conjunto) del conductor y del aislante. Y dentro de este grupo, se trata de un compósito disperso, debido a que las partículas de conductor están distribuidas aleatoriamente. Respecto a la fabricación, se emplea en forma de sólido y mezclado con el polímero PVC.

4. ELECTRODOS MODIFICADOS QUÍMICAMENTE.

4.1 Fundamentos Teóricos y Antecedentes Bibliográficos.

Los electrodos de pasta de carbono y de película de mercurio significan el comienzo de una nueva era en Electroanálisis, y pueden considerarse como precursores de los electrodos de superficie modificada. Utilizando un electrodo modificado, se intenta ejercer un mayor control sobre sus características e influir, no sólo en el potencial aplicado, sino también en la reactividad superficial, pudiendo preseleccionar o anticipar la respuesta del electrodo modificado hacia especies externas.

Así, el material modificador se elige de tal manera que sea o bien selectivo (e incluso específico) a un analito en particular, o bien capaz de mediar reacciones redox que son lentas, o incluso imposibles, sobre el electrodo sin modificar. De esta forma, los procesos redox que ocurren entre el electrodo y el analito en disolución están fuertemente influidos por las características del modificador empleado. La gama de especies modificadoras es muy amplia, variando desde depósitos metálicos o capas de óxidos metálicos, hasta el uso de materiales orgánicos, enzimas o polímeros.

La capa de modificador debe permitir la comunicación electroquímica entre el material del electrodo y la disolución que contiene el analito, lo cual se asegura normalmente gracias a la presencia de un grupo electroactivo en dicha capa modificadora o, en algunos casos, mediante el empleo de polímeros conductores. La unión de estos centros mediadores de material base del electrodo puede conseguirse de muy diversas formas tanto físicas como químicas.

Los métodos más importantes para la modificación de superficies electródicas aparecen en la Figura: 21. Como ocurre con cualquier otro tipo de sensor, la aplicación con éxito de los electrodos modificados con fines analíticos depende principalmente de su capacidad para transducir la identidad o la concentración de analito con las siguientes propiedades: estabilidad, reproducibilidad, respuesta bien definida y bien comprendida, posibilidad de observar el parámetro de interés en un elevado intervalo de concentración y ausencia de interferencias. Las principales aplicaciones de los electrodos modificados en el área del Electroanálisis son: (1) preconcentración, (2) electrocatálisis y (3) eliminación de interferencias.

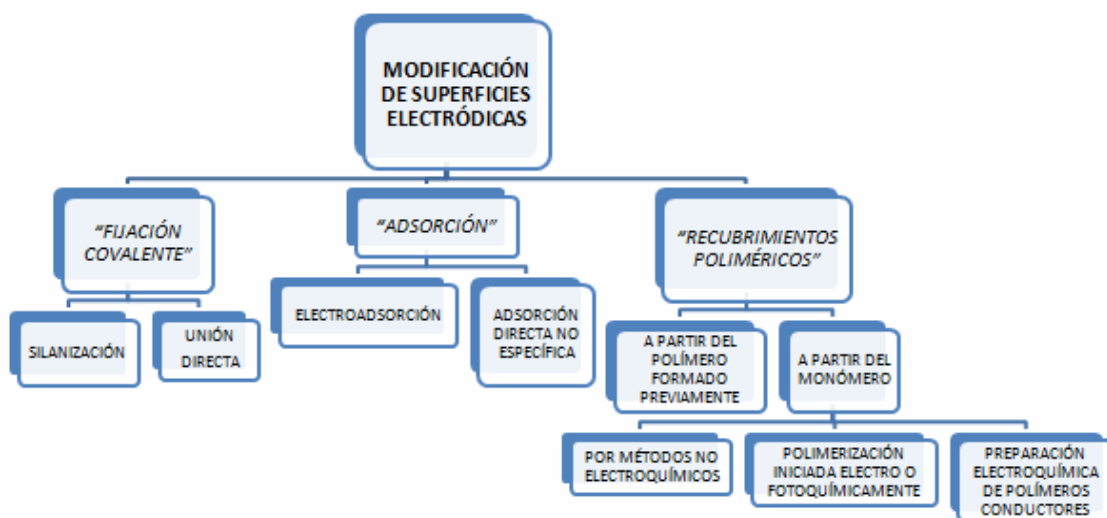


Figura: 21. Clasificación de los electrodos modificados.

La preconcentración empleando electrodos modificados químicamente presenta una cierta analogía formal con el análisis de trazas mediante la técnica electroquímica de adsorción-redisolución (stripping). Las especies de interés se acumulan, a partir de una disolución diluida, sobre la superficie del electrodo y, a continuación, se oxidan o reducen aplicando un barrido de potencial. Sin embargo, la “química” de la preconcentración depende del tipo de modificador utilizado y de la técnica de inmovilización empleada. Puede deberse simplemente a un proceso físico de adsorción, o puede producirse por intercambio iónico si el modificador es, por ejemplo, una resina como la Amberlita LA2 [83], o por formación de complejos o compuestos de coordinación estables cuando se emplean como modificadores sustancias tales como dimetilgloxima, para la determinación de trazas de Ni(II) [84,85], o 2,2'-bipiridina, en la determinación de Fe(III) [86].

Por otro lado, la posibilidad de efectuar la detección amperométrica de un analito de interés depende de la reacción redox que sufra dicha especie. Sin embargo, con frecuencia, las cinéticas electródicas hacen que tales procesos ocurran a potenciales mucho más positivos o negativos que lo predicho por la Termodinámica. La modificación de la superficie de una manera adecuada puede reducir o incluso eliminar esos sobrepotenciales, o desplazar el potencial redox a un valor al que pueda determinarse la especie de interés sin interferencias. Además de este desplazamiento en

el potencial formal operacional, a menudo, la reacción redox se produce a una velocidad mayor que la obtenida sobre el electrodo sin modificar.

La naturaleza del soporte al cual está enlazado el centro catalítico puede variar desde matrices poliméricas hasta metales, grafito o pasta de carbono. En cuanto a los mediadores redox, existe una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados con este fin. A este respecto, cabe destacar la revisión realizada por Wring y Hart [87] sobre la determinación de compuestos de importancia biológica, utilizando electrodos de carbono modificados con especies mediadoras orgánicas e inorgánicas (compuestos organometálicos), la de Kulesza y col. [88] que se centra principalmente en el empleo de películas inorgánicas de ftalocianinas, porfirinas y zeolitas, entre otras, la de Labuda [89] sobre las aplicaciones analíticas de la electrocatálisis con electrodos modificados en métodos voltamperométricos y cromatográficos y una más reciente, de Lyons [90], sobre el desarrollo de materiales poliméricos que pueden utilizarse como electrocatalizadores y como sensores amperométricos.

Por último, muchas veces se desea evitar el contacto entre el electrodo y determinadas especies que pueden encontrarse en la disolución de la muestra, bien porque se adsorban o bien porque sean electroactivas (interferentes) pero, a la vez, permitir el transporte de las especies deseadas hasta la superficie del electrodo. Con este propósito, se han empleado diversos tipos de películas poliméricas que eliminan dichas interferencias bien por su tamaño molecular [91] o por efectos de exclusión de carga [92,93]. Otros ejemplos de aplicaciones de este tipo se encuentran recogidas en la revisión de Wang sobre el empleo de electrodos modificados como sensores electroquímicos [94].

Estas tres formas de utilizar analíticamente los electrodos modificados, preconcentración, electrocatálisis y eliminación de interferencias, no son áreas aisladas sino que a menudo es posible aplicar, mediante modificación apropiada, varias de ellas simultáneamente, es decir, puede diseñarse por ejemplo, un electrodo que combine preconcentración con eliminación de interferencias, o con la electrocatálisis.

Existen en la bibliografía diversas revisiones generales acerca de electrodos modificados químicamente [95-104]. Cabe destacar las de Murray [95], Wallace [96] y Dong y col. [97], además de los trabajos de Wang [105,107] y Baldwin y col. [106] sobre la aplicación de los electrodos modificados como detectores en cromatografía

líquida y/o inyección en flujo. Otras revisiones más actuales son la de Davis [108], sobre detectores electroquímicos que incorporan carbón como sustrato principal, y la de Kumar [109], sobre los electrodos modificados con polímeros y los compósitos con polímeros/nanotubos de carbono.

4.2 Recubrimientos Poliméricos.

Durante la última década se han producido considerables avances en el desarrollo de materiales poliméricos que pueden ser utilizados para la obtención de sensores químicos y bioquímicos. Entre éstos, nos referiremos en este apartado a los electrodos modificados con películas de polímeros.

Se ha demostrado que el empleo de recubrimientos poliméricos para producir superficies modificadas conlleva varias ventajas importantes desde el punto de vista del análisis. Quizás, la más significativa sea que estos recubrimientos, en forma de multicapas, proporcionan una zona de reacción tridimensional en la superficie del electrodo, que ocasiona un aumento en el flujo de las reacciones que ocurren en dicha superficie, lo que a su vez produce un aumento de la sensibilidad.

Aunque los materiales poliméricos han sido depositados sobre los sustratos de muy diversas formas (enlace covalente, adsorción, mezcla física, etc.), parece ser que la electropolimerización es la que tiene más ventajas, constituyendo una ruta de síntesis polimérica simple, limpia y eficiente. Utilizando métodos electroquímicos se pueden controlar cuidadosamente la velocidad y la extensión del proceso de electropolimerización mediante la aplicación de las condiciones electroquímicas adecuadas. Además, las propiedades físicas y químicas del polímero resultante son también controladas por dichas condiciones electroquímicas durante el proceso de síntesis.

En comparación con los electrodos modificados químicamente mediante la formación de monocapas, los electrodos modificados con películas poliméricas ofrecen una mayor estabilidad física y química, una mayor densidad de centros activos (10^{-10} - 10^{-6} mol/cm² corresponden a $1-10^5$ monocapas), y una respuesta electroquímica muy sensible. Estas ventajas están asociadas con la estructura, composición y propiedades de los polímeros

empleados. Entre las cualidades deseables en un polímero para poder ser aplicado desde el punto de vista analítico deben mencionarse la facilidad de preparación, la formación de uniones estables con el electrodo, un largo tiempo de vida del mismo y que proporcionen un adecuado microentorno espacial, electroestático y químico.

La mayoría de las publicaciones están dedicadas a un grupo específico de materiales poliméricos. Aunque se han utilizado diversos tipos de polímeros para la modificación de electrodos, se pueden destacar tres grupos fundamentalmente: polímeros redox, ionómeros cargados y polímeros conductores electrónicamente.

Los *polímeros redox* contienen grupos redox activos unidos covalentemente a un esqueleto polimérico electroquímicamente inactivo. Un ejemplo de este tipo de polímeros es el poli(vinilferroceno). Estos materiales exhiben el fenómeno de conducción redox, es decir, la transferencia electrónica ocurre a través de procesos de autointercambio secuencial (salto de electrones) entre grupos redox vecinos unidos al esqueleto polimérico. Una característica típica de la conducción redox es que la conductividad es máxima al potencial normal del grupo redox inmovilizado, lo que corresponde a la situación en la cual la concentración de centros oxidados y reducidos en la película es la misma.

El segundo tipo de materiales poliméricos mencionado, los *ionómeros cargados*, están formados por grupos redox activos unidos electrostáticamente (tales como iones complejos metálicos multivalentes) dispersos en una matriz ionomérica a través de un proceso de intercambio iónico. En este caso, la movilidad de la carga puede producirse, bien por difusión física de los grupos electrostáticamente atrapados, o bien por salto electrónico entre grupos vecinos, como en el caso de los polímeros redox. Estos materiales son bastante atractivos desde el punto de vista de su fabricación, debido a que pueden prepararse rápidamente películas uniformes en las que puede variarse, de manera reproducible, la extensión de la carga. Además, la variedad de especies que pueden incorporarse en matrices poliméricas de intercambio iónico es muy amplia. Presentan una desventaja, y es que en estos materiales la estabilidad del reparto de los iones depende, en gran medida, de la concentración del electrolito soporte utilizado en la subsiguiente aplicación del electrodo.

Por último, el tercer tipo de material polimérico electroactivo, los *polímeros conductores electrónicamente*, exhiben propiedades que son fundamentalmente distintas de las de los polímeros redox y los ionómeros cargados. Una propiedad característica es que bajo las condiciones apropiadas, la conductividad es bastante elevada (1-100 S/cm), debido, principalmente, al hecho de que el esqueleto polimérico es altamente conjugado dando lugar a una deslocalización de la carga considerable. En estos materiales, el transporte de carga es debido a defectos deslocalizados en la cadena, como pueden ser los polarones o bipolarones, que se generan por oxidación del esqueleto del polímero. Este transporte de carga a lo largo de la cadena polimérica es muy rápido. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la conductividad es, en gran medida, función de la morfología del polímero [110]. Estos polímeros son semiconductores con una banda de valencia llena y una de conducción vacía, separadas por una barrera de energía. Mediante el “dopado” del polímero se pueden crear nuevas bandas de energía intermedias que hacen posible la movilidad de los electrones a esas nuevas bandas, aumentando la conductividad del material.

Los polímeros conductores constituyen una nueva generación de materiales funcionales con numerosas aplicaciones ligadas a las propiedades que presentan (Figura: 22). Una de las grandes ventajas que ofrecen es la posibilidad de modular dichas propiedades mediante el nivel de dopado. Por otra parte, combinan las propiedades electrónicas y ópticas de los metales y los semiconductores con las interesantes propiedades mecánicas y las ventajas de procesado de los polímeros.

Desde el punto de vista electroanalítico, uno de los compuestos más ampliamente utilizados, y el empleado en esta tesis (*Capítulo IV*) para la obtención de electrodos modificados con polímeros conductores, es el pirrol (Figura: 23) debido, principalmente, a la gran cantidad de contraiones que pueden incorporarse durante el proceso de polimerización, lo cual, a su vez, se debe a que el polímero de pirrol se sintetiza fácilmente a partir de una amplia gama de medios disolventes, incluyendo el agua [111].

En la Figura: 23 aparecen las estructuras de los polímeros conductores más ampliamente estudiados.

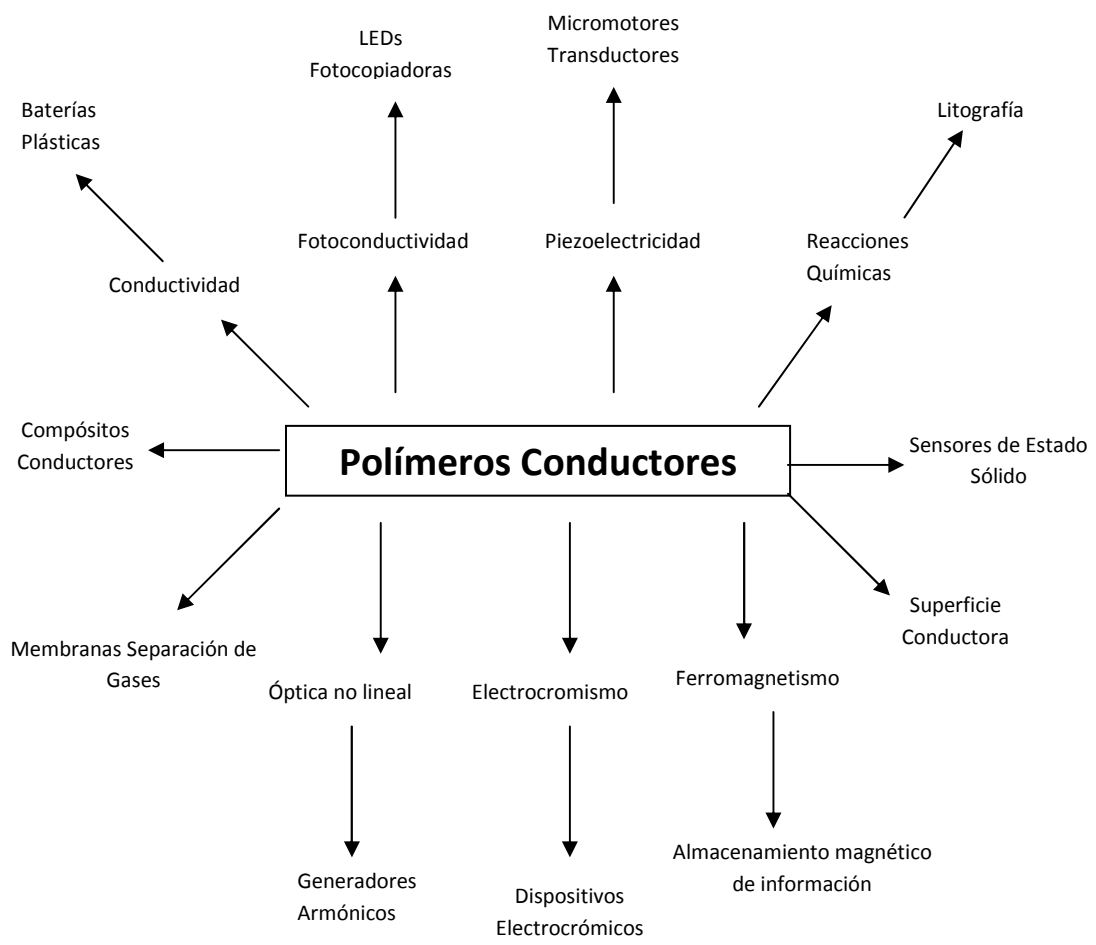


Figura: 22. Posibles aplicaciones para los polímeros conductores, en función de sus propiedades.

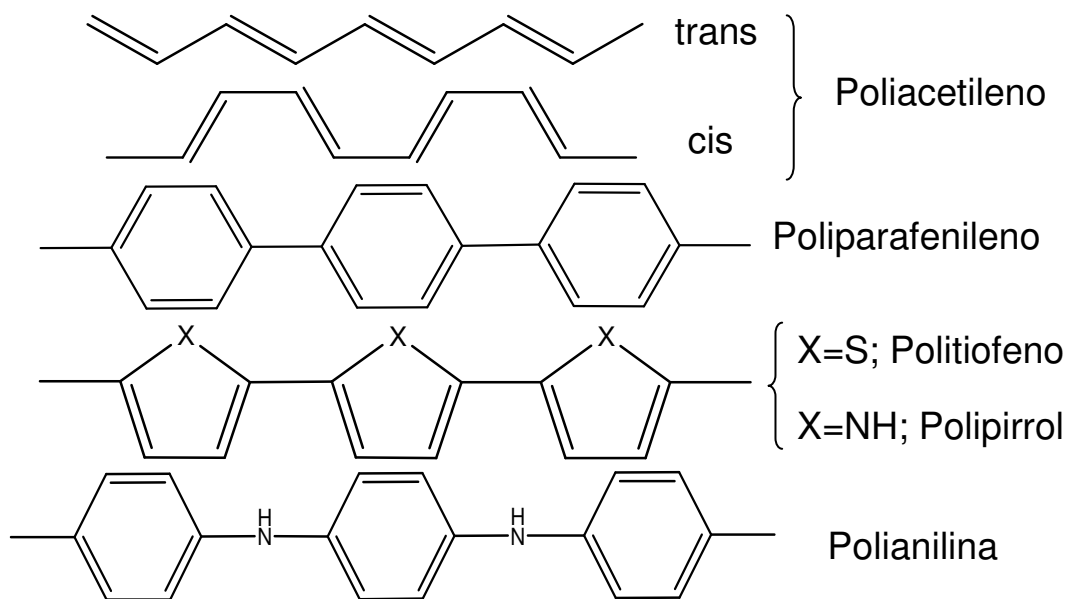


Figura: 23. Serie de polímeros mostrando la estructura unitaria.

5. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.

Con las técnicas electroquímicas se introduce una señal eléctrica en el sistema, y se obtiene información del mismo analizando la respuesta eléctrica que genera a dicha señal. Mediante un potenciostato, y gracias a las diversas técnicas disponibles, se pueden aplicar los métodos más interesantes para cada sistema, y se pueden realizar los estudios necesarios para la caracterización del mismo. En esta tesis se han aplicado principalmente dos técnicas, que se comentan a continuación.

5.1 Voltamperometría Cíclica.

Este tipo de técnica voltamperométrica se caracteriza por la aplicación al electrodo de trabajo, cuyas condiciones son estacionarias y sin agitación de la disolución, de una señal de potencial triangular (Ver Figura: 24). El potencial aplicado va desde un potencial inicial (E_0) hasta un potencial final (E_f), en el cual se produce una inversión en el sentido del barrido, volviendo a su valor original de E_0 . Este ciclo suele darse varias veces, y los potenciales en los que se da esta inversión de la dirección reciben el nombre de potenciales de inversión.

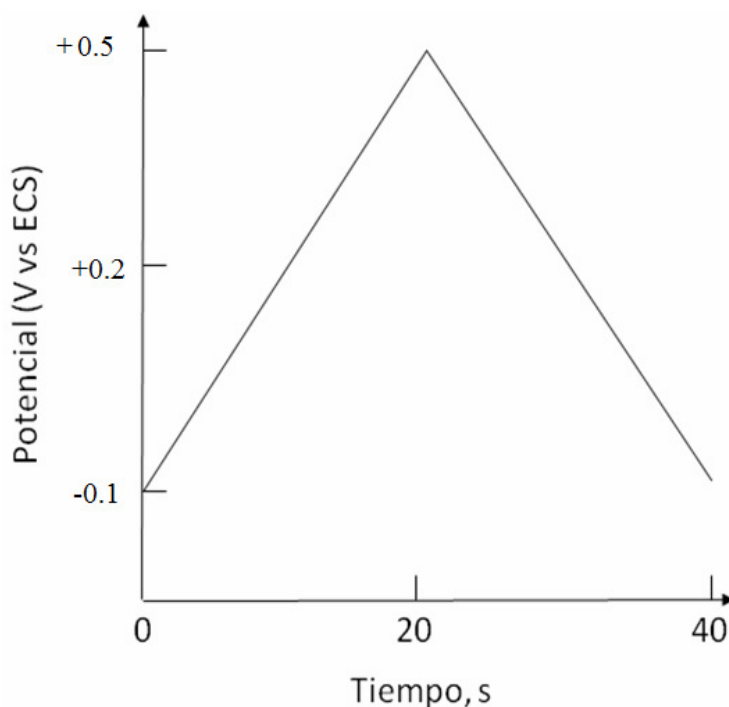


Figura: 24. Variación del potencial frente al tiempo en una Voltamperometría cíclica.

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

En la Figura: 25 se puede observar la variación de corriente cuando una disolución de $5 \cdot 10^{-2}$ M en $K_3Fe(CN)_6$ y 1 M en KBr se somete a la señal de excitación que anteriormente se ha descrito (el electrodo de trabajo usado es el compuesto de PVC/TTF-TCNQ desarrollado en esta tesis, y el de referencia es el electrodo de Ag/AgCl).

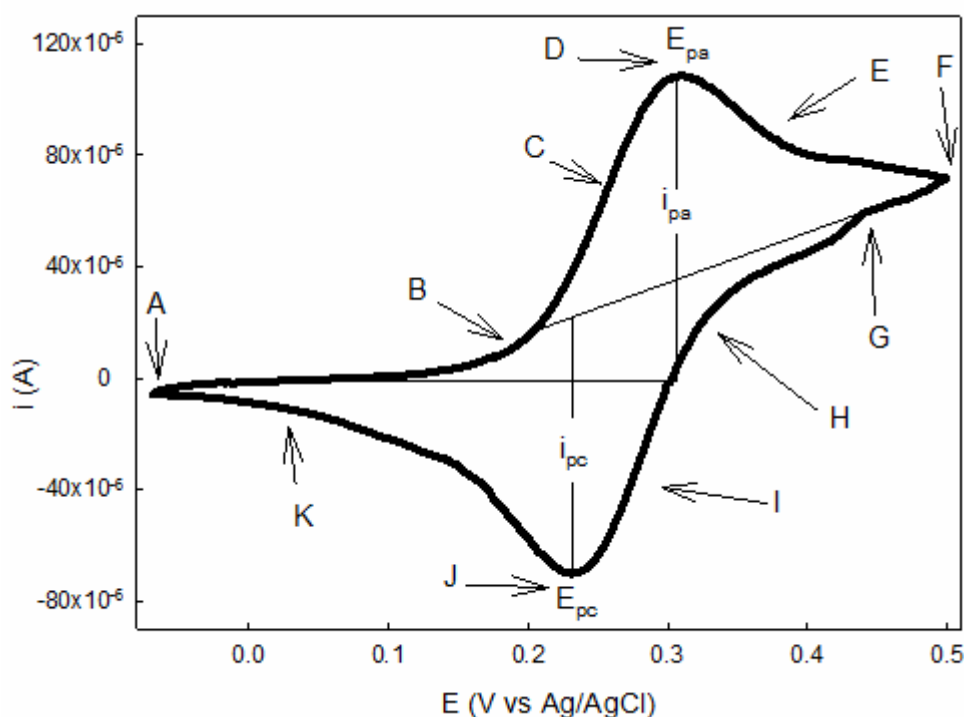


Figura: 25. Voltamperograma cíclico obtenido para un electrodo compuesto PVC/TTF-TCNQ. Electrolito $5 \cdot 10^{-2}$ M en $K_3Fe(CN)_6$ y 1 M en KBr. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

Al potencial inicial de -0.1 V, se observa una pequeña corriente catódica, que inmediatamente llega a cero cuando continúa el barrido. Esta corriente negativa inicial proviene de la reducción del agua para dar hidrógeno. No se observa corriente entre un potencial de 0.0 y $+0.1$ V, ya que no hay especies reducibles u oxidables en ese intervalo. Cuando el potencial alcanza valores más positivos que $+0.1$ V, se desarrolla

una corriente anódica (punto B Figura: 25) debida a la oxidación de un ion hexacianoferrito (II) a ion hexacianoferrato (III). La reacción en el ánodo es la siguiente:



En la región situada entre los puntos B y D señalados en la figura, tiene lugar un rápido aumento de la corriente a medida que la concentración superficial de iones hexacianoferrito se hace cada vez mayor. La corriente de pico se debe a dos componentes:

- Una es la corriente inicial transitoria necesaria para ajustar la concentración superficial de reactivo a su concentración de equilibrio dada por la ecuación de Nerst. Dicha corriente disminuye rápidamente (punto D a F) a medida que la capa de difusión se extiende hacia el exterior de la superficie del electrodo.
- La segunda es la corriente controlada por la difusión normal.

En el punto +0.5V se invierte la dirección del barrido, tal y como se vio en la Figura 25. Sin embargo, la corriente continúa siendo anódica. Una vez que el potencial va disminuyendo, la corriente cae a cero, y de anódica pasa a convertirse en catódica. Esta nueva corriente de carácter catódico es el resultado de la reducción del hexacianoferrato, que se ha ido acumulando en las cercanías de la superficie en el transcurso del barrido directo. Esta corriente catódica produce un pico, y después disminuye, a medida que el hexacianoferrato acumulado se consume en la reacción catódica.

Esta técnica voltamperométrica es usada, principalmente, como herramienta para análisis cualitativo. Los parámetros principales que permiten la identificación del analito son: el potencial de pico anódico (E_{pa}), el potencial de pico catódico (E_{pc}), la corriente de pico anódica (I_{pa}) y la corriente de pico catódica (I_{pc}). Todos estos parámetros están especificados en la Figura 25).

Las principales ecuaciones empleadas son:

- Para sistemas Reversibles:

$$\frac{I_{pc}}{I_{pa}} = 1 \quad (12)$$

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

siendo n el número de electrones intercambiado en la reacción, A el área del electrodo (cm^2), C la concentración de reactivo en el seno de la disolución (mol cm^{-3}), y D el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) de las especies oxidada y reducida (supuestos iguales).

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{59mV}{n} \quad (13)$$

En estos sistemas, E_p es independiente de la velocidad de barrido, mientras que I_p es proporcional a $v^{1/2}$.

- Para sistemas Cuasireversibles:

$$I_p = 0.4463K(\Lambda, \alpha)nFAC_A^*D^{1/2}v^{1/2} \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} \quad (14)$$

En estos sistemas, I_p aumenta con $v^{1/2}$ pero no es proporcional a ella. Además, el valor de ΔE_p se aproxima a $60/n$ (mV) a bajas velocidades de barrido, pero se incrementa al aumentar la velocidad de barrido.

- Para sistemas Irreversibles:

$$I_p = (2.99 \cdot 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (15)$$

En estos sistemas, no hay pico de vuelta. Además, E_p es una función de la velocidad de barrido. Aproximadamente, la variación de E_p es de $30/\alpha n$ (mV) por cada 10 veces de aumento de la velocidad de barrido.

Algunas aplicaciones de las curvas i-E reversibles son:

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

-
- b) A partir de forma de la onda se obtiene información del número de electrones de la reacción redox (que es útil a su vez para el estudio de los mecanismos y cinéticas de los procesos de óxido/reducción), y de si el sistema es reversible. A menudo, los voltamperogramas cíclicos revelan la presencia de intermedios en las reacciones de óxido/reducción.
- c) A partir de la posición de la onda se pueden estimar los potenciales formales del sistema químico.

En la presente tesis, se ha empleado esta técnica para obtener la siguiente información:

- ✓ Área real del electrodo compósito obtenido. Es un valor relativo que se calcula a partir de la carga transferida (número de electrones) en una determinada reacción electroquímica. En este caso, se ha empleado la oxidación del ion hexacianoferrito (II) a ion hexacianoferrato (III).
- ✓ Obtención del compósito con las mejores propiedades electroanalíticas y características físicas (compactación, dureza, etc.).
- ✓ Estabilización de los polímeros conductores de pirrol sintetizados sobre la superficie de electrodos metálicos, y posteriormente, la determinación voltamétrica de iones en la disolución de electrolito.

5.2 Amperometría.

Esta técnica implica la medición de la cantidad de corriente que circula por el circuito de medida, tras un determinado salto de potencial aplicado (ver Figura: 26). Este parámetro, intensidad de corriente, tiene utilidad analítica ya que se relaciona con la concentración del analito que se desea cuantificar. Para ello, se trabaja en condiciones donde el único mecanismo de transporte actuante con el analito es la difusión. Así se obtiene una “corriente límite” que será directamente proporcional a la concentración de analito, como se expresa en la ecuación de Ilkovic para electrodos de gota de mercurio.

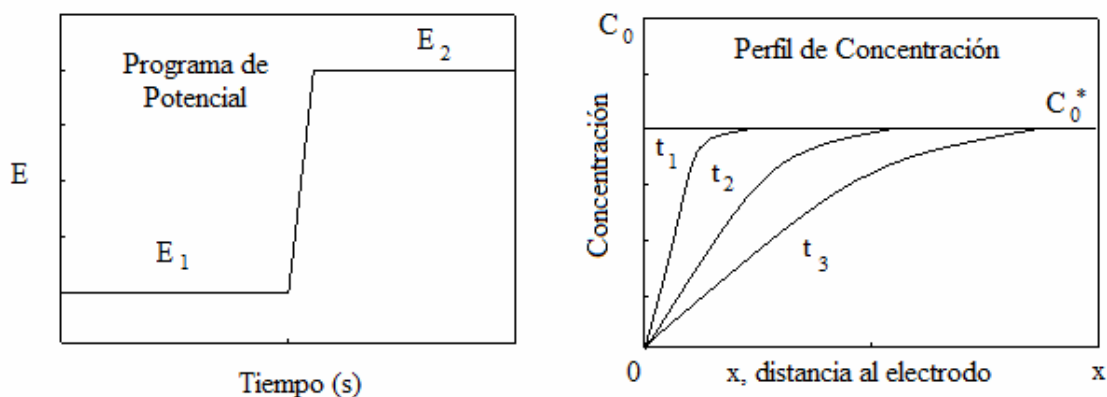


Figura: 26. A la izquierda se representa un programa de potencial, y a la derecha un perfil de concentración para una Amperometría.

Para llevar a cabo una determinación amperométrica con electrodos sólidos, se trabaja a un valor de potencial constante y se registra el valor de la corriente. Esta relación intensidad-concentración se trata de acuerdo con el modelo matemático basado en la Ley de Fick,

$$I = nFAD_0 \frac{\delta(C_0(o,t))}{\delta x} \quad (5)$$

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D_0 y C_0 son el coeficiente de difusión y la concentración del analito, respectivamente, y x representa la distancia de la doble capa.

En el caso de que la solución esté agitada constantemente, se puede considerar que x se mantiene constante y que se corresponde con el tamaño de la capa de difusión (δ). Así, la ecuación anterior puede simplificarse obteniéndose una relación lineal entre la intensidad medida y la concentración del analito,

$$I = \frac{nFAD_0}{\delta} C_0 \quad (6)$$

Esta técnica ha sido empleada en:

- ✓ El *Capítulo III*, para la detección amperométrica de distintos analitos de interés mediante sistemas en continuo (FIA), utilizando las condiciones idóneas para la determinación.

-
- ✓ El *Capítulo IV*, para la síntesis polimérica a carga controlada de polímeros de pirrol. El tiempo aplicado en la Amperometría regula la carga obtenida en la polimerización, la cual está directamente relacionada con las características del polímero obtenido.

Bibliografía

- [1] H. Akamatu, H. Inokuchi, Y. Matsunaga, *Nature*, 173 (1954) 168.
- [2] a) D.S. Acker, R.J. Harder, W.R. Hertler, W. Mahler, L.R. Melby, R.E. Benson, W.E. Mochel, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 6408; b) D.S. Acker, R.J. Harder, W.R. Hertler, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 3370.
- [3] F.G. Wuld, G.M. Smith, E.J. Hufnagel, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1970) 1453.
- [4] J. Ferraris, D.O. Cowan, V.V. Walatka, J.H. Perlstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 95 (1973) 948; L.B. Coleman, M.J. Cohen, D.J. Sandman, F.G. Yamagishi, A.F. Garito, A.J. Heeger, *Solid State Commun.*, 12 (1973) 1125.
- [5] W.A. Little, *Phys. Rev. A-Gen. Phys.*, 134 (1964) 1416.
- [6] G. Natta, G. Mazzanti, P. Corradini, *Atti. Accad. Naz. Lincei Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Rend.*, 25 (1958) 3.
- [7] T. Ito, H. Shirakawa, S. Ikeda, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, 12 (1974) 11.
- [8] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang, A.J. Heeger, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1977) 578.
- [9] D. Jérôme, A. Mazaud, M. Ribault, K. Bechgaard, *J. Phys. Lett.-Paris*, 41 (1980) L-95.
- [10] A.F. Hebard, M.J. Rosseinsky, R.C. Haddon, D.W. Murphy, S.H. Glarum, T.T. Palstra, A.P. Ramirez, A.R. Kortan, *Nature*, 350 (1991) 600; Z. Iqbal, R.H. Baughman, B.L. Ramakrishna, S. Khare, N.S. Murthy, H.J. Bornemann, D.E. Morris, *Science*, 254 (1991) 826.
- [11] a) J.P. Farges (ed.), *Organic Conductors: Fundamentals and Application*, Marcel Dekker, 1994; b) H.S. Nalwa (ed.), *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, vols. 1-4, Wiley, 1997; c) T. Skotheim, R.L. Elsenbaumer, J.R. Reynolds (eds.), *Handbook of Conducting Polymers* by Marcel Dekker, Inc., 1998.

-
- [12] a) J.R. Ferraro, J.M. Williams, *Introduction to Synthetic Electrical Conductors*, Academic Press, 1987; b) G. Saito, S. Kagosima (eds.), *The Physics and Chemistry of Organic Superconductors*, Springer-Verlag, 1990; c) J.M. Williams, J.R. Ferraro, R.J. Thorn, K.D. Carlson, U. Geiser, H.H. Wang, A.M. Kini, M.H. Whangbo, *Organic Superconductors (Including Fullerenes)*, Prentice Hall, 1992.
- [13] a) N. Martin, C. Seoane, *Mundo Científico*, 11 (1991) 820; b) M.R. Bryce, *Chem. Soc. Rev.*, 20 (1991) 355; c) M.R. Bryce, *J. Mater. Chem.*, 5 (1995) 1481; d) G.C. Papavassiliou, A. Terzis, P. Delhaes, en *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, vol. 1, (H.S. Nawa, ed.), Wiley, 1997, 151.
- [14] H. Shirakawa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 2574; A.G. MacDiarmid, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 2581; A.J. Heeger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 2591.
- [15] A.K. Bakhshi, Y. Yamaguchi, H. Ago, T. Yamabe, *Mol. Eng.*, 6 (1996) 239.
- [16] T.J. Marks, *Science*, 227 (1985) 881; M. Hanack, M. Lang, *Adv. Mater.*, 6 (1994) 819; H. Schultz, H. Lehmann, M. Rein, M. Hanack, *Struct. Bond.*, 74 (1991) 41.
- [17] E. Ortí en *New Organic Materials*, (C. Seoane, N. Martín, eds.), Univ. Complutense Madrid, 1994.
- [18] R.C. Haddon, *Acc. Chem. Res.*, 25 (1992) 127.
- [19] W. Krätschmer, L.D. Lamb, K. Fostiropoulos, D.R. Huffman, *Nature*, 347 (1990) 354.
- [20] T.J. Kistenmacher, T.E. Phillips, D.O. Cowan, *Acta Crystallogr. B*, 30 (1974) 763.
- [21] H. Klauk, U. Zschieschang, J. Pflaum. *Nature*, 445 (2007) 745; J. Li, S.B. Tang; L. Lu, , *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 9401; T.C. Pearce, S.S. Schiffman, H.T. Nagle, J.W. Gardner. *Handbook of machine olfaction: Electronic nose technology*, John Wiley & Sons, 2003; C. Hagleitner, A. Hierlemann, D. Lange. *Nature*, 414 (2001) 293; N.A. Rakow, K.S. Suslick. *Nature*, 406 (2000) 710; M.C. Janzen, J.B. Ponder, D.P. Bailey. *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 3591; F. Yakuphanoglu, B.F. Senkal. *J. Phys. Chem. C.*, 111 (2007) 1840; T. Dadosh, Y. Gordin, R. Krahn, I. Khirrich. *Nature*, 436 (2005) 677; W.H. Howie, F. Claeysens, H. Miura. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 1367; C.D.

