

---

# “Comportamiento electroquímico de surfactantes y micelas en interfaces líquido / líquido”

---

**Benjamín Nahuel Viada**

**Tesis para optar por el título de Doctor en  
Química**

Departamento de Fisicoquímica . Facultad de Ciencias Químicas.  
INFIQC- Instituto de Investigación en Fisicoquímica de Córdoba.  
Universidad Nacional de Córdoba

-2020-

La presente Tesis fue realizada en el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Lidia Mabel Yudi, y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Dra. Lidia Mabel Yudi

Comisión Evaluadora:

Dra. Natalia Wilke

Dra. Mariana A. Fernández

Dra. Ana Valeria Juarez

Dr. Mariano Correa  
(Evaluador externo)



## Agradecimientos

La realización de esta tesis ha requerido de la ayuda y el apoyo de numerosas personas. En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora de Tesis, Dra. Lidia Mabel Yudi y a la Dra. Ana Valeria Juárez. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte invaluable. Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Dr. Rodrigo Iglesias; la Dra. Ana Baruzzi, y la Dra Verónica Brunetti por la cordialidad de su recibimiento, y la disposición a ayudarme con todo lo que fuera posible. También me gustaría mencionar a mis compañeros de laboratorio por el compañerismo y el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A mi comisión de Tesis, Dra. Ana Valeria Juárez , Dra. Mariana A. Fernández y Dra. Natalia Wilke tanto por su genuino interés en este trabajo como por sus aportes a los diferentes temas que componen el presente trabajo de tesis. Al Dr Mariano Correa por leer y evaluar esta tesis.

A la Universidad Nacional de Córdoba, a la Facultad de Ciencias Químicas, al INFIQC-CONICET y al Departamento de Físicoquímica, por aportar el espacio físico donde se realizó este trabajo.

A las instituciones que financiaron esta tesis, CONICET, SECyT y FONCyT.

Por último, agradezco a mi familia y mi novia por su apoyo y comprensión a lo largo de toda mi carrera. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y como estudiante.

A todos, gracias.

# Índice

## **Parte I: Introducción y**

### **Objetivos**

## **Capítulo 1: Hipótesis de trabajo y Objetivos**

1.1. Introducción	1
1.2. Objetivos.	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
1.3. Bibliografía	6

## **Parte II: Fundamentos Teóricos**

### **y Metodología**

## **Capítulo 2: Descripción de interfaces líquido/líquido y líquido/aire**

2.1. Interfaz líquido/líquido	
2.1.1. Estructura interfacial y doble capa eléctrica	9 10
2.2. Termodinámica de interfaces líquidas	
2.2.1. Significado físico de la diferencia de potencial interfacial	12 12
2.2.2. Ecuación de Nerst en interfaces líquido/líquido	13 13
2.2.3. Escala de potencial	14
2.3. Ventana de potencial	16

<b>2.4.</b> Transferencia de carga a través de la interfaz líquido /líquido	18
<b>2.4.1.</b> Transferencia directa de iones	20
<b>2.4.2.</b> Transferencia facilitada	20
<b>2.4.3.</b> Transferencia de electrones	20
<b>2.5.</b> Interfaz agua/aire	21
<b>2.6.</b> Bibliografía	22

## **Capítulo 3: Comportamiento de surfactantes en solución y en interfaces**

<b>3.1.</b> Introducción	26
<b>3.2.</b> Comportamiento de surfactantes en solución	29
<b>3.3.</b> Adsorción de surfactantes en interfaces líquido/ líquido y líquido/aire	33
<b>3.4.</b> Antecedentes del estudio de surfactantes en interfaces líquidas	35
<b>3.5.</b> Bibliografía	39

## **Capítulo 4: Técnicas experimentales. Reactivos químicos**

<b>4.1.</b> Voltametría cíclica en interfaces líquidas	41
<b>4.1.1.</b> Respuesta voltamétrica en procesos de transferencia de especies disueltas	42
<b>4.1.2.</b> Respuesta voltamétrica en procesos de transferencia de especies adsorbidas	44
<b>4.1.3.</b> Celda electroquímica y electrodos	51
<b>4.1.4.</b> Arreglo de microinterfaces generadas en membranas de vidrio por ablación láser	54

<b>4.2.</b>	Voltametría de pulso diferencial (VPD)	58
<b>4.3.</b>	Espectroscopia de impedancia electroquímica	58
	<b>4.3.1.</b> Principales características de la espectroscopia de impedancia electroquímica	60
<b>4.4.</b>	Potenciostatos	61
<b>4.5.</b>	Isoterma presión superficial/área molecular	62
	<b>4.5.1.</b> Determinación de la tensión superficial	65
	<b>4.5.2.</b> Descripción de la isoterma presión superficial / área molecular	65
<b>4.6.</b>	Microscopia de ángulo de Brewster (BAM)	68
	<b>4.6.1.</b> Fundamento	68
	<b>4.6.2.</b> Cálculo del espesor óptico	71
	<b>4.6.3.</b> Equipamiento	72
<b>4.7.</b>	Dispersión dinámica de luz (DDL)	72
	<b>4.7.1.</b> Determinación del tamaño de partícula	73
<b>4.8.</b>	Nefelometría	75
<b>4.9.</b>	Espectroscopia de fluorescencia	77
<b>4.10.</b>	Reactantes químicos	78
	<b>4.10.1</b> Sales, ácidos y bases	79
	<b>4.10.2</b> Polímeros	79
	<b>4.10.3</b> Solventes	79
<b>4.11.</b>	Bibliografía	80

## Parte III: Resultados

### Capítulo 5: Comportamiento electroquímico de surfactantes perfluorados

<b>5.1.</b>	Introducción	81
-------------	--------------	----

<b>5.2.</b>	Objetivos	83
<b>5.2.1.</b>	General	84
<b>5.2.2.</b>	Particulares	86
<b>5.3.</b>	Parte experimental	86
<b>5.3.1.</b>	Voltametría cíclica (VC) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)	87
<b>5.3.2.</b>	Isotermas de presión superficial- área molecular y presión superficial- concentración	88
<b>5.3.3.</b>	Medidas de fluorescencia	
<b>5.3.4.</b>	Determinación del número de agregación	89
<b>5.4.</b>	Resultados	89
<b>5.4.1.</b>	Comportamiento electroquímico de tensoactivos perfluorados	90 93
<b>5.4.2.</b>	Efecto de la concentración de surfactante en su respuesta electroquímica	95
<b>5.4.3.</b>	Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) por voltametría cíclica	97
<b>5.4.4.</b>	Comparación con otros métodos	99
<b>5.4.4.1.</b>	Variación de la presión superficial	99
<b>5.4.4.2.</b>	Medidas de fluorescencia	100
<b>5.4.5.</b>	Espectroscopia de impedancia electroquímica	103
<b>5.4.6.</b>	Determinación del número de agregación	104
<b>5.5.</b>	Conclusiones	
<b>5.6.</b>	Bibliografía	106



## Capítulo 6: Efecto desestabilizante de surfactantes perfluorados sobre modelos de membranas simplificados

6.1.	Introducción	110
6.2.	Objetivos	112
6.2.1.	General	112
6.2.2.	Específicos	113
6.3.	Parte experimental	113
6.3.1.	Reactivos	113
6.3.2.	Métodos	114
6.3.2.1.	Monocapas en la interfaz agua/aire	115
6.3.2.2.	Inserción de PFD en monocapas preformadas de lípidos y determinación de la presión de exclusión	115
6.3.2.3.	Determinación de tamaño de vesículas por dispersión dinámica de la luz (DDL) y nefelometría	117
6.4.	Resultados	118
6.4.1.	Isotermas de langmuir y microscopia de ángulo de Brewsters	118
6.4.2.	Efecto de PDF sobre monocapas de DSPA	119
6.4.3.	Efecto de PDF sobre monocapas de DSPE	125

6.4.4. Inserción de PFD en monocapas pre formadas y determinación de la presión de exclusión	132
6.4.5. Efecto de PFD sobre LUVs	135
6.5. Conclusiones	138
6.6. Bibliografía	141

## **Capítulo 7: Determinación de compuestos perfluorados en muestras ambientales**

7.1. Introducción	145
7.2. Objetivos	147
7.2.1. General	147
7.2.2. Específicos	147
7.3. Parte experimental	149
7.4. Resultados	149
7.4.1. Voltametría cíclica en el arreglo de Micro-ITIES	149
7.4.2. Voltametría de pulso diferencial (VPD)	150
7.4.3. Voltametría de pulso diferencial y “Striping Voltamétrico” (SVPD)	151
7.4.4. Efecto del tiempo de preconcentración	152
7.4.5. Intervalo de concentraciones para la detección de PFOS-	154
7.4.6. Determinación de PFOS en muestras de agua reales	157
7.4.7. Parámetros analíticos	161
7.4.8. Determinación de PFOS en una matriz de agua de mar artificial (AMA)	165

7.5.	Conclusiones	167
7.6.	Bibliografía	168

## Capítulo 8: Comportamiento electroquímico de miltefosina

8.1.	Introducción	171
8.2.	Objetivos	175
	8.2.1. General	175
	8.2.2. Específicos	176
8.3.	Parte experimental	176
8.4.	Resultados	176
	8.4.1. Comportamiento voltamétrico de miltefosina	177
	8.4.2. Efecto de la concentración, pH y cationes del electrolito soporte de la fase acuosa sobre los perfiles voltamétricos de MTF	182
	8.4.3. Efecto de la velocidad de barrido	184
	8.4.4. Efecto del electrolito soporte de la fase orgánica	185
	8.4.5. Efecto de la concentración de MTF	187
	8.4.6. Efecto del tiempo de pulso y del potencial de corte	191
	8.4.7. ¿Es posible cuantificar miltefosina mediante voltametría cíclica en interfaces líquidas?	198
	8.4.8. Medidas de impedancia electroquímica	201
8.5.	Conclusiones	201

8.6. Bibliografía	203
-------------------	-----

## Capítulo 9: Comportamiento electroquímico del polímero pluronic F 127

9.1. Introducción	206
9.2. Objetivos	209
9.2.1. General	209
9.2.2. Específicos	209
9.3. Parte experimental	210
9.4. Resultados	210
9.4.1. Comportamiento voltamétrico de Pluronic® F-127	210
9.4.2. Efecto del pH y del electrolito soporte de la fase acuosa	211
9.4.3. Partición de Pluronic® F-127 en fase orgánica	215
9.4.4. Efecto de la concentración de polímero en la respuesta electroquímica	218
9.4.5. Interacción de Pluronic F-127 con MTF	220
9.5. Conclusiones	223
9.6. Bibliografía	224

## Parte IV: Conclusiones

### Capítulo 10: Conclusiones y perspectivas

10.1. Conclusiones	228
--------------------	-----

ANEXO	233
-------	-----

---

Parte I:

Introducción y Objetivos

---

---

# Capítulo 1

## Hipótesis de trabajo y Objetivos

---

## 1.1. Introducción

En términos generales, las moléculas orgánicas se pueden clasificar en hidrofílicas o polares de acuerdo a su capacidad de ser solubles en agua o en solventes polares y en hidrofóbicas o no-polares si son solubles en hidrocarburos o solventes no polares. Sin embargo, existe un amplio grupo de compuestos con características no tan bien definidas: los surfactantes. Estas moléculas son anfifílicas o anfipáticas, es decir, poseen una región polar o soluble en agua (cabeza polar) y una región no-polar generalmente formadas por cadenas carbonadas hidrofóbicas<sup>1</sup>. Las características duales de las moléculas de surfactantes les dan una amplia gama de propiedades, conectado dos características claves: adsorción en interfaces y autoensamblaje en solución formando diferentes tipos de agregados como micelas o micelas inversas, dependiendo del solvente.

El uso industrial de muchos surfactantes (como por ejemplo los compuestos perfluorados de cadena larga) se ha intensificado en las últimas décadas, aplicándolos en pinturas, plásticos, espumas ignífugas, industrial textil, entre otros. Debido a que estos compuestos son bastante inertes, tanto desde el punto de vista químico como biológico, y dado su carácter hidrofóbico, su persistencia en el ambiente y su acumulación en la cadena alimentaria son aspectos preocupantes y han generado un buen número de estudios en los últimos años. Algunos de estos estudios indican que estos compuestos anfipáticos podrían intercalarse en las membranas biológicas y afectar algunas de sus propiedades<sup>2,3</sup>.

Son numerosos los métodos utilizados para explorar la estructura de biomembranas y asociar sus propiedades y las condiciones del medio ambiente con la organización intermolecular y, en algunos casos, con la función de membranas. Debido a las dificultades de realizar estos estudios in vivo se han planteado diversos modelos simples de membranas artificiales constituidas por proteínas y lípidos definidos. Estos

estudios confirman y amplían el concepto de biomembranas como estructuras dinámicas y enfatizan la dificultad y la importancia de definir las características precisas del arreglo multimolecular utilizado. En las últimas décadas gran parte de la información se ha obtenido a partir del empleo de monocapas de lípidos adsorbidas en la interfaz agua-aire<sup>4</sup> o depositadas sobre soportes sólidos por el método de Langmuir-Blodgett<sup>5</sup>, así como también en interfaces formadas por dos líquidos no miscibles (agua / solvente orgánico)<sup>6</sup>.

<sup>15</sup> La posibilidad de polarizar la interfaz líquido/líquido, empleando métodos electroquímicos en sistemas de cuatro electrodos, le otorga a este tipo de modelos un interés adicional por la importancia que reviste el potencial eléctrico en las biomembranas<sup>16</sup>. Adicionalmente se pueden emplear modelos más complejos como liposomas. Estas estructuras son vesículas cuya constitución química básica son lípidos. Las mismas tienen un espacio acuoso central y, ocasionalmente, otros espacios interlaminares. Sobre esta estructura básica, se pueden insertar otros lípidos, proteínas, anticuerpos, biomoléculas diversas marcadas con isótopos radiactivos y sustancias fluorescentes, entre otras. Los sustratos por encapsular se ubicarán en los espacios acuosos, en la fase lipídica, o adoptarán una participación estructural comprometida en ambas fases, según sea su naturaleza lipofílica, hidrofílica o anfifílica<sup>17-19</sup>. Esta versatilidad estructural permite diseñar liposomas de acuerdo con los objetivos para los que serán utilizados, como por ejemplo, estudiar el efecto de moléculas tensioactivas sobre estas vesículas.

<sup>20</sup> De esta manera, en la presente tesis se estudió el comportamiento de ácidos perfluorados en interfaces líquido/líquido, tanto en lo que respecta a aspectos termodinámicos relacionados a su comportamiento interfacial y la formación de micelas, como su interacción con películas de fosfolípidos adsorbidas en interfaces líquido/líquido, líquido/aire, o vesículas, como modelos de membranas biológicas. Por otro lado, en el marco de una estadía de investigación en la Universidad de Curtin en la ciudad de Perth, Australia Occidental se desarrolló una metodología de



cuantificación electroquímica para la detección de estos surfactantes perfluorados a nivel de trazas.

Existen algunas moléculas anfífilas con actividad farmacológica como Hexadecilfosfocolina (miltefosina) es un compuesto anti-neoplásico con actividad en membrana. Experimentos en animales han demostrado su selectividad antitumoral y citotoxicidad contra un amplio espectro de líneas celulares cancerígenas <sup>21</sup>. Por otro lado, también se ha demostrado que este compuesto es altamente efectivo en el tratamiento de leishmaniasis visceral <sup>22</sup>. A pesar de esta actividad farmacológica muy bien demostrada, la administración oral o intravenosa de miltefosina está muy limitada debido a sus efectos dañinos en las células epiteliales del tracto gastrointestinal y a la producción de hemólisis de eritrocitos <sup>22</sup>. En consecuencia, una aproximación promisorio para solucionar estos efectos adversos es la preparación de nanoestructuras en las cuales el fármaco se encuentre encapsulado dentro de estructuras poliméricas que lo liberen en el sitio de acción. Recientemente los copolímeros de bloque han emergido como dispositivos interesantes para liberación de drogas y terapia de genes <sup>23, 24</sup>. En particular, el co-polímero Pluronic POE-POP-POE (POE: polioxietileno, POP: polioxipropileno) ha mostrado una gran versatilidad para este uso debido a la posibilidad de regular la forma y tamaño de sus micelas, así como también su balance hidrofílico-hidrofóbico, variando las condiciones experimentales (temperatura, concentración de los polímeros constituyentes y composición de la solución). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudió, en primer lugar, la transferencia de miltefosina a través de la interfaz líquido/líquido apuntando a evaluar la posibilidad de su cuantificación electroquímica debido a que dicho fármaco no posee grupos cromóforos, con lo cual su cuantificación por métodos espectroscópicos no es viable y, por otro lado, el método más común de cuantificación de fosfocolinas, a través de la determinación de fosfatos, no siempre es factible de aplicar dado que el medio más común de sus preparados es en

buffer fosfato. En segundo lugar se extendió este estudio a las nanoestructuras formadas por miltefosina y el copolímero Pluronic.

En el marco de la presente tesis se utilizó el sistema experimental de interfaces líquido / líquido, al cual se le aplican técnicas electroquímicas que permiten estudiar la transferencia de especies cargadas a través de las mismas <sup>25-27</sup>. En este caso, la molécula estudiada no participa de reacciones de oxidación o reducción: el pasaje de la misma a través de la interfaz produce un pico de corriente cuya magnitud es proporcional a la concentración y carga de la especie, mientras que el potencial al cual aparece el pico depende de la hidrofobicidad de la sustancia transportada. De este modo, se puede postular como hipótesis que esta metodología permitirá distinguir, a través de la magnitud de la corriente y el potencial voltamétrico, la transferencia de la especie monomérica o de la micela. Del mismo modo, de la observación del barrido inverso de potencial, será posible estimar si la micela es estable en fase orgánica o bien si se desestabiliza para formar otro tipo de estructuras.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis pretende contribuir al conocimiento del comportamiento interfacial de surfactantes de diferente naturaleza, y de los agregados formados por éstas, como micelas, en interfaces líquidas simples o modificadas con películas de fosfolípidos y bajo acción de polarización eléctrica.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Estudiar la transferencia electroquímica y la adsorción en interfaces líquido/líquido, de surfactantes aniónicos como los ácidos perfluorooctanoico, perfluorononanoico y perfluorodecanoico. Evaluar la posibilidad de determinar concentraciones micelares críticas a través de los parámetros electroquímicos;
- Analizar la interacción de estos surfactantes y sus micelas con monocapas de fosfolípidos adsorbidas en interfaces agua/aire y posteriormente en interfaces líquido/líquido polarizadas;
- Estudiar la capacidad detergente de estos surfactantes perfluorados sobre vesículas de distintos fosfolípidos;
- Diseñar métodos electroanalíticos para la cuantificación de surfactantes perfluorados en muestras ambientales a nivel trazas;
- Estudiar la transferencia electroquímica y la adsorción en interfaces líquido/líquido de surfactantes con actividad farmacológica como hexadecilfosfocolina (mitelfosina) y sus micelas. Evaluar la posibilidad de desarrollar una metodología electroquímica para su cuantificación en solución;
- Estudiar electroquímicamente la transferencia y adsorción en interfaces líquido/líquido del polímero Pluronic F127, el cual es un copolímero tribloque POE-POP-POE (POE: polioxietileno, POP: polioxipropileno) que forma micelas con capacidad para incluir y transportar fármacos como miltefosina.

Estos objetivos se desarrollarán en los distintos capítulos de la presente tesis:

Luego de la introducción en el capítulo 1, los capítulos 2,3 y 4 están destinados a presentar los fundamentos teóricos, metodológicos y experimentales.

En el capítulo 5, se describieron los resultados obtenidos para el comportamiento de surfactantes aniónicos perfluorados en interfaces líquidas como así también la determinación de su concentración micelar crítica a partir de parámetros electroquímicos.

En el capítulo 6, se analizó la interacción de estos surfactantes con modelos de membrana. A su vez, se evaluó capacidad detergente de estos compuestos sobre vesículas unilamelares de fosfolípidos.

En el capítulo 7, se aplicó una metodología para la cuantificación electroquímica de surfactantes perfluorados en muestras ambientales basada en el empleo de una membrana de vidrio que soporta la microinterfaz líquido / líquido

En el capítulo 8, se caracterizó la transferencia electroquímica y la adsorción en interfaces líquido/líquido de hexadecilfosfocolina (mitelfosina). Posteriormente se evaluó la factibilidad de cuantificar dicha molécula mediante metodologías electroquímicas.

En el capítulo 9, se muestran los resultados obtenidos para el polímero pluronic F127. Adicionalmente, se estudió la interacción de este polímero con miltefosina a través de metodologías electroquímicas.

Por último en el capítulo 10, se resumen los resultados más importantes junto con sus respectivas conclusiones.

## 1.3 Bibliografía

- [1] C. Zajka, J. Eastoe. *Langmuir* 30 (2015) 8205–8217
- [2] D. Matyszewska, R. Bilewicz, *Colloids and Surfaces A* 321 (2008) 11-15.
- [3] W. Xie, G. D. Bothun, H.J. Lehmler, *Chemistry and Physics of Lipids* 163 (2010) 206-209.
- [4] B. Maggio, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 62 (1994) 55-59.
- [5] J.F.D. Liljeblad, M.W. Rutland, and C.M. Johnson, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 10617-10622.
- [6] A.G. Volkov (Ed.) “Liquid Interfaces in Chemical, Biological and Pharmaceutical Applications”, Marcel Dekker, New York (2001).
- [7] D.K. Beaman, E.J. Robertson , G.L. Richmond, *Langmuir*, 27 (2011) 2104-2110.
- [8] L.M.A. Monzón , L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 1932-1940.
- [9] L.M.A. Monzón , L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 4573-4581.
- [10] L.M.A. Monzón , L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 6873-6879.
- [11] M.V. Colqui Quiroga, L.M.A. Monzón , L.M. Yudi, *Electrochim Acta* 56 (2011) 7022-1028.
- [12] M,V. Colqui Quiroga, L, M.A. Monzón, L. M. Yudi, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 5840-5846.
- [13] C.I. Cámara, M.V. Colqui Quiroga, N. Wilke, A. Gimenez-Kairuz , L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 94 (2013) 124-133.
- [14] C.I. Cámara, L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 113 (2013) 644-652.
- [15] C.I. Cámara, M. Coey, L.M.A Monzón, L.M. Yudi, *Physical Chemistry Chemical Physic.* 17 (2015) 414 – 421.
- [16] H.A. Santos, V. García-Morales, C.M. Pereira, *Chemphyschem.* 11 (2010) 28-33.

- [17] O. Maniti, K. Carvalho, C. Picart, *Biochimie*. 95 (2013) 3-11.
- [18] N. Puff, M. I. Angelova, *Biochimie*. 5 (2006) 173-228.
- [19] I.Y. Wu, N. Škalko-Basnet, M.P. di Cagno, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 157 (2017) 65-71.
- [20] N. Roldan, T. K. M. Nyholm, J.P. Slotte, J. Pérez-Gil, B. García-Álvarez. *Biophysical Journal* 111 (2016) 1703-1713
- [21] M. V. Zhukova, O. V. Romanenko, V. A. Nikolaevich, M. A. Kisel, *Pharmaceutical Chemistry Journal* 44 ( 2010) 507 – 509.
- [22] J. D. Berman, *Med. Chem*. 6 (2006) 145 – 151.
- [23] R. Basak ,R. Bandyopadhyay, *Langmuir* 29 (2013) 4350–4356.
- [24] E.V. Batrakova, A.V. Kabanov, *Journal of Controlled Release* 130 (2008) 98–106.
- [25] Z. Samec, *Electrochim. Acta* 84 (2012) 21-28.
- [26] B.R. Silver, K. Holub, V. Marecek, *J. Electroanal. Chem*. 784 (2017) 1-5.
- [27] C.I. Cámara, C.A. Bornancini, J.L. Cabrera, M.G. Ortega, L.M. Yudi, *Talanta* 83 (2010) 623-630.

---

Parte II:

Fundamentos Teóricos y  
Metodología

---

---

# Capítulo 2

Descripción de interfaces  
líquido/líquido y  
líquido/aire

---



## 2.1. Interfaz líquido/líquido

Si se ponen en contacto dos solventes de baja (idealmente cero) miscibilidad mutua, conteniendo cada uno de ellos electrolitos adecuados para aplicaciones electroquímicas, se genera una interfaz entre los mismos denominada por sus siglas en inglés ITIES (Interfacial two immiscible electrolyte solutions). En esta Tesis se trabajó con agua como uno de los disolventes y con 1,2-dicloroetano (DCE), un solvente orgánico, inmiscible con agua, con una permeabilidad dieléctrica alta.

Existen numerosos antecedentes de estudios electroquímicos de interfaz líquido/ líquido. Primeramente se observó el pasaje en simultáneo de electrones e iones a través de la interfaz agua/ fenol/ agua<sup>1</sup>. Otros trabajos se centraron en utilizar este sistema como modelo de membranas biológicas o bien en estudios teóricos sobre el mismo <sup>2,3</sup>. Posteriormente, se desarrolló un enfoque novedoso para estudiar la transferencia de iones en ITIES, basado en la polarización de esta interfaz. El pionero en este campo fue Claude Gavach quien estudió la transferencia de iones por métodos electroquímicos <sup>4-7</sup>. El término ITIES fue acuñado por Koryta, quien continuó desarrollando esta metodología en diversos trabajos <sup>8,9</sup>.

Durante la década de 1990 los grupos de investigación sobre electroquímica en ITIES crecieron considerablemente, centrando sus estudios en aplicaciones que resuelvan necesidades específicas, la química analítica es una de estas aplicaciones <sup>10,11</sup>. La electroquímica en ITIES puede reemplazar a los métodos de electroquímica tradicional en algunos casos. Esto se debe a que especies iónicas que generalmente no son detectadas por procesos redox pueden ser cuantificadas por esta metodología, constituyendo una gran ventaja. Los sensores electroquímicos son muy atractivos

desde el punto de vista académico y comercial, y se trata de un campo muy dinámico y en constante crecimiento<sup>12</sup>.

Actualmente, los avances principales en este campo, incluyen el desarrollo de micro y nano interfaz<sup>13,15</sup> o bien arreglos de los mismos<sup>16, 17</sup>, electrocatálisis<sup>18</sup>, detección de moléculas biológicas<sup>19, 21</sup>, síntesis de nanopartículas<sup>23</sup>, síntesis de materiales mesoporosos sobre la interfaz<sup>22, 23</sup>, entre otros.

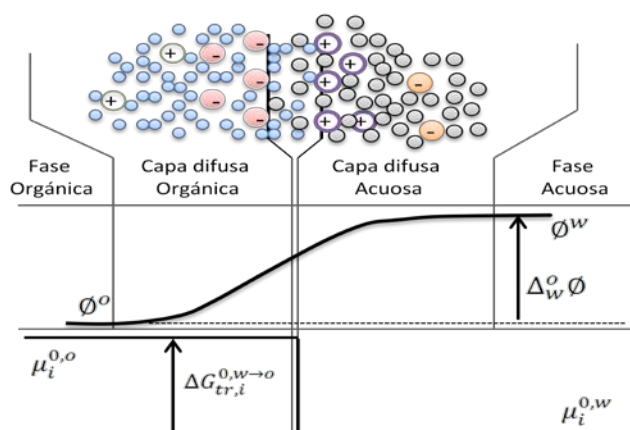
Con respecto a perspectivas futuras, el estudio de electroquímico en ITIES continua siendo de un interés elevado. Los principales desarrollos están enfocados en el reemplazo del solvente orgánico por líquidos iónicos<sup>24</sup>, los cuales son más amigables con el ambiente como así también en el desarrollo de sensores enzimáticos<sup>25</sup>.

### 2.1.1 Estructura interfacial y doble capa eléctrica

La primera descripción de las ITIES utilizó una transposición directa de los modelos existentes para interfaz electrodo/solución. En el caso de interfaz líquido/líquido, la doble capa eléctrica es una zona de interacción eléctrica (iónica y dipolar) que implica dos regiones extendidas donde se distribuyen las especies iónicas. La interfaz líquido / líquido es un medio no homogéneo y, por consiguiente, una interfaz molecular con características dinámicas propias.

Inicialmente, Verwey y Niessen representaron la interfaz como dos capas difusas, correspondientes una a cada fase, en las cuales existe un exceso de carga espacial con respecto al seno de cada una de las ellas. Las capas difusas se describen en términos de la teoría de Gouy-Chapman, y se considera el límite entre los dos líquidos como una superficie que separa las dos regiones. Muchos estudios,

en los cuales se realizaron mediciones de tensión superficial<sup>26</sup> y capacitancia<sup>27</sup>, informaron resultados compatibles con el modelo de Verwey-Niessen a potenciales cercanos al punto de carga cero. Posteriormente, Gavach propuso una modificación de este modelo<sup>28</sup> introduciendo el concepto de una capa compacta libre de iones, constituida por moléculas de ambos solventes, que separa las dos capas difusas (Figura 2.1). Z. Samec y colaboradores, propusieron que los iones pueden penetrar en la capa interior hasta una cierta distancia<sup>29</sup>. H. H. Girault y D. Schiffrin sugirieron que la región interfacial consiste en una capa interna en la cual se mezclan los solventes, y los iones pueden penetrar y adsorberse en esta región debido a la neutralización de carga interfacial con iones de la otra fase. Este modelo fue apoyado por W. Schmickler<sup>30</sup>, quien, mediante cálculos teóricos, sugirió que el espesor de la capa interna depende de la miscibilidad de los dos disolventes. Se ha verificado la existencia de una capa interna de un espesor aproximado de 1 nm mediante experimentos de reflectividad de neutrones<sup>31</sup>, de elipsometría<sup>32</sup> y por los estudios de M. L. Schlossman y colaboradores, quienes determinaron el perfil de distribución iónica en ITIES usando reflectividad de rayos X<sup>33</sup>. Más allá del modelo de doble capa, hay que tener en cuenta que el comportamiento experimental depende de la naturaleza de los solventes utilizados y de la composición química del sistema<sup>34</sup>.



**Figura 2.1:** Representación esquemática del modelo de capa mixta de solventes, de la distribución de potencial ( $\phi$ ) en la región interfacial y del cambio de potencial químico en términos de la energía de Gibbs. (●) moléculas de solvente orgánico, (○) moléculas de agua. Grafico extraído de la referencia<sup>1</sup>

## 2.2. Termodinámica en interfaz líquido/líquido

### 2.2.1 Significado físico de la diferencia de potencial interfacial

Teniendo en cuenta que la diferencia de potencial eléctrico entre dos fases (Potencial de Galvani,  $\Delta^o \phi = \phi^o - \phi^w$  Figura 2.1) es un parámetro muy importante para definir los aspectos termodinámicos de la interfaz líquido/líquido, en esta sección se explica brevemente el significado físico de  $\Delta^o \phi$ . La diferencia de potencial en ITIES comprende dos contribuciones, la de la capa interna y la de ambas capas difusas. La primera surge de la presencia de una capa de dipolos moleculares orientados, y de la adsorción de los iones presentes. La capa difusa está formada por iones disueltos a temperatura ambiente, que son atraídos a la interfaz intrínsecamente cargada, y la diferencia de potencial a través de ella puede ser tan alta como 0,500 V<sup>35, 36</sup>. Por otro lado, la caída de potencial en la capa interna compacta, puede tomar valores hasta 100 veces más pequeños<sup>37,39</sup>. La adsorción específica puede aumentar sustancialmente la diferencia de potencial en la capa compacta.

La diferencia de potencial a través de la capa compacta de dipolos moleculares orientados, es casi independiente de la composición del electrolito, mientras que el potencial en la capa difusa está fuertemente afectado por la fuerza iónica del medio. La suma de las caídas de potencial en las capas compacta y difusa, dan lugar a la diferencia de potencial de Galvani  $\Delta_w^o \phi$  entre las dos fases.

## 2.2.2 Ecuación de Nernst en interfaces líquido / líquido

Una vez discutido el significado físico de  $\Delta^o \emptyset^w$  (sección anterior), derivaremos a continuación, la relación entre  $\Delta^o \emptyset^w$  y la concentración de especies en solución para la situación de equilibrio. Para esto, vamos a considerar dos soluciones electrolíticas inmiscibles, fase orgánica y acuosa, indicadas por los índices "o" y "w", respectivamente. Ambas soluciones contienen la especie iónica "i". La condición de equilibrio establece que:

$$\tilde{\mu}_i^o = \tilde{\mu}_i^w \quad \text{Ec. 2.1}$$

Donde  $\tilde{\mu}_i^w$  y  $\tilde{\mu}_i^o$  representan los potenciales electroquímicos en cada fase, es decir, el trabajo requerido para transferir el ion i desde el vacío a la fase correspondiente. A su vez, el potencial electroquímico se puede separar en las contribuciones químicas y eléctricas:

$$\tilde{\mu}_i^\alpha = \mu_i^\alpha + z_i F \emptyset^\alpha \quad \text{Ec. 2.2}$$

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^{0,\alpha} + RT \ln a_i^\alpha \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde  $z_i$  es la carga del ion i,  $\mu_i^\alpha$  es el potencial químico de i en la fase  $\alpha$  (o o w),  $\mu_i^{0,\alpha}$  es el potencial químico estándar de i en la fase  $\alpha$ ,  $\emptyset^\alpha$  es el potencial de Galvani de la fase  $\alpha$ , F es la constante de Faraday,  $a_i^\alpha$  es la actividad de i en dicha fase, R la constante de los gases ideales y T la temperatura absoluta. Combinando las ecuaciones 2.2 y 2.3, se puede escribir:

$$\tilde{\mu}_i^\alpha = \mu_i^{0,\alpha} + RT \ln a_i^\alpha + z_i F \emptyset^\alpha \quad \text{Ec. 2.4}$$

Así, con el uso de la Ec. 2.4 y la condición de equilibrio en interfaz líquido/líquido (Ec. 2.1) se obtiene:

$$\mu_i^{0,w} + RT \ln a_i^w + z_i F \phi^w = \mu_i^{0,o} + RT \ln a_i^o + z_i F \phi^o \quad \text{Ec. 2.5}$$

Reordenando esta expresión se obtiene:

$$(\mu_i^{0,o} - \mu_i^{0,w}) + RT \ln \left( \frac{a_i^o}{a_i^w} \right) = -z_i F \Delta_w^o \phi \quad \text{Ec. 2.6}$$

Teniendo en cuenta que  $\Delta G_{tr,i}^{0,w \rightarrow o} = \mu_i^{0,o} - \mu_i^{0,w}$ , se obtiene:

$$\Delta_w^o \phi = -\frac{\Delta G_{tr,i}^{0,w \rightarrow o}}{z_i F} - \frac{RT}{z_i F} \ln \left( \frac{a_i^o}{a_i^w} \right) \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde  $\Delta G_{tr,i}^{0,w \rightarrow o}$  es la energía libre estándar de Gibbs de transferencia de iones desde la fase w a la fase o, que viene dada por la diferencia de la energía libre de Gibbs de solvatación de iones en las dos fases. Entonces, el potencial estándar de transferencia de i,  $\Delta_w^o \phi_i^0$ , se puede definir como:

$$\Delta_w^o \phi_i^0 = -\frac{\Delta G_{tr,i}^{0,w \rightarrow o}}{z_i F} \quad \text{Ec. 2.8}$$

Por lo tanto, la ecuación de Nernst para la transferencia de iones a través de ITIES es:

$$\Delta_w^o \phi_i = \Delta_w^o \phi_i^0 - \frac{RT}{z_i F} \ln \left( \frac{a_i^o}{a_i^w} \right) \quad \text{Ec. 2.9}$$

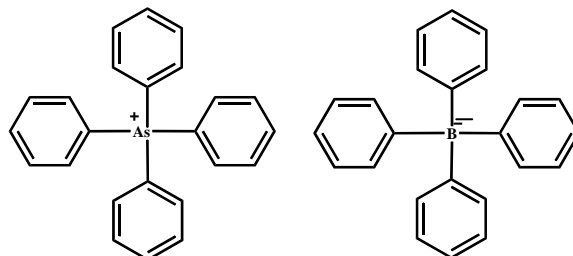
### 2.2.3 Escala de potencial

El potencial estándar de transferencia  $\Delta_w^o \phi_i^0$  no puede medirse directamente y se deben usar suposiciones de carácter no termodinámico si se pretende trabajar en

este tipo de escalas de potencial. El método más comúnmente utilizado para calcular diferencias de potencial de Galvani es la suposición de que las energías de transferencia estándar de Gibbs del catión tetrafenilarsonio (TPhAs<sup>+</sup>),  $\Delta G_{tr,TPhAs^+}^{0,w \rightarrow o}$ , y del anión tetrafenilborato (TPhB<sup>-</sup>),  $\Delta G_{tr,TPhB^-}^{0,w \rightarrow o}$ , en un par cualquiera de disolventes, son iguales debido a que sus tamaños y estructuras químicas son similares (Figura 2.2), y a que la carga de ambos iones se encuentra igualmente apantallada por los grupos fenilo. En consecuencia, sus energías de solvatación pueden ser consideradas de igual magnitud, lo que resulta en la igualdad de las energías de transferencia de Gibbs para cualquier par de solventes:

$$\Delta G_{tr,TPhAs^+}^{0,w \rightarrow o} = \Delta G_{tr,TPhB^-}^{0,w \rightarrow o} = \frac{1}{2} \Delta G_{tr,TPhAsTPhB}^{0,w \rightarrow o} \quad \text{Ec. 2.10}$$

Sin embargo, cabe aclarar que no se tienen en cuenta pequeñas diferencias como las longitudes no equivalentes de los enlaces C-As y C-B, y la carga de distinta naturaleza que poseen. De esta manera, a partir de las energías libres de transferencia de cualquier ión, referidos a los valores de  $\Delta G_{tr,TPhB^-}^{0,w \rightarrow o}$  o  $\Delta G_{tr,TPhAs^+}^{0,w \rightarrow o}$ , se obtienen los potenciales de transferencia estándar de ese ión en un par de solventes determinados.



**Figura 2.2:** Estructura química de tetrafenilborato de tetrafenilarsonio. (TPhAsTPhB).

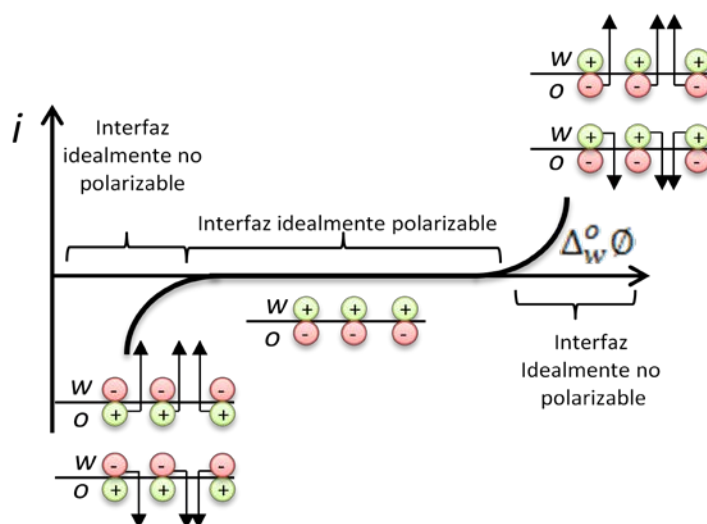
H.H. Girault y D. Schiffrin<sup>39</sup> propusieron otra manera de definir la escala de potenciales estándar utilizando el potencial de carga cero (pzc) como el punto cero, ya que la contribución dipolar a la diferencia de potencial de Galvani en el potencial de carga cero,  $\phi_{pzc}$ , es despreciable. El valor de pzc se puede obtener fácilmente mediante curvas de electrocapilaridad, determinando el potencial en el máximo de las curvas.

### 2.3. Ventana de potencial

Las interfaces líquido / líquido, al igual que la interfaz electrodo/solución, son idealmente polarizables en un intervalo limitado de potencial. En dicho intervalo, la diferencia de potencial en ITIES, aplicada a través de una fuente externa, genera una densidad de carga superficial, por acumulación de iones que componen los electrolitos presentes en cada fase, a ambos lados de la interfaz, sin que ocurran procesos faradaicos de transferencia de carga. Cuando el potencial aplicado alcanza valores positivos o negativos altos, la energía involucrada es suficiente para producir la transferencia de iones a la fase adyacente. En este caso, la transferencia de iones desde una a otra fase genera una corriente de transferencia de carga, la cual altera la



composición química de las fases en la región interfacial, de manera que la interfaz se convierte en idealmente no polarizable. El intervalo de potencial limitado por la transferencia de los iones que componen el electrolito soporte se denomina "ventana de potencial" y se describe esquemáticamente en la Figura 2.3.



**Figura 2.3:** Esquema de procesos interfaciales dentro de la ventana de potencial.

Por convención se define como corriente positiva a la transferencia de cationes desde la fase acuosa a la orgánica o de aniones desde la fase orgánica a la acuosa y viceversa para la corriente negativa, como puede observarse en los esquemas incluidos en la Figura 2.3.

Esta ventana de potencial determina el intervalo de potencial de trabajo, dentro del cual se pueden estudiar los procesos de transferencia faradaicos de sustancias de interés. La ventana de potencial puede ser ampliada mediante el uso de electrolitos soporte muy hidrofóbicos o hidrofílicos en la fase orgánica y la acuosa, respectivamente, ya que este tipo de sales poseen iones que requieren de la aplicación de altos valores de energía para ser transferidos a la fase adyacente.

## 2.4. Transferencia de carga a través de la interfaz líquido/líquido polarizada

### 2.4.1 Transferencia directa de iones

Este modo de transferencia de carga es quizás el más simple de todos, e involucra la transferencia de un ión presente en la fase acuosa hacia la orgánica (o viceversa), cuando se aplica una diferencia de potencial interfacial adecuado, dentro de la ventana de potencial:



El proceso de transferencia de  $A^+$  desde la fase acuosa a la orgánica involucra varias etapas. En primera instancia tiene lugar el transporte de masa de la especie  $A^+$  desde el seno de una de las fases a la interfaz; en segundo lugar, ocurre la reacción de transferencia electroquímica, donde la especie iónica atraviesa la interfaz, y por último, la transferencia de masa de la especie iónica  $A^+$  hacia el seno de la otra fase.

### 2.4.2 Transferencia facilitada de iones

La primera reacción de transferencia facilitada de iones en interfaz líquido / líquido, se informó en 1979 en los trabajos de J. Koryta, quien estudió la transferencia de los iones potasio y sodio facilitadas por un antibiótico natural y un ligando, respectivamente<sup>40</sup>. Desde ese momento, se han estudiado y publicado diferentes mecanismos de transferencia de iones facilitada por ligandos de distinta naturaleza presentes en la fase orgánica.

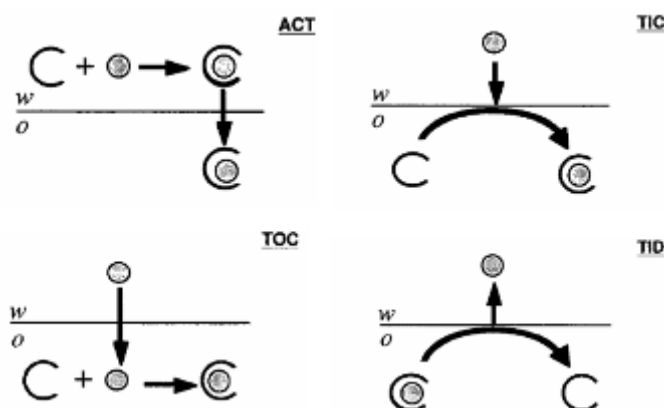
Las propiedades fisicoquímicas del ligando (constante de partición, carga, actividad ácido-base, etc.), así como su capacidad quelante hacia un catión específico (constante de formación de complejos en las dos fases y estequiometría de los complejos formados) determinan la naturaleza del proceso de transferencia de carga a través de interfaz líquido / líquido<sup>40</sup>.

El potencial de una transferencia iónica facilitada brinda información acerca de la hidrofobicidad del ligando, de la estequiometría y constante de formación del complejo, mientras que los estudios cinéticos aportan información relativa al mecanismo de transferencia de carga. Y. Shao y colaboradores<sup>41</sup> han propuesto una nueva terminología que permite identificar el tipo de mecanismo en estudio, pudiéndose distinguir cuatro tipos de reacciones (Figura 2.4).

El mecanismo ACT (Aqueous Complexation followed by Transfer) fue propuesto por S. Lin y colaboradores<sup>42</sup>, en el cual, si el ligando se disuelve en la fase orgánica, la reacción de transferencia facilitada de iones se llevaría a cabo a través de la difusión y partición del ligando desde la fase orgánica a la acuosa, seguido por la formación del complejo en la fase acuosa y la transferencia del ion acomplejado. Este mecanismo sólo es viable si el ligando es también soluble en agua.

T. Kakutani y colaboradores<sup>43</sup> propusieron el mecanismo TIC (Transfer by Interfacial Complexation), que consiste en la formación del complejo en la interfaz, posterior a la transferencia del ión. Este mecanismo se ve favorecido por relaciones de concentración tales que el ion en la fase acuosa se encuentre en exceso en comparación con la concentración del ligando en la fase orgánica. El mecanismo reverso de un TIC es una transferencia por disociación interfacial TID (Transfer by Interfacial Decomplexation).

El cuarto mecanismo, TOC, (Transfer followed by Organic Complexation), consiste en la transferencia de iones, seguido por la formación de complejos en la fase orgánica.



**Figura 2.4:** Representaciones esquemáticas de las diferentes vías de reacción para los procesos de transferencia facilitada de iones. Gráfico extraído de la referencia <sup>40</sup>.

### 2.4.3 Transferencia de electrones

Además de la transferencia de iones a través de la interfaz líquido/líquido, se han postulado procesos que implican la transferencia de electrones. Tales procesos requieren un sistema redox en cada una de las fases, capaces de reaccionar uno con otro bajo condiciones de polarización interfacial, dando como resultado la transferencia de electrones a través de la interfaz.

Teniendo en cuenta esta separación de especies redox entre las dos fases, el proceso que ocurre puede esquematizarse como sigue:



En comparación a las publicaciones sobre transferencia de iones simple o facilitada, existen pocos reportes sobre transferencia de electrones a través de la interfaz líquido/líquido <sup>44</sup>. Las principales dificultades que surgen cuando se pretende identificar un proceso de transferencia electrónica se deben a la elección del sistema bajo estudio, como la estabilidad de las especies redox en cada fase y la naturaleza de los electrolitos soporte, ya que pueden involucrar reacciones redox paralelas.

## 2.5. Interfaz agua/ aire

En el seno de un líquido (por ejemplo, agua), las moléculas que lo componen están rodeadas de otras de su misma especie, y las fuerzas de interacción entre ellas son iguales en todas las direcciones. Sin embargo, las moléculas que se encuentran en la superficie del líquido (así como ocurre en la interfaz entre dos líquidos inmiscibles) están sujetas a una fuerza neta, porque las fuerzas de atracción ejercidas por las moléculas del seno del líquido son diferentes a las ejercidas por las de la fase vapor (Figura 2.5). Este desbalance de fuerzas se traduce en una energía libre de Gibbs interfacial. Como la energía libre de las moléculas en la interfaz es mayor que en el seno de la solución, el líquido tiende a contraerse para minimizar la superficie expuesta. Una expansión de dicha superficie de contacto ( $\Delta A$ ) requiere de un trabajo proporcional a dicha expansión ( $W$ ) de acuerdo a:

$$W = \gamma \cdot \Delta A \qquad \text{Ec. 2.13}$$

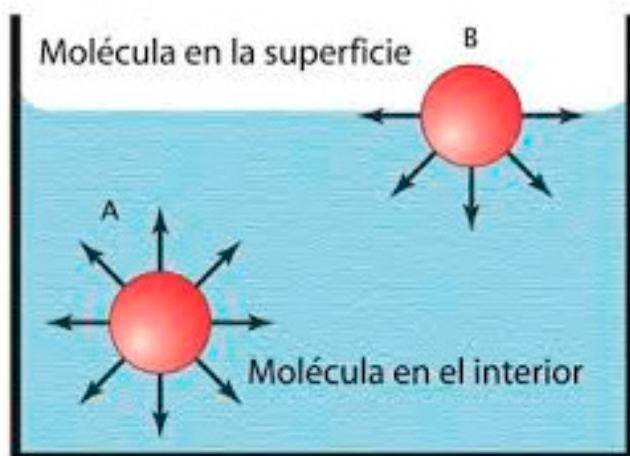
Donde  $\gamma$  es la tensión superficial y tiene unidades de [fuerza]/[longitud] (ej.: N/m). Cuanto menor es  $\gamma$ , menor es el trabajo necesario para aumentar la superficie.

Las moléculas de naturaleza anfifílica, pueden concentrarse en la superficie formando películas mono o multimoleculares disminuyendo la tensión superficial y generando una presión superficial “ $\pi$ ”, que se define como:

$$\pi = \gamma^0 - \gamma \quad \text{Ec. 2.14}$$

donde  $\gamma^0$  es la tensión superficial del líquido puro y  $\gamma$  es la tensión superficial en presencia de la película. De esta manera, un aumento de  $\pi$  involucra una disminución de  $\gamma$ . Puede decirse que la presión superficial es una medida de la energía cohesiva presente en la interfaz.

Cualquier sustancia tensioactiva tiende a acumularse en la interfaz aire-agua formando películas monomoleculares que se denominan monocapas. Dependiendo de la naturaleza y concentración de la sustancia tensioactiva, estas películas serán expandidas o condensadas. Las sustancias de alto peso molecular con actividad interfacial, como proteínas y polisacáridos, pueden acumularse en la interfaz gracias a que presentan en su estructura cantidades significativas de grupos polares y nopolares. Sin embargo, si se alcanza una determinada concentración se pueden formar agregados en la solución. En este punto se da un equilibrio entre las moléculas que hay en solución y las que permanecen adsorbidas en la superficie. Además, dichas interacciones dependerán del pH, la fuerza iónica, la temperatura, y la composición de la subfase acuosa.



**Figura 2.5:** Fuerzas de interacción entre moléculas en el seno de la solución (A) y la interfaz (B).

## 2.6. Bibliografía

- [1] W. Nernst, E.H. Riensenfield. *Annals of physics* 8 (1902)600-605.
- [2] M. Z. Crème. *Journal of biology* 47 (1906) 562-568.
- [3] E. J W. Vervey, K. F. Niessen *Philosophical magazine* 28 (1939) 435-440.
- [4] C. Gavach., *Experientia* 18 (1970) 321-326.
- [5] C. Gavach, A. Savajols. *Electrochim. Acta* 19 (1974) 575-579.
- [6] C. Gavach, P. Set, F. Henry. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1 (1974) 361-369.
- [7] C. Gavach, F. Henry. *J. Electroanal. Chem.* 54 (1974) 329-335.
- [8] J. Koryta, P. Vanysek, M Brezina. *J. Electroanal. Chem*, 67 (1976) 263-268.
- [9] J. Koryta, P. Vanysek, M Brezina. *J. Electroanal. Chem*, 67 (1977) 211-218.
- [10] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 3rd edn, 2006.
- [11] G. Herzog. *Analyst*, 2015,140, 3888-3896.
- [12] D. W. Kimmel, G. Leblanc, M. E. Meschievitz , D. E. Cliffel, *Anal. Chem* 84 (2012) 685–707.
- [13] R. Ishimatsu, A. Izadyar, B. Kabagambe, Y. Kim, J. Kimand S. Amemiya, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 16300–16308.
- [14] A. Mastouri, S. Peulon, N. Bellakhal, A. Chaussé. *Electrochim. Acta* 130 (2014) 818–825.
- [15] P. Elsamadisi, Y. Wang, J. Velmurugan, M. V. Mirkin. *Anal. Chem.* 83 (2011) 671–673.

- [16] S. O'Sullivan, D. W. M. Arrigan. *Electrochim. Acta.* 77 (2012), 71–76.
- [17] M. Sairi, N. Chen-Tan, G. Neusser, C. Kranz. D. W. M. Arrigan, *ChemElectroChem.* 2 (2015) 98–105.
- [18] M. A. Méndez, R. Partovi-Nia, I. Hatay, B. Su, P. Ge, A. Olaya, N. Younan, M. Hojeij, H. H. Girault. *Phys.Chem. Chem. Phys.* 12 (2010),15163–15171.
- [19] R. Matsui, T. Sakaki, T. Osakai, *Electroanalysis.* 24 (2012),2325–2331.
- [20] G. A. Crespo, M. G. Afshar, D. Dorokhin, E. Bakker. *Anal. Chem.* 86 (2014)1357–1360.
- [21] R. Matsui, T. Sakaki, T. Osakai, *Electroanalysis.* 24 (2012), 1164–1169.
- [22] L. Poltorak, M. Dossot, G. Herzog, A. Walcarius. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014), 26955-26962.
- [23] L. Poltorak, K.Morakchi, G. Herzog, A. Walcarius .*Electrochimica Acta* 179 (2015) 9 - 15.
- [24] D. S. Silvester, *Analyst*, 2011,136, 4871-4882
- [25] Z. Xianlong, D. Wu, Y. Yanxin, L. Jichao, H. Na, W. Honglun, L. Guoliang, W. Yongning, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 121, (2019), 115668
- [26] C. Gavach, P. Seta, B. D'Epenoux, 1977, 83, (2), 225-235.
- [27] Z. Samec, V. Marecek, D. Homolka, 1985, 187, (1), 31-51.
- [28] W. Schmickler, *Chem Phys*, 141 (2001); 95-99
- [29] I. Benjamin, *J. Chem. Phys*, 96 (1992), 577-585.
- [30] J. Strutwolf, A. L. J. Chem. Phys Barker, M. Gonsalves, D. J. Caruana, P. R. Unwin, D. E. Williams, J. R. P. Webster, *J. Chem. Phys*, 483, (2015), 163-173.
- [31] R. D. Webster, D. Beaglehole, *Physical Chemistry Chemical Physics* 24 (2000), 5660-5666.
- [32] D Michael, I. Benjamin, *Journal of Physical Chemistry* 99, (1995), 1530-1536.
- [33] G. Luo, S. Malkova, J. Yoon, D. G. Schultz, B. Lin, M. Meron, I. Benjamin, P. Vanýsek, M. L. Schlossman, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 593, (2006), 142-158.
- [34] C. M. Pereira, F. Silva, M. Sousa K. Kontturi, L. Murtomäki, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 509, (2001), 148-154.
- [35] M. Tomic, N. Kallay, *The Journal of Physical Chemistry* 96, (1992), 3874-3882.
- [36] A. M. Carmona-Ribeiro, B. R. Midmore, B. R., *The Journal of Physical Chemistry* 96, (1992), 3542-3547



- [37] J. C. Franklin, D. S. Cafiso, R. F. Flewelling, W. L. Hubbell, *Biophysical Journal* 64, (1993), 642-653.
- [38] A. Maitra, T. K Jain, Z. Shervani, Z. , *Colloids and Surfaces* 47 (1990), 255-267.
- [39] H. H. Girault, D. J. Schiffrin, *Electrochimica Acta* 31, (1986), 1341-1342.
- [40] J. Koryta, J., *Electrochimica Acta* 24, (1979), 293-300.
- [41] Y. Shao, M. D. Osborne, H. H. Girault, H. H. , *Journal of Electroanalytical Chemistry* 318, (1991), 101-109.
- [42] S. Lin, Z. Z., H. Freiser, *J. Electroanal. Chem* 210, (1986), 137-146.
- [43] T. Kakutani, Y. N., T. Osakai, M. Senda, , *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 59, (1986),781.
- [44] B. Quinn . *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 438 (2000) 124-134

---

# Capítulo 3

## Comportamiento de surfactantes en solución y en interfaces

---

## 3.1 Introducción

El término surfactante es un neologismo adaptado de las palabras inglesas “Surface active agent”. Los surfactantes son moléculas anfífilas, ya que poseen una región polar o soluble en agua (cabeza polar) y una región no-polar generalmente formada por cadenas carbonadas (cadenas hidrofóbicas)<sup>1</sup>. Estas características de las moléculas de surfactantes les dan una gran variedad de propiedades, conectando dos características claves: adsorción en interfaces y auto-organización en solución.

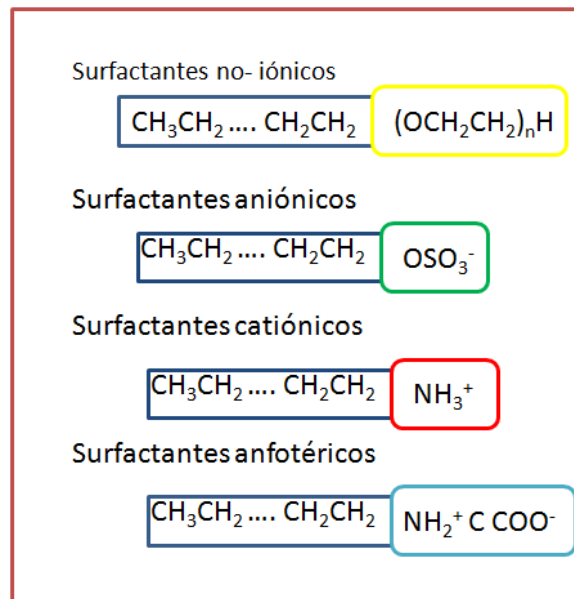
Los surfactantes constituyen una gran gama de productos químicos utilizados a nivel industrial como agentes de limpieza en jabones y detergentes, así como en preparaciones de cosméticos, fármacos, productos alimentarios y en procesos industriales como la petroquímica, cromatografía, análisis de suelos, catálisis, entre otras. Su amplio uso se debe a su notable influencia en las propiedades de superficie e interfaz<sup>2</sup>.

Laughlin define a los surfactantes como: un anfífilo que disminuye la tensión superficial y que, además, forma agregados coloidales, ya sean cristales líquidos o micelas, en presencia de cantidades variables de agua<sup>3</sup>. En la actualidad el término surfactante hace referencia al conjunto de sustancias que, estando en bajas concentraciones en un sistema, tiene la propiedad de adsorberse en la superficie o interfaz de ese sistema y alterar marcadamente la tensión superficial o interfacial, dependiendo de cuál sea el caso<sup>4</sup>.

Existen diversas clasificaciones para los surfactantes, una de las más aceptadas los diferencia entre iónicos y no-iónicos, propuesta por Y.Nakama<sup>5</sup>.

Los surfactantes **no-iónicos** no se disocian en iones en solución acuosa, mientras que los iónicos sí lo hacen y se subclasifica según el tipo de su grupo hidrofílico. Los surfactantes **aniónicos** donde el grupo hidrofílico se disocia en aniones en solución acuosa, surfactantes **catiónicos** que se disocian en cationes y surfactantes **anfotéricos** que se disocian en aniones y cationes dependiendo del pH.

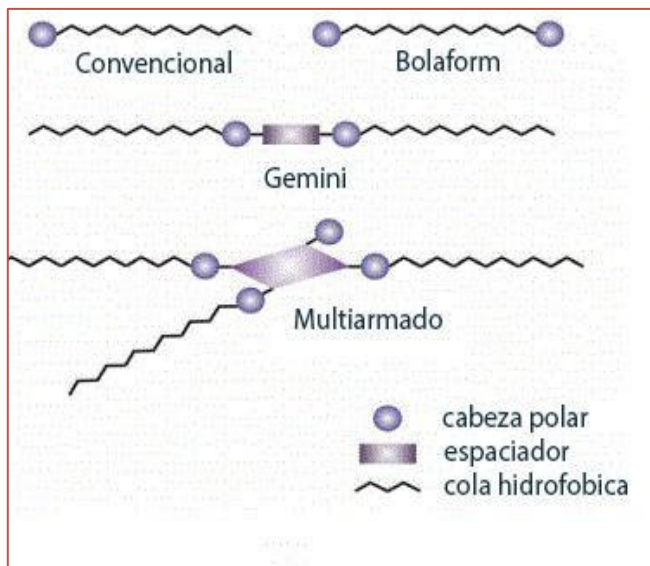
Algunos grupos hidrofílicos comunes son: carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ), sulfatos ( $-\text{OSO}_3^-$ ), sulfonato ( $\text{SO}_3^-$ ), carboxibetaína ( $-\text{NR}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ), sulfobetaína ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$ ) y amonio cuaternario ( $-\text{R}_4\text{N}^+$ ). En la Figura 3.1 se muestra una representación esquemática de cada tipo de surfactante.



**Figura 3.1** Clasificación de los surfactantes en función de su grupo polar.

Otra clasificación complementaria surge en base al desarrollo de nuevos surfactantes que poseen más de un grupo polar y más de una cadena hidrofóbica. Dependiendo de la cantidad de cadenas hidrofóbicas y de su disposición geométrica, se clasifican en cuatro grupos de surfactantes<sup>6</sup> (Figura 3.2):

- ❖ **Surfactantes convencionales:** Presentan una estructura clásica compuesta de un grupo iónico o polar y una cadena hidrofóbica.
- ❖ **Surfactantes bolaform:** Compuestos por dos cabezas hidrofílicas unidas por una o varias cadenas hidrofóbicas. Presentan actividad biológica y son promotoras de la formación de monocapas ultrafinas.
- ❖ **Surfactantes gemini:** Compuestos diméricos con dos cadenas hidrofóbicas y dos grupos iónicos unidos por un espaciador (rígido o flexible). Estos compuestos exhiben una variedad única de propiedades de agregación y de actividad superficial, se encuentran entre las sustancias químicas más versátiles, como potenciales vehículos para el transporte de moléculas bioactivas.
- ❖ **Surfactantes multiarmados polivalentes:** Poseen múltiples cadenas hidrofóbicas y varios grupos hidrofílicos interconectados por un espaciador múltiple rígido o flexible.



**Figura 3.2** Clasificación complementaria de los surfactantes en función de su geometría.

Se han desarrollado diversas metodologías para la síntesis de surfactantes, entre las cuales se puede mencionar las técnicas químicas<sup>7-9</sup>, las que utilizan fuentes renovables<sup>10,11</sup> o bien por síntesis de microorganismos<sup>12,13</sup>(biosurfactantes).

Existe un gran interés por los sistemas micelares debido a sus diversas aplicaciones industriales, así como su uso como modelos de sistemas biológicos, lo cual justifica ampliamente el estudio del comportamiento de surfactantes en solución, en interfaces y posterior caracterización de sus agregados.

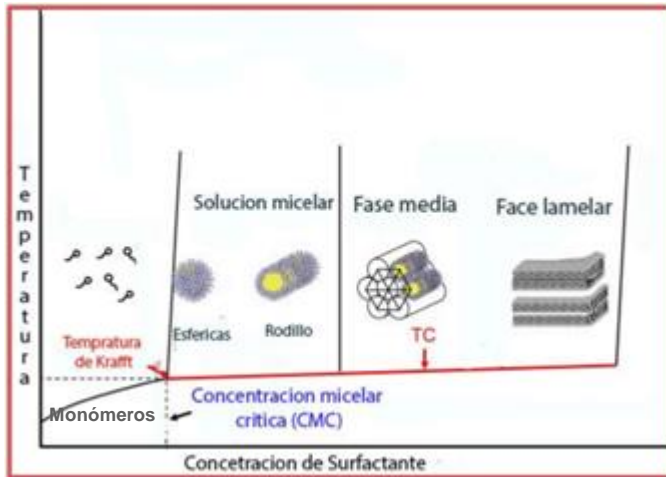
En las secciones posteriores de este capítulo se describen las propiedades fisicoquímicas de los surfactantes y su comportamiento en solución (sección 3.2); la adsorción de estas moléculas sobre interfaces líquido/aire (sección 3.3) y, por último, en la sección 3.4, se mencionan antecedentes del comportamiento electroquímico de surfactantes en interfaces líquido/ líquido.