Dimitrakopoulos, P.R.L. Malenfant. *Adv. Mater.*, 14 (2002) 99; P. Peumans, S. Uchida, S.R. Forrest. *Nature*, 425 (2003) 158.

[22] L. Ristic. *Sensor technology and devices*, ed. I. Artech House. (1994), Norwood.

[23] N. Graber, H. Ludi, H.M. Widmer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1 (1990) 239.

[24] W.H. Göpel; J.N. Zemel. *Sensors. A comprehensive Survey. Vol 1*, ed. W. VCN. (1989).

[25] W.H. Göpel; J.N. Zemel. *Sensors. A comprehensive Survey. Vol 2*, ed. W. VCN. (1991).

[26] H. Wohltjen. *Analytical Chemistry* 56 (1984) 87.

[27] A.K. Turner, Isao. *Biosensor: fundamentals and applications*, ed. O.U. Press., New York (1987),.

[28] B. Eggins. *Biosensors, an introduction.:* John Wiley & Sons Ltd (1996).

[29] J. Janata, M. Josowicz, P. Vanysek, D.M. DeVaney. *Analytical Chemistry* 70 (1998) 179.

[30] J. Janata, M. Josowicz, D.M. DeVaney, *Analytical Chemistry* 66 (1994) 207.

[31] J. Janata. *Analytical Chemistry* 73 (2001) 150.

[32] C.J. McNeil, D. Athey, M. Ball, W.O.Bo. *Analytical Chemistry* 67 (1995) 3928.

[33] T. Hofmann, K. Schroder, J. Zacheja. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 37 (1996) 37.

[34] E. Katzy, I. Willner. *Electroanalysis*, 15 (2003) 913.

[35] E. Souteyrand, D. Nicolas, E. Queau. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 26 (1995) 174.

[36] M.M. Castillo-Ortega, D.E. Rodríguez, J.C.Encinas. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 85 (2002) 19.

-
- [37] S. Pal; W. Ying; E.C. Alcocilja. *Biosystems Engineering* 99 (2008) 461.
- [38] M. Pravda. *Applications of Electrochemical Sensors and Detection Systems in Biomedical Analysis, in Pharmaceutical Sciences*. University of Pardubice (1998).
- [39] R.A. Saary, J.H. Weber. *Analytical Chemistry* 52 (1980) 2095.
- [40] Y. Taniy, Y. Umezawa. *Sensor Letters* 3 (2005) 99.
- [41] C. Jimenez, L. Moreno, C. de Haro, A. Florido. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 91 (2003) 103.
- [42] T.J. Wooster, A.M. Bond, *Analyst* 128 (2003) 1386.
- [43] T.J. Wooster, A.M. Bond, M.J. Honeychurch, *Anal. Chem.* 75 (2003) 586.
- [44] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson. *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001) 121.
- [45] B. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*, ed. *John Wiley & Sons Ltd* (2002).
- [46] L. Pastorino, F.C. Soumetz. *Journal of Immunological Methods* 313 (2006) 191.
- [47] M.L. Valero, J.A. Camarero, T. Haack, M.G. Mateu. *Journal of Molecular Recognition* 13 (2000) 5.
- [48] M. Díaz-González, M.B. González-García, A. Costa-García. *Electroanalysis* 17 (2005) 1901.
- [49] J.H. Zhai, H. Cui, R.F. Yang. *Biotechnology Advances* 15 (1997) 43.
- [50] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang. *Biosensors and Bioelectronics* 15 (2000) 273.
- [51] K.M. Millan, A. Saraullo, S.R. Mikkelsen. *Analytical Chemistry* 66 (1994) 2943.
- [52] K.M. Millan, S.R. Mikkelsen. *Analytical Chemistry* 65 (1993) 2317.
- [53] K.M. Millan, A.J. Spurmanis, S.R. Mikkelsen. *Electroanalysis* 4 (1992) 929.
- [54] E. Vaiopoulou, P. Melidis, E. Kampragou. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 365.

-
- [55] C.M. Ruan, L.J. Yang, Y.B. Li. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 519 (2002) 33.
- [56] A.J. Baeumner. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003) 434.
- [57] S. Jiao, W.C. Zhang, J.K. Cao. *Progress in Brain Research* 78 (1988) 575.
- [58] J.S. Sidwelly, G.A. Rechnitz. *Biotechnology Letters* 7 (1985) 419.
- [59] L.C. Vieira, K.O. Lupetti, O. Fatibello. *Analytical Letters* 35 (2002) 2221.
- [60] M. Topcu Sulak, O. Gokdogan, A. Gulce. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1719.
- [61] G.E. De Benedetto, F. Palmisano, P.G. Zambonin. *Biosensors and Bioelectronics* 11 (1996) 1001.
- [62] S.B. Adeloju, S.J. Shaw, G.C. Wallace. *Analytica Chimica Acta* 323 (1996) 107.
- [63] F. Kuralay, H. Ozyoruk. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 114 (2006) 500.
- [64] W. Hartmeier. *Trends in Biotechnology* 3 (1985) 149.
- [65] M. Arroyo. *Ars pharmaceutica* 39 (1998) 93.
- [66] D. Ivekovic, S. Milardovic, B.S. Grabaric. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 872.
- [67] M.A. Alonso Lomillo, J. Gonzalo Ruiz, F.J. Muñoz Pascual. *Analytica Chimica Acta* 547 (2005) 209.
- [68] S.S. Wongy, L.J. Wong. *Enzyme and Microbial Technology* 14 (1992) 866.
- [69] C. Jiménez, J. Bartrol, N.F. de Rooij. *Analytica Chimica Acta* 351 (1997) 169.
- [70] L.C. Lions, J.R. Clark. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 102 (1962) 28.
- [71] J. Wang. *Electroanalysis* 13 (2001) 983.
- [72] G.L. Guilbault. *Analytica Chimica Acta* 64 (1973) 439.
- [73] L. Gordon, A. Lindgren, T. Larsson. *Analytica Chimica Acta* 400 (1999) 91.

-
- [74] R.S. Freire, L. Kubota, L. Mello. *Journal Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 230.
- [75] A. Chaubevy, B.D. Malhotra. *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 441.
- [76] A.E. Cass, G. Davis, G.D. Francis. *Analytical Chemistry* 56 (1984) 667.
- [77] A.L. Ghindilis, P. Atanasov, E. Wilkins. *Sensors and Actuators B-Chemical* 34 (1996) 528.
- [78] K.V. Gobiy, F. Mizutani. *Sensors and Actuators B-Chemical* 80 (2001) 272.
- [79] Y. Tian, L.Mao, T. Okajima. *Analytical Chemistry* 74 (2002) 2428.
- [80] S. Xuy, X. Han. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004) 1117.
- [81] D.E. Tallman, S.L. Petersen. *Electroanalysis* 2 (1990) 499.
- [82] M. Luque, A. Ríos, M. Valcárcel. *Analytica Chimica Acta* 395 (1999) 217.
- [83] K. Kalcher. *Talanta* 33 (1986) 489.
- [84] K.N. Thomsen, L. Kryger, R.P. Baldwin. *Anal. Chem.* 60 (1988) 151.
- [85] R.P. Baldwin, J.K. Christensen, L. Kryger. *Anal. Chem.* 58 (1986) 1790.
- [86] A.R. Guadalupe, H.D. Abruña. *Anal. Chem.* 57 (1985) 142.
- [87] S.A. Wring, J.P. Hart. *Analyst* 117 (1992) 1215.
- [88] J.A. Cox, R.K. Jaworsky, P.J. Kulesza. *Electroanalysis* 3 (1991) 869.
- [89] J. Labuda. *Chem. Listy.* 86 (1992) 167.
- [90] M.E.G. Lyons, A. Flynn. *Analyst* 125 (2000) 1611.
- [91] T. Ikeda, R. Schmehl, P. Denisevich, K. Willman. *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2683.
- [92] G.A. Gerhardt, A.F. Oke, G. Nagay. *Brain Res.* 290 (1984) 390.
- [93] G. Nagay, G.A. Gerhardt, A.F. Oke. *J. Electroanal. Chem.* 188 (1985) 85.
- [94] J. Wang. *Electroanalysis* 3 (1991) 255.

-
- [95] R.W. Murray, A.G. Ewing, R.A. Durst. *Anal. Chem.* 59 (1987) 379.
- [96] C.G. Wallace. “*Chemical Sensors*”, Chapman and Hall, New York (1988) 132.
- [97] S. Dong, Y. Wang. *Electroanalysis* 1 (1989) 99.
- [98] R.W. Murray. *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.*, 30 (1986) 168.
- [99] P.S. Zacharias, *Indian J. Environ Prot.* 9 (1989) 468.
- [100] E. Barendrecht, *J. Appl. Electrochem.* 20 (1990) 175.
- [101] J. Labuda. *Zh. Anal. Khim.* 45 (1990) 629.
- [102] A.A. Kaplin, N.P. Pikula, E. Neiman. *Zh. Anal. Khim.* 45 (1990) 2086.
- [103] J. Labuda. *Sel. Electrode Rev.* 14 (1992) 33.
- [104] R.J. Foster, J.G. Vos. *Compr. Anal. Chem.* 27 (1992) 465.
- [105] J. Wang. *Anal. Chim. Acta* 234 (1990) 41.
- [106] R.P. Baldwin, K.N. Thomsen. *Talanta* 38 (1991) 1.
- [107] E. Wang, H. Ji, W. Hou. *Electroanalysis* 3 (1991) 1.
- [108] M.M. Villalba, J. Davis. *Journal of Solid State Electrochemistry* 12 (2008) 1245.
- [109] S.A. Kumar, S.M. Chen. *Sensors* 8 (2008) 739.
- [110] G. Inzelt. *Electroanal. Chem.* 18 (1994) 89.
- [111] M.D. Imisides, M. John, P.J. Riley, G.G. Wallace. *Electroanalysis* 3 (1991) 879.

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”.

Isaac Newton

“La ciencia es un gran juego. Es inspiradora y refrescante, y el campo de juego es el universo entero”

Isidor Isaac Rabi

"Los grandes espíritus siempre han tenido que luchar contra la oposición feroz de mentes mediocres"

Albert Einstein

“Sólo una cosa vuelve un sueño imposible: el miedo a fracasar”.

Paulo Coelho

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

“Me lo contaron y lo olvidé, lo vi y lo entendí, lo hice y lo aprendí”

Confucio

CAPÍTULO II

EXPERIMENTAL

1. Instrumentación.

1.1 Aparatos.

1.2 Electrodo y Células de trabajo.

1.3 Sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

2. Reactivos.

3. Procedimientos Experimentales.

3.1 Preparación del Electrodo compuesto.

3.2 Preparación del Electrodo modificado.

4. Condiciones de trabajo.

5. Tratamiento de datos.

1. INSTRUMENTACIÓN

1.1 Aparatos.

Para llevar a cabo los diferentes experimentos se han empleado:

- **Potenciostato-galvanostato EG&G PARC modelo 273** y el software de investigación electroquímica M270, adecuado para su control mediante ordenador. Se registraron las curvas i-E e i-t.
- **Agitador magnético P-Selecta Agimatic.**
- **pH-metro de precisión Crison 2001** calibrado de la forma habitual con disoluciones reguladoras de pH 7.00 y 4.00 a $(25 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$.
- **Balanza electrónica digital Sartorius 1712MP8** para realizar las pesadas. Permite la precisión de $\pm 0.01\text{mg}$.
- **Milli-Q PLUS de Millipore** para la obtención de agua ultrapura, basado en resinas de cambio iónico y un filtro de carbón activo para eliminar las trazas de materia orgánica. Este sistema era alimentado con agua bidestilada.
- **Prensa hidráulica Perkin-Elmer** para preparar pequeñas pastillas cilíndricas de 2.5 mm de espesor y 4.1 mm de diámetro.
- **Mechero Bunsen** para la limpieza de los electrodos metálicos de Platino.
- **Baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasonic.**

1.2 Electroodos y Células de trabajo.

Las medidas electroquímicas se han llevado a cabo utilizando los siguientes electrodos:

- **Electrodos de trabajo:**
 - Electrodo compuesto de PVC/TTF-TCNQ preparado siguiendo el procedimiento descrito en el *Capítulo III.1*.

-
- Electrodo metálico de Pt policristalino, modificado con polímeros de pirrol.
 - **Electrodo de referencia:** Ag/AgCl/KCl (3mol·L⁻¹) BAS MF-2052.
 - **Electrodo auxiliar o contraelectrodo:** electrodo con punta de Pt.

A lo largo de la presente memoria han sido empleadas 2 tipos de células de trabajo:

- **Medidas en discontinuo:** Una célula de vidrio Pobel de 10 mL con tapa de Teflón.
- **Medias en continuo (FIA):** Una célula de flujo de Metrohm 6.5303.020 que integra a los 3 electrodos (trabajo, referencia y auxiliar).

1.3 Sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

El sistema de flujo consistía en una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson), una válvula de seis vías (Omnifit), tubos de PTFE 0.5 mm de diámetro interno (Omnifit) y la celda de flujo.

Las variables a optimizar de este sistema eran tres principalmente: la velocidad de flujo (r.p.m. o mL min⁻¹), la longitud del bucle de muestra (en la válvula de 6 vías), y el potencial aplicado para la Amperometría.

2. REACTIVOS

Los reactivos usados en las experiencias de la presente memoria han sido adquiridos en las diferentes firmas comerciales que se detallan en los capítulos correspondientes.

Cuando se trata de productos sintetizados se detalla la síntesis, o bien se da la referencia bibliográfica donde se describe la síntesis.

En todas las disoluciones acuosas preparadas en esta tesis se utilizó como disolvente agua ultrapura.

La elevada reactividad del monómero de pirrol y su facilidad para oxidarse, dando lugar a oligómeros, obliga a llevar a cabo un proceso previo de purificación. Este proceso consiste en una destilación a vacío del reactivo obtenido comercialmente. Una vez purificado, el monómero se mantiene en el congelador y en atmósfera de nitrógeno.

Las disoluciones stock de D(+)-glucosa se preparan en tampón fosfato (0.05M y pH 7.4), y se dejan reposar toda la noche para permitir a los anómeros alcanzar el equilibrio. Todas las disoluciones eran almacenadas en el frigorífico.

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1 Preparación del Electrodo compuesto.

Se lleva a cabo la síntesis orgánica siguiendo el procedimiento descrito en el *Capítulo III.1*. El sólido seco se muele en el mortero hasta obtener el polvo del compuesto. A continuación, se pesan 50 mg de este polvo y se prensan para obtener una pastilla cilíndrica, la cual se introduce en el interior de una carcasa de teflón en contacto directo con una tuerca de cobre.

Antes de las medidas electroquímicas es necesario un proceso de limpieza de la superficie del electrodo, que consiste en (a) lijado con papel abrasivo P-1200 para obtener una superficie lisa; (b) pulido con papel satinado hasta obtener una superficie homogénea; y (c) enjuague con agua.

3.2 Preparación del Electrodo Modificado.

Los electrodos metálicos de Pt se someten a tratamiento de limpieza antes de cada uso. Dicho tratamiento se lleva a cabo mediante su exposición a la llama de un mechero.

Una vez se ha conseguido una óptima limpieza, la formación de la película de polipirrol se lleva a cabo mediante una “Cronoamperometría a carga controlada” en una disolución de electrolito que contiene la especie dopante y al monómero de pirrol. Esta película se lava y se seca, antes de su uso como electrodo de trabajo.

Después de cada uso el electrodo se almacena en el frigorífico.

4. CONDICIONES DE TRABAJO

Todos los registros se llevaron a cabo después de eliminar el oxígeno de la disolución electrolito, y para ello se hizo pasar corriente de nitrógeno a través de la misma durante 15 minutos. Todas las medidas fueron realizadas siempre en atmósfera de este gas.

La temperatura de trabajo fue de $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

Todos los potenciales están referidos al electrodo de referencia empleado.

5. TRATAMIENTO DE DATOS

Los datos se han adquirido de forma digital, y el tratamiento de los mismos se ha efectuado con ayuda de los programas SigmaPlot [1], Microcal Origin [2] y MathCad [3], que a su vez se han utilizado en la realización de las figuras que se presentan en esta memoria.

El cálculo de las cargas de los polímeros sintetizados que aparecen en esta memoria se efectuó mediante la integración de la curva obtenida en la Cronoamperometria utilizando el programa MathCad. También se ha utilizado el MathCad para el cálculo de la constante de Michaelis-Menten de la reacción enzimática.

Bibliografía

- [1] SigmaPlot 5.0; Jandel Scientific: 65 Koch Road, Corte Madera, CA 94925, USA. 1994.
- [2] Microcal Origin 6.1; Microcal Software: One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060, USA. 1995.
- [3] Mathcad 2000; MathSoft; 101 Main Street, Cambridge, MA 02142, USA. 1995.

CAPÍTULO III

SENSORES DE DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

- 1. Preparation and Characterization of a PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode.**
- 2. A PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode for use as Detector in Flow Injection Analysis.**
- 3. Simultaneous determination of ascorbic and uric acid by using a PVC/TTF-TCNQ composite electrode as detector in FIA system.**
- 4. A new, third generation, PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination.**

1. Preparation and Characterization of a PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode

It was prepared a new polyvinyl chloride (PVC)/tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane (TTF-TCNQ) composite electrode which showed good physical and electrochemical characteristics. Different PVC/TTF-TCNQ:Graphite proportions were tested and the relation 1/10 (p/p) PVC/TTF-TCNQ provided the best results in terms of sensitivity, coefficients of variation and mechanical resistance. This electrode has interesting applications as a working electrode. So, employment is remarkable in a flow injection system and had been satisfactory checked to detect ascorbic acid. Also, the electrode exhibits selective voltammetric behavior in aqueous solution that affords its use as an ion detector. The proposed electrode showed good kinetics property with a low background current and a relatively reproducible signal. Moreover, the electrode can be prepared in a simple way and its surface easily recovered.

Keywords: TTF-TCNQ; composite electrode; PVC; ascorbic acid; flow injection.

Paper published in *Portugalia Electrochimica Acta* 25 (2006) 67-78.

1.1. Introducción

Las sales orgánicas conductoras (SOC) tales como tetratiofulvaleno tetracianoquinodimetano (TTF-TCNQ) poseen interesantes propiedades electroquímicas, puestas de manifiesto en su empleo como materiales electródicos por transferencia electrónica directa con compuestos electroactivos, o bien actuando como mediadores en la construcción de nuevos electrodos. Tales electrodos pueden construirse a partir de varios sustratos incluyendo (a) una SOC en forma de pastillas compactas [1, 2] o monocristales macroscópicos [3]; (b) mezclas de una SOC con pasta de carbón [4, 5]; y (c) pasta polimérica mezclada con TTF-TCNQ y PVC en THF [6–9]. Sin embargo, los electrodos resultantes carecen tanto de estabilidad mecánica como de la reproducibilidad requerida para ser usados como detectores en sistemas de flujo, técnica que ha ganado una creciente importancia debido al necesario aumento de la automatización de los procesos analíticos y su control [10].

Aunque algunos electrodos compósitos de TTF-TCNQ desarrollados recientemente pueden usarse con éxito en sistemas de inyección en flujo, por ejemplo, los obtenidos mediante introducción de una sal orgánica conductora a través de una película no conductora de polipirrol para formar una estructura tridimensional [11], o mezclando TTF-TCNQ con resina epoxy, polvo de grafito y glucosa oxidasa [12], sin embargo, estos electrodos son técnicamente difíciles de preparar, y útiles sólo para aplicaciones determinadas.

El principal objetivo de este trabajo ha sido la preparación de un nuevo electrodo compósito, susceptible de ser empleado como electrodo de trabajo para la detección amperométrica en análisis de inyección en flujo, tomando como base las buenas propiedades de estabilidad de los conocidos electrodos de PVC/grafito [13, 14], y de la alta conductividad eléctrica de las sales orgánicas conductoras. Este artículo presenta el procedimiento de preparación y el estudio electroanalítico del electrodo compósito, donde la sal TTF-TCNQ ha sido incorporada en el interior de un compósito de PVC/grafito. La sustitución como fase conductora del grafito por la SOC aumenta la flexibilidad, selectividad y sensibilidad del electrodo compósito. Su aplicabilidad, como electrodo de trabajo, ha sido probada en la detección del ácido ascórbico mediante un sistema de flujo, obteniéndose mejoras en la respuesta voltamétrica y amperométrica

frente a un electrodo convencional de PVC/grafito. Este tipo de electrodo compuesto también ha sido ya aplicado satisfactoriamente como sensor voltamétrico de iones [15].

1.2. Parte Experimental

1.2.1 Reactivos y disoluciones

El electrodo compuesto PVC/TTF-TCNQ se construyó a partir de polvo de grafito de 1–2 micras (Aldrich), polivinil cloruro (PVC) de bajo peso molecular (Fluka de calidad puro), *N,N*-dimetilformamida (DMF, Merck) y la sal tetratiofulvaleno 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TTF-TCNQ, Fluka de grado puro). Con ferrocianuro potásico (Sigma) se prepararon disoluciones acuosas que contenían 1 M KBr (Merck), y L(+) ácido Ascórbico (Merck) y otras en 0.1 M KBr.

Todos los demás reactivos eran de calidad analítica, y las disoluciones se realizaron con agua ultrapura de un sistema Milli-Q (Millipore).

1.2.2 Aparatos y electrodos

Las intensidades de corriente fueron medidas con un potencióstato EG&G PAR Modelo 273, con corrección automática de la compensación iR_u . Los electrodos de referencia y auxiliar usados en los ensayos en célula eran Ag/AgCl 3 M KCl (Metrohm 6.0733.100) y platino (Metrohm 6.0302.100), respectivamente. El montaje instrumental era controlado informáticamente mediante el Software de investigación electroquímica M270.

El sistema de flujo consistía en una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson), una válvula de seis vías (Omnifit), tubos de PTFE 0.5 mm de diámetro interno (Omnifit) y una celda de flujo Metrohm modelo 6.5303.020, que integraba los tres electrodos auxiliar, referencia y de trabajo. Una prensa Hidráulica (Perkin–Elmer) se usaba para preparar pequeñas pastillas de 2.5 mm de espesor y 4.1 mm de diámetro.

Todos los experimentos fueron desarrollados en condiciones ambientales (*ca.* 25 °C).

1.2.3 Preparación del electrodo compósito

Inicialmente, el electrodo compósito fue preparado a partir de pastillas obtenidas mediante mezcla directa de PVC/grafito y la sal TTF-TCNQ. Sin embargo, este procedimiento resultaba ineficaz, puesto que los electrodos obtenidos carecían de homogeneidad y resistencia mecánica, lo que provocaba una alta variabilidad en la respuesta voltamperométrica. Por este motivo, las pastillas de PVC/TTF-TCNQ-grafito se prepararon siguiendo un procedimiento alternativo, similar al descrito previamente por Luque et al. [16]. En primer lugar, el polvo de polivinil cloruro era disuelto perfectamente en 7.5 ml de *N,N*-dimetilformamida, y posteriormente, se añadían 250 mg de una proporción determinada de TTF-TCNQ/grafito para obtener una mezcla homogénea. La suspensión resultante se separaba y se secaba perfectamente a temperaturas inferiores a 60 °C. El sólido así obtenido se molía en un mortero hasta formar un polvo compósito, y una cantidad de 50 mg de este polvo se prensaba para obtener una pastilla cilíndrica. La pastilla resultante se introducía en el interior de un tubo de Teflón, en el que se introducía un tornillo de cobre para asegurar el contacto eléctrico. La fracción de área efectiva se determinó voltamperométricamente con ferrocianuro potásico en KBr 1M, resultando ser prácticamente 1 en todos los casos.

Todas las medidas electroanalíticas eran precedidas de un proceso de limpieza de la superficie del electrodo, que consistía en (a) lijado con papel abrasivo P-1200 para obtener una superficie lisa; (b) pulido con papel satinado hasta obtener una superficie homogénea; y (c) enjuague con agua.

1.3. Resultados y discusión

El comportamiento electroanalítico del electrodo compósito se caracterizó usando ferrocianuro potásico como compuesto modelo, y la voltametría cíclica como técnica de medida. En primer lugar, se determinó la composición óptima del electrodo usando cantidades crecientes de SOC. Posteriormente, se modificó la proporción de PVC con objeto de asegurar el buen comportamiento analítico y mecánico.

1.3.1 Comportamiento Electroquímico del electrodo de PVC/grafito/TTF-TCNQ

1.3.1.1. Influencia de la composición del electrodo en la respuesta analítica.

La Figura 1(d) muestra el voltagrama típico obtenido con el electrodo de PVC/grafito para una concentración $5 \cdot 10^{-2}$ M de ferrocianuro potásico en KBr 1 M como electrolito soporte, usando una velocidad de barrido de 0.01 V s^{-1} . El grafito fue gradualmente reemplazado en el electrodo compuesto por una cantidad equivalente de la sal TTF-TCNQ. En este sentido, se prepararon varios electrodos compósitos con una relación variable de grafito/TTF-TCNQ, manteniendo una proporción constante de PVC, con el objetivo de examinar el efecto de la SOC en el comportamiento electroquímico y mecánico del electrodo.

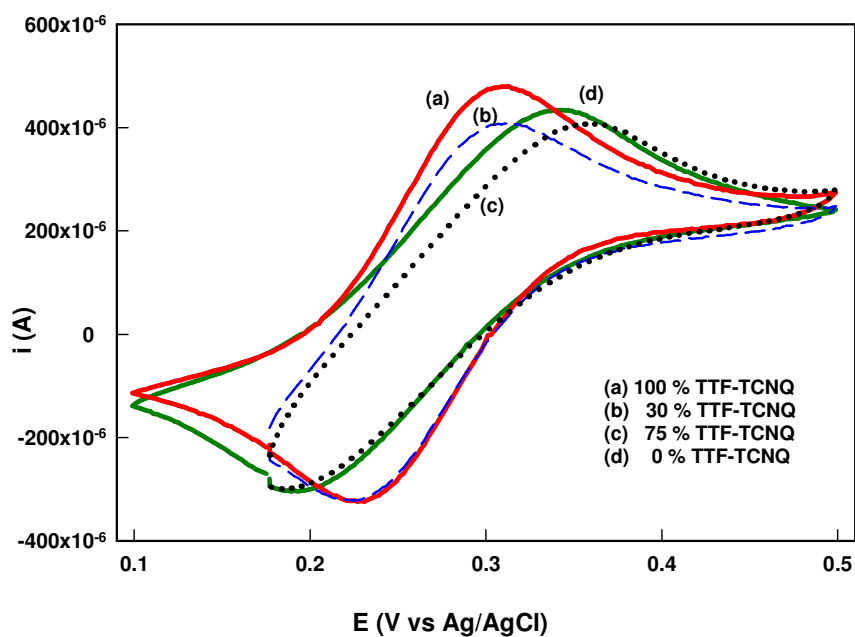


Figura. 1. Voltagramas cíclicos para $5 \cdot 10^{-2}$ M de ferrocianuro potásico en 1 M KBr, obtenidos a $v = 0.01 \text{ V s}^{-1}$ sobre electrodos compósitos de diferentes proporciones TTF-TCNQ/Grafito (% peso).

La tabla 1 resume los resultados obtenidos de las curvas de calibración para los distintos electrodos compósitos con una proporción variable de mezcla grafito/TTF-TCNQ y una relación 20/100 (p/p) PVC/mezcla. El rango estudiado de concentraciones

de ferrocianuro potásico fue de $2.5 \cdot 10^{-3}$ a $5 \cdot 10^{-2}$ M. Se comprobó que la proporción de TTF-TCNQ en la mezcla no tenía un efecto apreciable sobre la sensibilidad o la precisión. Así, todas las mezclas de grafito/TTF-TCNQ estudiadas proporcionaban electrodos compósitos con similares propiedades electroanalíticas a las del electrodo compósito convencional de PVC/grafito.

Por otro lado, aumentando la proporción de SOC en el electrodo compósito de PVC/(grafito/TTF-TCNQ) se observó que se reducía su estabilidad mecánica. Sin embargo, una mezcla consistente sólo de PVC y TTF-TCNQ [*viz.* grafito/TTF-TCNQ 0/100 (p/p)] exhibía una elevada estabilidad y dureza. Estos sorprendentes resultados pueden atribuirse a la interacción entre el grafito y las partículas de la sal TTF-TCNQ, que dificultan la compactación. Tal disminución de la compactación puede también ser el origen de los elevados coeficientes de variación obtenidos para algunos de los electrodos (ver tabla 1). Por consiguiente, estos resultados apuntan a que el electrodo compósito de PVC/TTF-TCNQ puede ser un interesante candidato para su empleo como electrodo de trabajo.

Tabla 1. Estadísticas analíticas de interés de las curvas de calibración obtenidas para electrodos compósitos con 20 (p/p) % PVC/(grafito + TTF-TCNQ), y proporción variable de grafito/TTF-TCNQ. Datos obtenidos para ferrocianuro potásico en 1 M KBr, usando una velocidad de barrido de 0.01 Vs^{-1} .

Grafito/TTF-TCNQ (p/p)	Pendiente ($\mu\text{A/M}$)	Ordenada (μA)	LOD ^a	Sy/x ^b	R ²	% CV ^c
100/0	8156.38±150	1.05±3.9	$2.1 \cdot 10^{-3}$	5.84	0.999	1.73
90/10	7338.84±200	-0.932±5.2	$3.2 \cdot 10^{-3}$	7.8	0.998	5.53
70/30	9144±148	-9.27±3.8	$1.9 \cdot 10^{-3}$	5.7	0.999	4.27
50/50	8145.34±75	3.21±2	$1.1 \cdot 10^{-3}$	2.91	0.999	1.75
35/75	7963.21±172	4.13±4.4	$2.5 \cdot 10^{-3}$	6.67	0.998	9.41
0/100	7895.91±288	4.95±7.4	$4.2 \cdot 10^{-3}$	11.18	0.996	3.78

^a Concentración, M

^b Desviación estándar de residuales

^c Coeficientes de variación para 5 medidas

Con objeto de mejorar las propiedades del electrodo PVC/TTF-TCNQ, se examinó la influencia de la proporción del PVC en la mezcla. Aunque aumentando la proporción de PVC se facilitaba la compactación de la mezcla, esto también incrementaba la resistencia eléctrica, en el sentido de distorsionar el potencial de la señal electroanalítica. Así, proporciones de PVC por encima de 20/100 (p/p) proporcionan pobres resultados. Por el contrario, disminuyendo sustancialmente la proporción de PVC se mejora el comportamiento analítico del electrodo compuesto, en términos de sensibilidad y de límites de detección (ver Tabla 2). No obstante, una reducción del contenido de PVC por debajo de 5/100 (p/p) conduce a elevados coeficientes de variación, debido a una inadecuada compactación del material. Por tanto, la proporción de PVC 10/100 (p/p) en el electrodo compuesto se presenta como solución de compromiso.

Tabla 2. Estadísticas analíticas de interés, obtenidas de las curvas de calibración para electrodos compósitos de PVC/TTF-TCNQ con proporción variable de PVC. Datos obtenidos para ferrocianuro potásico en 1 M KBr, usando una velocidad de barrido de 0.01 V s⁻¹.

PVC/TTF-TCNQ (g/100g)	Pendiente (μA/M)	Ordenada (μA)	LOD ^a	Sy/x ^b	R ²	% CV ^c
20	7895.91±288	4.95±7.4	4.2·10 ⁻³	11.18	0.996	3.78
10	8392.17±145	1.20±3.7	2.0·10 ⁻³	5.63	0.999	1.69
5	8156.95±120	-5.56±3	1.7·10 ⁻³	4.63	0.999	4.25

^a Concentración, M

^b Desviación estándar de residuales

^c Coeficiente de variación para 5 medidas

1.3.1.2. Influencia de la composición del electrodo en el comportamiento electroquímico.

Se examinó el efecto de la composición del electrodo compósito sobre su reactividad electroquímica. La Figura 2 muestra la variación en la separación de los potenciales de pico voltamétricos ($\Delta E_p = E_p^a - E_p^c$), y la corriente de pico de oxidación ($i_{p,ox}$) como una función de la relación grafito/TTF-TCNQ (p/p) en el electrodo compósito, para una disolución de ferrocianuro potásico de concentración de 1 mM de, bajo idénticas condiciones experimentales. Como puede verse, la mayor reactividad electroquímica (alta $i_{p,ox}$ y bajo valor de ΔE_p) se obtuvo en ausencia de TTF-TCNQ o grafito, es decir, para un electrodo de PVC/grafito (0 % TTF-TCNQ) o un electrodo PVC/TTF-TCNQ (100 % TTF-TCNQ). Por otro lado, los electrodos de grafito/TTF-TCNQ exhiben fluctuaciones que, como se indicó previamente, pueden deberse a interacciones entre partículas de grafito y de TTF-TCNQ.

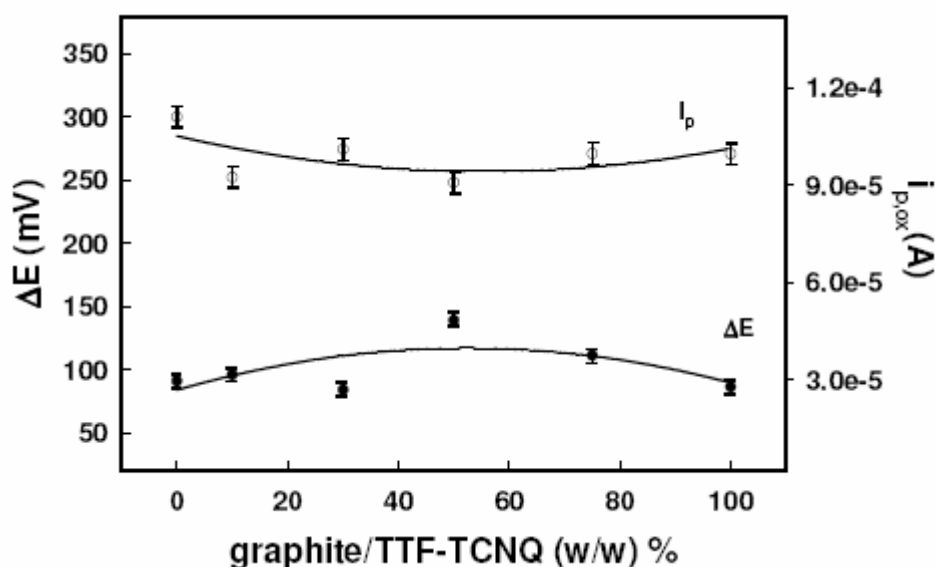


Figura 2. Efecto de la relación grafito/TTF-TCNQ (p/p) % sobre la intensidad de pico de oxidación, $i_{p,ox}$, y la separación de los potenciales de pico, ΔE_p . Datos obtenidos para 1 mM de ferrocianuro potásico en 1 M KBr a $v = 0.01 \text{Vs}^{-1}$.

El efecto de la proporción de PVC en el electrodo compósito de PVC/TTF-TCNQ puede verse en la Fig. 3. La mayor reactividad electroquímica se obtuvo para la relación

10/100 (p/p) PVC/TTF-TCNQ. Estos resultados son bastante consistentes con los obtenidos en las gráficas de calibración (ver Tablas 1 y 2).

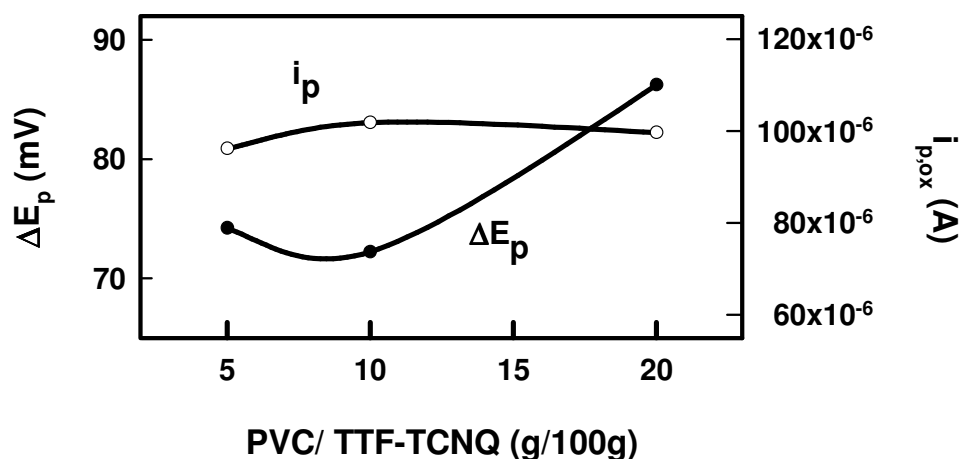


Figura 3. Efecto de la proporción de PVC/TTF-TCNQ (g/100g) sobre la intensidad de pico de oxidación, $i_{p,ox}$, y la separación de los potenciales de pico, ΔE_p . Datos obtenidos para 1 mM de ferrocianuro potásico en 1 M KBr. $\nu = 0.01 V s^{-1}$.