## 3.2. Comportamiento de surfactantes en solución

Los surfactantes presentes en solución acuosa a bajas concentraciones, se encuentran como especies mono moleculares (monómeros), las cuales se distribuyen de acuerdo a un equilibrio de adsorción entre el seno de la solución y la superficie. Sin embargo existen algunos tipos de tensioactivos que, de acuerdo a su naturaleza, son capaces de formar estructuras de dos o tres unidades de monómeros (dímeros o trímeros)<sup>14</sup>. Este comportamiento se debe principalmente a interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas que componen el surfactante. Si la concentración del surfactante aumenta, se forman agregados de tamaño coloidal constituyendo estructuras auto ensambladas denominadas micelas<sup>15</sup>. El tamaño y forma de estos agregados depende de diferentes factores que serán explicados más adelante. El valor de concentración al cual ocurre la formación de estas estructuras se denomina “Concentración Micelar Crítica” (CMC) y se define como la concentración mínima de surfactante a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una disolución”. Además de estas estructuras se

pueden formar otros tipos de agregados con distintas disposiciones moleculares como vesículas<sup>16</sup>. Puede ocurrir que ante un aumento de la concentración de surfactante o disminución de agua en la solución, se formen estructuras supramoleculares denominadas fases lamelares<sup>17</sup>. La micelización es el resultado de dos efectos opuestos: por un lado, las cadenas tienden a autoensamblarse para evitar el contacto con el agua (efecto hidrofóbico), y por otro lado, la proximidad de las cabezas polares al formarse la micela, conduce a su desestabilización debido a las repulsiones electrostáticas<sup>18</sup>. Si el efecto hidrofóbico es mayor, la disposición del surfactante será la que minimice el grado de contacto de las cadenas con las moléculas de agua, resultando en la formación de la micela<sup>19</sup>. Es decir, la fuerza impulsora para que ocurra la micelización es el efecto hidrofóbico, que a su vez dependerá principalmente de la naturaleza del surfactante<sup>20</sup>. Cabe aclarar que las micelas no son entidades estáticas, sino que están en constante equilibrio con los monómeros que las componen en solución.

En la Figura 3.3, se esquematiza el comportamiento de surfactantes en solución en función de su concentración en el medio y de la temperatura.



**Figura 3.3** Comportamiento del surfactante en solución. Formación de diferentes estructuras dependiendo de la concentración y la temperatura. Figura adaptada de la cita bibliográfica<sup>23</sup>

Como se observa, además de la concentración, la temperatura juega un papel importante con respecto a la formación de agregados. Existe una temperatura crítica, de forma similar a lo que ocurre con la CMC, necesaria para que se formen micelas, por encima de la CMC. Es decir, debajo de esta temperatura, denominada temperatura de Krafft<sup>21</sup>, no se forman micelas. Todos los surfactantes iónicos tienen una temperatura de Krafft<sup>22</sup>.

Con el objeto de sistematizar la relación entre la estructura de los surfactantes y la conformación de estructura micelar generada, se introduce el parámetro de empaquetamiento crítico, Cpp (por sus siglas en inglés critical packing parameter). Este parámetro permite realizar una estimación teórica de la geometría del agregado y se define como:

$$C_{pp} = \frac{v}{a_o l_c} \tag{Ec. 3.1}$$

Donde,  $v$  es el volumen ocupado en la micela por la parte lipofílica del surfactante,  $l_c$  es el largo promedio de la cadena hidrofóbica y  $a_o$  es el área óptima disponible por molécula de sustancia anfifílica. El valor del área, que da la menor entalpía libre por molécula, depende tanto de las características geométricas de la molécula como de la temperatura, de la concentración de la sustancia anfifílica y de la



fuerza iónica del medio. Para el caso de cadenas hidrocarbonadas saturadas se han desarrollado las siguientes relaciones:

$$v = 27,4 + 26.9n \quad \text{Ec. 3.2}$$

$$l_c = 1,5 + 1,265n \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde  $n$  es el número de átomos de la cadena. En función del valor de  $C_{pp}$  que se obtenga a partir de la Ec 3.1 se puede estimar el tipo de estructura que forma un determinado surfactante <sup>23</sup>. En la tabla 3.1 se muestran valores de  $C_{pp}$  con su correspondiente forma geométrica.

Anfililo	Parámetro Crítico de Empaquetamiento	Forma Crítica de Empaquetamiento	Estructuras Formadas
Anfililos de una cadena y cabeza polar grande	< 0,33		Micela Esférica 
Anfililos de una cadena y cabeza polar pequeña	0,33 – 0,5		Micela Cilíndrica 
Lípidos de doble cadena y cabeza polar grande	0,5 – 1,0		Liposoma 
Lípidos de doble cadena y cabeza polar pequeña	1,0		Bicapa Lipídica 
Anfililos de cabeza polar pequeña y cadenas de gran volumen	> 1,0		Micela Invertida 

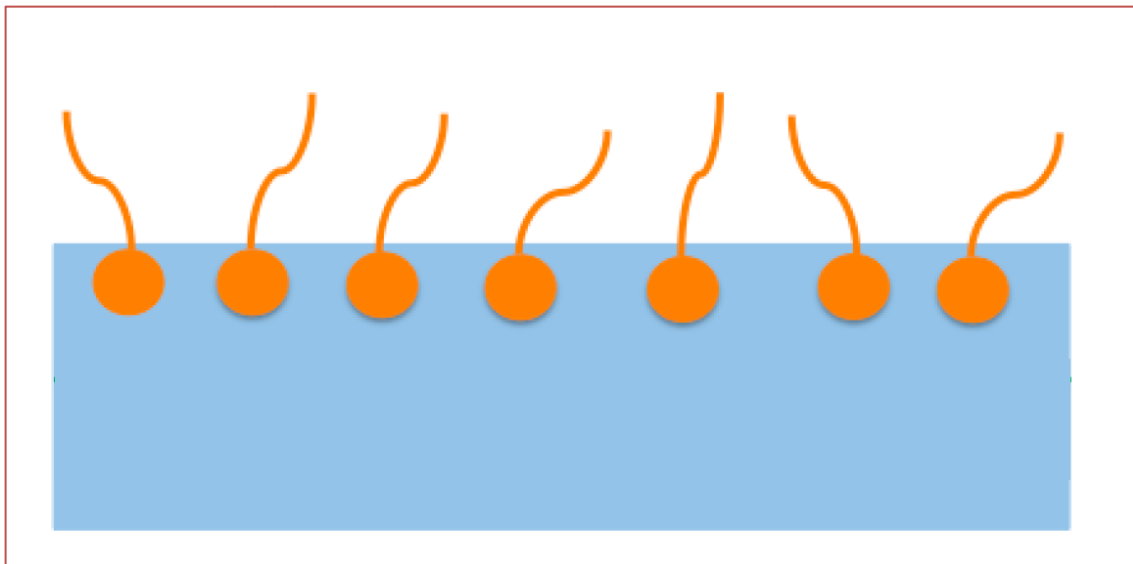
**Tabla 3.1** Conformaciones esperadas de los surfactantes en función del valor del parámetro de empaquetamiento crítico. Figura extraída de la cita <sup>23</sup>

### 3.3. Adsorción de surfactantes en interfaces

#### líquido / aire

La tensión superficial de un líquido en una interfaz líquido / gas es la energía libre de superficie por unidad de área (mientras que, por convención, la tensión interfacial se refiere a interfaces líquido-líquido o líquido-sólido). La tensión superficial del agua pura es de aproximadamente  $72 \text{ mN m}^{-1}$  a 298 K.

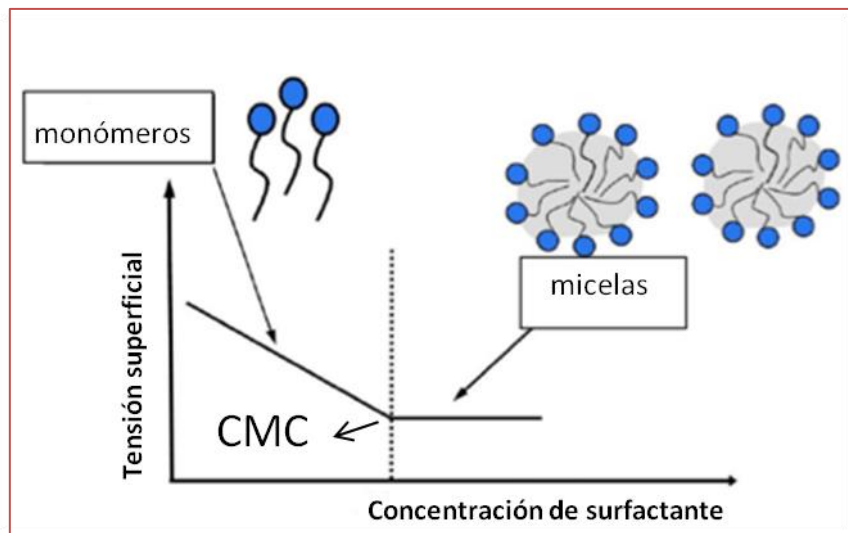
En la Figura 3.4, se muestra la disposición que adoptan los surfactantes cuando se adsorben en la interfaz agua/aire. Como se observa, las moléculas de tensioactivo se ubican con las cabezas polares hacia la fase acuosa y las cadenas hidrofóbicas hacia el aire.



**Figura 3.4** Disposición de los surfactantes en la interfaz líquido/ aire. Los grupos polares se orientan hacia el líquido y las cadenas hidrofóbicas hacia el aire.

Los surfactantes, como se mencionó anteriormente, disminuyen la tensión superficial de la interfaz agua/ aire. De esta manera disminuyen el trabajo requerido para expandir dicha superficie. Una de las propiedades más comunes a la hora de caracterizar un surfactante, es el grado de disminución de la tensión superficial que produce en la interfaz agua/aire<sup>24</sup>.

En la Figura 3.5, se muestra el cambio en la tensión superficial conforme aumenta la concentración de surfactante. La tensión superficial se reduce a medida que las moléculas de surfactante se adsorben a la interfaz agua/aire<sup>25</sup>. Este comportamiento cambia cuando se alcanza la CMC, en este punto el número de moléculas de surfactante absorbidas en la interfaz permanece constante en la interfaz, ya que en solución se establece el equilibrio monómero  $\rightleftharpoons$  micela y, por tanto, la tensión superficial no cambia, observándose la meseta de la Figura 3.5. El valor de tensión superficial donde esto ocurre se denomina  $\gamma_{CMC}$ .



**Figura 3.5** Determinación de concentración micelar crítica (CMC) a partir del cambio en la tensión superficial.

Estudiando el comportamiento interfacial de los surfactantes, es posible obtener información importante sobre sus interacciones, formación de agregados, cinética de las reacciones químicas y de procesos tanto en superficie como en solución<sup>26</sup>. Estos aspectos son muy importantes ya que tienen un estrecho vínculo con las diversas aplicaciones tecnológicas de estas moléculas, entre las cuales se destaca la producción de emulsificados en la industria farmacéutica, alimentaria, minera o de petróleo.

### 3.4. Antecedentes del estudio de surfactantes en interfaces líquidas

El comportamiento de surfactantes en interfaces líquido/ líquido, es similar al observado en interfaces líquido/ aire. En este caso, el surfactante se adsorbe en la interfaz con las cabezas polares orientadas hacia la fase acuosa y las cadenas hidrofóbicas hacia la fase orgánica, disminuyendo la tensión interfacial. La arquitectura del surfactante y su rigidez son las principales características que controlan su comportamiento interfacial<sup>25</sup>.

Existen antecedentes del estudio de surfactantes en interfaces líquido/ líquido, siendo las más numerosas aquellas en las cuales se utilizan moléculas de fosfolípidos<sup>27,31</sup>, debido a su interés tanto en el campo industrial como académico, ya que las monocapas de fosfolípidos pueden adoptarse como modelos simplificados de membranas biológicas. La transferencia de iones a través de la interfaz entre dos soluciones de electrolitos inmiscibles (ITIES) ha recibido un interés creciente en el campo de la electroquímica, extracción líquido/líquido y transporte de membrana<sup>32</sup>. El empleo de surfactantes en ITIES permite la detección de moléculas de interés, como proteínas, péptidos, aminoácidos,

fármacos, neurotransmisores o ADN ya que se adsorben en la interfaz, interaccionan con la molécula de interés y amplifican la señal electroquímica <sup>33</sup>.

La detección electroquímica de proteínas en presencia de surfactantes es una de las aplicaciones más recientes en ITIES. En este caso, las proteínas están presentes en la fase acuosa y los tensioactivos aniónicos se disuelven en la fase orgánica. Los surfactantes aniónicos facilitan la transferencia de la proteína a través de la interfaz, dando lugar a una corriente, que puede ser utilizada como señal analítica. Esto se debe a que las moléculas de tensioactivo, actúan como ionóforos permeabilizando la interfaz y de esta manera facilitando la transferencia de las proteínas. La presencia de surfactante mejoró la señal en un factor 6 en comparación con la señal obtenida en ausencia de surfactantes <sup>34</sup>.

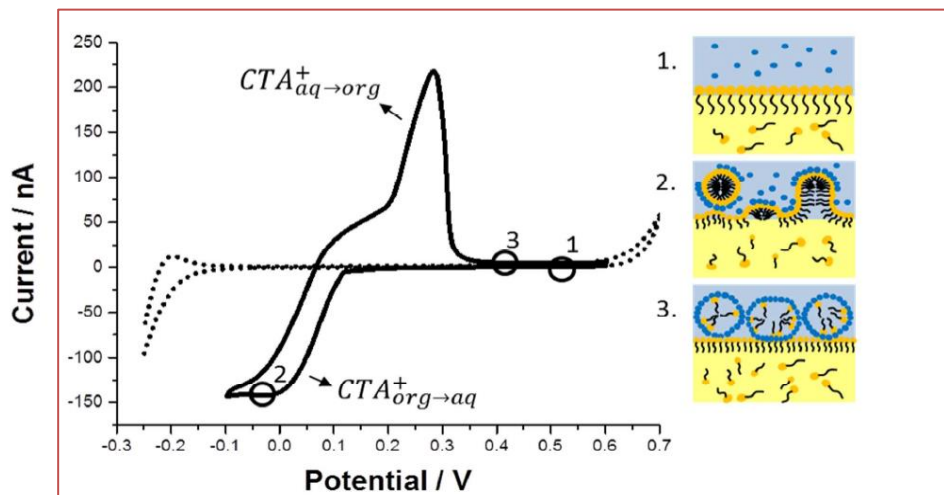
Osaka y colaboradores, han investigado el uso de una variedad de surfactantes para la detección de moléculas biológicas como citocromo c, ribonucleasa A, lisozima, albúmina, mioglobina y  $\alpha$ -lactoalbúmina <sup>35</sup>. Los autores sugieren que los surfactantes aniónicos interactúan con la porción positiva de las macromoléculas biológicas formando pares iónicos en la interfaz que amplifican la señal electroquímica. La técnica empleada en este caso es voltametría cíclica.

Una aplicación muy interesante de los surfactantes en interfaces líquidas es la síntesis de nanopartículas metálicas. Existen numerosos ejemplos recientes de organización de nanopartículas de tamaño uniforme en arreglos ordenados o superestructuras. En estos casos se utiliza el método de autoensamblaje cooperativo asistido por surfactantes que actúan como molde para la formación de nanopartículas <sup>36,37</sup>. Los surfactantes presentes en la fase orgánica migran hacia la interfaz, donde asisten a la formación de nanopartículas hidrofílicas cuyos precursores se encuentran presentes en la fase acuosa. En general, las nanopartículas recubiertas con surfactante quedan así funcionalizadas para aplicaciones específicas.

La voltametría cíclica en las interfaces líquido / líquido también ha demostrado ser una herramienta valiosa para dilucidar la formación de complejos, y para obtener datos termodinámicos y cinéticos de la transferencia de iones. Esta técnica ha permitido estudiar la interacción de polielectrolitos o polímeros con surfactantes en interfaces líquido / líquido. La importancia de conocer estas interacciones radica en las numerosas aplicaciones que involucran a ambos tipos de moléculas, como liberación controlada de drogas, productos alimenticios o de cuidado personal, entre otras <sup>38</sup>. En estos estudios, el análisis se basa en los cambios producidos por la presencia de polímero en la corriente voltamétrica de transferencia a través de una monocapa de surfactantes (fosfolípidos) adsorbida en la interfaz. Esta técnica permitió dilucidar que el efecto hidrofóbico juega un papel importante en la formación del complejo entre polímero y surfactantes aniónicos.

Por último, una de las aplicaciones más recientes y con mejor perspectiva del uso de surfactantes en ITIES, es la formación de películas mesoporosas sobre la interfaz. El proceso sol-gel es un método para sintetizar películas cerámicas a partir de soluciones acuosas que contienen precursores de alcóxidos metálicos y un molde (template). Este método puede considerarse como un proceso de polimerización orgánico o inorgánico que implica la conversión del precursor en una solución coloidal (sol) y la posterior formación de una red integrada (gel). Se pueden usar varios metales como precursores con lo cual, el proceso sol-gel puede generar una amplia variedad de materiales inorgánicos <sup>39</sup>. En el caso de interfaces líquidas, se puede emplear un proceso similar a lo que ocurre con la técnica de sol-gel: se utiliza un precursor alcóxido en la fase acuosa, mientras que se agregan surfactantes en la fase orgánica que funcionan como moldes <sup>40</sup>. En la Figura 3.6 se observa el proceso para la formación de películas sol-gel inducidas mediante voltametría cíclica, a partir de tetraetóxido de silicio (TEOS) presente en la fase acuosa, utilizado como precursor, y el surfactante cetil trimetil amonio (CTA<sup>+</sup>) presente en la fase orgánica. El esquema a la derecha en la Figura 3.6 representa los mecanismos que

ocurrirían en la interfaz durante la formación de la superficie mesoporosa en distintas regiones de potencial. En el cuadro 1, al comienzo de la polarización, el precursor está disuelto en la fase acuosa y el surfactante está adsorbido en la interfaz. En el cuadro 2, correspondiente a un potencial aplicado igual a 0,1 V comienza la transferencia del surfactante desde la fase orgánica a la fase acuosa (pico negativo en el voltograma), en este punto la concentración de surfactante en la región cercana a la interfaz es superior a la CMC, con lo cual se forman micelas. Cómo estas estructuras tienen carga positiva aceleran la condensación de los precursores negativos, es decir las micelas actúan como moldes. En el cuadro 3, se invierte el barrido de potencial hacia potenciales más positivos y se observa un pico positivo, correspondiente a la transferencia del surfactante desde la fase acuosa hacia la orgánica. La interfaz estará completa con la película de silica luego de un ciclo. Existen numerosas aplicaciones para superficies mesoporosas, entre las cuales podemos mencionar: sensado de drogas de interés farmacéutico <sup>41</sup>, biosensores <sup>42</sup>, fotoelectroquímica <sup>43</sup>, celdas solares <sup>44</sup>, adsorción de nanopartículas<sup>45</sup>, entre otras.



**Figura 3.6.** (A) Voltametría cíclica durante la electrogeneración de silica gel en ITIES. Fase acuosa: 50 mM TEOS y 5 mM NaCl a pH = 9.5; fase orgánica: 10 mM BTPPA<sup>+</sup>TPBCl<sup>-</sup> y 14 mM CTA<sup>+</sup>TPBCl<sup>-</sup>; velocidad de barrido 5 mV s<sup>-1</sup>. Formación de silica: (1) comienzo de polarización, no hay transferencia; (2) CTA org $\rightarrow$ ac<sup>+</sup> seguido por el auto ensamblado; (3) Deposición y adsorción interfacial de CTA<sup>+</sup>. Figura extraída de referencia <sup>40</sup>.

En base a lo mencionado en esta sección, existen numerosos antecedentes del empleo de surfactantes en ITIES, sustentando la factibilidad del cumplimiento de los objetivos propuestos en la presente tesis. La mayoría de estos estudios involucran surfactantes, como fosfolípidos, que se absorben espontáneamente a la interfaz sin dar lugar a procesos de transferencia de carga. Su aspecto más estudiado ha sido el efecto que producen sobre la transferencia de iones, o bien su capacidad de interactuar con otras moléculas. En el presente estudio de tesis se pretende avanzar sobre este conocimiento analizando el comportamiento de surfactantes cuya adsorción y posterior transferencia genera corriente de transferencia de carga, poniendo énfasis en la caracterización del proceso electroquímico.

### 3.5. Bibliografía

- [1] A. Czajka, J. Eastoe. *Langmuir* 30 (2015) 8205–8217
- [2] M. Koolivand-Salookia, A. Javadia, A. Bahramiana, M. Abdollahib. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 562 (2019) 345-353
- [3] R. G. Laughlin. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 1 (1996) 384-390
- [4] M. J. Rosen, J.T. Kunjappu *Surfactants and Interfacial Phenomena* (4th ed.) (2012).
- [5] Y. Nakama. *Cosmetic Science and Technology* 15 (2017) 231-244.
- [6] M.C. Murguía, L.M. Machuca, M.C. Lurá, M.I. Cabrera, R.J. Grau, *J Surfact Deterg* 11 (2008) 223.
- [7] P.M. Murphy, C.S. Baldwin, R.C. Buck. *J. Fluorine Chem.* 138 (2012) 3-23
- [8] D. Zhangab, M. Renming, P. Xiangyang, L. Ping, X.B. Jiangab. *Journal of Fluorine Chemistry* 219 (2019) 62-69
- [9] W. LiuLiang, Z. Wenbao, L. Ting-Yang, H. Duan. *Minerals Engineering Volume* 134, (2019) 394-401
- [10] A.M. Rabiú, S. Elias, O. Oyekola. *Energy Procedia*. 100 (2016), 188-192.
- [11] F. A. de Freitas, D. Keils, E. R. Lachter, C. E. B. Maiac, M. I. Pais da Silva, R. S. V. Nascimento. *Fuel. System* 241 (2019) 1184-1194.
- [12] A. K. Nogueira, F. Jeferson, J. L. Martins, J. G. Lima, A. M. Estela, A.G. Kênia, F.C. Vânia, M. M. Meloc, O. Deusdênia, L. Pessoa, M. Valderez, P. Rocha, L. Rocha Barros G. R. S. S. Aguiara. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 175 (2019) 256-263
- [13] R. Sharma, J. Singh, N. Verma. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 16 (2018) 132-139
- [14] L. J Cline, J. G., Habarta, J. G. Dorsey. *Anal. Chem.* 56 (1984) 11-15
- [15] J. W. Mc Bein. *Colloids and their viscosity Discussion*. 9 (1913) 99-101
- [16] F.M. Menger, R. Zana, B. Lindman. *Journal of Chemical Education*, 75 (1998) 115–115



- [17] K. Danov, P. Kralchevsky, S. Stoyanov, J. Cook, I. Stott. *Advances in Colloid and Interface Science*. 256 (2018) 1-22.
- [18] V. Peyre. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 14 (2009) 305–314
- [19] E. Summerton E, G. Zimbitas, M, Britton M, S. Bakalis, *Trends in Food Science & Technology*. 60 (2017) 23-30
- [20] L. Maibaum, A.R. Dinner, D. Chandler. *Journal of Physical Chemistry B*. 08 (2004), 6778-6781
- [21] J.Z. Manojlovic. *Thermal Science*. 16 (2012), 631-640
- [22] C. Vautier-Giongo, B.L. Bales. *Journal of Physical Chemistry B*. 107 (2003) 5398-5403
- [23] K. Holmberg, D.O. Shah, M.O. Schwuger (Eds.), *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*, 1, John Wiley & Sons, New York, NY (2002)
- [24] R. M. Manglik, M.W. Wasekar, J, Zhang. *Exp. Therm. Fluid Sci*. 25 (2001) 55-64.
- [25] H. Popovaa, A. Milcheva, S. A. Egorov. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 519 (2017) 168-178
- [26] R. Miller, E. Aksenenko, V. Fainerman, *Advances in Colloid and Interface Science*. 247 (2017) 115–129
- [27] T. Kakiuchi, M. Chiba, N. Sezaki, M. Nakagawa. *Electrochemistry Communications*. 4 (2002) 701–704
- [28] T. Kakiuchi. *J. Electroanal. Chem*. 496 (2001) 137–142
- [29] B. N. Viada, A. V. Juárez, E. M. Pachón Gómez, M. A. Fernández, L. M. Yudi. *Electrochimica Acta*. 263 (2018) 499-507
- [30] M. C. Collins, M. Hébrant, G. Herzog. *Electrochimica Acta*. 282 (2018) 155-162
- [31] L. Poltorak, K. Morakchi, G. Herzog, A. Walcarius. *Electrochim Acta*. 179 (2015) 9-15
- [32] M. Sairiab, D. W.M. Arrigan. *Talanta* 132 (2015) 205-214
- [33] G. Herzog. *Analyst*. 140 (2015) 3888-3995
- [34] S. O’Sullivan, D. W. M. Arrigan. *Anal. Chem*. 85 (2013) 1389–1394.
- [35] T. Osakai, Y. Yuguchi, E. Gohara and H. Katano. *Langmuir* 26 (2010) 11530–11537
- [36] W. Wei, F. Bai, H. Fan. *Iscience* 23425 (2019) 272-293
- [37] T. Feng. *Physical Chemistry Commons: Doctoral Dissertations*. 4 (2016) 646-651.
- [38] J. S. Riva, K. Bierbrauer, D. M. Beltramo, L. M. Yudi. *Electrochimica Acta* 85 (2012) 659–664
- [39] S. Wang, P. Wang, I. Hsieh, C. Hsieh. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 1 (2018) 1–6.
- [40] L. Poltorak, A. Gamero-Quijano, G. Herzog, A. Walcarius. *Applied Materials Today*. 9 (2017) 533-550
- [41] D. Li *Journal of Bionic Engineering* 14 (2017) 672-679
- [42] A. Walcarius. *Current Opinion in Electrochemistry* 10 (2018) 88-97
- [43] L. Poltorak, M. Hébrant, M. Afsharian, M. Etienne, G. Herzog, A. Walcarius. *Electrochimica Acta* 188 (2016) 71-77
- [44] S. Santhaveesuk, T. Srimaha. *Materials Today: Proceedings*, 5 (2018) 14105-14109
- [45] J. Tang, A. Gomez. *Aerosol Science and Technology*. 51 (2017) 755-765

---

# Capítulo 4

Técnicas experimentales.  
Reactivos químicos

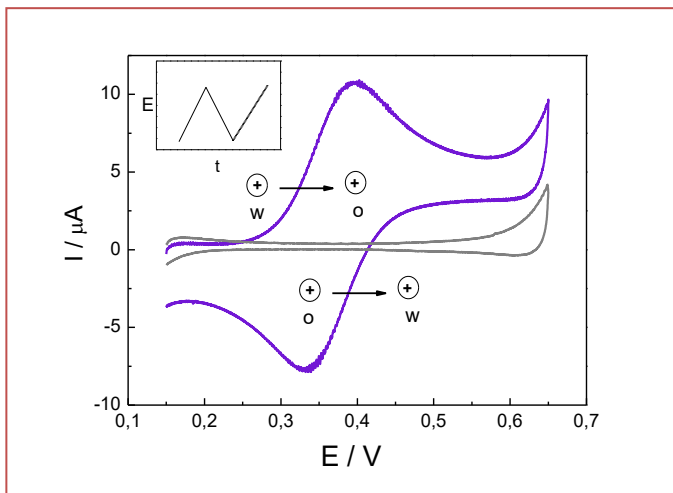
---

## 4. Técnicas Experimentales

### 4.1. Voltametría Cíclica en interfaces líquidas

De manera similar a la voltamperometría cíclica en interfaces electrodo/ solución, se aplica un barrido triangular de potencial a la interfaz líquido/líquido, por medio de dos electrodos de referencia sumergidos en cada fase, mientras se registra la corriente que circula a lo largo del sistema, la cual es detectada por dos contraelectrodos, uno en cada fase. El barrido triangular de potencial parte desde un valor inicial  $E_i$ , y nuevamente aumenta linealmente con el tiempo hasta un valor final  $E_f$ , para luego disminuir nuevamente hasta un valor que puede ser igual o diferente que  $E_i$ . La variación de  $E$  con el tiempo se realiza a una determinada velocidad de barrido.

Los registros de la variación de la corriente en función del potencial aplicado, Figura 4.1, se denominan voltagramas o voltamperogramas. En el recuadro de dicha Figura se muestra la señal de potencial aplicado.



**Figura 4.1:** Respuesta voltamperométrica para la transferencia de una especie catiónica desde la fase acuosa a la orgánica.

Al aplicar el barrido triangular de potencial en un sistema en el cual ambas fases sólo contienen los electrolitos soporte, se produce el cargado de la doble capa eléctrica, lo que origina una corriente no faradaica. Cuando el potencial aplicado es lo

suficientemente elevado como para producir la transferencia de los iones del electrolito soporte desde una fase a la otra, se observa un aumento de la corriente faradaica, a potenciales extremos, limitando la ventana de potencial de trabajo. Dentro de esta ventana de potencial la interfaz se comporta como un electrodo idealmente polarizable (—, Figura 4.1). Si en una de las dos fases se encuentra presente una especie cargada semihidrofóbica, en concentración considerablemente menor que el electrolito soporte, con un valor adecuado de energía de transferencia de Gibbs, entonces, a un potencial determinado dentro de la ventana de trabajo, ocurre la transferencia de esta especie, y se observa un aumento de la corriente. A un valor de potencial determinado, la corriente comienza a disminuir, debido a que la cantidad consumida del ion en la interfaz es mayor a la cantidad que llega a ésta por difusión, desde el seno de la solución, dando lugar a la presencia de picos de corriente positivos y negativos en las curvas voltamétricas, los cuales se asocian, entonces, a la transferencia de especies iónicas a través de la interfaz (— Figura 4.1). Los signos de la corriente de transferencia de iones, se encuentran definidos por convención, correspondiendo una corriente positiva a la transferencia de cationes desde la fase acuosa hacia la orgánica ó de aniones en el sentido opuesto, mientras que la corriente negativa corresponde a la transferencia de aniones desde la fase acuosa a la orgánica o de cationes desde la orgánica a la acuosa.

### 4.1.1. Respuesta voltamétrica de procesos de transferencia que involucran especies disueltas

Como se describió en el capítulo 2, el proceso de transferencia de una especie iónica disuelta en una de las fases, a través de la interfaz, involucra varias etapas. En primer lugar, ocurre el transporte de masa de la especie desde el seno de una de las

fases hacia la interfaz, posteriormente, ocurre el proceso de transferencia electroquímica, en el cual la especie iónica atraviesa la interfaz, mediada por la aplicación de potencial, y por último, ocurre la transferencia de masa de la especie en cuestión hacia el seno de la otra fase.

Si la primera etapa es la limitante de la velocidad del proceso global de transferencia, dicho proceso se encuentra controlado por la difusión de la especie desde el seno de su fase de origen, hacia la interfaz. Por otro lado, la transferencia de carga puede ser reversible o irreversible.

En bibliografía se encuentran criterios de diagnósticos para identificar los diferentes procesos electroquímicos que ocurren sobre electrodos sólidos, los cuales también pueden ser utilizados para caracterizar los procesos que ocurren en ITIES <sup>1</sup>.

Los criterios de diagnóstico para un proceso electroquímicamente reversible controlado por difusión son:

- Corriente de pico proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ya que la relación entre estas dos magnitudes está dada por:

$$I_p = 0,4463zFA C_x D_x^{1/2} \left( \frac{zFv}{RT} \right)^{1/2} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde  $I_p$  es la corriente de pico en amperes,  $z$  es la carga de la especie transferida ( $x$ ),  $A$  es el área de la interfaz líquida en  $\text{cm}^2$ ,  $D$  es el coeficiente de difusión del ion  $x$  en  $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  en la fase que corresponda, de acuerdo al signo de la corriente,  $C$  es la concentración de  $x$  en el seno de la fase que se encuentre inicialmente disuelto y  $v$  la velocidad de barrido en  $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ .

- $\Delta E_p = |E_p^+ - E_p^-| = \frac{59}{z} \text{mV}$  , donde  $E_p^+$  y  $E_p^-$  corresponden a los potenciales de pico positivo y negativo.

- $\frac{I_p^+}{I_p^-} = 1$ , donde  $I_p^+$  y  $I_p^-$  corresponden a las corrientes de pico positiva y negativa.
- $E_p$  es independiente de la velocidad de barrido.

La voltametría cíclica puede utilizarse con fines analíticos, ya que si el proceso de transferencia de la especie cargada a través de la interfaz es reversible y está controlado por difusión, la magnitud de la corriente de pico es proporcional a la concentración de la especie transferida en su fase de origen, según la ecuación 4.1. <sup>1</sup>

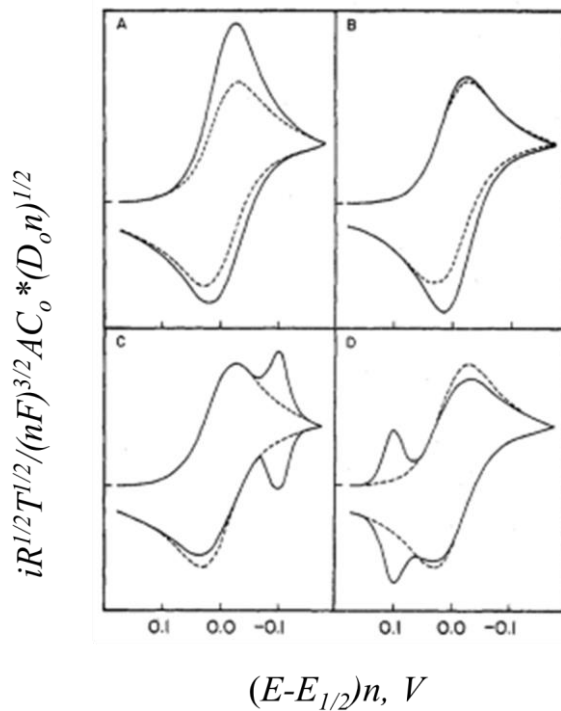
Por otro lado, a partir del valor de potencial al cual ocurre la transferencia de un ion, correlacionado con el máximo de corriente,  $E_p^+$ , se puede obtener el valor del potencial de transferencia estándar  $\Delta_o^w \phi_i^0$ , y por lo tanto, conocer la energía libre de transferencia estándar de dicho ion. Estos parámetros, dependen de la estructura química y de las diferencias en las energías de solvatación de las especies en ambos solventes, y permiten establecer escalas de hidrofobicidad de especies iónicas.

Para un proceso electroquímicamente irreversible, no se observa el pico de corriente en el barrido inverso, lo cual señala la dependencia cinética del proceso de transferencia. Una situación intermedia corresponde a un proceso cuasi-reversible, en el cual la separación en el potencial de los picos aumenta con la velocidad de barrido, indicando la existencia de un control cinético.

### 4.1.2. Respuesta voltamétrica de procesos que involucran especies adsorbidas.

Además de los procesos difusionales descritos en la sección precedente, también pueden ocurrir procesos de adsorción asociados a la transferencia de iones a través de la interfaz líquido/líquido.

Wopschall y Shain <sup>2</sup> describieron diferentes sistemas electroquímicos en los cuales el transporte de masa hacia la interfaz ocurre por difusión, pero además puede tener lugar la adsorción del reactante, del producto, o tanto del reactante como del producto, en la interfaz electrodo-disolución.



**Figura 4.2:** Voltagramas teóricos para casos que involucran adsorción. a) Reactante adsorbido débilmente; b) Producto adsorbido débilmente; c) Reactante adsorbido fuertemente; d) Producto adsorbido fuertemente. Se incluye en línea de puntos (- - -) la respuesta difusional a modo de comparación. Figura extraída de referencia <sup>2</sup>

Estos autores aplicaron un método numérico para caracterizar cuantitativamente los parámetros de adsorción del sistema, y a partir de la correlación entre los parámetros teóricos y experimentales, fue posible desarrollar criterios de

diagnóstico para la caracterización de procesos electroquímicos, a partir de la variación de la forma del pico y de la variación de la corriente con la velocidad de barrido y la concentración. En todos los casos se hace referencia a la siguiente reacción de reducción:



y se designa corriente catódica a la que se produce por la reducción de la especie O, y corriente anódica a la reacción en el sentido contrario.

De esta manera, en el caso en que el reactante O se encuentre adsorbido, el proceso de reducción ocurrirá tanto para la especie O adsorbida como para las que lleguen al electrodo por difusión.

En presencia de una especie débilmente adsorbida (reactante O o producto R), los voltagramas exhiben un aumento de las corrientes de pico debida al material adsorbido, mientras que el potencial de pico es el mismo que se hubiera obtenido para el caso difusional simple (Figura 4.2, curvas a y b). Por otra parte, si el producto o reactante están fuertemente adsorbidos, se observa un segundo pico de corriente, que puede producirse antes o después del pico normal difusional (Figura 4.2, curvas c y d).

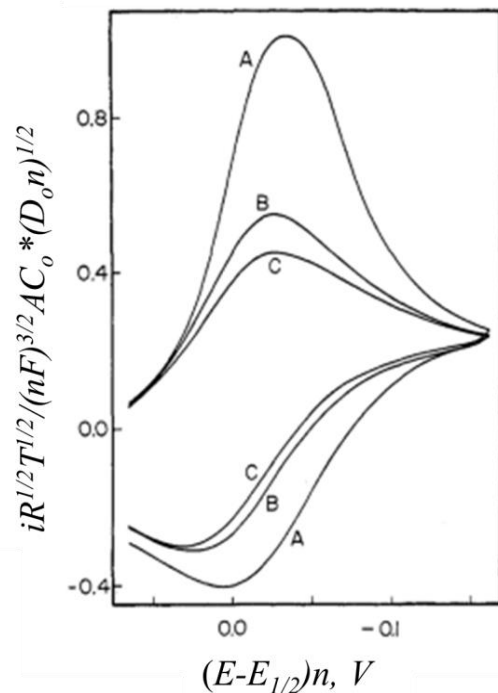
La adsorción débil de reactante (O) conduce generalmente a un aumento de la corriente de pico catódico (barrido directo) respecto de la que se obtendría para el caso difusional, mientras que en el barrido inverso se observa un aumento, aunque no tan pronunciado, de la corriente de pico anódica, como se muestra en la Figura 4.2, curva a, ya que durante el tiempo que transcurre entre el proceso catódico y anódico, la cantidad de especie adsorbida disminuye.

La velocidad de barrido, es probablemente, el parámetro experimental más importante para diferenciar entre los efectos debidos al reactante adsorbido y los debidos a material que llega al electrodo por difusión. Esto es así porque el reactante



adsorbido constituye una cantidad fija de material, mientras que la cantidad de reactante que llega a la superficie del electrodo por difusión, es dependiente del tiempo. A velocidades de barrido suficientemente altas, la cantidad de material que llega al electrodo por difusión es pequeño en relación a la cantidad de material adsorbido que reacciona en la superficie del electrodo, mientras que a bajas velocidades de barrido la cantidad de material aportado por la difusión aumenta. Por lo tanto, un aumento de la velocidad de barrido debe causar aumento en la función corriente, como se muestra en la Figura 4.3. La curva C muestra el caso reversible sin adsorción, mientras que las curvas A y B ilustran el aumento de la función corriente catódica y anódica, ocasionadas por la adsorción de reactante, correspondiendo el voltagrama A, a una mayor velocidad de barrido.

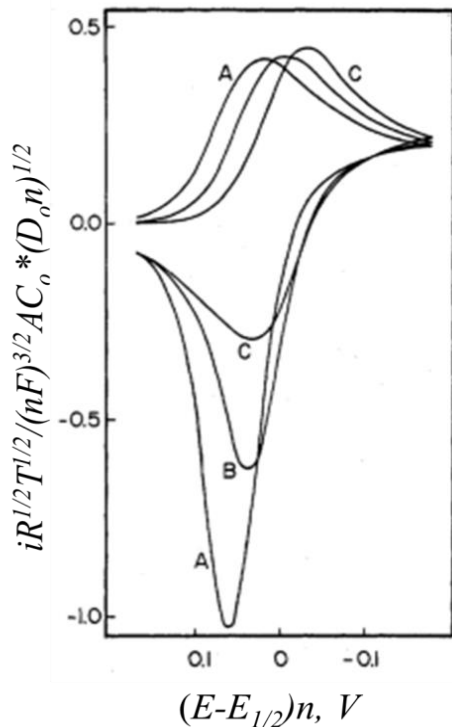
Además de afectar a la altura del pico catódico, la velocidad de barrido también afecta a la altura del pico anódico. El aumento en el pico anódico proviene del material inicialmente adsorbido en la superficie del electrodo, que después de la reducción comienza a difundir hacia la solución. Si la velocidad de barrido es alta, poca cantidad de la especie reducida alcanza a difundir antes de invertir el barrido de potencial. Bajo estas circunstancias, tanto las corrientes de pico anódicas como las catódicas conllevan la contribución del material adsorbido, dando un valor constante para la relación de corrientes de pico anódicas y catódicas ( $i_{pa} / i_{pc}$ ), pero que por lo general no es la



**Figura 4.3:** Voltagramas correspondientes a reactante débilmente adsorbido. Velocidades de barrido relativas: A=2.500, B= 100 y C= 0,1. Figura extraída de referencia <sup>2</sup>

unidad, como sería de esperar para el caso reversible sin adsorción. A velocidades de barrido bajas, la porción de la corriente dependiente de la adsorción, se hace despreciable, y se obtienen los mismos resultados que para un caso reversible sin adsorción, donde  $(ip)_a / (ip)_c$  es igual a 1.

Todos los procesos de adsorción muestran una marcada dependencia no lineal de la corriente con la concentración. A medida que la concentración aumenta, la superficie del electrodo se encuentra casi saturada, y la carga de reducción debida al material adsorbido, se hace constante, mientras que la carga debida al material que llega a la superficie del electrodo por difusión, continúa aumentando con la concentración. Esto hace que la fracción de la corriente de pico debida al material adsorbido, disminuya al aumentar la concentración, y los valores de la corriente se asemejen a los de un caso reversible sin adsorción. Esta es otra regla importante y general para los casos de



**Figura 4.4:** Voltagramas correspondientes a producto débilmente adsorbido. Velocidades de barrido relativas:  $A=4 \cdot 10^4$ ,  $B= 2,5 \cdot 10^3$  y  $C= 1$ . Figura extraída de referencia<sup>2</sup>

adsorción: a medida que la concentración global se incrementa, la adsorción pasa a tener una influencia relativamente menor en los voltagramas. En el presente caso de reactante débilmente adsorbido, para concentraciones altas, el comportamiento se aproxima al de una reducción reversible sin adsorción.

Si el reactante se encuentra fuertemente adsorbido, la reducción del material adsorbido ocurre a potenciales mayores, debido a la estabilización del mismo en la superficie, observándose dos picos de corriente en el voltograma: el

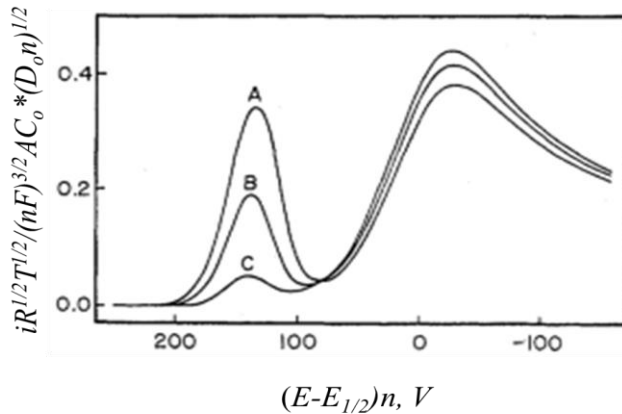
correspondiente a la reducción de O proveniente de la difusión y el debido a la reducción de O absorbido. Un aumento de la energía libre de adsorción, producirá un desplazamiento aún mayor del potencial de reducción de la especie adsorbida.

La adsorción débil de producto influye en el barrido inverso de los voltogramas, y tiene poco efecto en la corriente catódica (Figura 4.4). Por otra parte, el pico anódico aumenta notablemente con la velocidad de barrido y se hace más agudo. Esto es debido a que el producto formado en el barrido catódico se acumula en la superficie del electrodo y se reoxida en el barrido anódico subsiguiente, aumentando la corriente anódica. Como es de esperar, un aumento de la velocidad de barrido conduce a un aumento de la corriente anódica (Figura 4.4 A).

Cuando la reacción del electrodo involucra la adsorción fuerte del producto, el voltograma presenta un pico de adsorción a potenciales menores, respecto del potencial de pico de difusión normal (Figura 4.2, curva D).

A medida que la energía libre de adsorción aumenta, la energía requerida para la reducción del estado adsorbido se reduce junto con el potencial de reducción. Por lo tanto, la separación de picos está determinada principalmente por el valor de energía libre de adsorción, aunque la concentración global también influye. A medida que aumenta el grado de cubrimiento,  $\Gamma$ , se observa un pico de reducción cada vez más estrecho, pero cuya posición no cambia. La corriente de adsorción aumenta linealmente con la velocidad de barrido mientras que la de difusión aumenta con  $v^{1/2}$ , por lo tanto, con el incremento de la velocidad de barrido, la relación de altura entre el pico de adsorción y el de difusión, aumenta. A velocidades de barrido bajas, el comportamiento se aproxima al de una reducción reversible sin adsorción.

A medida que la concentración se incrementa, se observa una disminución relativa en la altura del pico de adsorción. Este comportamiento se muestra en la Figura 4.5. La corriente para el pico de adsorción disminuye, mientras que la corriente para el pico de difusión cambia sólo ligeramente con la concentración.



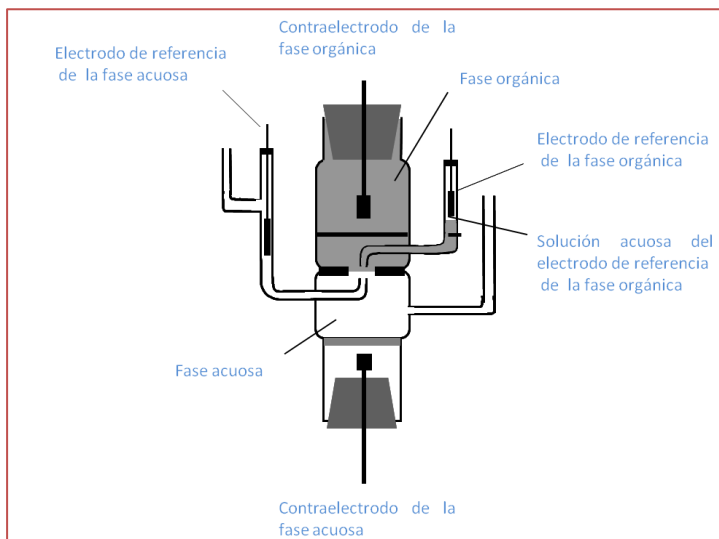
**Figura 4.5:** Efecto de los parámetros  $\Gamma\sqrt{v}$  sobre los voltagramas, para el caso donde el producto es fuertemente adsorbido. Para las curvas A, B y C, si el valor de  $\Gamma$  es constante, los valores relativos de las velocidades de barrido son 64:16:1. Si el valor de  $v$  es constante, los valores relativos de  $\Gamma$  son 8:4:1. Figura extraída de referencia<sup>2</sup>

Cuando se consideran las aplicaciones de la voltametría cíclica, es útil tener criterios para determinar si un proceso de adsorción está presente, para determinar el grado en el que está presente, y el tipo de adsorción involucrada. En los casos en que aparece un pre o post-pico, generalmente la presencia de adsorción será indiscutible. En otros casos, no es tan sencillo comprobar la presencia de adsorción, sobre todo cuando dicho proceso y el de difusión ocurren simultáneamente, y dan lugar a la transferencia de carga en el mismo potencial. En estos casos, para detectar la presencia de adsorción, se requiere que este proceso contribuya de manera significativa a la corriente total para las velocidades de barrido y las concentraciones estudiadas. En estas condiciones hay tres criterios de diagnóstico rápidos que se pueden aplicar. El primero, que es estrictamente cualitativo consiste en observar la forma general de las curvas de corriente-potencial. Si muestran más simetría que los correspondientes a la transferencia de carga sin adsorción, o aumento de la simetría con la velocidad de barrido o disminución de las concentraciones (Figuras 4.3 y 4.4),

hay razón para sospechar de adsorción. Los otros dos métodos implican una determinación cuantitativa y no se pueden aplicar con certeza si están presentes otros procesos (efectos cinéticos, reacciones químicas acopladas, etc.). Estos métodos consisten en evaluar la variación de la corriente de pico con la velocidad de barrido y con la concentración. La corriente de pico, en presencia de adsorción, es proporcional a la velocidad de barrido y no a la raíz cuadrada de la velocidad, como ocurre en los casos de difusión sin adsorción. Por último, en cuanto a si se normaliza el valor de la corriente de pico dividiéndola por la concentración, no se obtendrá un valor constante, como ocurre en un proceso difusional, sino que por lo general se observa un aumento de esta relación (corriente/concentración) con la disminución de la concentración, que puede estabilizarse en un valor constante para concentraciones bajas.

#### 4.1.3. Celda electroquímica y electrodos

Los experimentos voltamétricos se llevaron a cabo en una celda de vidrio, la cual se encuentra representada en la Figura 4.6. Esta celda consta de un orificio central donde se ponen en contacto la fase acuosa y la fase orgánica y se genera la interfaz líquido / líquido de trabajo. En este sistema se utilizan cuatro electrodos, dos de los cuales son electrodos de referencia de  $\text{Ag|AgCl|Cl}^-$  y se utilizan para aplicar una diferencia de potencial a la interfaz en estudio. Los otros dos electrodos son contraelectrodos de platino y cierran el circuito permitiendo medir la corriente que circula a través de la celda. El electrodo de referencia correspondiente a la fase orgánica se sumerge en una solución acuosa que está en contacto con la fase orgánica. Esta fase acuosa tiene disuelta una sal que contiene el mismo catión del electrolito soporte de la fase orgánica, y cloruro como contraión, de manera tal que la interfaz formada entre esta solución y la fase orgánica sea no polarizable.

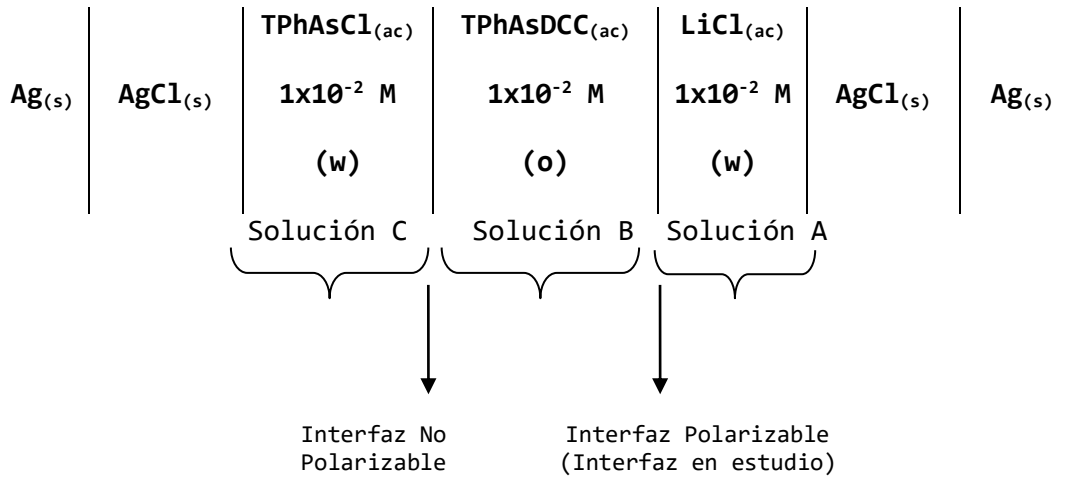


**Figura 4.6:** Esquema de celda utilizada para realizar experimentos electroquímicos.

Las soluciones utilizadas comprendieron siempre electrolitos conductores en fase acuosa o en 1,2-dicloroetano (fase orgánica).

Los electrodos de referencia de Ag/AgCl fueron preparados conectando un alambre de plata y un contraelectrodo a un terminal positivo y negativo, respectivamente, de un galvanostato con el cual se aplica una corriente constante de  $1\text{mA/cm}^2$  dentro de una solución acuosa de NaCl acidificada con HCl. Esta corriente produce la oxidación de la superficie de plata, sobre la cual se genera un depósito de AgCl. Los electrodos de referencia usualmente, en la celda electroquímica, se encuentran dentro de capilares Luggin localizados cerca de la interfaz, con el objetivo de minimizar la resistencia de la solución <sup>3</sup>.

Considerando el siguiente esquema de celda:



La diferencia de potencial de Galvani en la interfaz en estudio, definida como  $\Delta\phi_o^w = \phi^{(Solución A)} - \phi^{(solución B)}$ , se relaciona con el potencial aplicado entre los terminales de los electrodos de referencia,  $\Delta E$ , a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta\phi_o^w = \Delta E + \Delta E_{ref}^w - \Delta E_{ref}^o + \phi_{INP} \quad \text{Ec. 4.3}$$

siendo  $\Delta E_{ref}^w$  el potencial del electrodo de referencia sumergido en la fase acuosa,  $\Delta E_{ref}^o$  el potencial del electrodo de referencia correspondiente a la fase orgánica y  $\phi_{INP}$  la diferencia de potencial de Galvani en la interfaz no polarizable, la cual es generada por el contacto de la fase orgánica (solución B) con la solución acuosa de referencia (solución C):

$$\Delta\phi_{INP} = \Delta\phi_{TPhAs^+}^0 - \frac{RT}{zF} \ln \frac{[TPhAs^+]_o}{[TPhAs^+]_w} \quad \text{Ec.4.4}$$

Si la concentración del ión común TPhAs<sup>+</sup> es la misma en las soluciones C y D, el potencial de Galvani de la interfaz no polarizable es igual al potencial estándar de transferencia de TPhAs<sup>+</sup> ( $\Delta\phi_{\text{TPhAs}^+}^0$ ). Además, si las concentraciones de Cl<sup>-</sup> en las soluciones acuosas donde se sumergen los electrodos de referencia son iguales, entonces  $\Delta E_{ref}^w = \Delta E_{ref}^o$ , finalmente se tiene:

$$\Delta_o^w \phi = \Delta E + \Delta\phi_{\text{TPhAs}^+}^0 \quad \text{Ec. 4.5}$$

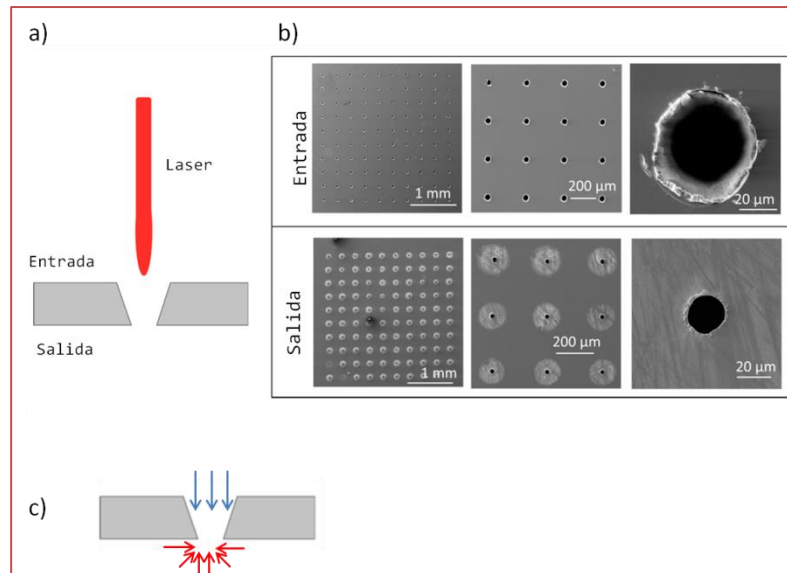
De esta manera, es posible convertir la escala de el potencial aplicado  $\Delta E$  en diferencia de potencial de galvani para la interfaz líquido/líquido  $\Delta_o^w \phi$ , a través de un término conocido,  $\Delta\phi_{\text{TPhAs}^+}^0$ .

#### 4.1.4 Arreglo de microinterfaces generadas en membranas de vidrio por ablación láser

Se fabricaron arreglos de micro-ITIES generando poros, por ablación laser, sobre membranas de vidrio de un espesor igual a 130  $\mu\text{M}$  (ANNF-Optofab). De esta manera se generó un arreglo cuadrado de 10x10 poros sobre la membrana. Seguido a esto se realizó una silanización de una de las caras del arreglo, con el fin de modificar la superficie de la membrana de vidrio y las paredes internas de los poros haciéndolas hidrofóbicas y facilitando así la introducción de la fase orgánica en los poros y, a su vez, evitando el ingreso de la fase acuosa. De esta forma, cuando se ponen en contacto la fase acuosa y la orgánica, a ambos lados de la membrana, se establece la interfaz. Posteriormente se realizó una caracterización de estos arreglos por microscopia electrónica de barrido, determinando el diámetro de los poros producidos

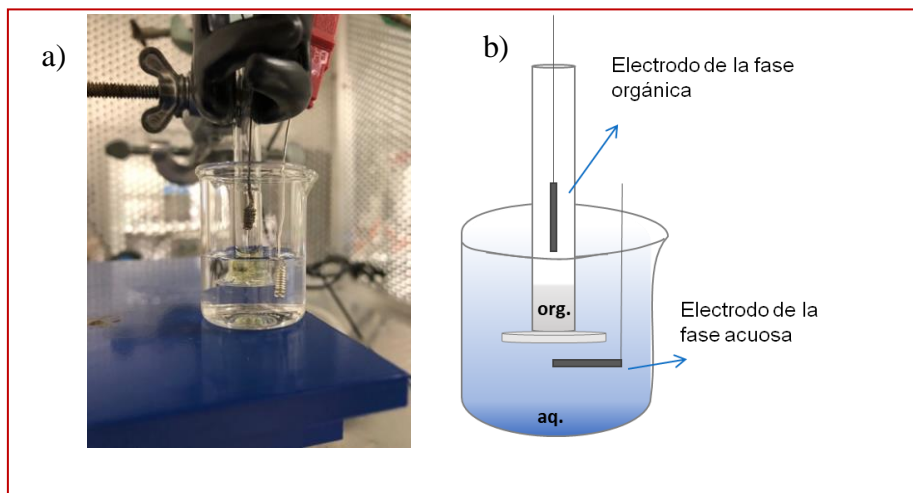


por la entrada y salida del laser y la distancia entre los poros. En la Figura 4.7 se muestra un esquema de los poros formados por ablación laser (a) y las fotografías de las membranas obtenidas por microscopia electrónica de barrido. En la Figura 4.8 se muestra una fotografía y un esquema de la celda electroquímica.



**Figura 4.7:** a) Esquema del proceso de fabricación del poro sobre la membrana, se observa la diferencia de diámetro entre la entrada y salida del laser. b) Fotografías de microscopia de barrido para el arreglo de poros en la membrana de vidrio. Imagen extraída de la referencia <sup>4</sup>. c) Regímenes difusionales fuera y dentro del poro.

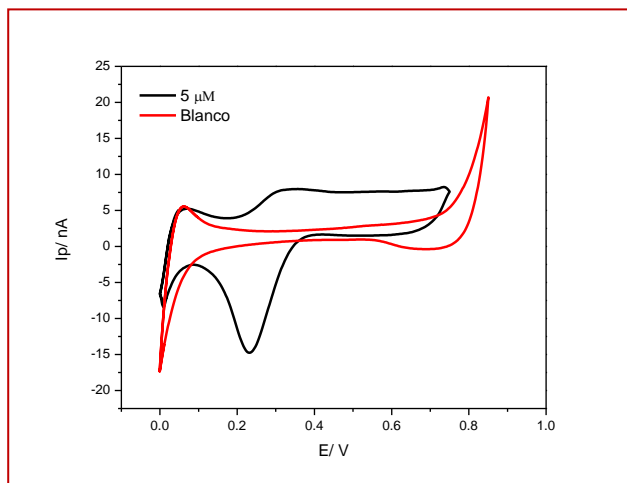
La membrana se pegó a un tubo de vidrio (~5,3 mm de diámetro) con la cara hidrofóbica orientada hacia el interior del tubo de vidrio, de forma tal que contenga a la fase orgánica. Posteriormente, se lavó este montaje sucesivas veces con acetona para extraer posibles contaminantes, se secó con aire y se llenó con fase orgánica (1,2-DCE). Luego, el tubo conteniendo la fase orgánica y que tiene en su extremo la membrana, se colocó en un recipiente con la fase acuosa (agua ultra pura + LiCl 10 mM). Finalmente, se agregó la solución acuosa del electrodo de referencia de la fase orgánica dentro del tubo, por encima de la fase orgánica, verificando que el nivel dentro y fuera sea el mismo, de forma tal de compensar las fuerzas hidrostáticas. Por último, se colocaron dos electrodos de referencia Ag / AgCl para formar la celda. En la Figura 4.8 se muestra una fotografía y un esquema de la celda electroquímica.



**Figura 4.8** a) Fotografía del sistema. b) Esquema del sistema.

La forma de cono truncado generada en los poros de la membrana conduce a diferentes regímenes difusionales: fuera del poro (fase acuosa), debido al tamaño reducido del mismo, la componente radial del transporte de masa es importante y tendrá lugar un régimen de difusión esférica. Por el contrario, en el interior del poro, la componente radial está impedida y, por lo tanto, la transferencia de masa ocurrirá por difusión lineal.

En la Figura 4.9, se muestra el comportamiento del catión tetrapropilamonio ( $\text{TPra}^+$ ) en este tipo de celdas con arreglo de micro-ITIES. Se eligió dicho catión por tener un comportamiento reversible y controlado por difusión en ITIES y micro-ITIES por la cual puede utilizarse para caracterizar el nuevo dispositivo. En este caso se observa una corriente límite durante el barrido positivo de potencial (barrido directo) típica de un régimen difusional esférico, correspondiente a la transferencia de  $\text{TPra}^+$  desde la fase acuosa a la orgánica. Durante el barrido negativo de potencial se observa un pico de corriente característico de un proceso controlado por difusión lineal, correspondiente a la transferencia de  $\text{TPra}^+$  desde la fase orgánica a la acuosa.

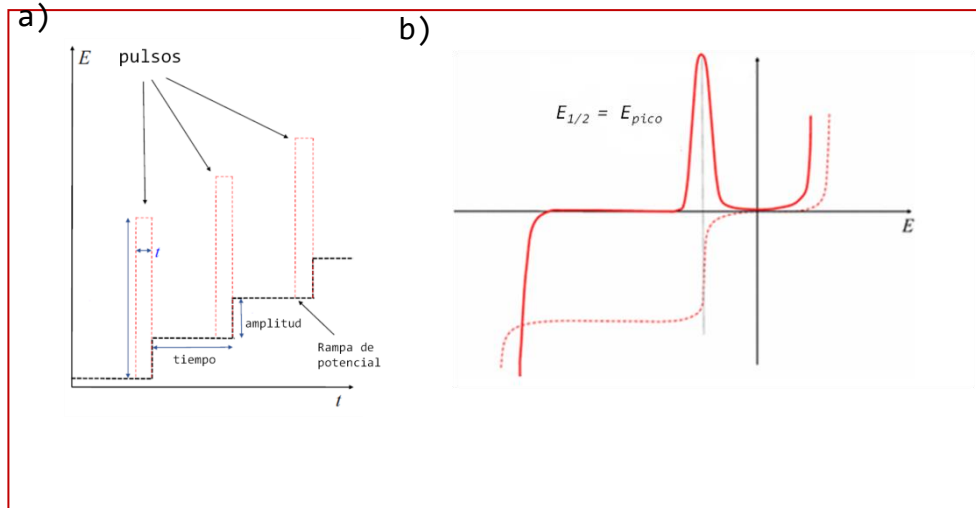


**Figura. 4.9** Voltametría cíclica para  $\mu$ ITIES en ausencia (-) y presencia de TprA<sup>+</sup> (-).

## 4.2 Voltametría de Pulso diferencial (VPD)

La voltametría de pulso diferencial (VPD) es una adaptación de la voltametría cíclica que permite amplificar las señales de corriente. VPD consiste en la aplicación de un pulso de potencial de valor constante y pequeño (5-100 mV) mientras se aumenta el potencial, de forma escalonada, con el tiempo (superposición de ambas perturbaciones) por lo tanto, el potencial al inicio de cada pulso es más alto que el del anterior, en un valor igual a la amplitud del escalón (Figura 4.10 a). Durante el tiempo de cada pulso de potencial, se toman dos muestras de corriente: una en el instante en el que se aplica el pulso y la segunda durante el transcurso del pulso (generalmente durante los últimos 17 ms del pulso). Para cada pulso, el potencióstato realiza la diferencia entre el segundo y el primer valor de corriente. De este modo, se grafica esta diferencia de corriente en función del potencial aplicado durante el barrido escalonado obteniéndose la señal característica mostrada en la Figura 4.10 b: a bajo valores de potencial no se observa corriente faradaica, cuando se alcanza el potencial de transferencia de las especies cargadas, la corriente aumenta generando un pico característico, cuyo potencial coincide con el potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) del procesos. La voltamperometría de pulso diferencial minimiza la interferencia por la corriente de

cargado de la doble capa eléctrica al restar las dos mediciones de corriente mencionadas, debido a la diferencia en la velocidad de decaimiento de la corriente de cargado de la doble capa y la faradaica<sup>6</sup>.