La Figura 1 compara los resultados obtenidos para $5 \cdot 10^{-2}$ M de ferrocianuro potásico en KBr 1 M sobre diversos electrodos compósito. Como puede verse, el electrodo de PVC/TTF-TCNQ (gráfica a) exhibe picos voltamétricos más agudos, y a menor potencial, que el electrodo convencional de PVC/grafito (gráfica d). Los electrodos formados por mezclas de grafito/TTF-TCNQ (gráficas b y c) muestran propiedades intermedias, y además, su intervalo de trabajo es algo menor que para los electrodos formados únicamente por grafito o TTF-TCNQ.

Teniendo en cuenta estos resultados, el electrodo compósito 10/100 (p/p) PVC/TTF-TCNQ se presenta como una interesante alternativa al electrodo convencional de PVC/grafito, mejorándolo en sensibilidad y precisión. Además, el electrodo propuesto exhibe buena estabilidad mecánica, y su superficie puede regenerarse fácilmente mediante un simple pulido.

La variabilidad entre electrodos se encontró que era inferior al 4% para electrodos de la misma tanda de preparación, y menos del 7% para electrodos de diferente lote. También, la variabilidad después de un diferente número de operaciones de renovación de superficies era inferior al 2%. Por tanto, el electrodo propuesto es altamente reproducible.

Los datos voltamétricos para ferrocianuro potásico se usaron para calcular la constante de velocidad heterogénea (k_s), usando el método de Nicholson [17]. Los valores de k_s así obtenidos fueron $5.1 \cdot 10^{-4}$ y $5.2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ para el electrodo de PVC/grafito y de PVC/TTF-TCNQ, respectivamente. Estos valores son similares a los encontrados para ferrocianuro sobre electrodos sólidos [18]. El incremento de la constante de velocidad heterogénea obtenido con el electrodo de PVC/TTF-TCNQ es consistente con el desplazamiento negativo observado en el pico de potencial anódico (ver Fig. 1), e indica una menor distancia entre los sitios activos en la superficie del electrodo o, en otras palabras, mayor compactación.

1.3.2 Aplicaciones. Detección Amperométrica de ácido ascórbico en FIA

La aplicabilidad, como electrodo de trabajo, del electrodo PVC/TTF-TCNQ propuesto se comprobó en la determinación de AA en un sistema FIA. Esta pequeña molécula está presente en muchos sistemas biológicos y en preparaciones multivitamínicas. Además, el AA es usado extensamente como antioxidante alimenticio con objeto de aumentar el tiempo de conservación de algunos productos. Varios electrodos modificados químicamente [19, 20 y referencias en ellas] y electrodos basados en TTF-TCNQ [7–9, 21] han sido propuestos para mejorar su detección electroquímica en célula. Sin embargo, pocos de estos electrodos permiten mejorar la detección de AA en sistemas de inyección en flujo.

En primer lugar, se efectuaron pruebas voltamperométricas preliminares sobre el ácido ascórbico para identificar el electrolito más apropiado, así como determinar el potencial óptimo a aplicar en términos de sensibilidad. En este sentido, los mejores resultados se obtuvieron empleando KBr 0.1 M como electrolito soporte. La Figura 4 compara los voltagramas para 5 mM AA obtenidos con un electrodo de PVC/grafito (a)

y con el electrodo propuesto de PVC/TTF-TCNQ (b). Este último exhibe una mayor intensidad, y un menor potencial de pico, debido, posiblemente, al efecto catalítico de la SOC sobre la oxidación del AA.

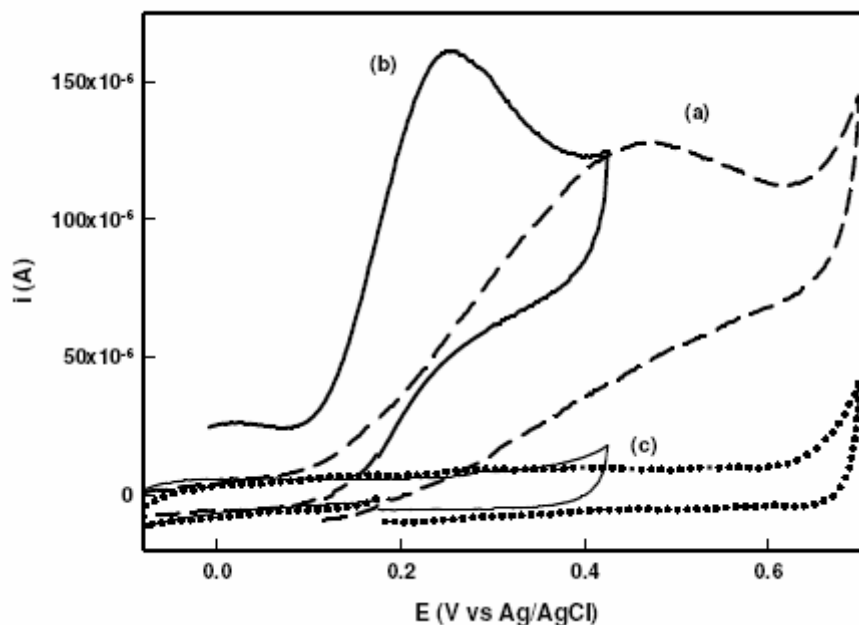


Figura 4. Voltagramas cíclicos para 10 mM AA en 0.1 M KBr obtenidos a $v = 0.01 \text{ Vs}^{-1}$ sobre un electrodo de PVC/grafito (a), y sobre un electrodo de PVC/TTF-TCNQ (b). (c) Voltagramas de los correspondientes fondos.

Teniendo en cuenta los registros anteriores, la mayor respuesta de corriente de pico del electrodo PVC/TTF-TCNQ frente al AA tiene lugar a unos 0.26 V, por lo que este valor de potencial fue seleccionado como el más idóneo en el sistema FIA.

La influencia de las variables hidrodinámicas, tales como la velocidad de flujo y el volumen de inyección, sobre la respuesta del electrodo de PVC/TTF-TCNQ al AA también fueron estudiadas. Los mejores resultados, en términos de sensibilidad y reproducibilidad, se obtuvieron a una velocidad de flujo de 1 ml min^{-1} y un volumen de inyección de $140 \mu\text{l}$.

La Figura 5 muestra las señales amperométricas obtenidas a concentraciones variables de AA en 0.1 M KBr.

La reproducibilidad del sistema fue analizada mediante varias inyecciones consecutivas de una solución 0.5 mM AA. Como resultado, se obtuvo una desviación estándar relativa de 0.46%, la cual indica buena reproducibilidad y, por lo tanto, buena resistencia mecánica del electrodo compuesto bajo las condiciones de flujo.

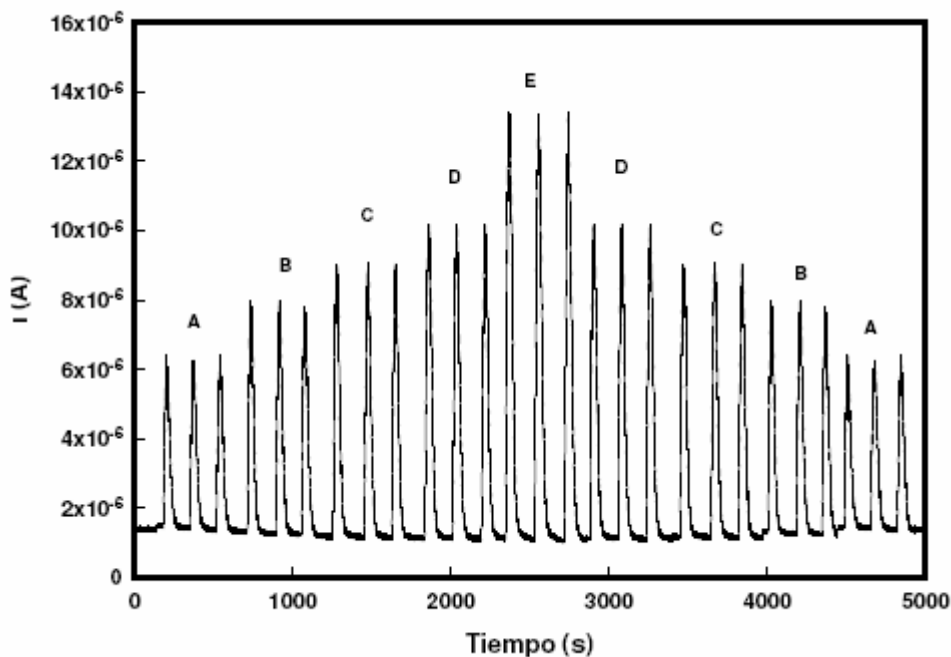


Figura 5. Detección amperométrica en FIA del AA a concentración variable sobre un electrodo de PVC/TTF-TCNQ. $A = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $B = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $C = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, $D = 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ $E = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ Portador 0.1 M KBr. Volumen inyectado 140 μl . Velocidad de flujo 1 ml min^{-1} . $E = 0.26 \text{ V}$.

En la Figura 6 se muestran las rectas de calibrado correspondientes a la determinación amperométrica del AA en 0.1 M KBr con el electrodo propuesto, y comparándolo con el electrodo de PVC/grafito. Cada estándar usado se midió 5 veces.

Para el electrodo propuesto se obtuvo un límite de detección (definido como la señal del blanco más tres veces su desviación estándar) de $1.51 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, mientras que para el electrodo de PVC/grafito (el potencial aplicado fue de 0.32 V) el límite de detección obtenido fue de $3.18 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Para ambos electrodos el rango lineal de determinación fue $5 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Por tanto, el electrodo propuesto exhibe una alta sensibilidad y una buena respuesta lineal. De hecho, su respuesta analítica supera a la del electrodo convencional PVC/grafito.

Finalmente, conviene destacar que la metodología propuesta para la preparación de este nuevo electrodo compósito es altamente flexible. En este sentido, pueden desarrollarse mezclas con otras SOC, que permitan construir electrodos eficientes, capaces de ser empleados para la detección electroquímica en sistemas FIA.

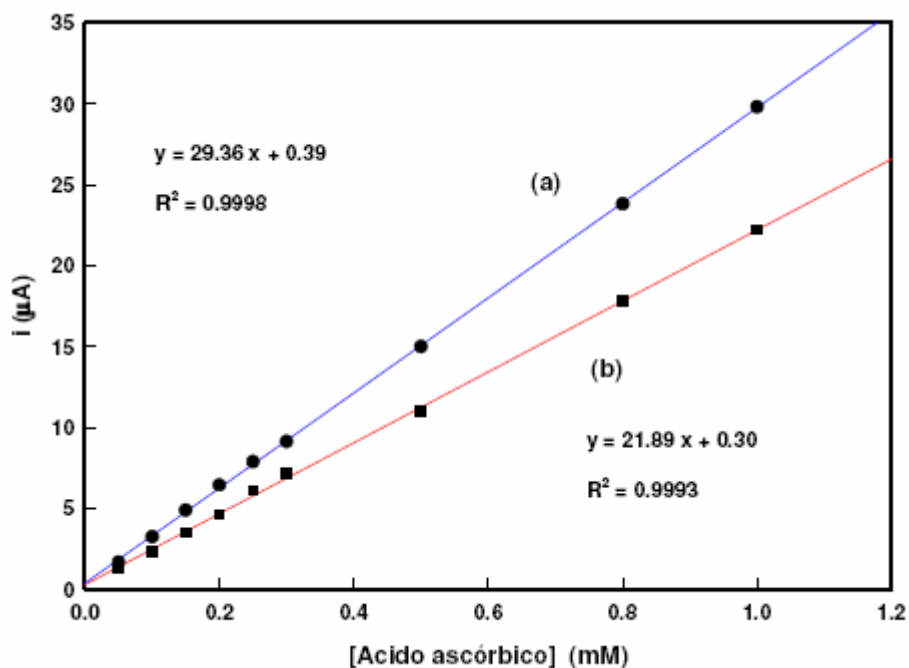


Figura 6. Representaciones de las corrientes amperométricas frente a la concentración de ácido ascórbico, obtenidas a partir de la figura 5.

1.4. Conclusiones

La incorporación de la sal TTF-TCNQ como fase conductora en electrodos compósitos, en forma de pastillas, ha resultado ser un método efectivo para la preparación de electrodos de trabajo alternativo, susceptibles de ser usados en sistemas de flujo continuo. El electrodo compósito de PVC/TTF-TCNQ propuesto en este trabajo exhibe muy buenas propiedades electroquímicas, una elevada sensibilidad y también una alta estabilidad mecánica. Además, es fácil y asequible de preparar, posee una elevada estabilidad, y proporciona resultados muy reproducibles, siendo su superficie fácilmente regenerable. Su aplicabilidad en un sistema FIA se ha probado, satisfactoriamente, en la detección amperométrica de AA, consiguiendo mejorar la respuesta del electrodo convencional de PVC/grafito.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia Español a través del proyecto CTQ2004-01677, cofinanciado con fondos FEDER. Agradecen también al profesor M. Valcárcel del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba por proporcionar el equipamiento FIA.

Referencias

- [1] C. D. Jaeger, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 1690.
- [2] C. D. Jaeger, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5435.
- [3] K. B. Scaboo, J. Q. Chambers, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3257.
- [4] M. Lamache, H. Menet, A. Moradpour, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4520.
- [5] P. Calvo-Marzal, KY. Chumbimuni-Torres; NF. Hoehr; G. de-Oliveira-Neto, LT. Kubota, *Sensors and Actuators B* 100 (2004) 333.
- [6] W.J. Albery, P. N. Bartlett, D.H. Craston, *J Electroanal. Chem.* 194 (1985) 223.
- [7] K. McKenna, S. Boyette, A. Brajter-Toth, *Anal. Chim. Acta* 206 (1988) 75.
- [8] M. S. Freund, A. Brajter-Toth, M. D. Ward, *J. Electroanal. Chem.* 289 (1990) 127.
- [9] E. Dabek-Zlotorzynska, K. Ahmad, A. Brajter-Toth, *Anal. Chim. Acta* 246 (1991) 315.
- [10] T. R. I. Cataldi, D. Centonze, *Anal. Chim. Acta* 326 (1996) 107.
- [11] F. Palmisano, P. G. Zambonin, D. Centonze, M Quinto, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5913.
- [12] X. Llopis, A. Merkoci, M. del Valle, S. Alegret, *Sensors and Actuators B* 107 (2005) 742.
- [13] M. Luque, E. Luque-Pérez, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 410 (2000) 127.
- [14] B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electroanal.* 14 (2002) 1427.
- [15] M. Cano, B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, *Electroanal.* 18 (2006) 1068.
- [16] F. Albertús, A. Llerena, J. Alpizar, V. Cerdá, M. Luque, A. Ríos, M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta* 355 (1997) 23.
- [17] R.S. Nicholson, *Anal. Chem.* 37 (1965) 1351.

-
- [18] J. Wang, Ü. A. Kirgöz, J. Mo, J. Lu, A. N. Kawde, A. Muck, *Electrochem. Comm.* 3 (2001) 203.
- [19] J. B. Raoof, R. Ojani, S. Rashid-Nadimi, *Electrochim. Acta.* 49 (2004) 271.
- [20] H. R. Zare, F. Memarzadeh, M. Mazloun Ardakani, M. Namazian, S. M. Golabi, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 3495.
- [21] U. Korell, R.B. Lennox, *Anal. Chem.* 64 (1992) 147.

2. A PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode for use as Detector in Flow Injection Analysis

A new polyvinyl chloride (PVC)/tetrathiafulvalene–tetracyanoquinodimethane (TTF-TCNQ) composite electrode was prepared and tested for electroanalytical performance. Variable PVC/TTF-TCNQ–graphite proportions were assayed in order to obtain the best possible detector for use in Flow Injection Analysis. A PVC/TTF-TCNQ w/w ratio of 1/10 was found to provide the best results in terms of sensitivity, coefficients of variation and mechanical resistance. The voltammetric and flow-injection amperometric detection responses of the electrode to ascorbic acid (AA) were measured and compared with those of a PVC–graphite electrode. The results revealed the proposed electrode to provide good electrode kinetics with a low background current and a relatively reproducible signal. In addition, the electrode can be readily prepared and its surface renewed.

Keywords: TTF-TCNQ; composite electrode; PVC; Ascorbic acid; Flow injection.

Paper published in *Electroanalysis* 18 (2006) 1727-1729.

Analyses in flowing solutions have gained growing importance in response to the increasing need for automation in analytical processes and their control. Amperometric flow detection systems are usually highly flexible and have allowed a wide variety of affordable electrodes to be developed for specific applications [1].

A large number of procedures for preparing solid electrodes for electroanalytical use have been reported in the recent years. Carbon-based materials have been extensively studied in this respect and well-known carbon paste electrodes consisting of reticulated vitreous carbon or composites of graphite with Teflon, PVC, Kel-F, zeolites and sol-gel matrices have been employed for analytical purposes. PVC/graphite composite electrodes possess favourable properties as electrode materials; thus, they are mechanically resistant, inexpensive and easily prepared and renewed. These advantages make them highly useful as electrochemical detectors in Flow Injection Analysis [2, 3].

Organic conducting salts (OCS) such as tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane (TTF-TCNQ) possess interesting electrochemical properties as revealed by their use as electrode materials for direct electron transfer with a number of electroactive compounds or as mediators in the construction of various electrodes [4-12]. Although some recently developed TTF-TCNQ composite electrodes can be successfully used in flow injection systems [13-14], these electrodes, however, are technically difficult to prepare and useful for dedicated applications only.

The primary aim of this work was to construct a new, sensitive detector for use in flow injection analysis based on the good properties of stable PVC/graphite electrodes and the high electrical conductivity of organic conducting salts. This paper reports the preparation procedure and an electroanalytical study of the composite electrode material, where TTF-TCNQ salt was incorporated into the bulk of PVC/graphite composite. Replacing the graphite with the OCS as conducting phase was found to increase the flexibility, selectivity and sensitivity of the composite electrode.

Figure 1(b) shows typical voltammograms provided by the PVC/graphite electrode $5 \cdot 10^{-2}$ M potassium ferrocyanide in 1M KBr as supporting electrolyte, using a scan rate of 0.01 V s^{-1} .

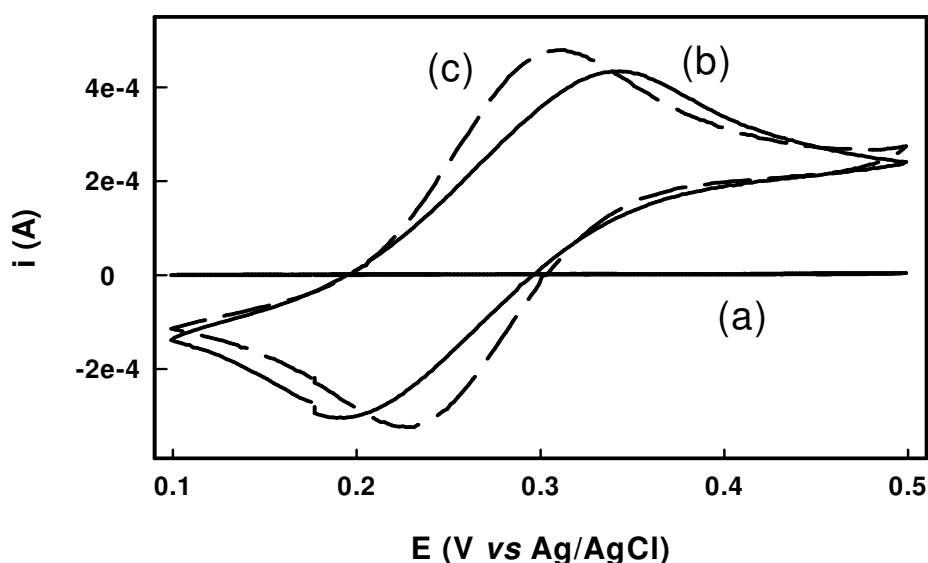


Figure 1. Cyclic voltammograms for $5 \cdot 10^{-2}$ M potassium ferrocyanide in 1 M KBr. $\nu = 0.01 \text{ V s}^{-1}$: (a) background, (b) PVC/Graphite 20/100 (w/w) composite electrode, (c) PVC/TTF-TCNQ 10/100 (w/w) composite electrode.

The results obtained from the calibration curves for potassium ferrocyanide suggest that the proportion of graphite/TTF-TCNQ in the mixture of the composite electrodes had no appreciable effect on sensitivity or precision; however, the electrode consisting of PVC and TTF-TCNQ only [viz. graphite/TTF-TCNQ 0/100 (w/w)] exhibited a higher stability and hardness, possibly as a result of an interaction between the graphite and TTF-TCNQ particles hindering compaction of the composite. The influence of the proportion of PVC in the mixture was also examined and a PVC/mixture ratio of 10/100 (w/w) found to provide the best results.

The effect of the electrode composition on its electrochemical reactivity was examined. The results were quite consistent with those obtained from the calibration curves: the highest electrochemical reactivity (high $i_{p,ox}$ and low ΔE_p values) was obtained for a PVC/TTF-TCNQ electrode (100% TTF-TCNQ) with 10/100 (w/w) PVC/TTF-TCNQ. Figure 1 compares the results obtained for $5 \cdot 10^{-2}$ M potassium ferrocyanide in 1M KBr. As can be seen, the PVC/TTF-TCNQ electrode (c) exhibited sharp voltammetric peaks and a small separation of peak potentials relative to the conventional PVC/graphite electrode (b).

The applicability of the proposed PVC/TTF-TCNQ electrode was checked by using it to detect AA in an FIA system. Preliminary voltammetric tests on AA (Fig. 2) were performed in order to identify the most appropriate electrolyte (0.1M KBr) and the optimum applied potential (0.26 V) in terms of sensitivity. The PVC/TTF-TCNQ electrode exhibited a higher intensity and a lower peak potential by virtue of the catalytic effect of TTF-TCNQ on the oxidation of AA.

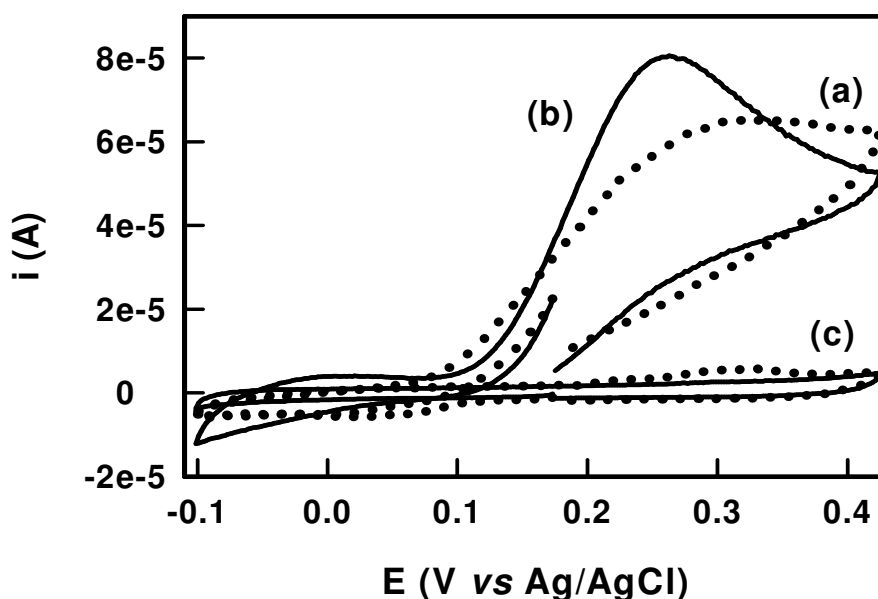


Figure 2. Cyclic voltammograms for 5 mM AA in 0.1 M KBr as obtained at $\nu = 0.01 \text{ Vs}^{-1}$ on a PVC/graphite electrode (a) and a PVC/TTF-TCNQ electrode (b). Background voltammograms (c).

The influence of hydrodynamic variables such as flow rate and injected volume on the response of the PVC/TTF-TCNQ electrode to AA was examined. The best results in terms of sensitivity and reproducibility were obtained at a flow rate of 1 mLmin^{-1} and an injected volume of $140 \mu\text{L}$.

Figure 3 shows the amperometric signals obtained at variable concentrations of AA in 0.1M KBr. The reproducibility was checked on several consecutive injections of a 0.5mM AA solution (see inset of Fig. 3). A relative standard deviation of 0.46% was obtained which indicates good reproducibility and hence good mechanical resistance of the PVC/TTF-TCNQ composite electrode under flowing conditions.

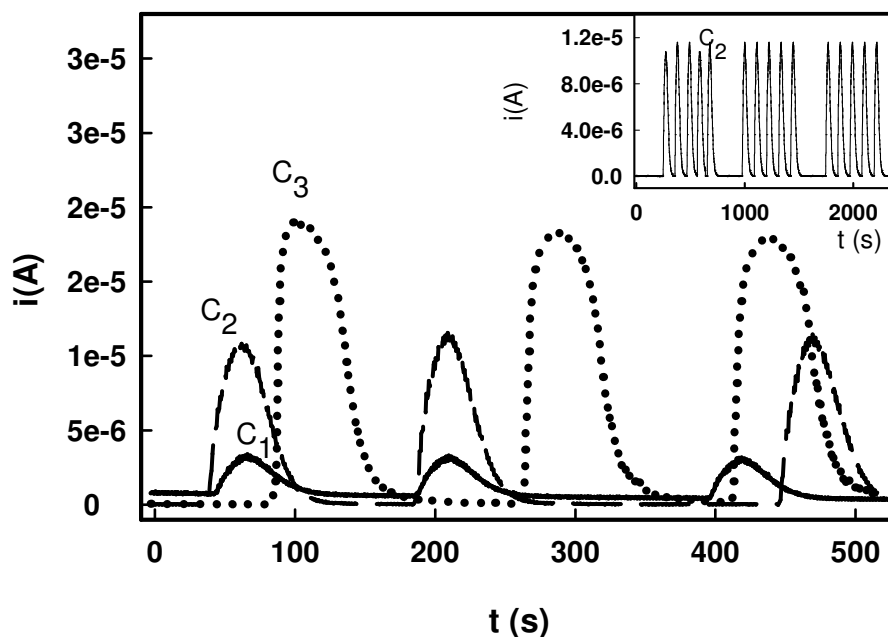


Figure 3. Flow-injection amperometric detection of AA at a variable concentration on a PVC/TTF-TCNQ electrode. $c_1 = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. $c_2 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. $c_3 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Carrier 0.1 M KBr. Injected volume 140 μl . Flow rate 1 ml min^{-1} . $E = 0.26 \text{ V}$.

Table 1 gives the figures of the merit of the amperometric determination of AA in 0.1M KBr with the proposed electrode and a PVC/graphite electrode for comparison. Each standard used was measured 5 times. As can be seen from the results, the proposed electrode exhibits a high sensitivity and response linearity. Moreover, the proposed electrode is easy and inexpensive to prepare, exhibits a high mechanical stability and provides reproducible results following renewal of its surface by use of a simple procedure (see Experimental). So, it was found to slightly outperform a conventional PVC/graphite electrode. Finally, the proposed methodology for preparing new composite electrode is highly flexible and can be used with conducting organic salts other than TTF-TCNQ in order to construct electrodes for efficient electrochemical detection in FIA systems.

Table 1. Figure of merit of the amperometric determination of AA in 0.1 M KBr.

	PVC/Graphite	PVC/TTF-TCNQ
Intercept, a (μA)	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Slope, b ($\mu\text{A/M}$)	21900 ± 600	29400 ± 400
Regression coefficient (r)	0.9958	0.9991
Standard deviation of residuals ($S_{y/x}$)	0.23	0.15
Detection limit [a] (M)	$3.18 \cdot 10^{-5}$	$1.51 \cdot 10^{-5}$
Determination range (M)	$[5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}]$	$[5 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}]$
Coefficient of variation	1.13	0.46
Measurement potential (V)	0.32	0.26

[a] Defined as the blank signal plus three times its standard deviation

Experimental

The PVC/TTF-TCNQ composite electrode was made from graphite powder of 1–2 micron (Aldrich), polyvinyl chloride (PVC) of low molecular weight (Fluka purum grade), *N,N*-dimethylformamide (DMF, Merck) and tetrathiafulvalene 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane salt (TTF-TCNQ, Fluka purum grade). Potassium ferrocyanide (Sigma) was used to prepare an aqueous solution containing 1 M KBr (Merck), and L(+) Ascorbic acid (Merck) another one in 0.1 M KBr. All other reagents were analytical-grade and solutions made in high-purity water from a Milli-Q system (Millipore).

Current intensities were measured with an EG&G PAR Model 273 potentiostat with automatic correction for the iR_u compensation. The reference and counter electrode used in batch tests were Ag/AgCl 3 M KCl (Metrohm 6.0733.100) and platinum (Metrohm 6.0302.100), respectively. The instrumental set-up was computer-controlled via M270 Research Electrochemistry Software.

The flow system consisted of a Minipuls 3 peristaltic pump (Gilson), a six-way injection valve (Omnifit), PTFE tubes of 0.5 mm inner diameter (Omnifit) and an amperometric detector integrating both the working and counter electrodes. The flow cell was a Metrohm model 6.5303.020 wall-jet cell of 60 μ L. A Hidraulische Presse (Perkin–Elmer) was used to prepare small pellets 50 mg in weight and 4.1 mm in diameter.

All experiments were performed under ambient conditions (*ca.* 25 °C). PVC/TTF-TCNQ–graphite pellets were prepared following an alternative procedure similar to that previously reported by Luque et al. [15]. First, PVC powder was thoroughly dissolved in 7.5 ml of *N,N*-dimethylformamide and 250 mg of a TTF-TCNQ–graphite composite in an appropriate ratio was added to obtain a homogeneous mixture. Subsequently, the mixture was thoroughly dried at a temperature below 60 °C. The solid thus obtained was then ground to obtain a composite powder and an amount of 50 mg of the powder was pressed to obtain a cylindrical pellet 2.5 mm thick and 4.1 mm in diameter. The cylinder was press-fitted into a Teflon tube with a copper wire to ensure electrical contact. The effective area fraction as determined voltammetrically with potassium ferrocyanide was *ca.* 1 in all instances.

Electroanalytical measurements were preceded by cleaning of the electrode surface. The clean-up procedure involved (a) polishing with P-1200 emery paper to obtain a flat surface; (b) further polishing with glossy paper until a homogeneous surface was obtained; and (c) rinsing with water.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge funding by Spain's Ministerio de Educación y Ciencia within the framework of Project CTQ2004-01677, and cofunding by FEDER. They also thank Professor M. Valcárcel of the Analytical Chemistry Department of the University of Córdoba for access to the FIA equipment.

References

- [1] T. R. I. Cataldi, D. Centonze, *Anal. Chim. Acta*, 326 (1996) 107.
- [2] M. Luque, E. Luque-Pérez, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 410 (2000) 127.
- [3] B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electroanal.*, 14 (2002) 1427.
- [4] C. D. Jaeger, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 1690.
- [5] C. D. Jaeger, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5435.
- [6] K. B. Scaboo, J. Q. Chambers, *Electrochim. Acta*, 43 (1998) 3257.
- [7] M. Lamache, H. Menet, A. Moradpour, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 4520.
- [8] P. Calvo-Marzal, KY. Chumbimuni-Torres; NF. Hoehr; G. de-Oliveira-Neto, LT. Kubota, *Sensors and Actuators B*, 100 (2004) 333.
- [9] W.J. Albery, P. N. Bartlett, D.H. Craston, *J Electroanal. Chem.*, 194 (1985) 223.
- [10] K. McKenna, S. Boyette, A. Brajter-Toth, *Anal. Chim. Acta*, 206 (1988) 75.
- [11] M. S. Freund, A. Brajter-Toth, M. D. Ward, *J. Electroanal. Chem.*, 289 (1990) 127.
- [12] E. Dabek-Zlotorzynska, K. Ahmad, A. Brajter-Toth, *Anal. Chim. Acta*, 246 (1991) 315.
- [13] F. Palmisano, P. G. Zambonin, D. Centonze, M Quinto, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5913.
- [14] X. Llopis, A. Merkoci, M. del Valle, S. Alegret, *Sensors and Actuators B*, 107 (2005) 742.
- [15] F. Albertús, A. Llerena, J. Alpizar, V. Cerdá, M. Luque, A. Ríos, M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta*, 355 (1997) 23.

3. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Uric Acid by Using a PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode as Detector in a FIA System

A PVC/TTF-TCNQ composite electrode has been employed as detector in flow injection system. The proposed method allows the simultaneous detection of ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) in mixtures by using a FIA system in a simple manner, without pre-treatment or modified electrode. This method is based on the amperometric determination of: (a) ascorbic acid at 0.15V and (b) both analytes at 0.35V. A linearly response in the range $1 \cdot 10^{-2}$ to $4 \cdot 10^{-4}$ M for both analytes with the detection limit ($s/n = 3$) of $1.2 \cdot 10^{-4}$ M and $8.1 \cdot 10^{-5}$ M for AA determination and UA, respectively, were obtained.

Keywords: TTF-TCNQ, Composite electrode, PVC, Ascorbic acid, Uric acid, Flow injection.

Paper published in *Electroanalysis* 19 (2007) 973-977.

3.1. Introduction

Solid composite electrodes have proved useful qualities as working electrodes in flow injection analysis and liquid chromatography. A conducting phase, generally graphite with different insulating materials, PVC, Teflon, etc, offers many potential advantages such as flexibility, high mechanical resistance, good stability in flowing system and a relatively simplicity in preparing and surface renewal.

Organic conducting salt (OCS) such as tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane (TTF-TCNQ) have interesting electrochemical properties as electrode materials for direct electron transfer with a number of electroactive compounds. For example, they have been used as mediators in the determination of reduced glutathione [1] and glucose [2]. Moreover, some recently developed TTF-TCNQ composite electrodes have been successfully used in flow injection systems [3-5]. Such is the case with electrodes made by introducing an organic conducting salt through a non-conducting polypyrrole film to form a tree-like structure [3] or by mixing TTF-TCNQ with epoxy resin, graphite powder and glucose oxidase to obtain a biosensor [4]. These electrodes, however, are technically difficult to prepare and useful for dedicated applications only. Moreover, the electrocatalytic effect of these OCS has been described with oxidation of ascorbic acid at TTF-TCNQ paste electrode [5]. The solid PVC/TTF-TCNQ composite electrode has favourable properties as electrode material; such as high flexibility, selectivity and sensitivity combined with a mechanically resistant, inexpensive and easily prepared and renewed.

Uric acid (UA) and ascorbic acid (AA) are commonly found in biological fluids of humans, mainly in serum, blood and urine. The detection of these compounds is important not only for diagnostic but also for pathological research. Their electrochemical detection becomes one of the feasible methods. However, electrochemical procedures based on the oxidation of UA presented the interference from AA that can also be oxidized at close potentials. Moreover, AA exists in body fluids in relatively high concentration.

Various methods aimed at the improvement of the selectivity, such as chemically modified electrode [6-8], electrochemical pre-treatment [9], enzyme-based techniques [10]. Although these alternatives present very selective and sensitive results, they have

several inconveniences, such as very complicated electrodes, and generally have little versatility and low stability for their application in flow systems.

In the literature, several studies of TTF-TCNQ as mediators in the construction of various electrodes have been applied to AA [11, 12] due to catalytic effect of TTF-TCNQ on the oxidation of AA [13]. Although, the electrochemical detection of AA and UA has been widely studied, their simultaneous detection by FIA system has not been reported yet. Angnes et al. [10] have recently reported the determination of AA and UA in urine by using amperometric detection in association with FIA, but the proposed method requires an enzymatic treatment for the determination of each analyte. On the other hand, the simultaneous determination of uric and ascorbic acids has been described by several electrochemical techniques, such as voltammetry using a commercial rotating glassy carbon electrode [14], differential pulse voltammetric with a modified electrode incorporating the thionine-nafion ion pair [15], cyclic voltammetry method with glassy carbon electrodes chemically modified [16], or by using norepinephrine on an activated glassy carbon electrode making a redox-active electrodeposited films [17]. However, in all these cases, the flow system was not applied.

In this paper, we propose a simple method that allows the simultaneous detection of AA and UA by using a PVC/TTF-TCNQ composite electrode as detector in flow system without previous treatment. The proposed method could be easily applied to biological samples.