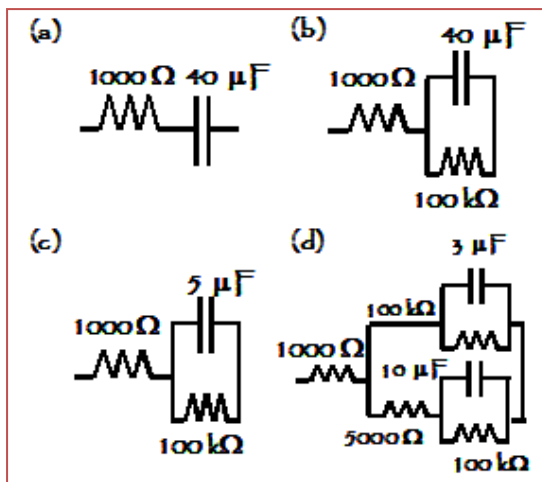
**Figura 4.10** a) Superposición de la señal rampa con los pulsos. Se muestran los parámetros típicos para VPD como amplitud y tiempo entre pulsos. b) Comparación del voltograma obtenido por VPD (línea sólida) y una voltametría de barrido lineal. E potencial de media onda es igual al potencial de pico ( $E_{1/2} = E_{pico}$ ). Figura extraída de referencia <sup>6</sup>.

### 4.3. Espectroscopia de impedancia electroquímica

La Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIE) resulta útil para estudiar procesos físicos de adsorción, estados interfaciales, etc. Se aplicó la técnica de EIE a la interfaz líquido/líquido con el objetivo de caracterizar dicha interfaz, fundamentalmente cuando se la modifica con películas de surfactantes. Esta caracterización se realizó a través del análisis de los circuitos eléctricos que mejor ajustan los puntos experimentales y de los valores de capacidad y resistencia obtenidos de dichos ajustes. No se analizaron en este caso, reacciones de transferencia a través de la interfaz.

### 4.3.1. Principales características de la espectroscopia de impedancia electroquímica

Mientras que la voltametría cíclica es un método potenciodinámico, la espectroscopia de impedancia es un método periódico. Es decir, la perturbación de potencial varía con el tiempo pero no de una manera lineal, sino que es una señal sinusoidal de baja amplitud y de frecuencia variable; la respuesta es una corriente también periódica. La relación entre la perturbación y la respuesta del sistema es una función denominada Impedancia. Esta función es compleja y por esto puede ser representada tanto en coordenadas polares como en rectangulares dada su condición vectorial.



**Figura 4.11:** Circuitos equivalentes para: a) una resistencia y una capacidad en serie, b) y c) una resistencia en serie con una capacidad en paralelo a una resistencia y d) resistencia en serie a con una resistencia y una resistencia en paralelo; además en serie otra resistencia en paralelo con una capacidad. Los diferentes valores de resistencia y capacidad que tomen estos circuitos darán distintos espectros de impedancia (figura 4.12)

La respuesta de impedancia se analiza en términos de análogos eléctricos como resistencias, capacitores, inductancias, etc. Respuestas puramente capacitivas tienen componente únicamente en el plano imaginario y por tanto la señal de impedancia está desfasada en 90 grados respecto a la perturbación aplicada. En este caso, el

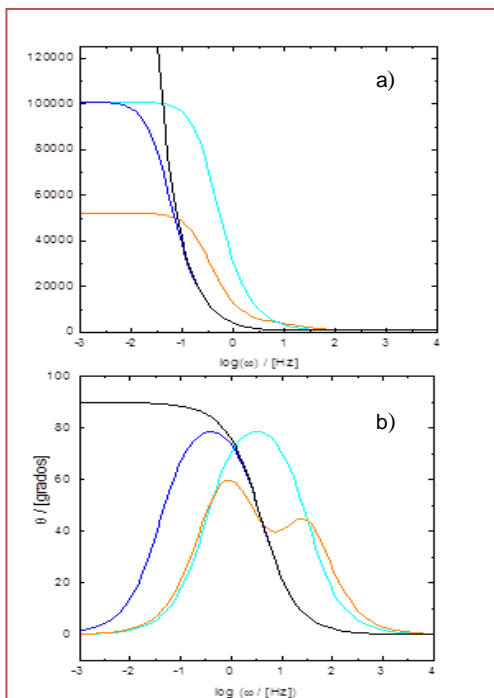
valor de la impedancia ( $Z$ ) se relaciona con la capacidad ( $C$ ) de acuerdo a:  $Z = \frac{1}{\omega C} i$ ,

donde  $\omega$  es la frecuencia angular de la perturbación sinusoidal. Las resistencias ( $R$ ) en cambio, dan respuestas con componente únicamente real y en consecuencia, el

ángulo  $\Theta$  de la función es cero y  $Z$  es igual a  $R$ . La expresión de  $Z$  para un circuito constituido por una resistencia en serie con un capacitor es:

$$Z_{\omega} = R + \frac{1}{\omega C}i \quad \text{Ec. 4.6}$$

y el ángulo de fase observado ( $\Theta$ ) depende de la frecuencia de la onda: a altas frecuencias,  $Z$  tiende a  $R$  y  $\Theta$  a  $0^{\circ}$ , mientras que a bajas frecuencias el término capacitivo aumenta,  $Z$  tiende a  $C$  y  $\Theta$  tiende a  $90^{\circ}$ . De esta manera, los resultados pueden representarse a través de gráficos de Bode, que informan sobre la variación de  $Z$  y de  $\Theta$  con el logaritmo de la frecuencia angular. Algunos ejemplos de los circuitos eléctricos más comunes se muestran en la Figura 4.11 y los gráficos de Bode correspondientes pueden observarse en la Figura 4.12.



**Figura 4.12:** Gráficos de Bode de la variación del módulo (a) y el ángulo de fase (b) como función de la frecuencia, correspondientes a los circuitos de la figura 4.11. Respuestas del circuito — 4.11(a), — 4.11(b), — 4.11(c), — 4.11(d).

Cuando el circuito está formado por una resistencia de  $1000 \Omega$  en serie con un capacitor de  $40 \mu\text{F}$  (Figura 4.11a), se observará un cambio en el ángulo de fase de  $0^{\circ}$

a  $90^\circ$  en un intervalo de frecuencias característico, indicando un comportamiento capacitivo de la impedancia a frecuencias bajas. Si además, en paralelo a la capacidad, se coloca una resistencia de  $100\text{ k}\Omega$  (Figura 4.11b), se registrará un cambio de ángulo de fase en el mismo intervalo de frecuencias que en el caso anterior (el valor de la capacidad es el mismo que antes), pero luego el ángulo retornará a cero, revelando que, a bajos valores de frecuencia, el comportamiento resistivo domina en el vector impedancia. Si se modifica el valor de la capacidad a  $5\text{ }\mu\text{F}$  (Figura 4.11c), el cambio en el ángulo de fase se registra a frecuencias mayores, debido a la relación inversa con  $\omega$  y  $C$  según la expresión Ec. 4.6. Un circuito que posee dos capacidades en paralelo conduce a dos constantes de tiempo en los gráficos de  $\Theta$  vs.  $\log\omega$ , entonces, estos gráficos presentan dos máximos. Cabe aclarar que esto se cumplirá siempre y cuando los valores de fase en función de  $\log\omega$  que tengan las capacidades en paralelo sean suficientemente diferentes.

#### 4.4. Potenciostatos

Para llevar a cabo los experimentos de voltametría cíclica en ITIES se utilizó un potenciostato para cuatro electrodos<sup>5</sup>. Los potenciostatos utilizados deben tener un mecanismo eficiente para compensar la caída óhmica debida a la gran resistencia generada en la solución orgánica. Normalmente esta última puede variar entre 1000 y 3000 ohms. En este sentido, el potenciostato utilizado elimina la caída óhmica a través de pulsos de interrupción de la corriente, durante los cuales se realiza el muestreo del potencial interfacial, y por lo tanto el potencial leído es realmente el potencial aplicado a la interfaz durante el experimento voltamétrico, eliminando, de esta manera, la caída óhmica de forma automática. Para generar los diferentes

programas de potencial, se utilizó un generador de ondas Hi-Tek Instruments England. Los voltogramas se registraron utilizando una placa de conversión D/A de Computer Boards conectada a una computadora o una placa NI-DAQMX (National Instrument) empleando el software LabView 10.0.0.1 (National Instrument).

Para los experimentos de VPD realizados con el arreglo de micro interfaces se empleó un ponteciostato Autolab (Metrohm Autolab B.V.) controlado por el software NOVA (versión 2.1.2).

La perturbación aplicada a la interfaz en los experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica se llevó a cabo empleando un potencióstato (Autolab) controlado por una computadora personal. El programa ZPlot/ZView (Scribner Associates Inc.) permitió la adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos.

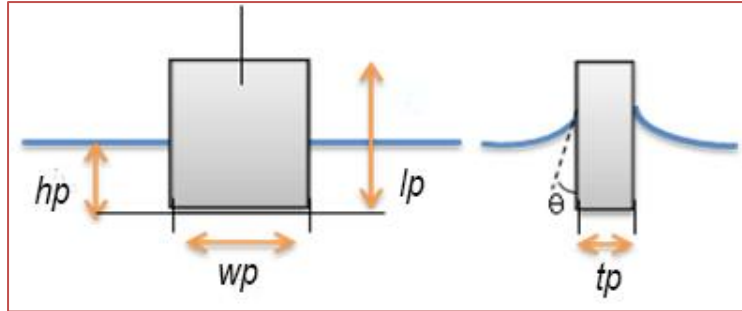
## 4.5. Isotermas presión superficial/área molecular

### 4.5.1. Determinación de la tensión superficial

Por definición, la tensión superficial se refiere a la interfaz gas-líquido y se determina usando instrumentos denominados tensiómetros superficiales. Este equipo se emplea para obtener información sobre las características de las superficies o de las interfaces y las propiedades de los surfactantes, tales como su concentración superficial, su presión superficial, la concentración micelar crítica y cinética de adsorción. Existen diferentes tipos de tensiómetros que difieren de acuerdo al principio físico en el que se basan, el diseño mecánico, si las mediciones son dinámicas o estáticas y si son capaces de medir la tensión superficial, la interfacial o ambas.



En esta tesis, se utilizó el método de la placa de Wilhelmy, el cual consiste en medir la fuerza debida a la tensión superficial en una placa de platino suspendida, parcialmente inmersa en el líquido (Figura 4.13). La fuerza es convertida en tensión superficial (mN/m o dinas/cm) a través de las dimensiones de la placa.



**Figura 4.13:** Placa de Wilhelmy inmersa en la superficie del agua.

Las fuerzas que actúan sobre la placa son la gravedad, la tensión superficial y la flotación debido al agua desplazada hacia abajo. Para una placa rectangular de dimensiones  $l_p$ ,  $w_p$  y  $t_p$ , de un material cuya densidad es  $\rho_p$ , inmersa en una profundidad  $h_p$  en un líquido de densidad  $\rho_l$ , la fuerza neta hacia abajo,  $F$ , está dada por la siguiente ecuación:

$$F = \rho_p g l_p w_p t_p + 2\gamma(w_p + t_p)(\cos\theta) - \rho_l g l_p w_p t_p \quad \text{Ec.4.7}$$

Donde  $\gamma$  es la tensión superficial del líquido,  $\theta$  es el ángulo de contacto del líquido en la placa sólida y  $g$  es la constante gravitacional. La presión superficial se determina midiendo el cambio de  $F$ ,  $\Delta F$ , para una placa estacionaria entre la superficie de un líquido puro y la superficie del líquido modificada por la presencia de una monocapa de surfactante. Si la placa está mojada completamente por el líquido (por ejemplo  $\cos \theta = 1$ ) la presión superficial se obtiene de la siguiente ecuación:

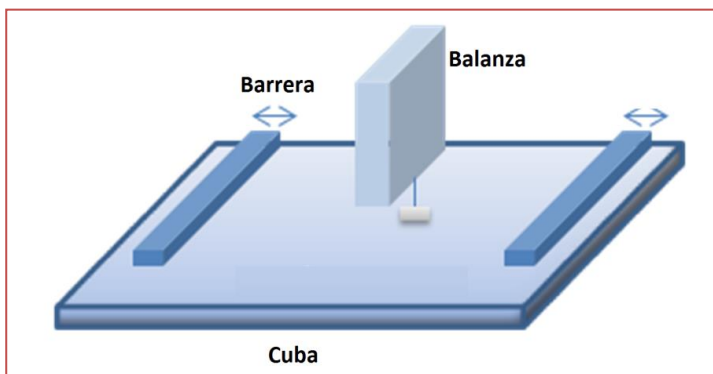
$$\pi = -\Delta\gamma = -\left[\frac{\Delta F}{2(w_p + t_p)}\right] = -\frac{\Delta F}{2w_p}, \quad \text{si } w_p \gg t_p, \quad \text{Ec.4.8}$$

La fuerza se determina por la medición de los cambios en la masa de la placa, mediante una electrobalanza.

El tensiómetro empleado para realizar las medidas de tensión superficial en el equilibrio fue un tensiómetro digital Sigma 701 (KSV, Finlandia) y consta de dos partes, la unidad de medida y una interface que permite la adquisición de datos. La interface incluye la fuente de alimentación y un indicador digital. La unidad de medida posee la placa de Wilhelmy que se suspende de un brazo de balanza. Esta placa es de platino, de superficies rugosas y es el sensor de la tensión superficial.

Como norma general, en todos los experimentos realizados con el tensiómetro de Wilhelmy, la placa de platino se calienta a la llama de un mechero Bunsen antes de realizar cualquier medida de tensión superficial, con el fin de eliminar cualquier impureza que pueda contaminar la superficie.

La Figura 4.14 muestra un esquema de la balanza de Langmuir. La subfase, generalmente agua o una solución acuosa, se introduce dentro de una cuba de teflón, cuyas dimensiones son: 364 mm x 75 mm x 15 mm. El área superficial de la cuba se puede variar mediante dos barreras móviles ubicadas sobre la superficie de la misma. Las barreras están hechas de Delrin, un material hidrofílico, y suficientemente pesado para prevenir cualquier fuga de la monocapa por debajo de las barreras. La presión superficial del material adsorbido y el área molecular son continuamente monitoreadas durante el proceso de compresión.



**Figura 4.14:** Esquema de la balanza de Langmuir con placa de Wilhelmy, y barreras para reducir el área de superficie disponible.

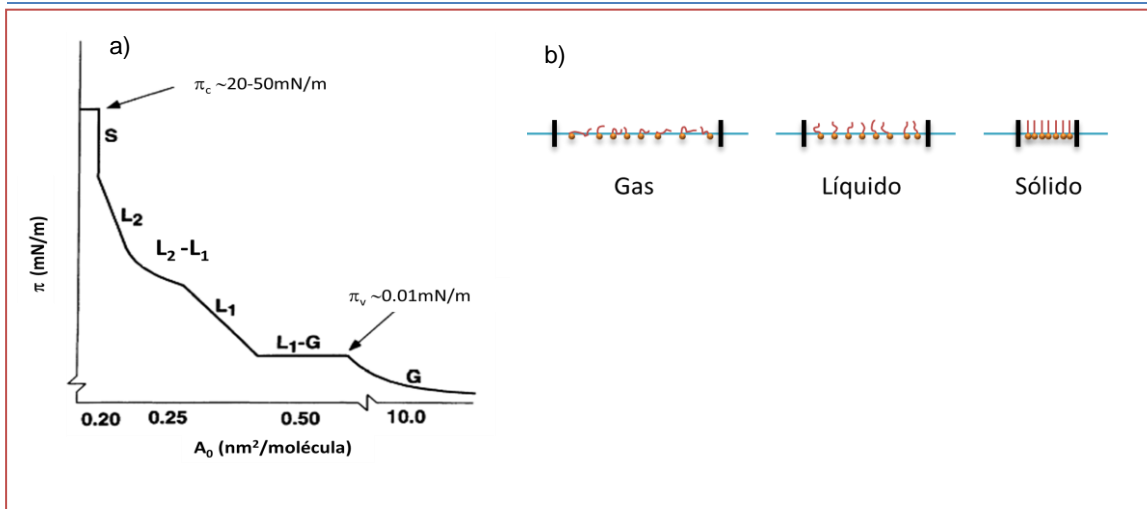
#### 4.5.2. Descripción de las isothermas presión superficial /área molecular

Cuando una solución de un compuesto anfipático disuelto en un solvente insoluble en agua se deposita en la superficie de la subfase con una microjeringa, la solución se distribuye rápidamente para cubrir toda el área disponible. La monocapa se forma luego de la evaporación del solvente. Cuando el área disponible para la monocapa es grande, la distancia entre moléculas adyacentes también lo es, entonces sus interacciones son débiles. La monocapa puede considerarse como un gas en dos dimensiones. Bajo estas condiciones, la monocapa tiene un pequeño efecto en la tensión superficial del agua. Si el área superficial disponible para la monocapa se reduce acercando las barreras (ver Figura 4.15), las moléculas comienzan a ejercer un efecto entre ellas.

La presión superficial,  $\pi$ , se determina a partir de la medida de la tensión superficial, siendo:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Ec. 4.9}$$

donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial de la fase acuosa en ausencia de la sustancia tensioactiva y  $\gamma$  es el valor de equilibrio correspondiente a la tensión superficial cuando un exceso de tensioactivo está presente en la interfaz, tal como se describió en el capítulo 2.



**Figura 4.15:** (a) Esquema de isothermas  $\pi$ -área y (b) orientación de las moléculas en las diferentes fases.

El indicador más importante de las propiedades de las monocapas de un material tensioactivo, es la variación de la presión superficial en función del área de la superficie de la subfase disponible para cada molécula, o área molecular. Este procedimiento se realiza a temperatura constante, y los gráficos obtenidos se conocen como isothermas presión superficial/área molecular. Usualmente una isoterma se obtiene por compresión del área molecular disponible (reduciendo el área total de la cuba con las barreras) a velocidad constante, mientras se monitorea la presión superficial. En la Figura 4.13.a, se muestra un esquema de una isoterma  $\pi$ -A.

La compresión de la monocapa conduce a cambios de fase que se observan en diferentes regiones de la isoterma. Las características de una monocapa y las diferentes fases que pueden existir están determinadas principalmente por las propiedades físicas y químicas de la sustancia anfipática, la temperatura y composición de la subfase.

W. D. Harkins propuso una terminología simple para clasificar las diferentes fases de las monocapas de ácidos grasos a principios de 1952. Cuando las moléculas están expandidas en toda la superficie disponible de la subfase, las monocapas existen en estado gaseoso (G) y pueden, por medio de la compresión, alcanzar una transición de fase al estado líquido expandido (L1), en el cual las moléculas alcanzan

cierto nivel de ordenamiento. Durante la transición, coexisten las dos fases y la presión se mantiene constante, como puede observarse en la Figura 4.13a. La posterior compresión conduce a la transición de fase líquido expandido-líquido condensado (L2), y a mayores densidades, la monocapa finalmente alcanza el estado sólido (S). En cada una de estas transiciones la estructuración de las moléculas en la monocapa es mayor. Si la monocapa se comprime después de alcanzar el estado S, la misma colapsará en estructuras tridimensionales. Generalmente el colapso se observa como una rápida disminución en la presión superficial o como una ruptura horizontal en la isoterma.

Una forma de caracterizar la fase en la cual se encuentra una monocapa a distintas presiones es a través de su compresibilidad. El factor de compresibilidad  $\kappa$  (mN/m) a una determinada temperatura (T) se define como:

$$\kappa = - \left( \frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T \cdot A \quad \text{Ec. 4.10}$$

donde A es el área molecular a una determinada presión superficial. A mayores valores de  $\kappa$  más compacta será la monocapa y más difícil será modificar su área. Por lo tanto el estado gaseoso será el más compresible, con valores de  $\kappa$  pequeños ( $\kappa < 10\text{mN/m}$ ), el estado sólido el más rígido, con los mayores valores de  $\kappa$  ( $\kappa > 1000\text{mN/m}$ )<sup>7</sup>. Este parámetro, por lo tanto, nos permite inferir acerca del estado físico y transiciones de fase de la monocapa, ya que cambios abruptos en el valor de  $\kappa$  indican, con alta sensibilidad, la existencia de una transición de fase.

La tabla 4.1 muestra la clasificación de fases de una monocapa a partir del coeficiente de compresibilidad<sup>5</sup>:

Estado de la monocapa	$\kappa$ mN/m
Gaseoso (G)	0-12
Líquido Expandido (LE)	15-50
Líquido Intermedio (LI)	50-100
Líquido Condensado (LC)	100-250
Sólido (S)	1000-2000

**Tabla 4.1:** Intervalo de valores de coeficiente de compresibilidad según la fase de la monocapa. Figura extraída de <sup>5</sup>

Para generar las películas de Langmuir se utilizó una balanza de Langmuir – Blodgett Minitrough II de KSV Instruments, conectado a una computadora personal.

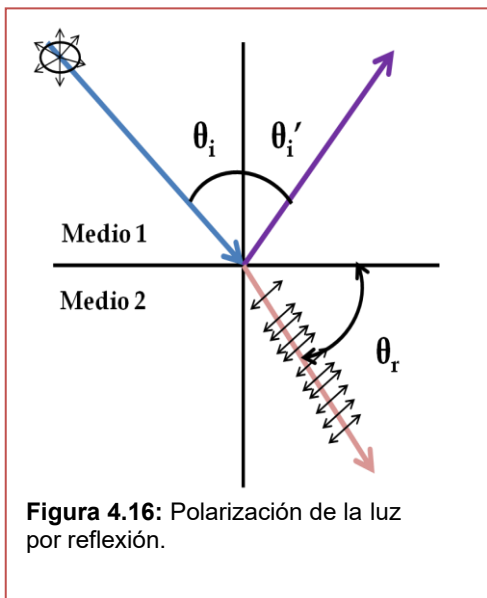
## 4.6. Microscopia de Ángulo de Brewster (BAM)

Las medidas de presión superficial, potencial superficial y viscosidad superficial se utilizan para el estudio termodinámico de las monocapas y para determinar las características de estas. Ante la necesidad de caracterizar la morfología y la estructura de la monocapa se comienzan a aplicar en la interfaz agua / aire otras técnicas entre las que podemos mencionar las espectroscopias y las microscopias. Dentro de las técnicas microscópicas se encuentra la microscopía basada en la observación de la refractancia para el ángulo de Brewster, la cual es muy ventajosa respecto a las demás técnicas microscópicas porque no es necesaria la adición de sondas o marcadores fluorescentes a la monocapa, de modo tal que se evita una posible alteración del estado físico de la misma<sup>9</sup>. Esta técnica permite el estudio de películas delgadas sobre una superficie plana, basándose en las propiedades de reflexión de la luz en la interfaz <sup>12</sup>.

### 4.6.1. Fundamento

Cuando la luz incide sobre la superficie que separa dos medios transparentes, no absorbentes, parte de la misma se refracta y parte se refleja (Figura 4.16). La luz reflejada está siempre parcialmente polarizada, con su plano de polarización perpendicular al plano de incidencia. Del mismo modo, la luz refractada también está polarizada, pero en este caso la dirección del plano de polarización es paralela a la de incidencia. La intensidad de la luz reflejada depende del ángulo de incidencia ( $\theta_i$ ), así como de la naturaleza de la interfase, utilizándose la reflectividad (reflectancia) como una medida de la misma<sup>12</sup>.

Para una interfase de Fresnel, es decir una interfase plana entre dos medios isotrópicos, en la que el índice de refracción cambia bruscamente desde  $n_1$  (índice de refracción del medio incidente) hasta  $n_2$  (índice de refracción del segundo medio), la



reflectividad ( $R$ ) está dada por las fórmulas de Fresnel.

Para una polarización  $p$  del haz incidente:

$$R_p = \left[ \frac{\tan(\theta_i - \theta_r)}{\tan(\theta_i + \theta_r)} \right]^2 \quad \text{Ec.4.11}$$

Para una polarización  $s$  del haz incidente:

$$R_s = \left[ \frac{\sin(\theta_i - \theta_r)}{\sin(\theta_i + \theta_r)} \right]^2 \quad \text{Ec.4.12}$$

Donde  $\theta_r$  es el ángulo de refracción:

$$n_1 \cdot \sin \theta_i = n_2 \cdot \sin \theta_r \quad \text{Ec.4.13}$$

La Figura.4.15a muestra las reflectividades  $R_p$  y  $R_s$ , en función del ángulo de incidencia, para  $n_1 = 1$  (aire) y  $n_2=1,33$  (agua). Como puede observarse,  $R_s$  aumenta a medida que lo hace el ángulo de incidencia, mientras que  $R_p$  disminuye al principio

hasta un valor 0 y luego aumenta hasta 1. El ángulo de incidencia para el cual  $R_p = 0$  recibe el nombre de ángulo de Brewster. La Ec.4.11 muestra que esto sucede cuando  $\tan(\theta_i + \theta_r)$  es infinito, es decir cuando  $\theta_i + \theta_r = \pi/2$ , lo que significa que los rayos reflejado y refractado son perpendiculares entre sí. Considerando esta última condición ( $\theta_i + \theta_r = \pi/2$  en el ángulo de Brewster) y la ec.4.13, podemos escribir:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{\sin \theta_i}{\sin \theta_r} = \frac{\sin \theta_i}{\cos \theta_i} = \tan \theta_{\text{Brewster}} \quad \text{Ec.4.14}$$

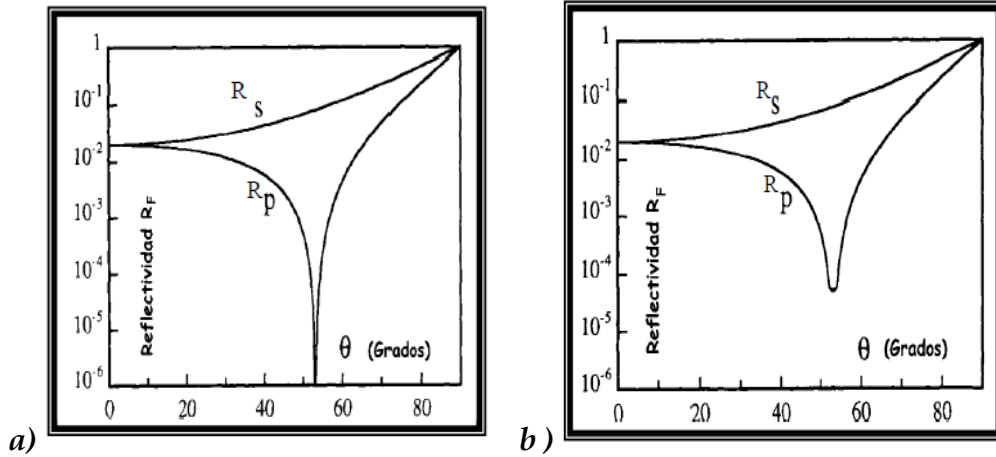
De acuerdo con esto, si la luz incidente es p-polarizada, no existe nada de luz reflejada cuando el ángulo de incidencia coincide con el ángulo de Brewster. No obstante, en una interfaz real, el valor de  $R_p$  decrece hasta un valor mínimo cuando el ángulo de incidencia coincide con el ángulo de Brewster, pero no llega a alcanzar un valor igual a cero, debido a la rugosidad de la interfase, como consecuencia de las fluctuaciones térmicas, y hace que el índice de refracción en la interfase dependa de las coordenadas x e y, modificándose por ello el valor del ángulo de Brewster, lo que puede dar lugar a una pequeña reflectividad.

Si se deposita una monocapa sobre la interface, cambia el índice de refracción del medio, modificándose por ello la reflectividad del ángulo de Brewster e incrementándose la reflectividad hasta un valor del orden de  $5 \times 10^{-5}$  en las proximidades del ángulo de Brewster (Figura 4.16b). Esta pequeña reflectividad es suficiente como para que se pueda visualizar la presencia de una monocapa, que se manifiesta como una imagen clara sobre un fondo oscuro (el agua).

En el caso particular de monocapas isotrópicas, como sucede en el caso de las cadenas hidrocarbonadas que se encuentran orientadas verticalmente, la luz reflejada es totalmente p-polarizada, lo mismo que la incidente, por lo que el campo de visión se hace completamente homogéneo. Bajo estas condiciones  $R_p$  es proporcional al cuadrado del espesor de la monocapa. Por otra parte  $R_p$  también es proporcional al cuadrado de la densidad superficial de la monocapa, por lo que en las transiciones de



fase las imágenes BAM presentan un importante contraste, como consecuencia que durante la transición coexisten dos fases de diferente densidad superficial.



**Figura 4.17:** Reflectividades  $R_p$  y  $R_s$  en función del ángulo de incidencia para **(a)** la interfaz agua / aire y **(b)** la interfaz agua/aire modificada con una monocapa de índice de refracción 1,5 y un espesor de 20 Å. Figura extraída de la referencia <sup>7</sup>

#### 4.6.2. Cálculo del espesor óptico

Para poder cuantificar el espesor óptico de las monocapas generadas en la interfaz agua/aire, es necesario que la película cumpla las siguientes condiciones:

- el espesor de la zona interfacial debe ser menor que la longitud de onda incidente
- el índice de refracción de ambos medios no debe cambiar con el ángulo de incidencia, medio isotrópicos;
- la interfaz debe ser ópticamente uniaxial (simetría normal a la interfaz).

Si esto se cumple, el espesor de cada fase se puede calcular a partir de las imágenes BAM, luego de calibrar el equipo.

El nivel de gris de la micrografía se puede convertir en intensidad de luz reflejada ( $R_p$ ) utilizando la Ec.4.15

$$R_p = (\text{nivel de gris} - \text{dark signal}) \times \text{factor de calibración} \quad \text{Ec.4.15}$$

Donde dark signal y el factor de calibración son parámetros obtenidos a partir de la calibración del microscopio.

En función de lo dicho anteriormente el espesor óptico ( $h$ ) puede ser calculado utilizando la Ec.4.16.<sup>13, 14</sup>

$$h = \frac{\sqrt{R_p}}{\sin(2\theta_B - 90)} \left( \frac{\pi \sqrt{n_1^2 + n_2^2} (n_1^2 - n^2) (n_2^2 - n^2)}{\lambda (n_1^2 - n_2^2) n^2} \right) \quad \text{Ec.4.16}$$

donde,  $n_1$ ,  $n$  y  $n_2$  son los índices de refracción del aire, monocapa y de la subfase, respectivamente,  $\theta_B$  es el ángulo de Brewster y  $\lambda$  la longitud de onda del laser. El índice de refracción de la subfase se calcula como  $\tan(\theta_B)$  y el índice de refracción de las monocapas depende de la fase en la cual se encuentre el surfactante<sup>15</sup>.

### 4.6.3. Equipamiento

Los experimentos BAM fueron llevados a cabo utilizando un elipsometro EP3 Imaging (Acucurion, Goettingen, Germany) con objetivos 20x y 10x equipado con un laser p-polarizado cuya  $\lambda = 532\text{nm}$ . El microscopio se encuentra adherido al Sistema Nacional de Microscopia y pertenece al Centro de micro y nanoscopia de Cordoba (CEMINCO). La monocapa se formó en una balanza de Langmuir (KSV, minitrough, KSV instruments, Ltd., Helsinki, Finland).

## 4.7. Dispersión dinámica de luz (DDL)

La dispersión dinámica de luz (DDL) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o

macromoléculas en solución tales como proteínas y polímeros <sup>16</sup>. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada.

Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas grandes llevan a variaciones más lentas. Por norma general, en DDL la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen.

#### 4.7.1 Determinación del tamaño de partícula

Como se mencionó, si se incide con un haz de luz a una solución coloidal, las partículas que la componen dispersan dicha luz. La técnica DDL detecta la intensidad de esa luz dispersada. Como las partículas están en constante movimiento pueden existir interferencias entre las moléculas tanto constructivas como destructivas, de esta manera la intensidad de luz dispersada fluctúa con el tiempo. La fluctuación de la luz dispersada nos proporciona información acerca de las partículas. Experimentalmente estas partículas se caracterizan calculando la función de correlación de intensidad  $G(\tau)$ , cuyo análisis proporciona el coeficiente de difusión de las partículas:

$$G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2D_t q^2 \tau} \quad \text{Ec.4.17}$$

Donde,  $b$  es una constante dependiente del instrumento y de los lentes usados,  $D_t$ , es el coeficiente de difusión,  $\tau$  el tiempo de decaimiento y  $q$ , el vector de dispersión, el cual puede ser expresado como:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}} \quad \text{Ec.4.18}$$

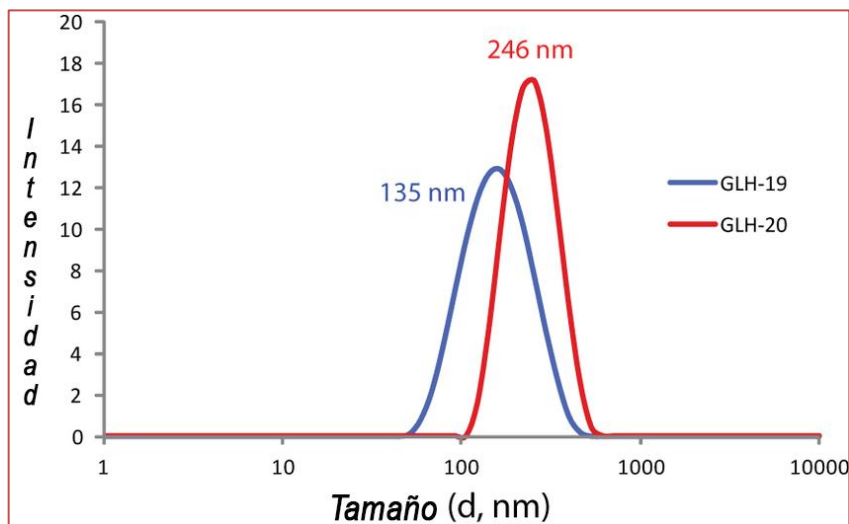
Donde,  $n_0$  es el índice de refracción del solvente,  $\lambda_0$  la longitud de onda en el vacío y  $\theta$  el ángulo de difracción.

Haciendo un ajuste de los datos se puede obtener la función de correlación  $G(\tau)$ , luego empleando Ec.4.17 se obtiene  $D_t$ . El tamaño de partícula se puede determinar empleando la siguiente ecuación (Stokes-Einstein):

$$D_T = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Ec.4.19}$$

donde,  $k_b$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura,  $\eta$  la viscosidad y  $R_h$  el radio hidrodinámico, esto último es lo que nos permite conocer el tamaño de las partículas.

A partir de los experimentos de DDL se pueden obtener Histogramas, los cuales muestran la intensidad de dispersión en función de la distribución de tamaños de las partículas que conforman la solución coloidal. En la Figura 4.16 se muestran histogramas para dos suspensiones de surfactantes medidos mediante DDL.



**Figura 4.16** Histogramas de tamaño a partir de experimentos de DDL. Se muestran los tamaños promedio para las micelas formadas por dos surfactantes aniónicos. Condiciones experimentales: concentración de surfactante 2 mM en medio acuoso, 25 °C.

## 4.8. Nefelometría

Además de la técnica de DDL, se utilizó nefelometría para confirmar resultados y evidencias. En este procedimiento analítico se determina una propiedad importante de una solución: la turbidez, la cual hace que la luz se disperse y absorba en lugar de transmitirse en línea recta a través de la muestra. Para que ocurra una dispersión de luz, la solución en cuestión debe tener pequeñas partículas en suspensión que al ser incididas por la luz produzcan dicha dispersión. La medición de la turbidez, se puede utilizar en muchas aplicaciones analíticas como determinar la concentración en masa de partículas suspendidas en una muestra y, para algunos casos, distribuciones de tamaño de partículas. Esta última aplicación, es la que se utiliza en esta tesis, puntualmente para determinar el efecto de surfactantes sobre agregados en suspensión, a través de turbidez. En nefelometría, la medida de turbidez se da por la evaluación directa del grado "dispersión" de la luz que tiene lugar en el medio. Es mucho más apropiado para medios de menor turbidez en los que las partículas suspendidas son pequeñas, como en el caso de vesículas o micelas<sup>16</sup>.

El fundamento de la técnica se basa en la dispersión de la luz, producida por la interacción de un haz incidente con una partícula, lo cual resulta en emisión de luz en todas las direcciones.

La luz dispersa incluye la que se refleja desde la superficie de la partícula y la que se refracta dentro de la partícula, posiblemente después de muchas reflexiones internas. Sin embargo, la relación directa entre los datos de turbidez y las concentraciones de partículas en suspensión es compleja debido a las múltiples interacciones de la energía luminosa con las partículas suspendidas. Esta interacción depende de muchos factores, incluyendo:

- Concentración de partículas dispersas suspendidas en el medio;
- Distribución del tamaño de las partículas dispersantes;
- Forma, orientación y estado de la superficie de las partículas dispersantes;
- Índice de refracción de las partículas dispersantes;
- Índice de refracción del medio de suspensión;
- Longitud de onda de la fuente de luz empleada.

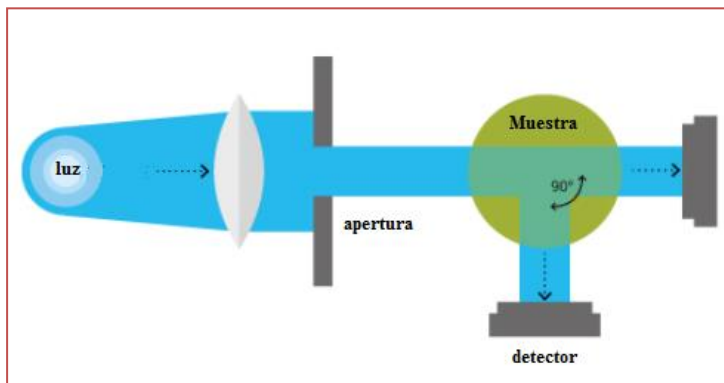
Debido a esta complejidad se han desarrollado modelos simplificados para encontrar una utilidad analítica a la propiedad de la turbidez. En su nivel más simple, la intensidad de la luz se reduce luego de incidir sobre una dispersión de partículas en una muestra según una función de atenuación de la forma:

$$I = I_0 e^{-tl} \quad \text{Ec 4.20}$$

Donde  $I_0$  es la intensidad inicial con la que se incide la solución,  $I$  la intensidad transmitida luego de pasar por el medio,  $l$  la longitud de dicho medio y  $t$  el coeficiente de turbidez del medio.

A su vez la dispersión de la luz está gobernada por la relación de diámetro,  $D$ , de los elementos dispersantes con la longitud de onda de la luz emitida por el instrumento de medición. Con lo cual en la Ec 4.20 depende fuertemente del diámetro de la partícula, por ende si existe una ruptura de estas partículas la difracción disminuye <sup>16</sup>.

Las mediciones utilizando esta técnica se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro (Agilent Technologies) equipado con una cubeta termo controlada. En la Figura 4.17 se muestra un esquema simplificado de esta técnica, donde se ilustran los conceptos mencionados en esta sección.



**Figura 4.17** Esquema de un equipo de nefelometría convencional.

## 4.9. Espectroscopia de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es un tipo de espectroscopia electromagnética que analiza la emisión de luz producida por un fluoróforo después de la absorción de luz UV o visible de una muestra. De esta manera, se emplea un haz de luz, que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos, los que posteriormente se relajarán a un nivel inferior emitiendo luz de una menor energía. La fluorescencia se utiliza como técnica de detección y cuantificación de compuestos en solución, siendo un método rápido, simple y económico.

Hay varios parámetros que influyen en la intensidad y la forma de los espectros obtenidos mediante esta técnica. Al registrar un espectro de emisión, la intensidad depende de:

- Longitud de onda de excitación;
- Concentración del analito;
- Longitud del recorrido de la cubeta;
- Auto-absorción de la muestra;

Una molécula puede ser excitada desde su estado fundamental electrónico. Tras la excitación (la absorción de un fotón, proveniente del haz incidido), uno de los electrones entra en un estado electrónico superior y la molécula se excita. La molécula permanecerá en su estado excitado electrónico durante un tiempo del orden de los nanosegundos (ns). Luego, el electrón regresará a su estado fundamental y emitirá un fotón de una longitud de onda más larga que el fotón utilizado para la excitación. Se puede determinar la concentración del analito empleando la siguiente relación:

$$\frac{I_0}{I} = e^{-Ecl} \quad \text{EC. 4.21}$$

Donde  $I_0$  es la intensidad incidente (intensidad del haz de luz),  $I$ , la intensidad de transmisión (proveniente de la emisión del analito),  $E$ , coeficiente de extinción molecular,  $c$ , concentración en mol.L<sup>-1</sup> del analito y  $l$ , la longitud del camino óptico.

Con los datos obtenidos empleando esta metodología, se puede graficar la relación  $I_0/I$  como función de las variables de interés del sistema que normalmente involucran la longitud de onda y la concentración del analito.



Los espectros de emisión de fluorescencia de la presente tesis, fueron generados utilizando un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55 empleando distintas longitudes de onda para la excitación y la emisión.

## 4.10. Reactantes Químicos

### 4.10.1. Sales, Ácidos y Bases

- Ácido clorhídrico (HCl), Sigma Co.
- Cloruro de litio (LiCl), Merk.
- Cloruro de sodio (NaCl), Merck.
- Hidróxido de litio (LiOH), Merck
- Hidróxido de sodio (NaOH), Merck.
- Bromuro de tetrapentil amonio (TpnABr), Sigma Co
- Cloruro de tetrafenil arsonio,  $\text{Ph}_4\text{AsCl}$  (TPhAsCl), Sigma Co.
- Cloruro de tetrapentil amonio  $(\text{C}_5\text{H}_{11})_4\text{NCl}$ , (TPACl), Sigma Co.
- Cloruro de tetrabutilamonio  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NCl}$ , (TBACl), Sigma Co.
- Cloruro de tetraetil amonio  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NCl}$ , (TEACl), Sigma Co.
- Cloruro de tetrafenilfosfarileno (BTPPAsCl), Sigma Co.
- 3,3'-commo-bis(undecahidro-1,2-dicarba-3-cobalta-closo-dodecaborato) de sodio (dicarbolil cobaltato de sodio, NaDDC), Lachema, p.a.
- Tetrafenil borato de sodio (NaTPhB), Sigma Co.
- Tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio(KTPhClB), Sigma Co.
- Ácido Perfluoro octanoico, (PFO), Fluka.
- Ácido Perfluoro nonanoico, (PFN), Fluka
- Ácido Perfluoro decaanoico.(PFD) Fluka.

- Ácido perfluoro sulfónico (PFOS), Strem Chemicals
- Fosfolípidos:1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfato(DSPA), Sigma Co
- 1,2-diestearoil-sn-3-fosfoetanol amina (DSPE), Sigma Co
- 1,2-dilauril-sn-glicerol-3-fosfato (DLPA) Sigma Co

#### 4.10.2. Polímeros

- P F127, (12600 g/mol): The National Starch and Chemical Co.

#### 4.10.3. Solventes

- Agua ultrapura (18 MΩ) Sistema MilliQ RiOs 16, Millipore.
- 1,2-dicloroetano (1,2-DCE), Dorwil p.a.
- Cloroformo, Merck.
- Etanol, Merck.
- Metanol, Merck.

### 4.11. Bibliografía

- [1] Z. Samec, V. Mareček, D. Homolka, Faraday Discussions of the Chemical Society 1984, 77, 197-208
- [2] R. H. Wopschall, I. Shain, Analytical Chemistry 39 (1967), 1514-1527
- [3] Z. Samec, V. Mareček, J. Koryta, M. Khalil, Journal of Electroanalytical Chemistry 83 (1977), 393-397.
- [4] E. Alvarez de Eulate, J. Strutwolf, Y. Liu, K. O'Donnell, D.W.M. Arrigan, Anal. Chem. 88 (2016) 2596–2604.
- [5] J. Allen, L. R. F. Bard, Electrochemical Method: "Fundamentals and applications". 2nd edition ed.; New York, 1976.
- [6] F. Scholz, ChemTexts 1 (2015) 17
- [7] R. H. Wopschall, I. Shain, I., Analytical Chemistry 39 (1967), 1514-1527.
- [8] A. M. Baruzzi, J. Ühlken, Journal of Electroanalytical Chemistry 282 (1991), 267-273.
- [9] J.T. Davies, Interfacial phenomena. Academic Press: New York, 1963.

- [10] Trillo, J. M., La interfase aire / agua: Monocapas de Extensión. Real Academia de Farmacia. Sección Galicia.: Santiago de Compostela, 2002.
- [11] D. M. Taylor, O. N. Oliveira Jr, H. Morgan, Thin Solid Films 173 (1989),141-147.
- [12] O. N. Oliveira Jr, D.M. Taylor, H. Morgan, Thin Solid Films 210 (1992), 76-78.
- [13] A. Baszkin, ., Physical Chemistry of Biological Interfaces. Marcel Dekker, Inc: New York, 2000.
- [14] F. V. Mercado, B. Maggio, N. Wilke, Chemistry and Physics of Lipids 164 (2011), 386-392.
- [15] C. I. Cámara, M. V. C. Quiroga, N. Wilke, A. Jimenez-Kairuz, L. M. Yudi, Electrochimica Acta 94 (2013),124-133.
- [16] B. Sourav , Journal of Controlled Release 235 (2016), 337-351.

---

Parte III:

Resultados

---

---

# Capítulo 5

## Comportamiento electroquímico de surfactantes perfluorados

---

## 5. Comportamiento electroquímico de surfactantes perfluorados en interfaces líquido/ líquido.

### 5.1. Introducción

Como se mencionó en el capítulo 3, existe una amplia gama de aplicaciones relacionadas con la adsorción de surfactantes en diferentes interfaces. La concentración micelar crítica (CMC) es uno de los parámetros más importantes para la caracterización de las propiedades coloidales y superficiales de un surfactante. Ésta también determina su utilidad industrial, como la formación de espuma, humectación, emulsificación y solubilización de solutos de interés<sup>1</sup>.

Se han desarrollado varios métodos experimentales para la determinación de la CMC de agentes tensioactivos, todos ellos basados en la discontinuidad o punto de inflexión en una propiedad física medible de la solución que contiene el surfactante, conforme aumenta su concentración<sup>2-5</sup>.

Las técnicas electroquímicas aplicadas a interfaces sólido / líquido se han utilizado con éxito para el estudio de diferentes propiedades de los surfactantes y las estructuras organizadas que ellos forman, como los coeficientes de difusión, radio hidrodinámico micelar, CMC<sup>6-8</sup>, número de agregación de micelas inversas<sup>9</sup> y constantes de velocidad heterogéneas estándar para la transferencia de carga. Los métodos electroquímicos en interfaces líquido / líquido, formadas entre dos soluciones electrolíticas inmiscibles, también se han empleado para estudiar el comportamiento interfacial de diversos surfactantes. Se ha prestado especial atención al estudio de la adsorción de fosfolípidos y transferencia de iones a través de estas monocapas<sup>10-16</sup>; el efecto de los surfactantes en la fusión de partículas emulsionadas en la interfaz<sup>17</sup>; así como la transferencia de tensioactivos catiónicos,

empleados como moldes para la generación de depósitos de sílice mesoporosos<sup>18-22</sup>, y el uso de micelas para la amplificación de la señal amperométrica de proteínas en interfaces líquido / líquido<sup>23</sup>.

Un grupo especial dentro de los surfactantes, son los denominados perfluorados, que contienen átomos de flúor en la parte lipofílica del tensoactivo, aumentando su carácter hidrofóbico y disminuyendo su reactividad química. Es por esto que tienen una gran gama de aplicaciones industriales. Sus propiedades únicas, como su mayor actividad superficial y estabilidad son las características principales que los diferencian de los correspondientes compuestos hidrocarbonados, así como una marcada mayor acidez. Motivadas por estas propiedades especiales, numerosas investigaciones se han centrado en el estudio de la adsorción de surfactantes perfluorados en diferentes interfaces<sup>24</sup>, y los sistemas micelares formados por estas especies<sup>25-26</sup> o por sus mezclas con surfactantes hidrocarbonados<sup>27</sup>.

Por otra parte, el uso excesivo de los compuestos perfluorados, trajo consigo importantes problemas ambientales. Principalmente porque son utilizados en polvos extintores de fuego y como repelentes de agua en la industria textil, produciendo su acumulación en fuentes de agua o suelos. Actualmente, existen más de doscientos derivados de estos compuestos en el ambiente, provenientes de la industria química o como metabolitos y productos de degradación química o biológica<sup>28</sup>. Esto ha llevado a que el ácido perfluoro octanoico (PFO), ampliamente conocido por estar presente en el politetrafluoroetileno(PTFE), empleado para recubrir utensilios de cocina (como Teflon<sup>TM</sup>), sea revisado como un posible contaminante orgánico, dado que tiene propiedades bioacumulativas y persistentes<sup>29</sup>. En general los compuestos perfluorados de cadena larga representan una gran amenaza para los ecosistemas y la salud humana, y es de suma importancia comprender los mecanismos de su acumulación, así como desarrollar métodos para su eliminación. Por esta razón, estudiar las

propiedades de estos compuestos como la CMC, su coeficiente de difusión en soluciones acuosas (D), el número de agregación micelar, entre otras, no solo es de interés industrial sino también ambiental y de salud humana. Entonces el estudio de estos compuestos con un enfoque básico podría contribuir a la remediación del ambiente ya que el conocimiento de sus propiedades facilitaría su detección y posterior remoción de ecosistemas o seres vivos.

## 5.2. Objetivos

### 5.2.1. General

En función de lo expuesto el objetivo general de esta sección fue estudiar el potencial de las técnicas electroquímicas para estudiar el comportamiento de ácidos perfluorados en la interfaz agua / 1,2-dicloroetano mediante voltametría cíclica y espectroscopia de impedancia para obtener información útil relacionada con las propiedades interfaciales de monómeros y micelas de estos surfactantes.

### 5.2.2. Específicos

- Determinar la condiciones experimentales para el estudio de surfactantes en interfaces líquido/ líquido
- Calcular la concentración micelar crítica (CMC) para los ácidos perfluoro octanoico, nonanoico y decanoico mediante voltametría cíclica (CV)
- Validar los valores de CMC obtenidos por CV mediante otros métodos
- Caracterizar propiedades de superficie de los surfactantes estudiados a través de experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica



- Obtener parámetros de las especies micelares de los surfactantes estudiados como el número de agregación (N) y el coeficiente de difusión en soluciones acuosas (D)

### 5.3. Parte experimental

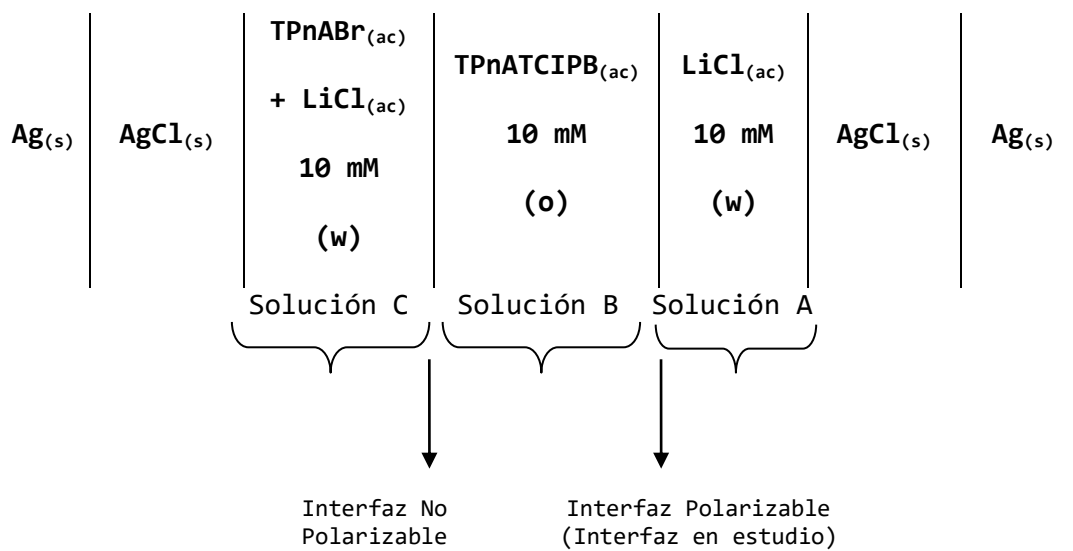
Se empleó una celda de vidrio convencional como la mostrada en la sección 4.1.3 (Figura 4.6) con un área interfacial de 0,17 cm<sup>2</sup> para las medidas electroquímicas. Los electrodos de referencia usados fueron de Ag/AgCl y dos alambres de platino como contra electrodos. El electrodo de referencia correspondiente a la fase orgánica se sumergió en una solución acuosa compuesta por bromuro de tetrapentilamonio (TPnABr) y LiCl, ambas sales en concentración 10 mM. De esta manera, los potenciales de trabajo informados en los voltagramas y Figuras incluyen  $\Delta\phi_{tr}^o_{TPnA^+}$ , para la transferencia de TPnA<sup>+</sup> como ion de referencia.

Las soluciones electrolíticas se prepararon en una concentración 10 mM, a partir de las siguientes sales: LiCl en agua ultra pura para la fase acuosa mientras que para la fase orgánica se empleó Tetrakis(4-clorofenil)borato de tetra pentil amonio (TPnATCIPB) en 1,2- dicloroetano (DCE). La sal TPnATCIPB fue preparada por metátesis de bromuro de tetra pentil amonio (TPnABr) y tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio (KTPPhCIPB).

Se emplearon los siguientes surfactantes perfluorados: Acido perfluoro octanoico (PFO), Ácido perfluoro nonanoico (PFN) y Ácido perfluoro decanoico (PFD) (pureza del 98%). Estos ácidos se disolvieron en la fase acuosa en concentraciones comprendidas dentro del intervalo: 0,05 mM hasta 3,00 mM. El pH de trabajo para todas los experimentos fue igual a 6, a este pH los tres surfactantes están

completamente ionizados (forma aniónica), con su grupo polar cargado negativamente.

De esta manera el esquema de la celda de trabajo es el siguiente:



### 5.3.1 Voltametría cíclica (VC) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIE)

En los experimentos de VC el potencial de trabajo se varió entre  $0,900\text{ V}$  y  $0,150\text{ V}$ , en un intervalo de velocidades desde  $10\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta  $200\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . En este capítulo se toma como barrido inicial al negativo y barrido inverso al positivo.

La EIE se llevó a cabo empleando un analizador electroquímico CHI C700. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó con el software ZPlot/ Zview (Scribner Associates Inc.). El intervalo de frecuencia experimental fue entre  $0,1$  y

2000,0 Hz, la amplitud de la perturbación ac fue de 10 mV y se aplicaron diferentes potenciales dc constantes, E, superpuestos a la onda sinusoidal.

Se realizaron gráficos de capacitancia (C) en función de E en un valor de frecuencia correspondiente al máximo, de las curvas de los gráficos de Bode ( ángulo de fase vs frecuencia).

### 5.3.2 Isotermas de presión superficial- área molecular y presión superficial - concentración

La subfase acuosa, compuesta por LiCl 10 mM, se introdujo en una celda de teflón (364 mm x 75 mm de área de película efectiva), y sobre su superficie se inyectaron 100  $\mu$ L de soluciones de PFO, PFN o PFD 0,70 mM en 1:2 metanol:cloroformo utilizando una microjeringa Hamilton. Antes de la inyección de las soluciones se limpió la interfaz de la siguiente manera: se redujo el área superficial por medio de las barreras del equipo y posteriormente se eliminó cualquier contaminante realizando succión de la interfaz. Se controló la limpieza de la interfaz verificando que los valores de presión superficial sean menores a  $0,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para una isoterma completa en ausencia de surfactantes. Luego de la inyección se esperaron 10 minutos para evaporar el solvente, posteriormente se realizó la compresión de la interfaz por medio de las barreras a una velocidad de  $5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ , mientras en simultáneo se registró la presión lateral ( $\pi$ ) de forma tal de construir las isotermas.

Para el análisis de la variación de la presión superficial en función de la concentración de surfactantes, se agregaron sucesivos volúmenes de 5  $\mu$ L de soluciones de 0,100 M de PFO, PFN o PFD a la subfase de LiCl 10,00 mM en una celda con un área interfacial igual a  $3,92 \text{ cm}^2$ , mientras se medía la presión superficial

estacionaria para cada concentración. De esta manera se alcanzaron valores de concentración de surfactante en la subfase en un intervalo de 1,00 a 4,00 mM.

### 5.3.3 Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo empleando 1-sulfonato-o-aminonaftaleno (en inglés, ANS) como sonda fluorescente en una concentración igual a 0,14 mM. Se analizó la variación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de surfactante en el siguiente intervalo de concentración: 1,00 mM <  $C_{\text{surfactante}}$  < 3,00 mM. El fundamento de esta técnica se basa en que el ANS solo fluoresce en ambientes hidrofobicos por lo cual solo lo hara en el corazón de la micela permitiendo con esta técnica determinar la CMC del surfactante estudiado.

Para obtener el espectro de emisión de fluorescencia del ANS a  $\lambda = 475$  nm se utilizó un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS 55 excitando la muestra a  $\lambda = 370$  nm

### 5.3.4 Determinación del número de agregación

Se determinó el número de agregación de los surfactantes por el método de atenuación (“quenching”) de fluorescencia de pireno (utilizado como sonda).

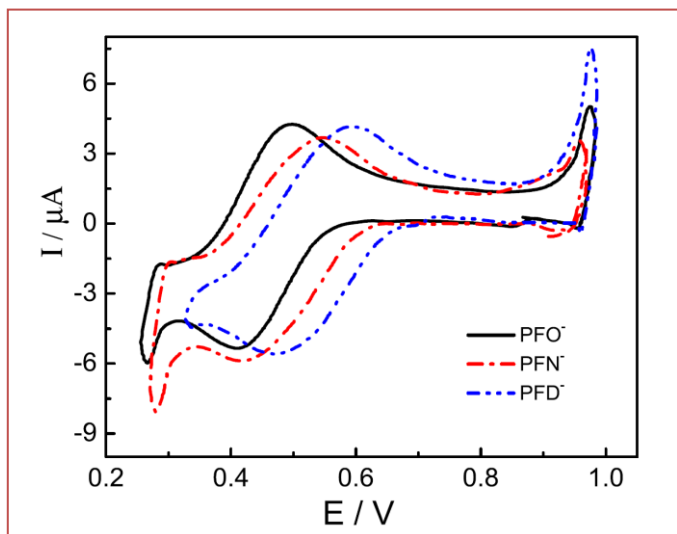
La concentración de la sonda se mantuvo constante (igual a 20  $\mu\text{M}$ ) mientras que la concentración de “quencher” (bromuro de cetilpiridinio), se varió entre 50,0 y 600,0  $\mu\text{M}$ . La concentración de surfactante se mantuvo constante y por encima de su valor de CMC. El pireno es poco soluble en agua, por esta razón la solución madre de

esta sonda se preparó en metanol, en una concentración igual a 0,4  $\mu\text{M}$ . Antes de cada medida, las soluciones fueron agitadas durante 24 horas a 25° C en un baño termostatzado con el objetivo de alcanzar un equilibrio de solubilización. La longitud de onda de excitación de pireno fue  $\lambda = 335 \text{ nm}$ , los anchos de la banda de excitación y fluorescencia fueron de 3 nm. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura constante de  $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 5.4 Resultados

### 5.4.1. Comportamiento electroquímico de tensioactivos perfluorados

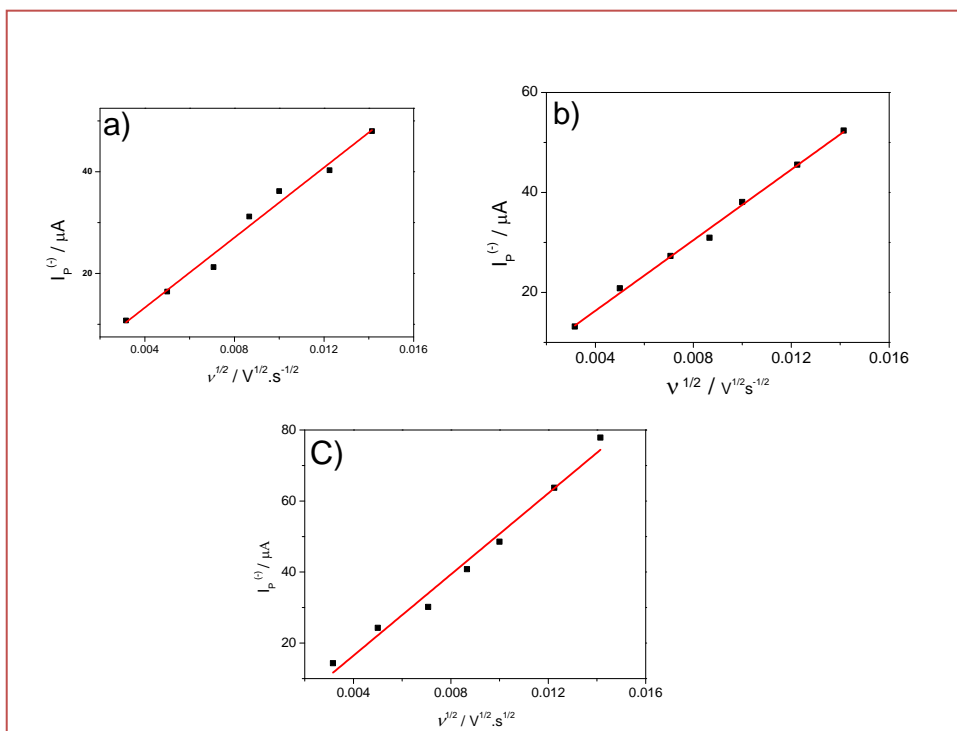
En la Figura 5.1 se muestran, los voltagramas obtenidos para las formas aniónicas de los tres surfactantes analizados en el presente capítulo, PFN<sup>-</sup>, PFN<sup>-</sup> y PFN<sup>-</sup>. Durante el barrido negativo de potencial, ocurre la transferencia de estos aniones desde la fase acuosa a la orgánica a un potencial  $E_p(-) = 0,410, 0,425 \text{ y } 0,475 \text{ V}$  respectivamente. Esta tendencia en los potenciales de pico puede explicarse considerando que una disminución del largo de cadena produce a su vez una disminución en la hidrofobicidad, y por lo tanto, un aumento en el potencial requerido para transferir el anión a la fase orgánica (corrimiento hacia potenciales más negativos). Para los 3 aniones, los valores de corriente de pico dependen linealmente de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 5.2), lo cual indica que la transferencia de los 3 aniones está controlada por difusión.



**Figura 5.1** Voltametría cíclica para la transferencia de PFO<sup>-</sup> (negro), PFN<sup>-</sup> (rojo) y PFD<sup>-</sup> (azul) en la interfaz agua / 1,2 dicloroetano.