3.2. Experimental

3.2.1 Reagents and solutions

The PVC/TTF-TCNQ composite electrode was made from graphite powder of 1–2 micron (Aldrich), polyvinyl chloride (PVC) of low molecular weight (Fluka purum grade), *N,N*-dimethylformamide (DMF, Merck) and tetrathiafulvalene 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane salt (TTF-TCNQ, Fluka purum grade). L(+) Ascorbic acid (Merck) and uric acid (Sigma-Aldrich 99%) were used to prepare aqueous solution containing phosphate (PBS) and acetate (AcBS) saline buffer, both supplied by Merck.

All other reagents were analytical-grade and solutions made in high-purity water from a Milli-Q system (Millipore).

3.2.2 Apparatus and electrodes

Current intensities were measured with an EG&G PAR Model 273 potentiostat with automatic correction for the iR_u compensation. The reference and counter electrode used in batch tests were Ag/AgCl 3 M KCl (Metrohm 6.0733.100) and platinum (Metrohm 6.0302.100), respectively. The instrumental set-up was computer-controlled via M270 Research Electrochemistry Software.

The flow system in Figure 1 consists of a 6.5303.020 Metrohm wall-jet cell, an amperometric detector, a Minipuls 3 peristaltic pump (Gilson), a six-way injection valve (Omnifit), and PTFE tubes of 0.5 mm inner diameter (Omnifit). The injection volume (sampling loop) was 60 μL .

A Hidraulische Presse (Perkin–Elmer) was used to prepare small pellets 50 mg in weight and 4.1 mm in diameter.

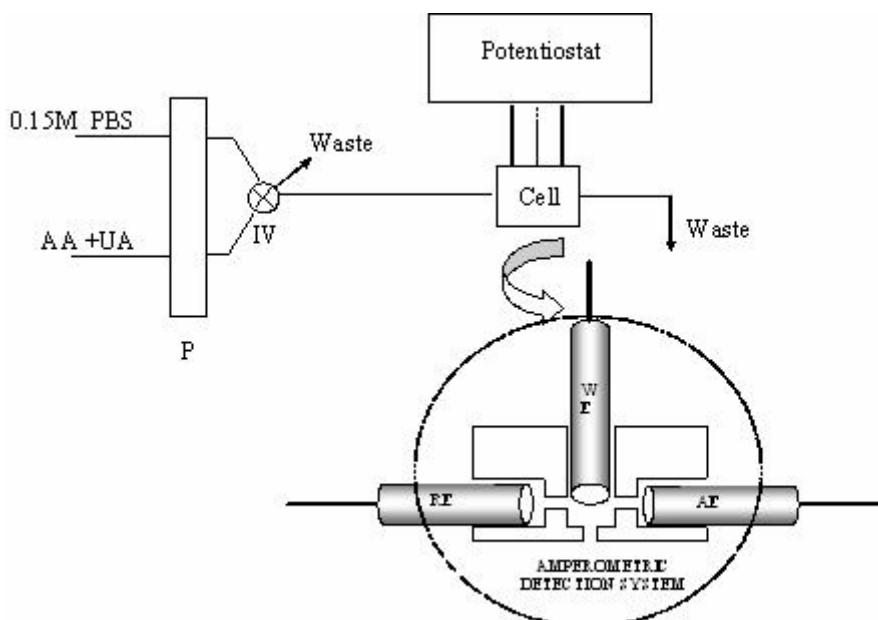


Figure 1. Manifold employed for AA and UA detection. P: peristaltic pump, IV: six-way injection valve, RE, AE, and WE: reference, auxiliary and working electrodes, respectively.

All experiments were performed under ambient temperature (*ca.* 25 °C).

The electrode was prepared by using the procedure previously described by Rodriguez-Amaro et al. [5, 18]. 250mg of a TTF-TCNQ composite mixed in an appropriate ratio was added to a solution of PVC previously dissolved in 7.5mL of DMF. The homogeneous mixture thus obtained is dried at a temperature below 60°C and subsequently ground. 50mg of this composite powder was pressed to obtain a cylindrical pellet 2.5mm thick and 4.1mm in diameter. The cylinder was press-fitted into a Teflon tube where a copper wire was then inserted to ensure electrical contact. The electroanalytical measurements were always preceded by a thorough cleaning of the electrode surface. The clean-up procedure involves (a) polishing with P-1200 emery paper to obtain a flat surface; (b) further polishing with glossy paper until a homogeneous was obtained; and (c) rinsing with water.

3.2.3. Procedure

For simultaneous amperometric detection of AA and UA in the FIA system, two injections are required: one at 0.15 V to detect AA in the mixture, and a second one at 0.35 V, where both AA and UA are oxidized, to detect UA in the mixture. For the determination of UA concentration we had to carry out a previous calibration of AA at 0.15 V and 0.35 V, as the amperometric response of AA depends on the applied potential. Then we subtract, from the signal obtained at 0.35 V, the one obtained at 0.15 V, this one properly modified by the calibration curves of AA. This simple procedure has been tested in comparison with the consecutive additions method, in which increasing amounts of one of the acids were added, starting from a definitive amount of the other. The experimental results obtained by both methods by less than 5%.

3.3. Results and discussion

3.3.1 Voltammetric Studies of AA and UA

Preliminary voltammetric studies of AA and UA were performed in order to identify the most appropriate electrolyte and pH to obtain the best effective separation of these compounds. We have studied and compared the behaviour of saline buffers PBS 0.15M and AcBS 0.15M, as they are the supporting electrolytes more widely employed in the bibliography for the electrochemical detection of AA and UA. Figure 2 shows cyclic voltammograms of uric acid in PBS and AcBS. Although the cyclic voltammograms are rather similar, the oxidation peak appears at a lower potential and with higher intensity in PBS 0.15M, thus being this supporting electrolyte the one selected as more suitable for the simultaneous detection of AA and UA in a mixture.

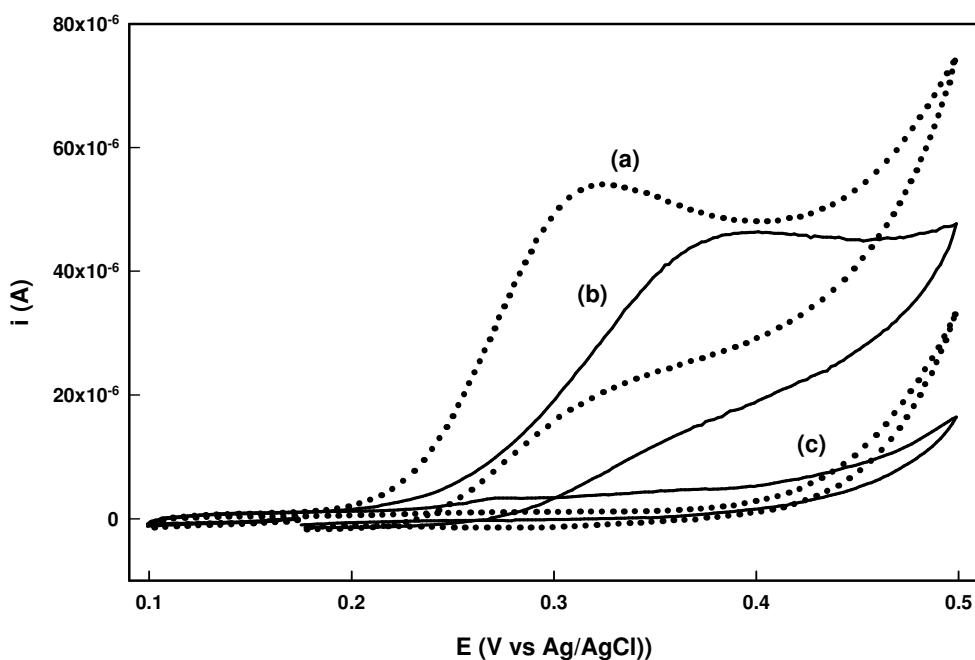


Figure 2. Cyclic voltammograms for 4 mM UA as obtained at $v = 0.01 \text{ Vs}^{-1}$ and pH 7: (a) in PBS 0.15 M, (b) in AcBS 0.15M and (c) Background voltammograms.

Effect of pH on the oxidation of UA and AA was studied in the pH range 4-9, in which our results show that higher values of pH give rise to lower intensities and more negative oxidation potentials, for both of the UA and AA. Between pH 7 and 8 we got

not only a good splitting between the peaks of AA and UA. Therefore, this pH range was selected. We may point out that this range is also the optimum one for applications to biological systems. In these conditions the cyclic voltammograms obtained by using PVC/TTF-TCNQ composite electrode show well-resolved anodic peak for AA (at about 0.15V) and for UA (at about 0.32 V), revealing the possibility of the simultaneous electrochemical detection.

Figure 3 shows cyclic voltammograms of UA and AA, individually and in the mixture. As can be seen, the fact of being mixed does not give rise to significant changes in the UA peak potentials, whereas the AA shows a shift of its E_p towards less positive values.

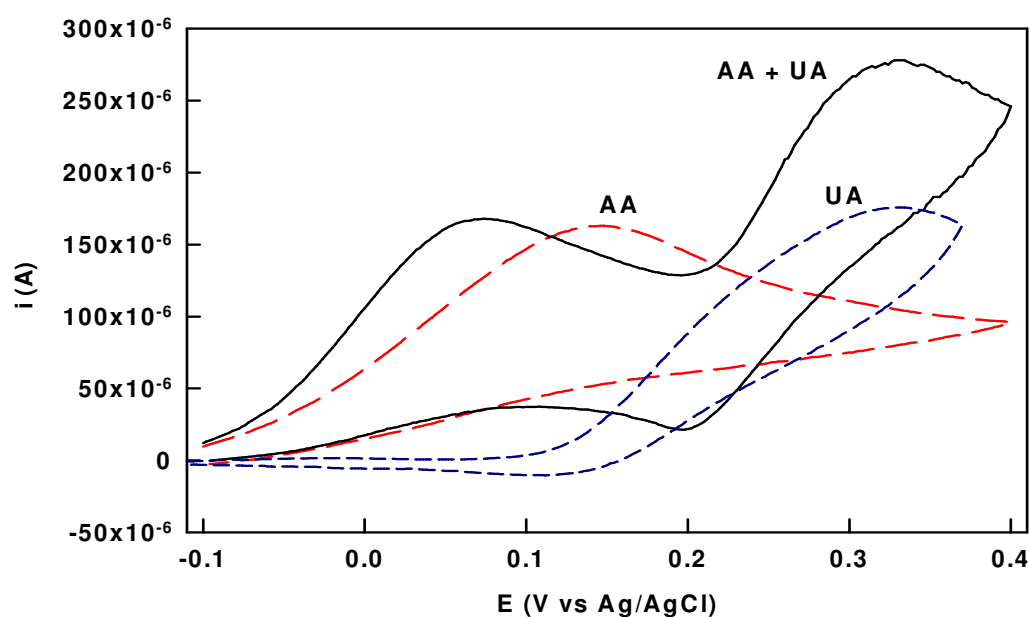


Figure 3. Cyclic voltammograms obtained in phosphate buffer 0.15M (pH 7) and $\nu = 0.01 \text{ Vs}^{-1}$ on a PVC/TTF-TCNQ electrode for (a) 10 mM ascorbic acid, (b) 10 mM uric, acid and (c) mixture of 10 mM AA and 10 mM UA.

In these conditions, the results of analytical curves show a detection limits ($S/N = 3$) of $7.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ and $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ to UA and AA, respectively, in the mixture with a regression coefficient of 0.9998.

The shift of the AA anodic peak towards less positive potentials is suggestive of electrocatalytic effects, which seems to have a rather complex behaviour, probably due to the surface nature of the process.

3.3.2 Amperometric Detection of the Mixture UA and AA in a FIA System.

The most suitable potentials by using the PVC/TTF-TCNQ electrode were found to be +0.15 V and +0.35 V, for the amperometric detection of AA and UA, respectively. Note that at +0.15V all the AA reaching the electrode will be oxidized, regardless of the aforementioned electrocatalytic effects.

The influence of hydrodynamic variables such as flow rate and injected volume on the response of the PVC/TTF-TCNQ electrode to AA and UA were examined. The best results in terms of sensitivity and reproducibility were obtained at a flow rate of 1 ml min⁻¹ and an injected volume (sampling loop) of 60 µl (Table 1).

Table 1. Figures of the merit of the amperometric determination of AA and UA in PBS 0.15 M (pH = 8) by using the FIA system.

	Ascorbic Acid		Uric Acid
Intercept (A)	$1.6 \cdot 10^{-6} \pm 4.3 \cdot 10^{-7}$	$2.1 \cdot 10^{-6} \pm 2.3 \cdot 10^{-7}$	$3.8 \cdot 10^{-7} \pm 1.5 \cdot 10^{-7}$
Slope (A/M)	$8.7 \cdot 10^{-3} \pm 1.8 \cdot 10^{-4}$	$16.2 \cdot 10^{-3} \pm 2.0 \cdot 10^{-4}$	$8.3 \cdot 10^{-3} \pm 1.3 \cdot 10^{-4}$
Regression coefficient (r)	0.9997	0.9996	0.9997
Standard deviation of residuals ($S_{y/x}$)	$2.1 \cdot 10^{-7}$	$2.5 \cdot 10^{-7}$	$1.8 \cdot 10^{-7}$
Detection limits [a] (M)	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$6.7 \cdot 10^{-5}$
Determination range (M)	$[4 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}]$	$[4 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}]$	$[4 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}]$
Coefficient of variation (%)	0.69	0.72	0.92
Measurement potential (V)	0.15	0.35	0.35

The results for quantification of UA in the mixture (Table 2) were obtained under various concentrations in the presence of a fixed concentration of AA $4 \cdot 10^{-3}$ M. The analytical graph was linear in the concentration range of $4 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-2}$ M with a correlation coefficient (r) of 0.9995 and the detection limit ($S/N = 3$) was $8.1 \cdot 10^{-5}$ M. In the same way, the results obtained to AA in the co-existence of $4 \cdot 10^{-3}$ M UA, under the optimized conditions, were a linearly response in the range of $4 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^{-2}$ M with a correlation coefficient (r) of 0.9997 and the detection limit ($S/N = 3$) was $1.2 \cdot 10^{-4}$ M. Note that these values are very similar to those obtained for solutions containing only one of the acids (Table 1).

Table 2. Figures of merit of the amperometric determination of mixtures of AA and UA in PBS 0.15 M (pH = 8) by using the FIA system.

	AA + UA (4×10^{-3} M)	UA + AA (4×10^{-3} M)
Intercept (A)	$5.0 \cdot 10^{-7} \pm 1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.1 \cdot 10^{-6} \pm 1.4 \cdot 10^{-7}$ *
Slope (A/M)	$8.1 \cdot 10^{-3} \pm 8.5 \cdot 10^{-5}$	$8.0 \cdot 10^{-3} \pm 1.1 \cdot 10^{-4}$
Regression coefficient (r)	0.9997	0.9995
Standard deviation of residuals ($S_{y/x}$)	$2.8 \cdot 10^{-7}$	$2.2 \cdot 10^{-7}$
Detection limits [a] (M)	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$8.1 \cdot 10^{-5}$
Determination range (M)	$[4 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}]$	$[4 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}]$
Coefficient of variation (%)	0.80	1.10
Measurement potential (V)	0.15	0.35

The relative standard deviations ($N=7$) for determination of AA and UA was 0.80 and 1.10% respectively, showing the excellent reproducibility. Figure 4 shows the good reproducibility of the signals obtained by several consecutive injection of UA, in the mixture, even in 50-fold concentration excess of ascorbic acid do not interfere in the UA detection.

Although the results obtained for the proposed system are less spectacular than those obtained by other methods reported in the literature, they are, however, acceptable enough for allowing the simultaneous determination of AA and UA in body fluid samples such as urine, where the concentration of UA is about 1.5-4.5 mM, and AA is about 0.5-4 mM, human serum or blood (about 0.3 mM for UA and 0.4 for AA). The PVC/TTF-TCNQ electrode also exhibits a good stability. In fact, it can be used for at least three months without noticing any significant response changes. For all these reasons, it can be considered a good alternative for automatic simultaneous determination of AA and UA.

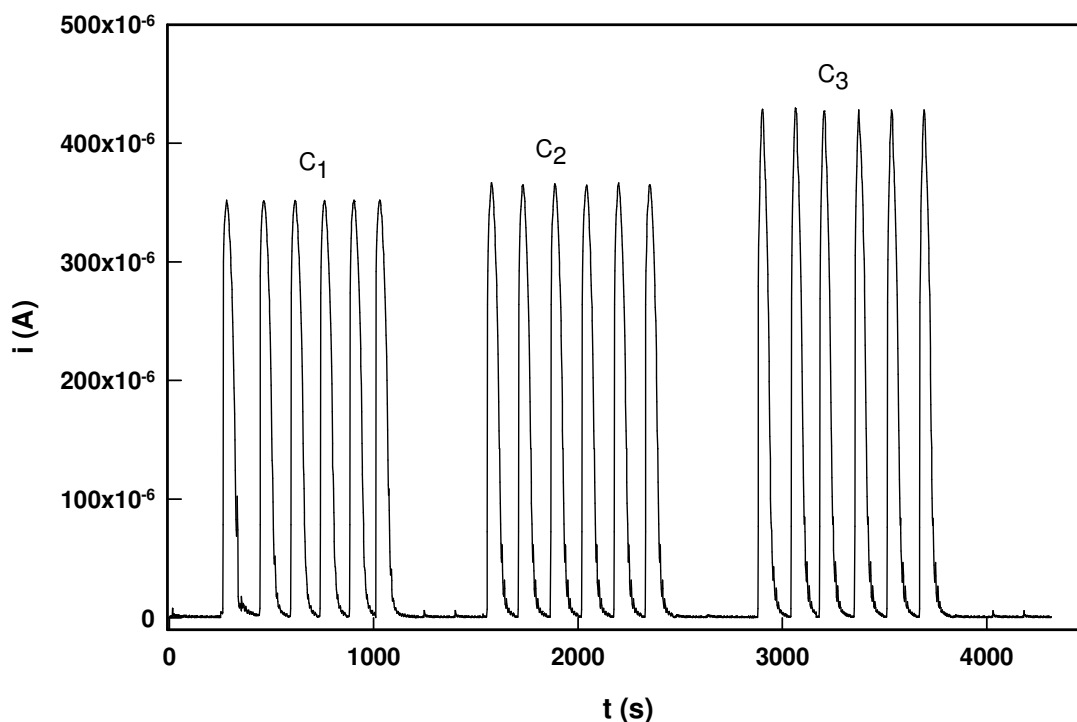


Figure 4. Flow-injection amperometric detection of UA at a variable concentration in the presence of 20 mM AA. $c_1 = 0.5$ mM. $c_2 = 2$ mM. $c_3 = 10$ mM. Carrier 0.15 M PBS (pH 8). Injected volume 140 μ l. Flow rate 1 ml min⁻¹. $E = 0.35$ V.

3.4. Conclusions

An efficient and very simple method for the simultaneous determination of AA and UA in a flow injection system has been satisfactorily achieved by using a solid PVC/TTF-TCNQ composite electrode as amperometric detector. This electrode presents very low cost, high reproducibility, robustness and long-term stability. It can be prepared easily and its surface can be renewed by simple mechanical polishing. The detection limits obtained for AA ($1.2 \cdot 10^{-4}$ M) and for UA ($8.1 \cdot 10^{-5}$ M) in the mixtures make it possible its application to biological samples.

3.5. Acknowledgment

The authors wish to acknowledge funding by Spain's Ministerio de Educación y Ciencia within the framework of Project CTQ2004-01677, and cofunding by FEDER. They also thank Professor M. Valcárcel of the Analytical Chemistry Department of the University of Córdoba for access to the FIA equipment.

3.6. References

- [1] P. Calvo-Marzal, K.Y. Chumbimuni-Torres, N. Fenalti Höehr, G. de Oliveira Neto, L.T. Kubota, *Sensors and Actuators B*. 133 (2004) 340.
- [2] Q.S. Li, B.C. Ye, B.X. Liu, J.J. Zhong, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 327.
- [3] F. Palmisano, P. G. Zambonin, D. Centonce, M Quinto, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5913.
- [4] X. Llopis, A. Merkoci, M. del Valle, S. Alegret, *Sensors and Actuators B*. 107 (2005) 742.
- [5] M. Cano, B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, *Electroanal.* 18 (2006) 1068.
- [6] Y. Zhao, Y. Gao, D. Zhan, H. Liu, Q. Zhao, Y. Kou, Y. Shao, M.Li, Q. Zhuang, Z. Zhu, *Talanta*. 66 (2005) 51.
- [7] J. Wang, M.S. Lin, *Electroanalysis*. 2 (1990) 861.
- [8] J.M. Zen, J.S. Tang, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1892.
- [9] R. Aguilar, M.M. Dávila, M.P. Elizalde, J. Mattusch, R. Wennrich, *Electrochim. Acta*. 49 (2004) 851.

-
- [10] R.C. Matos, M. A. Augelli, C. L. Lago, L. Angnes, *Anal. Chim. Acta.* 404 (2000) 151.
- [11] K. McKenna, S. Boyette, A. Brajter-Toth, *Anal. Chim. Acta.* 206 (1988) 75.
- [12] M. S. Freund, A. Brajter-Toth, M. D. Ward, *J. Electroanal. Chem.* 289 (1990) 127.
- [13] U.Korell, R.B. Lennox, *Anal. Chem.* 64 (1992) 147.
- [14] E.M. Stochkova, Y.I. Turýan, I. Kulseman, A. Shenhar, *Talanta* 44 (1997) 1923.
- [15] S. Shahrokhian, M. Ghalkhani, *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 2599.
- [16] X. Lin, Y. Li, *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 5794.
- [17] H.R Zare, F. Memarzadeh, M. Mazlom Ardakani, M. Namazian, S.M. Golabi, *Electrochim. Acta.* 50 (2005) 3495.
- [18] M. Cano, B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, *Electroanal.* 17 (2006) 1727.

4. A new, third generation, PVC/TTF-TCNQ composite electrode amperometric biosensor for glucose determination

A simple and effective amperometric biosensor based on PVC/TTF-TCNQ composite electrode is proposed for glucose determination. Glucose oxidase (GOx) was immobilized by crosslinking with glutaraldehyde. The TTF-TCNQ salt acts as conducting phase and as redox mediator, without needing the addition of any other substance. The biosensor can be applied in batch (response linear up to 5.0 mM, with a limit of detection, $s/n = 3$, of $8.5 \cdot 10^{-6}$ M) and in FIA system (linear range between 0.1 and 8.0 mM, with a limit of detection, $s/n = 3$, of $1.9 \cdot 10^{-5}$ M). It is also proposed a simple procedure that allows glucose and ascorbic acid to be simultaneously determined.

Keywords: TTF-TCNQ, Composite electrode, Biosensor, Glucose, Flow injection.

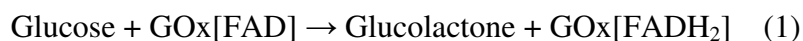
Paper published in *Journal of Electroanalytical Chemistry* 615 (2008) 69-74.

4.1. Introduction

The development of composite-based electrodes to design new amperometric biosensors for clinical, environmental, and food analysis has been the subject matter of a large number of research lines in the last decades. The advantage of these materials, apart from being relatively cheap, lies in their outstanding electrochemical, physical, mechanical properties [1, 2].

Recently, we have reported a new composite electrode, based on tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane (TTF-TCNQ), whose sensitivity as a detector in flow injection analysis is a result of the high electrical conductivity of the organic conducting salt (OCS) [3, 4]. Moreover, TTF-TCNQ has interesting electrochemical properties as electrode material for direct electron transfers in biosensors of the third generation (without needing mediators) as it has been shown by the results obtained in a large number of experiments carried out with different enzymes, particularly flavoproteins such as glucose oxidase, GOx [5-10].

In Eqs. (1) and (2) it is shown the schematic mechanism of glucose oxidation when using a glucose biosensor:



Several configurations have been described for the incorporation of TTF-TCNQ as part of these biosensors, i.e. grown at the surface of a shapable electroconductive film [5,6], through the nonconducting polypyrrole film [7], forming a paste electrode [9, 10], or integrated in an epoxy-graphite biocomposite [8].

With respect to the reported biosensors based on the formation of a paste electrode, they have the inconvenience of their short lifetime. The rest of the configurations described in the literature correspond to biosensors that need some other species in addition to the OCS in order to ensure a good conductivity.

The aim of this work is to further the development of a biosensor with a new system based on a composite electrode containing only the TTF-TCNQ salt as the conducting phase. The proposed biosensor provides some improvements on those reported

previously. It is easy to prepare and upkeep and can be used for glucose analysis in either batch or FIA systems. Moreover, it shows better analytical characteristics in the glucose determination, such as a better sensitivity, higher linear range and lower detection limit.

4.2. Experimental

4.2.1 Reagents

TTF-TCNQ salt (purum grade, Fluka), poly(vinyl chloride) (PVC, low mol. weight, purum grade Fluka) and *N,N'*-dimethylformamide (DMF, $\geq 99.7\%$ pure, Merck) were used to prepare the TTF-TCNQ/PVC composite electrode.

The solutions used for the enzyme and its immobilization were Glucose oxidase (GOx, EC 1.1.3.4 Type X-S from *Aspergillus niger*, 185,000 Units/g solid from Sigma) prepared in 0.05 M phosphate buffer (PBS) at pH 7.4 and a 25% glutaraldehyde solution (Aldrich).

Stock 0.5 M D(+) glucose (Sigma) solutions were prepared in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) and let to stand overnight to allow the anomers to reach equilibration of. More diluted standards were prepared by suitable dilutions with the same phosphate solution. All solutions were stored in the refrigerator. The rest of chemicals were obtained in analytical reagent-grade from Merck or Fluka and also used as received.

All solutions were made in twice-distilled water from a Millipore Milli-Q system.

4.2.2. Instrumentation and procedures

All electrochemical measurements were made by using an EG&G PAR 273 potentiostat with automatic iR_u compensation. Ag/AgCl 3M KCl and Pt wire were used as the reference and auxiliary electrode, respectively. All tests were performed at ambient temperature (*ca.* 25 °C) and under oxygen-free conditions (except for the experiments in which the influence of oxygen was studied).

The instrumental set-up was computer-controlled with the aid of M270 Research Electrochemistry software.

The flow system [4] consists of a Minipuls 3 peristaltic pump (Gilson), a six-way injection valve (Omnifit), PTFE tubes of 0.5 mm inner diameter (Omnifit) and an amperometric detector integrating both the working and counter electrodes. The flow cell was a Metrohm model 6.5303.020 wall-jet cell. The injection volume (sampling loop) was 60 μl .

The TTF-TCNQ/PVC composite electrode was prepared by using the procedure previously described by Rodriguez-Amaro et al. [3,11]. The PVC/TTF-TCNQ ratio leading to the highest electrical conductivity while maintaining mechanical stability was determined in previous experiments. The best results are obtained at a 1:10 (w/w) ratio of TTF-TCNQ to PVC in DMF. The polymer, polyvinyl chloride, was thoroughly dissolved in DMF and the TTF-TCNQ salt is added to obtain a homogeneous TTF-TCNQ/PVC mixture. Subsequently, the suspension was separated and dried in order to obtain the composite powder. Finally, the powder was pressed into cylindrical pellets 4 mm in diameter \times 2.5 mm thick with an active surface area of 12 mm². Composite pellets were inserted by press-fitting into a Teflon tube furnished with a copper wire to establish electrical contact.

The electrode surface was regenerated as required by polishing with P-1200 emery paper to obtain a flat surface, followed by polishing with glossy paper to obtain a uniform surface and rinsing with water.

GOx was immobilized onto the PVC/TTF-TCNQ electrode by cross-linking with glutaraldehyde as described previously [12]. Briefly, the procedure consisted of coating the PVC/TTF-TCNQ electrode with 15 μl of a 9 mg/mL GOx solution (*c.a.* 24 Units GOx). Once the electrode surface had dried out at ambient temperature, then the electrode was immersed in a glutaraldehyde solution for 40 min and rinsed with water.

When not in use, the electrode was kept in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) and stored in the refrigerator.

4.3. Results and Discussion

4.3.1. Response to glucose

First of all, in order to delimit the potential range in which there is no risk of decomposition of the organic salt, it was registered a cyclic voltammogram by using the PVC/TTF-TCNQ electrode in the PBS buffer. In these conditions, in positive scans, the TTF-TCNQ salt starts being oxidized at 0.4 V vs. Ag/AgCl, whereas in negative scans its reduction starts at -0.15 V. Therefore, the PVC/TTF-TCNQ electrode can be polarized at any potential between -0.1 and 0.4 V without any problems associated with the salt decomposition.

Figure 1 shows the voltammogram obtained at a scan rate of 0.01V s^{-1} in a PBS solution at pH 7.4 and 5.0 mM glucose (once subtracts the voltammogram obtained in the absence of glucose in the same conditions of scan rate and pH). As can be seen, the oxidation of glucose starts at a low overpotential (from -0.05 V) and although the intensity increases with the potential, it does not give rise to well-defined peak within the working range of the electrode.

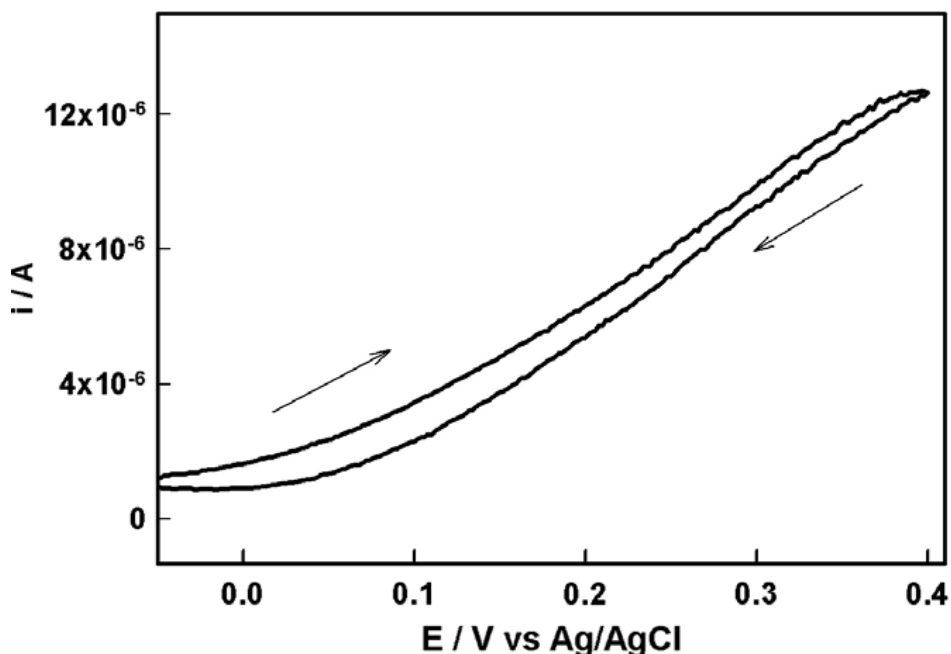


Figure 1. Cyclic voltammogram (once subtracted the signal obtained in the absence of glucose) for 5.0 mM glucose obtained at 0.01V s^{-1} in a PBS buffer (0.05 M, pH 7.4).

Based on the above results, chronoamperometric experiments for glucose determination were carried out in the range 0.1-0.2 V. Figure 2 shows chronoamperograms recorded after successive additions of 1.0 mM glucose under stirring conditions, with the biosensor containing 24 Units GOx. In all cases, a typical Michaelis-Menten behaviour was observed.

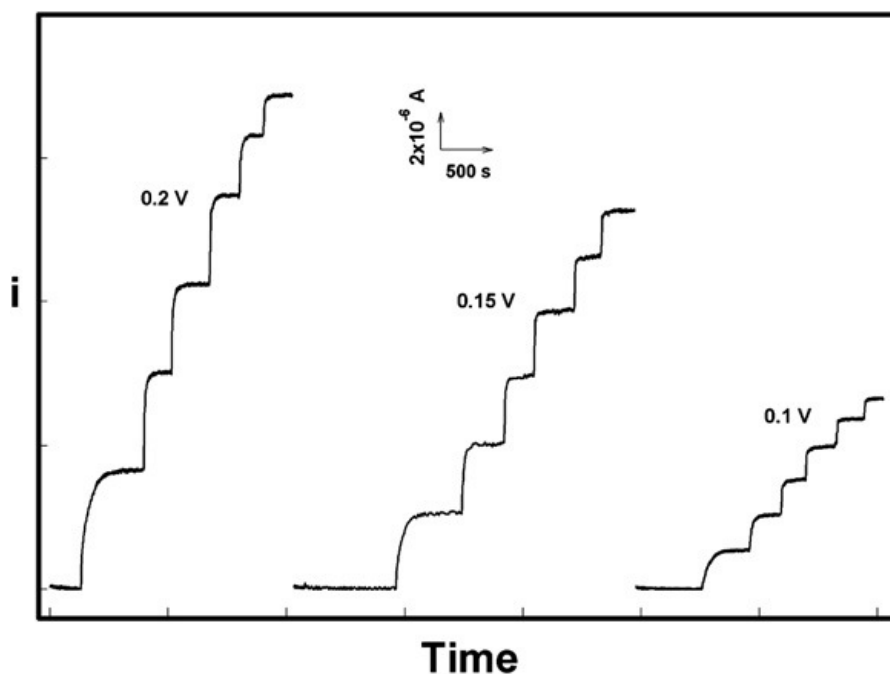


Figure 2. Chronoamperometric response of the biosensor electrode after successive additions of 1.0 mM glucose at different applied potentials. PBS buffer 0.05 M and pH 7.4.

4.3.2. Oxygen effect

The oxidation mechanism of glucose at TTF-TCNQ electrodes, outlined in Eqs. (1) and (2), has not been completely established yet. The direct electron transfer process might be very complicated and the dominant pathway seems to depend on the method of electrode preparation, glucose concentration and applied potential [8, 13]. However, it has been reported that the presence of oxygen may induce a poor response of the biosensor towards glucose because of the competition between oxygen, Eq. (3), and the organic salt for the oxidation of the FADH₂ group of GOx.



The H_2O_2 produced in this reaction could not be detected by the biosensor because at the working potential, 0.1-0.2 V, hydrogen peroxide is not re-oxidized to oxygen.

Figure 3 shows the response of the prepared glucose biosensor at 0.2 V, with and without oxygen. As can be seen, the signal is strongly affected by the presence of oxygen up to glucose concentrations close to 1.0 mM (curve B, injections a-d). Above this concentration (curve B, injection e), the influence of oxygen on the measurements is practically negligible.

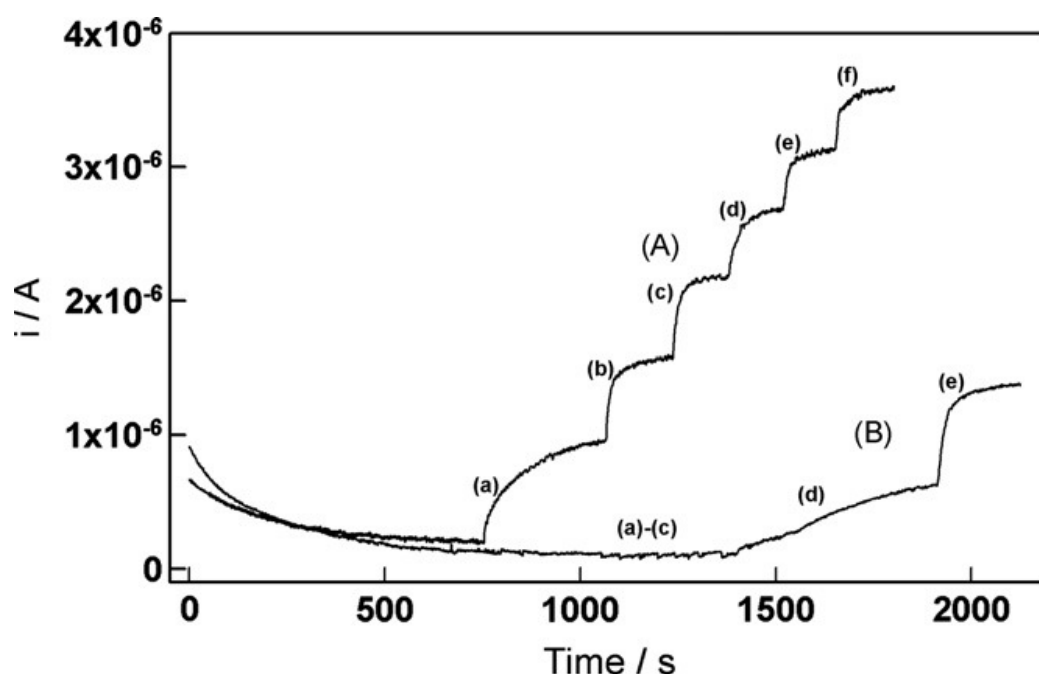


Figure 3. Influence of oxygen on the steady-state current for successive injections of 0.2 mM glucose: (A) N_2 -saturated solution; (B) air -saturated solution. The applied potential is 0.2 V. Others conditions as in Fig. 2.