**Composición de la fase acuosa:** Acido perfluorado 0,25 mM + LiCl 10 mM

**Composición de la fase orgánica:** TPnATCIPhB 10 mM.  
 $v = 0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$



**Figura 5.2** Corriente de pico negativa ( $I_p^{(c)}$ ) en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ) para a) PFO<sup>-</sup>; b) PFN<sup>-</sup> y c) PFD<sup>-</sup>,

**Composición de la fase acuosa:** Acido perfluorado 0,25 mM + LiCl 10 mM

**Composición de la fase orgánica:** TPnATCIPhB 10 mM.

### 5.4.2. Efecto de la concentración de surfactante en su respuesta electroquímica

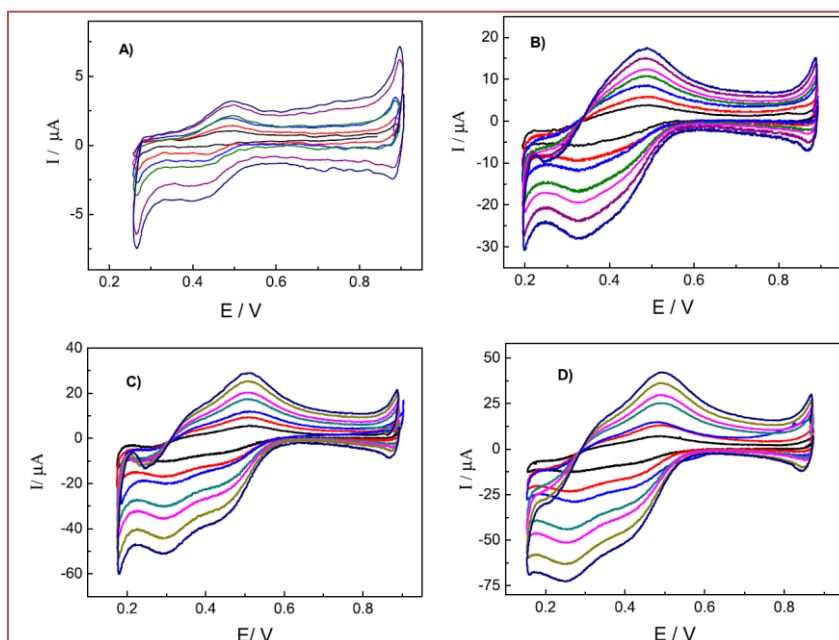
En la Figura 5.3, se muestran los voltagramas obtenidos para distintas concentraciones de PFN presente en la fase acuosa. A bajas concentraciones de surfactante se observa un sistema formado por un solo pico de corriente positiva y su correspondiente pico negativo, atribuibles a la transferencia del surfactante aniónico en su forma monomérica desde la fase acuosa a la orgánica durante el barrido negativo de potencial (corriente negativa) y el retorno a la fase acuosa durante el barrido positivo (Figura 5.3A). Bajo estas condiciones se obtuvo una relación lineal entre la corriente de pico y la concentración de surfactante, de la pendiente de ese gráfico, y de gráficos similares obtenidos para PFO y PFN, se calculó el coeficiente de difusión en fase acuosa (D). En la tabla 5.1 se observan los valores de D obtenidos para los 3 surfactantes estudiados en su forma monomérica.

Coeficiente de difusión (D)/ $10^{-5}\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$	
PFO	2,80
PFN	2,51
PFD	2,32

**Tabla 5.1.** Coeficientes de difusión de monómeros de PFO<sup>-</sup>, PFN<sup>-</sup> y PFD<sup>-</sup> determinados por voltametría cíclica.

A medida que la concentración se incrementa, se observa la aparición de un segundo pico, a potenciales más negativos, (Figuras 5.3 B-D). En este caso también se observa una relación lineal de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de

barrido y con la concentración del surfactante en fase acuosa. Este comportamiento fue similar para PFN y PFN (ver anexo 1).



**Figura 5.3.** CVs para la transferencia de  $\text{PFN}^-$  en la interfaz agua/1,2-dicloroetano a diferentes velocidades de barrido

**Composición de la fase acuosa:**  $\text{PFN}^-$  A) 0,05 mM, B) 0,32 mM, C) 0,74 mM y D) 0,95 mM + LiCl 10 mM  
**Composición de la fase orgánica:** TPnATCIPhB 10.00 mM.

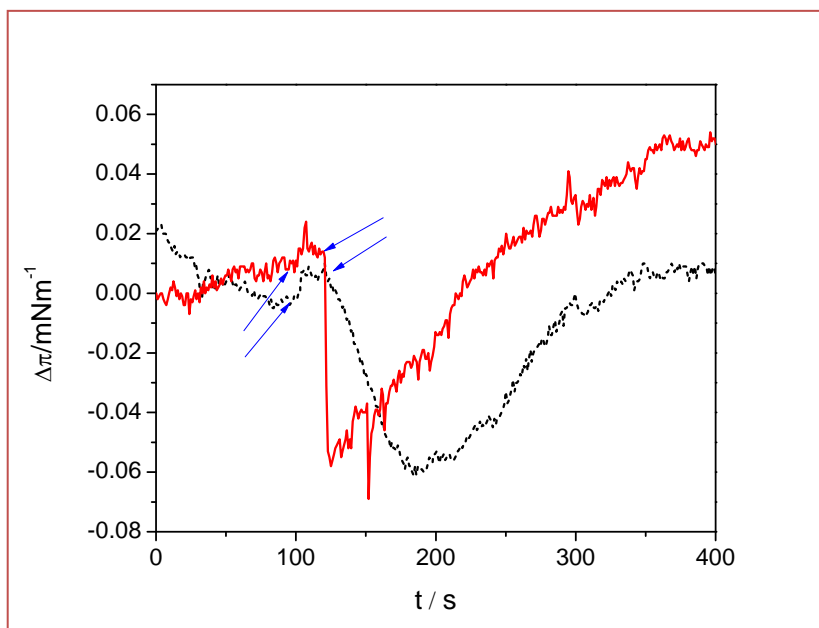
$v = 0,010, 0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,150$  y  $0,200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Este segundo sistema de picos puede atribuirse a tres procesos diferentes: 1) difusión facilitada de los aniones de surfactantes presentes en la fase acuosa por acción del catión  $\text{TPnA}^+$  presente en la fase orgánica vía formación de un par iónico  $\text{TPnA}^+ - \text{PFN}^-$ ; 2) la transferencia de especies pre-micelares, formadas como producto del aumento de la concentración de surfactante, ocurriendo a potenciales más negativos comparados con la transferencia del monómero, lo cual se explica teniendo en cuenta que la asociación de 2 o más moléculas de surfactantes conduce a que los agregados sean más hidrofílicos por aumento de la carga negativa y también porque las cadenas carbonadas, al estar interrelacionadas, se mantienen menos accesibles a la fase acuosa; 3) considerando que un aumento de la concentración de surfactantes lleva a un aumento de la adsorción de estas moléculas en la interfaz, el segundo pico,



entonces, podría corresponder a la desorción de las moléculas presentes desde la interfaz a la fase orgánica. Para determinar cuál de estos tres es el proceso que corresponde al segundo pico, se registraron cambios en la presión superficial en presencia de surfactantes en una concentración igual a 0,50 mM, antes y después de un pulso de potencial a  $E=0,250$  V (potencial de segundo pico) durante 30 segundos. Debido a que a este valor de concentración se observa el segundo pico, en el caso de que ocurriese una desorción, se deberían observar cambios marcados en la tensión superficial luego de la aplicación del pulso de potencial.

En la Figura 5.4 se muestran los cambios en la presión superficial, obtenidas antes, durante y después de la aplicación del pulso de potencial en presencia y ausencia de surfactante. ( $\Delta\pi = \pi - \pi_{\text{inicial}}$ , donde  $\pi_{\text{inicial}}$  corresponde a la presión inicial, registrada en la balanza de Langmuir sin ninguna perturbación, mientras que  $\pi$  es la presión registrada durante o luego de la aplicación del pulso). El potencial inicial previo a la aplicación del pulso es el potencial de equilibrio a circuito abierto.



**Figura 5.4.** Variación de la diferencia de presión superficial ( $\Delta\pi=\pi-\pi_{\text{inicial}}$ ) antes y después de aplicar un pulso de potencial a  $E= 0,250$  V, durante 30 s. Las flechas azules hacia arriba indican la aplicación del pulso de potencial las flechas azules hacia abajo indican el final del pulso.

**Composición de la fase acuosa:**

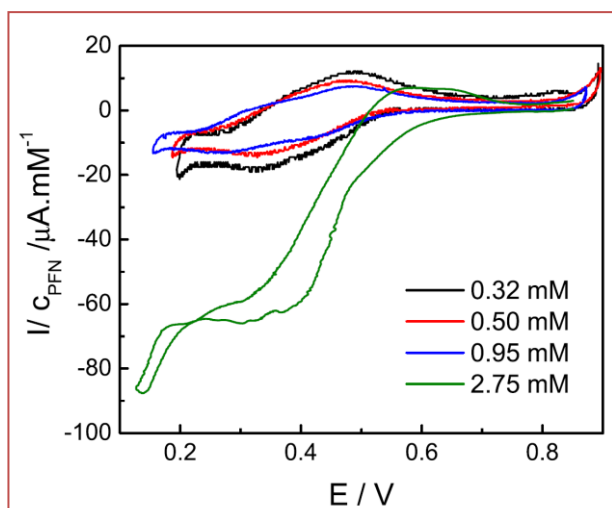
LiCl 10 mM (Negro), Acido perfluorado 0,50 mM + LiCl 10 mM (Rojo).

Las flechas hacia arriba indican el comienzo del pulso de potencial mientras que las flechas hacia abajo indican el final del pulso. Como se observa, no hay un descenso significativo en la presión durante la aplicación del pulso ni tampoco se evidencian diferencias en  $\Delta\pi$  en ausencia y presencia de surfactante, lo que indicaría que no ocurre una desorción del surfactante. El descenso en la presión luego del pulso correspondiente a  $0,06 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , para ambas condiciones, en ausencia y presencia de surfactante se debe a reordenamientos en la interfaz. Por otro lado, para este segundo proceso electroquímico se observa una dependencia lineal de la corriente de pico con  $v^{1/2}$  (anexo Figura 2), lo cual indica que la reacción de transferencia de carga está controlada por difusión. Estas dos evidencias confirmarían que el segundo pico se debe a la transferencia de una especie pre-micelar o a un par iónico formado entre el catión soporte de la fase orgánica ( $\text{TPnA}^+$ ) y los aniones perfluorados y se descartaría

la posibilidad de que el segundo pico se deba a una desorción y posterior transferencia a la fase orgánica.

Si la concentración de PFN continúa aumentando, a concentraciones iguales o superiores a 2,24 mM, se aprecia un cambio abrupto en la forma de los voltagramas (Figura 5.5). La normalización de la corriente por la concentración de surfactante permite clarificar mejor el efecto del aumento de la concentración. Es evidente el gran incremento en la corriente negativa, junto con un cambio en la forma del CV hacia un perfil estacionario, a bajas velocidades de barrido, para estas concentraciones de surfactante mayores a 2,24 mM. El cambio repentino en la respuesta voltamétrica puede atribuirse a la formación de micelas en la fase acuosa. El gran aumento de corriente se debería a un incremento de la carga negativa de la especie transferida desde la fase acuosa a la orgánica, mientras que el valor relativamente bajo de corriente en el barrido inverso reflejaría la inestabilidad de la micela en fase orgánica. Al mismo tiempo la corriente estacionaria observada a bajas velocidades se puede explicar como un aumento en la cantidad de moléculas adsorbidas en la interfaz. En este punto, vale la pena mencionar que la transferencia de especies iónicas a través de interfaces modificadas por surfactantes puede tener lugar bajo diferentes regímenes de transferencia de masa/ transferencia de carga <sup>30</sup>. Si la película de surfactantes es homogénea y estructurada, el proceso electroquímico tiene un control cinético y la transferencia ocurre mediante la permeación a través de dicha interfaz modificada. Si la distribución de los surfactantes en una interfaz no es uniforme, con dominios cubiertos y descubiertos (poros) la transferencia de iones puede ocurrir a través de ambas regiones. En el caso en que la transferencia ocurra solo en las regiones descubiertas, la respuesta voltamétrica depende del tamaño, distribución y número de poros y del tiempo del experimento. Estas interfaces con dominios descubiertos se pueden asemejar a un arreglo de microelectrodos y aplicar los modelos teóricos de comportamiento difusional en microelectrodos <sup>31-33</sup>: a altas velocidades, cuando el diámetro del microporo,  $\phi$ , es más grande que el espesor de la

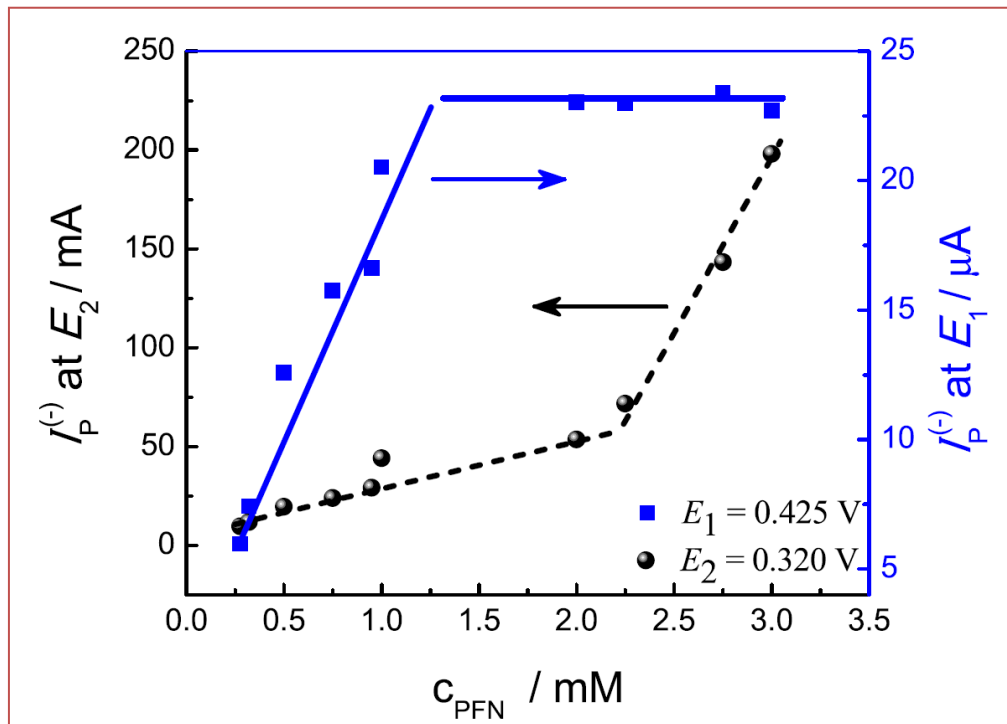
capa de difusión, la transferencia de masa a dicha interfaz ocurre mediante difusión lineal semiinfinita y se observa la forma típica de picos de corriente en voltogramas cíclicos. Cuando la velocidad de barrido es baja y  $\delta$  es más grande que  $\varphi$ , pero pequeña en comparación a la distancia entre dos poros adyacentes, ocurre una difusión radial para cada poro y se observan corrientes estacionarias en los voltogramas (forma sigmoidea). La respuesta de estado estacionario evidenciada para PFN a altas concentraciones y bajas velocidades de barrido, indica que la transferencia de masa está ocurriendo a través de un proceso de difusión radial. Estos resultados demuestran la presencia de microporos en la interfaz, a través de los cuales tiene lugar la transferencia de la micela. La forma de pico durante el barrido inverso y su baja corriente comparada con los valores del barrido directo se explicaría considerando que las micelas se disocian en la fase orgánica y los monómeros u otras estructuras pre-micelares se transfieren hacia la fase acuosa a su correspondiente  $E_{p(+)}$ . Si se aumenta la velocidad de barrido, se observan voltogramas convencionales con picos de corriente. También en estos casos ocurre un cambio abrupto en los valores de corrientes para valores iguales o superiores a 2,24 mM. A partir de estos voltogramas, se analizó la dependencia de  $I_p^{(+)}$ , (valores de la corriente de pico negativas), con la concentración de PFN, los cuales se discutirán en la sección siguiente.



**Figura 5.5.** CVs para la transferencia de  $\text{PFN}^-$  en la interfaz agua/1,2-dicloroetano normalizados por la concentración de  $\text{PFN}^-$ .  
**Composición de la fase acuosa:**  $\text{PFN}^-$  +  $\text{LiCl}$  10,00 mM  
**Composición de la fase orgánica:**  $\text{TPnATCIPhB}$  10,00 mM  
 $v = 0.010 \text{ V s}^{-1}$ .

### 5.4.3. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) por voltametría cíclica

En la Figura 5.6 se graficó la variación de  $I_p^{(-)}$ , medida a  $E_1 = 0,425$  V (proceso correspondiente al monómero), y a  $E_2 = 0,320$  V (segundo proceso correspondiente a especies pre-micelares) en función de la concentración de PFN. Para ello, se ajustaron los picos del proceso a  $E_1 = 0,425$  V con un modelo teórico correspondiente a un proceso reversible y controlado por difusión, que permitió dilucidar la corriente del segundo proceso (a modo de ejemplo se muestra el ajuste para dos concentraciones, ver anexo Figura 3). Como se observa en la Figura 5.6, la corriente de pico a  $E_1$  para PFN muestra una relación lineal con la concentración del anión hasta alcanzar un valor constante. En paralelo, la corriente de pico correspondiente al segundo proceso ( $E = E_2$ ) incrementa levemente en forma lineal con respecto a la concentración de PFN hasta valores de concentración comprendidas entre 2,00 y 2,27 mM, a partir de los cuales se observa un abrupto incremento de la corriente. Así, del ajuste lineal de ambos conjuntos de datos medidos en  $E_2$  se determina la concentración micelar crítica (CMC), como la intersección entre los dos ajustes. Para PFN se determinó un valor de  $CMC = 2,23$  mM. Además vale la pena destacar en esta figura, como evidencia adicional, que en el intervalo de concentración al cual ocurre el incremento abrupto de corriente de pico del segundo proceso, la corriente del primer pico permanece constante, reforzando la hipótesis de que se alcanza el equilibrio monómero / micela.



**Figura 5.6.** Variación de  $I_p$  a  $E_1=0,425 \text{ V}$  y  $E_2= 0,320 \text{ V}$  con la concentración de PFN  
**Composición de la fase acuosa:** PFN + LiCl 10 mM  
**Composición de la fase orgánica:** TPnATCIPhB 10 mM  
 $V = 0.050 \text{ V s}^{-1}$ .

Esta metodología se realizó de la misma manera para PFN y PFN (ver anexo Figura 4). Los valores así obtenidos de CMC para los tres surfactantes se muestran en la tercer columna de la tabla 5.2. Como se esperaba, el valor más alto de CMC se obtuvo para PFN, debido a que su cadena carbonada es más corta en comparación a los otros dos surfactantes, lo que conduce a menores fuerzas hidrófobas, es decir, una menor entropía como fuerza impulsora en la formación de micelas de surfactantes comparado con las otras dos moléculas.

### CMC (mM) / Método

	Presión superficial	Fluorescencia	Electroquímico
<b>PFO</b>	11,1 ± 0,2	9,9 ± 0,2	9,4 ± 0,2
<b>PFN</b>	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,2
<b>PFD</b>	2,2 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,2

**Tabla 5.2.** Valores de CMC en milimolar calculados mediante la variación de presión superficial, por fluorescencia de ANS o por voltametría cíclica en la interfaz agua/ 1,2-DCE.

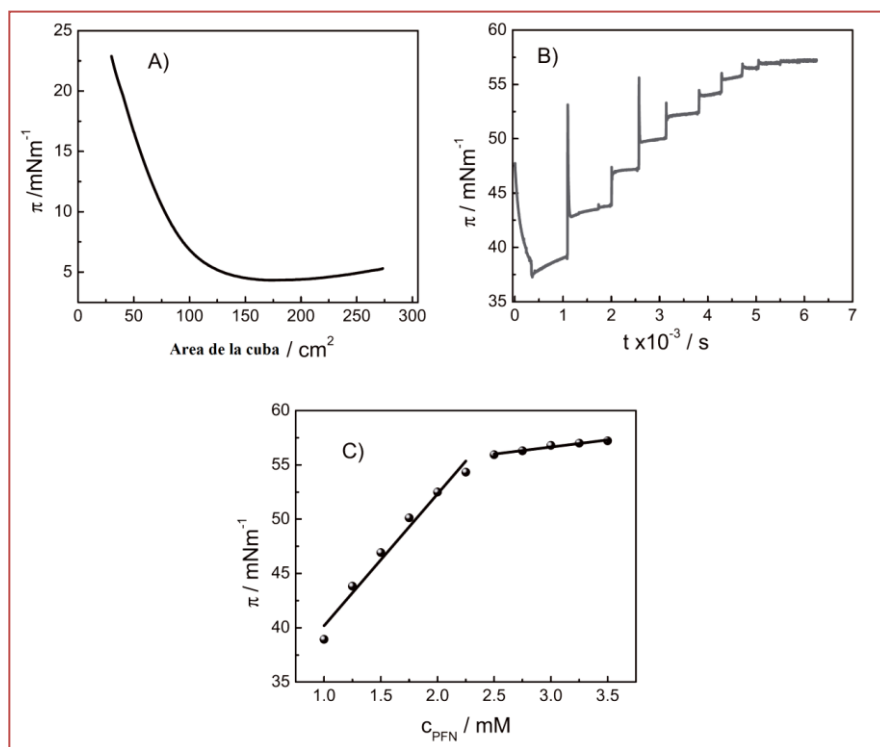
## 5.4.4. Comparación con otros métodos

### 5.4.4.1. Variación de la presión superficial

En la Figura 5.7A se muestra la isoterma de compresión (presión vs área de la cuba) obtenida para PFN a 25 °C. Se observa un leve descenso inicial de la presión superficial, al principio de la compresión, indicando una desorción inicial de un pequeño número de moléculas desde la superficie, comportamiento que ya ha sido reportado para compuestos parcialmente solubles en agua, como estas especies iónicas<sup>34</sup>. A pesar de esta desorción inicial, el incremento en la presión observada para valores de área menores a 100 cm<sup>2</sup> muestra que estos iones tienen una importante actividad de superficie. De esta manera, se realizaron experimentos analizando la variación de  $\pi$  en función de la concentración de surfactante en la subfase. Para ello, se agregaron sucesivos volúmenes de una solución 1,00 mM de

PFN, a una subfase de LiCl 10,00 mM con el objetivo de aumentar gradualmente la concentración de PFN dentro del intervalo comprendido entre de 1,00 y 3,5 mM. Luego de cada inyección, se registró la variación de la presión en función del tiempo (Figura 5.7B). La  $\pi$  estacionaria (valor constante en tiempo) obtenido después de cada inyección se graficó en función de la concentración de PFN y los resultados se muestran en la Figura 5.7C. Como se observa, un incremento en la concentración de surfactante produce un aumento en la presión superficial, debido a la adsorción de PFN, hasta alcanzar un valor constante que se logra cuando la superficie está saturada de moléculas de surfactante y la formación de micelas comienza a ocurrir dejando constante la concentración de surfactante en la subfase en un valor igual a la CMC una vez que se alcanza el equilibrio monómero  $\rightleftharpoons$  micela. La concentración en la cual se interceptan los ajustes lineales de las dos regiones en la Figura 5.7C es la CMC para el surfactante estudiado. El comportamiento fue similar para los otros surfactantes (ver anexo Figura 4), los valores de CMC determinados a partir de esta metodología se muestran en la primer columna de la tabla 5.2. Como se puede observar hay una buena correlación entre los valores de CMC determinados por medidas de presión superficial y los logrados por voltametría cíclica.



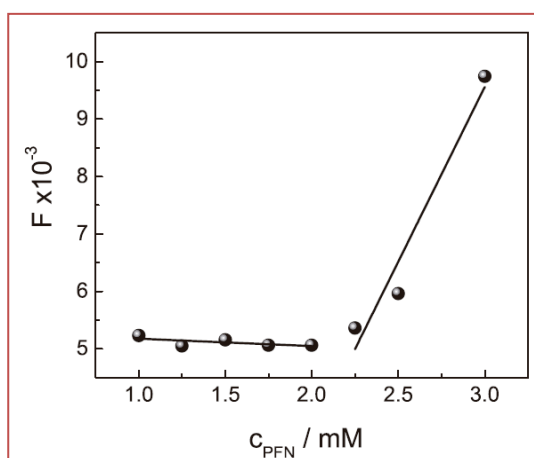


**Figura 5.7** **A)** Isotherma de compresión de  $\text{PFN}^-$  en la interfaz agua/ aire obtenida después de la inyección de 100  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{PFN}^-$  0,70 mM en la interfaz. Composición de Subfase:  $\text{LiCl}$  10,00mM. **B)** Variación de la presión superficial con el tiempo luego de sucesivas inyecciones de 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{PFN}^-$  0,10 M en la subfase **C)** Variación de la presión estacionaria ( $\pi$ ) con la concentración de  $\text{PFN}^-$ .

#### 5.4.4.2 Medias de fluorescencia

Se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia utilizando 8-aminonaftaleno-1-sulfonato (ANS) como sonda fluorescente <sup>35</sup>. Es importante remarcar que ANS sólo muestra emisión de fluorescencia en ambientes hidrofóbicos, por ejemplo, cuando está particionado en una micela. La Figura 5.8 muestra la intensidad de fluorescencia de una solución de ANS 0,70 mM luego de la adición de cantidades crecientes de PFN. El cambio abrupto en la pendiente observado en el gráfico de intensidad de fluorescencia vs concentración de PFN se debe a la formación de las micelas y en consecuencia el acceso de ANS a un ambiente hidrofóbico. El valor correspondiente a la intercepción

de ambas regresiones lineales es el valor de CMC. En la tabla 5.2 (segunda columna) se muestran los resultados para los 3 surfactantes estudiados. Los resultados obtenidos por esta metodología concuerdan con los de presión superficial y en consecuencia con los valores obtenidos por voltametría cíclica. Esta evidencia valida el uso de voltametría cíclica en interfaces líquido/líquido como alternativa para determinar valores de CMC de surfactantes cargados.



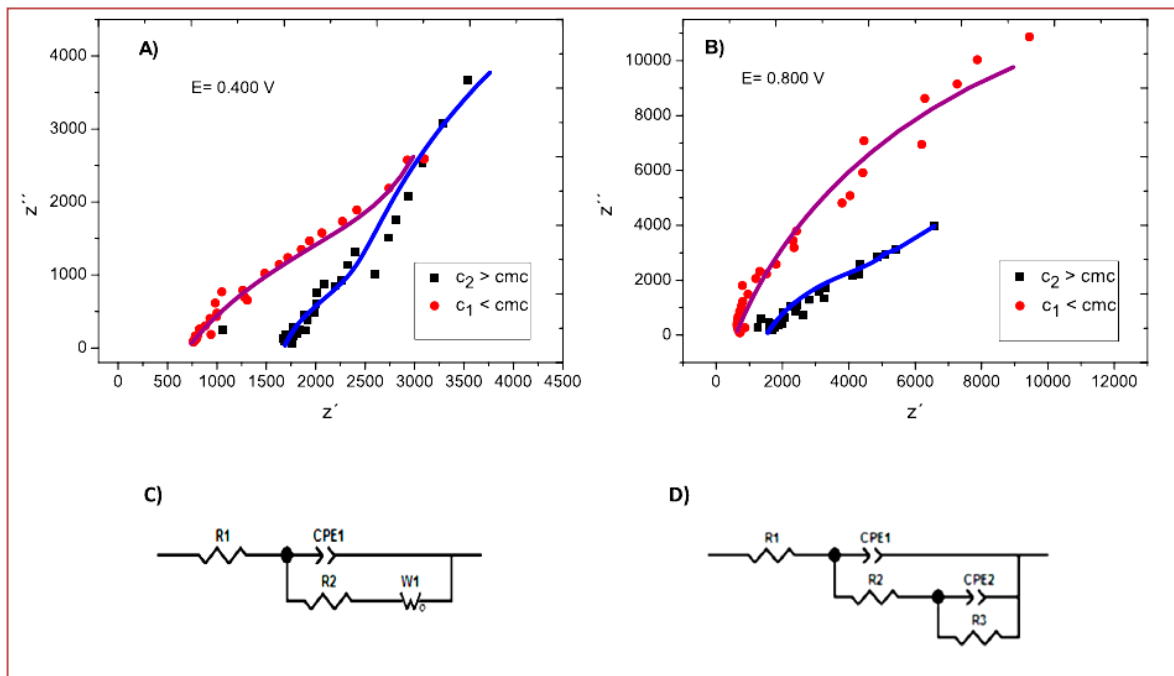
**Figura 5.8** Variación de la intensidad de fluorescencia (F) vs la concentración de PFN-. Solución: sonda Fluorescente 0,70 mM + PFN<sup>-</sup> a diferentes concentraciones desde 1,00 mM hasta 3,00 mM en LiCl 10.00 mM

#### 5.4.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) y medidas de capacitancia

Se realizaron experimentos de EIE con el objetivo de evaluar propiedades de superficie en presencia de altas concentraciones de surfactante en la fase acuosa. En estas condiciones se espera dilucidar si la adsorción de surfactante forma una monocapa compacta, y encontrar una diferenciación entre películas homogéneas y heterogéneas con diferentes dominios. Se registraron los espectros de impedancia en la interfaz líquido / líquido variando la frecuencia dentro de un intervalo comprendido entre 0,1 Hz y 2 kHz, a dos valores de potencial: Edc: 0,400 V (potencial al cual tiene lugar la transferencia de monómero o de la micela) y Edc: 0,800 V (donde no hay

transferencia de surfactante), y dos concentraciones de PFN en fase acuosa:  $c_1$ : 0,25 mM y  $c_2$ : 3,00 mM ( $c_1 < \text{CMC} < c_2$ ). Las Figuras 5.9 A y B, muestran los gráficos de Nyquist obtenidos en estas condiciones, junto con los resultados del ajuste (línea sólida) obtenidos utilizando los respectivos circuitos equivalentes mostrados en la Figura 5.9 C y D. El mejor ajuste de los puntos experimentales se logró con circuitos que dependen de la concentración de surfactante: para valores de concentración baja de PFN ( $c_1$ ), el ajuste fue mejor con un circuito de tipo Randles (Figura 5.9 C), donde  $R_1$  es la resistencia de la solución,  $\text{CPE}_1$  es un elemento de fase constante el cual tiene en cuenta la capacitancia de la doble capa ( $C_{dc}$ ),  $R_2$  es la resistencia a la transferencia de carga y  $W_1$ , es el elemento de Warburg que representa el proceso de difusión de PFN. Cabe aclarar que no fue necesario agregar este elemento para  $E_{dc}$ : 0,800 V, potencial en el cual no ocurre la transferencia de carga. Por otro lado, para concentraciones de PFN mayores a la CMC ( $c_2$ ), los espectros de impedancia no se pudieron ajustar con el circuito de Randles. En su lugar, los resultados ajustaron mejor con el circuito equivalente mostrado en la Figura 5.9 D, el cual se puede interpretar en función de la presencia de una película no homogénea, donde están presentes diferentes dominios, con zonas cubiertas (formadas por moléculas de surfactante adsorbidas) y zonas descubiertas (sin surfactante adsorbido). En este caso, los diferentes elementos del circuito equivalente representan los siguientes parámetros eléctricos presentes en la interfaz:  $R_3$ ,  $\text{CPE}_2$  y  $R_2$  son la resistencia a la transferencia de carga, la capacidad de la doble capa y la resistencia de la solución en las zonas descubiertas, respectivamente; mientras que  $\text{CPE}_1$  representa la capacidad de la monocapa en las zonas cubiertas, correspondientes a los dominios con PFN adsorbidas. Estos resultados, demuestran la presencia de diferentes dominios, lo cual es consistente con la respuesta típica de corriente estacionaria observada durante el

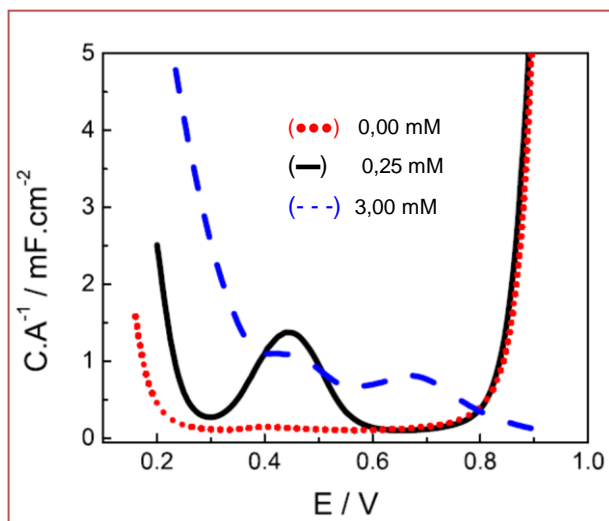
barrido negativo en los voltagramas obtenidos para la transferencia de PFN a bajas velocidades de barrido, comportamiento típico de transferencia iónica en microporos.



**Figura 5.9** Gráficos de Nyquist,  $Z''$  vs  $Z'$ , obtenidos a (A)  $E = 0,400$  V and (B)  $E = 0,800$  V. Los ajustes de los puntos experimentales se muestran en una línea sólida. Fase acuosa: LiCl 10,00 mM + PFN (●) 0,25 mM (■) 3,00 mM. Fase orgánica: TPnATClPhB 10,00 mM. C) y D): Circuitos empleados para los ajustes de EIE a bajas y altas concentraciones de PFN<sup>-</sup> respectivamente.

La Figura 5.10 muestra la variación de la capacitancia,  $C$ , con el potencial, obtenida por voltametría a.c en la interfaz líquido/ líquido, en ausencia y presencia de PFN en la fase acuosa en concentraciones iguales a  $c_1$  y  $c_2$ . Como puede observarse, las curvas que corresponden a la capacitancia de la doble capa de la interfaz, en ausencia o presencia de bajas concentraciones de PFN ( $c_1$ ) son casi coincidentes, excepto por el máximo que se observa a  $E=0,450$  V debido a la pseudo capacitancia producida por la transferencia de PFN. Para la condición  $c_2$ , es decir a concentraciones mayores que la CMC, se evidencia un cambio importante en las curvas  $C$  vs  $E$  mostrando un corrimiento general de la curva hacia potenciales más positivos, lo cual indica la absorción de moléculas con carga negativa, mientras que

los dos máximos observados se deberían a la presencia de dos regiones dentro de la interfaz, tal como se menciono anteriormente.



**Figura 5.10** Gráficos de Capacitancia vs Potencial. Composición de la fase acuosa: LiCl 10,00 mM (●●●), LiCl 10,00 mM + PFN 0,25 mM (—) y LiCl 10,00 mM + PFN 3,00 mM PFN (- - -). Composición de la fase orgánica: TPnATCIPhB 10,00 mM. La frecuencia utilizada es la correspondiente al valor máximo de ángulo de fase en el grafico Bode.  $\nu = 10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

#### 5.4.6 Determinación del número de agregación en las micelas

El número de agregación micelar puede determinarse registrando cambios en la fluorescencia de una sonda en presencia (F) y en ausencia ( $F_0$ ) de diferentes concentraciones de un atenuador (“quencher”, Q), de acuerdo al método reportado por N.J. Turri y col. <sup>36</sup>. En este caso se registro la atenuación de fluorescencia de la sonda pireno, (P) por el atenuador hidrofóbico, cloruro de cetilpiridinio (Q). Tanto P como Q tienen afinidad por ambientes hidrofóbicos y, en consecuencia están distribuidos preferentemente dentro del corazón de las micelas. Para una solución que contiene surfactantes (PFO, PFN o PFD) en concentraciones mayores a la CMC ( $[S_0] > \text{CMC}$ ), tanto los monómeros como las micelas (formadas por N moléculas de surfactante) están presentes, y la concentración de micelas, [M], puede representarse como:

$$[M] = ([S_o] - CMC) / N \quad \text{Ec. 5.1}$$

Si el atenuador está presente en la misma solución, en una concentración  $[Q]$ , y se adiciona la sonda al sistema en una relación mayor al atenuador, ésta se particionará tanto en las micelas que contengan a  $Q$  como en micelas “vacías”, es decir en aquellas que no tienen presente a  $Q$ . Mediante una distribución de Poisson se puede describir estadísticamente la partición de  $P$  y  $Q$  en las micelas. Si la sonda sólo fluoresce cuando ocupa una micela vacía, y su fluorescencia está totalmente atenuada cuando ocupa una micela que contiene  $Q$ , la relación entre intensidades de fluorescencia ( $F/F_o$ ) en presencia y ausencia de  $Q$  se define como:

$$F/F_o = \exp(-[Q]/[M]) \quad \text{Ec. 5.2}$$

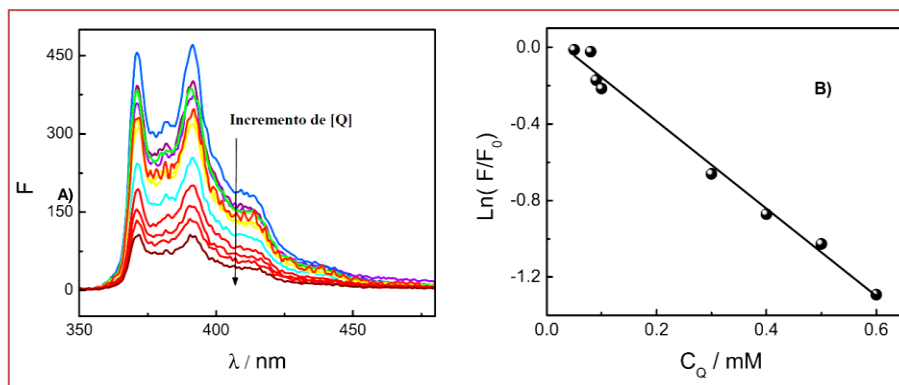
Por lo tanto, se espera un decaimiento de  $F/F_o$  si se aumenta la concentración de atenuador  $Q$ . Si se combinan las ecuaciones 5.1 y 5.2, se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln(F/F_o) = -([Q] \cdot N) / ([S_o] - CMC) \quad \text{Ec. 5.3}$$

De esta manera, el logaritmo de la relación entre el área integrada para cada espectro de fluorescencia de pireno en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de  $Q$  para cada surfactante (Figura 5.11 A), se graficó en función de la concentración de  $Q$  (Figura 5.11 B). A partir de la pendiente de la Figura 5.11 B, se determinó el valor de  $N$ . Los resultados obtenidos fueron 12, 9 y 5 moléculas por micela para PFO, PFN y PFD, respectivamente. Estos números dan cuenta del incremento en  $I$  cuando se forma la micela respecto a la  $I$  del monómero (voltagramas a alta concentración comparado con baja concentración de surfactante). Del análisis de estos resultados, se podría pensar que los valores son muy pequeños para tratarse

del número total de moléculas de surfactante que componen a una micela. Sin embargo, existen antecedentes con números de agregación similares para este tipo de surfactantes. Turro y col. determinaron que  $N$  para el perfluorooctanoato de sodio es de 7 moléculas por micela <sup>37</sup>. En dicho trabajo, los autores mencionan la posible formación de “mini” micelas de este surfactante, en contraste a las micelas formadas por los surfactantes hidrocarbonados, que suelen tener un  $N$  más alto.

Una vez calculados los valores de  $N$ , se pudo determinar el valor del coeficiente de difusión de las micelas en agua para los 3 surfactantes estudiados, a partir de la variación de la corriente de pico con la concentración de surfactante (Figura. 5.6) dentro del intervalo de concentraciones:  $2,10 \text{ mM} < c < 3,00 \text{ mM}$ . Los resultados se muestran en la tabla 5.3, estos resultados muestran órdenes de magnitud similares a los reportados por T. Asakawa y col. <sup>7</sup> para micelas de PFN.



**Figura 5.11: A)** Espectro de Pireno a diferentes concentraciones de Q (bromuro de cetilpiridinio). Solución: Pireno 2,0 mM + Q a diferentes concentraciones desde 50,0 mM a 600,0 mM + PFN<sup>-</sup> 4,00 mM + LiCl 10,00 mM. **B)** Grafico de Ln (F/F<sub>0</sub>) para Pireno en función de la concentración de Q.

<b>Coefficiente de difusión</b>	
<b>(D)/ 10<sup>-6</sup>cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup></b>	
<b>PFO</b>	2,4 .10 <sup>-6</sup>
<b>PFN</b>	4,46 .10 <sup>-6</sup>
<b>PFD</b>	7,76.10 <sup>-6</sup>

**Tabla 5.1.** Coeficientes de difusión de monómeros de PFO<sup>-</sup>, PFN<sup>-</sup> y PFD<sup>-</sup> determinados por voltametría cíclica.

## 5.5. Conclusiones

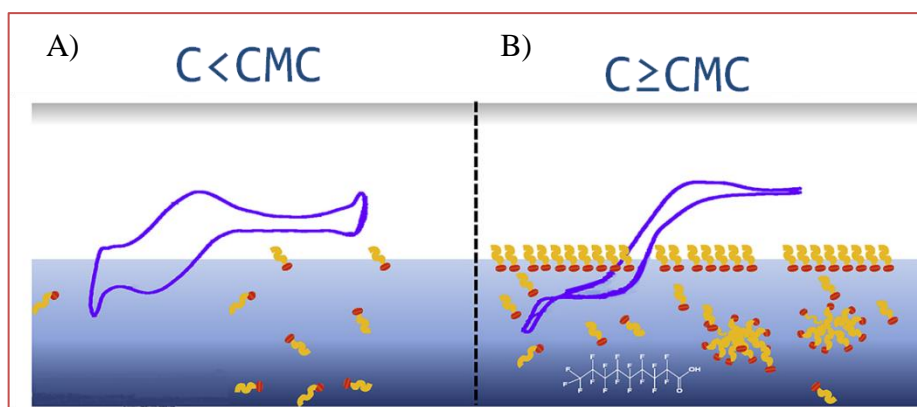
Teniendo en cuenta los resultados de esta sección, se puede proponer a la voltametría cíclica en interfaces líquidas como una metodología útil para la determinación de la CMC de surfactantes cargados cuya transferencia a través de la interfaz líquido/líquido dé lugar a una corriente eléctrica detectable. Los valores de CMC se calcularon a partir del cambio abrupto observado en la corriente voltamétrica, coincidente con un cambio en la forma del voltagrama al aumentar la concentración de surfactante. Los resultados obtenidos concuerdan con los valores determinados por métodos convencionales para medir CMC. De la misma manera, el coeficiente de difusión de las micelas se pudo determinar a partir de los valores de corriente, previa determinación del número de agregación por métodos espectrofluorométricos. Los experimentos de espectroscopia de impedancia muestran que a una alta concentración de surfactante se forma una monocapa heterogénea, con dominios desnudos y cubiertos, sobre la interfaz líquido/líquido.

Además de la posibilidad de determinar parámetros importantes de las micelas por esta metodología, se contribuyó al conocimiento del comportamiento de surfactantes y micelas en la interfaz entre dos solventes inmiscibles, lo cual es particularmente importante considerando que las aplicaciones principales de las



especies micelares se basan en el transporte de diferentes sustancias a través de diferentes medios, cambiando de un entorno polar a otro no polar, que puede modificar su naturaleza. La posibilidad de controlar la entrada y salida de estas especies desde el agua al solvente orgánico, y viceversa, aplicando una diferencia de potencial, es una estrategia interesante para predecir el comportamiento de las micelas en tales interfaces.

En base a los resultados obtenidos en esta sección, en la Figura 5.12 se ilustra el comportamiento propuesto para surfactantes perfluorados en la interfaz agua/1,2 DCE: a concentraciones menores a la CMC, el surfactante en su forma monomérica, se transfiere a través de la interfaz líquido/ líquido mediante un mecanismo controlado por difusión, mientras a concentraciones de surfactantes mayores a la CMC, dichas moléculas se encuentran adsorbidas en la interfaz, formando dominios cubiertos y descubiertos, y las especies micelares se transfieren a través de los dominios descubiertos (poros).



**Fig 5.12** Comportamiento propuesto para surfactantes perfluorados. A) Si la concentración es menor a la CMC, se observan voltagramas convencionales controlados por difusión. B) Si la concentración es mayor o igual a la CMC se observa una respuesta de corriente estacionaria debido a la transferencia de las micelas a través de los poros.

## 5.6. Bibliografía

- [1] A. Patist, S.G. Oh, R. Leung, D.O. Shah, *Colloid Surf. A* 176 (2001) 3-16.
- [2] W. C. Preston, *J. Phys. Colloid Chem.* 52 (1948) 84-96.
- [3] P. Mukerjee, K.J. Mysels, *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*, NSRDS-NBS 36, US Department of Commerce, Washington, DC, 1971.
- [4] M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, second ed., Wiley, New York, 1989.
- [5] N.M. Van Os, J.R. Haak, L.A. Rupert, *Physico-chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [6] P.G. Molina, J.J. Silber, N.M. Correa, L. Sereno, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 4269-4276.
- [7] T. Asakawa, H. Sunagawa, S. Miyagishi, *Langmuir* 14 (1998) 7091-7094.
- [8] A.B. Mandal, B.U. Nair, D. Ramaswamy, *Langmuir* 4 (1998) 736-739.
- [9] J.S. Florez Tabares, N.M. Correa, J.J. Silber, L.E. Sereno, P.G. Molina, *Soft Matter* 11 (2015) 2952-2962.
- [10] C.I. Camara, M.V. Colqui Quiroga, N. Wilke, A. Jimenez-Kairuz, L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 94 (2013) 124-133.
- [11] H. Janchenova, A. Lhotský, K. Stulik, V.J. Marecek, *J. Electroanal. Chem.* 601 (2007) 101-106.
- [12] L.M.A. Monzon, L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 6873-6879.
- [13] M.V. Colqui Quiroga, L.M.A. Monzon, L.M. Yudi, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 7022-7028.
- [14] M.A. Mendez, Z. Nazemi, I. Uyanik, Y. Lu, H.H. Girault, *Langmuir* 27 (2011) 13918-13924.
- [15] V. Marecek, A. Lhotsky, H. Janchenova, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 4573-4578.
- [16] A.K. Kontturi, K. Kontturi, L. Murtomaki, B. Quinn, V.J. Cunnane, *J. Electroanal. Chem.* 424 (1997) 69-74.
- [17] M. Nakagawa, N. Sezaki, T. Kakiuchi, *J. Electroanal. Chem.* 501 (2001) 260-263.
- [18] V. Marecek, H. Janchenov\_a, *J. Electroanal. Chem.* 558 (2003) 119-123.
- [19] H. Janchenov\_a, K. Stulík, V. Marecek, *J. Electroanal. Chem.* 591 (2006) 41-45.

- [20] L. Poltorak, K. Morakchi, G. Herzog, A. Walcarius, *Electrochim. Acta* 179 (2015) 9-15.
- [21] L. Poltorak, G. Herzog, A. Walcarius, *Langmuir* 30 (2014) 11453-11463.
- [22] L. Poltorak, M. Dossot, G. Herzog, A. Walcarius, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 26955-26962.
- [23] M.Y. Vagin, E.V. Malyh, N.I. Larionova, A.A. Karyakin, *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 329-333.
- [24] P. Mukerjee, T. Handa, *J. Phys. Chem.* 85 (1981) 2298-2303.
- [25] H. Kunieda, K. Shinoda, *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 2468e2470.
- [26] J.L. Lopez-Fontan, F. Sarmiento, P.C. Schulz, *Colloid Polym. Sci.* 283 (2005) 862-871.
- [27] M.F. Torres, R.H. de Rossi, M.A. Fernandez, *J Surfact Deterg* 16 (2013) 903-912.
- [28] R. C. Buck, J. Franklin, U. Berger, J. M. Conder, I. T. Cousins, P. de Voogt, A. A. Jensen, K. Kannan, S. A. , Mabury, S. P. van Leeuwen, *Integr Environ Assess Manag* 7 (2011). 513-541.
- [29] H. Reller, E. Sabatini, I. Rubinstein *Chemico-Biological Interactions* 281 (2018) 1–10
- [30] J. Lipkowski, in: B.E. Conway, et al (Eds.), *Modern Aspects of Electrochemistry* vol. 23, Plenum Press, New York, 1992, p. 8.
- [30] H. Reller, E. Sabatini, I. Rubinstein, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 6663-6670.
- [32] H. Reller, E. Kirowa-Eisner, E. Gileadi, *J. Electroanal. Chem.* 138 (1982) 65-72.
- [33] C. Amatore, J.M. Saveant, D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.* 147 (1983) 39-45.
- [34] G.L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces* Chapter 4, Section III (Pages 151e154), John Willey and Sons, Inc., New York (, 1966.
- [35] E.B. Abuin, E.A. Lissi, A. Aspee, F.D. Gonzalez, J.M. Varas, *J. Colloid Interface Sci.* 186 (1997) 332-338.
- [36] N.J. Turro, A. Yekta, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5951-5952.
- [37] N.J. Turro, P.C.C. Lee, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3367-3371.

---

# Capítulo 6

Efecto de surfactantes  
perfluorados sobre modelos  
de membranas

---

## 6. Efecto de surfactantes perfluorados sobre modelos de membranas

### 6.1. Introducción

Tal como se mencionó en capítulos previos, los ácidos perfluorados (PFA), son moléculas tensioactivas, donde todos los átomos de hidrógeno de las cadenas hidrocarbonadas están reemplazados por átomos de flúor<sup>1</sup>, esto les confiere propiedades especiales, que conducen a una amplia gama de aplicaciones industriales <sup>1-3</sup>. Este interés industrial radica principalmente en la fuerza del enlace C-F, en la estructura de estos compuestos, lo cual les da una gran estabilidad. Por otra parte, esta ventaja desde el punto de vista industrial se contrasta con los grandes problemas ambientales que generan esos compuestos: debido a su alta estabilidad, producen un alto impacto en el ambiente ya que no son biodegradables y, en consecuencia, prevalecen por mucho tiempo y tienden a bioacumularse en humanos, animales o bien en el agua o el suelo <sup>4</sup>. De esta manera, existe evidencia de la presencia de estos compuestos en el ambiente <sup>5</sup>, aves y mamíferos marinos <sup>6</sup>, sedimentos de los lagos <sup>7</sup>, cursos diversos de agua <sup>8-11</sup>, sangre y orina humana <sup>4,12-14</sup>. En la última década ha habido un importante número de publicaciones sobre la toxicidad de estos surfactantes sobre las células <sup>15-17</sup>, animales <sup>18-20</sup> y humanos <sup>21-24</sup>. Estos artículos demostraron que la presencia de PFAs pueden generar diversas enfermedades o desórdenes: bajo peso de nacimiento, hiperuricemia, enfermedad crónica de los riñones, enfermedad de tiroides, entre otras <sup>24</sup>. El grado de contaminación causado por estos surfactantes es tan dañino que varios países han comenzado a regular su producción y aplicación. La toxicidad de estos compuestos sobre el organismo humano puede involucrar diferentes niveles: neurotoxicidad, toxicidad en hígado y pulmones<sup>2</sup>. Resulta

importante mencionar que por su característica anfipática, estos efectos se pueden deber a que estos compuestos interaccionan con membranas biológicas. Numerosas publicaciones abordan el estudio del comportamiento de ácidos perfluorados en la interfaz aire/agua <sup>25-26</sup> y también hay algunos reportes del efecto de PFA sobre modelos de membranas; monocapas <sup>27-30</sup> o bicapas <sup>31-32</sup>. Lehmler y Bummer demostraron que los ácidos perfluorados se mezclan parcialmente con monocapas de fosfolípidos mientras que en bicapas en fase gelificada fueron inmiscibles <sup>33</sup>. Además, W. Xie y col. encontraron que el ácido perfluorooctanoico (PFO) se particiona de forma más eficiente en la fase líquida de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) y que se forman heteromicelas entre este fosfolípido y PFO <sup>34</sup>. Por otra parte, M. Paige propuso que las propiedades de miscibilidad entre lípidos y moléculas de perfluorados pueden utilizarse para modular las propiedades topográficas de las películas que forman <sup>30</sup>.

Debido a lo expuesto resulta interesante estudiar la interacción de los PFAs con membranas biológicas, ya sea desde modelos sumamente simplificados como monocapas, de los que existen algunos reportes, hasta estructuras más complejas como vesículas. En base a esto, el presente capítulo se centró en el estudio del ácido perfluorodecanoico (PFD) en modelos de membranas. Se evaluó cómo la carga eléctrica en la interfaz y la compactación de las monocapas modulan la interacción entre fosfolípidos y PFD utilizando isothermas de compresión de Langmuir, isothermas de penetración y microscopía de ángulo de Brewster (BAM). Además, se estudió el efecto de PFD sobre vesículas a través de ensayos de nefelometría y dispersión dinámica de luz (DDL) con el objeto de evaluar el efecto de este surfactante en las propiedades de estructuras más complejas.

## 6.2. Objetivos

### 6.2.1. General

El objetivo general de esta sección fue estudiar el efecto de los ácidos perfluorados sobre modelos de membrana simplificados, monocapas en la interface agua/ aire y vesículas.

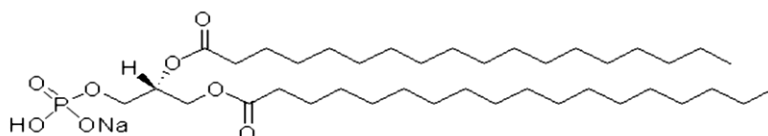
### 6.2.2. Específicos

- Evaluar el efecto de los ácidos perfluorados en la estabilidad de monocapas de los lípidos estudiados.
- Determinar si existe una miscibilidad mediante el estudio de las interacciones entre el surfactante perfluorado y los lípidos estudiados.
- Caracterizar propiedades de superficie de los lípidos y el surfactante perfluorado a través de experimentos de microscopia de ángulo de Brewster (BAM).
- Calcular una presión de exclusión del surfactante PFD en monocapas de los lípidos seleccionados.
- Evaluar el efecto lítico de PFD sobre vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DSPA y DLPA, registrando los cambios por DDL y nefelometría.

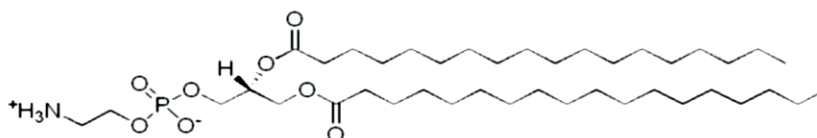
## 6.3. Parte experimental

La estructura química de los reactivos empleados se observa en la Figura 6.1

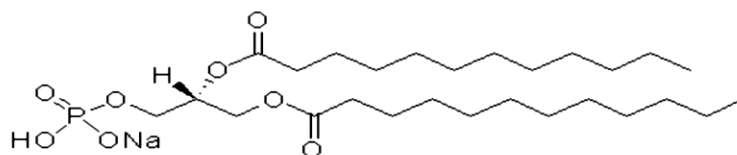
(a) **DSPA**



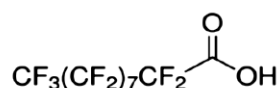
(b) **DSPE**



(c) **DLPA**



(d) **PFD**



**Fig 6.1** Estructuras de los fosfolípidos: **a)** 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfato (**DSPA**), **b)** 1,2-diestearoil-sn-3-fosfoetanolamina (**DSPE**), **c)** 1,2-dilauril-sn-glicerol-3-fosfato (**DLPA**) y **d)** del Ácido perfluorodecanoico (**PFD**)

### 6.3.1 Reactivos

Fosfolípidos: 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfato (**DSPA**), 1,2-diestearoil-sn-3-fosfoetanol amina (**DSPE**), y 1,2-dilauril-sn-glicerol-3-fosfato (**DLPA**) de Sigma-Aldrich (pureza 98%).

Ácido Perfluorado: Ácido perfluorodecanoico (**PFD**) Sigma-Aldrich (98% de pureza).



Reactivos químicos: LiCl (electrolito de la subfase), Merck (Germany). Cloroformo, Sintogran (Argentina). Metanol, Dorwil S.A (Argentina).

Las soluciones acuosas se prepararon con agua ultra pura desionizada (Milli-Q Gradient System, Millipore, Bedford, MA).

## 6.3.2 Métodos

### 6.3.2.1 Monocapas en la interfaz agua/aire

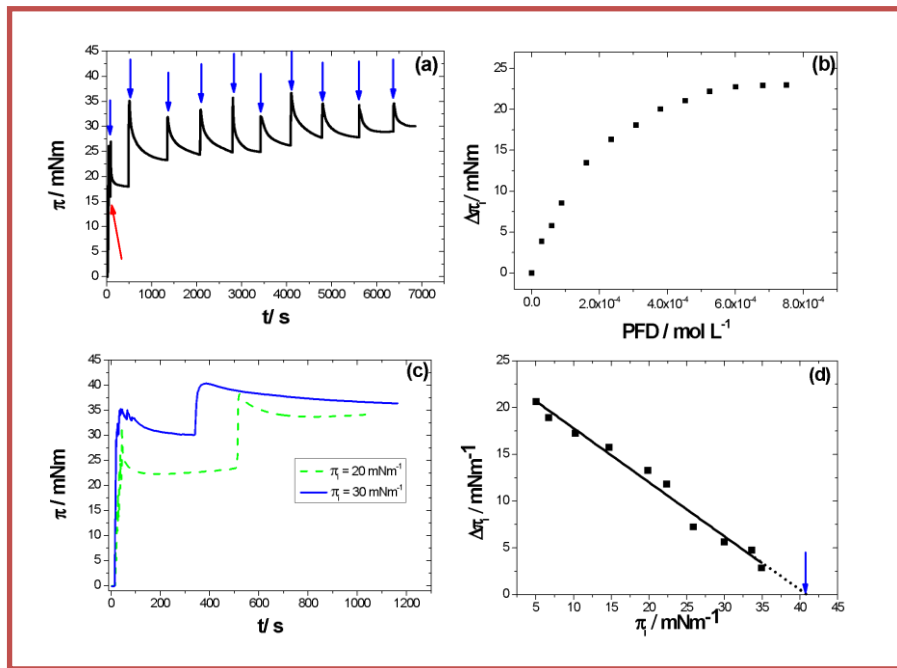
Las soluciones de lípidos se prepararon en cloroformo:metanol 2:1 v/v en una concentración igual a 1,0 mM. Se prepararon mezclas de PFD y fosfolípidos en distintas proporciones en tubos eppendorfs previa inyección de las mismas. Posteriormente se generaron las monocapas de las mezclas mediante la inyección de las soluciones lipídicas mencionadas sobre la superficie de una solución de LiCl 10,0 mM, empleando una microjeringa Hamilton. Luego de la inyección se esperó 10 minutos, a fin de evaporar el solvente y, transcurrido este tiempo la interfaz comenzó a comprimirse mediante las barreras móviles a una velocidad de 10 mm.min<sup>-1</sup> mientras se registraron los cambios en la presión lateral ( $\pi$ ). Las relaciones molares para las mezclas lípidos:PFD fueron: 100:0, 80:20, 60:40, 20:80 y 0:100.

Durante la compresión también se observaron propiedades de superficie a través de microscopía de ángulo de Brewster (BAM). Antes de las inyecciones se calibró el equipo con la interfaz limpia para determinar, la señal oscura (DS, valor de la reflectividad en la interfaz en ausencia de lípido) y la intensidad de la luz reflejada (RP) <sup>36, 37</sup>. Los niveles de gris promedio fueron determinados para 5 regiones diferentes correspondientes a cada fase, en al menos 2 imágenes para cada condición empleando el software ImageJ. En todos los experimentos se controló la temperatura igual a 21°C utilizando un

termocirculador. Este valor de temperatura es inferior al de la transición principal para todos los lípidos estudiados.

### 6.3.2.2 Inserción de PFD en monocapas preformadas de lípidos y determinación de la presión de exclusión

Estos experimentos se llevaron a cabo en una cuba de volumen= 5,00 mL y área de superficial igual a 15,8 cm<sup>2</sup>. El procedimiento seguido se observa en la Figura 6.2 (se muestran los resultados para DSPE, el mismo procedimiento se repitió para todos los lípidos estudiados). En primer lugar, se coloca la solución de LiCl en la cuba, posteriormente se inyecta sobre la superficie la cantidad necesaria de lípido para lograr una presión igual a 15 mN/m (flechas rojas, Figura 6.2a). De esta manera, se genera una monocapa lipídica, sobre la cual se determinará la concentración de saturación para PFD. Finalmente, se realizan sucesivas inyecciones de la solución de PFD directamente en la subfase, sin perturbar la superficie (flechas azules, Figura 6.2a) y se registra el valor de presión final, luego de esperar 12 minutos después de cada inyección. A partir de los resultados mostrados en la Figura 6.2a, se grafica entonces, el cambio en la presión luego de cada inyección de PFD, con respecto a la presión inicial ( $\Delta\pi_i / \text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ), en función de la concentración de PFD (Figura 6.2b).



**Figura 6.2** Secuencia típica para la determinación de la presión de exclusión de PFD desde la monocapa lipídica a la subfase: **a)** inyecciones sucesivas de PFD en la subfase en presencia de una monocapa preformada de DSPE a una presión inicial de 15 mN.m<sup>-1</sup>, **b)** cambio en la presión superficial con respecto a la presión inicial, para cada concentración de PFD, calculados a partir de fig.6.2a, **c)** Variación de la presión superficial antes y después de la inyección de PFD a una concentración igual al valor de saturación observado en (b) para dos presiones superficiales iniciales diferentes, **d)** Gráfico de los valores de  $\Delta\pi_i$  (obtenidos de la Figura 6.2c) vs  $\pi_i$ . Concentración de PDF inyectada 0,52 mM. A partir de la intersección con el eje x se obtiene el valor de presión de exclusión.

Como puede observarse, se obtiene un aumento inicial en  $\Delta\pi_i$  para alcanzar, a altas concentraciones, un valor de saturación constante de  $\Delta\pi_i$ , a partir del cual no se observan cambios posteriores en la presión superficial. Esta concentración se denomina concentración de saturación y fue calculada para cada lípido estudiado. Una vez determinada esta concentración de saturación, se prosiguió con la evaluación de la capacidad de penetración de PFD a diferentes valores iniciales de presión superficial. En la Figura 6.2c, se muestran, a modo de ejemplo, dos curvas de  $\pi$  vs  $t$  obtenidas a dos valores de presiones iniciales diferentes, utilizando la saturación de saturación de PFD determinada en la Figura 6.2d. A partir de este gráfico se obtienen los valores de  $\Delta\pi_i$  para cada presión inicial, con estos valores se construye un gráfico de  $\Delta\pi_i$  en función de  $\pi_i$  (Figura 6.2d). A partir de la intersección de la línea recta con el

eje x, se obtiene el valor máximo de presión en la cual PFD puede penetrar la monocapa del lípido en cuestión, a este valor se lo denomina presión de exclusión (flecha azul, Figura 6.2d).

### 6.3.2.3 Determinación de tamaño de vesículas por dispersión dinámica de la luz (DDL) y nefelometría

Se generaron vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DSPE, DSPA y DLPA mediante el agregado de una solución de cloroformo/metanol que contiene dichos lípidos sobre la pared de un tubo de vidrio. Posteriormente a través de una corriente de N<sub>2</sub> se evaporó el solvente y se generó una película sobre la pared. Las últimas trazas de solvente se eliminaron, incubando los tubos en un ambiente de alto vacío durante 2 horas. Posteriormente, los lípidos fueron resuspendidos en una solución acuosa de LiCl 10 mM, logrando una concentración lipídica final de 0,5 mg/mL. A esta suspensión se le aplicaron 5 ciclos de calor-agitación-frío, cada uno durante 1 minuto. El proceso de calor fue llevado a cabo en un baño de 60°C y luego en una incubación en hielo. Las vesículas formadas fueron luego separadas por su tamaño a través de una membrana de extrusión cuyo tamaño de poro es 100 µm. Bajo estas condiciones se lograron vesículas de DLPA y DSPA<sup>38</sup>. El tamaño de las LUVs así generadas se determinó por DDL, obteniéndose valores promedio de (84 ±16) nm y (71±13) nm para DLPA y DSPA, respectivamente.

Se evaluó la estabilidad de las LUVs de DSPA y DLPA frente a la adición de PFD (efecto detergente) a través de la ruptura de estas nanopartículas. Con este fin se agregaron volúmenes crecientes de una solución de PFD 16 µM en LiCl 10 mM a la solución que contiene las LUVs. El efecto de PFD se registró por seguimiento de la turbidez mediante nefelometría. La difracción de la luz depende del tamaño de

partícula, por lo tanto, si existe una ruptura de estas partículas la difracción disminuye<sup>39</sup>. Se registró la turbidez relativa después de cada adición de la solución de PFD y el porcentaje de turbidez (%RT) fue calculado como:

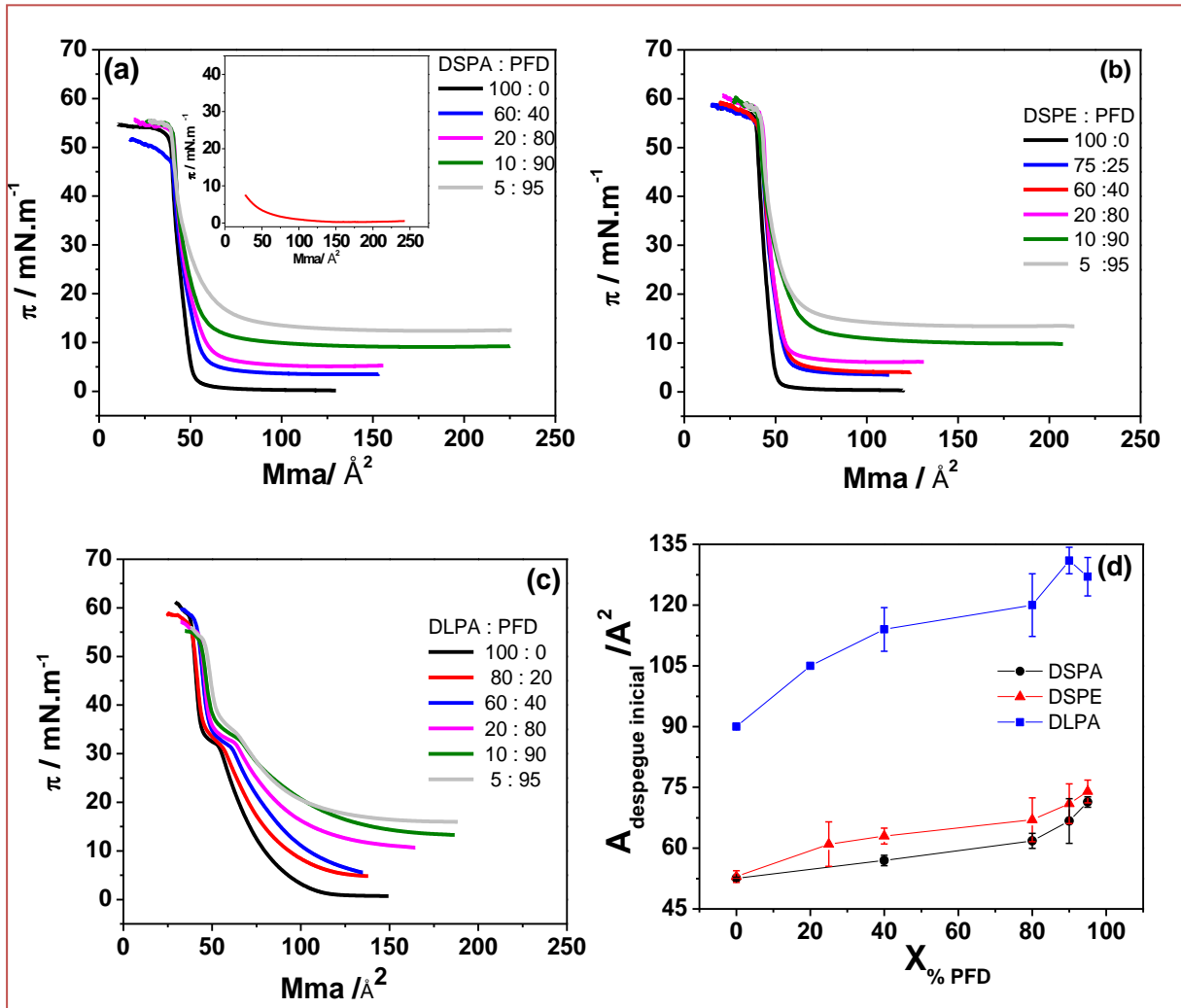
$$\%RT = RT_i / RT_0 \times 100 \quad \text{Ec. 6.1}$$

Donde  $T_0$  es la turbidez inicial mientras que  $T_i$  es la turbidez posterior a la adición.

## 6.4. Resultados

### 6.4.1. Isotermas de Langmuir y microscopia de ángulo de Brewster

La Figura 6.1 muestra la estructura química de los diferentes lípidos estudiados (DSPA, DSPE y DLPA) y la de PFD. En el caso de DSPA y DLPA los valores promedio de pKa aparentes son:  $pK_{a1} = 3,2$  y  $pK_{a2} = 8,3$ , mientras que los valores correspondientes a DSPE son:  $pK_{a1} = 2,2$  y  $pK_{a2} = 10,1$ <sup>40</sup>. PFD es un ácido fuerte con un valor de  $pK_a = -0.17$ <sup>41</sup>. Por lo tanto, en las condiciones del presente trabajo ( $pH=6$ ), DLPA, DSPA y PFD son aniones con carga -1, mientras que DSPE es un zwitterion. Con el fin de evaluar el efecto disruptivo de PFD en estos modelos de membranas, se registraron isotermas de compresión de Langmuir para diferentes lípidos (DLPA, DSPA y DSPE) y PFD (Figura 6.3).



**Figura 6.3** Isothermas de compresión, para las mezclas: **(a)** DSPA:PFD; inserto: PFD:100%, **(b)** DSPE:PFD, **(c)** DLPA:PFD, para las siguientes fracciones molares Lípido:PFD: **(negro)** 100:0, **(rojo)** 80:20, **(azul)** 60:40, **(magenta)** 20:80, **(verde)** 10:90 y **(gris)** 5:95. **(d)** Áreas de elevación inicial en función de la fracción molar PFD para: **(rojo)** DSPE, **(negro)** DSPA y **(azul)** DLPA. Composición de la subfase: LiCl 10 mM, pH = 6.00 y T = 21°C.

#### 6.4.2. Efecto de PFD en monocapas de DSPA

La Figura 6.3a muestra la presión superficial en función del área molecular promedio para monocapas de PFD pura (inserto) DSPA pura y mezclas DSPA:PFD de diferentes proporciones. Cabe aclarar que en el caso de monocapas que contienen

DSPA, tanto puro como formando mezclas con PFD, siempre se representa el área molecular media del lípido en el eje x. Por el contrario, para las monocapas de PFD puro, el eje x representa el área de la caba ya que la alta solubilidad de PFD en agua no permite estimar el número de moléculas que se mantienen adsorbidas en la superficie.

La conducta de la película de PFD bajo compresión fue altamente dependiente de la cantidad de PFD inyectada en la interfaz. A bajas concentraciones superficiales de PFD se observa una disminución suave de la presión superficial al comienzo de la isoterma de Langmuir. Este efecto se puede atribuir a la solubilización de las moléculas de PFD hacia la sub fase acuosa, efectos similares se han reportado para otros compuestos perfluorados<sup>35,42</sup>. Para esta película la máxima presión alcanzada fue  $15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Por lo tanto, la isoterma correspondiente a PFD puro puede interpretarse considerando que estas moléculas no forman una película estable debido a su alta solubilidad en agua. Esta hipótesis puede corroborarse a través de las imágenes de BAM de películas de PFD puro, las cuales no mostraron diferencias significativas con respecto a una interfaz limpia.

Las imágenes de ángulo de Brewster correspondiente a monocapas de DSPA puro corresponden a una película condensada y homogénea, tal como se encuentra en bibliografía<sup>43</sup>.

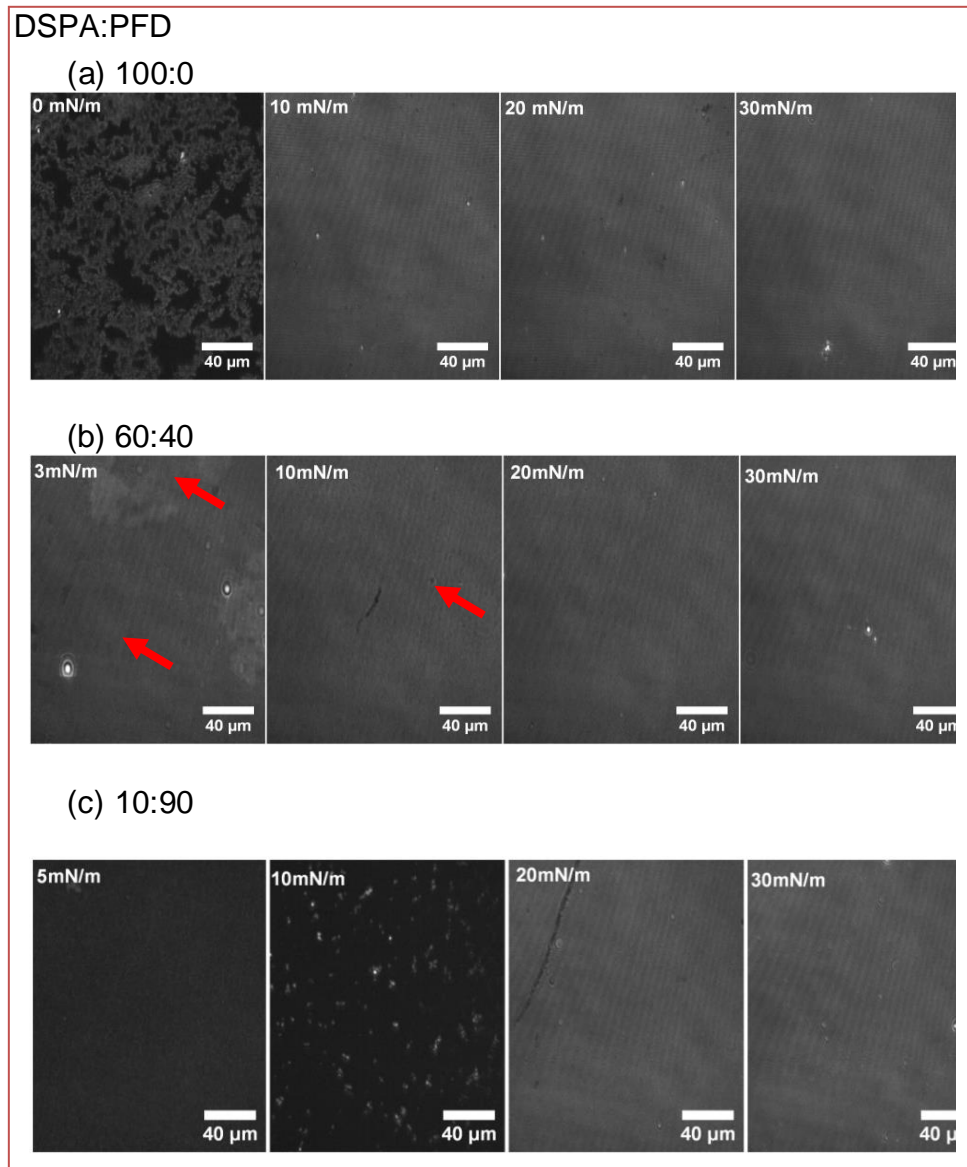
Luego de caracterizar el comportamiento de películas de PFD y DSPA puros por separado, se analizaron las mezclas DSPA:PFD, aumentando la fracción molar de PFD entre 0 y 95% (Figura 6.3a). Como se puede observar en las isotermas, el aumento de la concentración de PFD en las mezclas produce un incremento en las áreas de elevación inicial (Figura 6.3d). Este resultado aporta evidencias de presencia de PFD en la monocapa. En este punto es importante destacar, tal como se explicó

anteriormente, que todas las isothermas se refieren al area por molécula de fosfolípido, calculada a partir de la relacion entre el area total de la cuba y el numero total de moleculas de fosfolípido, independientemente de que la solucion inyectada tuviera lípido puro o mezclas lípido:PFD. De este modo, un aumento en el área por molécula de lípido en presencia de PFD se puede interpretar ya sea considerando que el lípido ocupa un area mayor dentro de la monocapa o bien que las moléculas de PFD se insertan dentro de la monocapa, ocupando un espacio y dando como resultado una mayor relación área/molécula de lípido. El aumento en los valores de area de elevacion inicial a presiones bajas podría deberse a repulsión electrostática entre los grupos polares cargados negativamente de DSPA y los grupos polares de las moléculas de PFD, lo cual conduce a un área más alta por molécula de lípido y a una monocapa más compresible. A medida que la compresión continúa hacia áreas moleculares más pequeñas y presiones mayores, las isothermas se aproximan a la correspondiente a DSPA puro para todos los valores de concentración de PFD. Este resultado se debe, probablemente, a la expulsión y posterior solubilización de las moléculas de PFD, a altas presiones. En lo que respecta al area y presión de colpaso, podemos decir que la presencia de PFD no induce cambios significativos en estos parámetros.

Las imágenes de BAM permiten cuantificar la reflectividad de la monocapa a través de los cambios en el nivel de gris (GL) cuando una película, de índice de refracción diferente con respecto al agua o a la película lipídica, está presente en la interfaz, pudiéndose además determinar el espesor óptico de la película <sup>43,44</sup>. La Figura 6.4, muestra las imágenes de BAM obtenidas para mezclas DSPA:PFD en las siguiente fracciones molares: 100:0, 60:40 y 10:90 (algunas de ellas se corresponden con las mostradas en la Figura 6.3a), y la Figura 6.7a muestra los correspondientes valores de GL para las diferentes zonas: dominios (●) y fase condensada (■). Como se



discutió previamente, las imágenes de BAM para DSPA puro (Figura 6.4a) muestran una película condensada y homogénea en todo el intervalo de presiones analizadas. Cuando se analiza el nivel de gris de las imágenes se observa un aumento gradual hasta un valor constante, alrededor de 28. Este aumento se debe a la organización de las cadenas hidrocarbonadas de forma perpendicular a la interfaz agua/ aire a medida que avanza la compresión (Figura 6.7a, cuadrados negros). Si se agrega PFD a las mezclas, en bajas proporciones (DPSA:PFD 60:40, Figura 6.4b), se encuentra una respuesta diferente con respecto a DSPA puro. La primera diferencia observada es la presencia de películas no homogéneas a presiones bajas. A  $\pi = 3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  se distinguen “islotos” grises claros y dominios oscuros, ambos contenidos dentro de una fase continua (Figura 6.4b). El GL determinado para los “islotos” es alrededor de 29, valor similar al que se encontró para DSPA a altas presiones. Por lo tanto, estas regiones probablemente sean zonas de lípido puro altamente condensado, las cuales se hacen más homogéneas a medida que la presión aumenta. Por otra parte, la presencia de dominios oscuros (círculos rojos, Figura 6.7a) con un nivel de gris cercano a 8 prevalece hasta  $\pi = 20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , por lo cual esta estructura puede atribuirse a dominios enriquecidos con PFD. Una conducta similar se observó para otras moléculas perfluoradas, lo cual se atribuyó al índice de reflexión bajo de los anfifilos fluorados <sup>45</sup>.



**Figura 6.4** Imágenes de BAM para monocapas de DSPA:PFD en las relaciones: (a) 100:0, (b) 60:40 y (c) 10:90 a diferentes presiones superficiales ( $\pi = 0-30 \text{ mNm}^{-1}$ ). Condiciones experimentales de la sub fase: LiCl 10 mM, pH = 6.00 y T = 21°C.

Los dominios oscuros desaparecen cuando la presión superficial aumenta por encima de  $\pi = 25 \text{ mN.m}^{-1}$ ; al mismo tiempo que la isoterma de Langmuir de la mezcla se aproxima a la isoterma correspondiente de DSPA puro, evidencian la expulsión de PFD desde la interfaz y su posterior solubilización en agua. Esta situación está inducida, probablemente, por la repulsión electrostática entre PFD y DSPA, la cual

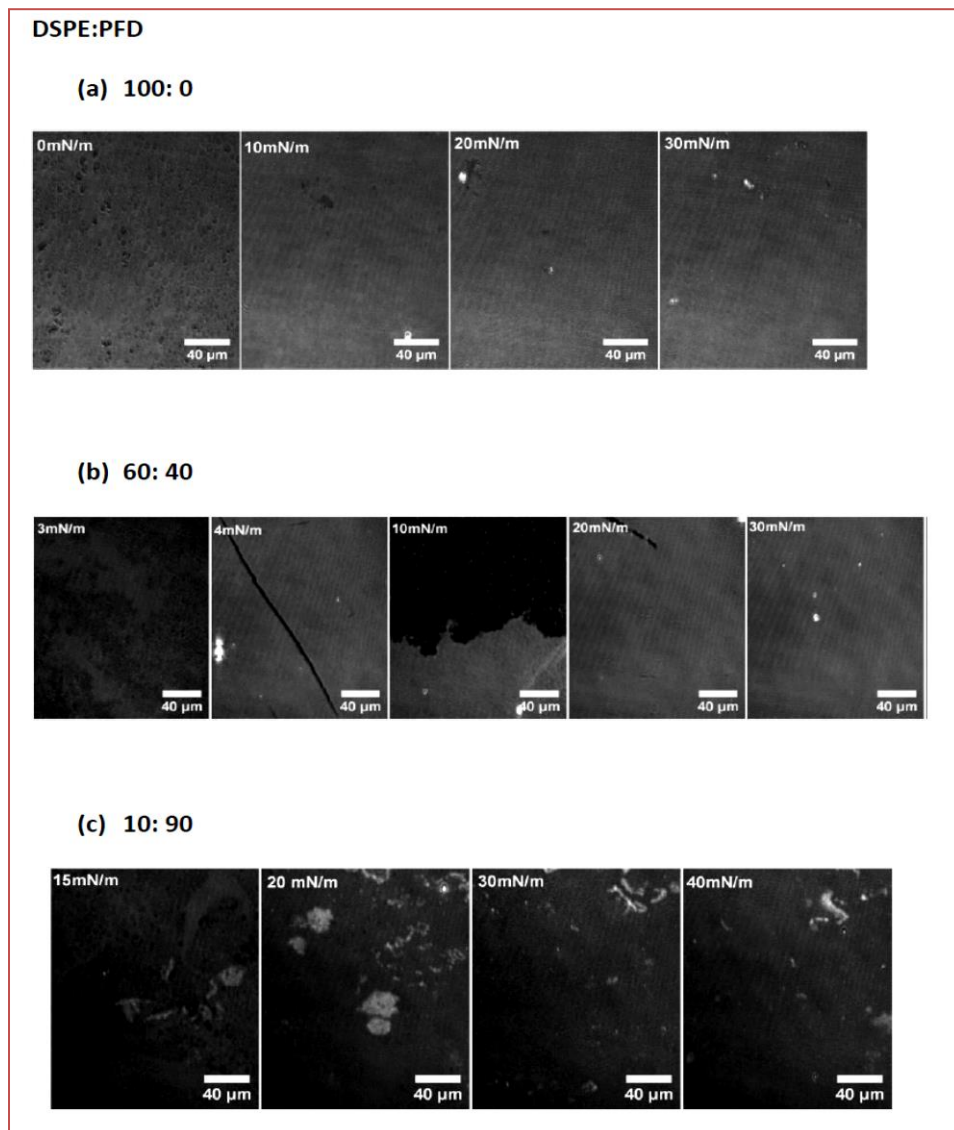
aumenta significativamente a medida que progresa la compresión, y también por la diferencia en el largo de la cadena hidrocarbonada de ambas especies, lo cual no contribuye a interacciones de van der Waals favorables.

Además podemos mencionar que el PFD es altamente soluble en la subfase, lo cual contribuye a su expulsión de la interface. Otra evidencia que apoya la hipótesis de expulsión de PFD es el hecho de que el área de colapso es constante para todos los valores de fracción molar de PFD (Figura 6.3a), y además las imágenes de BAM obtenidas por encima  $\pi = 25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , son homogéneas, condensadas y con el mismo nivel de gris que la monocapa de DSPA puro. Por lo tanto los resultados presentados hasta aquí indican que la mezcla DSPA:PFD 60:40 se comporta como un sistema no miscible a bajas presiones.

La Figura 6.4c, muestra las imágenes de BAM para la mezcla DSPA:PFD 10:90. En este caso a bajas presiones superficiales, el lípido forma dominios circulares brillantes de DSPA/PFD (bajo estas condiciones la cantidad de PFD es suficientemente alta para evitar la formación de “islotos” de DSPA puro), y el nivel de gris de los dominios es menor que el correspondiente a DSPA puro (cuadrados azules Figura 6.7a), indicando una mezcla parcial con PFD. A medida que la presión aumenta la película se hace más homogénea pero con un nivel de gris menor que el de DSPA puro y presenta dominios oscuros elongados de PFD, similar a los encontrados para DSPA:PFD 60:40. La fase continua tiene un nivel de gris menor que el obtenido para DSPA, pero estos valores se van asemejando gradualmente, a medida que la presión se aproxima a  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ; por encima de ese valor la película es homogénea y condensada (Figura 6.4c). Estos resultados pueden interpretarse considerando un mezclado parcial entre DSPA y PFD a presiones menores que  $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ; por encima de este valor PFD es expulsado de la interfaz.

### 6.4.3. Efecto de PFD en monocapas de DSPE

La Figura 6.3b muestra las isothermas de Langmuir para DSPE puro y para mezclas DSPE: PFD. La isoterma de DSPE está caracterizada por una presión y área de colapso de  $55 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  y  $38 \text{ \AA}^2$ , respectivamente, similar a los valores informados previamente <sup>46</sup>. Las imágenes de BAM muestran una película homogénea en todo el intervalo de presiones estudiado (Figura 6.5a), con un valor de GL promedio igual a 32 (Figura 6.7b, cuadrados negros).



**Figura 6.5** imágenes de BAM para monocapas de DSPE:PFD en las proporciones: **(a)** 100:0, **(b)** 60:40 y **(c)** 10:90 a diferentes presiones superficiales ( $\pi = 0\text{-}30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Condiciones experimentales de la subfase 10 mM, pH = 6.00 y T = 21°C.

La presencia de PFD en monocapas híbridas de DSPE:PFD produce (de manera similar a lo observado en las mezclas DSPA:PFD) un corrimiento en las elevación inicial hacia valores más altos (Figura 6.3d), el cual se hace más pronunciado a medida que la concentración de PFD aumenta. Para valores de presión mayores, las isothermas de Langmuir tienden a parecerse a las obtenidas para DSPE puro, indicando nuevamente una posible la expulsión de PFD desde la monocapa a la subfase. Si se observan las imágenes de BAM (Figura 6.5b), la presencia de PFD en la mezcla DSPE:PFD 60:40 induce la segregación de una fase enriquecida en PFD con un valor de GL inferior al que corresponde a DSPE puro, a  $\pi > 20 \text{ mN.m}^{-1}$ ; también en este caso la apariencia es la de dominios elongados<sup>45</sup> con un valor de GL entre 10 y 20 (Figura 6.8b). A medida que la presión superficial aumenta, la segunda fase desaparece y el valor de GL promedio se aproxima al de DSPE puro, debido probablemente a la expulsión de PFD de la interfaz.

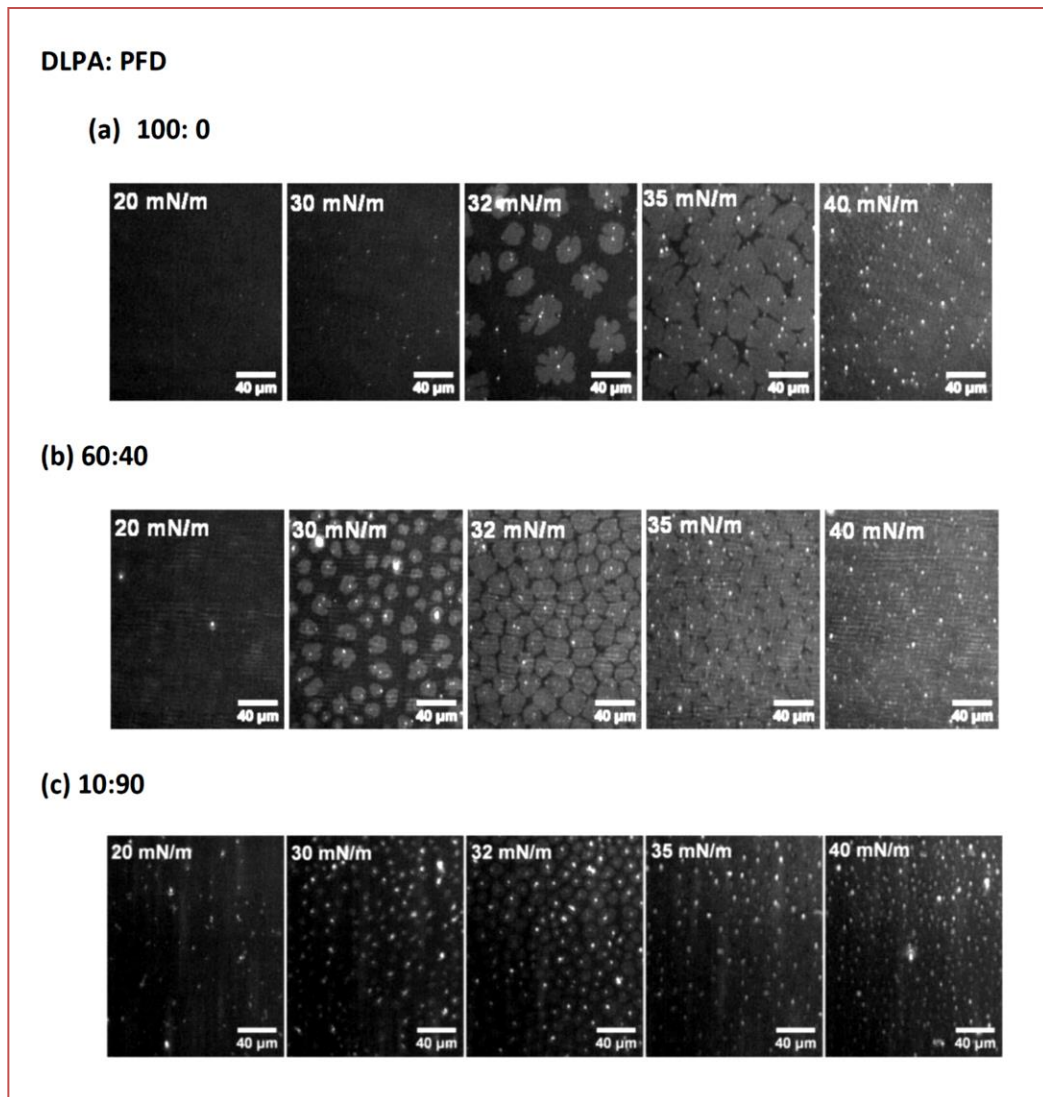
En el caso de la mezcla DSPE:PFD 10:90, se observa una conducta diferente (Figura 6.5c). Bajo esta condición los dominios elongados oscuros no se forman a ninguna presión, por el contrario, se evidencia la formación de una fase continua con un valor de GL menor que el correspondiente a DSPE, a todas las presiones (Figura 6.7b). En la Figura 6.6c se puede observar la presencia de zonas con un valor de GL igual a 64, mayor que el correspondiente a DSPE, el cual se mantiene a todas las presiones.

#### 6.4.4. Efecto de PFD en monocapas de DLPA

La Figura 6.3c muestra las isothermas de Langmuir para DLPA puro y mezclas DLPA:PFD. La isoterma de DLPA muestra una transición de fase de líquido expandido a líquido condensado alrededor de  $\pi = 31 \text{ mN.m}^{-1}$ . Bajo las condiciones experimentales

presentes, el valor del factor  $Cs^{-1}$  en las fases líquida expandida ( $\pi = 20 \text{ mN.m}^{-1}$ ) y líquido-condensado ( $\pi = 40 \text{ mN.m}^{-1}$ ) es de  $56 \text{ mN.m}^{-1}$  y  $165 \text{ mN.m}^{-1}$ , respectivamente. Los valores de área y presión de colapso son  $38 \text{ \AA}^2$  y  $57 \text{ mN.m}^{-1}$ , respectivamente. La Figura 6.6a muestra imágenes BAM para DLPA en ausencia de PFD. Puede observarse que las imágenes para la monocapa en estado líquido-expandido, a  $\pi < 30 \text{ mN.m}^{-1}$ , indican la presencia de una fase homogénea, con un valor GL máximo de 4 (Figura 6.7c, cuadrados negros). A partir de  $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ , se observa la aparición de núcleos de fase líquida condensada (“semillas”) y el crecimiento de dominios alrededor de estas “semillas”. Estos dominios conducen a una fase homogénea condensada a altos valores de presión, con un GL promedio de 9 (Figura 6.7c, círculos negros).

El incremento en la fracción molar de PFD induce un aumento en el área de elevación inicial (Figura 6.3d). Las Figuras 6.6b y c muestran las imágenes BAM obtenidas en presencia de PFD, en las mismas condiciones que las isothermas de la Figura 6.3c, mientras que la Figura 6.7c muestra los valores de GL, correspondientes a estas imágenes, en función de  $\pi$ . Como puede observarse en la Figura 6.6b y c, las películas híbridas de DLPA:PFD forman una monocapa homogénea a  $\pi < 20 \text{ mN.m}^{-1}$  (DLPA:PFD 60:40) o  $\pi < 10 \text{ mN.m}^{-1}$  (DLPA:PFD 10:90, imagen no mostrada).



**Figura 6.6** imágenes de BAM para monocapas de DLPA:PFD en las proporciones: **(a)** 100:0, **(b)** 60:40 y **(c)** 10:90 a diferentes presiones superficiales ( $\pi = 0-30 \text{ mNm}^{-1}$ ). Condiciones experimentales de la subfase: LiCl 10 mM, pH = 6.00 y T = 21°C.

Para valores de presión mayores, se observa la aparición de centros de nucleación para la fase condensada. Los valores de presión superficial a partir de los cuales estos centros de nucleación comienzan a aparecer disminuyen gradualmente a medida que la fracción molar de PFD aumenta (Figuras 6.6b y c). La Figura 6.8 muestra imágenes de las monocapas formadas por mezclas de DLPA:PFD, 100:0, 60:40 y 10:90, obtenidas cuando la transición de fase ha avanzado en un 60% en

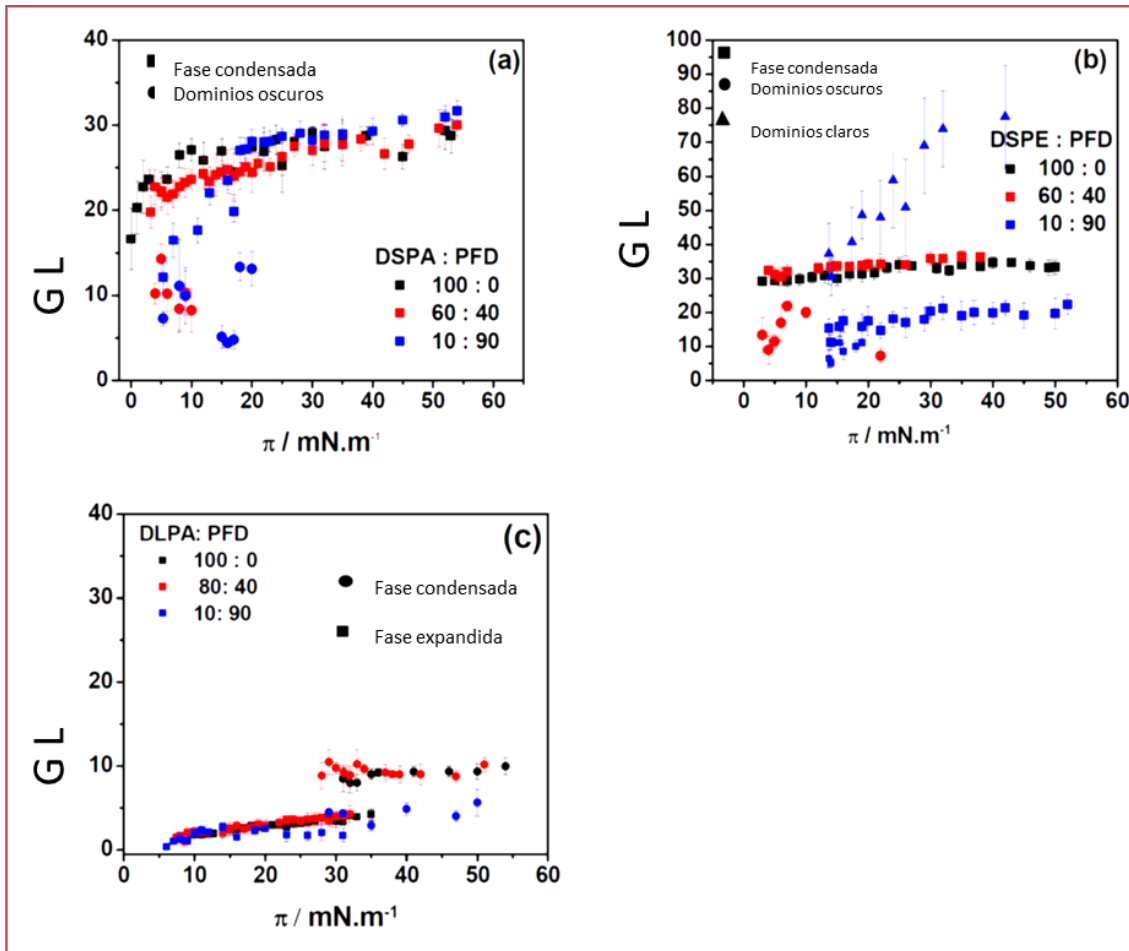
todos los casos, es decir el 60% de la película completa corresponde a la fase condensada. La presión en la cual se alcanzó la condición de 60% de transición de fase para las distintas mezclas: se muestra en la tabla 6.1

Relación DLPA:PFD	100:0	60:40	10:90
Presión superficial ( $\pi$ ) /mN.m <sup>-1</sup>	31± 1	30±1	30 ±1

Tabla 6.1 presiones para las distintas mezclas DLPA:PFD en las que se alcanza el 60% de transición

A partir de estas imágenes se pueden calcular la cantidad de dominios y sus áreas para el mismo estado de transición de fase. Como puede observarse en la Figura 6.8a, el aumento de la fracción molar de PFD en la mezcla induce la formación de un número mayor de dominios con un área menor. La Figura 6.8 b muestra el número (círculos rojos) y el área promedio (barras rosadas) de dominios obtenidos a partir de las imágenes en la Figura 6.8 a. El número de dominios aumenta desde 9, en ausencia de PFD, a 39, para una fracción molar de PFD igual a 90%, y las correspondientes áreas promedio disminuyen desde 681  $\mu\text{m}^2$  a 145  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente. En este punto, podemos postular que las moléculas de PFD impiden la difusión de lípidos y, por esta razón, la formación de un nuevo dominio en presencia de PFD es más favorable que el crecimiento de uno preexistente <sup>44</sup>. Trabajos previos han demostrado que las moléculas de compuestos perfluorados pueden utilizarse para modular la topografía de las membranas lipídicas <sup>30</sup>.

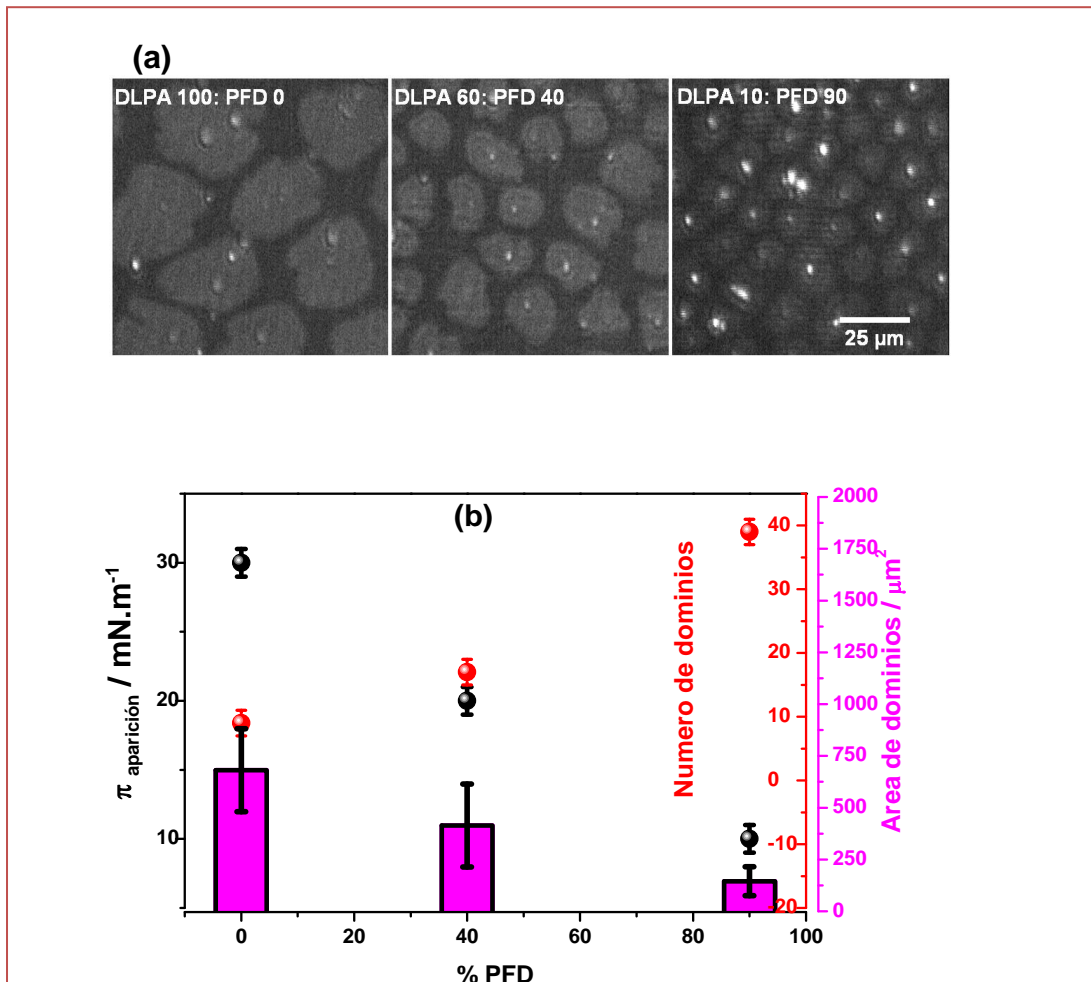




**Figura 6.7** Nivel de gris en función de la presión superficial en monocapas de: **(a)** DSPA:PFD, **(b)** DSPE:PFD y **(c)** DLPA:PFD. Relación de Lípido:PFD: 100:0 (**Negro**), 60: 40 (**rojo**) and 10:90 (**Azul**). Condiciones experimentales de la sub fase: LiCl 10 mM, pH = 6.00 y T = 21°C. **(a-b) círculo:** dominios oscuros, **cuadrados:** fase continua y **triángulos:** dominios claros; **(c) cuadrado:** fase expandida y **círculo:** fase condensada. Condiciones experimentales de la subfase: LiCl 10 mM, pH = 6.00 y T = 21°C.

Con respecto a la cuantificación del nivel de gris a partir de imágenes BAM (Figura 6.7c), la mezcla DLPA:PFD presenta dos zonas de nivel de gris, similar a los resultados para DLPA puro. La primera corresponde a la fase líquida expandida (cuadrados en la Figura 6.7c) y la segunda se relacionada con la fase condensada (círculos en la Figura 6.7c). Cuando PFD está presente en una fracción molar igual a 40%, no se detectan cambios en el nivel de gris con respecto a la monocapa de DLPA puro, pero cuando la fracción molar de PFD aumenta a 90%, se observa una marcada disminución en el nivel de gris para ambas fases. Esta disminución en el nivel de gris fue del 50%, aproximadamente, para ambas fases y se correspondió con una

disminución en el contraste entre las fases líquida expandida y condensada. Este efecto, junto con el aumento en el número de dominios y la disminución lineal en la presión a la cual los dominios aparecen, apoyan la hipótesis de una mezcla miscible entre DLPA y PFD bajo estas condiciones de concentración y presión superficial <sup>33</sup>. Para las mezclas DLPA:PFD, no se encontró segregación de PFD, probablemente debido a una mayor afinidad entre ambas especies, por tener una longitud similar en sus cadenas de hidrocarbonadas (DLPA: 12 átomos de carbono y PFD: 10 átomos de carbono).



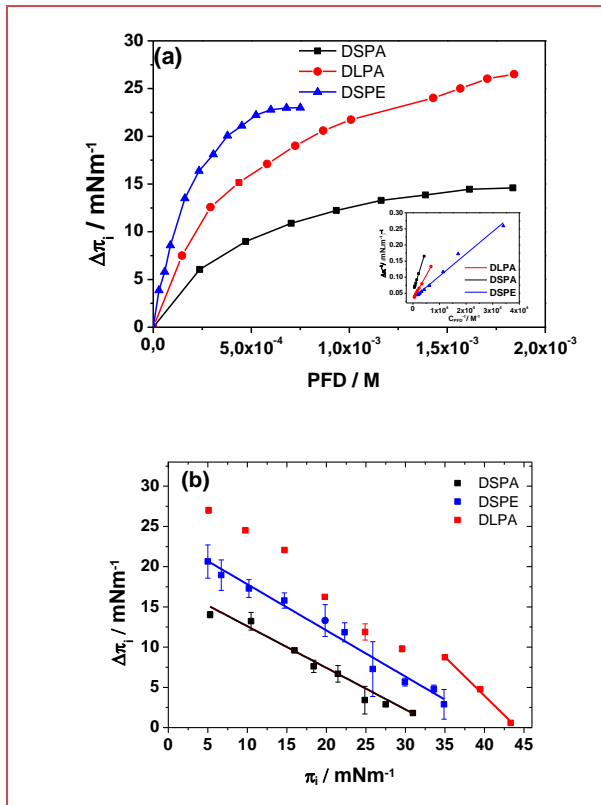
**Figura 6.8 a)** Imágenes de BAM para mezclas de DLPA:PFD, obtenidas al 60 % de la transición de fase. (Presión superficial:  $31 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para una relación 100:0;  $30,7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para 60:40;  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para 10:90) tamaño:  $100 \mu\text{m}^2 \times 100 \mu\text{m}^2$ , **b)** Presión superficial de aparición de dominios (●), números de dominios (●) y áreas de dominion (■) en función de la fracción molar de PFD para mezclas de DLPA:PFD, obtenidos en las imágenes de (a).

#### 6.4.5. Inserción de PFD en monocapas pre formadas y determinación de la presión de exclusión

Se caracterizó la penetración de PFD en monocapas de DSPA, DSPE y DLPA mediante Isotermas de adsorción y experimentos basados en la aproximación de área superficial constante, empleando una solución de LiCl 10,00 mM como subfase. Con el objetivo de determinar la concentración de saturación de PFD en la monocapa de fosfolípidos, se preformaron dichas monocapas a presión constante y se estudió el efecto que produce, sobre la presión superficial, un aumento de la concentración de PFD en la subfase (Figura 6.9a, donde  $\Delta\pi_i = \pi_{t=12 \text{ min}} - \pi_{t=0}$  es el cambio de presión registrado antes y después de 12 minutos transcurridos desde cada inyección de PFD en la subfase). Se determinó la concentración de PFD a la cual se alcanza el valor máximo y constante de  $\Delta\pi_i$ . Este valor corresponde a la concentración de saturación (SC) y se utilizó para la determinación de la presión de exclusión. Los valores de SC obtenidos fueron 0,52 mM, 1,60 mM y 1,70 mM, para DSPE, DLPA y DSPA respectivamente (Tabla 6.2, primera columna). Las curvas de  $\Delta\pi_i$  vs concentración de PFD, se pueden linealizar y, a través de la siguiente ecuación<sup>47</sup>:

$$\frac{1}{\Delta\pi} = \frac{1}{\Delta\pi_{max}} + \frac{K_{0,5}}{\Delta\pi_{max}} \frac{1}{C_{PFD}} \quad \text{Ec.6.4}$$

se pueden determinar  $\Delta\pi_{max}$  y  $K_{0,5}$  a partir de la ordenada al origen y la pendiente de gráficos  $1/\Delta\pi_i$  vs  $1/C_{PFD}$ , respectivamente (inserto en la Figura 6.9a.  $K_{0,5}$  es la concentración del surfactante a la cual se alcanza un valor de cambio en la presión igual a la mitad del cambio máximo, y por lo tanto refleja la habilidad de las moléculas de PFD para inducir un cambio en el empaquetamiento molecular de la monocapa.



**Figura 6.9** a)  $\Delta\pi_i$  vs concentración de PFD en la subfase (isoterma de adsorción). Inserto: isoterma adsorción linealizada. (b) variación de la presión superficial en función de la presión inicial, para DSPA (negro), DSPE (azul) y DLPA (rojo) en presencia de PFD en la subfase. Condiciones experimentales de la sub fase: 10 LiCl mM, pH = 6.00 y T = 21°C.

Los valores de  $\Delta\pi_{\text{max}}$  y  $K_{0.5}$  así obtenidos se muestran en la tabla 6.1. Como puede observarse, los valores de  $\Delta\pi_{\text{max}}$  obtenidos (19  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para DSPA, 29  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para DSPE y 33  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para DLPA) demuestran que PFD induce cambios en la presión de acuerdo al siguiente orden decreciente: DLPA > DSPE > DSPA. Por el contrario, la tendencia es diferente para los valores de  $K_{0.5}$ . DSPA y DLPA muestran casi el mismo valor, cercano a 0,5 mM, lo cual podría explicarse teniendo en cuenta que ambos lípidos tienen mismo grupo polar y la misma carga, por lo tanto, la habilidad de PFD para inducir cambios en el empaquetamiento molecular cuando ingresa a la monocapa desde la subfase es aproximadamente la misma para ambos fosfolípidos. Por otra parte, el efecto de PFD en el empaquetamiento molecular de DSPE fue mayor, lo cual corresponde a un valor de  $K_{0.5}$  menor (0,2 mM). Este resultado se puede interpretar teniendo en cuenta la carga neta cero de DSPE en la interfaz, a diferencia de lo que ocurre con los grupos polares cargados negativamente

de DSPA y DLPA. De esta manera, PFD (con carga negativa) sufre menor repulsión electrostática con la monocapa de DSPE, produciendo un mayor efecto.

Fosfolípidos	SC / mM	$\Delta\pi_{\max}$ / mN.m <sup>-1</sup>	K <sub>0,5</sub> /mM	Presión de exclusión /mN.m <sup>-1</sup>
DSPA	1.70	(18 ± 0.2)	(0,5±0,1)	(34,2± 0,9)
DSPE	0.52	(29 ± 3,0)	(0,2±0,1)	(41,3± 0,2)
DLPA	1.60	(33± 3,0)	(0,5±0,2)	(44,2± 0,2)

**Tabla 6.2:** (SC); Cambio máximo en la presión superficial ( $\Delta\pi_{\max}$ ); constante K<sub>0,5</sub> y presión de exclusión de DSPA, DSPE y DLPA en presencia de PFD

Una vez que se determinaron los valores de SC para cada lípido, se procedió a determinar las presiones de exclusión. Con este fin, se llevaron a cabo experimentos a diferentes presiones iniciales y se registraron los cambios en la presión superficial ( $\Delta\pi_i$ ) producidos por la adición de PFD a la subfase, en concentración igual a la SC. Los valores de  $\Delta\pi_i$  obtenidos se graficaron en función de la presión inicial, Figura 6.9b. A partir de la intersección del ajuste de la recta con el eje x se determinó el valor de presión de exclusión, el cual indica la presión superficial por encima de la cual PFD no penetra en la monocapa lipídica<sup>48-50</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.2. En el caso de DLPA, este valor se calculó tomando en cuenta sólo la fase condensada, de tal manera de poder comparar el efecto de PFD en el mismo estado de fase (líquida condensada) para todos los fosfolípidos. Es importante señalar que todos los valores de presión de exclusión son más altos que los valores de presión lateral de la monocapa a la cual su densidad molecular es comparable a la de bicapas (30 mN.m<sup>-1</sup>)<sup>51</sup>, y este hecho indica que, probablemente, PFD puede penetrar y permanecer en las bicapas lipídicas. Los valores de presión de exclusión pueden interpretarse como una medida de la estabilidad de la mezcla PFD:lípidos y, en este

sentido, la mezcla con DLPA sería la más estable, lo cual está de acuerdo con lo demostrado en las secciones previas.

#### 6.4.6. Efecto de PFD sobre LUVs

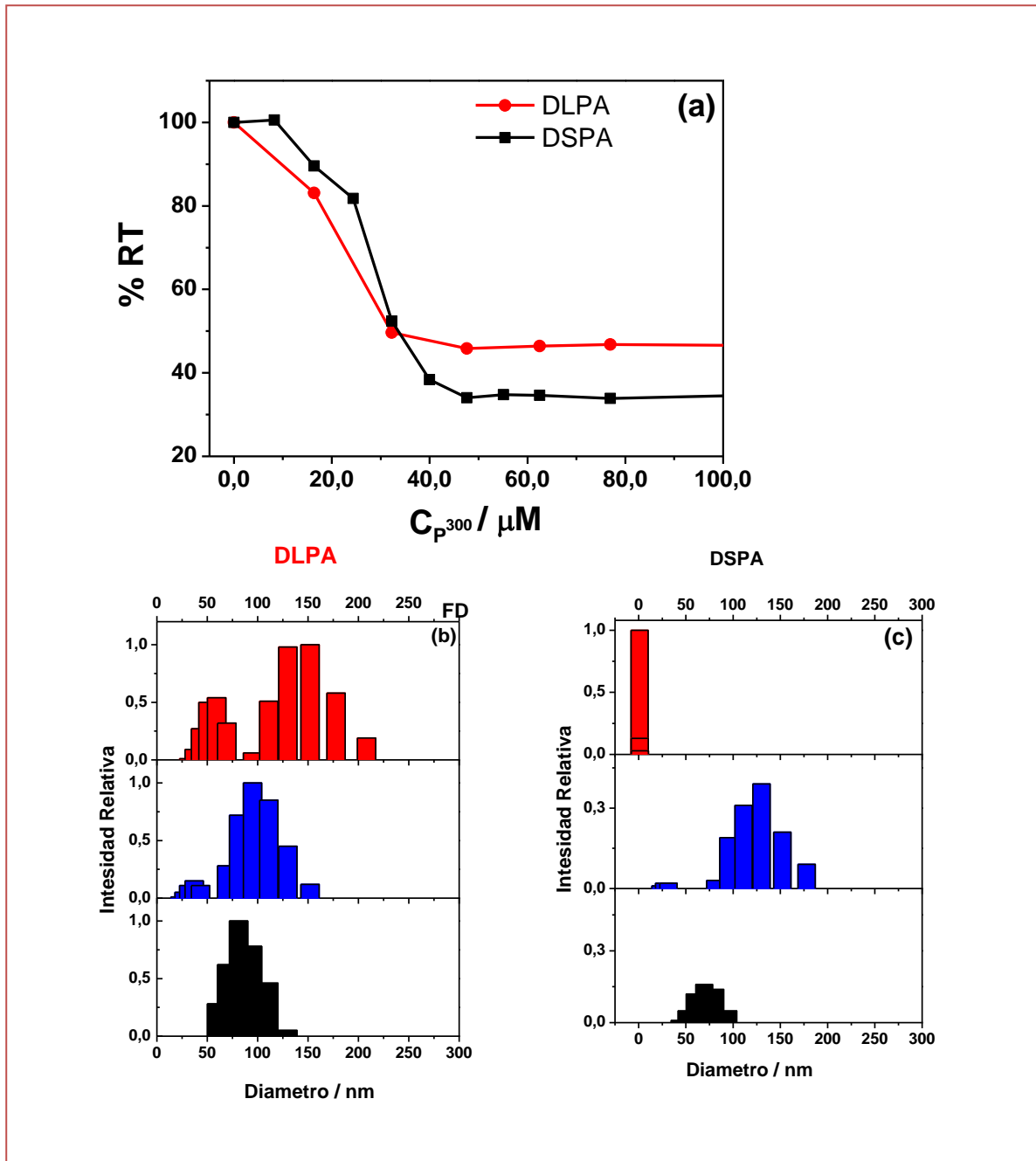
Con el objetivo de evaluar el efecto detergente de PFD sobre LUVs de DSPA y DLPA, se sintetizaron dichas vesículas y se expusieron a soluciones que contenían concentraciones crecientes de PFD. Estos experimentos fueron seguidos por mediciones de nefelometría y DDL. En este punto, es importante remarcar que DSPE no forma LUVs bajo las presentes condiciones experimentales (LiCl 10 mM).

La Figura 6.10a muestra el porcentaje de turbidez relativa en función de la concentración de PFD para vesículas de DLPA (rojo) y DSPA (negro), y las Figuras 6.11b y 6.11c muestran la variación del tamaño hidrodinámico de las LUVs a tres concentraciones de PFD distintas señaladas en los puntos 1, 2 y 3 de la Figura 6.11a. En general se puede asociar una disminución de la turbidez a la ruptura de las LUVs<sup>52, 53</sup>. En el caso de DSPA, las LUVs tienen un diámetro promedio de  $(71 \pm 13)$  nm en ausencia de PFD, (punto 1 en las Figuras 6.10 a y c).

Si la concentración de PFD aumenta a 20  $\mu$ M (punto 2 en las Figuras 6.10 a y c), se observan dos poblaciones de tamaños de vesículas: por un lado se obtienen vesículas con un tamaño mayor ( $126 \pm 20$ ) nm debido, probablemente, a la inserción de moléculas de PFD en las vesículas DSPA, hipótesis respaldada por los valores de presión de exclusión; por otro lado, un porcentaje de vesículas se rompen, de acuerdo a la disminución en el %RT, y se observa una pequeña población con un tamaño promedio de  $(27 \pm 7)$  nm. Un aumento posterior en la concentración de PFD induce la ruptura de todas las vesículas de DSPA (punto 3 en las Figuras 6.10 a y c). Bajo estas

condiciones, el tamaño promedio obtenido es  $(1,0 \pm 0,2)$  nm, de acuerdo con el valor constante y pequeño de %RT.

El efecto de PFD en las LUVs de DLPA es diferente respecto al encontrado en las vesículas de DSPA. En ausencia de PFD, las LUVs de DLPA tienen un tamaño promedio de  $(84 \pm 16)$  nm (punto 1 en las Figuras 6.10 a y b). Cuando se agrega PFD en una concentración final de  $18 \mu\text{M}$  (punto 2, en Figuras 6.10 a y b), una fracción de vesículas se rompe y da lugar a una población con diámetros promedios de  $(24 \pm 4)$  nm, lo cual conduce a la disminución en % RT observada. Al mismo tiempo se observa una segunda población de LUVs con un diámetro similar al de las vesículas de DLPA vacías  $(87 \pm 17)$  nm. Si la concentración de PFD aumenta hasta un valor igual a  $62 \mu\text{M}$ , (punto 3 en las Figuras 11a y b), nuevamente se observan dos poblaciones, pero con diferentes tamaños respecto del punto 2:  $(56 \pm 9)$  nm; y  $(147 \pm 24)$  nm. Para ambas poblaciones, el aumento de tamaño está de acuerdo con los valores de presión de exclusión obtenidos: las moléculas de PFD pueden penetrar a valores de presión lateral de la monocapa a la cual su densidad molecular es comparable a la de bicapas  $(44 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1})$ , la cual es más alta que el valor aceptado para la presión superficial de una bicapa lipídica. En este caso, la disminución en %RT se mantiene constante en un valor prácticamente igual al 50% para la mayor concentración de PFD analizada, este efecto se puede deber a una ruptura incompleta de las vesículas, como consecuencia de la miscibilidad entre DLPA y PFD, y la formación de una vesícula híbrida.



**Figura 6.11** a) Porcentaje de turbidez relativa (%RT) vs la concentración de PFD para LUVs de DSPA (negro) y DLPA (rojo) en LiCl. b,c) Frecuencia relativa (intensidad) en función del diámetro de LUVs para DLPA (b) y DSPA (c) en ausencia de PFD (negro), en presencia de PFD 20  $\mu M$  (azul) y en presencia de PFD 55  $\mu M$  (rojo). Composición de la subfase: LiCl 10 mM



## 6.5. Conclusiones

La elección de los tres fosfolípidos empleados tuvo como objetivo comparar el efecto de la carga del lípido (negativa para PA y zwitterionica para PE), y del largo de cadena (C18 para DS y C12 para DL) en las interacciones electrostáticas e hidrófobas, respectivamente, entre los lípidos y PFD.

Teniendo en cuenta los sistemas estudiados, es importante analizar tres factores para comprender el efecto global de la PFD sobre las membranas lipídicas:

- Repulsión electrostática entre grupos polares;
- Empaquetamiento molecular de la monocapa;
- Diferencias entre el largo de cadena de PFD y el largo de cadena de los lípidos estudiados.

A partir del análisis de las isotermas de Langmuir obtenidas para las mezclas de lípidos:PFD, es evidente que a bajas presiones laterales PFD aumenta el área ocupada por lípido y la magnitud de este cambio depende del compactamiento del film, siendo DLPA el lípido más afectado.

Las imágenes de BAM demostraron que las monocapas DSPA:PFD y DSPE:PFD a altas fracciones molares de PFD segregan dominios oscuros de PFD a bajas presiones superficiales, de acuerdo a la formación de un sistema no miscible. Un aumento adicional en la presión lateral produce la expulsión de PFD de la interfaz. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta el grado de compactación de las películas DSPA y DSPE y la diferencia en los largos de cadena entre estos lípidos y PFD. En el caso de DSPE a altas fracciones molares de PFD y para DLPA a todas las fracciones molares de PFD, el sistema no segrega PFD, por el contrario, se observa una película completamente visible a través de BAM. El cambio en el comportamiento

de DSPE con la concentración de PFD se puede explicar considerando las interacciones entre la cabeza polar de DSPE y PFD (enlace puente hidrógeno). En el caso de las mezclas de DLPA:PFD, la diferencia en el largo de cadena entre estos compuestos fue de dos enlaces C-C, lo cual no implica un costo energético adicional, por lo tanto DLPA estabiliza a PFD en la interfaz a través de interacciones hidrofóbicas y forma un sistema miscible. Otra evidencia de la miscibilidad entre DLPA y PFD es el hecho de que PFD afecta la nucleación de los dominios en la transición de fase líquida expandida / líquida condensada de DLPA, inhibiendo la difusión de lípidos y generando así dominios más pequeños y numerosos. En este punto, podemos concluir que una mezcla de lípido:PFD se puede comportar como un sistema miscible o no miscible dependiendo de las interacciones entre los componentes y de la coincidencia en el largo de cadena que exista entre ellos.

Los experimentos de adsorción, permitieron obtener valores de  $K_{0.5}$  para las distintas monocapas. Los resultados obtenidos indican que la habilidad para inducir cambios en el empaquetamiento molar depende de la afinidad electrostática entre PFD y el lípido. Los valores encontrados para la penetración de PFD son independientes de las cadenas hidrocarbonadas, pero dependen de la carga neta del grupo de polar, demostrando mayor afinidad hacia los lípidos neutros que hacia los negativos. Por otro lado, la máxima presión obtenida a partir de las isothermas de adsorción depende en gran medida de la compactación de la película, obteniéndose el valor más alto para DLPA (monocapa más expandida) y el valor más bajo para DSPA (monocapa más compacta).

Uno de los resultados más interesantes obtenidos, se relaciona con el hecho de que PFD se incorpora a la monocapa a valores de presiones superficiales mayores que 25-30  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , específicamente a 34  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , 41  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  y 44  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para DSPA, DSPE y DLPA, respectivamente. El mayor valor encontrado corresponde a la

monocapa de DLPA y el más pequeño a DSPA. De hecho, DLPA tiene una similitud estructural con PFD mayor y su monocapa está más expandida que la de DSPA. Además, la presión de exclusión de PFD en la monocapa de DSPE es mayor que en DSPA, debido a la ausencia de repulsiones electrostáticas.

Cuando se estudió el efecto de PFD en vesículas LUVs, se comprobó mediante DDL que PFD se incorpora a las LUVs de DSPA y DLPA, aumentando su tamaño promedio. Sin embargo, en el caso de DSPA, un aumento en la concentración de PFD induce un efecto lítico y las LUVs se rompen. Las vesículas de DLPA aumentan de tamaño, en presencia de PFD, formando una bicapa híbrida, más estable que la anterior.

Con todas las evidencias descritas anteriormente, se propone el siguiente comportamiento para los dos casos extremos:

- (A)** Las mezclas DSPA:PFD son inmiscibles a altas fracciones molares de PFD.
- (B)** Las mezclas de DLPA:PFD y DSPE:PFD (a bajas presiones laterales) son miscibles a bajas fracciones molares.

Finalmente, los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que PFD podría tener efectos negativos en los sistemas biológicos y en el ambiente. Esta molécula puede penetrar y absorberse en modelos de membranas (LUVs o monocapas) a valores de presiones superficiales similares a las propuestas para la presión en una bicapa celular, independientemente de la composición lipídica (películas condensadas o expandidas; neutra o cargada). Este hecho tiene varios efectos, modificando la bicapa desde un punto estructural y alterando su funcionalidad. Estas moléculas son contaminantes presentes en el medio ambiente que han adquirido mucha relevancia en los últimos años.

## 6.6. Bibliografía

- [1] Buck, R. C.; Franklin, J.; Berger, U.; Conder, J. M.; Cousins, I. T.; de Voogt, P.; Jensen, A. A.; Kannan, K.; Mabury, S. A.; van Leeuwen, S. P. J.,. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7, (2011) 513-541.
- [2] Viberg, H.; Eriksson, P., Chapter 47 -, Gupta, R. C., Ed. Academic Press: San Diego, 2011; 623-635.
- [3] Butenhoff, J. L.; Pieterman, E.; Ehresman, D. J.; Gorman, G. S.; Olsen, G. W.; Chang, S.-C.; Princen, H. M. G.,. *Toxicology Letters* 210 (2012) 360-365.
- [4] Zhang, Y.; Beesoon, S.; Zhu, L.; Martin, J. W.,. *Environmental Science & Technology* 47 (2013) 10619-10627.
- [5] Chen, H.; Zhang, C.; Han, J.; Yu, Y.; Zhang, P. *Environmental Pollution* 170 (2012) 26-31.
- [6] Bossi, R.; Riget, F. F.; Dietz, R.; Sonne, C.; Fauser, P.; Dam, M.; Vorkamp, K., *Environmental Pollution* 136 (2005) 323-329.
- [7] Yeung, L. W. Y.; De Silva, A. O.; Loi, E. I. H.; Marvin, C. H.; Taniyasu, S.; Yamashita, N.; Mabury, S. A.; Muir, D. C. G.; Lam, P. K. S., *Environment International* 59 (2013) 389-397.
- [8] Hopkins, Z. R.; Sun, M.; DeWitt, J. C.; Knappe, D. R. U. *Journal - American Water Works Association* 7 (2018) 13-28.
- [9] Guelfo, J. L.; Adamson, D. T.,. *Environmental Pollution* 236 (2018) 505-513.
- [10] Hu, X. C.; Andrews, D. Q.; Lindstrom, A. B.; Bruton, T. A.; Schaidler, L. A.; Grandjean, P.; Lohmann, R.; Carignan, C. C.; Blum, A.; Balan, S. A.; Higgins, C. P.; Sunderland, E. M. *Environmental Science & Technology Letters* 3 (2016) 344-350.
- [11] Suuberg, J. L. G. T. M. D. M. K. D. A. S. S. F. M. C. E. M. *Environ Health Perspect* 126 (2018) 1-13.
- [12] Kannan, K.; Corsolini, S.; Falandysz, J.; Fillmann, G.; Kumar, K. S.; Loganathan, B. G.; Mohd, M. A.; Olivero, J.; Wouwe, N. V.; Yang, J. H.; Aldous, K. M. *Environmental Science & Technology* 38 (2004) 4489-4495.