4.3.3. Effect of enzyme concentration on the biosensor response

Figure 4 shows the calibration curves obtained at 0.15 V with different enzyme amounts (expressed as Units GOx) in the biosensor. It can be observed an increase in the current response, which is proportional to the enzyme concentration. Nevertheless, it must be pointed out that there are reproducibility problems when using biosensors prepared with amounts above 40 Units GOx. This can be due to saturation effects,

which probably entail a lack of homogeneity of the sensor. Therefore, 12 or 24 Units GOx seem to be appropriate.

According to these results, 24 Units GOx and 0.15 V of applied potential can be estimated as rather suitable work conditions. Under these experimental conditions (curve b in Figure 4) we obtained a linear range up to 5.0 mM, with a sensitivity of $3.5 \pm 0.4 \text{ mA M}^{-1}$ and a linear regression coefficient (r) of 0.9979. The detection limit ($s/n = 3$) was $8.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. These values are similar to those obtained for other recent glucose biosensors that use gold nanoparticle-modified electrodes [12].

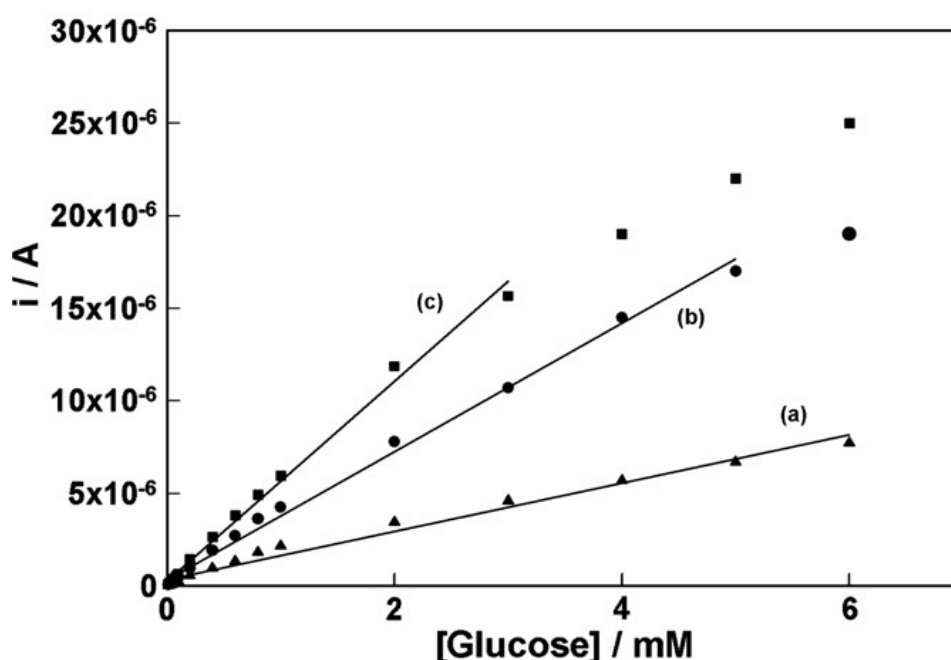


Figure 4. Influence of the Glucose oxidase loading cross-linked with glutaraldehyde on the biosensor response: (a) 12 Units, (b) 24 Units and (c) 36 Units. The applied potential is 0.2 V. Others conditions as in Figure 2.

We have obtained a value of $9.0 \pm 0.5 \text{ mM}$ for the apparent Michaelis-Menten constant, K_m^{app} , determined from the corresponding Lineweaver-Burk plot. This value is similar to those reported for the free enzyme, which proves the good affinity for glucose of GOx in the proposed biosensor, even higher than those of other GOx-based biosensors [14-16].

4.3.4. Reproducibility

The reproducibility of the biosensor was estimated by the response of the electrode to 1.0 mM glucose at 0.15 V. We obtained a relative standard deviation (R.S.D.) of 1.0% for five successive determinations by using the same electrode, a R.S.D. of 1.6 % by using five different electrodes of the same synthesis and a R.S.D. of 2.5 % for five electrodes from different syntheses. These results show a remarkable reproducibility of the proposed biosensor.

4.3.5. Stability

We have investigated the long-term stability of the biosensor by recording a daily calibration curve for one month. There is a slight decrease in sensitivity (*ca.* 10 %) and in intensity, as can be seen for instance in Figure 5 for a solution containing 1.0 mM glucose. After this period, i_{max} becomes 72 % of its initial value, although its decrease is not significant throughout the first 10 days.

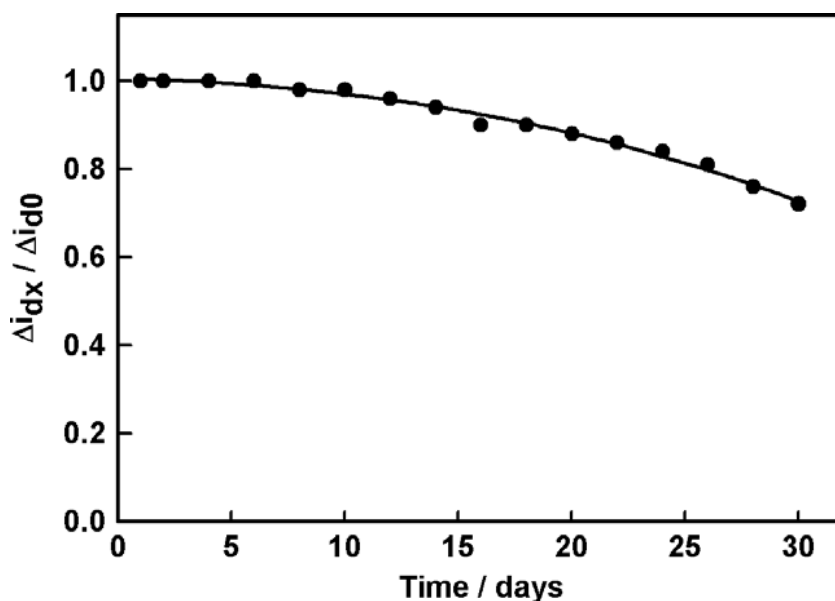


Figure 5. Stability of the enzyme electrode stored in PBS buffer (0.05 M; pH 7.4) at 4 °C. The determination solution is 1.0 mM glucose plus PBS buffer (0.05 M; pH 7.4). The applied potential is 0.15 V.

4.3.6. Interferences

We have studied the effect of the most usual electroactive interferences, such as ascorbic acid (AA), uric acid (UA) and oxalic acid (OA), on the biosensor performance. The solid line in Fig. 6 shows the chronoamperogram obtained for 1 mM glucose in the presence of the investigated interferences (1.0 mM). As can be observed in the figure, only AA gives rise to a significant response, whereas neither UA nor OA affect the steady-state current response. These results are logical because of the low value of the applied potential.

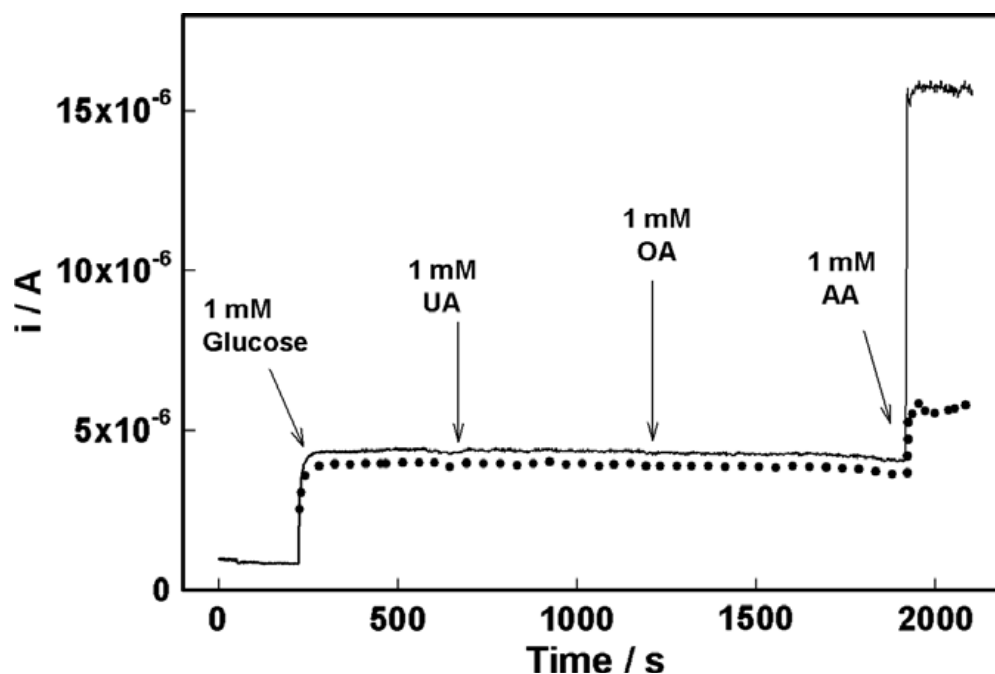


Figure 6. Influence of electroactive interferences at the applied potential (0.15 V): response at not Nafion-modified biosensor (solid line) and response at Nafion-modified biosensor (dashed line). Arrows indicate the additions in PBS 0.05 M buffer and pH 7.4.

In order to solve the possible interference of AA we suggest two alternative methods:

i) Direct elimination of the interfering effects of AA by coating the biosensor with an extra 15 μ l layer of 0.5 % Nafion solution (see dashed line in Fig. 6). This type of treatment has been used in previous papers [14, 17, 18]. The inconvenient of this procedure is that it entails a decrease in reproducibility and sensitivity (c.a. 10 %) of the

biosensor. Therefore, this method would be more suitable when the AA concentration in the sample is small compared to that of glucose, as it happens with human blood samples in which typical concentrations are 0.1 mM and 5.0 mM of AA and glucose, respectively [19].

ii) Simultaneous determination of glucose and AA in the sample. First of all, the AA concentration is determined by using the PVC/TTF-TCNQ electrode, as described in previous papers [4, 11]. The subsequent determination of glucose is carried out using the biosensor proposed in this work, after previous calibrations of both glucose and AA, at 0.15 V. Since the response of the biosensor (i'_{AA}) to the AA concentration is different from that of the PVC/TTF-TCNQ electrode (i_{AA}), the contribution of AA is subtracted from the total signal (i_{biosen}) according to: $i_{glucose} = i_{biosen} - i'_{AA}$. This simple procedure has been tested in comparison with consecutive additions method, in which increasing amounts of glucose were added, starting from a definite amount of AA. The experimental results obtained by both methods differ by less than 6 %.

4.3.7. Biosensor integration into a FIA system and glucose determination

As noted above, the most suitable potential was found to be +0.15 V for the amperometric detection of glucose. The influence of hydrodynamic variables such as flow rate and injected volume on the response of the biosensor to glucose was also examined. The best results in terms of sensitivity and reproducibility were obtained at a flow rate of 1 ml min⁻¹ and an injected volume (sampling loop) of 60 µl.

The reproducibility ($n = 5$) was checked on several consecutive injections of a 1.0 mM glucose solution. A relative standard deviation of 1.2% was obtained, which indicates a good reproducibility and therefore good mechanical resistance of biosensor under flowing conditions.

Figure 7 shows the calibration curve obtained for standards. Four measurements were performed for each standard solution. A sensitivity of 0.80 ± 0.04 mA M⁻¹ and a linear regression coefficient (r) of 0.9985 were obtained for a linear range between 0.1 to 8.0 mM. The detection limit ($s/n = 3$) was $1.9 \cdot 10^{-5}$ M. These results are in good

agreement with those obtained in batch, and involve an interesting improvement when compared with those of biosensors containing the enzyme in the composite [8]. Moreover, for the biosensor proposed in this work there is no need to add any additional substance to the composite mixture to ensure its conductivity. It also has lower cost, as only a small amount of enzyme is needed (just to cover the electrode surface, instead of the whole composite).

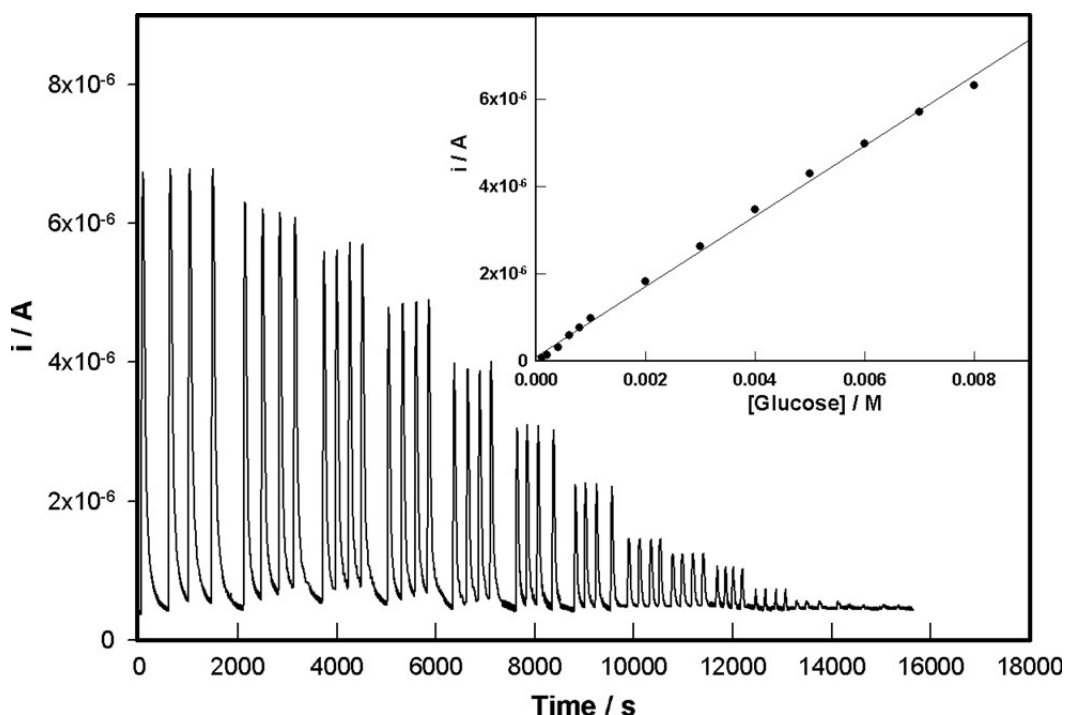


Figure 7. FIA peaks obtained at the biosensor for quadruple injections of glucose standards (ranging from 0.1 mM to 7.0 mM glucose) and the corresponding calibration curve (inset). Carrier solution: PBS buffer (0.05M; pH 7.4). Flow rate: 1.0 mLmin^{-1} . Injected volume (sampling loop): $60 \mu\text{l}$. Applied potential: 0.15V.

The good results obtained allow its use for glucose determination in most of the systems of interest (commercial beverages [8,18] clinical analysis [14] and human serum or plasma [9,15]).

In fact, as a matter of interest, we have applied the proposed biosensor to determine glucose in a commercial sport beverage. Five of these commercial samples were

properly diluted by means of the supporting electrolyte solution before the amperometric measurements. We obtained a good concordance ($\pm 6.0\%$) between the results obtained when the biosensor and those obtained by the commercially available Glucose Assay Kit.

4.4. Conclusions

This paper means our proposal of a new third generation composite biosensor for glucose determination, based on the redox mediator TTF-TCNQ. It can be used both in batch and in FIA systems. The composite can be easily prepared, and there is no need to add any additional substance to ensure its conductivity. It shows high reproducibility, long-term stability and low cost. Because of the low working potential of the biosensor, the only possible or significant interference could be due to AA. Nevertheless, by means of a simple procedure we can determine simultaneously glucose and AA concentrations present in the sample. The linear range for glucose determination (from 0.1 mM up to 5.0-8.0 mM) and the detection limits obtained ($8.5 \cdot 10^{-6}$ M- $1.9 \cdot 10^{-5}$ M) make it feasible for this biosensor to have of possible applications.

4.5. Acknowledgments

The authors wish to acknowledge funding by Spain's Ministerio de Educación y Ciencia within the framework of Project CTQ2004-01677, and cofunding by FEDER. They also thank Professor M. Valcárcel of the Analytical Chemistry Department of the University of Córdoba for access to the FIA equipment.

4.6. References

- [1] F. Cespedes, E. Martinez-Fabregas, S. Alegret, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 15 (1996) 296.
- [2] S. Ramirez- Garcia, S. Alegret, F. Cespedes, R. J. Forster, *Analyst*, 127 (2002) 1512.
- [3] M. Cano, B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, *Electroanal.* 18 (2006) 1727.

-
- [4] M. Cano, B. Palenzuela, J.L. Ávila, R. Rodríguez-Amaro, *Electroanal.* 19 (2006) 1068.
- [5] G. F. Khan, M. Ohwa, W. Wernet, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 2939.
- [6] G. F. Khan, *Sensors and Actuators B*, 35 (1996) 484.
- [7] F. Palmisano, P. G. Zambonin, D. Centonze, M. Quinto, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 5913.
- [8] X. Llopis, A. Merkoci, M. del Valle, S. Alegret, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 107 (2005) 742.
- [9] J. C. Vidal, S. Mendez, J. R. Castillo, *Analytica Chimica Acta*, 385 (1999) 203.
- [10] P.C. Pandey, S. Upadhyay, S. Sharma, *Electroanal.* 15 (2003) 1115.
- [11] M. Cano, B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, *Electroanal.* 18 (2006) 1068.
- [12] M. L. Mena, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarron, *Analytical Biochemistry*, 336 (2005) 20.
- [13] Q. S. Li, B. C. Ye, B. X. Liu, J. J. Zhong, *Biosensors & Bioelectronics*, 14 (1999) 327.
- [14] K. I. Ozoemena and T. Nyokong, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 5131.
- [15] H. Tang, J. H. Chen, S. Z. Yao, L. H. Nie, G. H. Deng, Y. F. Kuang, *Analytical Biochemistry*, 331 (2004) 89.
- [16] X. Chu, D. Duan, G. Shen, R. Yu, *Talanta*, 71 (2007) 2040.
- [17] . J. Yuan, C. L. Hsu, S. C. Wang, K. S. Chang, *Electroanalysis*, 17 (2005) 2239.
- [18] J. Manso, M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. Pingarrón, *J. Electroanal. Chem.*, 603 (2007) 1.
- [19] H. Zheng, H. G. Xue, Y. F. Zhang, Z. Q. Shen, *Biosensors & Bioelectronics*, 17 (2002) 541.

CAPÍTULO IV

SENSORES DE DETECCIÓN VOLTAMÉTRICA

- 1. A PVC/TTF-TCNQ Electrode as Voltammetric Analogue of an Ion-Selective Electrode.**
- 2. Use of Butler-Volmer treatment to assess the capability of voltammetric ion sensors. Application to a PPy/DBS film for cations detection.**
- 3. A new method based in the Butler-Volmer equation to evaluate Voltammetric cation and anion sensors.**

1. A PVC/TTF-TCNQ Electrode as a Voltammetric Analogue of an Ion-Selective Electrode

Abstract

A TTF-TCNQ/PVC composite electrode is proposed as a voltammetric cation and anion sensor. The electrode relies on the principle that, during redox processes involving the TCNQ^{0/-} couple for cations and the TTF^{+/0} couple for anions, electrolyte ions are included into lattice sites in the charge neutralization process. This voltammetric ion-sensor provides results that are similar to those of sensors based on two electrodes (*viz.* one modified with TCNQ for cations and another modified with TTF for anions) but with some practical advantages over them.

Keywords: Ion sensor, Voltammetric detection, TTF-TCNQ, Composite electrode, Ion selectivity.

Paper published in *Electroanalysis* 18 (2006) 1068-1074.

1.1. Introduction

Although 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) and tetrathiafulvalene (TTF) have been the subjects of much electrochemical research, recent voltammetric studies [1–6] on them have focussed on identifying the processes occurring in surface-confined TCNQ and TTF microparticles. During such processes, electrolyte ions are included into TCNQ (cations) and TTF (anions). Bond *et al.* [5,6] have proposed them as candidates for the development of novel voltammetric cation and anion sensors, respectively.

This voltammetric form of sensing has major advantages over the much more extensively investigated potentiometric ion-selective electrode technique [6]. Thus, it dispenses with the need to prepare one electrode per ion. Also, the reversible potential can be calculated from data obtained under dynamic conditions with minimum requirements as regards pre-equilibrium cycling of the potential. Finally, voltammetrically generated current–potential–time curves provide significantly more analytically useful information than do single equilibrium potential curves obtained under potentiometric conditions.

Bond *et al.* [5,6] have successfully applied the following equation to TCNQ and TTF immobilized as solids on an electrode surface:

$$E_R = E' + S \log [M^+] \text{ for TCNQ}^{0/-} \quad (1)$$

$$E_R = E' - S \log [X^-] \text{ for TTF}^{+/0} \quad (2)$$

where E_R is the reversible potential, defined as $E_R = (E_p^{\text{ox}} + E_p^{\text{red}})/2$, E_p^{ox} the oxidation peak potential and E_p^{red} the reduction peak potential. These equations provide the basis for an ion detection system.

Equations (1) and (2) were obtained from an expression of the Nernst relationship for a reversible sensing process:

$$E_R = E' - S \log [a_R/a_O] \quad (3)$$

where a_R denotes the activity of the reduced phase and a_O that of the oxidized phase. The formal potential, E' , is a constant and the factor S is the potential shift per decade

change in analyte concentration. Ideally, $S = 2.303RT/nF$. An equation similar to Equation 1 was used by Krysinski [7] for a TCNQ-modified Au-SAM electrode immersed in aqueous solutions of alkali metal cations.

When presented with mixed-analyte solutions, both ion-sensing systems exhibit some ion selectivity by virtue of the ion inclusion/exclusion processes of TCNQ and TTF being governed by nucleation growth kinetics with a different free energy of ion incorporation into lattice sites. An equation similar to that of Nicolsky for cation selective electrode [8] allowed a selectivity sequence to be established for the ions studied.

The aim of this work was to further the development of solid-state univalent cation and anion detectors with a new system based on the voltammetry of an electrode consisting of the organic conducting salt (OCS) TTF-TCNQ as an alternative to existing ion detection methods. The proposed system provides some improvements on that reported by Bond *et al.* Thus, the use of the conducting salt in the composite mixture of the electrode increases its durability to an extent that makes it virtually permanent; also, it increases its flexibility by making it suitable for both cations and anions, and its responsiveness (the electrode memory effect is overcome within a smaller number of cycles).

1.2. Experimental

1.2.1. Reagents

TTF-TCNQ salt (purum grade, Fluka), poly(vinyl chloride) (PVC, low mol. weight, purum grade Fluka) and *N,N'*-dimethylformamide (DMF, $\geq 99.7\%$ pure, Merck) were used to prepare the TTF-TCNQ/PVC composite electrode. All other chemicals were obtained in analytical reagent-grade from Merck or Fluka and also used as received.

All solutions were made in bidistilled water from a Millipore Milli-Q system.

1.2.2. Instrumentation and procedures

All electrochemical measurements were made by using an EG&G PAR 273 potentiostat with automatic correction for the iR_u compensation. Ag/AgCl 3M KCl and Pt wire were used as the reference and auxiliary electrode, respectively. All tests were performed under ambient conditions (*ca.* 25 °C).

The instrumental set-up was computer-controlled with the aid of M270 Research Electrochemistry software.

The TTF-TCNQ/PVC composite electrode (working electrode) was prepared by using a procedure similar to that reported by Luque et al. [9]. The PVC/TT-TCNQ ratio leading to the highest electrical conductivity while maintaining mechanical stability was determined in previous experiments. The best results in this respect were obtained at a 10:1 (w/w) ratio of TTF-TCNQ to PVC in DMF. The polymer, polyvinyl chloride, was thoroughly dissolved in DMF and then supplied with TTF-TCNQ salt to obtain a homogeneous TTF-TCNQ/PVC mixture. Subsequently, the suspension was separated and dried in order to obtain the composite powder. Finally, the powder was pressed into cylindrical pellets 4 mm in diameter \times 2.5 mm thick with an active surface area of 12 mm². Composite pellets were inserted by press-fitting into a Teflon tube furnished with a copper wire to establish electrical contact.

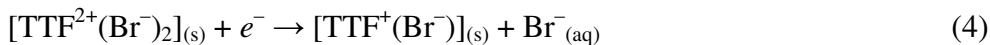
The electrode surface was regenerated as required by polishing with P-1200 emery paper to obtain a flat surface, followed by polishing with glossy paper to obtain a uniform surface and rinsing with water.

Each experimental potential (E_p or E_R) was determined from at least five measurements the results of which were all virtually identical—which testifies to the high reproducibility of the electrode.

1.3. Results and discussion

The voltammetric behaviour of TTF-TCNQ electrodes has been carefully examined by authors such as Jaeger and Bard [10, 11], El Kacemi and Lamache [12], Brajter-Toth

et al. [13], and Scaboo and Chambers [14]. Based on their results, partial oxidation produces dication lattice sites that are reduced at 0.45 V in a process denoted by R3:



After this reduction reaction, if the potential sweep range is restricted from -0.2 to 0.4 V, then the peaks due to the TCNQ/TCNQK couple (Ox2/R2) and the peaks due to the TTFBr/TTF couple (Ox1/R1) persist in steady state multi-cycle voltammograms. All these processes involve the transport of ions inside the solid lattice and out.

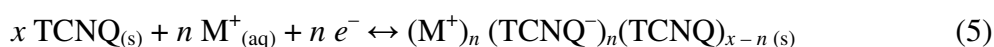
1.3.1. Detector response to ion identity and concentration

The basis for calibration of the proposed voltammetric ion sensor is a plot of oxidation (E_p^{ox}) or reduction peak potential (E_p^{red}), or reversible potential (E_R), versus concentration. Although ohmic distortion has been found to influence E_p^{ox} and E_p^{red} , it has fairly little effect on the reversible potential. However, application of dynamic iR_u compensation results in substantial sharpening of voltammetric peaks, thereby improving the reproducibility and accuracy of E_R measurements. Thus, we applied a dynamic iR_u compensation of 50Ω , which was calculated to be the mean for the different solutions used with our system, to our voltammetric measurements.

1.3.1.1. Application to cations

For the determination of cation concentrations, the TTF-TCNQ/PVC composite electrode was activated by preliminary oxidation at 0.6 V. However, after the reduction process R3, the potential sweep range was restricted where only the Ox2/R2 peaks appear. Figure 1 shows the peaks for the TCNQ/TCNQ⁻ couple as isolated by clipping the potential limits at -0.1 and 0.4 V in $0.1 \text{ M M}^+\text{Cl}^-$.

Previous studies [1, 2] showed that, for most group I cations (*viz.* Na^+ , K^+ and Rb^+), the transformation



occurs at $x = 1$ and $n = 1$; with Cs^+ , however, it occurs at $x = 3$ and $n = 2$.

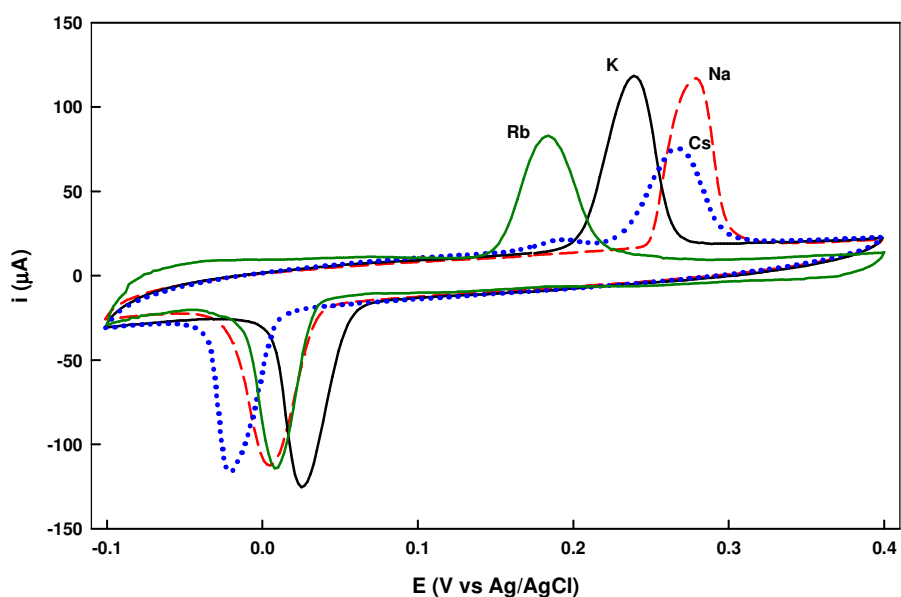


Figure 1. Voltammograms of the $\text{TCNQ}^{0/-}$ couple for a TTF-TCNQ/PVC composite electrode immersed in 0.1 M aqueous solutions of sodium, potassium, rubidium and cesium chloride. Scan rate = 10 mV s^{-1} . Dynamic iR_u compensation = 50Ω . Data obtained from the fourth cycle of the potential after a 3 potential cycle pre-equilibrium.

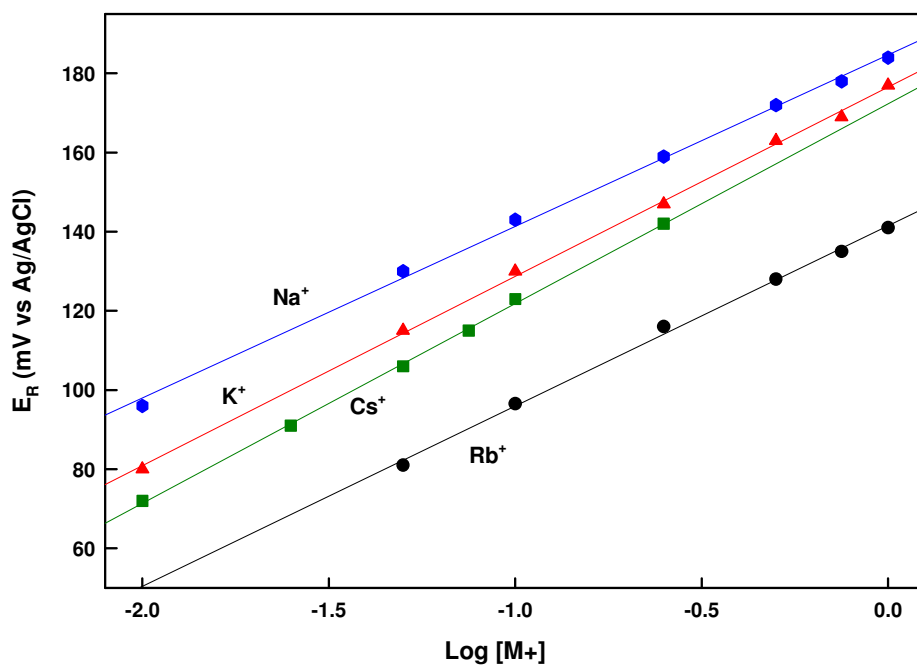


Figure 2. Calibration plots of reversible potential versus $\log [M^+]$ for the $\text{TCNQ}^{0/-}$ couple as obtained by immersing a TTF-TCNQ/PVC composite electrode in aqueous solutions of $M^+\text{Cl}^-$. Other conditions as in Figure 1.

The accuracy of the Nernst-type relationship for our system was confirmed by changing the alkali concentration in single-cation solutions. The plots of E_R versus $\log [M^+]$ thus obtained are shown in Figure 2 and their figures of merit in Table 1.

Table 1: Voltammetric parameters for the TCNQ^{0/-} activation process as obtained by immersing a TTF-TCNQ/PVC composite electrode in 0.1 M M^+Cl^- aqueous solutions. Scan rate: 10 mV s⁻¹. Data were collected at the fourth potential cycle following a 3 potential cycle pre-equilibrium S values were obtained from Figure 2.

	Sodium	Potassium	Rubidium	Cesium
E_p^{ox} (mV)	279	239	184	267
E_p^{red} (mV)	5	25	8	-21
E_R (mV)	142	132	96	123
ΔE_p (mV)	274	214	176	288
S (mV)	43	43	46	48

These results are very similar to those obtained by Bond et al. [5] for a TCNQ-modified RAM electrode. Also, as can be seen from Figure 2, all cations gave straight lines, which indicate that the TCNQ^{0/-} process exhibits a Nerstian-type shift in the reversible potential with alkaline cations. As expected from its disparate stoichiometry in Equation 5, the intercept E' for Cs departed from those for the other alkali metals and its slope, S , was slightly greater than the rest.

In order to avoid raising background noise and irreproducibility, we used a moderate scan rate (≤ 10 mV s⁻¹). Under these conditions, the TTF-TCNQ/PVC composite electrode exhibited two major advantages, namely: (a) it was rapidly recycled (2–3 cycles sufficed to suppress any memory effect developing from contact with previous solutions), and (b) it remained operational over a virtually unlimited period (any signs of deterioration were easily suppressed by using a simple surface regeneration procedure described in Sec. 2).

As can be seen from Table 1 regarding cation identity, on identical ion concentrations in solution each cation led to a different voltammetric peak pattern and an also different reversible potential for TCNQ. Therefore, the TTF-TCNQ sensor can be deemed a voltammetric analogue of a cation-selective electrode.

1.3.1.2. Application to anions

For the determination of anion concentrations, the TTF-TCNQ/PVC composite electrode was activated similarly as for the determination of cations since it was previously confirmed that it was more responsive when activated by oxidation than by reduction. After the reduction process R3, the potential sweep limits were restricted to the range where only Ox1/R1 peaks appeared (normally from -0.2 to 0.25 V). Figure 3 shows the peaks for the TTF^+/TTF couple in 0.1 M K^+X^- .

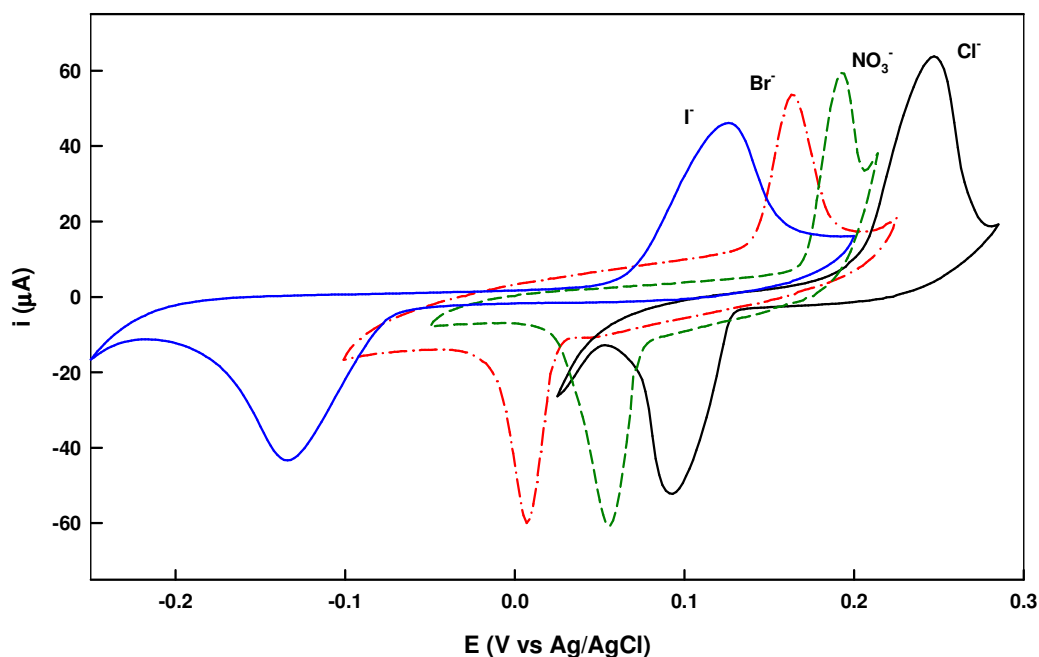
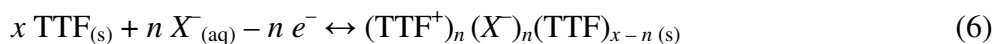


Figure 3. Voltammograms of the $\text{TTF}^{+/0}$ couple for a TTF-TCNQ/PVC composite electrode immersed in 0.1 M aqueous solutions of selected potassium anions. Other conditions as in Figure 1.

The redox process occurring at the electrode can be defined as



where $x = 1$ and $n = 0.71\text{--}0.76$ [10,15–17] for halides.

As with the cations, the accuracy of the Nernst-type relationship here was confirmed by changing the anion concentration in single-analyte solutions. Figure 4 shows the E_R versus $\log [X^-]$ plots obtained and Table 2 their figures of merit. The fact that all anions gave straight lines, the disparate voltammetric peak separation and the also disparate reversible potential for TTF suggests that the TTF-TCNQ sensor is a voltammetric analogue of an anion-selective electrode. Note that the S values for the anions were more disperse (41–56 mV) than those for the alkali cations. This, as previously predicted by Bard et al. [17], may be a consequence of the strength of the TTF^+X^- complex.