- [13] Olsen, G. W.; Mair, D. C.; Lange, C. C.; Harrington, L. M.; Church, T. R.; Goldberg, C. L.; Herron, R. M.; Hanna, H.; Nobilette, J. B.; Rios, J. A.; Reagen, W. K.; Ley, C. A. *Environmental Research* 157 (2017) 87-95.
- [14] Moriwaki, H.; Takata, Y.; Arakawa, R. *Journal of Environmental Monitoring* 5 (2003) 753-757.
- [15] Sanchez Garcia, D.; Sjödin, M.; Hellstrandh, M.; Norinder, U.; Nikiforova, V.; Lindberg, J.; Wincent, E.; Bergman, Å.; Cotgreave, I.; Munic Kos, V., *Chemico-Biological Interactions* 281 (2018) 1-10.
- [16] Rainieri, S.; Conlledo, N.; Langerholc, T.; Madorran, E.; Sala, M.; Barranco, A. *Food and Chemical Toxicology* 104 (2017) 14-25.
- [17] Rockwell, C. E.; Turley, A. E.; Cheng, X.; Fields, P. E.; Klaassen, C. D. *Food and Chemical Toxicology* 100 (2017) 24-33.
- [18] Lau, C.; Thibodeaux, J. R.; Hanson, R. G.; Narotsky, M. G.; Rogers, J. M.; Lindstrom, A. B.; Strynar, M. J. *Toxicological Sciences* 90 (2006) 510-518.
- [19] Rainieri, S.; Conlledo, N.; Larsen, B. K.; Granby, K.; Barranco, A., *Environmental Research* 162 (2018) 135-143.
- [20] Tang, J.; Jia, X.; Gao, N.; Wu, Y.; Liu, Z.; Lu, X.; Du, Q.; He, J.; Li, N.; Chen, B.; Jiang, J.; Liu, W.; Ding, Y.; Zhu, W.; Zhang, H. *Environmental Pollution* 238 (2018) 1035-1043.
- [21] Song, X.; Tang, S.; Zhu, H.; Chen, Z.; Zang, Z.; Zhang, Y.; Niu, X.; Wang, X.; Yin, H.; Zeng, F.; He, C. *Environment International* 113 (2018) 50-54.
- [22] Steves, A. N.; Turry, A.; Gill, B.; Clarkson-Townsend, D.; Bradner, J. M.; Bachli, I.; Caudle, W. M.; Miller, G. W.; Chan, A. W. S.; Easley, C. A. I. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 64 (2018) 225-239.
- [23] VanNoy, B. N.; Lam, J.; Zota, A. R. Review. *Current Environmental Health Reports* 2018, 5 (2), 213-224.
- [24] Melzer, D.; Rice, N.; Depledge, M. H.; Henley, W. E.; Galloway, T. S., *Environmental Health Perspectives* 118 (2010) 686-692.
- [25] Broniatowski, M.; Sandez Macho, I.; Dynarowicz-Łątka, P. *Thin Solid Films* 493 (2005) 249-257.
- [26] Broniatowski, M.; Vila Romeu, N.; Dynarowicz-Łątka, P. *Journal of Colloid and Interface Science* 325, (2008) 464-471.
- [27] Nakahara, H.; Nakamura, S.; Kawasaki, H.; Shibata, O., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41 (2005) 285-298.

- [28] Xie, W.; Kania-Korwel, I.; Bummer, P. M.; Lehmler, H. J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1768 (2007) 1299-1308.
- [29] Yokoyama, H.; Nakahara, H.; Shibata, O. *Chemistry and Physics of Lipids* 161 (2009) 103-114.
- [30] Paige, M. F.; Eftaiha, A. a. F., *Advances in Colloid and Interface Science* 248 (2017) 129-146.
- [31] Saito, H.; Shinoda, W.; Mikami, M. *Chemical Physics Letters* 468 (2009) 260-263.
- [32] Krafft, M. P. *Biochimie* 94 (2012) 11-25.
- [33] Lehmler, H. J.; Bummer, P. M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1664 (2004) 141-149.
- [34] Xie, W.; Bothun, G. D.; Lehmler, H.-J. *Chemistry and Physics of Lipids*. 163 (2010) 300-308.
- [35] Viada, B. N.; Juárez, A. V.; Pachón Gómez, E. M.; Fernández, M. A.; Yudi, L. M. *Electrochimica Acta* 263 (2018) 499-507.
- [36] Wilke, N., Aleš, I.; Chandrashekhar, V. K., Eds. *Academic Press* 20 (2014) 51-81.
- [37] Mercado, F. V.; Maggio, B.; Wilke, N. *Chemistry and Physics of Lipids* 164 (2011) 386-392.
- [38] Giudice, F.; Ambroggio, E. E.; Mottola, M.; Fanani, M. L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1858 (2016) 2132-2139.
- [39] Brasitus, T. A.; Dudeja, P. K.; Worman, H. J.; Foster, E. S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 855 (1986) 16-24.
- [40] Tocanne, J.-F.; Teissié, J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1031 (1990) 111-142.
- [41] Registry, A. f. T. S. a. D., *Toxic Substances Portal - Perfluoroalkyls*. Atlanta. US.
- [42] George L. Gaines, J., *Insoluble Monolayers at liquid-gas interfaces*. John Wiley & Sons, I., Ed. New York 1966; 151-154.
- [43] Cámara, C. I.; Riva, J. S.; Juárez, A. V.; Yudi, L. M., *J Phys Org Chem* 29 (2016) 672-681.
- [44] Cámara, C. I.; Wilke, N. *Chemistry and Physics of Lipids* 204 (2017) 34-42.
- [45] Matsumoto, Y.; Nakahara, H.; Moroi, Y.; Shibata, O. *Langmuir* 23 (2007) 9629-9640.
- [46] Bos, M. A.; Nylander, T. *Langmuir* 12 (1996) 2791-2797.
- [47] de Matos Alves Pinto, L.; Malheiros, S. V. P.; Lino, A. C. S.; de Paula, E.; Perillo, M. A. *Biophys Chem* 119 (2006) 247-255.
- [48] Elderdfi, M.; Sikorski, A. F. *Chemistry and Physics of Lipids* 2018, 212, 61-72.

- [49] Stillwell, W., In An Introduction to Biological Membranes (Second Edition), Stillwell, W., Ed. Elsevier: 2016.
- [50] Demel, R. A.; Geurts van Kessel, W. S. M.; Zwaal, R. F. A.; Roelofsen, B.; van Deenen, L. L. M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 406 (1975) 97-107.
- [51] Jähnig, F. *Biophysical Journal* 71 (1996), 1348-1349.
- [52] Stano, P.; Bufali, S.; Domazou, A. S.; Luisi, P. L.,. *Journal of Liposome Research* 15 (2005), 29-47.
- [53] Hulakova, S.; Fulier, B.; Gallova, J.; Balgavy, P.,. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae* 60 2013, 7-13.
- [54] Kuzmin, P. I.; Akimov, S. A.; Chizmadzhev, Y. A.; Zimmerberg, J.; Cohen, F. S., Line. *Biophysical Journal* 88 (2005) 1120-1133.
- [55] Dupuy, F.; Maggio, B. *Chemistry and Physics of Lipids* 165 (2012), 615-629.
- [56] Sánchez-Martín, M. J.; Haro, I.; Alsina, M. A.; Busquets, M. A.; Pujol, M., A. *The Journal of Physical Chemistry B* 114 (2010), 448-456.

---

# Capítulo 7

## Determinación de compuestos perfluorados en muestras ambientales

---



## 7. Determinación de compuestos perfluorados en muestras ambientales

### 7.1. Introducción

Los compuestos perfluorados (PFCs), tal como se mencionó en el capítulo 3, han sido ampliamente utilizados en múltiples aplicaciones industriales debido a sus propiedades físicoquímicas específicas, que los hacen altamente atractivos<sup>1,2</sup>. Por otra parte, dichas propiedades específicas como su alta estabilidad han conducido a la persistencia de estos compuestos en el medio ambiente, fundamentalmente en el suelo y en diversos cuerpos de agua, como así también en animales y en los seres humanos constituyendo un problema ambiental y de salud pública debido a la toxicidad de estos compuestos<sup>3-8</sup>. Resulta importante el monitoreo de estos compuestos en diferentes ambientes<sup>9,10</sup>. Dentro de los PFCs más utilizados se encuentra el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y el ácido perfluoro sulfónico (PFOS) y sus aniones, representando éstos el mayor problema ambiental y de Salud. En la Figura 7.1 se muestran sus estructuras. De esta manera, la mayor parte de los estudios se han centrado en la detección de estos dos compuestos por diversas técnicas, entre las cuales se incluyen cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectroscopia de masas (HPLC-EM), cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopia de masas (CG-EM) y técnicas colorimétricas, entre otras<sup>11-17</sup>, lográndose excelentes límites de detección y una buena sensibilidad. Sin embargo, estas técnicas cuentan con una serie de desventajas: son técnicas relativamente costosas, requieren de tratamientos previos complejos, largos tiempos de procesamiento, personal altamente calificado y la imposibilidad de realizar ensayos in-situ. De esta manera, en los últimos años han surgido diferentes técnicas para la detección de contaminantes que no presenten los inconvenientes antes mencionados.

La determinación analítica de contaminantes ambientales por métodos electroquímicos ha surgido como una atractiva alternativa debido, fundamentalmente a sus bajos costes y posibilidad de portabilidad <sup>18-21</sup>.

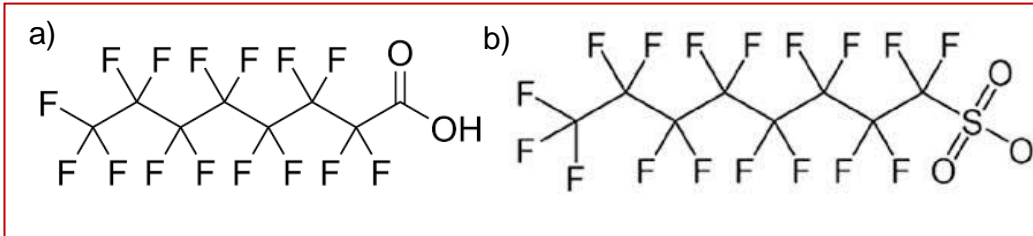


Figura 7.1 a) Estructura del ácido perfluorooctanoico (PFOA). b) el ácido perfluoro sulfónico (PFOS)

Por otra parte, la determinación electroquímica directa de los PFOS es compleja debido a su falta de actividad electroquímica ya que cuentan con un gran número de enlaces C-F, lo cual les otorga estabilidad frente a reacciones de óxido reducción. Este problema se puede resolver empleando las técnicas electroquímicas en interfaces líquido/ líquido, las cuales solo requieren que la molécula tenga carga neta y pueda ser transferida desde una fase a la otra dentro de la ventana de potencial. Existen antecedentes en el empleo de esta técnica para determinar diversos analitos <sup>22-25</sup>. De cualquier manera, para fines analíticos resulta conveniente reemplazar las celdas electroquímicas convencionales por celdas con una micro área ( $\mu$ ITIES). De esta forma se logra una mayor estabilidad de la interfaz y se supera la limitación de la difusión lineal hacia la misma, mejorando las características analíticas del método. La estabilidad de la interfaz puede aumentarse empleando una membrana que la soporta<sup>26-28</sup>. Existen varias publicaciones para la caracterización y detección de contaminantes <sup>25-29</sup>, proteínas <sup>30-32</sup>, drogas con actividad farmacológica <sup>33-35</sup>, macromoléculas <sup>36-37</sup>, especies inorgánicas <sup>38-39</sup> empleando técnicas electroanalíticas aplicadas a  $\mu$ ITIES. Adicionalmente, se pueden emplear técnicas de pulso como la voltametría de pulso diferencial (VPD) aplicadas a una  $\mu$ ITIES, lo cual mejora los

límites de detección y la sensibilidad comparada con la voltametría cíclica, debido a una mayor discriminación de las corrientes farádicas como se explicará posteriormente<sup>40</sup>. Adicionalmente, las técnicas de “*Stripping voltamétrico*” (SV) se pueden emplear en una interfaz líquido/líquido para obtener mejores límites de detección (LDD)<sup>23,41,42</sup>.

En este capítulo, se estudió la detección del anion perfluoro octansulfonato (PFOS) como analito en la interfaz agua/ 1,2- DCE en un arreglo de  $\mu$ ITIES. Además, se alcanzó una mayor sensibilidad y un menor LDD por combinación de “*Stripping voltamétrico*” y pulso diferencial (SVPD). Se logró la detección de valores de concentración menores a los reportes fijados por la agencia estadounidense (EPA)<sup>43</sup> y el Departamento de Salud de Australia<sup>44</sup>. Esta parte del trabajo de tesis fue realizada en la Universidad de Curtin, Australia, bajo la dirección del Prof. Damien Arrigan durante los meses de noviembre a agosto de 2019.

## 7.2. Objetivos

### 7.2.1. General

Desarrollar una metodología para la cuantificación electroquímica del anión PFOS en la interfaz agua / DCE soportada en una membrana porosa de vidrio ( $\mu$ ITIES) en agua pura y en muestras reales.

### 7.2.2. Específicos

- Evaluar la detección electroquímica de PFOS en un microarreglo de ITIES por voltametría cíclica (CV);
- Evaluar la detección electroquímica de PFOS en un microarreglo de ITIES por Voltametría de pulso diferencial (DPV);

- Optimizar las condiciones de potencial y tiempo de preconcentración utilizando la técnica de “*Stripping Voltamétrico*” (SV);
- Implementar la técnica de voltametría de pulso diferencial y “*Stripping Voltamétrico*” (SVPD) para la cuantificación de PFOS. Calcular los parámetros analíticos más importantes;
- Evaluar el efecto de la matriz y el desempeño analítico de la técnica SVPD en muestras reales

### 7.3. Parte experimental

Todos los experimentos se realizaron usando un arreglo de microporos en una membrana de vidrio, dicho arreglo consiste en 100 poros realizados por perforación láser (detalles de fabricación <sup>38</sup>). La membrana posteriormente fue adherida a un tubo de vidrio con silicona. Luego, se limpió la membrana con sucesivos lavados de acetona/metanol y se evaporó el solvente. Para los experimentos electroquímicos, este tubo fue rellenado con DCE (fase orgánica). Luego el sistema se colocó en un beaker que contiene la fase acuosa (LiCl 10 mM + PFOS). Para generar la celda electroquímica (ver sección 4.1.4), se utilizaron dos electrodos de referencia de Ag/AgCl colocados uno en cada fase.

Las soluciones electrolíticas se prepararon a partir de las siguientes sales: LiCl (10 mM) en agua ultra pura para la fase acuosa mientras que para la fase orgánica se empleó tetrakis(4-chlorophenyl) borato de bis (triphenylphosphoranylidine) (BTPPA<sup>+</sup>TPBCl<sup>-</sup>). Esta sal se preparó por metatesis de cloruro de bis (triphenylphosphoranlidene) (BTPPA<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>) y tetrakis(4-chlorophenyl) borato de potasio (K<sup>+</sup>TPBCl<sup>-</sup>). Para los estudios del efecto de la matriz, se preparó una solución de agua de mar artificial (AMA), compuesta por cloruro de sodio (28,32 g/L) cloruro de potasio

(0,77 g/L), cloruro de magnesio (5,48 g/L), sulfato de magnesio (7,39 g/L) y cloruro de calcio (1,1 g/L) <sup>45</sup>.

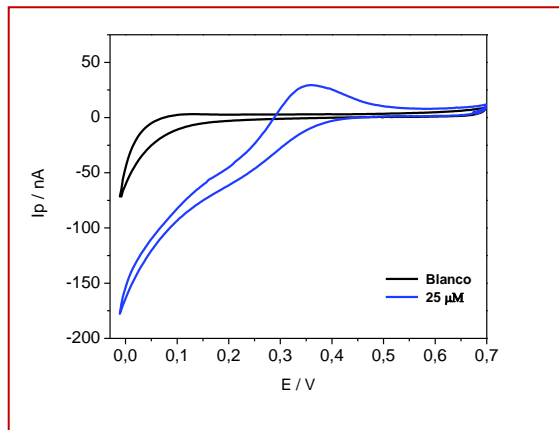
## 7.4. Resultados

### 7.4.1. Voltametría cíclica en el arreglo de Micro-ITIES

Se ha estudiado la transferencia de PFOS a través de la interfaz líquido/líquido soportada en micropipetas empleando voltametría cíclica<sup>46</sup>. En estas condiciones se observan voltagramas bien definidos, que responden a un proceso difusional, sin evidencia de una posible adsorción en la interfaz. En el barrido inicial (negativo) se observó la transferencia del PFOS desde la fase acuosa a la orgánica, el perfil corriente/ potencial obtenido muestra una respuesta difusional esférica con una corriente límite, característica de las microinterfaces, como se describió en la sección 4.1.4. Por otra parte, durante el barrido inverso (positivo), se obtuvo una señal de corriente con forma de pico característico de un proceso controlado por difusión lineal, correspondiente a la transferencia del analito desde la fase orgánica a la acuosa. La misma respuesta se obtuvo al utilizar la membrana de vidrio mostrada en la celda de la Figura 4.8 b, que contiene el arreglo de micro-ITIES.

Estos resultados se muestran en la Figura 7.2 donde puede observarse el perfil de corriente estacionario durante el barrido negativo de potencial, correspondiente a la transferencia de PFOS desde la fase acuosa a la fase orgánica controlada por un régimen de difusión esférico fuera de los poros. El pico de corriente observado en el barrido positivo da cuenta de la transferencia de PFOS en el sentido inverso controlado por la difusión lineal dentro de los poros. Este comportamiento para PFOS ya ha sido reportado<sup>46</sup>. En dicho trabajo,

Los datos experimentales ajustan correctamente con una simulación quasi-reversible para la transferencia de estos iones. Los resultados de esta sección indican que PFOS puede ser detectado empleando un arreglo de microporos como soporte para la  $\mu$ ITIES. De forma tal de obtener un mejor límite de detección (LDD) y una mayor sensibilidad se empleó la técnica de voltametría de pulso diferencial (VPD).

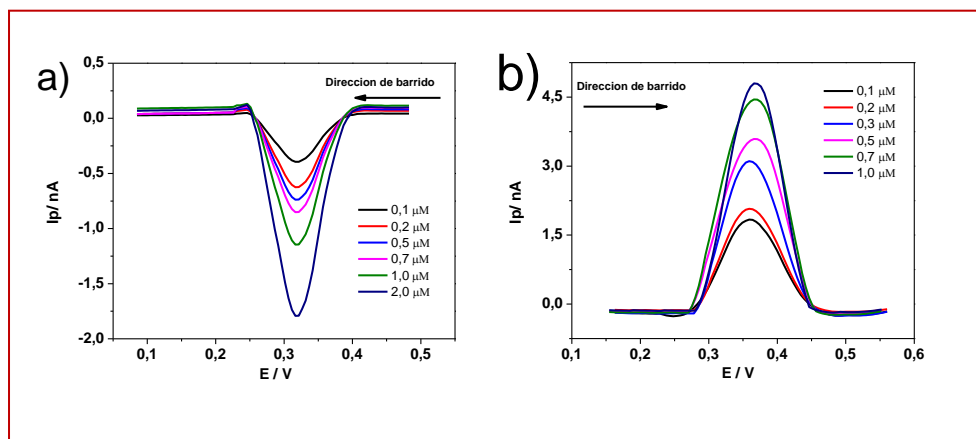


**Figura 7.2** Voltametría cíclica para  $\mu$ ITIES en ausencia (-) y presencia de PFOS<sup>-</sup> (-) utilizando un arreglo de micro-ITIES. Composición de la fase acuosa: PFOS<sup>-</sup> 25  $\mu$ M + LiCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: BTTPATPBCl 10 mM.  $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

#### 7.4.2. Voltametría de pulso diferencial (VPD)

Como se mencionó anteriormente la técnica VPD permite obtener mejores límites de detección como así también una mejor sensibilidad <sup>47</sup>. Esta técnica ya ha sido empleada en la detección de diversas moléculas orgánicas en  $\mu$ ITIES <sup>40-48</sup>. Si se observan los voltagramas mostrados en la sección anterior se deduce que es posible aplicar VPD tanto en el barrido positivo como en el negativo. La Figura 7.3 muestra los resultados de VPD a diferentes concentraciones de PFOS para el barrido de directo (7.3a) y el inverso (7.3b). Como se observa, la menor concentración detectada para PFOS fue de 0,1  $\mu$ M utilizado ambos barridos. Las diferentes concentraciones del analito se lograron inyectando distintos volúmenes de una solución madre a la fase acuosa. Cuando se grafica la corriente de pico en función de la concentración de PFOS se obtiene una respuesta lineal dentro del intervalo de concentraciones

comprendido entre 0,1 y 1  $\mu\text{M}$ . Es importante mencionar que la Agencia de Protección Ambiental y el Departamento de Salud de Australia establecen una concentración máxima aceptable de este contaminante igual a 80 pM y 140 pM, respectivamente. Este valor es inferior al límite de detección conseguido con esta metodología. Por lo tanto, para disminuir el LDD, es necesario incorporar un paso previo de preconcentración que permita mejorar las características analíticas de la técnica. Este enfoque se denomina “*Stripping Voltamétrico*” (SV) y constituye una poderosa herramienta en electroanálisis debido a la alta sensibilidad que permite lograr <sup>41-49</sup>.



**Figura 7.3** Voltametría de pulso diferencial a distintas concentraciones de PFOS<sup>-</sup> en el barrido directo a) y el inverso b). Composición de la fase acuosa: PFOS<sup>-</sup> + LiCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: BTTPATPBCl 10 mM utilizando un arreglo de micro-ITIES. Parámetros para VPD: pulso de potencial 0,005 V, amplitud 0,025 V tiempo 0,05 s, intervalo de tiempo entre pulsos 0,5 s y velocidad de barrido 0,01 V.s<sup>-1</sup>

### 7.4.3. Voltametría de pulso diferencial y “Stripping Voltamétrico” (SVPD)

En esta sección, se muestran los resultados obtenidos al combinar la técnica de voltametría de pulso diferencial con Stripping voltamétrico (SVPD) con el fin de mejorar la sensibilidad en la detección de PFOS. Esta metodología involucra dos etapas, la primera es de preconcentración y se realiza a un potencial fijo, mientras que

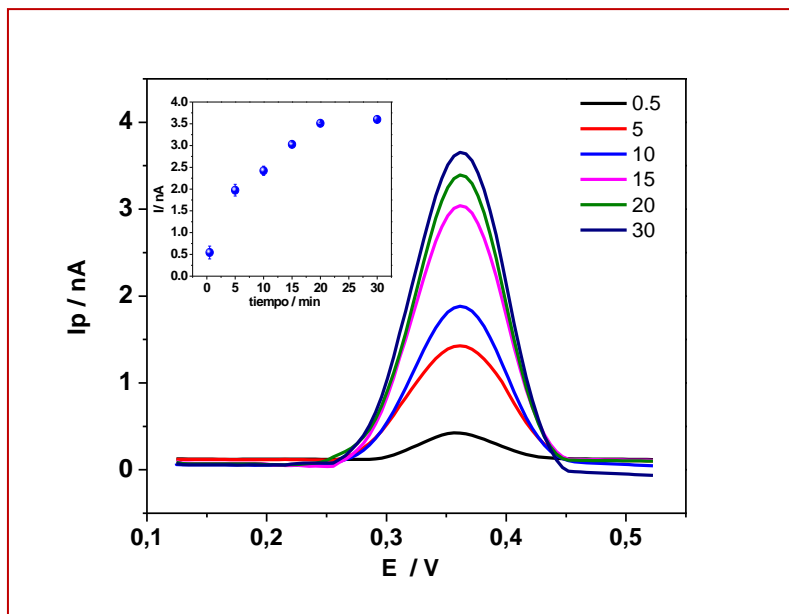
la segunda es la etapa de voltametría de pulso diferencial en la cual se registra la señal analítica. Con respecto a la primera, la selección del potencial es crucial, ya que este factor es el que permite la preconcentración del analito cerca de la interfaz y, en consecuencia, la amplificación de la señal permitiendo mejores características analíticas. Para este caso se utilizó un potencial de 0,1 V. Este valor se seleccionó a partir de la comparación de los voltagramas en presencia y en ausencia de PFOS en la fase acuosa (Figura 7.2). Como puede observarse, en este valor ocurre la transferencia del analito desde la fase acuosa a la orgánica, incrementando la cantidad de moléculas de PFOS en un área cercana al lado orgánico de la interfaz. Luego de esta etapa de preconcentración en la fase orgánica, se aplica el barrido positivo de potencial durante el cual el analito se transfiere nuevamente hacia la fase acuosa, dando lugar a la detección de mismo. Una vez seleccionado este valor de potencial, se estudió la influencia del tiempo de preconcentración en la respuesta voltamétrica de PFOS en  $\mu$ ITIES.

#### 7.4.4. Efecto del tiempo de preconcentración

En la Figura 7.4 se muestran los resultados de SVPD para una concentración de PFOS igual a 10 nM a distintos tiempos de preconcentración entre 0,5 y 30 minutos. En el inserto de la Figura 7.4 se muestra la corriente del pico positivo en función del tiempo preconcentración. Como puede observarse, la corriente de pico aumenta linealmente con el tiempo de preconcentración hasta los 20 minutos, tiempo a partir del cual se alcanza un efecto de saturación. Este efecto se ha observado anteriormente para diversos analitos como colina<sup>50</sup>, oligopéptidos<sup>48</sup>, drogas ionizables<sup>40</sup> y proteínas<sup>31,51</sup>. Una posible explicación para este comportamiento podría estar basada en el hecho de que la condición de tiempos de preconcentración largos



permiten una mayor acumulación de surfactante cerca de interfaz, lo cual puede conducir a la formación de estructuras micelares o pre micelares <sup>52</sup>, situación en la cual un incremento en la concentración de surfactante no afectará la corriente de pico. Este comportamiento ha sido reportado previamente para diversos compuestos perfluorados <sup>22,53</sup>.



**Figura 7.4** Efecto del tiempo de pre concentración utilizado SVPD para PFOS<sup>-</sup> 10 nM utilizando un arreglo de  $\mu$ TIES. Los tiempos de preconcentración fueron 0,5, 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. Inserto: dependencia de la corriente de pico en función del tiempo de preconcentración. Composición de la fase acuosa: PFOS<sup>-</sup> + LiCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: BTTPATPBCl 10 mM. Parámetros para VPD: pulso de potencial 0,005 V, amplitud 0,025 V tiempo 0,05 s, intervalo de tiempo entre pulsos 0,5 s y velocidad de barrido 0,01 V.s<sup>-1</sup>

Se estimó la concentración dentro de los poros de la membrana de vidrio luego de la etapa de preconcentración. Basándonos en la suposición de que todas las moléculas de PFOS se mantienen en la región interfacial correspondiente a la fase orgánica dentro del poro, es posible calcular la carga (Q) en dicho poro a través de la corriente inicial para distintos tiempos (Figura 7.4).

Este valor se puede relacionar con el número de moles transferido, a través de la siguiente ecuación:

$$Q = z \cdot N \cdot F \qquad \text{Ec. 7.1}$$

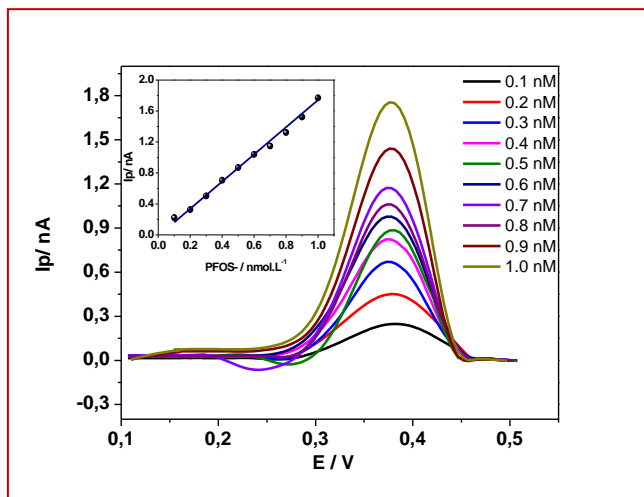
Donde  $z$  es la carga del ion transferido a través de la interfaz (en este caso  $z=-1$ ),  $N$  el número de moles y  $F$  la constante de Faraday <sup>54</sup>. Por último, con el valor del número de moles y el volumen del poro ( $V= 7 \cdot 10^{-11} \text{ dm}^3$ ) es posible estimar la concentración de PFOS en dicho poro para todos los tiempos de preconcentración. De esta manera, los valores calculados para 5, 10, 20 y 30 minutos fueron 4,4 mM, 8 mM, 18 mM y 27 mM, respectivamente. Considerando que la acumulación del analito ocurre del lado orgánico (DCE) de la interfaz, el valor de CMC para PFOS puede diferir del valor en fase acuosa. De hecho, en este caso, se forman micelas reversas, donde las cabezas polares componen el núcleo del agregado mientras que las cadenas hidrocarbonadas se orientan hacia el solvente. Se ha informado la formación de estas estructuras con diversos surfactantes perfluorados pero no así el valor de CMC para las micelas reversas <sup>55</sup>. De esta manera, las altas concentraciones estimadas en el poro pueden ocasionar la formación de micelas reversas de PFOS en la cara orgánica de la interfaz, lo cual ocasionaría la pérdida de la linealidad tal como se comentó anteriormente.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, la selección del tiempo de preconcentración resulta de un compromiso entre dos efectos: por un lado, tiempos largos permiten obtener una mejor señal analítica pero con el inconveniente de la pérdida de linealidad como se discutió. Adicionalmente estos tiempos de espera largos constituyen una importante desventaja desde el punto de vista de un sensor, ya que resultan poco prácticos. Por otro lado, los tiempos cortos producen una señal menor y una mayor imprecisión, con resultados más variables. En base a esto, se seleccionó

un tiempo igual a 5 minutos, ya que el mismo es un tiempo corto de preconcentración con una buena respuesta de corriente. De esta manera, todos los experimentos subsecuentes fueron realizados utilizando un potencial y tiempo de preconcentración iguales a 0,1 V y 5 minutos, respectivamente.

#### 7.4.5. Intervalo de concentraciones para la detección de PFOS

Se realizaron mediciones de SVPD en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,1 y 1 nM de PFOS utilizando 5 minutos de preconcentración a  $E = 0,1$  V. En la Figura 7.5 se muestran los voltagramas obtenidos bajo las condiciones mencionadas, como se puede observar, la corriente de pico se incrementa con la concentración de analito en todo el intervalo analizado.



**Figura 7.5** Respuesta de SVPD para  $PFOS^-$  en un intervalo de concentración entre 0,1 y 10 nM utilizando un arreglo de  $\mu$ TIES. Inserto: variación de la corriente de pico positivo en función de la concentración de  $PFOS^-$ . Composición de la fase acuosa:  $PFOS^- + LiCl$  10 mM. Composición de la fase orgánica: BTTPATPBCI 10 mM. Parámetros para VPD: pulso de potencial 0,005 V, amplitud 0,025 V tiempo 0,05 s, intervalo de tiempo entre pulsos 0,5 s y velocidad de barrido  $0,01 V \cdot s^{-1}$ . Tiempo de preconcentración: 5 minutos

En el inserto de la Figura 7.5 se grafica la variación de la corriente del pico positivo en función de la concentración de PFOS, obteniéndose una relación lineal en todo el intervalo de concentraciones estudiado. La ecuación de la recta de calibrado

fue:  $I_p = (1,755 \text{ nA/nM}^{-1}) C - 0,013 \text{ nA}$  con un  $R^2 = 0,9964$ , para 10 muestras. A partir de esta ecuación se calculó el límite de detección, LDD, igual a 46 pM (0,023 µg/L). Este valor es similar al informado para PFOS empleando un electrodo de oro modificado con una membrana de PVC<sup>23</sup> y 1 orden más pequeño que los informados empleando una membrana fluorada<sup>20</sup>. Cabe aclarar, para el caso del electrodo modificado, que en dicho trabajo el tiempo de preconcentración fue de 30 minutos y con el electrodo bajo rotación para aumentar el transporte de masa hacia este. El método propuesto en el presente capítulo logró los mismos resultados con un tiempo de preconcentración de 5 minutos, lo cual constituye una importante ventaja. Este menor tiempo se debería al incremento en el transporte de masa hacia la interfaz producto de la difusión radial hacia los poros por tratarse de una micro área. Otras ventajas de emplear µTIES son las bajas corrientes con las que se trabaja, lo que conduce a una menor caída de la resistencia óhmica y también se logra una menor capacitancia en la interfaz, con menores tiempos de cargado de la doble capa eléctrica, que permite mediciones más rápidas<sup>28, 56, 57</sup>. Adicionalmente, la técnica de voltametría de pulso diferencial minimiza la interferencia de la corriente no faradaica o de cargado de la doble capa eléctrica, ya que se toman dos muestras de corriente, una justo luego de aplicar el pulso de potencial y la segunda cuando termina dicho pulso. La corriente de cargado se disipa mucho más rápido que la faradaica, entonces a partir de la sustracción de la segunda medida por la primera se obtendrá una respuesta de corriente más adecuada. Esto resulta sumamente importante, ya que una mejor discriminación entre la corriente de cargado y la faradaica conduce a una mejor cuantificación del analito ya que es esta última, la que está asociada con la transferencia del analito a través de la micro interfaz<sup>58, 59</sup>. La técnica de VPD también provee una respuesta más selectiva en comparación con la voltametría de barrido lineal (VBL)<sup>42,60</sup>. Por otra parte con los métodos convencionales no electroquímicos,

se obtienen resultados más acertados con límites de detección más bajos, en el orden de los ng/L, un orden de magnitud menor al presentado en esta sección. Estos métodos son fundamentalmente cromatográficos acoplados a un espectrómetro de masa <sup>61-63</sup>. Sin embargo, los métodos convencionales requieren instrumentos caros y relativamente complicados de manejar. Otro factor importante, es que la muestra, en muchos casos, necesita de largos tiempos de preparación lo cual resulta inadecuado para una aplicación de medición in-situ. En base a los inconvenientes mencionados, la detección de PFOS utilizando una membrana microporosa resulta una alternativa sumamente atractiva con respecto a los métodos convencionales ya que es posible obtener excelentes resultados a niveles picomolares, mediante una metodología más sencilla.<sup>22,46</sup>

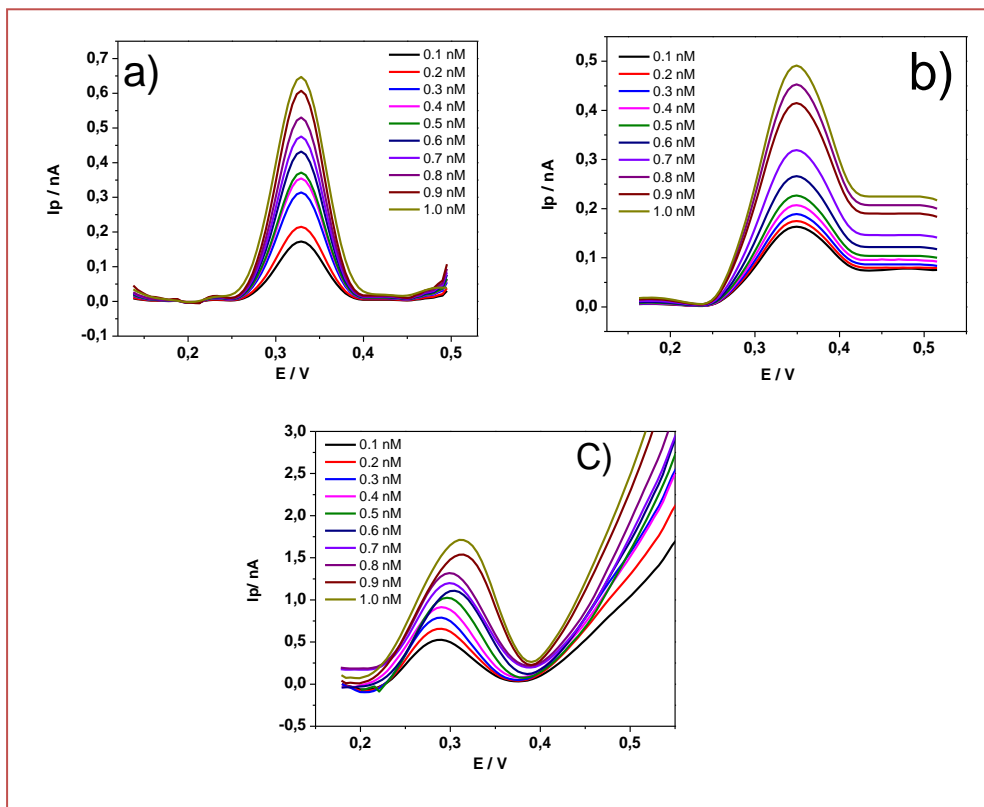
#### 7.4.6. Determinación de PFOS en muestras de agua reales

Con el fin de validar la técnica propuesta, se aplicó el procedimiento descrito en la sección precedente en muestras reales. Se seleccionaron muestras de agua de mar, agua de red y agua potable (agua de red filtrada) para validar la presente metodología de cuantificación de PFOS. Las muestras fueron tomadas directamente de la red de agua de la Ciudad de Perth, Australia, o bien del Océano Índico dependiendo del caso. Previo a la realización de los experimentos se agregó la sal LiCl en una concentración igual a 10 mM, como electrolito soporte de la fase acuosa a fin de reducir la caída óhmica <sup>64</sup>. La metodología de trabajo fue exactamente igual a la de la sección anterior. Se estudió la respuesta del sistema en un intervalo de concentraciones del analito y posteriormente se realizó una curva de calibrado graficando la corriente en función de la concentración. Para realizar las soluciones madre de PFOS en este caso, se disolvió LiCl sobre cada una de las muestras reales

y, posteriormente, el analito. Es decir, se prepararon 3 soluciones madre para cada una de las muestras (Agua de red, potable y de mar). Con dichas soluciones se inyectaron sucesivos volúmenes en la fase acuosa que contenía la misma matriz que la solución madre. Esta metodología se realizó para evaluar la respuesta del sistema y determinar posibles interferencias con componentes de la matriz que puedan afectar la correcta cuantificación de PFOS. Es decir, se realizó un estudio del efecto de la matriz. Generalmente los componentes de la matriz afectan considerablemente la detección de un analito, es por eso que resulta muy importante determinar este efecto <sup>65</sup>. Los compuestos presentes en la matriz pueden aumentar o disminuir la señal de respuesta, en este caso la corriente de pico <sup>66</sup>. En el caso de observar un aumento de corriente, el mismo puede deberse a que algún componente de la matriz también se transfiera a través de la interfaz a potenciales cercanos a los de PFOS. Por otro lado, una disminución en la señal puede deberse a que los componentes de la matriz interactúen con el analito produciendo un corrimiento en el potencial de transferencia de PFOS o directamente evitando su transferencia. Cualquiera sea la alteración en la señal, las características analíticas de la técnica se ven afectadas, siendo fundamental el estudio del efecto de matriz de forma tal de poder validar el método en muestras reales.

La Figura 7.6 muestra los resultados de SVPD siguiendo la metodología descrita anteriormente, en las muestras reales de agua analizadas. Como puede observarse, en todos los casos existe un aumento en la corriente de pico con la concentración. Otro resultado interesante fue que el potencial de transferencia también se vio afectado, en mayor o menor medida, dependiendo de cada muestra. Éste fue un resultado esperado, ya que, la presencia de ciertos tipos de iones en las muestras reales puede afectar al potencial de los electrodos de referencia de Ag/AgCl. Fundamentalmente los iones Cl<sup>-</sup>, presentes en gran exceso en el agua de mar,

determinan el valor de potencial del electrodo de referencia de la fase acuosa. Por otra parte, la presencia de iones puede afectar la transferencia de PFOS directamente, tal como se discutirá más adelante. Además se observa la aparición de un aumento de corriente en el caso del agua de red (Figura 7.6 b) y el agua de mar (Figura 7.6 c).



**Figura 7.6** Respuesta de SVPD para  $\text{PFOS}^-$  en un intervalo de concentración comprendido entre 0,1 y 10 nM en distintas muestras reales utilizando un arreglo de  $\mu\text{ITIES}$ . a) agua potable, b) agua de red, c) agua de mar. Composición de la fase acuosa:  $\text{PFOS}^- + \text{LiCl}$  10 mM. Composición de la fase orgánica: BTTPATPBCl 10 mM. Parámetros para VPD: pulso de potencial 0,005 V, amplitud 0,025 V, tiempo 0,05 s, intervalo de tiempo entre pulsos 0,5 s y velocidad de barrido  $0,01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Tiempo de preconcentración: 5 minutos

Por otra parte, los intervalos de corriente fueron menores para todas las muestras en comparación con los experimentos en agua pura a las mismas concentraciones de PFOS. Esta pérdida de señal se podría deber a la interacción del

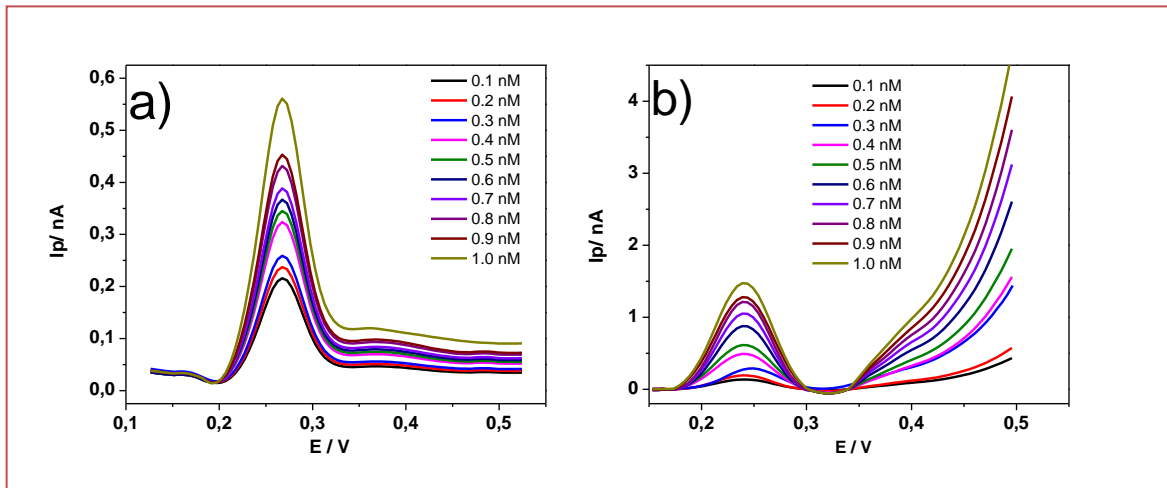
analito con algunos componentes de las muestras reales. Debido a que el agua colectada contiene materia particulada, y teniendo en cuenta que PFOS puede adsorberse en estos compuestos, se puede postular que la caída en la respuesta de corriente estaría producida por dicha adsorción del analito que impide su transferencia de una fase a la otra. El fenómeno de adsorción de PFOS en la superficie de distintos materiales es ampliamente conocido y es uno de los mayores factores de transporte de este surfactante en el ambiente.<sup>53, 67-69</sup>. Entre los principales componentes que pueden interactuar con PFOS se destacan arena, materia orgánica y diversos minerales. Estos compuestos están presentes en las muestras lo cual explicaría la pérdida de la señal mencionada anteriormente. Una posible solución a este problema sería un pretratamiento de la muestra. Un método adecuado sería la filtración o centrifugación de la muestra, de forma tal de separar la materia absorbente. El problema de implementar este paso previo sería que gran parte del analito podría ser eliminado ya que el mismo se mantendrá retenido en la materia orgánica, por lo cual se optó por seguir trabajando con las muestras sin tratamiento previo.

Además de estos experimentos con muestras a las que se agregó LiCl, se realizaron otras mediciones utilizando directamente las muestras sin el agregado de electrolito soporte. La metodología fue la misma: se prepararon soluciones madre de PFOS y se inyectaron volúmenes sucesivos de las mismas en la matriz. Se trabajó en el mismo intervalo de concentraciones de PFOS. Para este caso se estudiaron sólo las muestras de agua potable y de mar, ya que se consideraron las más importantes desde el punto de vista del efecto que tendrían sobre los seres humanos. Estudiar las muestras directamente constituye una importante ventaja operacional ya que de esta forma se podría analizar una muestra in-situ, realizando la medida directamente. Esta metodología se basa en aprovechar los iones presentes en las muestras y que los mismos funcionen como electrolito soporte. Además, el empleo de una micro interface



reduce considerablemente la resistividad del sistema permitiendo aplicar este diseño experimental. Existen antecedentes bibliográficos de esta metodología en  $\mu$ ITIES <sup>70</sup>.

En la Figura 7.7 se muestran los resultados de SVPD obtenidos al emplear muestras sin el agregado de LiCl. Como puede observarse, las corrientes de pico en este caso son menores que las registradas con las muestras que contenían electrolito soporte agregado (Figura 7.6). Para hacer un análisis estadístico más riguroso, se calcularon diferentes parámetros analíticos que se presentan en la sección siguiente.



**Figura 7.7** Respuesta de SVPD para un rango entre 0.1 y 10 nM de PFOS<sup>-</sup> en distintas muestras de agua reales sin electrolito soporte (LiCl 10 mM) en un arreglo de  $\mu$ ITIES. a) agua potable, b) agua de mar. Composición de la fase acuosa: PFOS<sup>-</sup>. Composición de la fase orgánica: BTTPATPBCI 10 mM. Parámetros para VPD: pulso de potencial 0,005 V, amplitud 0,025 V tiempo 0,05 s, intervalo de tiempo entre pulsos 0,5 s y velocidad de barrido 0,01 V.s<sup>-1</sup>  
Tiempo de preconcentración: 5 minutos

#### 7.4.7. Parámetros analíticos

La tabla 7.1 resume los diferentes parámetros analíticos determinados para la cuantificación de PFOS en diferentes muestras empleando la técnica de SVPD. Como puede observarse la mejor sensibilidad y el menor límite de detección se obtuvo para la muestra de agua ultra pura, como era de esperarse. Como se mencionó en la

sección anterior cuando se trabajó con muestras reales se evidenció una pérdida en la señal, esto se reflejó en los parámetros analíticos para estas muestras. Sorprendentemente, la sensibilidad y el LDD para el agua de mar fueron mejores en comparación al agua de red y potable. Estos resultados no esperados se pueden deber a la concentración alta de iones en el agua de mar. De esta forma, la fuerza iónica elevada presente en el agua de mar previene la adsorción de PFOS en la materia orgánica de la muestra permitiendo su transferencia y en consecuencia una mayor señal. En el caso del agua de red y potable no hay una concentración tan elevada de iones y por ello este fenómeno no se evidencia. Se han reportado diversos trabajos con este efecto. En dichos trabajos, los autores concluyen que la adsorción de PFOS disminuye a medida que la fuerza iónica del medio aumenta en presencia de cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , y  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>71,72</sup>. En todos los casos cuando se cambió de agua pura a cualquiera de las muestras reales se evidenciaron cambios en las pendientes de todas las curvas de calibrado (% de diferencia de pendiente).

	Pendiente de curva de calibrado/ $\text{nM.nA}^{-1}$	Intersección curva de calibrado/ $\text{nA}$	Intervalo lineal / $\text{nM}$	Límite de detección (LDD) / $\text{pM}$	$R^2$	% Diferencia de pendientes
Agua Ultra pura	$1,75 \pm 0,03$	$-0,013 \pm 0,02$	0,1 – 1,0	46	0,99	100
Agua potable	$0,48 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	0,1 – 1,0	125	0,99	27
Agua de red	$0,43 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	0,1 – 1,0	146	0,97	24
Agua de mar	$0,91 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,01$	0,1 – 1,0	96	0,98	52
Agua potable (sin LiCl)	$0,34 \pm 0,28$	$0,016 \pm 0,02$	0,1 – 1,0	140	0,99	19
Agua de mar (sin LiCl)	$0,81 \pm 0,08$	$-0,019 \pm 0,04$	0,1 – 1,0	180	0,96	46
Agua de mar artificial (AMA)	$0,95 \pm 0,05$	$0,020 \pm 0,02$	0,1 – 1,0	142	0,96	54

**Tabla 7.1** Parámetros analíticos calculados a partir del ajuste lineal del gráfico de corriente vs concentración para todos los voltogramas de SVPD mostrados en las Figuras 7.5 7.6 7.7 y 7.9.

Si existiera un efecto de matriz, las pendientes de las curvas de calibrado para las muestras reales deberían ser significativamente diferentes a las de agua pura. En este caso las diferencias son significativas y muestran un efecto de matriz que afecta el desempeño analítico para la detección de PFOS empleando el sistema propuesto en muestras reales. Estos resultados sugieren que sería necesaria la implementación de alguna estrategia para minimizar este efecto de forma tal de poder emplear el sistema propuesto en el presente capítulo para la detección de PFOS en muestras reales.

Con respecto al agua potable y de red, las diferencias en la pendiente entre ellas no fueron significativas, lo que sugiere que el efecto de la matriz sobre la transferencia de PFOS para estas dos muestras es similar. Estos resultados fueron los esperados ya que la composición de ambas muestras no tiene grandes diferencias. Por otra parte, si se comparan las muestras en ausencia o en presencia de electrolito soporte agregado, los resultados difieren dependiendo de la muestra. Por un lado, como era de esperarse, para el agua de mar, las diferencias en la pendiente de la curva de calibrado no son significativamente distintas. Esto último se debe a que la concentración de iones en el agua marina es uno o dos órdenes (1-0.1 M, dependiendo del ion) mayor que la que se agrega usualmente como electrolito soporte (LiCl 10 mM)<sup>45</sup>. En otras palabras, la adición de electrolito soporte en las muestras de agua de mar no tiene un efecto significativo en el desempeño analítico en la detección de PFOS con el sistema propuesto. Con respecto al agua potable, las diferencias son considerables. Como es de suponer, esta muestra no contiene la cantidad suficiente de iones que permita obviar la adición de LiCl como electrolito soporte<sup>74</sup>. De esta manera, para las muestras con agua potable resulta indispensable el agregado de electrolito soporte para mejorar la sensibilidad de la técnica. Otro parámetro importante a tener en cuenta es el LDD, con respecto a éste se observó en todos los casos de

muestras reales un valor mayor al mínimo reportado por la EPA (80 pM) pero menor, en muchos casos, al del Departamento de Salud de Australia (140 pM). La discrepancia entre estos valores de referencia, se basa en que hasta ahora no existen datos concluyentes sobre cuál es la concentración en la que los PFCs comienzan a ser tóxicos <sup>75</sup>. Sin embargo, el LDD obtenido para todas las muestras reales refuerza lo comentado anteriormente sobre la necesidad de minimizar el efecto de matriz de una manera que permita un mejor rendimiento analítico en la cuantificación de PFOS en muestras reales de agua.

Finalmente, como se puede notar en los resultados de SVPD para muestras de agua de red y agua de mar, hay un aumento importante de corriente en la rama positiva de la ventana de potencial comparado a lo observado en agua ultra pura. En el caso de agua de red ese aumento no es tan notorio ya que, en comparación al agua de mar, contiene una menor cantidad de iones. Debido a esto último, los siguientes estudios se centraron solo en agua de mar, ya que en dicho caso es donde se observan los mayores cambios. Para determinar si alguno de los componentes de la muestra de agua de mar fue responsable de este aumento de la corriente a potenciales positivos extremos, se preparó una matriz compleja que imita un agua de mar real. De esta forma, se estudió individualmente el efecto de cada componente en la respuesta electroquímica en  $\mu$ ITIES. Esta metodología se ha utilizado en diversos trabajos para simular diferentes matrices artificiales como orina <sup>76</sup> o saliva <sup>40</sup>, entre otras.

### 7.4.8. Determinación de PFOS en una matriz de agua de mar artificial (AMA)

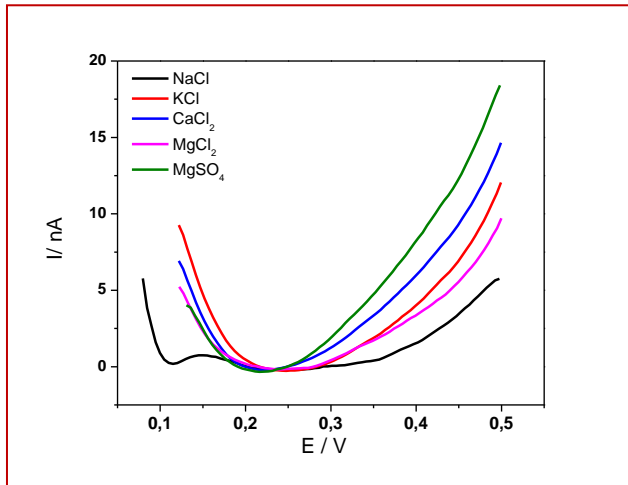
Se determinó el efecto individual de cada uno de los componentes del agua de mar en la detección de PFOS. En la tabla 7.2 se muestra la composición del agua de mar indicando las concentraciones para cada electrolito presente <sup>45</sup>.

Concentración		
	mol/ L	g / L
<b>NaCl</b>	0,48 M	28,32
<b>KCl</b>	0,01	0,77
<b>Mg Cl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O</b>	0,027	5,48
<b>MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>	0,03 M	7,39
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,01 M	1,11

---

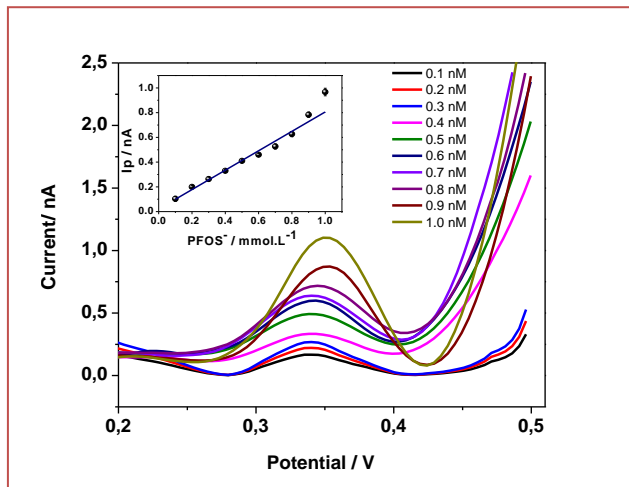
**Tabla 7.2** Principales sales inorgánicas presentes en el agua de mar junto a sus concentraciones. Valores obtenidos de la referencia <sup>45</sup>.

En la Figura 7.8 se muestran los experimentos de SVPD obtenidos al agregar, uno por vez, cada uno de los componentes mostrados en la tabla 7.2, a una fase acuosa que solamente contiene electrolito soporte. Como se observa, la presencia de iones produce una disminución de la ventana de potencial disponible comparada con lo obtenido cuando sólo está presente el electrolito soporte. Se puede concluir, entonces que estos iones son los responsables de los aumentos de corriente observados a potenciales positivos cuando se trabajó con muestras de agua de mar (Figura 7.6c - 7.7b).



**Figura 7.8** SVPD obtenido para las distintas sales inorgánicas presentes en el agua de mar utilizando un  $\mu$ ITIES. La fase acuosa contiene LiCl 10 mM + (—) NaCl, (—) KCl, (—) CaCl<sub>2</sub>, (—) MgCl<sub>2</sub>, (—) MgSO<sub>4</sub>. Composición de la fase orgánica: BTPPATPBCI 10 mM. Parámetros para VPD: pulso de potencial 0,005 V, amplitud 0,025 V, tiempo 0,05 s, intervalo de tiempo entre pulsos 0,5 s y velocidad de barrido 0,01 V.s<sup>-1</sup>

Para caracterizar completamente esta disminución en el límite positivo de la ventana de potencial y la influencia que esto tiene sobre la transferencia de PFOS a través de la  $\mu$ ITIES, se realizaron experimentos de SVPD en presencia del analito en AMA. El procedimiento fue el siguiente: a una solución de LiCl 10 mM en agua pura se le añadió cada uno de los componentes del agua de mar artificial. Posteriormente, se agregó a esta fase acuosa diferentes concentraciones de PFOS para obtener una curva de calibración similar a las mostradas en las secciones anteriores. Teniendo esto en cuenta, con este experimento es posible comparar el rendimiento analítico del PFOS en agua de mar artificial (AMA) con el de agua de mar real. Los voltamogramas SVPD utilizando esta metodología para todas las concentraciones de PFOS se muestran analizadas se muestran en la Figura 7.9.



**Figura 7.9** SVPD en una matriz de agua de mar artificial para el intervalo de concentraciones de PFOS<sup>-</sup> de 0.1 a 1 mM.

Composición de la fase acuosa: PFOS<sup>-</sup> + LiCl 10 mM + electrolitos e la tabla 7.2. Composición de la fase orgánica: BTPPATPBCI 10 mM.

Parámetros para VPD: pulso de potencial 0,005 V, amplitud 0,025 V tiempo 0,05 s, intervalo de tiempo entre

Como se puede observar, los voltamogramas muestran que las corrientes de pico aumentan con la concentración de PFOS. A partir del gráfico de corriente en función de la concentración de PFOS se realizó un ajuste lineal (inserta Figura 7.9) en el intervalo de trabajo 0,1-1,0 nM. La ecuación del ajuste lineal fue:  $I_p = (1,2148 \text{ (nA/nM}^{-1}) C - 0,021 \text{ nA}$ , utilizando 10 muestras ( $R = 0,9973$ ). Las características analíticas calculadas para la detección de PFOS en AMA fueron las esperadas (tabla 7.1). La sensibilidad fue menor en comparación con el agua ultrapura debido a la interferencia de los iones de la matriz, como se discutió anteriormente. Por otro lado, estos resultados son mejores que los obtenidos con las muestras reales de agua de mar, lo que indicaría que la materia orgánica o particulada de la muestra real afecta a la transferencia de PFOS en las micro ITIES, (la matriz AMA solo contiene sales inorgánicas).

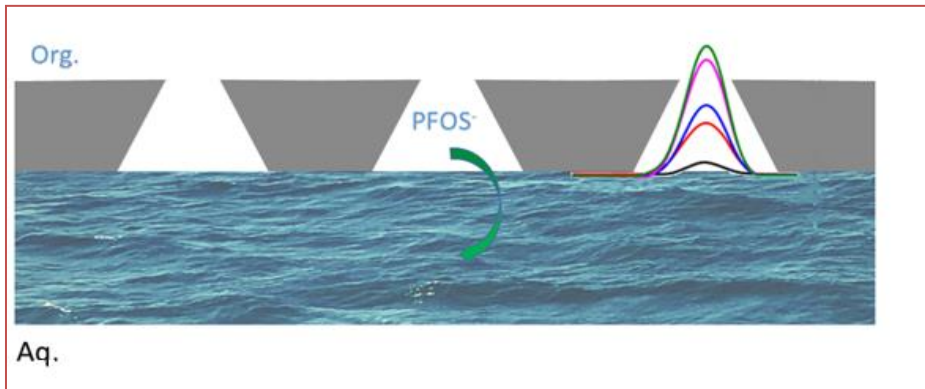
## 7.5. Conclusiones

En este trabajo, se demostró que los PFCs se pueden detectar en la interfaz líquido/líquido mediante un arreglo de  $\mu$ ITIES dispuesto en una membrana de vidrio.

Mediante la combinación de las técnicas de Stripping voltamétrico y voltametría de pulso diferencial (SVPD), se desarrolló un método con enfoque analítico ultrasensible basado en una etapa de preconcentración a potencial constante durante cinco minutos, seguido de una etapa voltamétrica que permite la detección de niveles picomolares de PFOS en solución acuosa. Se obtuvo un límite de detección de 46 pM, este valor es más bajo que los niveles de referencia de PFOS en el agua potable establecidos por la EPA de EE. UU. y el Departamento de Salud de Australia. Los resultados obtenidos para muestras reales de agua muestran que los componentes de la matriz de las muestras estudiadas afectan el rendimiento analítico del método propuesto así como las características analíticas importantes como la sensibilidad y el LDD. Por lo tanto, las estrategias para minimizar el efecto de la matriz, como por ejemplo la adición de estándar, podrían mejorar el rendimiento analítico del método propuesto. Finalmente, este trabajo abre un espacio para determinar PFOS "in situ" mediante un método rápido y sin complicaciones. Se puede proponer el uso de esta técnica como previa a los métodos convencionales como HPLC – MS, GC-MS, para seleccionar las muestras positivas, reduciendo considerablemente el tiempo de análisis de un gran número de muestras.

En la Figura 7.10 se muestra un esquema que resume la transferencia de PFOS desde la fase orgánica hacia la acuosa generando la señal analítica.





**Figura 7.10.** Resumen de la transferencia de  $\text{PFOS}^-$  desde la fase orgánica a la acuosa luego de la preconcentración. La señal que se observa es la característica para un pico de voltametría de pulso diferencial.

## 7.6. Bibliografía

- [1] P.A. Fair, B. Wolf, N.D. White, S.A. Arnott, K. Kannan, R. Karthikraj, J.E. Vena, *Environ. Res.* 171 (2019) 266–277.
- [2] Y.-J. Jeong, S. Bang, J. Kim, S.-H. Chun, S. Choi, J. Kim, M.-S. Chung, G.J. Kang, Y.-W. Kang, J. Kim, Y. Kho, Y. Joo, K.-W. Lee, *Food Chem. Toxicol.* 126 (2019) 199–210.
- [3] Y. Liu, J. Su, R.M. van Dam, K. Prem, J.Y.S. Hoong, L. Zou, Y. Lu, C.N. Ong, *Chemosphere* 171 (2017) 617–624.
- [4] N. Hansmeier, T.-C. Chao, J.B. Herbstman, L.R. Goldman, F.R. Witter, R.U. Halden, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 51–58.
- [5] N. Wu, D. Cai, M. Guo, M. Li, X. Li, *Sci. Total Environ.* 667 (2019) 594–600.
- [6] I.A. Rodríguez-Jorquera, R.C. Colli-Dula, K. Kroll, B.S. Jayasinghe, M.V. Parachu Marco, C. Silva-Sanchez, G.S. Toor, N.D. Denslow, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 1441–1452.
- [7] N. Briels, T.M. Ciesielski, D. Herzke, V.L.B. Jaspers, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 12859–12867.
- [8] B. Viada, C.I. Cámara, L.M. Yudi, *Soft Matter* 15 (2019) 2447–2462.
- [9] M. Houde, J.W. Martin, R.J. Letcher, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3463–3473.

- [10] M. Houde, A.O. De Silva, D.C.G. Muir, R.J. Letcher, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 7962–7973.
- [11] V.I. Furdui, P.W. Crozier, E.J. Reiner, S.A. Mabury, *Chemosphere* 73 (2008) 24–30.
- [12] K. Saito, E. Uemura, A. Ishizaki, H. Kataoka, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 141–146.
- [13] P. Giusto, P. Lova, G. Manfredi, S. Gazzo, P. Srinivasan, S. Radice, D. Comoretto, *ACS Omega* 3 (2018) 7517–7522.
- [14] N. Cennamo, G. D'Agostino, F. Sequeira, F. Mattiello, G. Porto, A. Biasiolo, R. Nogueira, L. Bilro, L. Zeni, *Sensors* 18 (2018) 3009.
- [15] S. Poothong, S.K. Boontanon, N. Boontanon, *J. Hazard. Mater.* 205–206 (2012) 139–143.
- [16] M. Surma, Z. Giżejowski, H. Zieliński, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120 (2015) 436–444.
- [17] C. Tang, J. Tan, C. Wang, X. Peng, *J. Chromatogr. A* 1341 (2014) 50–56.
- [18] M. Liu, G. Zhao, Y. Tang, Z. Yu, Y. Lei, M. Li, Y. Zhang, D. Li, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4241–4246.
- [19] G. Hernandez-Vargas, J.E. Sosa-Hernández, S. Saldarriaga-Hernandez, A.M. Villalba-Rodríguez, R. Parra-Saldivar, H.M.N. Iqbal, *Biosensors* 8 (2018) 25–29.
- [20] L.D. Chen, C.-Z. Lai, L.P. Granda, M.A. Fierke, D. Mandal, A. Stein, J.A. Gladysz, P. Bühlmann, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7471–7477.
- [21] T. Tran.T, J. Li, H. Feng, J. Cai, L. Yuan, N. Wang, Q. Cai, *Sens. Actuators B Chem.* 190 (2014) 745–751.
- [22] B.N. Viada, A.V. Juárez, E.M. Pachón Gómez, M.A. Fernández, L.M. Yudi, *Electrochimica Acta* 263 (2018) 499–507.
- [23] M.B. Garada, B. Kabagambe, Y. Kim, S. Amemiya, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11230–11237.
- [24] T. Osakai, Y. Yuguchi, E. Gohara, H. Katano, *Langmuir* 26 (2010) 11530–11537.
- [25] G. Herzog, S. Flynn, C. Johnson, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5693–5699.
- [26] D.W.M. Arrigan, G. Herzog, *Curr. Opin. Electrochem.* 1 (2017) 66–72.
- [27] G. Herzog, *The Analyst* 140 (2015) 3888–3896.
- [28] D.W.M. Arrigan, Y. Liu, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 9 (2016) 145–161.
- [29] Md.M. Hossain, S.N. Faisal, C.S. Kim, H.J. Cha, S.C. Nam, H.J. Lee, *Electrochem. Commun.* 13 (2011) 611–614.