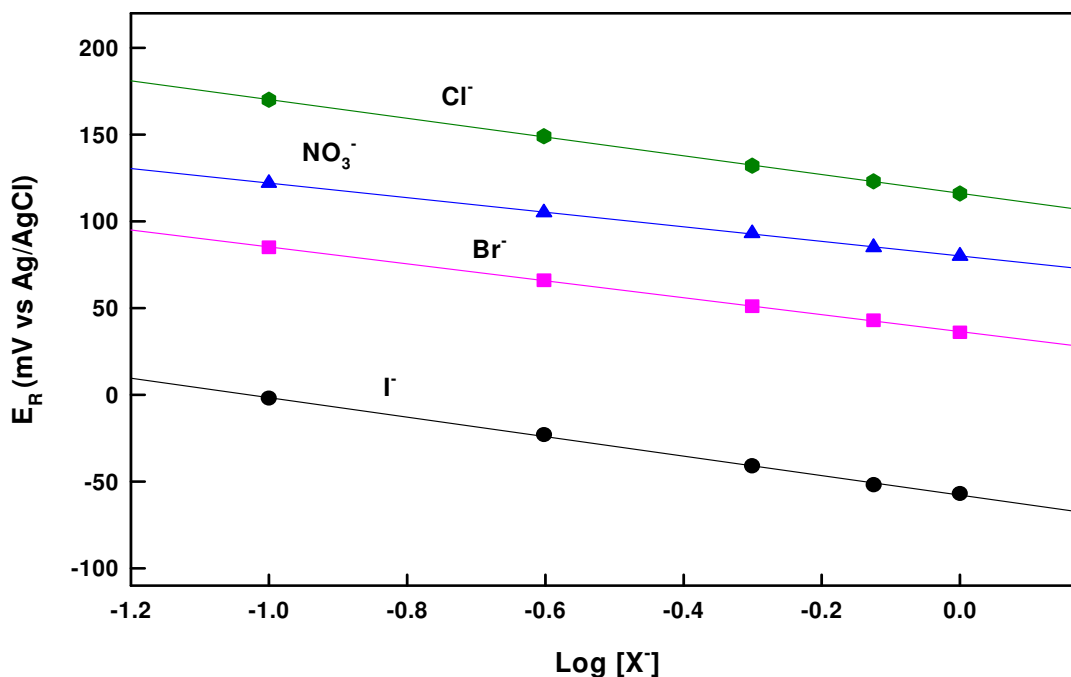


Figure 4. Calibration plots of reversible potential versus $\log [X^-]$ for the $\text{TTF}^{+/0}$ couple as obtained by immersing a TTF-TCNQ/PVC composite electrode in aqueous solutions of K^+X^- . Other conditions as in Figure 1.

Table 2: Voltammetric parameters for the TTF⁺⁰ activation process as obtained by immersing a TTF-TCNQ/PVC composite electrode in 0.1 M K⁺X⁻ aqueous solutions. Scan rate: 10 mV s⁻¹. Data were collected at the fourth potential cycle following a 3 potential cycle pre-equilibrium *S* values were obtained from Figure 4.

	Chloride	Bromide	Iodide	Nitrate
E_p^{ox} (mV)	247	163	126	192
E_p^{red} (mV)	93	7	-134	56
E_R (mV)	170	85	-4	124
ΔE_p (mV)	154	156	260	136
S (mV)	54	49	56	41

The previous results show that the TTF-TCNQ/PVC composite electrode exhibits ion detection capabilities when presented with single-analyte solutions. In fact, with TCNQ^{0/-} activated, the electrode behaves as a cation sensor and with TTF⁺⁰ activated as an anion sensor.

1.3.2. Detector response to multianalyte solutions

In order to check whether the TTF-TCNQ/PVC composite electrode would retain its ion selectivity in mixed-ion solutions, we used Equation 7, proposed by Bond *et al.* [5, 6] for a voltammetric sensor. This equation is an adaptation of the Nicolsky-type equation for an ion selective electrode (ISE) immersed in a mixed-cation solution:

$$E_R = x + S \log \left([M_A^+] + K_{M_A^+ M_B^+} [M_B^+] \right) \quad (7)$$

Similarly, for a sensor immersed in a mixed-anion solution,

$$E_R = x - S \log \left([X_A^-] + K_{X_A^- X_B^-} [X_B^-] \right) \quad (8)$$

where x and S can be obtained from the calibration plot for the main ion A, B denotes the “competing” or interfering cation, and K is the ion selectivity coefficient and represents preference for the main ion and the interfering ones.

There are three different possibilities for mixed-ion solutions, namely [6]:

- (a) No selectivity (i.e., the potential remains constant and $K = 1$).
- (b) Competitive selectivity (secondary ions interfere to some extent).
- (c) Total selectivity. The potential depends on the main ion only, so $K = 0$.

The ion selectivity coefficients of a voltammetric sensor can be calculated by using the empirical separate solution method, based on the following equation for ISEs:

$$-\log K_{A,B} = \frac{E_{RB} - E_{RA}}{S} \quad (9)$$

where S is the average gradient of the calibration plot for each ion.

From data in Tables 1 and 2 we obtained the following sequences:

$K_{Rb,Na} = 10.8 > K_{Rb,K} = 6.4 > K_{Rb,Cs} = 3.7 > K_{Cs,Na} = 2.6 > K_{K,Na} = 1.7 > K_{Cs,K} = 1.6$ for cations, and

$K_{Cl,I} = 1457 > K_{NO_3,I} = 436 > K_{Br,I} = 49.6 > K_{Cl,Br} = 44.7 > K_{NO_3,Br} = 7.4 > K_{Cl,NO_3} = 2.4$ for anions.

The previous values are quite consistent with those reported by Bond et al. [5] and lead to a similar ion selectivity sequence, namely: $Na^+ > K^+ > Cs^+ > Rb^+$ for cations, which is consistent with an increased selectivity for those cations with an increased positive TCNQ^{0/-} reversible potential; and $I^- > Br^- > NO_3^- > Cl^-$ for anions, which is consistent with an increased selectivity for the anions with an increased negative TTF⁺⁰ reversible potential

The experimental values of the reversible potential were obtained by using mixed-ion (cation or anion) solutions in variable ion ratios, but a constant total ion concentration (0.1 M). The results were compared with those predicted by Equation 7 and 8, and found to be quite consistent. By way of example for cations, Figure 5a shows the results

for $\text{Rb}^+:\text{K}^+$ mixtures. Circles correspond to experimental data and the solid line to the best fit obtained with Equation 7. Consistency between the experimental and predicted data was especially good at $x = 137$ mV, $S = 44.5$ mV and $K_{\text{Rb,K}} = 5.3$.

Similarly, by way of example for anions, Figure 5b shows the results for selected $\text{Cl}^-:\text{Br}^-$ mixtures. Circles correspond to experimental data and the solid line is the best fit of Equation 8. As can be seen, the two were highly consistent at $x = 122$ mV, $S = 49$ mV and $K_{\text{Cl,Br}} = 50$.

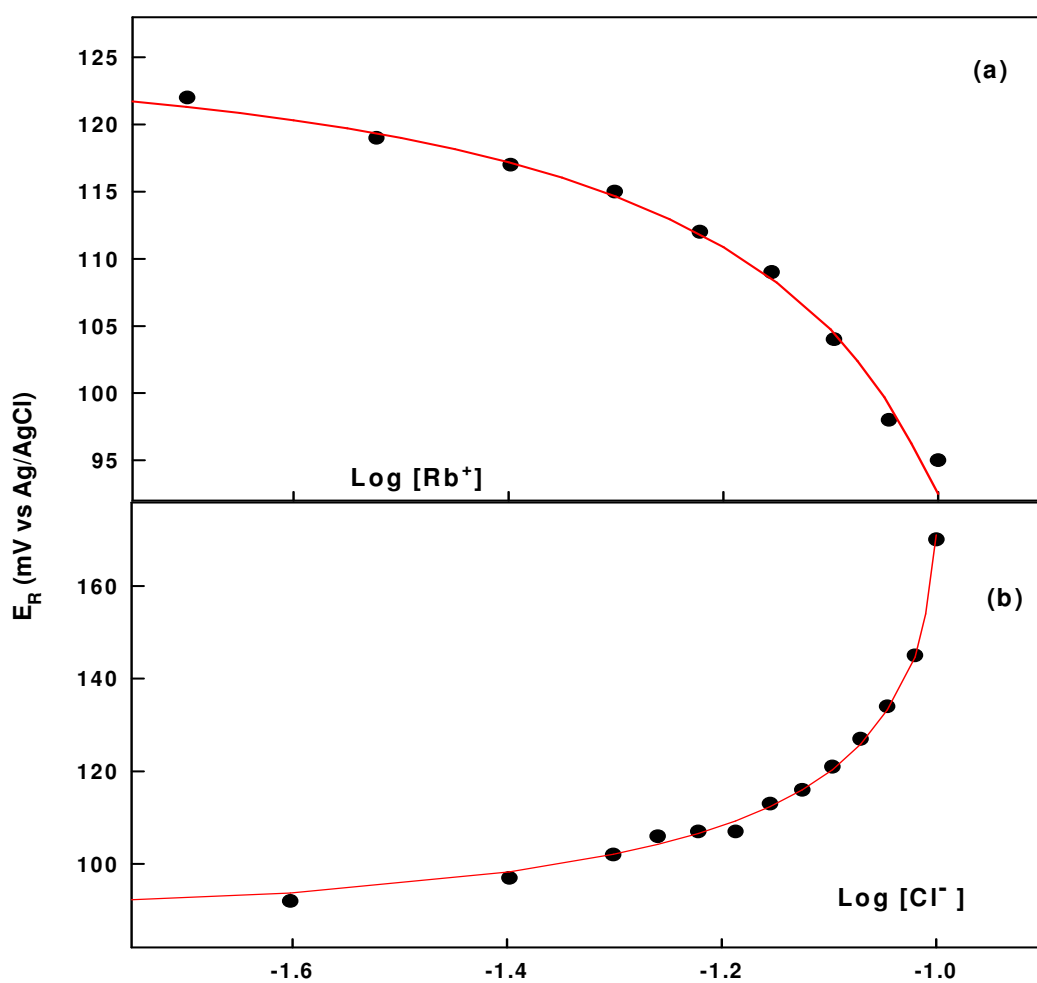


Figure 5. (a) Reversible potential for the $\text{TCNQ}^{0/-}$ couple as obtained by immersing a TTF-TCNQ/PVC composite electrode in mixed-cation solutions containing variable Rb^+/K^+ ratios and a constant total cation concentration of 0.1 M. (b) Reversible potential of the $\text{TTF}^{+/0}$ couple as obtained by immersing a TTF-TCNQ/PVC composite electrode in mixed-cation solutions containing variable Cl^-/Br^- ratios and a constant total anion concentration of 0.1 M. Symbols correspond to experimental data and the solid line to data obtained from Equations (7) or (8) (see text for further details). Other conditions as in Figure 1.

Although the $K_{\text{Rb,K}}$ and $K_{\text{Cl,Br}}$ values obtained suggest strong perturbations (competitive selectivity) from the interfering ion in the determination of the main ion, the proposed electrode provides an acceptable response to these types of mixtures. Also, the K values obtained are similar to those provided by Equation 9, which confirms the accuracy of the separate solution method approximation —at least with a view to obtaining acceptable estimates.

Although the determination of divalent cations such as Mg^{2+} , Ca^{2+} or Ba^{2+} was outside the scope of this work, we found the presence of these ions at concentrations below 5% (for Na^+ and K^+) or 1% (for Rb^+ and Cs^+) that of the univalent main cation to cause no appreciable interferences.

Based on the foregoing, the proposed TTF-TCNQ/PVC composite ion-sensing electrode exhibits acceptable selectivity in mixed-ion solutions, at least on a par with those of modified TCNQ electrodes for cations and modified TTF electrodes for anions [5, 6]. The electrode can thus be expected to be useful with real systems (e.g. in the determination of cations in blood serum [18, 19] or that of ions in water [20, 21]).

Therefore, including TTF-TCNQ salt in the electrode composition is, to our minds, a step forward in the development of new solid-state univalent ion detectors providing an acceptable compromise between reliability and ease of preparation and use.

1.4. Conclusions

The proposed TTF-TCNQ/PVC composite electrode exhibits a selective voltammetric behaviour in aqueous solutions that affords its use as an ion detector. The relationship of the thermodynamically reversible potential to both the nature of the analyte and its concentration (a Nernst-type relationship) in mixed-ion solutions (Nicolson ion-selective type equation), together with the ease of preparation of the electrode, its responsiveness and durability, make it an appealing alternative to existing electrochemical forms of ion sensing.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge funding by Spain's Ministerio de Educación y Ciencia within the framework of Project CTQ2004-01677, and cofunding by FEDER.

1.5. References

- [1] A. M. Bond, S. Fletcher, F. Marken, S.J. Shaw, P.G. Symons, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92 (1996) 3925.
- [2] A. M. Bond, S. Fletcher, P. G. Symons, *Analyst.* 123 (1998) 1891.
- [3] M. F. Suárez, A. M. Bond, R. G. Compton, *Journal Solid State Electrochem.* 4 (1999) 24.
- [4] S. J. Shaw, F. Marken, A. M. Bond, *Electroanalysis.* 8 (1996) 732.
- [5] T. J. Wooster, A. M. Bond, M. J. Honeychurch, *Anal. Chem.* 75 (2003) 586.
- [6] T. J. Wooster, A. M. Bond, *Analyst.* 128 (2003) 1386.
- [7] P. Kryszinski, *Adv. Mater. Opt. Electron.*, 8 (1998) 121.
- [8] G. D. Christian, *Analytical Chemistry*, 5th edn; Wiley: New York, 1994.
- [9] M. Luque, E. Luque-Pérez, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta.* 410 (2000) 127.
- [10] C. D. Jaeger, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 1690.
- [11] W. L. Wallace, C. D. Jaeger, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 4840.
- [12] K. El Kacemi, M. Lamache, *Electrochim. Acta.* 31 (1986) 1197.
- [13] M. S. Freund, A. Brajter-Toth, M. D. Ward, *J. Electroanal. Chem.* 289 (1990) 127.
- [14] K. M. Scaboo, J. Q. Chambers, *Electrochim. Acta.* 43 (1998) 3257.
- [15] B.A. Scott, S.J. La Placa, J.B. Torrance, B. D. Silverman, B. Welber, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 6631.
- [16] M. Lamache, H. Menet, A. Moradpour, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 4520.
- [17] T. P. Henning, A. J. Bard, *J. Electrochem. Soc.*, 130 (1983) 613.
- [18] G. N. Doku, P.Y. Gadzekpo, *Talanta*, 43 (1996) 735.
- [19] F. Deyhimi, *Talanta*, 50 (1999) 1129.
- [20] H. Sakai, T. Fujiwara, T. Kumamaru, *Anal. Chim. Acta*, 331 (1996) 239.
- [21] M. Heng, M. Kita, K. Murata, *Anal. Sci.*, 21 (2005) 95.

2. Use of Butler-Volmer Treatment to Assess the Capability of the Voltammetric Ion Sensors: Application to a PPy/DBS Film for Cations Detection.

Abstract

In this work, the Butler-Volmer formalism has been used to obtain a new equation to be applied to assess the calibration to voltammetric ion sensors. This new method postulates a direct relationship between the mid point reversible potential, E_R , and the logarithm of the electrolyte concentration. In the same way as the others relationships based on the Nernst equation, a positive slope is expected to a cationic exchanging system, and a negative one for an anionic sensor. However, the theoretical slope proposed in this work includes the electron-transfer coefficient, which allows us to explain the slopes frequently reported in the literature non coincident with the ideal value estimated from Nernst equation: $2.303RT/nF$. Also, comments are made on results from other literature with respect to the new equation, and an application of this method to PPy/DBS films as a cation sensor is carried out.

Keywords: Ion sensor; Butler-Volmer equation; Voltammetric detection; Conductive polymer; Cation selectivity

Paper published in *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 190-194.

2.1. Introduction.

The electrochemical sensors, including potentiometric, voltammetric/amperometric and those using resistance changes measurements are very attractive to practical applications because they are associated with small-size, portability, low energy consumption and low cost [1-3]. Voltammetric sensors have some advantages: they dispense with the need to prepare one electrode per ion; the current-potential-time curves generated provide more analytically useful information than single equilibrium potential curves obtained under potentiometric conditions; also, the reversible potential can be calculated from data obtained under dynamic conditions [4].

Actually, the expressions used to characterize ion-selective electrodes are based on the Nernst relationship. Bond and co-workers [4,5] adapted this equation for cation and anion voltammetric sensors, respectively:

$$E_R = E^o + S \log[M_A^+] \quad (1)$$

$$E_R = E^o - S \log[X^-] \quad (2)$$

where $[M_A^+]$ and $[X^-]$ are the cations and anions concentrations, respectively, and E_R is the reversible potential, defined by

$$E_R = \frac{E_p^{red} + E_p^{ox}}{2} \quad (3)$$

E_p^{red} is the reduction peak potential and E_p^{ox} is the oxidation peak potential. These equations were applied recently to check a TTF-TCNQ/PVC composite as ion-selective electrode [6].

Equations (1) and (2) demonstrate a direct relationship between E_R and the logarithm of the electrolyte concentration, where S is the slope derived from the plot, which has positive or negative values for cationic or anionic exchanging, respectively. Moreover, ideally S will be equal to $2.303RT/nF$.

Application of conducting polymers in chemical and biochemical sensors have been extensively studied since the mid-1980s. Polymers as polypyrrole (PPy), polyaniline (PANI), or Polythiophene (PTH) offer great possibilities to improve the selectivity,

partly changing the chemical structure of the polymer backbone, and partly from the many possible counterions or neutral molecules that can be trapped inside the polymer [2, 3, 7].

Moreover, for electrochemical ion sensors based in polymeric materials linear relationships between potential and the logarithm of electrolyte concentration have been reported. This behavior has been frequently explained on the basis of the Nernst equation [8-12]. However, a treatment based in the Butler-Volmer expression has recently been reported to explain the direct evolution of the potential with respect to the logarithm of the electrolyte concentration [13].

2.2. Experimental.

Pyrrole monomer (Fluka, >97%) was distilled under vacuum before use. Sodium dodecylbenzene sulfonate (Aldrich), LiClO₄, NaClO₄ and KClO₄ (Merck) were used as received. Millipore water with resistivity of > 18 MΩ cm was used.

Ppy/DBS films were generated by electrochemical oxidation on Pt foil electrodes. A potential of +0.8 V vs. Ag/AgCl was applied for 60 s in aqueous solutions of 0.1M pyrrole and 0.1M DBS. Afterwards, the modified electrode was taken out of the solution, washed with water, dried and stored at 4°C.

The electrochemical polymerization and the voltammetric measurements were performed with a PAR 273A potentiostat/galvanostat. A three electrodes cell composed of Pt foil working electrode (area 1 cm²), an Ag/AgCl reference electrode, and a Pt wire as the auxiliary electrode, were used. All the solutions were purged with N₂ gas for 15 min.

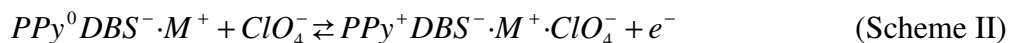
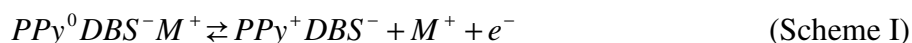
With the aim of preventing an ohmic distortion, a voltammetric iR_u compensation of 50 Ω—which was calculated to be the mean for the different solutions used— has been applied to our voltammetric measurements.

Each experimental potential (E_R) was determined from at least five measurements. All results were virtually identical, which testifies to the high reproducibility of the PPy/DBS modified electrode.

2.3. Results and Discussion:

2.3.1 Butler-Volmer treatment.

For the theoretical treatment we will consider the oxidation/reduction process of a PPy/DBS film using an aqueous solution of $MClO_4$ 0.1 M, where M is an alkaline cation. In this case, DBS^- anions will remain fixed inside the polymeric material making it necessary that the electrolyte ions are exchanged during the redox process. Thus, two basic redox reactions for the prevailing interchange of cations or anions, respectively, could be proposed:



In the simplest approximation and considering an equilibrium condition, the electrochemical potential for these reactions could be described by the Nernst equation:

$$E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+ DBS^-||M^+|}{|PPy^0 DBS^- \cdot M^+|} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+ DBS^-|}{|PPy^0 DBS^- \cdot M^+|} + \frac{RT}{nF} \ln |M^+| \quad (4)$$

$$E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+ DBS^- \cdot M^+ \cdot ClO_4^-|}{|PPy^0 DBS^- \cdot M^+||ClO_4^-|} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+ DBS^- \cdot M^+ \cdot ClO_4^-|}{|PPy^0 DBS^- \cdot M^+|} - \frac{RT}{nF} \ln |ClO_4^-| \quad (5)$$

These equations describe a semi-logarithmic increase in the potential with electrolyte concentration when a cationic exchange prevails, whereas a negative slope is predicted when the interchange of perchlorate anions prevails [8-12].

We consider that the Butler-Volmer formalism is more appropriate for describing kinetic processes as this one. As regards the anodic part of the general process, $R \rightleftharpoons O + ne^-$ and considering that only oxidation is occurred in this branch of the voltammogram, the Butler-Volmer equation can be expressed by [14,15]:

$$i_a = nFAk^0 \cdot C_R \cdot e^{(1-\alpha)n_s f (E_a - E^{o'})} \quad (6)$$

or:

$$E_a = E^{0'} + \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln C_R \quad (7)$$

where, i_a , E_a , $E^{0'}$, α , k^0 , n_s and C_R are the anodic current, the anodic potential, the standard potential, the transfer coefficient, the standard rate constant, the n value of the rate-determining step, and the reactive compounds concentration, respectively.

On the other hand, considering that in the cathodic part only reduction is presented, the cathodic intensity, i_c , can be expressed by:

$$i_c = nFAk^0 \cdot C_O \cdot e^{-\alpha n_s f (E - E^{0'})} \quad (8)$$

or:

$$E_c = E^{0'} - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} + \frac{1}{\alpha n_s f} \ln C_O \quad (9)$$

where, E_c , and C_O are the cathodic potential and the product compounds concentration, respectively.

Considering that solid-state phases confined on the electrode surface (such as PPy^+DBS^- and $PPy^0DBS^-M^+$) have activity values equal to the unity, the Eqs. (7) and (9) can be expressed for Scheme I by:

$$E_c = E^{0'} - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} + \frac{1}{\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad (10)$$

$$E_a = E^{0'} + \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} \quad (11)$$

Alternatively, previous studies reported changes in the mid point reversible potential, E_R , with the electrolyte concentration [4-6]. Hence, E_R could be giving by Eq. (1) or Eq. (2), which provide direct relationships between E_R and the cation or anion concentration for cationic or anionic exchange systems, respectively.

Continuing with Butler-Volmer treatment, we can obtain the E_R value taking E_c and E_a from Eqs. (10) and (11) as E_p^{red} and E_p^{ox} , respectively:

$$E_R = \frac{E_p^{red} + E_p^{ox}}{2} \approx \frac{E_c + E_a}{2} \quad (12)$$

For the Scheme I, introducing Eqs. (10) and (11) in this equation, one obtains:

$$E_R = E^{0'} + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} \right) + \frac{1}{2\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad (13)$$

For clarify, the second term can be designed by Z , and thus this equation would be transformed into:

$$E_R = E^{0'} + Z + \frac{1}{2\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad (14)$$

Comparing this expression with Eq. (1) it should be noted that they are very similar. Moreover, a direct relationship between E_R and the cation concentration is obtained experimentally, as it will be showed below for PPy/DBS polymer, and as it has been reported for different systems [4-6]. Hence, Z has to be a constant term, and this equation can thus be transformed into:

$$E_R = H + \frac{1}{2\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad (15)$$

where H is the origin ordinate constant.

On the other hand, the cathodic and anodic peak currents do not maintain similar values with the electrolyte concentration. However, a relationship between i_c and i_a has to exist to make the Z term constant with the electrolyte concentration.

With respect to the Scheme II, where anion exchange prevails, and considering again that solid-state phases confined on the electrode surface (such as $PPy^+DBS^-M^+ClO_4^-$ and $PPy^0DBS^-M^+$) have activity values equal to the unity, the Eqs. (7) and (9) can be expressed by:

$$E_c = E^{0'} - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} \quad (16)$$

$$E_a = E^{0'} + \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln |ClO_4^-| \quad (17)$$

In this case, we will use Eqs. (16) and (17) to obtain E_R :

$$E_R = E^{o'} + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} \right) - \frac{1}{2(1-\alpha)n_s f} \ln |ClO_4^-| \quad (18)$$

Note that in this equation the second term is identical to that designed by Z in Eq. (13) for the Scheme I. Again, in the same way, this term will be included inside the constant, H , resulting:

$$E_R = H - \frac{1}{2(1-\alpha)n_s f} \ln |ClO_4^-| \quad (19)$$

Furthermore, substituting f by its value and using decimal logarithm, Eqs. (15) and (19), for Scheme I and II, respectively, could be expressed by:

$$E_R = H + 2.303 \frac{RT}{2\alpha n_s F} \log |M^+| \quad (20)$$

$$E_R = H - 2.303 \frac{RT}{2(1-\alpha)n_s F} \log |ClO_4^-| \quad (21)$$

It is further worth noting that these equations are very similar to Eqs. (1) and (2) reported by Bond et al. [4,5], where the only changes are the slope and the origin ordinate constant. Thus, for cationic exchange the slope is equal to $S/2\alpha$, and for anionic movement the slope is equal to $-S/2(1-\alpha)$, while the origin ordinate is $E^{o'} + Z$. Note also that, for a system where $\alpha = 1-\alpha = 0.5$, resulting slopes are in accordance with those of Bond equations. Moreover, in systems where i_c equal, in absolute value, to i_a the origin ordinate constant in Eqs. (20) and (21) will be equal to $E^{o'}$. Hence, in system where $|i_c| = |i_a|$ and $\alpha = 1-\alpha = 0.5$ the equations obtained using the Butler-Volmer formalism will coincide exactly with those derived by Bond from the Nernst equation.

In addition, in Ref. [5] Bond et al. obtained for a TCNQ^{0/-} system a S value of 44.4 mV/dec, which is not coincident with 58.5 mV/dec, predicted by the Nernst equation at 22 °C. Knowing that during the redox process of the TCNQ^{0/-} system an interchange of cations is produced as well as Scheme I, Eq. (20) can be applied for this system. From this equation and considering $n_s=1$, a value of α equal to 0.66 could explain the 44.4 mV/dec slope value reported.

Unwin et al.[16] have studied the reaction between TCNQ and $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ at the interface between two immiscible electrolyte solutions (ITIES), and they reported a α value in the range 0.56 ± 0.04 . This value is next to 0.66, the one calculated by our method, though there is a clear difference between this system and that used by Bond.

2.3.2. PPy/DBS film as a cation sensor.

As has already been commented, equations derived from Nernst or Butler-Volmer ones, provide a direct relationship between E_R and ion concentration, although their constants and slopes are different.

We have used a PPy/DBS modified electrode immersed in aqueous solutions of sodium, potassium, and lithium perchlorate to examine the properties of this polymeric material as a voltammetric cation sensor. The redox reaction of this system is described by Scheme I, as it is deduced from the positive slope observed in Figure 2. In this case the DBS^- anions are fixed inside the polymer matrix, and they are not exchanged during the redox process, as it has been reported previously [18-20].

Thus, cyclic voltammograms of a PPy/DBS film were obtained from -1.1 V to 0.5 V in different concentrations of these electrolyte solutions (Fig. 1). A moderate scan rate ($\leq 10 \text{ mV s}^{-1}$) allowed us to maintain operational the polymeric modified electrodes operational for a long period of time (no deterioration was observed after five months of working). Moreover, the polymer was rapidly recycled (2–3 cycles sufficed to suppress any memory effect developing from contact with previous solutions).

E_R values were calculated from these voltammograms, and a linear relationship between E_R and $\log [M^+]$ was obtained for the three alkaline cations studied (Fig. 2). This result, where increasing slopes are observed, is in accordance with Eq. (1) derived from Nernst and Eq. (20) obtained from Butler-Volmer.

The slopes obtained from Fig. 2 have very similar values, ranging between 41 and 36 mV/dec. However, all of them differ of the ideal Nernstian value. Hence, we consider that it is more appropriate to use Eq. (20), which could explain these slope values. From this equation the value of the slope is defined by:

$$S' = 2.303 \frac{RT}{2\alpha n_s F} \quad (22)$$

From Figure 2 we can estimate the values of the factor $\alpha \cdot n_s$ for the $\text{PPy}^{+/0}$ couple when different cations were used: 0.82 for K^+ , 0.76 for Na^+ and 0.72 Li^+ .

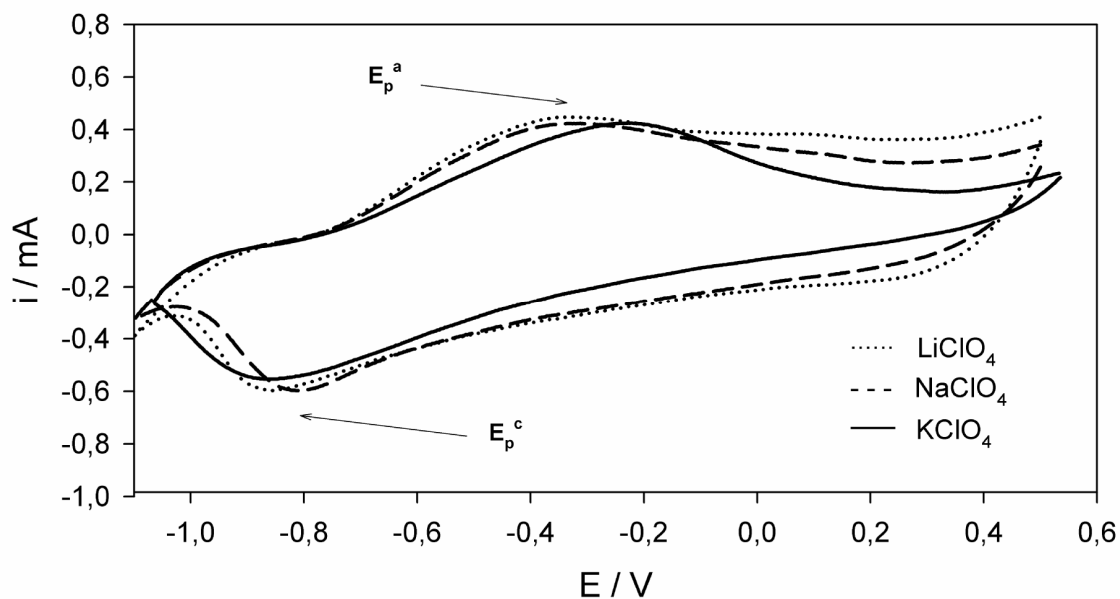


Figure 1. Voltammograms recorder for a PPy/BBS film immersed in 0.01M aqueous solutions of LiClO_4 , NaClO_4 , and KClO_4 . The voltammograms were carried out changing the potential from -1.1 V to 0.5 V. Scan rate = 10 mV s^{-1} .

As for cation identity, it is demonstrated that on identical cation concentrations in electrolyte solutions each cation led to different voltametric peak pattern and hence different reversible potential values for the $\text{PPy}^{+/0}$ couple (Figure 2). Thus, the PPy/DBS system can be deemed as a voltametric sensor analogue to a cation-selective electrode.

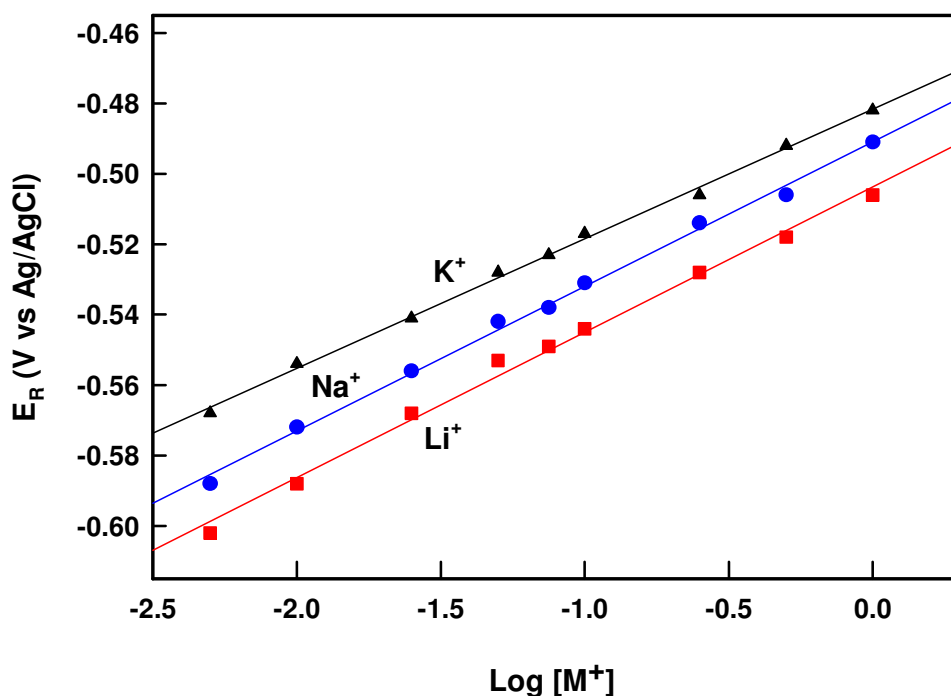


Figure 2. Calibration plots of reversible potential, E_R , versus $\log [M^+]$ for a PPy/DBS modified electrode in aqueous solutions of $M^+ClO_4^-$. Scan rate = 10 mV s^{-1} .

2.4. Conclusions.

A new method based in the Butler-Volmer theory to assess the capability of the voltametric cation and anion sensors has been proposed. Equations (20) and (21) are very similar to those proposed previously by Bond et al. derived from the Nernst relationship, Eqs. (1) and (2). Also, in a system where $|i_{cl}| = |i_{dl}|$ and $\alpha = 1 - \alpha = 0.5$ the equations obtained using the Butler-Volmer formalism will be similar to those proposed by Bond, i.e. at systems with behavior similar to Nernst to method proposed by us is still valid. Knowing that most of the redox systems studied do not fulfill the Nernst conditions, it is essential to have a method at our disposal that is based on the Butler-Volmer equation, which could be used for systems out of equilibrium.

The new method allows us to explain the slopes reported in the literature non coincident with the ideal value estimated from the Nernst equation: $2.303RT/nF$.

Moreover, from the slope value obtained experimentally a transfer coefficient can be proposed for the system studied.

At the end, PPy/DBS modified electrode has probed to fulfill equation Eq. (20), and due to its different response to the three alkaline cations analyzed, it can be deemed as a voltammetric cation sensor. The application of this new method to different polymeric cation and anion sensors is actually in progress in our laboratories.

Acknowledgements.

M.C. and R.R.-A. wish to acknowledge funding by Spain's Ministerio de Educación y Ciencia within the framework CTQ2004-01677, and confunding by FEDER. AJFR would like to thank the financial support from the Spanish government through the grant BQU2001-0477, and from the Seneca Foundation through the project PI-25/00827/FS/01.

References.

- [1] E. Bakker, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3285.
- [2] J. Bobacka, *Electroanalysis* 18 (2006) 7.
- [3] J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstam, *Electroanalysis* 15 (2003) 366.
- [4] T. J. Wooster, A. M. Bond, *Analyst*, 128 (2003) 1386
- [5] T.J. Wooster, A. M. Bond, M. J. Honeychurch, *Anal. Chem.* 75 (2003) 586.
- [6] M. Cano, B. Palenzuela, R. Rodríguez-Amaro, *Electroanalysis* 18 (2006) 1068.
- [7] K. Maksymiuk, *Electroanalysis* 18 (2006) 1537.
- [8] M.D. Levi, C. López, E. Vieil, M.A. Vorotyntsev *Electrochim. Acta* 42 (1997) 757.
- [9] X. Ren, P.G. Pickup, *J. Phys.Chem.*, 97 (1993) 5356.
- [10] C. Zhong, K. Doblhofer *Electrochim. Acta*, 35 (1990) 1971.
- [11] W. Takashima, S.S. Pandey, K. Kaneto, *Thin Solid Films*, 438-439 (2003) 339.
- [12] S. Skaarup, K. West, L.M.W.K. Gunaratne, K.P. Vidanapathirana, M.A. Careem, *Solids State Ionics* 136-137 (2000) 577.
- [13] A.J. Fernández Romero, J.J. López Cascales, T. Fernández Otero, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 907.

-
- [14] A.J. Bard, L.R. Faulkner, in: *Electrochemical Methods*, 2^o Edition, Wiley, New York, 2001. Chapter 3.
- [15] J.O. Bockris, A. K.N. Reddy, M. Gamboa-Aldeco, in: *Modern Electrochemistry 2A, Fundamentals of Electrode Processes*, 2^o Edition, Kluwer Academic, New York, 1998.
- [16] A.L. Barker, P.R. Unwin, J. Zhang, *Electrochem. Comm.* 3 (2001) 372.
- [17] Shimoda, S.; and Smela, E. *Electrochimica Acta* 44 (1998) 219-238.
- [18] M.A. De Paoli, R.C.D. Peres, S. Panero and B. Scrosati *Electrochim. Acta* 37 (1992) 1173-1182.
- [19] F.J. Guzmán Frutos, T. Fernández Otero, A.J. Fernández Romero, *Electrochim Acta* 52 (2007) 3621.