- [30] H. Sakae, Y. Toda, T. Yokoyama, *Electrochem. Commun.* 90 (2018) 83–86.
- [31] G. Herzog, V. Kam, D.W.M. Arrigan, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 7204–7209.
- [32] D.W.M. Arrigan, M.J. Hackett, R.L. Mancera, *Curr. Opin. Electrochem.* 12 (2018) 27–32.
- [33] H. Sakae, M. Fujisawa, H. Nagatani, H. Imura, *J. Electroanal. Chem.* 782 (2016) 288–292.
- [34] H. Sakae, H. Nagatani, H. Imura, *Electrochimica Acta* 191 (2016) 631–639.
- [35] S. Jeshycka, H.Y. Han, H.J. Lee, *Electrochimica Acta* 245 (2017) 211–218.
- [36] B.M.B. Felisilda, A.D. Payne, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 90 (2018) 10256–10262.
- [37] J.S. Riva, D.M. Beltramo, L.M. Yudi, *Electrochimica Acta* 115 (2014) 370–377.
- [38] E. Alvarez de Eulate, J. Strutwolf, Y. Liu, K. O'Donnell, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2596–2604.
- [39] Md.M. Hossain, S.H. Lee, H.H. Girault, V. Devaud, H.J. Lee, *Electrochimica Acta* 82 (2012) 12–18.
- [40] C.J. Collins, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2344–2349.
- [41] G. Herzog, V. Beni, *Anal. Chim. Acta* 769 (2013) 10–21.
- [42] J. Strutwolf, M.D. Scanlon, D.W.M. Arrigan, *J. Electroanal. Chem.* 641 (2010) 7–13.
- [43] O. US EPA, US EPA (2015).
- [44] .J. Collins, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 81 (2013) 2348–2349
- [45] F.H. Wilt, S.C. Benson, in: *Methods Cell Biol.*, Academic Press, 2004, pp. 273–285.
- [46] P. Jing, P.J. Rodgers, S. Amemiya, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 2290–2296.
- [47] T.R. Brumleve, Janet. Osteryoung, *Anal. Chem.* 53 (1981) 988–991.
- [48] M.D. Scanlon, G. Herzog, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5743–5749.
- [49] J. Strutwolf, D.W.M. Arrigan, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1625–1631.
- [50] H.J. Lee, C. Beriet, H.H. Girault, *Anal. Sci.* 14 (1998) 71–77.
- [51] E. Alvarez de Eulate, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2505–2511.
- [52] Wiley.Com (n.d.).
- [53] R.L. Johnson, A.J. Anschutz, J.M. Smolen, M.F. Simcik, R.L. Penn, *J. Chem. Eng. Data* 52 (2007) 1165–1170.
- [54] Macmillan Int. High. Educ. (n.d.).
- [55] J.H. Jun, K. Sawada, M. Ueda, *Dyes Pigments* 61 (2004) 17–22.
- [56] B.Z. Yu, B. Huang, P.B. Li, *Microchem. J.* 52 (1995) 10–21.

- [57] E. Goh, H.J. Lee, *Rev. Polarogr.* 62 (2016) 77–84.
- [58] D.L. Langhus, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 457.
- [59] F. Scholz, *ChemTexts* 1 (2015) 17.
- [60] E. Marsili, D.B. Baron, I.D. Shikhare, D. Coursolle, J.A. Gralnick, D.R. Bond, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 3968–3973.
- [61] C. Gremmel, T. Frömel, T.P. Knepper, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 1643–1655.
- [62] C.A. Huset, K. M. Barry, *MethodsX* 5 (2018) 697–704.
- [63] M. Trojanowicz, M. Koc, *Mikrochim. Acta* 180 (2013) 957–971.
- [64] M. Senda, T. Kakiuchi, T. Osaka, *Electrochimica Acta* 36 (1991) 253–262.
- [65] W. Zhou, S. Yang, P.G. Wang, *Bioanalysis* 9 (2017) 1839–1844.
- [66] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929–3937.
- [67] Y. Yao, K. Volchek, C.E. Brown, A. Robinson, T. Obal, *Water Sci. Technol.* 70 (2014) 1983–1991.
- [68] J. Qian, M. Shen, P. Wang, C. Wang, J. Hou, Y. Ao, J. Liu, K. Li, *Chemosphere* 168 (2017) 1383–1388.
- [69] H. Campos Pereira, M. Ullberg, D.B. Kleja, J.P. Gustafsson, L. Ahrens, *Chemosphere* 207 (2018) 183–191.
- [70] J.S. Riva, V.C. Bassetto, H.H. Girault, A.J. Olaya, *J. Electroanal. Chem.* 835 (2019) 192–196.
- [71] D.Q. Zhang, W.L. Zhang, Y.N. Liang, *Sci. Total Environ.* 694 (2019) 133606.
- [72] F. Wang, K. Shih, *Water Res.* 45 (2011) 2925–2930.
- [73] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed, W.H. Freeman and Co, New York, 2010.
- [74] Water Corp. WA (n.d.).
- [75] K.E. Pelch, A. Reade, T.A.M. Wolffe, C.F. Kwiatkowski, *Environ. Int.* 130 (2019) 104851.
- [76] C.J. Collins, A. Berduque, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8102–8108.

---

# Capítulo 8

## Comportamiento electroquímico de Miltefosina

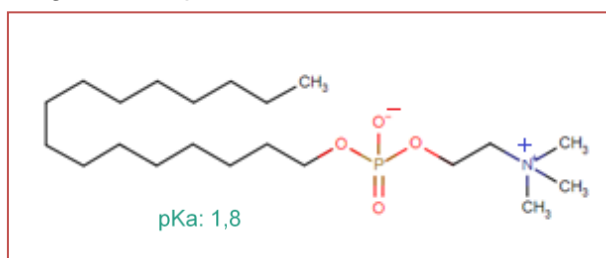
---

## 8. Comportamiento electroquímico de miltefosina

### 8.1. Introducción

En el presente capítulo se estudió el comportamiento electroquímico de hexadecilfosfolina (miltefosina, MTF) en la interfaz agua/ 1,2 dicloroetano. Esta molécula, es un tensioactivo con importantes propiedades de membrana, utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades debido a su amplio espectro farmacológico<sup>1</sup>. MTF fue inicialmente empleada como agente antineoplásico, y actualmente se utiliza para el tratamiento local de metástasis del cáncer de mama. Además, es la única droga oral indicada para la leishmaniasis visceral<sup>2</sup>.

La estructura de MTF se muestra en la Figura 8.1, como se observa, esta molécula cuenta con un grupo fosfato (rojo) y un grupo amonio cuaternario (azul). Es soluble en agua y el pH no afecta su solubilidad. Dado el carácter anfifílico de esta molécula puede autoagregarse formando micelas con una CMC promedio igual a  $10 \mu\text{M}$ <sup>2</sup>.



**Figura 8.1** Estructura química de la hexadecilfosfolina (MTF)

Esta molécula es un alquil lisofosfolípido, donde el glicerol se reemplaza por una cadena carboxílica por una esterificación directa<sup>3</sup>. Los alquilfosfolípidos sintéticos como se mencionó anteriormente, son fármacos anticancerígenos con propiedades antiproliferativas para las células. Su mecanismo de acción se basa en su incorporación en las membranas celulares, donde se acumulan e interfieren con el metabolismo de los lípidos y las vías de señalización dependientes de los lípidos. Se

internalizan en la membrana celular en determinados dominios lipídicos y causan reacciones posteriores, como la inhibición del crecimiento y la migración celular, la detención del ciclo celular, el colapso de las fibras de estrés de actina y la apoptosis <sup>4</sup>. Existen numerosos estudios que han demostrado el efecto de MTF sobre monocapas de fosfolípidos. En estos trabajos se demostró que MTF es selectiva hacia fases expandidas y no lo es para las fases más densas de las monocapas <sup>5</sup>. Este comportamiento genera más regiones desordenadas dentro de las membranas posibilitando los efectos anteriormente descritos <sup>6</sup>. En otras palabras, una partición selectiva podría ser la responsable del cambio de equilibrio de fases y las modificaciones de los patrones de superficie en monocapas de fosfolípidos <sup>7</sup>. Además, esto concuerda con los estudios teóricos de la interacción de MTF con monocapas <sup>8</sup>.

Por otra parte, el uso de MTF como agente quimioterapéutico, en administración peroral o intravenosa está limitado por su efecto nocivo sobre las células epiteliales del tracto gastrointestinal y la hemólisis de eritrocitos respectivamente<sup>9</sup>. Un enfoque prometedor para superar las consecuencias negativas de la administración sistémica de MTF es el encapsulamiento de la droga en liposomas<sup>10</sup>, en nanopartículas metálicas<sup>11</sup> o micelas de copolímeros<sup>12,13</sup>. Las micelas poliméricas (MP) se consideran una de las alternativas potenciales más sólidas, ya que varias formulaciones micelares han sido evaluadas clínicamente como portadoras de medicamentos contra el cáncer <sup>14</sup>. Entre las ventajas de este método se destacan: solubilización de drogas hidrofóbicas y protección de fármacos, eliminación de efectos adversos, optimización de parámetros farmacocinéticos (evitando la captación del sistema reticuloendotelial, RES), mejorando el tiempo de circulación y la orientación pasiva hacia el tumor por el mejoramiento del efecto de permeabilidad y retención (EPR), entre otras <sup>15</sup>.

Existen diversas técnicas de cuantificación de miltefosina <sup>16,17,18</sup>. Sin embargo algunas de ellas presentan muchas desventajas ya que se trata de métodos complejos

y generalmente muy costosos. Además, MTF no posee grupos cromóforos, con lo cual su cuantificación por métodos espectroscópicos no es viable y, por otro lado, el método más común de cuantificación de fosfocolinas, a través de la determinación de fosfatos, no siempre es factible dado que el medio generalmente empleado para sus preparados es en buffer fosfato. Por lo tanto una cuantificación electroquímica sería una muy buena alternativa a los métodos ya existentes.

Considerando que MTF es un surfactante zwitteriónico con diversas aplicaciones, resulta interesante realizar un estudio de su comportamiento electroquímico en la interfaz agua/1,2 dicloroetano, de forma tal de contribuir al conocimiento de esta droga desde un nuevo enfoque. En base a lo mencionado, en este capítulo se analizó la transferencia de MTF a través de la interfaz agua/ 1,2 dicloroetano mediante voltametría cíclica, para estudiar las propiedades del fármaco tanto en solución como en superficie. Adicionalmente, se desarrolló una metodología para poder cuantificar MTF en ITIES, obteniendo una respuesta lineal de la corriente con respecto a la concentración de fármaco dentro de un determinado intervalo. Por último, se realizaron experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica para caracterizar sus propiedades de adsorción, y de esta manera, corroborar los resultados obtenidos por voltametría cíclica. Los resultados de este capítulo ayudan a concretar algunos de los objetivos planteados en esta tesis, extendiendo el estudio de surfactantes en interfaces líquidas.

## 8.2. Objetivos

### 8.2.1. General

Caracterizar la transferencia electroquímica y la adsorción del surfactante hexadecilfosfocolina (MTF) en interfaces líquido/líquido con el objeto de desarrollar una metodología para lograr su cuantificación.



### 8.2.2. Específicos

- Determinar las condiciones experimentales para el estudio de MTF en ITIES;
- Estudiar la transferencia de MTF desde un enfoque básico en interfaces líquidas para dilucidar mecanismos de transferencia de este fármaco;
- Evaluar la posibilidad de desarrollar una metodología electroquímica para la cuantificación de MTF en solución;
- Realizar experimentos de EIE para caracterizar los procesos la adsorción de miltefosina en la interfaz agua/ 1,2-dicloroetano.

## 8.3. Parte experimental

Se realizaron experimentos de voltametría cíclica (VC) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE). El intervalo de frecuencias experimental fue 0,1-2000 Hz, la amplitud de la perturbación ac fue 10 mV y se aplicaron diferentes potenciales dc constantes, E. Se realizaron gráficos de capacitancia (C) en función de E a un valor de frecuencia seleccionada a partir de los gráficos de Bode (se eligió el valor de frecuencia a la cual el ángulo de fase tiene su máximo valor, próximo a 90°).

## 8.4. Resultados

### 8.4.1. Comportamiento voltamétrico de miltefosina

En la Figura 8.2 se observan los voltagramas del fármaco MTF a diferentes concentraciones. Como puede notarse, si bien se define un sistema de pico positivo y

negativo alrededor de 0,65 V y 0,55 V, respectivamente, la señal electroquímica es muy baja y muy poco sensible a los cambios en la concentración de MTF. El ruido eléctrico observado en la señal de corriente es característico de los sistemas que involucran moléculas surfactantes debido a la inestabilidad que producen en la interfaz. Esta señal podría atribuirse a la transferencia de MTF desde la fase acuosa a la orgánica durante el barrido positivo y viceversa para el barrido inverso, sin embargo esta respuesta electroquímica resulta poco útil para fines analíticos. Por esta razón, se optó por ampliar el intervalo de concentraciones de trabajo a fin de evaluar mejoras en la señal.

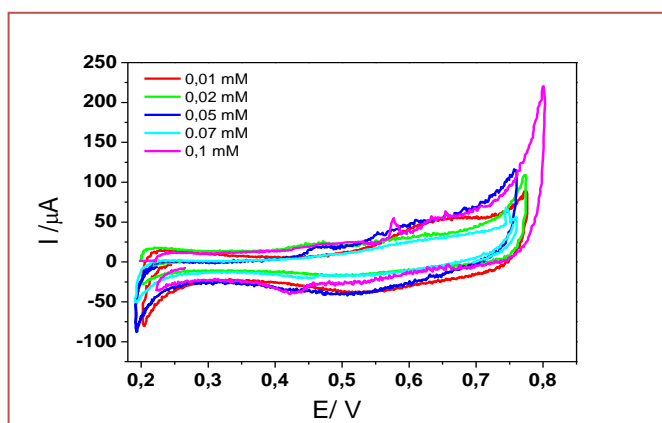


Figura 8.2 Voltametría cíclica para diferentes concentraciones de MTF en la fase acuosa. Composición de la fase acuosa: MTF 0,01 a 0,1 mM + KCl 10 mM. Composición fase orgánica: TPnATCIPhB 10 mM.  $v = 0.050 \text{ V.s}^{-1}$

#### 8.4.2. Efecto de la concentración, pH y cationes del electrolito soporte de la fase acuosa sobre los perfiles voltametricos de MTF

En la Figura 8.3 se muestran los voltagramas obtenidos en presencia del fármaco MTF en la fase acuosa utilizando tres cationes diferentes en la sal que constituye el electrolito soporte de la fase acosa:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Li}^+$ . Se pueden observar cambios significativos en la forma de los voltagramas al variar dichos cationes. En el caso de los voltagramas realizados en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Li}^+$ , se observan los picos de corriente negativa en  $E_p^- = 0,45 \text{ V}$  y  $E_p^- = 0,35 \text{ V}$ , respectivamente, pero no se

definen adecuadamente los correspondientes al barrido positivo durante el cual ocurre la transferencia de MTF desde la fase acuosa a la orgánica. En estas condiciones, los perfiles I/E muestran una importante componente resistiva acoplada a la corriente faradaica, en la cual quedan solapados los picos de corriente de barrido positivo de potencial. Por el contrario, cuando se emplea  $K^+$  como contra ion del electrolito acuoso, se observa una buena definición de los picos en ambos barridos de potencial:  $E_p^+ = 0,55 \text{ V}$  y  $E_p^- = 0,42 \text{ V}$ . En función de estos resultados se demuestra que el comportamiento electroquímico de MTF depende en gran medida del catión empleado en el electrolito soporte presente en la fase acuosa, lo cual era de esperar, ya que éste determina el grado de estructuración de las moléculas de MTF, en el caso que éstas se encuentren adsorbidas en la interfaz. Si se parte de la hipótesis de que la transferencia de MTF, a concentraciones mayores a la CMC, a través de la interfaz agua/1,2 DCE involucra una adsorción previa, el grado de estructuración de las moléculas adsorbidas afectará la respuesta electroquímica, modificando la forma de los voltogramas y la corriente de los picos. Teniendo en cuenta esto, y considerando que los cationes interaccionan de distinta manera con los grupos fosfatos de MTF, pueden explicarse los resultados de la Figura 8.3 de la siguiente manera: la mayor estructuración de las moléculas de MTF en presencia de  $Ca^{2+}$  viene dada por la mayor capacidad de este catión de neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato de MTF, lo cual ocasiona una disminución de las fuerzas de repulsión laterales en la monocapa y en consecuencia, un aumento de las fuerzas de interacción de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas; en el caso de  $Li^+$ , se observa un efecto similar debido a que su tamaño reducido le permite penetrar dentro de las cabezas polares y neutralizar la carga; por último, para  $K^+$ , con una relación carga/tamaño mucho menor a  $Ca^{2+}$  y  $Li^+$ , su interacción con los grupos polares de MTF es menor. Entonces el grado de estructuración producido por los cationes estudiados sobre la monocapa de MTF, sigue el siguiente orden:  $Ca^{2+} > Li^+ > K^+$ . Este comportamiento ha

sido reportado en diversos trabajos<sup>19,20</sup>. En base a estos resultados, se seleccionó a  $K^+$  como catión del electrolito soporte de la fase acuosa para la caracterización del comportamiento electroquímico de MTF en la interfaz agua/ 1,2- DCE.

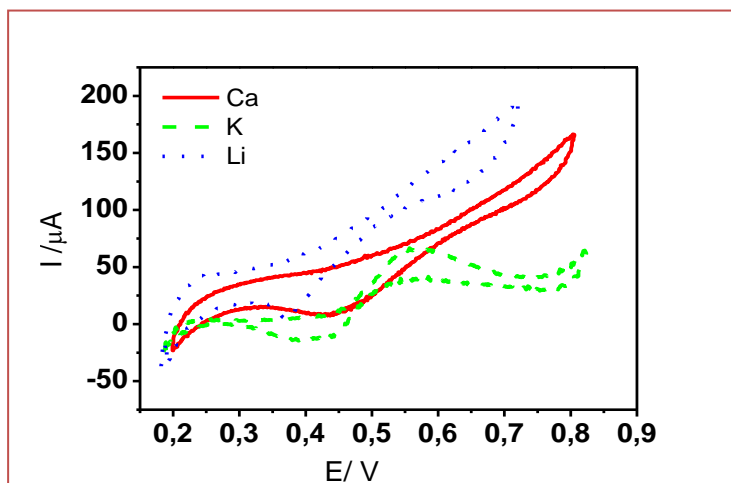


Figura 8.3. Voltametría cíclica para MTF en la interfaz agua /1,2-DCE. Composición fase de la acuosa: MTF 0,4 mM + (...) LiCl, (- -) KCl y (—) CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Composición de la fase orgánica: TPnATCIPhB 10 mM.  $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Una vez seleccionada la sal de la fase acuosa, se evaluó el efecto del pH sobre la respuesta electroquímica de MTF. Teniendo en cuenta que este fármaco es zwitteriónico (Figura 8.1), es de esperar que al variar el valor de pH de la fase acuosa ocurran cambios en la carga de la molécula y, en consecuencia, se modifique la respuesta voltamétrica. En la Figura 8.4 se observan voltagramas registrados para distintos valores de pH de la fase acuosa en presencia de MTF en una concentración constante e igual a 0,4 mM.

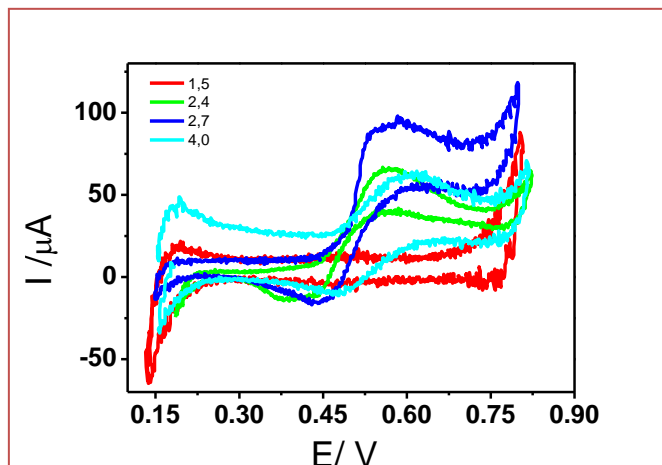


Figura 8.4. Voltametría cíclica aplicada a la interfaz líquido/líquido en presencia de MTF a diferentes valores de pH en fase acuosa. Composición de la fase acuosa: MTF 0,4 mM + KCl 10 mM, a pH: (—) 1,5, (—) 2,4, (—) 2,7, y (—) 4,0. Composición de la fase orgánica: TPnATClPhB 10 mM.  $v = 0.050 \text{ V.s}^{-1}$

Como se puede observar, los cambios en el pH en la fase acuosa conducen a cambios en la forma de los perfiles voltamétricos y en los valores de las corrientes de pico. El valor de pKa informado para MTF es 1,8 , con lo cual se esperaría que, a medida que disminuya el pH aumente la proporción de grupos fosfatos protonados (neutros) y, por lo tanto, la fracción de moléculas con carga positiva neta dada por el grupo amino. Si el proceso de transferencia de MTF ocurriese por un mecanismo directo controlado por difusión, sería de esperar, entonces, que la corriente aumente a medida que disminuye el pH. Sin embargo esta tendencia sólo se observa al pasar de pH = 4,0 a pH =2,7, pH al cual se alcanza el máximo valor de corriente de pico, mientras que la tendencia opuesta se observa al continuar disminuyendo el pH a valores iguales a 2,4 y 1,5, obteniéndose prácticamente la señal de base para el último valor. Por lo tanto, un simple mecanismo difusional no explica los resultados obtenidos a diferentes valores de pH. La dependencia de la señal electroquímica con el pH se puede explicar considerando el comportamiento superficial de MTF. Este fármaco, tal como se mencionó, es un surfactante con lo cual se esperaría que se encuentre adsorbido en la interfaz líquido/ líquido. En estas condiciones, el fármaco formaría una monocapa sobre dicha interfaz, cuya estabilidad dependerá, por un lado de las interacciones laterales de la cadena hidrocarbonada del fármaco, y por otro de las interacciones de las cabezas polares orientadas hacia la fase acuosa. Cambios en las

condiciones del medio pueden generar variaciones en estas interacciones y en consecuencia afectar la compactación de la monocapa <sup>21</sup>. Entonces, si la transferencia de carga a través de la interfaz ocurre previa adsorción de MTF, el grado de compactación de la monocapa y su estabilidad tendrán un efecto directo sobre la corriente de transferencia. Este efecto ocurrirá, si esta transferencia involucrara: a) el pasaje de MTF adsorbida hacia alguna de las fases, o b) la transferencia de otro ion que deba atravesar la película adsorbida, o bien c) la formación de un “par iónico” interfacial entre los grupos polares de MTF adsorbida y alguno de los iones de los electrolitos soporte. En cualquiera de estas tres posibilidades planteadas, sería de esperar una menor corriente faradica a medida que aumenta la compactación y estabilidad de la monocapa. La cabeza polar de MTF contiene un grupo fosfato con carga negativa y una amina cuaternaria, similar a la fosfatidilcolina, cargada positivamente de manera permanente. Se ha reportado que fosfatidilcolina se mantiene como zwitterion en un intervalo de pH de 3 a 12 <sup>22</sup>, con lo cual se podría postular el mismo comportamiento para MTF, ya que cuenta con el mismo grupo polar. Esto explicaría por qué se observa mayor corriente en las condiciones de pH de 2,66 con respecto a 3,99. Sin embargo si el pH continúa disminuyendo la corriente de pico también lo hace (pH= 2,4, 1,5), tal como se mencionó anteriormente. Esto se debería a que en estas condiciones la compactación de la monocapa es mayor, producto de interacciones no electrostáticas como las uniones de puente hidrógeno entre los grupos fosfato de las cabezas polares, comportamiento ya reportado <sup>23</sup>. Estas interacciones aumentan a medida que el pH se asemeja al pKa <sup>24</sup>, favoreciendo aún más la estabilidad de la monocapa. Una mayor compactación se traducirá en una menor señal electroquímica (corriente de respuesta) ya que las moléculas de MTF adsorbidas fuertemente presentan una mayor energía de transferencia. En las condiciones de pH = 1,5, la disminución en la corriente también podría atribuirse a una hidrólisis de la molécula con lo cual la señal se vería afectada por este motivo <sup>4</sup>.

### 8.4.3. Efecto de la velocidad de barrido

Considerando los resultados obtenidos previamente se continuó con el estudio de MTF a  $\text{pH} = 2,66$  y cloruro de potasio como electrolito soporte de la fase acuosa. En la Figura 8.5a, se muestran los barridos de potencial a diferentes velocidades desde  $0,010 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  hasta  $0,200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . La separación de potenciales de pico positivo y negativo es mayor a  $0,06 \text{ V}$  en todos los casos y aumenta conforme aumenta la velocidad de barrido, sugiriendo un mecanismo de transferencia con control cinético<sup>25</sup>. En las Figuras 8.5b y c se muestra la relación de la corriente de pico y el potencial de pico negativo con la velocidad de barrido, respectivamente. Con respecto a la Figura 8.5b se observa que la corriente varía linealmente con  $v$ , indicando un proceso de adsorción previo a la transferencia de MTF a través de la interfaz. Por otra parte, del análisis de las Figuras 8.5a y c, se puede postular que dicha adsorción es fuerte, y por lo tanto la desorción de las moléculas de MTF y su posterior transferencia a la fase orgánica, requieren de mayores potenciales a medida que aumenta la velocidad de barrido, produciendo un corrimiento en los potenciales de transferencia, hacia valores más negativos, demostrando un control cinético en la desorción y posterior transferencia. Por otra parte en la condición de  $v = 0,010 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  se observa un hombro segundo pico en simultáneo con una disminución de la corriente en el barrido negativo, proceso que se comentará posteriormente.

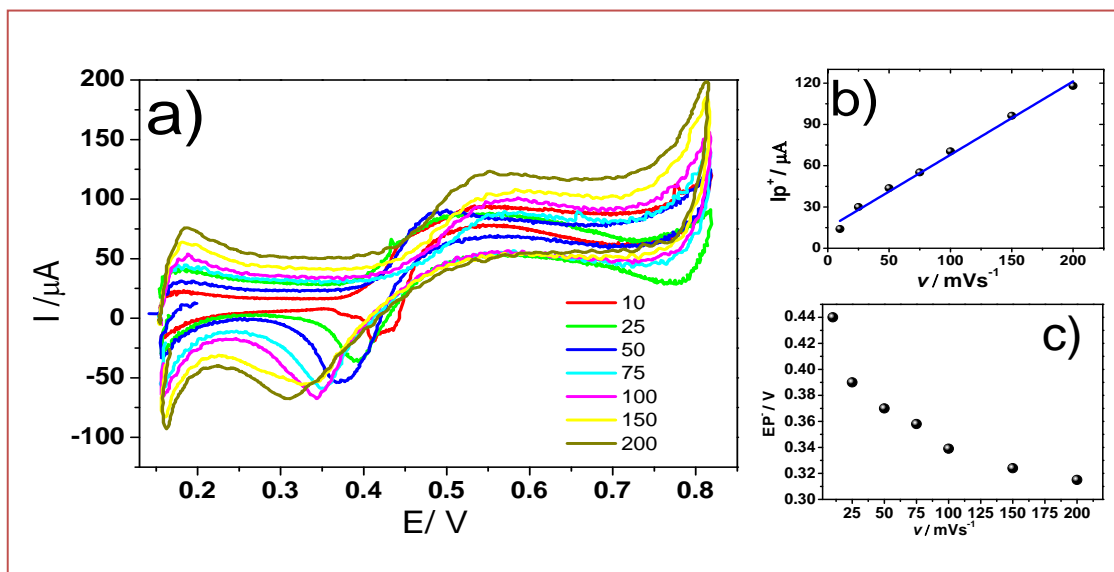


Figura 8.5 a) Voltametría cíclica de MTF a diferentes velocidades de barrido. b) Variación de la corriente de pico negativa en función de la velocidad de barrido. c) Variación del potencial de pico negativo ( $E_p^-$ ) en función de la velocidad de barrido. Composición de la fase acuosa: MTF 0,4 mM + KCl 10 mM pH = 2,66. Composición de la fase orgánica: TPnATCIPhB 10 mM

En base a estos resultados, se propone el siguiente proceso interfacial: las moléculas de MTF parcialmente cargadas se adsorben espontáneamente en la interfaz y sufren procesos de reordenamiento interfaciales durante el barrido positivo de potencial. Luego el anión del electrolito de la fase orgánica (TPhCIB<sup>-</sup>) se transfiere hacia la fase acuosa, facilitado por la presencia de MTF adsorbida en la interfaz, y permanece asociado a los grupos polares de MTF, formando un “par iónico” adsorbido. Este proceso sería el responsable de la corriente positiva observada durante el barrido directo de potencial. En el barrido inverso, este “par iónico” se disocia y las moléculas de MTF son transferidas o desorbidas hacia la fase acuosa, mientras que el anión TPhCIB<sup>-</sup> también es transferido desde la fase acuosa a la fase orgánica, dando lugar al pico de desorción agudo observado en barrido inverso. De esta manera se explicaría el comportamiento interfacial de MTF y el efecto que las variables como el pH y el electrolito soporte de la fase acuosa producen sobre la respuesta electroquímica de este fármaco. Es decir, cambios en la composición de la fase acuosa modifican las interacciones entre las moléculas de MTF y, en



consecuencia, se producen cambios en la compactación y estabilidad de la película, modificando la transferencia de carga, lo que se traduce en cambios en la forma de los voltagramas.

#### 8.4.4. Efecto del electrolito soporte de la fase orgánica

Se realizaron experimentos adicionales para corroborar el mecanismo propuesto. En la Figura 8.6 se comparan dos voltagramas obtenidos para la misma concentración de MTF, variando el electrolito soporte de la fase orgánica: Tetrakis(4-clorofenil) borato de potasio (TPhATCIPB) o dicarbóil cobaltato de tetrafenil arsonio (TPhAsDCC). De esta manera, si la corriente voltamétrica está asociada a la adsorción/ desorción de un “par iónico” interfacial entre el anión del electrolito orgánico y MTF, tal como se describió en la sección anterior, sería de esperar que la respuesta electroquímica se modifique en presencia de TCIPB<sup>-</sup> o DCC<sup>-</sup> en la fase orgánica. Como puede observarse, la posición de los picos voltamétricos depende de la naturaleza del electrolito orgánico, evidenciándose cambios en el potencial de pico positivo  $E_p^+ = 0,615 \text{ V}$  (DCC<sup>-</sup>) y  $E_p^+ = 0,489 \text{ V}$  (TPhCIB<sup>-</sup>). Del mismo modo, hay un corrimiento del potencial de pico negativo hacia valores más positivos en el caso de DCC<sup>-</sup> respecto a TPhCIB<sup>-</sup>. Como se mencionó anteriormente, tal efecto puede deberse a interacciones de “pares iónicos” entre MTF cargada positivamente y el anión del electrolito orgánico. Se han reportado comportamientos similares para moléculas cargadas positivamente como aminoácidos<sup>26</sup>. Los resultados de este experimento indican que el par iónico más estable es el formado por el anión tetrakis, esto se deduce del análisis de los potenciales de transferencia. Aparentemente, de acuerdo a la bibliografía la estabilidad del “par iónico” disminuye con el tamaño del anión<sup>27</sup>, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados ya que el anión DCC<sup>-</sup> es el más voluminoso.

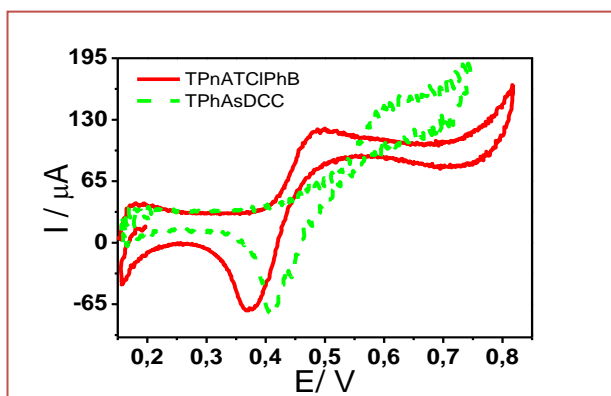


Figura 8.6 Comparación entre electrolitos soporte de la fase orgánica: TPnATCIPhB (—) y (---) TPhAsDCC. Composición de la fase acuosa: MTF 0,7 mM + KCl 10,0 mM, pH = 2,66  
Composición de la fase orgánica: (—) TPnATCIPhB 10 mM, (---) TPhAsDCC 10 mM  
 $v = 0,050 \text{ V.s}^{-1}$

#### 8.4.5. Efecto de la concentración de MTF

En la Figura 8.7 se muestran los voltagramas obtenidos para distintas concentraciones de MTF en la fase acuosa en las condiciones de fase acuosa seleccionadas previamente y empleado TpnATCIPhB como electrolito soporte de la fase orgánica. El objetivo de estos experimentos fue, por un lado continuar, con la caracterización del mecanismo de transferencia de MTF en la interfaz agua/ 1,2- DCE y, por el otro, encontrar una relación entre la concentración del fármaco y la corriente de pico, de forma tal de diseñar una metodología de cuantificación de MTF. Como puede observarse, no hay una relación lineal entre la corriente del barrido positivo y la concentración de MTF (ver gráfico inserto en la Figura 8.7). Nagatan y col. han informado comportamientos similares para moléculas orgánicas catiónicas en ITIES<sup>28</sup>.

Esta respuesta en la  $I_p$  puede deberse al mecanismo de transferencia de este fármaco, ya que inicialmente, al aumentar la concentración, aumenta la difusión de las moléculas del fármaco desde el seno de la solución hacia la interfaz y, en consecuencia, aumenta la cantidad de moléculas que se absorben produciendo finalmente una mayor corriente. Cuando se alcanza una concentración alta, la interfaz

se encuentra cubierta completamente (saturada), con lo cual cambios en la concentración de fármaco no producen cambios evidentes en la corriente voltamétrica.

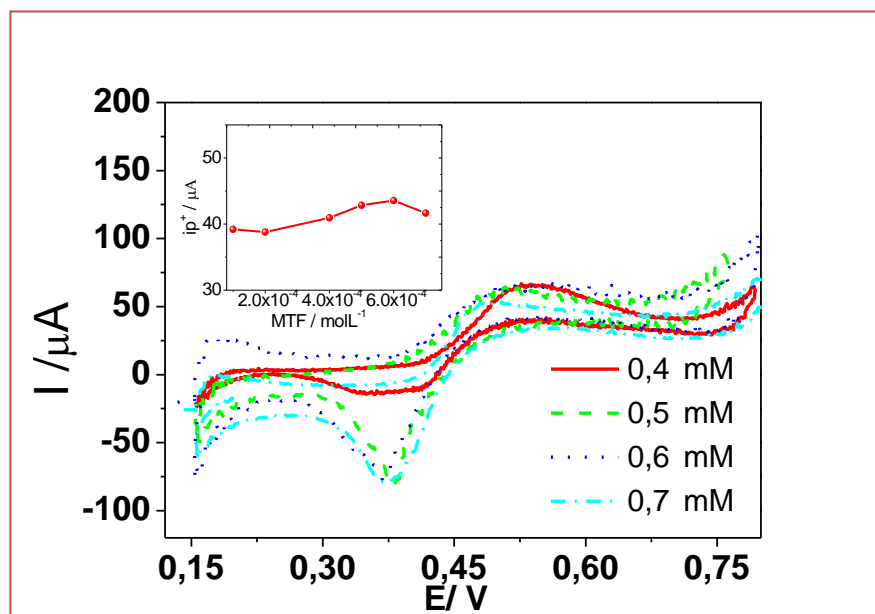


Figura 8.7. Voltametría cíclica a diferentes concentraciones de MTF. Composición de la fase acuosa: MTF (—) 0,4 mM, (---) 0,5 mM, (· · ·) 0,6 mM, (- · - ·) 0,7 mM + KCl 10 mM, pH = 2,66. Composición de la fase orgánica: TPnATCIPhB 10 mM. Inserto: variación de la corriente de pico durante el barrido directo en función de la concentración de MTF.  $\nu = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Por otra parte, en la Figura 8.8 se muestra el comportamiento de MTF a distintas concentraciones empleando, en este caso, TPhAsDCC como electrolito soporte de la fase orgánica. Como se observa la respuesta difiere de los resultados que se muestran en la Figura 8.7, obteniéndose, en estas condiciones una variación más clara de la corriente con la concentración de MTF. La respuesta para la variación de  $I_p$  con la concentración de MTF puede explicarse considerando un primer intervalo de concentraciones entre 0,1 y 0,5 mM, en el cual la corriente es muy pequeña e independiente de la concentración, esta respuesta estaría indicando que existe una concentración “umbral” necesaria para que el proceso electroquímico tenga lugar. Puede suponerse que, a estos valores de concentración de MTF pequeños la cantidad adsorbida es muy baja. Luego hay una región intermedia de concentraciones,

comprendida entre 0,5 y 0,8 mM, en la cual la respuesta de la corriente varía casi linealmente con la concentración de MTF, y podría postularse como intervalo óptimo de concentraciones para su cuantificación. Para concentraciones mayores a 0,8 mM, la corriente es independiente de la concentración de MTF, indicando una saturación de la interfaz, la cual no admite posterior adsorción de moléculas de MTF<sup>29</sup>.

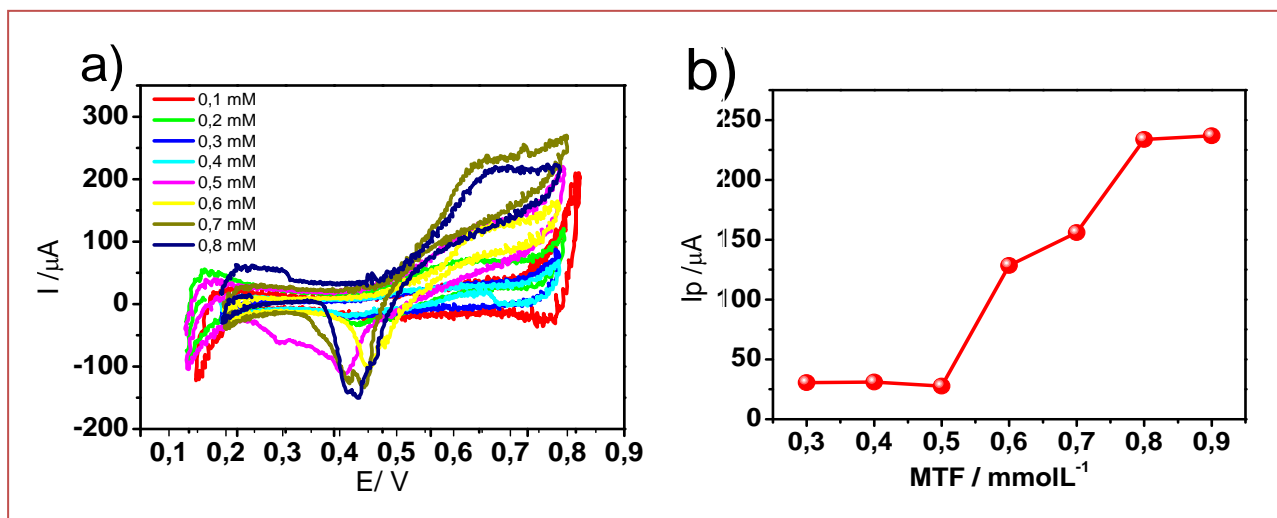


Figura 8.8. a) Voltametría cíclica realizada a diferentes concentraciones de MTF. Composición de la fase acuosa: MTF + KCl 10 mM, pH = 2,66. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM. b) variación de la corriente de pico del barrido positivo en función de la concentración de MTF.  $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$

#### 8.4.6. Efecto del tiempo de pulso y del potencial de corte

Con el objetivo de corroborar en mayor detalle el proceso de adsorción se realizaron experimentos de pulsos de potencial a 0,650 y 0,750 V, durante diferentes tiempos previos a la aplicación del barrido de potencial. Se seleccionaron estos dos potenciales ya que en los mismos se observa el máximo valor de corriente positiva. En la Figura 8.9 se muestran los resultados de estos experimentos para una concentración constante de MTF igual a 0,70 mM. Se graficaron los potenciales de pico obtenidos en el barrido negativo de potencial, luego de la aplicación del pulso a

distintos tiempos, en función de la velocidad de barrido. Como se puede observar, en todos los casos ocurre un corrimiento del  $E_p^-$  hacia valores más negativos a medida que aumenta la velocidad de barrido inverso, comportamiento similar al mostrado en la Figura 8.5a. Este efecto se hace más evidente cuando aumenta el tiempo de pulso (pendiente más negativa), lo cual indica que existen interacciones atractivas entre las moléculas de MTF adsorbidas. Es decir, a medida que aumenta el tiempo de pulso, aumenta la cantidad de moléculas de MTF adsorbidas, y este aumento de moléculas genera una película más fuertemente adsorbida, requiriéndose potenciales cada vez más negativos para su desorción, lo cual necesariamente, es consecuencia de interacciones atractivas. Este corrimiento de potencial es característico en los procesos cuasi-reversibles de adsorción/ desorción, lo cual refuerza la hipótesis antes planteada.

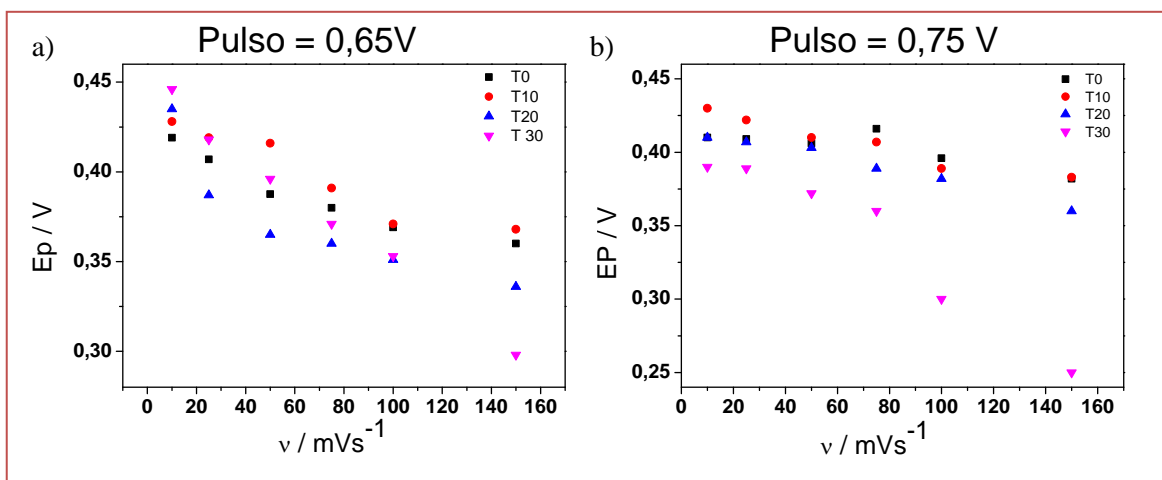


Figura 8.9 a) Variación del potencial de pico ( $E_p^-$ ) en función de la velocidad de barrido ( $v$ ) aplicando un pulso a 0,65 V durante 0 (■), 10 (●), 20 (▲) y 30 (▼) segundos. b) variación del potencial de pico ( $E_p^-$ ) en función de la velocidad de barrido ( $v$ ) aplicando un pulso a 0,75 V durante 0 (■), 10 (●), 20 (▲) y 30 (▼) segundos. Composición de la fase acuosa: MTF 0,7 mM + KCl 10 mM, pH = 2,66. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.

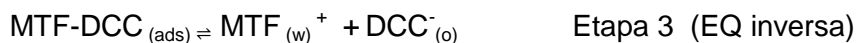
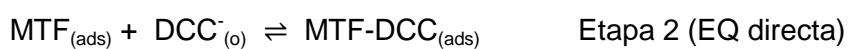
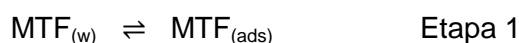
Considerando estos resultados se plantearon experimentos de voltametría cíclica a diferentes potenciales de corte. Potenciales de corte más positivos aumentarían la cantidad de moléculas adsorbidas en la interfaz y, de existir interacciones atractivas entre éstas, deberían observarse corrimientos hacia potenciales más negativos de los picos de desorción ( $E_p^-$ ). En la Figura 8.10 se

muestran perfiles de corriente en función de E a diferentes potenciales de corte, E registrados a una velocidad de barrido lenta ( $0,01 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Como se puede observar, al aumentar  $E_\lambda$ , el  $E_p^-$  se corre hacia valores más negativos. Esto refuerza la hipótesis de las interacciones positivas entre las moléculas de MTF. A bajas velocidades de barrido y altos potenciales de corte, donde la acumulación interfacial de MTF y de  $\text{DCC}^-$  es importante en la fase acuosa y orgánica, respectivamente, ocurre la neutralización de las moléculas del fármaco con los iones  $\text{DCC}^-$ . Este “par iónico” se mantiene adsorbido hacia ambos lados de la interfaz, con las cabezas polares de MTF orientadas hacia la fase acuosa y sus cadenas hidrofóbicas hacia la orgánica. De esta manera el par iónico [MTF-DCC] aumentaría su estabilidad en valores de potencial de corte más positivos, requiriendo entonces una mayor energía para la desorción de MTF hacia la fase acuosa o del  $\text{DCC}^-$  hacia la orgánica, conduciendo a los cambios observados de  $E_p^-$ .

Por otra parte para  $E_\lambda = 0,70 \text{ V}$  y  $E_\lambda = 0,75 \text{ V}$ , los voltogramas muestran la aparición de un segundo pico en el barrido negativo, simultáneamente con una disminución de la corriente del primer pico. Este segundo pico no fue descrito anteriormente en este capítulo, debido a que no es tan notorio a velocidades de barrido más altas. Sin embargo, si se observa el voltograma medido a  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  de la Figura 8.5 se pueden distinguir dos picos de corriente negativas. En el caso de la Figura 8.10 se observa que el primer pico se ve favorecido a  $E_\lambda$  más bajos mientras que el segundo a  $E_\lambda$  más altos, donde el recubrimiento interfacial es mayor y la monocapa más estable. El corrimiento de potencial es más notorio en el segundo proceso ya que en este caso, los potenciales de pico para  $E_\lambda = 0,70 \text{ V}$  y  $E_\lambda = 0,75 \text{ V}$  son  $E_{p2}^- = 0,35 \text{ V}$  y  $E_{p2}^- = 0,29 \text{ V}$ , respectivamente. En las mismas condiciones se observan los potenciales  $E_{p1}^- = 0,40 \text{ V}$  y  $E_{p1}^- = 0,37 \text{ V}$  para  $E_\lambda = 0,70 \text{ V}$  y  $E_\lambda = 0,75 \text{ V}$ , respectivamente. Es decir, para el segundo proceso el  $\Delta E_{p2} = E_{p2}^{E_\lambda=0,70} - E_{p2}^{E_\lambda=0,75} = 0,06 \text{ V}$  mientras que para el primero es igual  $0,03 \text{ V}$ . Una posible hipótesis para

explicar la aparición de este segundo pico a altos valores de  $E\lambda$  y bajos valores de velocidad de barrido, es la siguiente: a medida que avanza el potencial durante el barrido positivo los "pares iónicos" interfaciales sufren reordenamientos generándose dominios con diferente conformación y diferente grado de estabilización. Los dos picos observados en el barrido negativo corresponden entonces a la desorción de los adsorbatos de diferentes conformación interfacial.

Luego de analizar la respuesta voltamétrica en función de las diferentes variables experimentales (pH, composición de los electrolitos orgánico y acuoso, concentración de MTF, velocidad de barrido, potencial de corte y tiempo y potencial de pulsos), podemos postular un mecanismo de transferencia de carga que involucra la adsorción previa de MTF con las siguientes etapas:



La etapa 1 ocurre a circuito abierto, antes de iniciar el barrido de potencial, debido a la naturaleza anfifílica de MTF. Esta etapa es altamente dependiente del tiempo que transcurre desde que se ponen en contacto las dos fases hasta que se inicia el barrido.

Al aplicar el barrido de potencial, ocurre la transferencia electroquímica (EQ) del anión  $\text{DCC}^-$  desde la fase orgánica hacia la región interfacial donde se encuentran las cabezas polares de MTF orientadas hacia la fase acuosa (Etapa 2). Este proceso da lugar a una corriente positiva y el anión queda adsorbido en la monocapa de MTF formando un "par iónico" interfacial. A medida que el potencial avanza hacia valores más positivos, esta película se reordena y estabiliza.

Al invertir el barrido hacia potenciales más negativos el "par iónico" interfacial se disocia, produciendo la transferencia electroquímica (EQ) de algunas moléculas de MTF hacia la fase acuosa y de los iones  $DCC^-$  hacia la fase orgánica, dando lugar al pico de desorción del barrido negativo (Etapa 3)

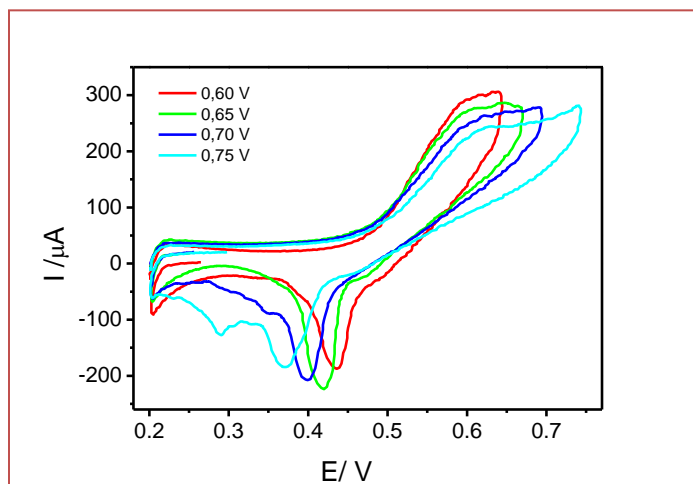


Figura 8.10. Voltagramas de MTF a diferentes potenciales de corte,  $E_c$ . Composición de la fase acuosa: MTF 0,7 mM + KCl 10 mM, pH = 2,66. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM. Velocidad de barrido  $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

#### 8.4.7. ¿Es posible cuantificar MTF mediante voltametría cíclica en interfaces líquidas?

Uno de los objetivos planteados en este capítulo fue el de proponer una nueva metodología para cuantificar MTF debido a las complicaciones que existen con los métodos disponibles actualmente. Considerando los resultados obtenidos en la sección anterior, se optó por emplear como electrolito soporte de la fase orgánica TPhAsDCC y desarrollar una metodología que permita cuantificar MTF mediante una relación lineal entre la corriente electroquímica y la concentración del fármaco. Teniendo en cuenta el comportamiento de MTF en la interfaz agua/ 1,2-DCE y el esquema de reacción planteado en la sección anterior, surge como punto importante a



analizar, el efecto del tiempo transcurrido a circuito abierto previo a la aplicación del barrido de potencial.

En este sentido, se diseñó un protocolo experimental el cual incluye una etapa de limpieza de la interfaz y un control del tiempo a circuito abierto necesario para que se establezca un equilibrio de las moléculas de MTF en solución con aquellas adsorbidas en la interfaz. La metodología propuesta fue la siguiente: se limpia la interfaz aspirando la superficie con una micro jeringa (esto sería equivalente a pulir un electrodo), posteriormente se esperan diferentes tiempos a circuito abierto y luego se realiza el barrido de potencial. En la Figura 8.11 se muestran los voltagramas obtenidos para una concentración de MTF igual a 0,7 mM siguiendo esta metodología, cabe aclarar que para cada experimento se realizó la limpieza de la interfaz y se esperó el tiempo indicado. Como puede observarse hay un cambio en la corriente en función del tiempo de espera posterior al limpiado de la interfaz. Esto se explica fácilmente, considerando que la adsorción de MTF a circuito abierto requiere de un tiempo de espera, durante el cual esta especie difunde desde el seno de la fase acuosa hacia la interfaz para reordenarse y adsorberse. En consecuencia, a mayor tiempo de espera aumenta la cantidad de moléculas adsorbidas, obteniéndose una mayor señal electroquímica. Cuando los tiempos de espera son superiores a 60 minutos, no se observa aumento en la corriente, indicando que a este tiempo ocurre la saturación de la interfaz con moléculas de MTF. Existen antecedentes donde se mejora la capacidad de detección empleando metodologías similares<sup>30</sup>.

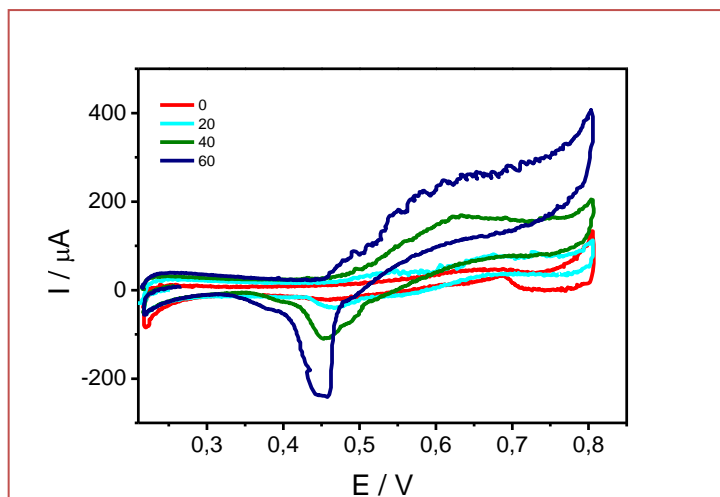


Figura 8.11. Voltagramas de MTF a diferentes tiempos de espera a circuito abierto. Composición de la fase acuosa: MTF 0,7 mM + KCl 10 mM, pH = 2,66. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.  
 $t =$  (—) 0, (—) 20, (—) 40, (—) 60 min.  
 Velocidad de barrido  $0.05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Teniendo en cuenta los resultados, se repitió esta metodología en un intervalo de concentraciones de MTF comprendido entre 0,1 y 0,8 mM. En la Figura 8.12 se muestra la variación de la corriente positiva a  $E = 0,6 \text{ V}$  en función del tiempo transcurrido de circuito abierto luego de limpiar la interfaz para diferentes concentraciones de MTF.

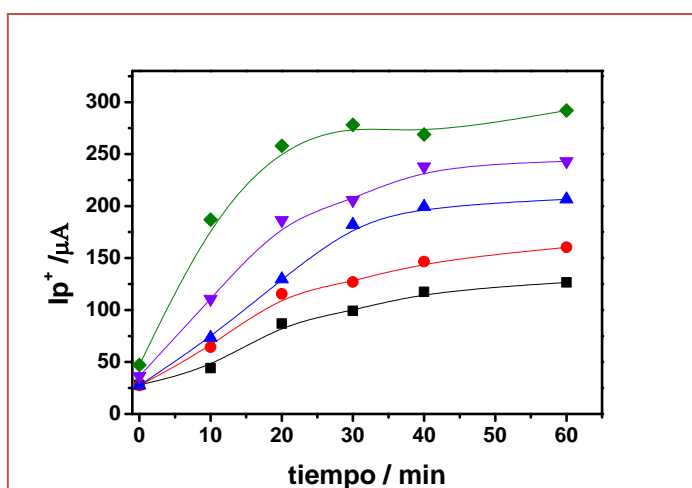


Figura 8.12. Variación de la corriente de pico positiva medida a  $E = 0,60 \text{ V}$  en función del tiempo transcurrido a circuito abierto. Composición de la fase acuosa: MTF (■) 0,2 mM, (●) 0,4 mM, (▲) 0,6 mM, (▼) 0,7 mM y (◆) 0,8 mM + 10 mM KCl, pH = 2,66. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.  
 $v = 0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Como se puede observar en la Figura 8.12, los valores de corriente dependen de la concentración inicial de fármaco. A concentraciones bajas (0,2 mM, 0,4 mM) la respuesta de corriente continúa variando hasta tiempos largos (60 min para la concentración más baja). En cambio, cuando la concentración de MTF aumenta se alcanzan valores de corriente constante a tiempos menores, indicando que a altas

concentraciones, la saturación de la interfaz se alcanza más rápidamente, sin embargo en todos los casos es necesario un tiempo de espera para lograr una corriente constante. Existen comportamientos similares en procesos de transferencia de moléculas cargadas positivamente en ITIES<sup>31,32</sup>. El desafío entonces consiste, en encontrar el tiempo de espera a circuito abierto con el cual se obtenga el mayor intervalo lineal de la corriente con la concentración que garantice una alta sensibilidad y buena reproducibilidad del método analítico de cuantificación de MTF. Para lograr este objetivo se calcularon las cargas del proceso de desorción para todas las condiciones analizadas de concentración de MTF y tiempo de espera (Figura 8.13).

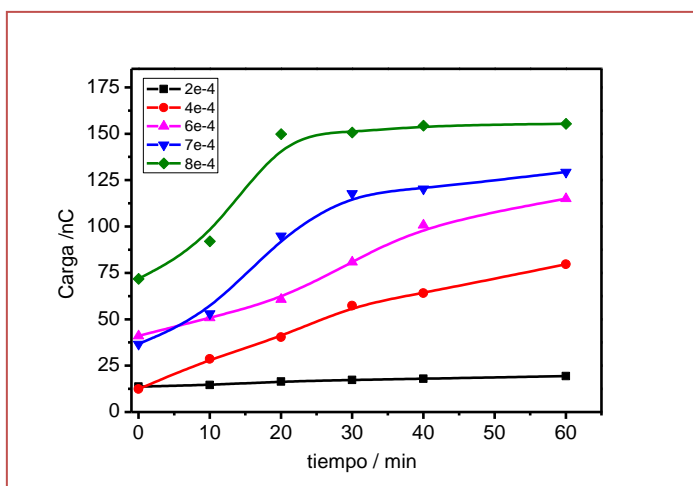


Figura 8.13. Variación de la carga del pico de desorción en función de los tiempos a circuito abierto medidos en minutos. Composición fase de la acuosa: MTF (■) 0,2 mM, (●) 0,4 mM, (▲) 0,6 mM, (▼) 0,7 mM y (◆) 0,8 mM + 10 mM KCl, pH = 2,66. Composición fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.

Como se puede observar, la dependencia, de la carga con la concentración y el tiempo es similar a lo que ocurre con la corriente y, de ambos gráficos, es posible concluir que el proceso de adsorción de MTF en la interfaz agua/1,2-DCE requiere de tiempos de espera largos para alcanzar la saturación en la interfaz, dando cuenta de un proceso de adsorción lento. El cálculo de la carga, adicionalmente, nos permite obtener información de las moléculas adsorbidas en la interfaz a través del cálculo del recubrimiento interfacial ( $\Gamma$ ). El parámetro  $\Gamma$  indica el número de moléculas de fármaco adsorbidas formando una monocapa sobre la interfaz, sus unidades son  $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ , es

decir es un valor de concentración superficial. Se puede estimar empleando la siguiente ecuación <sup>33</sup>:

$$Q = zFA\Gamma \quad \text{Ec 8.1}$$

Donde Q es la carga de desorción representada en la Figura 8.13, F la constante de faraday, A el área interfacial y z la carga de MTF en las condiciones experimentales empleadas. Además de las condiciones experimentales el parámetro  $\Gamma$  depende de las características propias de cada molécula, teniendo en cuenta interacciones electrostáticas entre las cabezas polares e interacciones hidrofóbicas entre las cadenas. Se han reportado valores de  $\Gamma$  para surfactantes zwitteriónicos con grupos fosfocolinas en interfaces agua / aire <sup>33</sup>. En dicho trabajo se calcularon valores de  $\Gamma = 300 \text{ pmol.cm}^{-2}$  para fosfocolinas similares en su estructura a MTF y este será el valor que se considerara, en esta aproximación, como el valor de recubrimiento  $\Gamma$  de una monocapa de MTF.

A partir de la Figura 8.13 se pueden obtener los valores de Q en distintas condiciones y empleando la Ec. 8.1, se pueden determinar los valores de  $\Gamma$  para dichas condiciones. En la tabla 8.1 se muestran los valores de  $\Gamma$  obtenidos para el intervalo de tiempo y concentraciones estudiados suponiendo que la carga de MTF es Z= 1 y el área de la celda igual 0,17 cm<sup>2</sup>.

Tiempos (min)	$\Gamma / \text{pmol.cm}^{-2}$				
	Concentración MTF (mM)				
	0,2	0,4	0,6	0,7	0,8
0	88,68	80,2	265,6	237,81	465,12
10	94,51	185,33	329,14	603,1	596,62
20	106,5	261,19	393,28	939,3	970,4
30	111,81	371,19	524,13	958,09	976,23
40	116,67	415,56	653,04	974,15	1000,13
60	125,35	516,1	809,74	1013,15	1006,35

Tabla 8.1. Variación de cubrimiento interfacial ( $\Gamma$ ) en función de los tiempos a circuito abierto medidos en minutos para el intervalo de concentraciones analizado.

Como se puede notar en la tabla, a medida que aumenta el tiempo,  $\Gamma$  también lo hace. Además, puede observarse que a medida que aumenta la concentración de MTF la saturación de la interfaz involucra mayor cantidad de moléculas en menor tiempo. Si se asume que el valor del recubrimiento interfacial de una monocapa de MTF es de  $300 \text{ pmol.cm}^{-2}$ , valores de  $\Gamma$  mayores a éste indicarían la presencia de multicapas o agregados. Como se observa en la tabla, para altas concentraciones el valor de  $\Gamma = 300 \text{ pmol.cm}^{-2}$  se supera en poco tiempo mientras que para concentraciones menores el tiempo requerido es mayor o, incluso, no se alcanza este valor aún a tiempos largos. Por lo tanto, se puede pensar que para condiciones de concentraciones altas de MTF o tiempos largos, se forman multicapas sobre la interfaz. La posibilidad de formar monocapas o multicapas de MTF en la interfaz dependiendo de la concentración y del tiempo, explica la respuesta encontrada en las Figuras 8.12 y 8.13, en donde no se obtiene el mismo valor de saturación para diferentes concentraciones experimentales. Existen evidencias de comportamientos similares de moléculas biológicas en la interfaz líquido/líquido empleando experimentos de voltametría cíclica<sup>35-37</sup>.

Teniendo en cuenta estos resultados, se analizó la posibilidad de usar tanto el pico de corriente positivo así como el negativo con fines analíticos. De esta manera, en las Figuras 8.14 a y b se muestran las corrientes de pico positivas y negativas en función de la concentración de MTF para todos los tiempos de espera a circuito abierto analizado.