3. A new method based in the Butler-Volmer equation to evaluate Voltammetric Cation and Anion Sensors

Abstract

A new method based on the Butler-Volmer formalism is applied to assess the capability of two voltammetric ion sensors based on Polypyrrole films: PPy/DBS and PPy/CIO₄ modified electrodes were studied as voltammetric cation and anion sensors, respectively. The reversible potential versus electrolyte concentrations semi-logarithm plots provided positive calibration slopes for PPy/DBS and negative ones for PPy/CIO₄, as was expected from the proposed method and that based on the Nernst equation. The slope expressions deduced from Butler-Volmer include the electron-transfer coefficient, which allows slope values different from the ideal Nernstian value to be explained. Both polymeric films exhibited a degree of ion-selectivity when they were immersed in mixed-analyte solutions. Selectivity coefficients for the two proposed voltammetric cation and anion sensors were obtained by several experimental methods, including the Separated Solution Method (SSM) and Matched Potential Method (MPM). The K values acquired by the different methods were very close for both polymeric sensors.

Paper Accepted, on 11 September 2008, in *Journal of Physical Chemistry-B*.

3.1 Introduction.

In order to characterize ion-selective electrodes the expressions used until present have been based on the Nernst relationship¹. Bond et al.^{2,3} adapted the potentiometric equation to voltammetric ion sensors, changing the EMF for E_R and considering an activity coefficient close to unity. These authors successfully applied eq. 1 and 2 to TCNQ and TTF immobilized on electrode surfaces, respectively:

$$E_R = E^o + S \log[M_A^+] \quad [1]$$

$$E_R = E^o - S \log[X^-] \quad [2]$$

where $[M_A^+]$ and $[X^-]$ are the cation and anion concentrations, respectively, and E_R is the reversible potential, defined by

$$E_R = \frac{E_p^{red} + E_p^{ox}}{2} \quad [3]$$

E_p^{red} is the reduction peak potential and E_p^{ox} is the oxidation peak potential. These equations were also applied recently to check a TTF-TCNQ/PVC composite for use as ion selective electrode.⁴

Equations 1 and 2 demonstrate a direct relation between E_R and the logarithm of the electrolyte concentration, where S is the slope derived from the plot, which has positive or negative values for cationic or anionic movement, respectively. Ideally, S will be equal to $2.303RT/nF$.

A similar linear dependence of the potential versus the logarithm of ion activity has frequently been reported for electrochemical ion sensors based on polymeric materials. In this case, a negative slope is recorded for anion exchanging polymer and a positive slope is obtained for cationic exchanger polymeric materials. Although this linear relationship is mainly based on the Nernst equation,⁵⁻⁹ recently a treatment based on the Butler-Volmer expression has been reported to explain the direct relationship between the potential and the logarithm of the electrolyte concentration.¹⁰

Polymers, such as polypyrrole (PPy), polyaniline (PANI) or polythiophene (PTH), offer great possibilities for improving selectivity, by partly changing the chemical structure of the polymer backbone and partly due to the many possible counterions or

neutral molecules that can be trapped inside the polymer.¹⁰⁻¹³ Hence, the use of anions of different size means that polypyrrole films can be used as cationic and anionic potentiometric ion sensors.^{6,10-16}

In PPy polymers doped with small-anions it is considered that the anions are expelled during the reduction process, while they are included again inside the polymer during oxidation. However, it is normally accepted that PPy films doped with large anions, such as DBS⁻, the anions are fixed inside the polymer matrix, providing cationic transport when the polymer is subjected to a redox process.^{15, 17-19}

Recently, we introduced a new method based on the Butler-Volmer equation to assess the capability of voltammetric ion sensors.²⁰ In the present work, this method is designed to evaluate any voltammetric anion and cation sensor, and so is applied to PPy/DBS and PPy/ClO₄ modified electrodes, acting as voltammetric cation and anion sensors, respectively. We then examine whether both of these PPy modified electrodes retain their ion selectivity in mixed-ion solutions. Also, selectivity coefficients of these voltammetric sensors are calculated by different methods. In this sense, the increase in the mid-point reversible potential (ΔE_R) will be used for the first time to apply the Matched Potential Method to voltammetric ion sensors.

3.2. Experimental.

Pyrrole monomer (Fluka, >97%) was distilled under vacuum before use. Sodium dodecylbenzene sulfonate (Aldrich), LiClO₄, NaClO₄, KClO₄, NaF, NaNO₃ and NaCl (Merck) were used as received. Millipore water with resistivity of > 18 M Ω cm was used.

PPy/DBS and PPy/ClO₄ films were generated by electrochemical oxidation on Pt foil electrodes, applying a constant potential of +0.8 V vs. Ag/AgCl for 60 seconds. A 0.1M pyrrole and 0.1M DBS aqueous solution was used to generate the PPy/DBS polymers and a 0.1 M pyrrole and 0.1 M LiClO₄ solution was used to synthesise the PPy/ClO₄ films. Once the polymer film was deposited on the Pt foil, the modified electrode was taken out of the solution, washed with water, dried, and stored at 4°C.

The electrochemical polymerization and the voltammetric measurements were performed with a PAR 273A potentiostat/galvanostat. A three electrodes cell composed of Pt foil working electrode (area 1 cm²), an Ag/AgCl reference electrode, and a Pt wire as the auxiliary electrode, was used. All the solutions were purged with N₂ gas for 15 minutes.

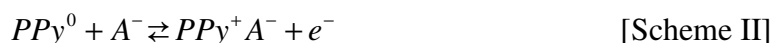
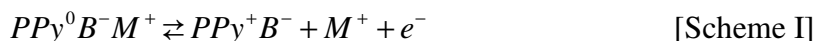
With the aim of preventing an ohmic distortion, a voltammetric iR_u compensation of 50 Ω , which was calculated as the mean for the different solutions used, was applied to the voltammetric measurements.

Each experimental potential (E_R) was determined from at least three measurements. The results were virtually identical, which testifies to the high reproducibility of the polymer modified electrodes.

3.3. Results and Discussion.

3.3.1 Butler-Volmer treatment.

Anions of different sizes can be used to dope PPy during the polymerization process, providing polymeric systems with different electrochemical properties.¹⁴⁻¹⁶ Hence, a PPy film can be used as cationic or anionic ion sensor, depending on the anion type used during polymeric synthesis. For the theoretical treatment based on the Butler-Volmer equation, we will consider the oxidation/reduction process of two polymeric systems: one cationic exchanger polymer, such as PPy/DBS, and another anionic exchanger, such as PPy/CIO₄. Thus, the basic redox reactions for the prevailing interchange of cations or anions, respectively, could be proposed as:



where B⁻ is a large anion, such as DBS⁻, used to dope the polymeric material during the synthesis, and M⁺ and A⁻ represent the small cations and anions present in the test solutions when the polymeric material is used as voltammetric sensor.

Therefore, during the reduction of a polymer as PPy/DBS, DBS⁻ anions will remain fixed inside the polymer, making it necessary for the electrolyte cations to enter. These cations will be expelled to the solution during the subsequent oxidation [Scheme I]. However, when a polymer such as PPy/ClO₄ is reduced, ClO₄⁻ anions are expelled from the film, and during the subsequent oxidation small anions will again enter the polymer from the solution.

In the simplest approximation and considering an equilibrium condition, the electrochemical potential for these reactions could be described by the Nernst equation as, respectively:

$$E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+B^-||M^+|}{|PPy^0B^- \cdot M^+|} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+B^-|}{|PPy^0B^- \cdot M^+|} + \frac{RT}{nF} \ln |M^+| \quad [4]$$

$$E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+A^-|}{|PPy^0||A^-|} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{|PPy^+A^-|}{|PPy^0|} - \frac{RT}{nF} \ln |A^-| \quad [5]$$

These equations describe the evolution of the redox potential as a function of the electrolyte concentrations, in accordance with eqs 1 and 2. If cationic exchange prevails, the redox potential vs. electrolyte concentration plots will show a semi-logarithmic increase in the potential with electrolyte concentration (eq 4). On the contrary, a negative slope is predicted (eq 5) when the interchange of small anions prevails.^{5-7,10,19-22}

Previously, different research groups have used the Butler-Volmer treatment to study the kinetic of the charge transport of diverse polymeric films.^{10,20,23-27} We consider that the Butler-Volmer formalism is more appropriate for describing kinetic processes such as those described by Schemes I and II.^{10,20} As regards the anodic part of the general process, $R \rightleftharpoons O + ne^-$ and, considering that only oxidation occurs in this branch of the voltammogram, the Butler-Volmer equation for Scheme I can be expressed by:^{10,20,28,29}

$$E_a = E^{o'} + \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln |PPy^0B^- \cdot M^+| \quad [6]$$

where, i_a , E_a , E^0 , α , k^0 and n_s are the anodic current, the anodic potential, the standard potential, the transfer coefficient, the standard rate constant and the n value of the rate-determining step, respectively. Also, $|PPy^0B^- \cdot M^+|$ is the reactive compound concentration, C_R .

Moreover, considering that in the cathodic part of Scheme I, only reduction is presented, the cathodic potential, E_c , can be expressed by:

$$E_c = E^0 - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} + \frac{1}{\alpha n_s f} \ln |PPy^+B^-| + \frac{1}{\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad [7]$$

where, i_c is the cathodic current, while $|PPy^+B^-|$ and $|M^+|$ are the concentrations of the product compounds, C_O .

In this case, considering that solid-state phases confined on the electrode surface, such as PPy^+B^- and $PPy^0B^-M^+$, have activity values equal to unity, eqs 6 and 7 can be transformed into:

$$E_a = E^0 + \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} \quad [8]$$

$$E_c = E^0 - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} + \frac{1}{\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad [9]$$

At this point, based on the definition of E_R , eq 3, and substituting E_p^{red} and E_p^{ox} by E_c and E_a from eq 8 and 9, respectively, we can express E_R for Scheme I as:

$$E_R = E^0 + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} \right) + \frac{1}{2\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad [10]$$

For clarity, the second term can be designated Z , and thus this equation would be transformed into:

$$E_R = E^0 + Z + \frac{1}{2\alpha n_s f} \ln |M^+| \quad [11]$$

Comparing this expression with eq 1, it should be noted that they are very similar. Moreover, a direct relationship between E_R and the cation concentration is obtained

experimentally, as will be presented below. Hence, Z has to be a constant term, and thus, this equation can be transformed into:

$$E_R = H + \frac{1}{2\alpha n_s f} \ln|M^+| \quad [12]$$

where H is the origin coordinate constant.

With respect to Scheme II, where anion exchange prevails, eqs 6 and 7 can be expressed by:

$$E_c = E^0 - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} + \frac{1}{\alpha n_s f} \ln|PPy^+ \cdot A^-| \quad [13]$$

$$E_a = E^0 + \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln|PPy^0| - \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln|A^-| \quad [14]$$

Once again, considering that solid-state phases confined on the electrode surface, such as PPy^+A^- and PPy^0 , have activity values equal to unity, eqs 13 and 14 can be transformed into the form:

$$E_c = E^0 - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} \quad [15]$$

$$E_a = E^0 + \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln|A^-| \quad [16]$$

Proceeding in a similar manner to the way in which eq 10 was deduced; we can obtain E_R for scheme II by using eqs 15 and 16:

$$E_R = E^0 + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{(1-\alpha)n_s f} \ln \frac{i_a}{nFAk^0} - \frac{1}{\alpha n_s f} \ln \frac{i_c}{nFAk^0} \right) - \frac{1}{2(1-\alpha)n_s f} \ln|A^-| \quad [17]$$

Note that in this equation the second term is identical to that obtained for Scheme I in eq 10. Hence, this term will again be designated Z and, in the same way to the previous case, it could be considered as a constant, giving:

$$E_R = E^0 + Z - \frac{1}{2(1-\alpha)n_s f} \ln|A^-| \rightarrow E_R = H - \frac{1}{2(1-\alpha)n_s f} \ln|A^-| \quad [18]$$

In figure 4, the cathodic and anodic peak currents maintain similar values with the electrolyte concentration. This fact is in accordance with a constant value of Z .

However, it is possible that i_c and i_a have different values for each electrolyte concentration (see figure 1). In this case, $|i_c|$ and $|i_a|$ increase uniform and continuously with the concentration. Thus, a relationship between i_c and i_a has to exist to make the Z term constant with the electrolyte concentration.

Furthermore, substituting f by its value and using decimal logarithm, eqs 12 and 18, for Scheme I and II, respectively could be expressed by:

$$E_R = H + 2.303 \frac{RT}{2\alpha n_s F} \log |M^+| \quad [19]$$

$$E_R = H - 2.303 \frac{RT}{2(1-\alpha)n_s F} \log |A^-| \quad [20]$$

Comparing these equations with eqs 1 and 2 reported by Bond et al.^{2,3}, the only changes are the slope and the origin ordinate constant. Thus, for cationic exchange, the slope is equal to $S/2\alpha$, and for anionic movement the slope is equal to $-S/2(1-\alpha)$, while the origin ordinate is H (equal to $E^\circ + Z$). Note that, for a system where $\alpha = 1-\alpha = 0.5$, the resulting slopes are in accordance with those of Bond equations. Moreover, in systems where i_c is equal, in absolute value, to i_a the origin ordinate constant in eqs 19 and 20 will be equal to E° . Hence, in systems where $|i_c| = |i_a|$ and $\alpha = 1-\alpha = 0.5$ the equations obtained using the Butler-Volmer formalism will be similar to those proposed by Bond. Thus, for systems with behaviors close to Nernst, the method proposed by us is still valid.²⁰

3.3.2. Assessment of the capability of Polymer films as voltammetric ion sensors.

As mentioned above, the basis of calibration of the proposed voltammetric cation sensor is a plot of the reversible potential (E_R) versus electrolyte concentrations. Equations derived from Nernst or Butler-Volmer provide a linear relationship between E_R and the logarithm of the ion concentration. Thus, eqs 1 and 19 predict a positive slope and eqs 2 and 20 propose a negative slope, for cationic and anionic sensors, respectively.

In this section, we will use the Butler-Volmer treatment to assess the capability of a PPy/DBS film as a voltammetric cation sensor and a PPy/ClO₄ polymer as a voltammetric anion sensor.

3.3.2.1 Polypyrrole film working as voltammetric cation sensor.

Firstly, we assess the capability of a PPy/DBS modified electrode as a voltammetric cation sensor using the Butler-Volmer based method. Cyclic voltammograms of PPy/DBS films deposited on Pt electrode were obtained at several concentrations of sodium, potassium, and lithium perchlorate aqueous solutions. The potential was cycled between -1.0 V and 0.5 V at a moderate scan rate ($\leq 30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), which allowed us the modified electrode to be kept operational for a long period of time. Figure 1 shows the voltammograms registered at $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ for a PPy/DBS film immersed in different concentrations of LiClO₄. As can be seen, the cathodic and the anodic peaks changed with increases in the electrolyte concentration.

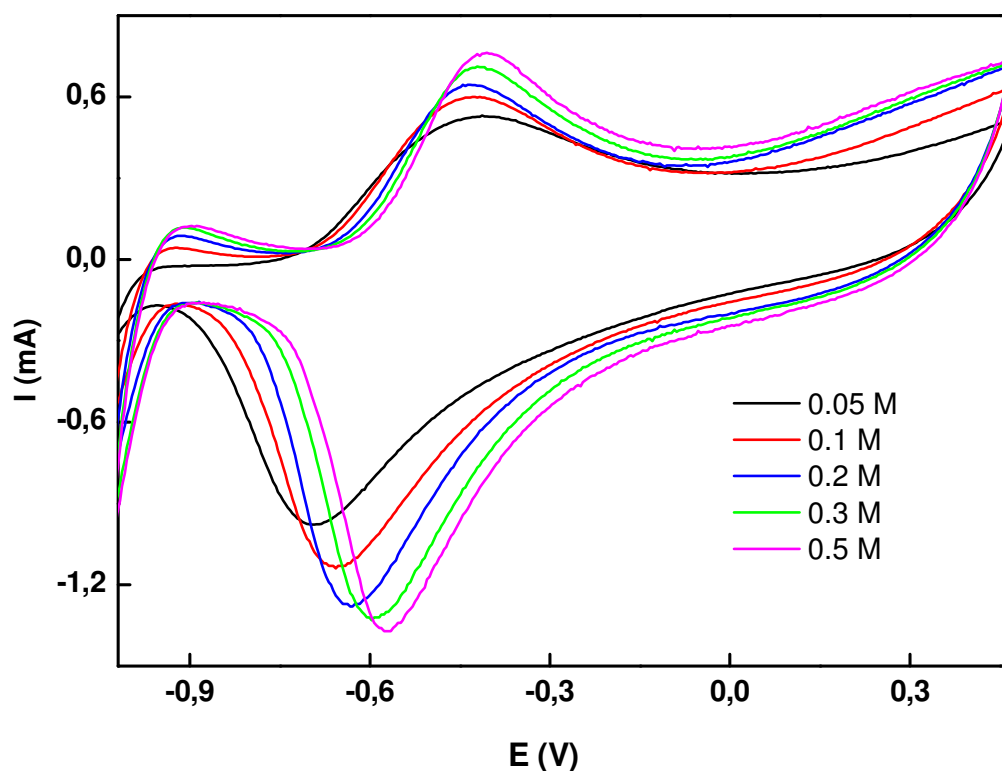


Figure 1. Voltammograms of a PPy/DBS modified electrode in diverse concentrations of LiClO₄ aqueous solutions. Figure indicates the LiClO₄ concentrations.

By using the corresponding cathodic and anodic peak potentials obtained in eq 3, the E_R values could be calculated for each electrolyte concentration, and hence the E_R vs. $\log [\text{LiClO}_4]$ plot was generated (Figure 2). This plot shows a positive slope for the PPy/DBS polymeric film cycled in different concentrations of LiClO_4 solutions, in accordance with eqs 1 and 19 derived from Nernst and Butler-Volmer, respectively, for cation exchanger systems.

Thus, a positive slope confirms that the redox reaction of this system is described by Scheme I. In this case, the DBS^- anions are fixed inside the polymer matrix, and are not exchanged during the redox process. This behavior means that the cations must penetrate the polymer from the solution during the cathodic branch, and they will be expelled to the solution during the subsequent anodic semicycle, as has been reported previously.¹⁷⁻¹⁹

In the same way, we also registered the voltammograms for PPy/DBS films in different concentration solutions of KClO_4 and NaClO_4 . A similar shift of the peak potentials with the electrolyte concentration resulted, again providing positive slopes in E_R vs. $\log [M^+]$ plots for these electrolytes (Figure 2). Although these slopes have very similar values for different electrolytes, all of them clearly differ from the ideal Nernstian value: $2.303RT/nF$ ($58.1 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ for $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Table 1: Voltammetric parameters for the PPy^{+0} process obtained by immersing a PPy/DBS modified electrode in $0.1 \text{ M } M^+\text{ClO}_4^-$ aqueous solutions. Scan rate: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. S values were obtained from Fig. 2.

	Potassium	Sodium	Lithium
E_p^{ox} (mV)	-442	-437	-451
E_p^{red} (mV)	-592	-625	-637
E_R (mV)	-512 ± 8	-531 ± 7	-544 ± 6
S ($\text{mV}\cdot\text{dec}^{-1}$)	36	39	41

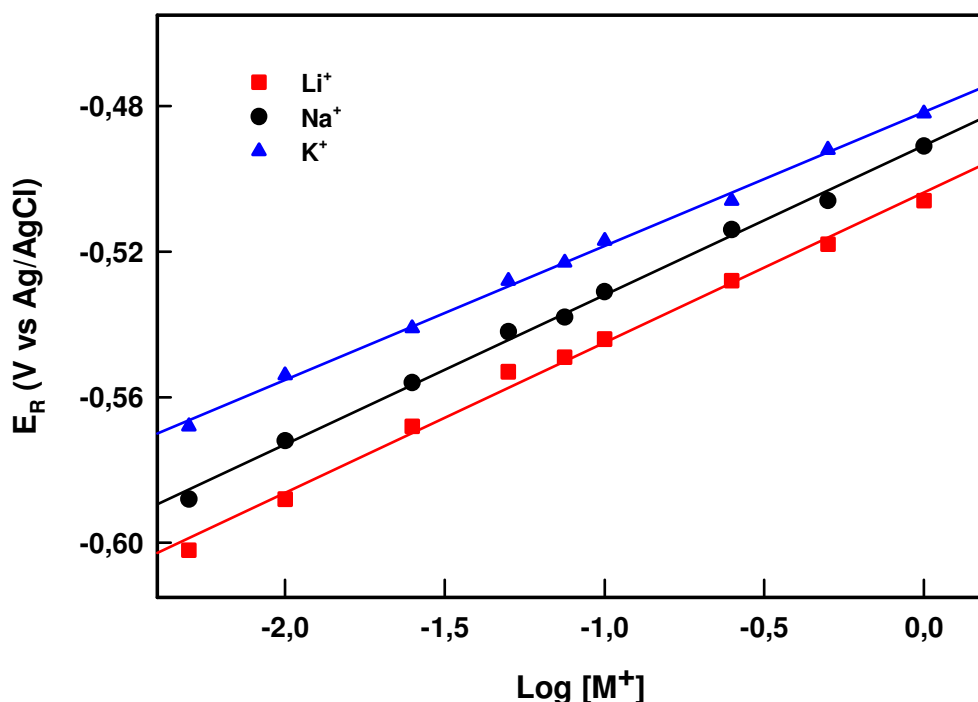


Figure 2. Calibration plots of reversible potential, E_R , versus $\log [M^+]$ for a PPy/DBS modified electrode in aqueous solutions of $M^+\text{ClO}_4^-$. E_R values were obtained including the peak potentials obtained from the voltammograms in eq 3.

The Bond method based on the Nernst equation can not explain the values of these slopes values, which differ from the ideal one. Hence, we consider it is more appropriate to apply eq 19, deduced from the Butler-Volmer equation. This equation defines the slope value as:

$$S' = 2.303 \frac{RT}{2\alpha n_s F} \quad [21]$$

By including the slope values obtained from Figure 2 in this expression, we can estimate the values of the factor $\alpha \cdot n_s$ for the $\text{PPy}^{+/0}$ couple for different cations: 0.82 for K^+ , 0.76 for Na^+ , and 0.72 for Li^+ . Note that the presence of the electron-transfer coefficient in the slope equation allows slope values different from the ideal Nernst value to be explained.²⁰ Note also that when $\alpha = 0.5$ eq 21 coincides exactly with the ideal Nernst slope.

On the other hand, although the slopes values are very similar for all cations, a vertical shift was observed, indicating that the origin constant is different for each

cation. Bond et al.² explained a similar shift as being due to a change of the formal potential value, although if we use eq 19 derived from Butler-Volmer this explanation is not clear: the standard potential could be similar for the three electrolytes used but only if change the Z constant value.

With regard to cation identity, from Figure 2 and Table 1, it can be demonstrated that for identical cation concentrations in electrolyte solutions, each cation led to a different voltametric peak pattern and hence different reversible potential values for the PPy⁺⁰ couple. Thus, the PPy/DBS system can be deemed as a voltametric sensor analogous to a cation-selective electrode.

Finally, with the aim of corroborating that the Butler-Volmer formalism could be applied to these polymeric systems, an additional figure has been included. Figure 3 shows the cathodic and anodic peak potentials derived from Figure 1 vs. log [Li⁺]. As can be seen, the variation of the cathodic peak potential increases linearly with the logarithm of the electrolyte concentration. However, the anodic peak potential maintains a quasi constant value with the log [Li⁺]. These results are in agreement with eqs 9 and 8, respectively; confirming that the Butler-Volmer based method is truly applicable to these polymeric systems.

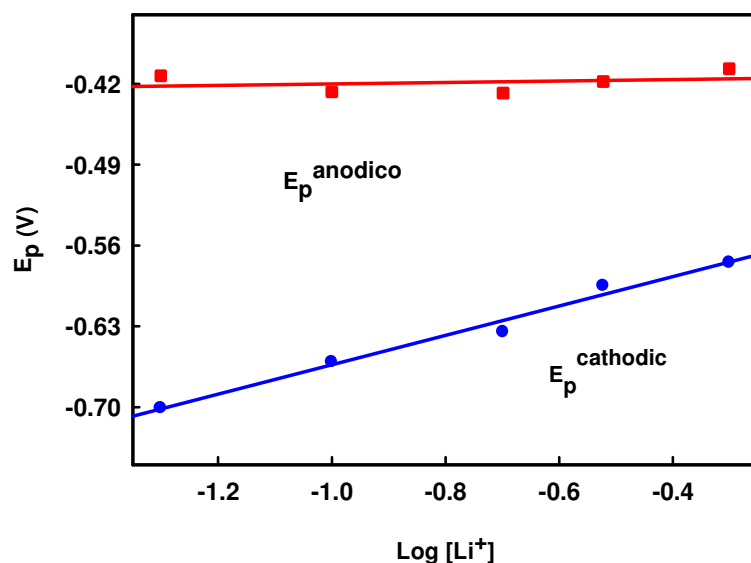


Figure 3. Variation of the cathodic and anodic peak potentials with the log[Li⁺] for a PPy/DBS modified electrode cycled in LiClO₄ aqueous solutions.

3.3.2.2 Polypyrrole film as a voltammetric anion sensor.

In the same way as we have used a PPy/DBS modified electrode as a cation sensor, another polypyrrole film will be evaluated in this section as an anion sensor. In this case, we synthesized a PPy film doped with a small anion: ClO_4^- . The redox reaction of this system is described by Scheme II, which postulates anion interchange during the reduction/oxidation process.

To evaluate this polymeric material as voltammetric anion sensor, we have cycled a PPy/ ClO_4 film in four sodium salts of different anions: fluoride, chloride, nitrate and perchlorate. Cyclic voltammograms of the polymeric modified electrode were obtained in different concentrations of the electrolyte solutions. As for application to cations sensor, a moderate scan rate ($\leq 30 \text{ mV s}^{-1}$) allowed the polymeric modified electrodes to be kept operational for a long period of time and also permitted one polymeric film to be immersed in different electrolyte solutions.

Figure 4 displays the cyclic voltammograms of a PPy/ ClO_4 film registered in different concentrations of NaCl. As before, the use of the peaks potentials values from these voltammograms, allows us to obtain the E_R values for each NaCl concentration. Hence, the E_R vs. $\log [\text{Cl}^-]$ plot is generated and a linear relationship with negative slope resulted (Figure 5).

Proceeding in the same way as with the other electrolyte salts, we observed negative slopes for all of them (Figure 5), in accordance with eq 2, derived from Nernst and eq 20 obtained from Butler-Volmer.

The slopes obtained from Figure 5 have values ranging between $-56 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ for NaClO_4 and $-76 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ for NaF (Table 2). Although the slope obtained for NaClO_4 is close to the ideal Nerstian value, the other three slope values differ notably from this ideal value. Hence, we again consider that it is more appropriate to use the Butler-Volmer based treatment, eq 20, which can explain these values. From this equation, the value of the slope for an anion sensor is defined by:

$$S'' = 2.303 \frac{RT}{2(1-\alpha)n_s F} \quad [22]$$

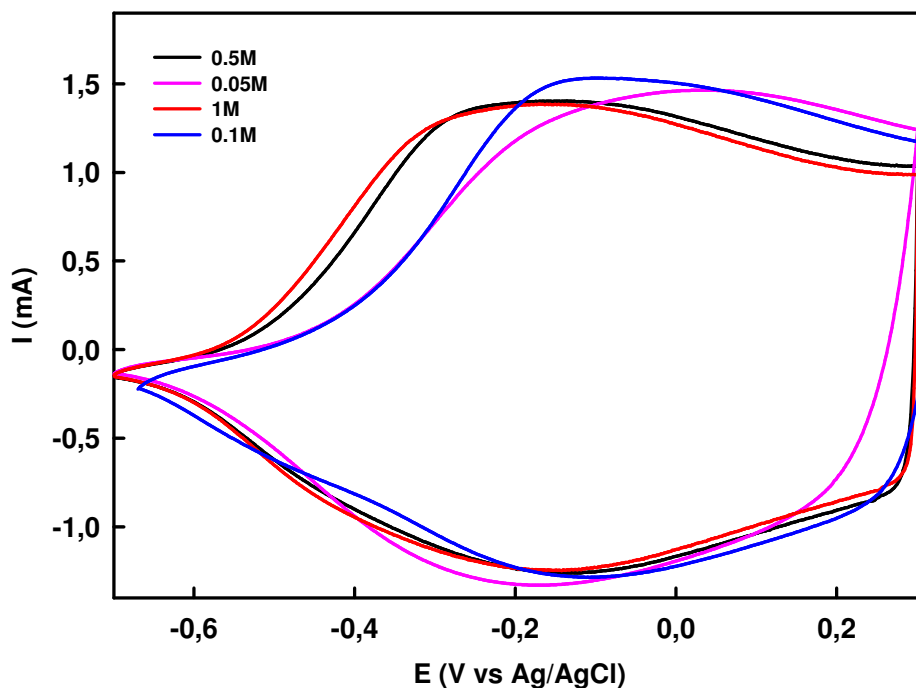


Figure 4. Voltammograms of a PPy/ClO₄ modified electrode in diverse concentrations of NaCl aqueous solutions. Figure indicates the NaCl concentrations.

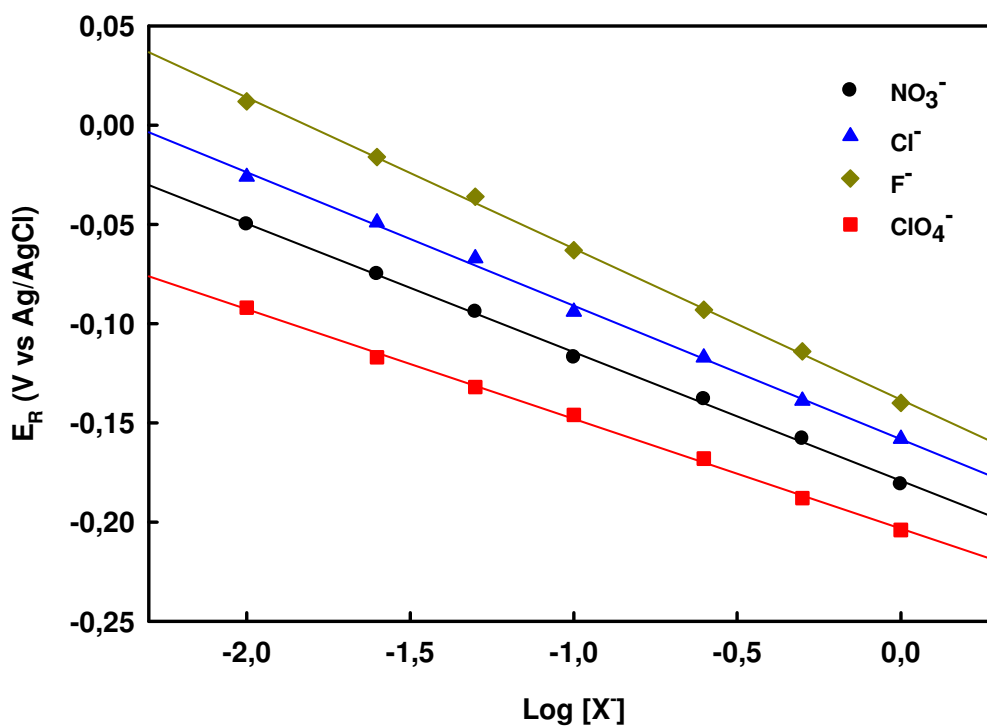


Figure 5. Calibration plots of reversible potential, E_R , versus $\log [X^-]$ for a PPy/ClO₄ modified electrode in aqueous solutions of Na⁺X⁻. E_R calculated using eq 3.

Table 2: Voltammetric parameters for the $\text{PPy}^{+/0}$ redox process obtained for PPy/ClO_4 films immersing in 0.1 M Na^+X^- aqueous solutions. Scan rate: $30 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. S values were obtained from Fig. 4.

	Perchlorate	Nitrate	Chloride	Fluoride
E_p^{ox} (mV)	-113	-32	-92	-16
E_p^{red} (mV)	-179	-202	-96	-110
E_R (mV)	-146 ± 4	-117 ± 5	-94 ± 4	-63 ± 2
S ($\text{mV}\cdot\text{dec.}^{-1}$)	-56	-64	-67	-76

Note that where $(1-\alpha)$ is equal to 0.5, the slope value obtained from the Butler-Volmer treatment coincides with the slope obtained from Nernst. Accordingly, the Butler-Volmer treatment can be used for a Nerstian system and for a system out of equilibrium.

Using the slope values obtained from Figure 5, eq 22 allows us estimate the values of factor $(1-\alpha)\cdot n_s$ for the $\text{PPy}^{+/0}$ couple when different anions are used: 0.39 for F^- , 0.44 for Cl^- , 0.46 for NO_3^- and 0.53 for ClO_4^- .

With respect to anion identity, it is demonstrated that for identical anion concentrations in electrolyte solutions, each anion leads to a different voltammetric peak pattern and hence different reversible potential values for the $\text{PPy}^{+/0}$ couple (Figure 5). Thus, the PPy system can be deemed as a voltammetric sensor analogous to an anion-selective electrode.

The applicability of the Butler-Volmer formalism to these PPy/ClO_4 polymeric systems can be demonstrated in a similar way as it was carried out previously in Figure 3 for a PPy/DBS system. Eqs 15 and 16 predict, respectively, that the cathodic peak maintains a constant value and the anodic peak decreases linearly with the $\log [X^-]$. These predictions are in accordance with the shift of the peak potentials observed in figure 4.

At this point, we would like to outline the different behaviour observed for PPy/DBS and PPy/ClO_4 in Figure 1 and 4, respectively. For PPy/ClO_4 , the anodic peak is shifted to a more negative potential as the electrolyte concentration increases, while

the cathodic peak remains approximately at the same potential for different NaCl concentrations. However, in Figure 1, where a PPy/DBS film was cycled, the cathodic peak shifted to more positive values, while the anodic peak maintained a quasi-constant value for the different electrolyte concentrations (Figure 3). This behaviour could be explained by eqs 8 and 9 for the PPy/DBS system and eqs 15 and 16 for a PPy/CIO₄ of the method presented in this paper. However, an alternative explanation was used previously in the literature to interpret a similar shift of the peak potentials.^{6,10}

Thus, it has been reported that the voltammetric peaks corresponding to the insertion of mobile ions are more sensitive to the scan rate, leading to a shift of the peak potential.^{6,10} Thus, Ren et al⁶ affirmed that insertion of the mobile ionic species from the solution into the polymer is associated with a larger ohmic potential drop than its expulsion. These authors considered that at the beginning of the part of the potential cycle involving insertion, the ionic resistance of the film is at its maximum value.

Hence, the shift of the cathodic peak for PPy/DBS and the anodic peak in the case of PPy/CIO₄ with the electrolyte concentration may be explained by the above evidence. PPy/DBS is a cationic exchanger system and so the cations take up the polymer during the reduction and they are expelled to the solution during the oxidation. Thus, inclusion of the cations occurs during the reduction process and a shift of the cathodic peak potential is observed with the electrolyte concentration. Contrarily, during oxidation, the cations are expelled from the polymer and so the peak potential presents a similar value for all electrolyte concentrations studied.

In the same way, PPy/CIO₄ is an anionic exchanger system and, in this case, the anions enter the polymer during the anodic branch and they are expelled during the cathodic one. Once again, in Figure 4 the anodic peak, where anion inclusion occurs, shifts with the electrolyte concentration and the cathodic peak, where the anion is expelled, maintains its potential value invariable with the electrolyte concentration.

Furthermore, note that in refs 6 and 10 the peak shifted due to ion inclusion inside the polymer when the scan rate was varied. However, we observed a similar shift related with ion inclusion when the electrolyte concentration was changed. Hence, it can be established that the electrolyte concentration will affect the ionic resistance of the film in similar terms as the scan rate. Thus, for a PPy/DBS system an increasing electrolyte

concentration produces a shift of the cathodic peak to a more positive potential, indicating that a lower overpotential is necessary to reduce the polymer. This behaviour can be explained as a diminution of the ionic resistance of the polymer with the electrolyte concentration, facilitating inclusion of the cation in the polymeric matrix.

In the same way, the shift of the anodic peak to a more negative potential for PPy/ClO₄ film when the electrolyte concentration increased indicates that a lower overpotential has to be applied to oxidize the polymeric material, facilitating anionic inclusion from the solution. Once again, this behaviour is explained by a decrease in the ionic resistance of the film as the electrolyte concentration increases.

3.3.3. Detectors responses to multianalyte solutions

The aim of this section is to check whether the PPy films used in the previous sections would retain their cation or anion selectivity in mixed-cation or mixed-anion solutions, respectively.

Firstly, we exam the PPy/DBS modified electrode in solutions where two different cations have been mixed. Bond et al.^{2,3} used an adaptation of the Nicolsky-Eisenman (N-E) type equation for voltammetric sensors:

$$E_R = x + S \log([A] + K_{A,B} [B]) \quad [23]$$

where E_R is the mid-point reversible potential, x and S are the origin ordinate and the slope of the calibration plot for the main ion (A), B denotes the “competing” or interfering cation, and K is the ion selectivity coefficient, which represents the preference of the sensor for the main ion or the interfering one.

In the literature it has been established that the N-E equation assumes a Nerstian response for the main and the interfering ions.^{30,31} However, based on the Butler-Volmer treatment proposed in this work, an equation similar to N-E equations can be deduced, but in this case the S value is defined by eq 21. Hence, this S value may coincide or not with the ideal Nersntian slope, as was commented in previous sections, and this fact makes it possible to use the N-E equation for non Nerstian systems, which, however, follows a Butler-Volmer behaviour.

With respect to the estimation of the ion selectivity coefficients of a voltammetric sensor, the empirical Separate Solution Method (SSM), based on the following equation, can be used:

$$-\log K_{A,B} = \frac{E_{RA} - E_{RB}}{S} \quad [24]$$

where S is the average gradient of the calibration plots for each ion. As mentioned above, the S values can be deduced for each ion by our method based on the Butler-Volmer treatment. Thus, we can assume the use of S values differing from ideal Nerstian value.

Using the data included in Table 1 we obtained the following sequence of K values:

$$K_{Li,K} = 4.73 > K_{Na,K} = 2.24 > K_{Li,Na} = 2.11$$

This result leads to the following cation selectivity sequence: $K^+ > Na^+ > Li^+$, which is in accordance with the shift of the calibration lines to more negative values (Table 1 and Figure 2).

Furthermore, in order to confirm that the using of the N-E equation is appropriate to our system, the experimental values of the E_R obtained by using mixed-cation solutions in variable cation ratios were compared with those predicted by the N-E expression. Ten mixed-ion ratios, ranging from 0.1 M of A and 0 M of B to 0 M of A and 0.1M of B, maintaining a constant ionic strength, were used. Figure 6.a shows the results for $Li^+ : K^+$ mixtures. Circles correspond to experimental data and the solid line to the best fit obtained with equation 23. Consistency between the experimental and predicted data was especially good at $x = -503$ mV, $S = 41$ mV·dec⁻¹ and $K_{Li,K} = 4.80$.

In the same way, Figure 6.b depicts the results for selected $Li^+ : Na^+$ mixtures. Again, the experimental data and the best fit were highly consistent at $x = -505$ mV, $S = 40$ mV·dec⁻¹ and $K_{Li,Na} = 2.20$.

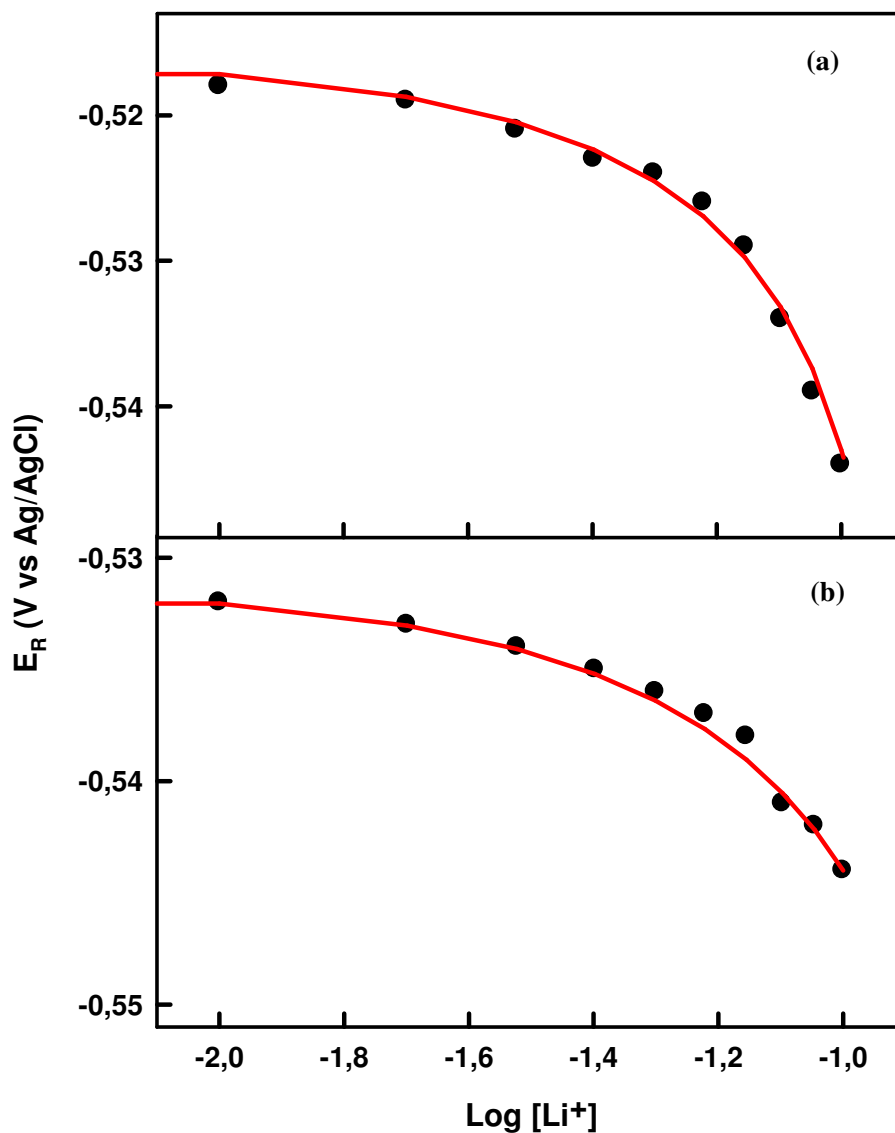


Figure 6. Reversible potential for the PPy^{+0} couple as obtained by immersing a PPy/DBS electrode in mixed-cation solutions containing variable Li^+/K^+ ratios (a) and containing variable Li^+/Na^+ ratios (b) and a constant total cation concentration of 0.1 M. Symbols correspond to experimental data and the solid line to data obtained from eq 23 (see text for further details).

Although the $K_{\text{Li,K}}$ and $K_{\text{Li,Na}}$ values obtained suggest perturbations (competitive selectivity) from the interfering ion in the determination of the main ion, the proposed electrode provides an acceptable response to these types of mixtures. Also, the K values obtained for the cation-mixture measurements are similar to those provided by eq 24, which confirms the accuracy of the separate solution method approximation.

In 1995 the Matched Potential Method (MPM) was recommended by IUPAC^{30,32} as the most appropriate for determining K values, due to it is totally independent of the N-E equation or any of its modifications. This recommendation was based on the affirmation that the N-E equation assumes a Nerstian response for the primary and the interfering ions. However, based on the method proposed by us, in our opinion this affirmation is not totally correct; because we have demonstrated that the N-E equation is also valid for systems obeying the Butler-Volmer theory.

Furthermore, Umezawa et al.^{30,31} affirmed that the K values obtained by MPM for cases in which both primary and interfering ions have the same charge and respond in a Nerstian manner should agree well with those obtained by methods based on the N-E equation. In this sense, we considered that two systems obeying the Butler-Volmer equation should produce similar values of K as those obtained by SSM and MPM. Therefore, we have obtained the K values using the MPM to compare them with those resulting from the N-E based method.

The MPM, proposed by Gadzepko and Chirstian³³ in 1984, defines K as an activity ratio of primary and interfering ions giving the same potential changes under identical conditions. At first, a known activity (a_A') of the primary ion solution is added to a reference solution that contains a fixed activity (a_A) of primary ions, and the corresponding reversible potential change (ΔE_R) is recorded. Next, a solution of an interfering ion, whose activity is a_B , is added to the reference solution until the same reversible potential change (ΔE_R) is reached:

$$K_{A,B} = \frac{a_A' - a_A}{a_B} \quad [25]$$

It should be noted that this equation is here adapted for the first time to be applied in voltammetric ion sensors. With this aim, we use the activity values where the same reversible potential change (ΔE_R) is observed, instead of the potential increment (ΔE) used in potentiometric sensors.

We obtained $K_{Li,K} = 5.18$ and $K_{Li,Na} = 2.38$ (each value was the average from 9 K values obtained from 9 different ΔE_R), values that are very close to those obtained by the N-E based methods. Hence, we can confirm that for cases in which both primary

and interfering ions have the same charge and respond in a Nernstian or Butler-Volmer manner, both of methods provide similar results.

In the same way, we examined the selectivity of a PPy/ClO₄ film in solutions where two different anions have been mixed. Once again, the ion selectivity coefficients, *K*, for this voltammetric anion sensor were calculated using the empirical SSM, based on eq 24. The experimental data included in Table 2 were taken to obtain the following sequence of *K* values:

$$K_{F,ClO_4} = 15.3 > K_{F,NO_3} = 5.9 > K_{F,Cl} = 2.76 > K_{Cl,NO_3} = 2.13$$

These *K* values lead to the following selectivity sequence: ClO₄⁻ > NO₃⁻ > Cl⁻ > F⁻, which is in accordance with the positive shift of the PPy reversible potential obtained changing the anion included in the electrolyte solution (see Table 2 and Figure 5).

Furthermore, in order to confirm that the using the N-E is appropriate to our system, the experimental values of the *E_R* obtained by using mixed-cation solutions in variable cation ratios were compared with those predicted by N-E expression. Several mixed-ion ratios, ranging from 0.1M of A and 0M of B to 0M of A and 0.1M of B, maintaining a constant ionic strength, were used. Figure 7 shows the results for selected F⁻:Cl⁻ (a) and F⁻:NO₃⁻ (b) mixtures. Circles correspond to experimental data and the solid lines are the best fits of eq 23. The two were highly consistent at *x* = -120 mV, *S* = -56 mV·dec⁻¹ and *K_{F,Cl}* = 2.76 for F⁻:Cl⁻ mixtures and at *x* = -116 mV, *S* = -56 mV·dec⁻¹ and *K_{F,NO₃}* = 5.4 for F⁻:NO₃⁻ mixtures.

Also, the matched potential method (MPM) was used to obtain the anion selectivities coefficients, resulting *K_{F,Cl}* = 2.52 and *K_{F,NO₃}* = 3.54. Although the *K_{F,NO₃}* value is lower, the *K_{F,Cl}* value is close to that obtained by N-E methods.

Again, although the *K_{F,Cl}* and *K_{F,NO₃}* values obtained suggest competitive selectivity from the interfering ion in the determination of the main ion, the proposed electrode provides an acceptable response to these types of mixtures.

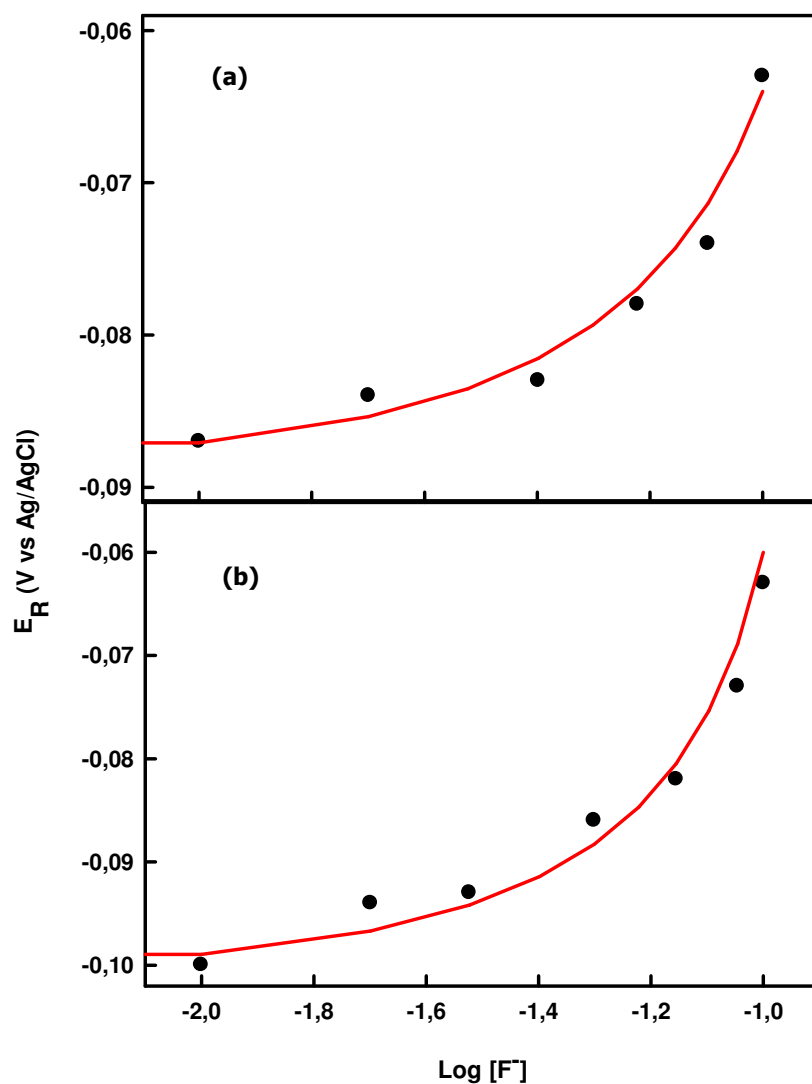


Figure 7. Reversible potential for the $\text{PPy}^{+/0}$ couple as obtained by immersing a PPy/ClO_4 electrode in mixed-anion solutions containing variable F/Cl^- ratios (a) and containing variable F/NO_3^- ratios (b) and a constant total anion concentration of 0.1 M. Symbols correspond to experimental data and the solid line to data obtained from eq 23 (see text for further details).

3.4. Conclusions.

In this work we have demonstrated that the new method proposed based on Butler-Volmer formalism can be successfully applied to assess the capability of the voltammetric ion sensors. Two polypyrrole films, PPy/DBS and PPy/ClO_4 , modified electrodes were tested as voltammetric cation and anion sensors, respectively. Both polymeric films produced slope values in the semi-logarithm plots that differed from

ideal Nerstian values, which could be explained by the inclusion of the electron-transfer coefficient in the equations deduced from Butler-Volmer. Tentative values of electron-transfer coefficients for the different polymeric materials and electrolytes are presented.

Moreover, this new theoretical treatment allows us to include the slope values deduced by the new method in the Nicolsky-Eisenman equation for the determination of the selectivity coefficients (K) for systems which respond with a Butler-Volmer, and those obeying the Nerstian equation.

The results show that PPy/DBS and PPy/CIO₄ systems can be deemed as voltammetric ion sensors analogous to cation and anion-selective electrodes, respectively, and that they exhibit a degree of ion-selectivity when immersed in mixed-analyte solutions. Selectivity coefficients for the two proposed sensors were obtained by several experimental methods, including SSM and MPM. The latter is applied for the first time to the voltammetric ion sensors, changing the ΔE by ΔE_R . The K values acquired by the different methods were very close.

The acceptable degree of selectivity obtained suggests that these electrodes may be useful for applying in real systems, although a previous pre-concentration step may sometimes be necessary. Therefore, the proposed sensors represent, to our minds, a step forward in the development of new voltammetric lithium (or others cations) or fluoride (or other anions) detectors, providing an acceptable compromise between reliability and ease of preparation and use.

Acknowledgements.

MC and RR-A wish to acknowledge funding by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia within the framework CTQ2004-01677, CTQ2007-60387 and cofunding by FEDER. AJFR would like to thank the financial support from the Spanish government, and from the Seneca Foundation.

3.5. References.

1. Ammann D. In *Ion-selective microelectrodes. Principles, design and application*; Springer, Berlin Heidelberg, New York, 1986.
2. Wooster, T. J.; Bond, A. M. *Analyst*. 128 (2003) 1386.
3. Wooster, T. J.; Bond, A. M.; Honeychurch, M. J. *Anal. Chemistry*. 75 (2003) 586.
4. Cano, M.; Palenzuela, B.; Rodriguez-Amaro, R. *Electroanalysis*. 18 (2006) 1068.
5. Levi, M. D.; Lopez, C.; Vieil, E.; Vorotyntsev, M. A. *Electrochim. Acta*. 42 (1997) 757.
6. Ren, X. M.; Pickup, P. G. *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 5356.
7. Zhong, C. J.; Doblhofer, K. *Electrochim. Acta*. 35 (1990) 1971.
8. Takashima, W.; Pandey, S. S.; Kaneto, K. *Thin Solid Films*. 438 (2003) 339.
9. Skaarup, S.; West, K.; Gunaratne, L.M.W.K.; Vidanapathirana, K.P.; Careem, M.A. *Solids State Ionics* 577 (2000) 136.
10. Fernandez Romero, A. J.; Lopez Cascales, J. J.; Fernandez Otero, T. *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 907.
11. Bobacka, J. *Electroanalysis* 18 (2006) 7.
12. Bobacka, J.; Ivaska, A.; Lewenstam, A. *Electroanalysis* 15 (2003) 366.
13. Maksymiuk, K. *Electroanalysis* 18 (2006) 1537.
14. Lien, M.; Smyrl, W. H.; Morita, M. *J. Electroanal. Chem.* 309 (1991) 333.
15. Naoi, K.; Lien, M.; Smyrl, W. H. *J. Electrochem. Soc.* 138 (1991) 440.
16. Bidan, G.; Ehui, B.; Lapkowski, M. *J. Phys. D-Applied Physics* 21 (1988) 1043.
17. Shimoda, S.; Smela, E. *Electrochim. Acta* 44 (1998) 219.
18. Depaoli, M. A.; Peres, R. C. D.; Panero, S.; Scrosati, B. *Electrochim. Acta*. 37 (1992) 1173.
19. Guillamón Frutos, F.J.; Fernández Otero, T.; Fernández Romero, A.J. *Electrochim. Acta* 52 (2007) 3621.
20. Cano, M.; Rodríguez-Amaro, R.; Fernández Romero, A.J. *Electrochem. Comm.* 10 (2008) 190.
21. Fernandez Romero, A. J.; Lopez Cascales, J. J.; Otero, T. F. *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 21078.
22. Yang, H.; Lee, H.; Kim, Y. T.; Kwak, J. *J. Electrochem. Soc.* 147 (2000) 4239.

-
23. Vicente, F.; García-Jareño, J.J.; Benito, D.; Agrisuelas, J. *J. New Mat. Electrochem. Systems* 6 (2003) 267.
 24. Sundfors, F.; Bobacka, J.; Ivaska, A.; Lewenstam, A. *Electrochim. Acta* 47 (2002) 2245.
 25. Bobacka, J.; Grzeszczuk, M.; Ivaska, A. *J. Electroanal. Chem.* 427 (1997) 63.
 26. Hu, H.; Hechavarria, L.; Campos, J. *Solid States Ionics.* 161 (2003) 165.
 27. Chiba, K.; Ohsaka, T.; Oyama, N. *J. Electroanal. Chem.* 217 (1987) 239.
 28. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. In *Electrochemical Methods*, 2^o Edition, Wiley, New York, 2001.
 29. Bockris, J.O.; Reddy, A. K.N.; Gamboa-Aldeco, M. In *Modern Electrochemistry 2A, Fundamentals of Electrode Processes*, 2^o Edition, Kluwer Academic, New York, 1998.
 30. Umezawa, Y.; Umezawa, K.; Sato, H. *Pure Appl.Chem.* 67 (1995) 1995.
 31. Umezawa, Y.; Buhlmann, P.; Umezawa, K.; Tohda, K.; Amemiya, S. *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1851.
 32. Gupta, V. K.; Ludwig, R.; Agarwal, S. *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 213.
 33. Gadzekpo, V.P.Y.; Christian, G.D. *Anal. Chim. Acta* 164 (1984) 279.

DISCUSIÓN CONJUNTA DE LOS RESULTADOS

En esta Memoria se han diferenciado dos bloques claramente definidos en los *Capítulos III-IV*. Esta clasificación ha sido basada en los diferentes sensores electroquímicos desarrollados a lo largo de esta tesis, uno de tipo amperométrico y otro voltamperométrico. Además, se lleva a cabo una trayectoria que comienza con el desarrollo de un nuevo material electrodo compuesto (*Capítulo III*), y que continua con su aplicación a diferentes analitos de interés en el análisis clínico. En el *Capítulo IV* se explica el desarrollo de nuevos sensores de detección voltamperométrica, y de un nuevo formalismo para este tipo de sensores, basado en la ecuación de Butler-Volmer. Este tratamiento matemático permite un mejor ajuste que las tradicionalmente empleadas ecuaciones de Nernst. Finalmente, este tratamiento se aplica a sensores de cationes y de aniones, basados en polímeros orgánicos conductores.

Obtención y caracterización de un nuevo material compuesto PVC/TTF-TCNQ.

Tomando como base las buenas propiedades de estabilidad de los electrodos conocidos de PVC/Grafito, y la alta conductividad eléctrica de las sales orgánicas conductoras, se llevó a cabo la síntesis y caracterización del material compuesto PVC/TTF-TCNQ. La sustitución en la fase conductora del grafito por la sal orgánica TTF-TCNQ aumenta la flexibilidad, sensibilidad y selectividad del electrodo. Al mismo tiempo, se siguen conservando las propiedades físicas de dureza y compactabilidad, que son de gran importancia a la hora de su aplicación en sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA).

Hay que destacar, además, la capacidad catalítica que presenta la sal orgánica conductora dentro del compuesto, y que permite la oxidación de especies orgánicas, tales como el ácido ascórbico y ácido úrico, a menores potenciales anódicos que los reportados en la bibliografía, sin necesidad de modificar su superficie con un receptor biológico. Otro aspecto importante es la capacidad de interacción directa entre la SOC y los enzimas flavoproteínas (biosensores), ya que la fase conductora del compuesto PVC/TTF-TCNQ actúa también como mediador dando lugar a los denominados *biosensores de tercera generación*. Éstos muestran una mayor selectividad que los de generaciones previas, puesto que trabajan a potenciales muy próximos a los intrínsecos del enzima, quedando menos expuestos a posibles interferentes.

No sólo se sintetizó este compuesto en particular, sino que además se obtuvieron otros con diferente proporción de la mezcla grafito-TTF-TCNQ (en la fase conductora), y que podrían ser útiles en otras aplicaciones. Además, el método de síntesis desarrollado puede emplearse para conseguir nuevos compósitos basados en otras sales orgánicas conductoras conocidas.

Detección Amperométrica y aplicación a sistemas en continuo (FIA). La información obtenida anteriormente ha motivado la investigación de las propiedades electroquímicas de este material compuesto, y su capacidad para trabajar en sistemas de análisis por inyección en flujo.

Inicialmente, este nuevo material compuesto se aplicó como sensor de ácido ascórbico (AA), una molécula orgánica que es usada industrialmente como antioxidante alimenticio para incrementar el tiempo de conservación de algunos productos. Se estudió la determinación amperométrica cuantitativa del AA, tanto en celda convencional como en un sistema FIA, consiguiendo su detección a potenciales anódicos inferiores a los encontrados hasta el momento en bibliografía.

Posteriormente, el compuesto se aplicó como sensor de ácido úrico (AU), producto de desecho que proviene del metabolismo del nitrógeno en el cuerpo humano, y que se encuentra en la orina en pequeñas cantidades. Además, se consiguió realizar, por primera vez, la determinación simultánea de ácido úrico y ácido ascórbico, de gran interés ya que ambas sustancias se suelen presentar de manera conjunta en fluidos biológicos. La detección de ambos compuestos es importante no sólo para diagnóstico de enfermedades, sino también para el estudio de diversas patologías. El método propuesto está basado en la determinación amperométrica en FIA, capaz de detectar de manera simultánea la presencia de ambos analitos. Dicho método requiere solamente de dos inyecciones: (1) a 0.15V para determinar sólo AA y (2) a 0.35V para la determinación simultánea de ambos analitos (AA + AU). La cantidad de AU se obtiene por la diferencia (2) - (1), esta última convenientemente modificada a través de las curvas de calibración del AA a 0.15V y a 0.35V.

Finalmente, se aplicó como biosensor de glucosa en sistemas FIA, tras modificar la superficie del compósito con un enzima como receptor biológico, y usando glutaraldehído para el entrecruzamiento (cross-linking). De esta manera, se obtuvo un biosensor de tercera generación para la determinación de glucosa, y cuya fase conductora estaba formada únicamente por el mediador TTF-TCNQ.

Sensor Voltamperométrico como aplicación de la propiedad dador-aceptor de electrones del complejo de transferencia de carga TTF-TCNQ. Una interesante característica que presenta este material compósito es la posibilidad de trabajar tanto de electrodo de trabajo inerte como activo. Debido a que los componentes de la sal orgánica conductora TTF-TCNQ son electroquímicamente activos, el electrodo compósito presenta un intervalo de trabajo, como electrodo inerte, comprendido entre -0.1V y +0.4V. Sin embargo, si se rebasa el límite inferior tiene lugar la ruptura de la sal con la reducción del TCNQ a TCNQ^- , mientras que por el límite superior la ruptura de la sal sucede como consecuencia de la oxidación del TTF.

La detección voltamperométrica de iones monovalentes en disolución acuosa es un claro ejemplo de la aplicación de este material compósito como *electrodo de trabajo activo*. La reducción del TCNQ se aplica para el sensor voltamperométrico de cationes, ya que la deficiencia de carga positiva generada en la superficie del electrodo es compensada con la entrada de cationes procedentes del electrolito. Del mismo modo, para el sensor voltamperométrico de aniones se emplea la oxidación del TTF, y en este caso, la deficiencia de carga negativa se compensa con la entrada de los aniones del electrolito.

En resumen, la gran versatilidad del material compósito permite su aplicación como *electrodo de trabajo activo* en la determinación voltamperométrica, bien de cationes (activando la sal por reducción), o bien en la de aniones (activando por oxidación).

Desarrollo de un nuevo formalismo a partir de las ecuaciones de Butler-Volmer para sensores voltamperométricos. El estudio de la capacidad como sensor iónico de un electrodo policristalino de platino modificado con el polímero conductor PPyDBS,

que mostraba una relación semi-logarítmica entre el potencial reversible y la concentración de iones en disolución, mostró que las ecuaciones de Nernst modificadas para electrodos selectivos de iones no conseguían explicar el valor obtenido en la pendiente de la ecuación de la recta durante la calibración. En consecuencia, se propone un nuevo formalismo, más general, desarrollado a partir de las ecuaciones de Butler-Volmer, y que incluye un parámetro “ α ”, o coeficiente de transferencia electrónica, capaz de explicar satisfactoriamente estos valores de las pendientes.

Los valores de pendiente obtenidos a partir de este nuevo tratamiento teórico se emplean, posteriormente, en la ecuación de Nicolsky-Eisenman, la cual permite la determinación de los coeficientes de selectividad (K) en disoluciones con mezclas de iones. Los coeficientes de selectividad para los dos sensores propuestos se obtuvieron mediante varios métodos experimentales, incluyendo SSM y MPM. Este último se aplicaba por primera vez a los sensores voltamperométricos de iones, cambiando ΔE por ΔE_R . Los valores de K obtenidos a través de los diferentes métodos eran muy similares.

Obtención de un sensor voltamperométrico catiónico y otro aniónico, a partir de electrodos metálicos modificados con películas de polímeros orgánicos conductores. Además de aplicar el formalismo de Butler-Volmer, desarrollado en el punto anterior, se pone de manifiesto la propiedad que presentan los polímeros de pirrol de cambiar sus propiedades electroquímicas en función del tamaño de la especie aniónica utilizada como dopante durante la síntesis polimérica. Se obtiene un sensor catiónico de detección voltamperométrica al dopar el polímero con un anión dodecibencenosulfonato (DBS) muy voluminoso, mientras que se consigue un sensor aniónico al dopar con un anión perclorato.

CONCLUSIONES

Al final de cada uno de los capítulos de esta Memoria, se incluye un conjunto de conclusiones particulares al estudio desarrollado. En este apartado se presentan las conclusiones más generales, teniendo en cuenta tanto el grado de avance alcanzado como sus implicaciones prácticas.

1. La incorporación de la sal TTF-TCNQ como fase conductora en electrodos compósitos, en forma de pastillas, ha resultado ser un método efectivo para la preparación de electrodos de trabajo alternativos, susceptible de ser usados en sistemas de flujo continuo. El electrodo compósito de PVC/TTF-TCNQ propuesto en este trabajo exhibe muy buenas propiedades electroquímicas, una elevada sensibilidad y también una alta estabilidad mecánica. Además, es fácil y asequible de preparar, posee una elevada estabilidad, y proporciona resultados muy reproducibles, siendo su superficie fácilmente regenerable.
2. La aplicabilidad del electrodo compósito PVC/TTF-TCNQ, como *electrodo de trabajo inerte*, se ha probado satisfactoriamente en un sistema FIA con la detección amperométrica de AA, consiguiendo mejorar la respuesta del electrodo convencional de PVC/grafito.
3. Se ha propuesto un método eficiente y muy simple para la determinación simultánea de AA y AU en un sistema FIA, mediante el uso de un electrodo compósito de PVC/TTF-TCNQ como detector amperométrico. Este electrodo presenta muy bajo coste, alta reproducibilidad, robustez y largo tiempo de estabilidad. Además es fácil de preparar y su superficie puede renovarse mediante un simple tratamiento mecánico de lijado. El límite de detección obtenido en mezclas para AA ($1.2 \cdot 10^{-4}$ M) y para AU ($8.1 \cdot 10^{-5}$ M) hace posible su aplicación a muestras biológicas.
4. Se ha desarrollado el primer biosensor de tercera generación para la determinación amperométrica de glucosa, basado en el mediador redox TTF-TCNQ y que no contiene grafito. Puede emplearse tanto en sistemas en continuo (FIA) como en discontinuo (Batch). El compósito se prepara fácilmente, y no tiene la necesidad de añadir ninguna otra sustancia adicional para asegurar su conductividad. Muestra una alta reproducibilidad, largo tiempo de estabilidad y bajo coste. Debido al bajo potencial de trabajo empleado, la única interferencia

seria puede ser la debida a la presencia del AA. Sin embargo, mediante un sencillo procedimiento, se pueden determinar, simultáneamente, las concentraciones de glucosa y AA presentes en la muestra. El rango lineal y los límites de detección obtenidos, para la determinación de glucosa, hacen factible el uso de este biosensor en posibles aplicaciones biomédicas.

5. El electrodo compuesto PVC/TTF-TCNQ propuesto exhibe un comportamiento voltamperométrico selectivo en solución acuosa, que permite su uso como detector de iones. La relación directa del potencial reversible termodinámico, tanto a la naturaleza como a la concentración del analito (una relación tipo Nernst), así como en disoluciones de mezcla de iones (ecuación selectivo de iones tipo Nicolsky), junto con la facilidad de preparación del electrodo, su sensibilidad y durabilidad, le convierten en una interesante alternativa a los electrodos selectivos de iones ya conocidos.
6. Se ha desarrollado un nuevo método matemático más general, basado en la teoría de Butler-Volmer, aplicable a sensores voltamperométricos de cationes y de aniones. Además, en sistemas con un comportamiento tipo Nernst ($|i_c| = |i_d|$ y $\alpha = 1-\alpha = 0.5$) el método propuesto es también válido. Teniendo en cuenta que en la mayoría de los sistemas redox estudiados no se cumplen las condiciones de Nersnt, es esencial disponer de un método adecuado para sistemas fuera del equilibrio (ecuaciones de Butler-Volmer).
7. La aplicación de este nuevo método matemático a los sensores voltamperométricos, que no cumplen con el valor ideal estimado por la ecuación de Nernst, permite proponer un valor del coeficiente de transferencia para cada uno de los sistemas estudiados.
8. El nuevo formalismo de Butler-Volmer, desarrollado en esta tesis, ha sido satisfactoriamente aplicado a dos electrodos modificados con películas de polipirrol, PPy/DBS y PPy/CIO₄, que fueron probados como sensores voltamperométricos de cationes y aniones, respectivamente. Ambas películas poliméricas dan lugar en las gráficas semi-logarítmicas, a valores en la pendiente que difieren de los valores ideales nernstianos. Los valores de coeficientes de transferencia electrónica, calculados para los diferentes materiales poliméricos y

electrolitos, han permitido, posteriormente, obtener los coeficientes de selectividad (K) teóricos mediante la ecuación de Nicolsky-Eisenman.

9. De acuerdo con los resultados obtenidos, los sistemas PPy/DBS y PPy/ ClO_4 pueden ser propuestos como sensores voltamperométricos de cationes y aniones, respectivamente (aunque en ocasiones se requiera de una etapa previa de preconcentración). Ambos se comportan de manera análoga a los electrodos selectivos de iones, presentando un adecuado grado de selectividad iónica en disoluciones con mezcla de analitos, como así se demuestra con el cálculo de los coeficientes de selectividad a través de varios métodos experimentales, incluyendo SSM y MPM. Este último se aplicaba por primera vez a los sensores voltamperométricos de iones, cambiando ΔE por ΔE_R . Los valores de K obtenidos a través de los diferentes métodos fueron muy similares.
10. Finalmente, hay que destacar que los sensores propuestos representan una etapa previa hacia el desarrollo de nuevos detectores voltamperométricos de iones litio (u otros cationes), o iones fluoruro (u otros aniones), proporcionando un aceptable compromiso entre fiabilidad y facilidad de preparación y uso.

APÉNDICES

El trabajo desarrollado en esta Memoria, *Capítulos III-IV*, han dado como fruto las publicaciones que se relacionan a continuación:

- “A TTF-TCNQ Electrode as a Voltammetric Analogue of an Ion-Selective Electrode”. Manuel Cano^a, Beatriz Palenzuela^a, y Rafael Rodríguez-Amaro^a. *Electroanalysis* 18, **2006**, 1068-1074.

- “A PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode for use as Detector in Flow Injection Analysis”. Manuel Cano^a, Beatriz Palenzuela^a, y Rafael Rodríguez-Amaro^a. *Electroanalysis*, 18, **2006**, 1727-1729.

- “Simultaneous determination of ascorbic and uric acid by using a PVC/TTF-TCNQ composite electrode as detector in FIA system”. Manuel Cano^a, Beatriz Palenzuela^a, J. Luis Ávila^a y Rafael Rodríguez-Amaro^a. *Electroanalysis* 19, **2007**, 973-977.

-“Preparation and Characterization of a PVC/TTF-TCNQ Composite Electrode. Applications in a Flow Injection System”. Manuel Cano^a, Beatriz Palenzuela^a, y Rafael Rodríguez-Amaro^a. *Portugaliae Electrochimica Acta* 25, **2007**, 67-78.

- “A new, third generation, PVC/TTF-TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination”. Manuel Cano^a, J. Luis Ávila^a, Manuel Mayén^b, M.L. Mena^c, J. Pingarrón^c, y Rafael Rodríguez-Amaro^a. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 615, **2008**, 69-74.

- “Use of Butler-Volmer treatment to assess the capability of the voltammetric ion sensors. Application to a PPy/DBS film for cations detection”. Manuel Cano^a, Rafael Rodríguez-Amaro^a, and Antonio J. Fernández Romero^d. *Electrochemistry Communications* 10, **2008**, 190-194.

- “A new method based in the Butler-Volmer equation to evaluate Voltammetric cation and anion sensors”. Manuel Cano^a, Rafael Rodríguez-Amaro^a, and Antonio J. Fernández Romero^d. Accepted in *J. Phys. Chem. B*.

^a *Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio C-3, 14071 Córdoba, España.*

^a *Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio C-3, 14071 Córdoba, España.*

^b *Departamento de Química Agrícola y Edafología, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio C-3, 14071 Córdoba, España.*

^c *Departamento de Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España.*

^d *Laboratorio de Electroquímica, Materiales Inteligentes y Dispositivos (CEMI), ETSII, Campus de Alfonso XIII, Universidad Politécnica de Cartagena, 30203 Cartagena, España.*

La participación en Congresos relacionados sobre la línea de investigación, en la que se encuadra la presente Memoria, ha sido una de las acciones objeto del Programa de Formación del doctorando en la realización de su tesis doctoral. De esta forma, se han presentado las siguientes comunicaciones:

- *“Detección Voltamperométrica de iones mediante el empleo de un electrodo compósito PVC/TTF-TCNQ”*. Manuel Cano, Beatriz Palenzuela, y Rafael Rodríguez-Amaro. Exposición Oral en la XXVIII Reunión del Grupo de Electroquímica de la RSEQ celebrada en A Coruña (España), Julio de 2006.

- *“Determinación Simultánea de Ácido Ascórbico y Ácido Úrico mediante un electrodo compósito PVC/TTF-TCNQ como detector en un sistemas FIA”*. Manuel Cano, Beatriz Palenzuela, J. Luis Ávila, y Rafael Rodríguez-Amaro. Exposición Oral en la XIX Reunión del Grupo de Electroquímica de la RSEQ celebrada en Lleida (España), Julio de 2007.

- *“Voltammetric Ion Sensors Evaluated by Butler-Volmer Based Treatment. Application to Polypyrrole Films”*. Manuel Cano, Rafael Rodríguez-Amaro, and Antonio J. Fernández Romero. 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry in Seville (Spain), September 2008.

- *“A PVC TTF-TCNQ composite electrode as amperometric biosensor for glucose determination”*. Manuel Cano, J. Luis Ávila, Manuel Mayén, M.L. Mena, J.M. Pingarrón, y Rafael Rodríguez-Amaro. 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry in Seville (Spain), September 2008.