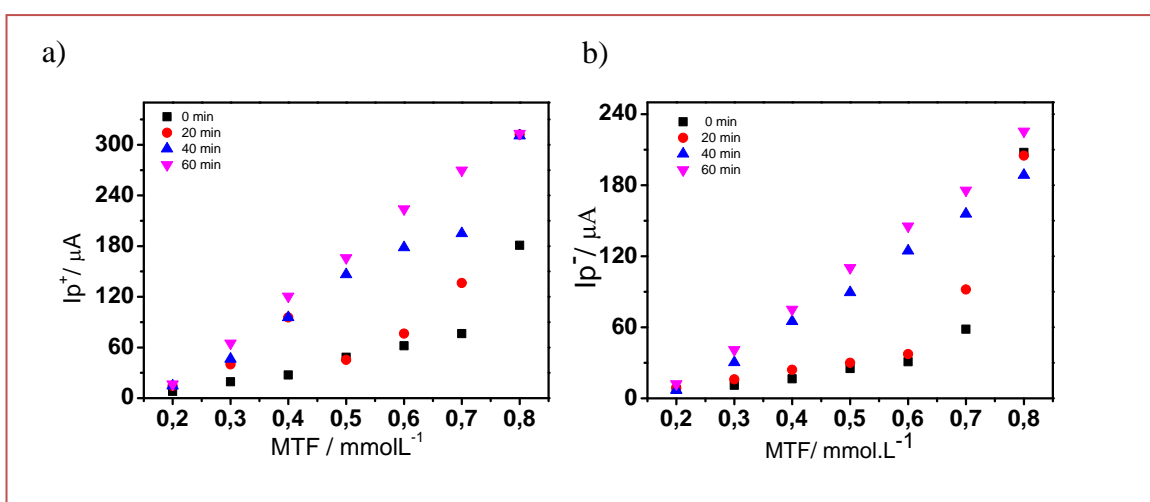


Figura 8.14. a) Variación de la corriente de pico positiva ( $I_p^+$ ) en función de la concentración de MTF para distintos tiempos a circuito abierto: 0 (■), 20 (●), 40 (▲) y 60 (▼) minutos. b) Variación de la corriente de pico negativa ( $I_p^-$ ) en función de la concentración de MTF para distintos tiempos a circuito abierto: 0 (■), 20 (●), 40 (▲) y 60 (▼) minutos. Composición fase de la acuosa: MTF + 10 mM KCl, pH = 2,66. Composición fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.  $v$ : 0,050  $V.s^{-1}$

Como se puede observar, a medida que aumenta el tiempo a circuito abierto también aumenta el intervalo de linealidad de la corriente frente a la concentración, tanto si se considera la corriente positiva como la negativa. A fin de seleccionar el mejor tiempo a circuito abierto para cuantificar MTF se calcularon diferentes parámetros analíticos a todos los tiempos. Estos resultados se muestran en las Tabla 8.2 para ambos picos, positivo y negativo.

Corriente de pico positiva/ $I_p^+$				Corriente de pico negativa/ $I_p^-$			
Tiempo/ min	Sensibilidad/ $\mu A \cdot \mu M^{-1}$	Intervalo Lineal/ $\mu M$	$R^2$	Tiempo/ min	Sensibilidad/ $\mu A \cdot \mu M^{-1}$	Intervalo Lineal/ $\mu M$	$R^2$
10	140,16	0,2-0,7	0,98	10	109,24	0,2-0,6	0,94
20	233,60	0,2-0,7	0,81	20	139,68	0,2-0,6	0,89
30	436,60	0,2-0,7	0,98	30	115,75	0,2-0,6	0,9
40	426,04	0,2-0,8	0,98	40	221,25	0,2-0,7	0,93
50	456,78	0,2-0,8	0,99	50	254,25	0,2-0,8	0,97
60	505,44	0,2-0,8	0,99	60	274,06	0,2-0,8	0,98

Tabla 8.2. Parámetros analíticos obtenidos para la respuesta  $I_p^+$  o  $I_p^-$  vs  $C_{MTF}$  a los tiempos de espera a circuito abierto mostrados en la Figura 8.14.

De la tabla 8.2 se puede deducir que, en ambos casos los tiempos más largos proporcionan una mayor pendiente del gráfico de calibración (sensibilidad). Además el intervalo lineal también mejora con el aumento de los tiempos a circuito abierto. En base a estos resultados, se observa que para el tiempo de espera a circuito abierto  $t = 60$  minutos es el de las mejores características analíticas.

#### 8.4.8. Medidas de impedancia electroquímica

Con el fin de corroborar el mecanismo para la transferencia electroquímica de MTF desde otro enfoque se realizaron espectros de impedancia en diferentes condiciones experimentales:

- Intervalo de frecuencia: 0,1 Hz-2000 Hz;

- Valor inicial de potencial:  $E_{dc} = 0,400$  V (al cual no hay transferencia faradaica);
- Concentraciones de MTF en fase acuosa:  $c_1 = 0,4$  mM y  $c_2 = 0,8$  mM;
- Tiempos de espera a circuito abierto:  $t_1 = 0$  min  $t_2 = 40$  min.

En la Figura 8.15 a se muestran los gráficos de Nyquist registrados luego de diferentes tiempos de espera a circuito abierto para una concentración de MTF de 0,4 mM mientras que en las Figuras 8.15 b y c se detallan los circuitos utilizados para el ajuste de los puntos experimentales. Cuando se esperó un tiempo  $t = t_1$  el circuito con el que se logró el mejor ajuste fue el de tipo Randles (Figura 8.15 b), en donde R1 representa la resistencia de la solución a la difusión del fármaco mientras que CPE1 es un elemento de fase constante, el cual tiene en cuenta la capacitancia de la doble capa ( $C_{dc}$ ) y R2 representa la resistencia a la transferencia de carga de la interfaz. Es decir, en estas condiciones la interfaz responde a un modelo sencillo en el cual la presencia de una monocapa no influye en la señal. Por otro lado, cuando se utilizan tiempos de espera más largos ( $t = t_2$ ) los espectros de impedancia no se pudieron ajustar con un circuito sencillo de tipo Randles; en lugar de ello, los resultados ajustaron mejor con el circuito equivalente mostrado en la Figura 8.15 c, el cual da cuenta de la existencia de dos regiones en la interfaz, donde están presentes dos diferentes dominios, con distintos valores de capacidad (CPE1 y CPE2). Este resultado, demuestra la presencia de moléculas en la interfaz formando una película no homogénea, lo cual es consistente con la respuesta de corriente observada para el proceso electroquímico de MTF a bajas concentraciones y tiempos de espera a circuito abierto largos (Figura 8.13).



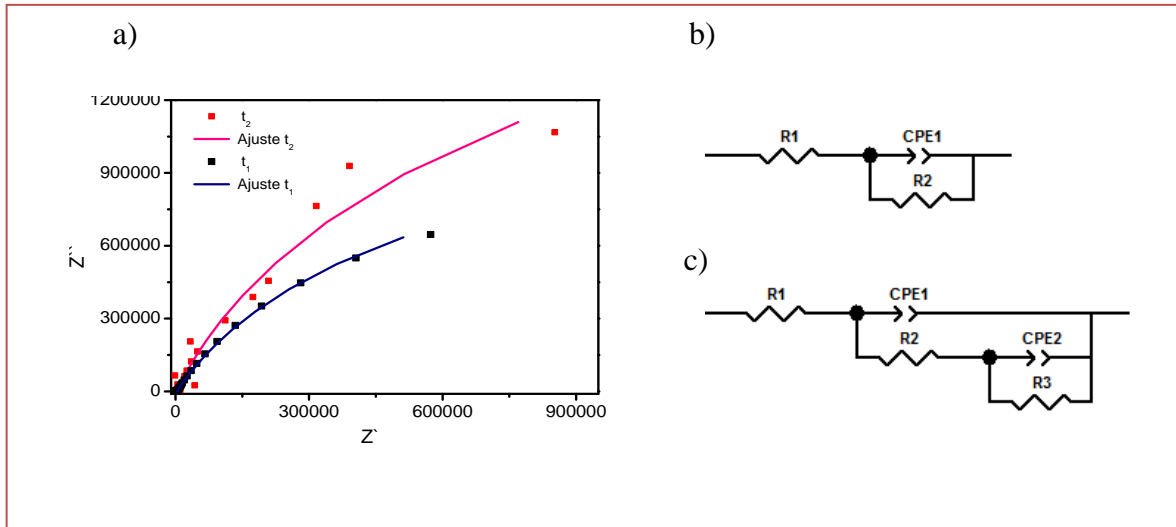


Figura 8.15. a) Gráficos de Nyquist,  $Z''$  vs  $Z'$ , obtenidos a  $E = 0,400 \text{ V}$ . Los ajustes resultantes se muestran en línea sólida. Fase acuosa: MTF 0,4 mM + KCl 10,00 mM, pH = 2,66. Fase orgánica: TPhAsDCC 10.00 mM. b) y c) Circuitos empleados para los ajustes de EIE a  $t_1$  y  $t_2$ .

En la Figura 8.16 a, se muestran los gráficos de Nyquist registrados adiferentes tiempos transcurridos a circuito abierto para una concentración de MTF igual a 0,8 mM, mientras que la Figura 8.16 b se detalla el circuito equivalente utilizado en el ajuste de los datos experimentales. En este caso, el efecto del tiempo es menor al observado en la Figura 8.15 y ambas curvas se ajustan con el mismo tipo de circuito equivalente similar a lo que ocurre a tiempos largos y concentraciones bajas. Esto indica que para altas concentraciones, la adsorción del fármaco en la interfaz es más rápida, mostrando una menor dependencia con el tiempo.

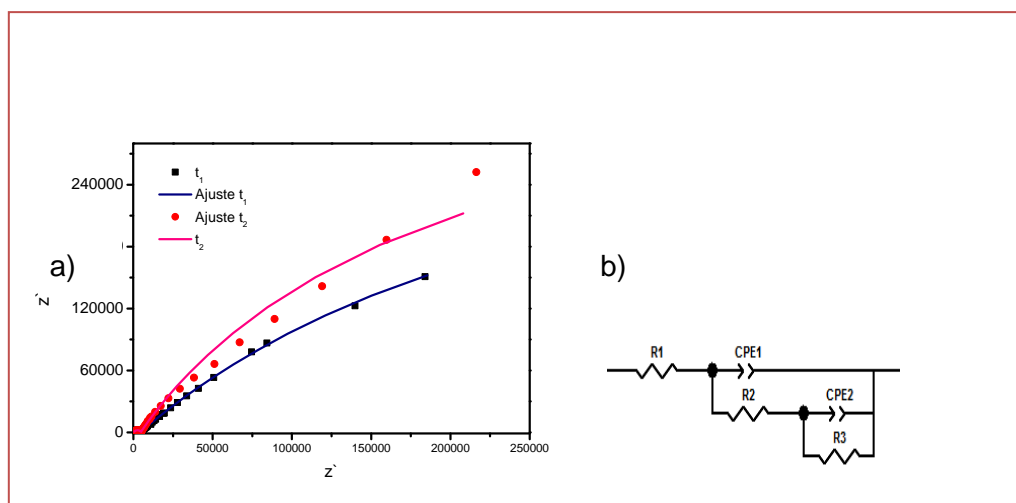


Figura 8.16. a) Gráficos de Nyquist,  $Z''$  vs  $Z'$ , obtenidos a  $E = 0,400 \text{ V}$ . Los ajustes resultantes se muestran en línea sólida. Fase acuosa: MTF 0,8 mM + KCl 10,00 mM, pH = 2,66. Fase orgánica: TPhAsDCC 10.00 mM. b) Circuito empleado para los ajustes de EIE.

La Figura 8.17 muestra la variación de la capacitancia,  $C$ , con el potencial obtenido por voltametría a.c en la interfaz líquido/ líquido, para las soluciones de base, en ausencia y en presencia de MTF en la fase acuosa en concentración igual a 0,8 mM y esperando 40 minutos a circuito abierto previo registro del espectro. La curva de capacidad obtenida en ausencia de MTF muestra el comportamiento típico de una interfaz líquido/ líquido limpia. Por otro lado cuando se agrega MTF a la fase acuosa, se observa un aumento general en los valores de capacidad, lo cual se explica considerando la acumulación de cargas en la interfaz producida por la adsorción de MTF. Además se puede notar un máximo de capacidad a  $E = 0,650 \text{ V}$ , debido a la pseudo capacitancia de la transferencia de carga. En estas condiciones se evidencia un cambio importante en la forma de las curvas  $C$  vs  $E$  respecto del blanco, notándose un acercamiento de las ramas positiva y negativa. Como se mencionó anteriormente, a tiempos largos el fármaco se adsorbe en la interfaz orientando sus cabezas polares hacia la fase acuosa y sus cadenas hidrocarbonadas hacia la orgánica. La presencia de estas últimas conduce a un cambio del coeficiente de partición del electrolito soporte de la fase orgánica, lo cual se traduce en una curva de capacidad más

angosta, efecto reportado para otros fosfolípidos<sup>38</sup>. De esta manera, estos resultados concuerdan con los obtenidos por voltametría cíclica donde el mecanismo propuesto para la transferencia del fármaco en la interfaz agua/ 1,2-DCE conduce a la formación de un "par iónico" en la interfaz constituido por MTF y el anión del electrolito soporte de la fase orgánica.

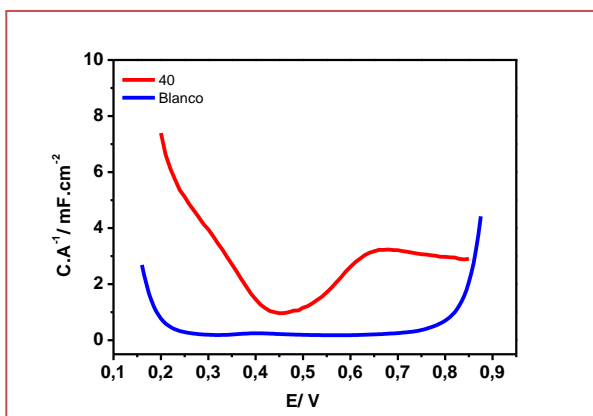
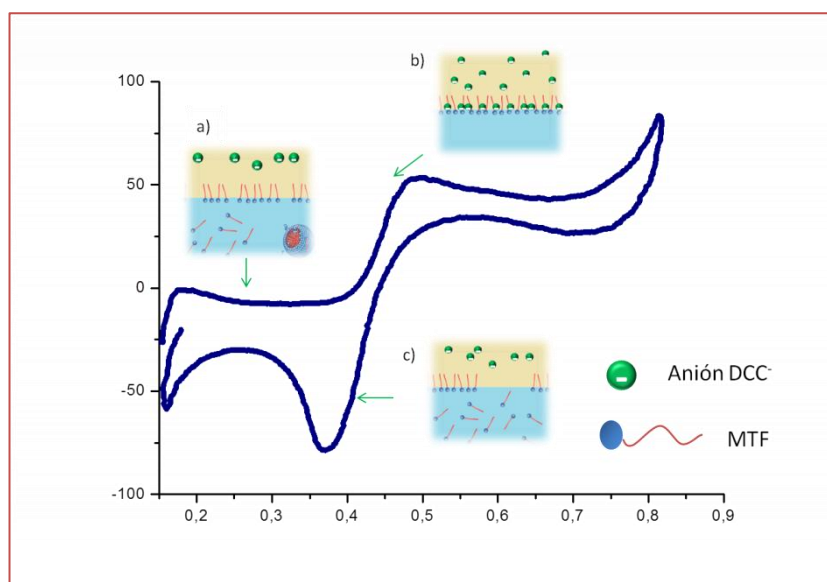


Figura 8.17. Curvas de capacidad en función de potencial. Fase acuosa: (—) KCl 10 mM, (—) 10mM KCl + MTF 0,8 mM. Fase orgánica: TPhAsDCC 10mM.

## 8.5. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados de esta sección, se puede proponer a la voltametría cíclica en interfaces líquidas como una metodología útil para la cuantificación de MTF. Se obtuvo una respuesta lineal de la corriente con la concentración de fármaco en un intervalo aceptable, empleando una metodología que involucra un ciclo de limpieza de la interfaz y posterior espera de determinados tiempos, a circuito abierto, de forma tal que se establezca un equilibrio de adsorción de las moléculas de MTF en la interfaz. El comportamiento electroquímico del fármaco no depende solamente del tiempo de espera a circuito abierto sino también de condiciones experimentales como el pH, electrolito soporte de la fase acuosa y orgánica, velocidad de barrido, potencial de corte y concentración de MTF.

A partir de los experimentos realizados variando todas estas condiciones experimentales se puede proponer el siguiente esquema para el mecanismo de la transferencia de carga en presencia de MTF en la interfaz agua/ 1,2-DCE ( esquema 8.1):



Esquema 8.1. Voltametría típica para la transferencia de MTF en la interfaz agua/ 1,2-DCE. Las imágenes representan el mecanismo propuesto en diferentes regiones de potencial: a) Las moléculas de MTF y  $DCC^-$  están presentes en sus respectivas fases, no se ha aplicado aún el barrido del potencial. En este punto MTF comienza a difundir hacia la interfaz para adsorberse en la misma a circuito abierto. b) Los aniones  $DCC^-$  son transferidos electroquímicamente, durante el barrido positivo de potencial, desde la fase orgánica hacia el lado acuoso de la interfaz, en donde se asocian a los grupos polares de las moléculas de MTF previamente adsorbidas. c) Desorción de las moléculas de MTF desde la interfaz hacia la fase acuosa y de  $DCC^-$  hacia la fase orgánica, durante el barrido negativo de potencial.

En este esquema se muestra un voltograma típico obtenido para una concentración de MTF en la fase acuosa igual a 0,4 mM, Cada uno de los esquemas representa una etapa del mecanismo para la adsorción/desorción de MTF en la interfaz en las diferentes regiones de potencial. Inicialmente, las moléculas del fármaco comienzan a difundir a la interfaz producto de su naturaleza anfífilica, como se mencionó anteriormente. En este punto no se aplica una polarización a la interfaz. La cantidad de moléculas adsorbidas de fármaco dependerá del tiempo de espera a circuito abierto y responderá a los equilibrios de adsorción ( $MTF_{(w)} \rightleftharpoons MTF_{(ads)}$ )

(esquema 8.1a). Además de el tiempo cabe resaltar que la compactación de la monocapa adsorbida dependerá del catión soporte de la fase acuosa, en este caso  $K^+$ , y en consecuencia de la respuesta electroquímica posterior. Posteriormente se polariza positivamente la interfaz desde 0,16 V hasta 0,80 V y, cuando se alcanza un potencial de alrededor de 0,4 V, los aniones  $DCC^-$  son transferidos electroquímicamente desde la fase orgánica hacia el lado acuoso de la interfaz, en donde se asocian a los grupos polares de las moléculas de MTF previamente adsorbidas (esquema 8.1 b). En el barrido de potencial negativo se induce la disociación del "par iónico" interfacial MTF-DCC y las moléculas de MTF se transfieren desde la interfaz hacia el seno de la fase acuosa mientras que  $DCC^-$  se transfiere desde la interfaz hacia el seno de la fase orgánica, observándose un pico de corriente negativo a un potencial igual a 0,37 V. La forma aguda de este pico es característica de un proceso de desorción (esquema 8.1 c).

En función de lo mencionado y con el modelo propuesto se puede concluir que el fármaco MTF ha mostrado electroactividad en las interfaces líquido/líquido y puede ser empleado con fines analíticos determinando las corrientes de pico del barrido positivo o negativo. Los resultados de voltametría cíclica confirman un mecanismo de transferencia, que involucra la adsorción de MTF cargada positivamente en la interfaz acompañada de la transferencia facilitada de aniones desde la fase orgánica.

### 8.6. Bibliografía

- [1] T. Unyoto T, J. Potet, M. Boelaert *BMJ Global Health* 3 (2018), 7-9
- [2] T- Monge-Maillo, A. López-Vélez, *PLoS Negl Trop Dis.* 8 (2014), 3-21.
- [3] M. Teymouri, H. Farzaneh y M. R. Jaafari. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 80 (2015), 66-73
- [4] M. Teymouri, A. López-Vélez. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* 101 (2015), 27-66

- [5] Y. Z. Díaz, M. Mottola, Raquel V. Vico, N. Wilke, M. L. Fanani Langmuir, 32 (2016), 587-595,
- [6] Y. Z. Díaz, M. Mottola, Raquel V. Vico, N. Wilke, M. L. Fanani .Biochim. Biophys. Acta Biomembr., 1859 (2017), 1891-1899,
- [7] Y. Z. Díaz, M. Mottola, N. Wilke, M. L. Fanani. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes , 1860 (2018)1972-1984
- [8] M.de Sá, M. Sresht, V. Rangel-Yagui, C. Blankschtein. Biochimica et Biophysica Acta 1798 (2016), 368-375.
- [9] L. Alonso, A. Alonso Biochimica et Biophysica Acta 1858 (2016), 1160–1164.
- [10] B. Monge-Maillo, R. López-Vélez, Clin. Infect. Dis. 60 (2015), 1398–1404.
- [11] M. V. ZhukovaO. V. RomanenkoV. A. NikolaevichM. A. Kisel. Pharmaceutical Chemistry 44, (2010) , 507-509
- [12] M. Eissa, R. El-Moslemany,A. Ramadan , E. Amer, M. El-Azzouni ,L. Khordagui. LK PLoS One. 10 (2015) 11-15
- [13] G. Wang, L. Zhang .Reactive and Functional Polymers 107, (2016) 1-10
- [14] M. Teymouri, H. Farzaneh y M. R. Jaafari. Acta Biomaterialia 92 (2019), 205-218
- [15] E.Alvarez de Eulate Int J Nanomedicine. 8 (2013)73-84
- [16] A.E. Kip, H. Rosing, M.J.X. Hillebrand, M.M. Castro, M.A. Gomez, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, T.P.C. Dorlo,998–999,(2015) 57-62
- [17] A.E. Kip, K.C. Kiers, H. Rosing, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, T.P.C. Dorlo. 135,(2017) 160-166
- [18] A.E. Kip, H. Rosing, M.J.X. Hillebrand, S. Blesson, B. Mengesha, E. Diro, A. Hailu, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, T.P.C. Dorlo. Antimicrob. Agents Chemother., 60 (2016), 2081-2089
- [19] Monzón, L. M. A., Tesis doctoral: “*Transferencia de fármacos ionizables a través de una interfaz líquido/líquido y su aplicación al estudio Cuantitativo Estructura- Actividad*”. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, 2006.
- [20] J. M. Boggs.Biochimica et Biophysica Acta 906, (1987) 353-404
- [21] H. Sakae. Biochimica et Biophysica Acta 1031 (1990) 111-142
- [22] G. Cevc. Blochermst 26 (1987) 6305-6310
- [23] M. de Sá, M. Sresht, V. Rangel-Yagui, C. Blankschtein Langmuir 106(2015) 2-4
- [24] H. Sakae, Y. Toda, T. Yokoyama. Electrochemistry Communications 90, (2018), 83-86
- [25] Y. Yuan, L. Wang, S. Amemiya, Anal. Chem. 76 (2004) 5570-5575
- [26] A. Trojánek, J. Langmaier, E. Samcová, Z. Samec.Journal of Electroanalytical Chemistry 603 (2007) 235–242
- [27] G. Feng, Y. Xiong, H. Wang, Y. Yang .Electrochimica Acta 53 (2008) 8253-8257
- [28] S. Amemiya, X. Tracy L. Wazenegger. J Am Chem Soc. 39 (2003) 11832-11833.
- [29] R. Kalvoda J. Fresen. Anal Chem 349 (1994) 565–570
- [30] Da. W. M. Arrigan, M. J. Hackett, R. L. Mancera. Current Opinion in Electrochemistry 12, (2018), 27-32

- [31] E. Alvarez de Eulate E, D. Arrigan *Anal Bioanal Chem.* 11 (2013). 3801-3806
- [32] E. Alvarez de Eulate, D. Arrigan, *Analytical Chemistry* 84 (2012). 2505-2511
- [33] M. Yaseen, Y. Wang, T.J. Su, J.R. Lu. *Journal of Colloid and Interface Science* 288. (2005) 361-370
- [34] G. Herzog, W. Moujahid, J. Strutwolf, D. W. M. Arrigan, *Analyst* 134 (2009). 1608–1613
- [35] E. Rufeil-Fiori , N.a Wilke , A. J. Banchioa. *Soft Matter.*12 (2016). 281 -294
- [36] P. Yu, F. Yang, J. Zhao, J. Wang. *J. Phys. Chem. B* 2014, 118, 3035–3040
- [37] M. C. Martins, C. M. Pereira, H. A. Santos, R. Dabirian, F. Silva, V. Garcia-Morales, J. A. Manzanares, J. A., 2007, 599, (2), 367-375.

---

# Capítulo 9

## Comportamiento electroquímico del polímero pluronic F 127

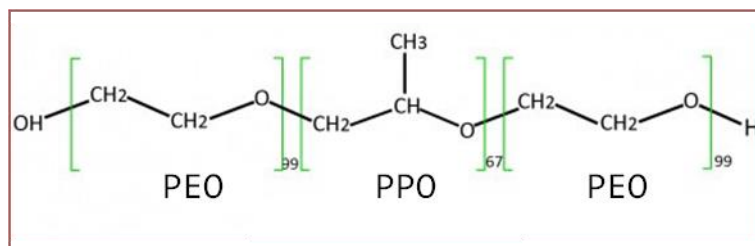
---



## 9. Comportamiento electroquímico del polímero pluronic F 127

### 9.1 Introducción

En el presente capítulo se presentan los resultados sobre el comportamiento electroquímico del polímero anfifílico Pluronic F-127. (poli (oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno), PEO-PPO-PEO). Debido a que esta molécula tiene una porción hidrofóbica (PPO) y una hidrofílica (PEO) es capaz de auto organizarse en estructuras denominadas micelas poliméricas en las cuales el 30 % corresponden a PPO y el 70% a la porción PEO<sup>1</sup>. El interés en estudiar este compuesto se basa fundamentalmente en su amplio rango de aplicaciones biomédicas. El PPO, por su naturaleza hidrofóbica, es ideal para la incorporación de fármacos no solubles en medios acuosos, mientras que el segmento PEO previene la adsorción y agregación de proteínas plasmáticas, mejorando sus propiedades farmacocinéticas<sup>2</sup>. La viabilidad comercial de cualquier sistema de liberación de drogas depende del costo y facilidad del uso del material empleado. En este sentido, las formulaciones con Pluronic F-127 no requieren tecnologías de alto costo ni complejas, ya que los reactivos y las técnicas están disponibles a un costo asequible y pertenecen a la rutina del laboratorio<sup>3</sup>. En la Figura 9.1 se muestra la estructura química de este compuesto, y en la tabla 9.1 se resumen sus propiedades fisicoquímicas.



**Figura 9.1** Estructura química del polímero Pluronic® F-127 (PEO-PPO-PEO).

En base a lo mencionado, una parte fundamental de las aplicaciones biomédicas de Pluronic F-127 involucra el estudio de las interacciones del polímero con los fármacos que pueda transportar. Es fundamental estudiar los parámetros fisicoquímicos que gobiernan y controlan la interacción entre el portador y el fármaco de forma tal de poder optimizar el sistema. Existen antecedentes del estudio de interacciones de Pluronic F-127 con distintos fármacos donde se caracterizan sus propiedades fisicoquímicas <sup>4-6</sup>.

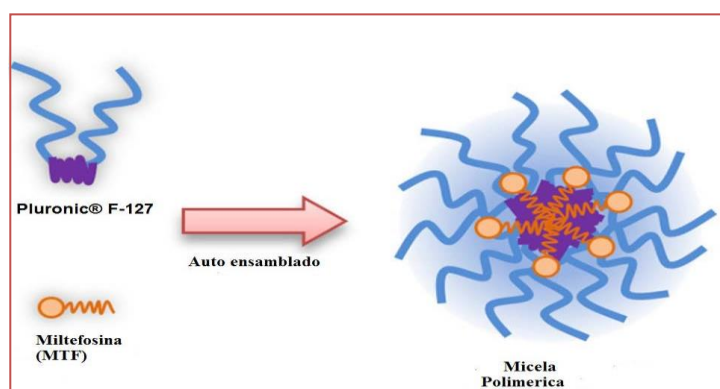
Pluronic	Estructura Molecular	Peso molecular promedio	%PEO	Relación PPO/PEO	Tensión superficial (dym/cm)
<b>F127</b>	EO <sub>106</sub> PO <sub>70</sub> EO <sub>106</sub>	12600	70	0.33	41

**Tabla 9.1** Algunas propiedades fisicoquímicas del polímero Pluronic F-127 (PEO-PPO-PEO).

En el capítulo 8 se mencionaron las características y principales aplicaciones del fármaco miltefosina (MTF) como así también sus principales inconvenientes si es administrada de forma oral. En función de esto, Pluronic F-127 se presenta como una excelente alternativa para emplearse como nanotransportador del fármaco<sup>6</sup>. Se ha propuesto que MTF se une a Pluronic F-127 formando una heteromicela donde sus cadenas hidrofóbicas se ubican en el corazón hidrofóbico del segmento PPO de Pluronic F-127, mientras que sus grupos polares interactúan con el segmento PEO. En la Figura 9.2 se muestra un esquema con el modelo propuesto para la formación de la heteromicela. Un factor importante a tener en cuenta es la relación entre MTF/ Pluronic F-127, ya

que si ésta es demasiado grande quedaría un exceso de fármaco en el medio que conduciría a la agregación del mismo. Las micelas de MTF pura tienen efecto hemolítico y se desagregan fácilmente durante la administración oral o intravenosa<sup>7</sup>. En base a lo mencionado resulta fundamental realizar una correcta formulación de forma tal de encontrar una relación entre MTF y Pluronic F-127 que no conduzca a fármaco libre.

Existen antecedentes del estudio del comportamiento electroquímico de diferentes polímeros en interfaces líquido/líquido con diferentes objetivos: analizar la formación de complejos, obtener datos termodinámicos y cinéticos de transferencia<sup>8,9</sup>, y estudiar las interacciones de polímeros con surfactantes<sup>10</sup>, proteínas<sup>11</sup> y diversas moléculas<sup>12-14</sup>. Las técnicas electroquímicas aplicadas a interfaces líquido/ líquido también permiten estudiar surfactantes iónicos como MTF y determinar propiedades de estos<sup>15,16</sup>. De esta manera, estas técnicas se presentan como promisorias para estudiar el comportamiento interfacial del polímero Pluronic F-127 y sus interacciones con la MTF.



**Figura 9.2** Formación de Micelas de Pluronic® F-127 y el fármaco MTF. Imagen extraída de cita bibliográfica<sup>1</sup>.

Considerando lo mencionado y teniendo en cuenta la naturaleza anfifílica de Pluronic F-127, en el presente capítulo se abordó el estudio electroquímico de este polímero en la interfaz agua/1,2-DCE. Se evaluó su respuesta electroquímica

mediante voltametría cíclica y se determinaron importantes parámetros variando las condiciones experimentales como el pH y el electrolito soporte de la fase acuosa. Por otra parte se estudiaron sus interacciones con MTF, a partir del análisis de diferencias encontradas en la señal electroquímica cuando están presentes en el medio el fármaco y el polímero respecto del comportamiento individual de cada compuesto. De esta manera en este capítulo se estudia un copolímero anfifílico en interfaces líquidas, respondiendo a uno de los objetivos planteados en la presente tesis.

## 9.2 Objetivos

### 9.2.1 General

El objetivo general del presente capítulo pretende contribuir al conocimiento del comportamiento interfacial de Pluronic F-127, y de su interacción con MTF en interfaces líquidas simples bajo acción de polarización eléctrica.

### 9.2.2 Específicos

- Determinar las condiciones experimentales para el estudio de Pluronic F-127 en ITIES;
- Estudiar la transferencia de Pluronic F-127 desde un enfoque básico en interfaces líquidas para dilucidar mecanismos de transferencia de este compuesto;
- Determinar parámetros de Pluronic F-127 como coeficiente de difusión en fase acuosa (D) y concentración micelar crítica (CMC);
- Realizar experimentos de voltametría cíclica en presencia de polímero, MTF o

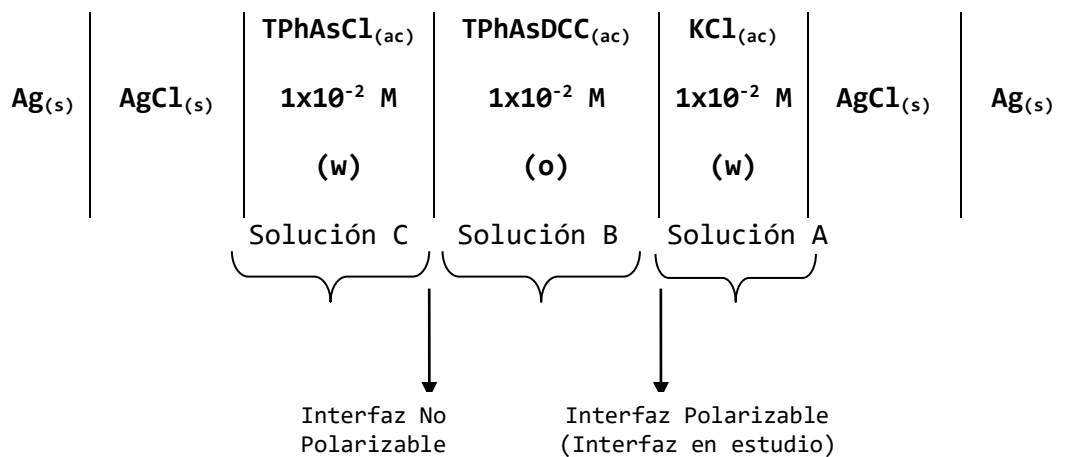
ambos para determinar la relación MTF/ Pluronic F-127 en la cual no exista exceso de fármaco.

### 9.3 Parte experimental

Las soluciones electrolíticas se prepararon en una concentración 10 mM, a partir de las siguientes sales: KCl en agua ultra pura para la fase acuosa mientras que para la fase orgánica se empleó dicarbóil cobaltato de tetra fenil arsonio (TPhAsDCC) en 1,2-dicloroetano (DCE). La sal TPhAsDCC fue preparada por metátesis de TPhAsCl y dicarbóil cobaltato de sodio (NaDCC).

El surfactante polimerico Pluronic F-127 (Sigma Aldrich) se disolvió en fase acuosa a diferentes concntraciones.

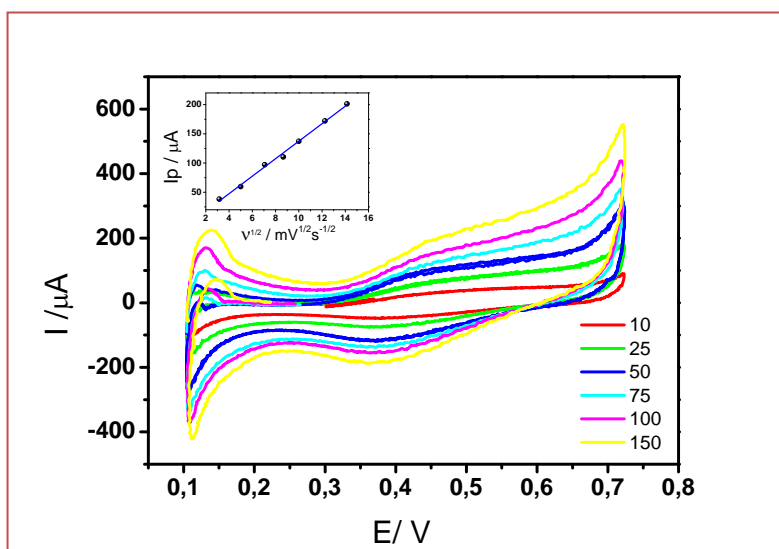
De esta manera el esquema de la celda de trabajo es el siguiente:



## 9.4 Resultados

### 9.4.1 Comportamiento voltamétrico de Pluronic F-127

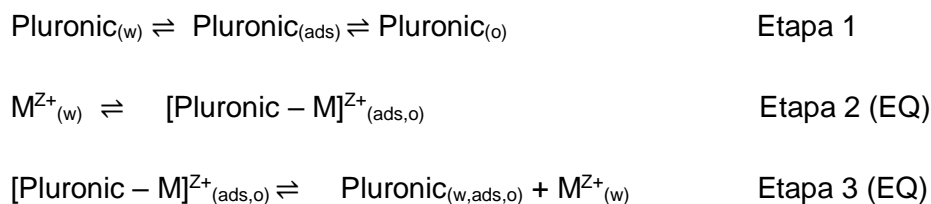
Se estudió el comportamiento electroquímico de Pluronic F-127 en la interfaz agua/1,2-DCE. En la Figura 9.3 se muestran voltagramas obtenidos a distintas velocidades de barrido para una concentración de Pluronic F-127 igual 1,14 g/L en fase acuosa. Estos voltagramas muestran una señal de corriente tanto en el barrido positivo ( $E_p^+ = 0,47$  V) como en el negativo ( $E_p^- = 0,41$  V). En el inserto de esta Figura se observa una relación lineal entre la corriente de pico y  $v^{1/2}$ . Además, la diferencia entre  $E_p^+$  y  $E_p^-$  es de 60 mV, el cociente entre  $I_p^+/I_p^-$  es 1 y el potencial de ambos procesos no varía con la velocidad de barrido. En base a estos resultados se puede proponer que la transferencia de carga que tiene lugar corresponde a un mecanismo controlado por difusión.



**Figura 9.3** Voltmetría cíclica, a diferentes velocidades de barrido, para Pluronic® F-127. Composición de la fase acuosa: Pluronic® F-127 0,09 mM + KCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.  $v = 10, 25, 50, 75, 100, 150 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$   
Inserto: variación de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

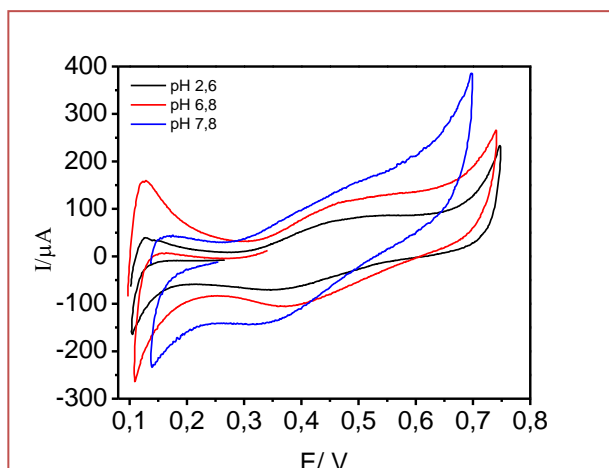
#### 9.4.2 Efecto del pH y del electrolito soporte de la fase acuosa

Se estudió el efecto del pH sobre la señal electroquímica producida por Pluronic F-127 en la interfaz agua/1,2-DCE, teniendo en cuenta que este factor es muy importante en la formación de agregados de estas estructuras poliméricas<sup>17</sup>. En la Figura 9.4 se muestran distintos voltogramas obtenidos empleando una concentración de Pluronic® F 127 igual a 0,09 mM a diferentes valores de pH. Como puede observarse, el pH afecta la señal electroquímica. Claramente frente a un aumento de pH ocurre un aumento la corriente de pico positiva y negativa. Esto sugiere un aumento de carga en la especie que está siendo transferida. Los cambios en el pH no afectan la carga del polímero pero si sus interacciones con los iones presentes en el medio<sup>18</sup>. Es decir, este polímero cambia sus propiedades fisicoquímicas cuando se expone a estímulos tales como cambios en el pH<sup>19</sup> o concentración y tipo de electrolitos<sup>20,21</sup>. Por otra parte, si se observa la estructura química del Pluronic F-127 (Figura 9.1), se puede notar que la molécula contiene enlaces éter entre las porciones PPO y PEO, estos grupos son capaces de interactuar con los cationes presentes en la fase acuosa tal como ha sido reportado para diversos polímeros<sup>22-24</sup>. Una posible explicación para los resultados de la Figura 9.4, surge de pensar que la respuesta electroquímica observada corresponde a la transferencia de los cationes presentes en la fase acuosa, facilitada por las interacciones con los grupos éter del polímero. De esta manera, nuestra hipótesis para el proceso de transferencia de carga en la interfaz líquido /líquido en presencia de pluronic involucra las siguientes etapas:



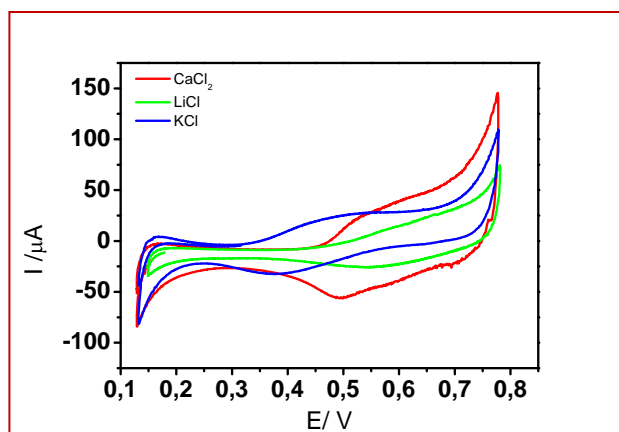
en donde  $M^{Z+}$  es el catión presente en el electrolito soporte de la fase acuosa. Es decir, debido a su naturaleza anfifílica, pluronic puede particionarse a circuito abierto entre la fase acuosa, la interfaz y la fase orgánica (Etapa 1). Durante el barrido directo de potencial, tanto el polímero adsorbido como el que está presente en fase orgánica, puede facilitar la transferencia de  $M^{Z+}$  desde la fase acuosa a la interfaz o a la fase orgánica dando lugar a la corriente positiva observada (Etapa 2). Durante el barrido negativo de potencial, el complejo  $[\text{Pluronic} - M]^{Z+}$  se disocia, regresando el  $M^{Z+}$  a la fase acuosa, lo cual da lugar a la corriente negativa observada (Etapa 3). Para interpretar los cambios voltamétricos encontrados al variar el pH, se debe tener en cuenta que, al disolver Pluronic F-127 en agua pura, sus enlaces éter formarán enlaces puente hidrógeno con el agua. Si posteriormente se agrega un electrolito, los grupos éter podrán interactuar con los cationes o bien formar enlaces puente hidrógeno con el agua, lo cual dependerá de cuál de las dos opciones sea energéticamente más favorable<sup>25-28</sup>. De esta manera, puede ocurrir que frente a una disminución del pH se favorezca a la formación de enlaces puente hidrógeno con el agua, y no a la interacción con cationes, lo cual se traduciría en un cambio en los voltagramas explicando la tendencia mostrada en la Figura 9.4, donde una disminución en el pH produce corrientes de pico menores.





**Figura 9.4** Perfiles de corriente para Pluronic F-127 a distintos valores de pH. Composición de la fase acuosa: Pluronic F-127 0,09 mM + KCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.  $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

A fin de corroborar la hipótesis propuesta anteriormente se realizaron experimentos de voltametría cíclica cambiando el electrolito soporte de la fase acuosa. De esta manera, si la hipótesis de transferencia facilitada de cationes fuese correcta se esperaría ver cambios en los voltagramas. Se utilizó KCl,  $\text{CaCl}_2$  y LiCl como electrolitos y los resultados se muestran en la Figura 9.5. Como puede observarse existe un efecto del electrolito sobre la forma de los voltagramas. Se observan cambios en los potenciales de pico como así también en las corrientes de pico.



**Figura 9.5** Perfiles de corriente para Pluronic® F-127 a pH: 6,8 en presencia de diferentes electrolitos soportes en la fase acuosa. Composición de la fase acuosa: Pluronic® F-127 0,09 mM + (—) KCl, (—)  $\text{CaCl}_2$  y (—) LiCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.  $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

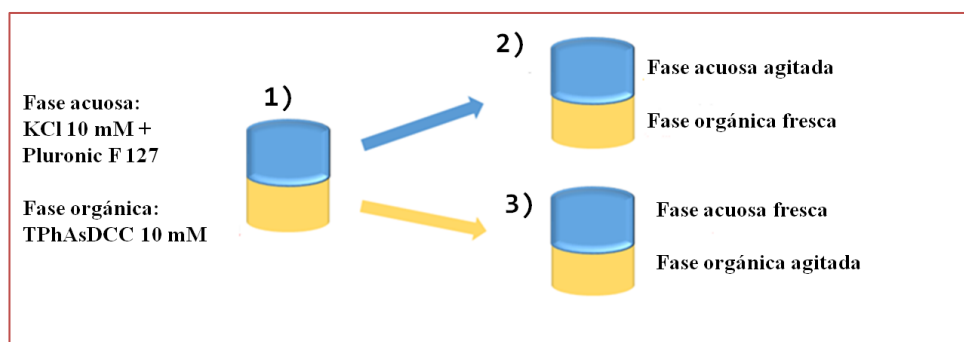
El potencial de transferencia para el  $\text{K}^+$  es el menor, seguido por el de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que para  $\text{Li}^+$  la transferencia ocurre a mayores potenciales con

valores de corriente pequeños. Es decir,  $K^+$  es el catión que interacciona más fuertemente con el polímero. Se han reportado comportamientos similares para estos cationes, donde el mayor efecto sobre los polímeros se observa para  $K^+$  <sup>29</sup>. Esta tendencia sigue la serie de Hofmeister. Dicha serie permite diferenciar a los iones de acuerdo a su habilidad de insolubilizar proteínas o polímeros <sup>30</sup>. El efecto Hofmeister se explica tradicionalmente en términos de cómo los diferentes iones influyen en la estructura del agua y, por lo tanto, en la hidratación de los solutos hidrofóbicos. En el caso de los polímeros, distintos autores <sup>31-33</sup>, han propuesto un mecanismo en el cual el efecto de Hofmeister se explica por la capacidad de los iones para ubicarse en la zona de hidratación de los polímeros. En el caso del Pluronic F-127, los cationes producirían la deshidratación de la porción PEO afectando la solubilidad de este compuesto en agua. La magnitud de este efecto generalmente aumentará con las siguientes propiedades del polímero: polarizabilidad, tamaño molecular / volumen y polaridad <sup>34-37</sup>. En este caso, el orden de interacción es:  $K^+ > Ca^{+2} > Li^+$ . Esta selectividad diferencial ha sido publicada en diversos trabajos <sup>38-42</sup>. Las interacciones de los cationes con el polímero Pluronic F-127, alteran su hidrofobicidad favoreciendo la adsorción del mismo en la interfaz<sup>43-45</sup>. Dependiendo del catión al que esté unido el polímero variará la carga de complejo catión/polímero.

### 9.4.3 Partición de Pluronic F-127 en fase orgánica

Teniendo en cuenta los resultados de la sección anterior existe la posibilidad de que el polímero pueda particionarse en la fase orgánica, a circuito abierto, debido a su hidrofobicidad o bien que se mantenga adsorbido en la interfaz como ha sido reportado <sup>44-48</sup>. A fin de dilucidar si esta alternativa es posible se realizó el siguiente experimento (Figura 9.6): **1)** se realizó un

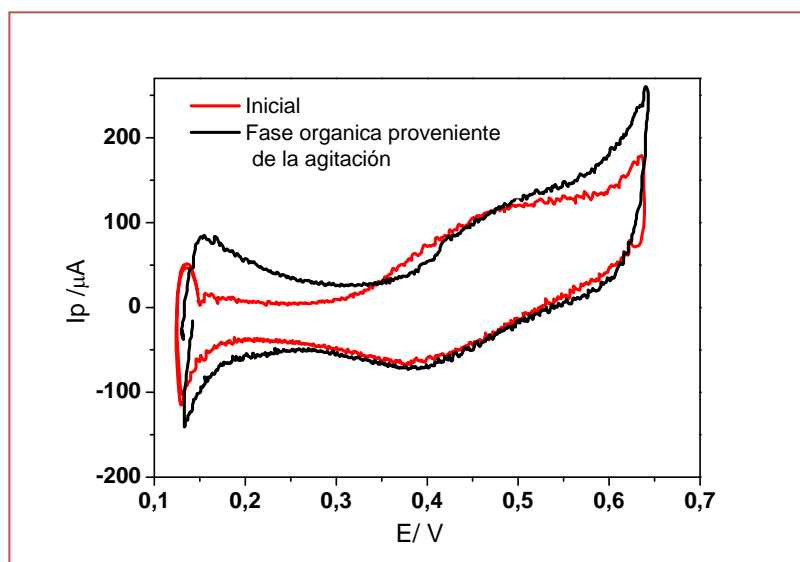
voltagrama inmediatamente después de poner en contacto una solución acuosa de Pluronic F127 y KCl con la fase orgánica, dentro de la celda electroquímica; paralelamente, en otro recipiente, se colocaron las mismas soluciones y se las sometió a agitación durante un determinado tiempo, **2)** se separaron las fases acuosa y la orgánica agitada y se realizó un experimento de voltametría cíclica cargando la celda con la fase acuosa agitada previamente y una fase orgánica fresca sin contacto previo con la fase acuosa, **3)** la fase orgánica resultante de la agitación, se puso en contacto con una fase acuosa fresca y se realizó un experimento de voltametría cíclica con este sistema. De esta manera, al agitar ambas fases, podría ocurrir o no la partición del polímero a la fase orgánica a circuito abierto, esto dependerá fundamentalmente de la hidrofobicidad del polímero. Dependiendo de los resultados obtenidos en los pasos 2 y 3 se podrá dilucidar si el polímero se transfiere totalmente a la fase orgánica, se particiona o se mantiene en la fase acuosa.



**Figura 9.6.** Metodología propuesta para estudiar la posible partición del polímero en la fase orgánica

En la Figura 9.7 se muestran los voltagramas resultantes luego de aplicar la metodología propuesta en la Figura 9.6. Como se puede observar el voltagrama obtenido en la etapa 3 tiene una forma similar al voltagrama de la etapa 1, lo cual indicaría que hay partición total del polímero hacia la fase orgánica. De esta manera, la señal electroquímica observada para Pluronic F-127 en las Figuras 9.3, 9.4, 9.5, y 9.7 se debería a la transferencia facilitada de los cationes del electrolito soporte de la fase

acuosa, los cuales debido a las interacciones mencionadas anteriormente competirán con los enlaces puente hidrógeno que puede formar el agua con los grupos éter del polímero, corroborando la hipótesis planteada en la sección 9.4.2. La transferencia facilitada de un catión metálico desde la fase acuosa a la orgánica ocurre por medio de la formación de un complejo con un ligando presente en la fase orgánica <sup>49</sup>. Esta formación del complejo entre el ion metálico con el ionóforo conduce a una disminución de la energía de Gibbs de transferencia del ion metálico a través de la interfaz, causando un cambio en el potencial de transferencia hacia valores más negativos <sup>50,51</sup>.



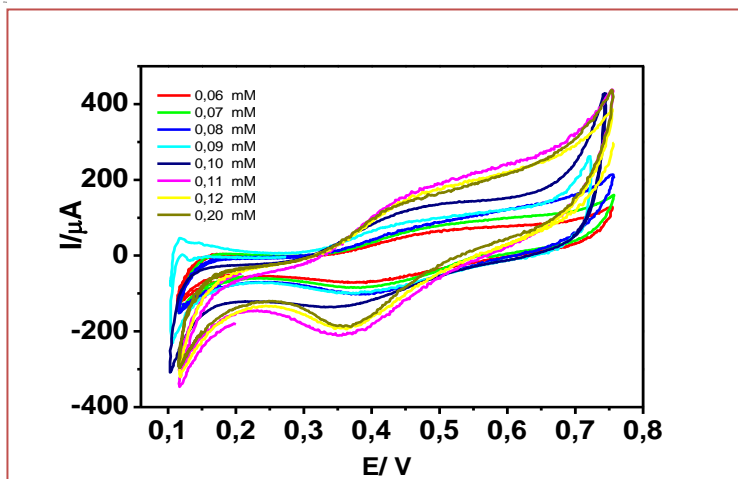
**Figura 9.7.** Voltagramas obtenidos a partir de la metodología propuesta en la Figura 9.6. Composición de la fase acuosa: (—) Pluronic® F-127 0,09 mM + KCl 10 mM, pH = 6,8. Composición de la fase orgánica: (—) TPhAsDCC 10 mM, (—) TPhAsDCC 10 mM proveniente de la agitación  $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

La estequiometría del complejo formado dependerá de la capacidad del ligando de unirse a más de un catión <sup>52</sup>. Existen diferentes mecanismos propuestos para la transferencia facilitada en ITIES, tal como se describió en la sección 2.4.2. Cualquiera de estos mecanismos dependerá fundamentalmente de la naturaleza del ligando y del catión metálico, así como también de la relación molar entre los mismos.

En el caso particular estudiado en este capítulo el catión metálico puede ser  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  o  $Li^+$ , mientras que la concentración molar del catión siempre fue mayor a la del polímero. En estas condiciones, de acuerdo a la bibliografía, el mecanismo de transferencia facilitado más factible es el denominado "TIC" en la Figura 2.4 (transferencia por formación de complejo en la interfaz). Es decir que el polímero formaría un complejo en la interfaz con los iones metálicos de la fase acuosa y se mantendría adsorbido. Esta alternativa también se basa en la disposición que tendría el polímero cuando está adsorbido en la interfaz agua/1,2-DCE, orientando su porción PEO hacia la fase acuosa, la cual interacciona con los iones de dicha fase <sup>52,53</sup>. Esto último permite proponer que el complejo se mantiene adsorbido y, cambios en el pH de la fase acuosa conducirán a cambios en los perfiles voltamétricos, ya que la porción PEO del polímero es la que puede o no formar enlaces puente hidrógeno con el agua. Entonces el pH de la fase acuosa determinará la naturaleza de la transferencia de los iones en la interfaz, tal como se ha reportado para distintos iones y ligandos <sup>53</sup>. Adicionalmente y como se mencionó anteriormente, la presencia de iones en la fase acuosa aumenta la hidrofobicidad del polímero favoreciendo la hipótesis de que el polímero se particiona en la fase orgánica. Este efecto se denomina "salting out" y ha sido reportado para diversos polímeros <sup>54,55</sup>.

#### 9.4.4 Efecto de la concentración de polímero en la respuesta electroquímica

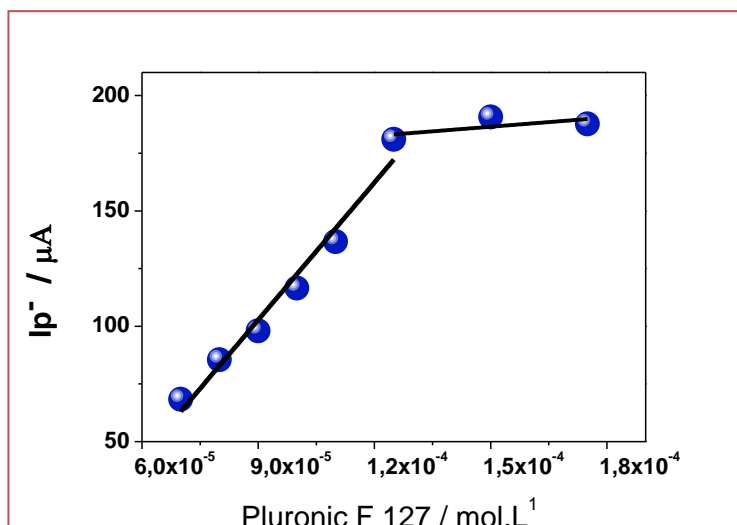
En la Figura 9.8 se observa la respuesta voltamétrica de Pluronic F-127 a 50  $mV.s^{-1}$  para distintas concentraciones. Como se observa, a medida que aumenta la concentración de polímero la corriente del pico positivo también aumenta mientras que el potencial de pico ( $E_p^+$ ) se mantiene constante.



**Figura 9.8.** Perfiles voltamétricos para diferentes concentraciones de polímero. Composición de la fase acuosa: Pluronic® F-127 + KCl 10 mM, pH = 6,8. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM,  $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Sin embargo cuando la concentración de polímero alcanza un valor igual a 0,12 mM la corriente se mantiene constante y los voltagramas se tornan más resistivos. La Figura 9.9 muestra la variación de la corriente de pico en función de la concentración de polímero. Como puede observarse, existe una región donde la corriente varía linealmente con la concentración y otra donde la corriente se mantiene constante (concentración de polímero alta). En base a estos resultados se propusieron dos alternativas que permitirían explicar este comportamiento. Por un lado, podría ocurrir una saturación de la interfaz debido al aumento de la concentración de polímero, condición en la cual no existirá un aumento de corriente ya que la interfaz no admite más moléculas de pluronic F-127 capaces de acomplejar al catión potasio. Otra posible hipótesis sería que se ha alcanzado la concentración micelar crítica del polímero, con lo cual la cantidad de monómero libre se mantiene constante y la corriente no aumenta. Teniendo en cuenta esta última alternativa, se realizaron ajustes de las dos regiones del gráfico de la Figura 9.9, tomándose como concentración micelar crítica al valor del eje x correspondiente a la intercepción de los dos ajustes lineales. De esta manera, el valor de CMC para Pluronic F-127 es igual a 0,13 mM. Este valor es similar al reportado para este polímero <sup>56-60</sup>, lo cual indicaría que la segundo hipótesis es la correcta, aunque se deberían realizar experimentos

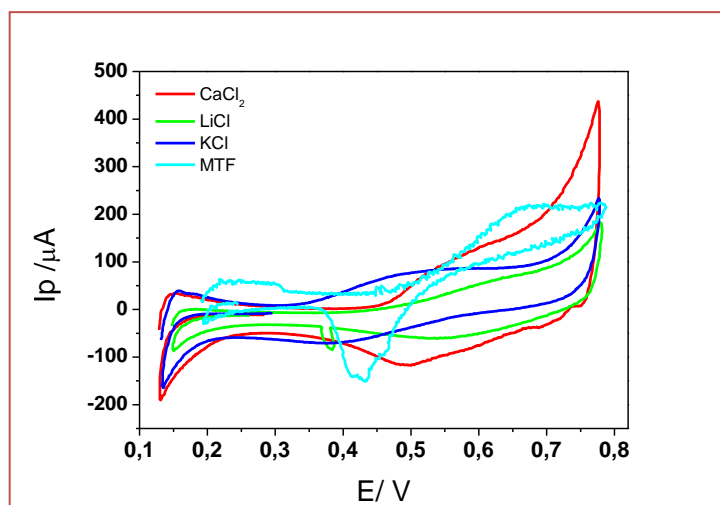
adicionales para corroborar este valor en nuestras condiciones de trabajo.



**Figura 9.9.** Corriente de pico en función de la concentración de polímero. Condiciones experimentales iguales a las de la Figura 9.8.

#### 9.4.5 Interacción de Pluronic F-127 con MTF

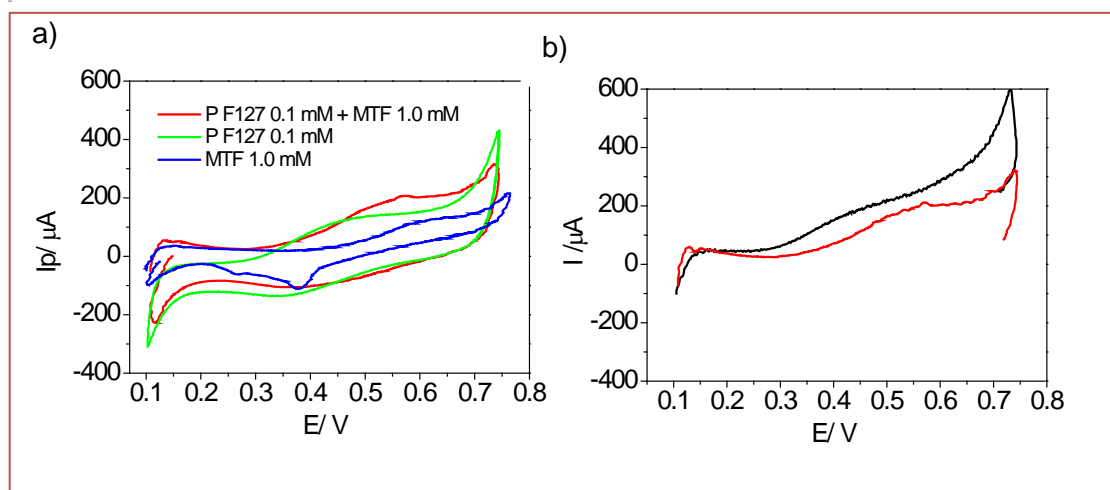
Como se mencionó al comienzo de esta sección una de las mayores aplicaciones del polímero Pluronic F-127 es la vehiculización de fármacos hidrofóbicos debido a que el polímero es capaz de encapsularlos dentro de las micelas que el mismo forma<sup>58</sup>. En base a esta propiedad, en esta sección se abordó el estudio de la interacción de Pluronic F-127 con el fármaco MTF mediante voltametría cíclica en interfaces líquido/ líquido. En la Figura 9.10, se superpusieron los voltagramas correspondientes a MTF en una concentración 0,8 mM en ausencia de polímero y los correspondientes a Pluronic F-127 en una concentración de 0,09 mM en KCl, CaCl<sub>2</sub> y LiCl. Como puede observarse, el potencial de transferencia facilitada de K<sup>+</sup> es el más alejado con respecto al potencial de transferencia de MTF en ausencia de polímero, permitiendo dilucidar mejor cualquier cambio que ocurra en caso de una interacción entre fármaco y polímero.



**Figura 9.10** Perfiles de corriente/ potencial para Pluronic® F-127 con distintos electrolitos soporte y para el fármaco MTF. Composición de la fase acuosa: Pluronic® F-127 0,09 mM + (—) KCl, (—) LiCl, (—) CaCl<sub>2</sub> 10 mM; (—) MTF 0,8 mM + KCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM.  $\nu = 0.050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Debido a la toxicidad de la MTF cuando es administrada en forma libre es de vital importancia que este fármaco se encuentre correctamente encapsulado de forma tal de prevenir los efectos nocivos antes mencionados. En función de esto, es importante determinar las interacciones del fármaco con el polímero, así como también de los iones del medio. Se realizaron experimentos a una concentración menor a la de la CMC de Pluronic F-127 y a una concentración de MTF igual a 1 mM. En la Figura 9.11a se muestran los perfiles voltamétricos para Pluronic F-127 en ausencia y presencia del fármaco así como también para MTF en ausencia del polímero.



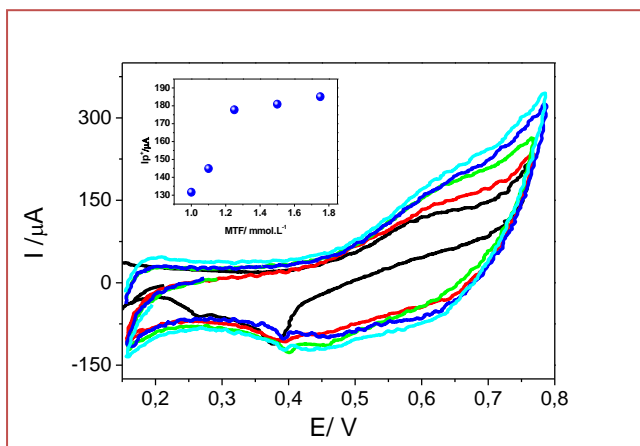


**Figura 9.11** a) Perfiles de corriente para Pluronic® F-127 y el Fármaco MTF. Composición de la fase acuosa: (-) MTF 1 mM + 10 mM KCl, (-) F-127 0.1 mM + 10 mM KCl y (-) Pluronic® F-127 0.1 mM + MTF 1 mM + 10 mM KCl. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM. b) (-) Barrido positivo del voltograma experimental para las condiciones de mezcla Pluronic F-127 + MTF igual a la mostrada en la Figura a) (-); (-) barrido positivo obtenidos a partir de la suma aritmética de las corrientes obtenidas para las soluciones de MTF y Pluronic F-127 mostradas en a) ((-) + (-))  
Velocidad de barrido 50 mV.s<sup>-1</sup>

Como se observa, en la Figura 9.11 a cuando están presentes en solución acuosa tanto el fármaco como el polímero se evidencia la aparición de un pico de corriente a un potencial intermedio al de la transferencia facilitada del potasio y a la adsorción del fármaco. Como puede notarse en la Figura 9.11 b, la corriente obtenida en este caso difiere de la simple suma aritmética de las corrientes obtenidas para el polímero y MTF por separado. Estos resultados podrían indicar que existe una interacción atractiva entre el polímero y el fármaco, ya que el potencial al cual se transfiere el fármaco en presencia de polímero es menor que el del fármaco solo. De esta manera, el polímero actuaría como ligando para la MTF facilitando su adsorción en la interfaz, lo que conduce a una disminución en su potencial de transferencia. Existen evidencias de interacciones entre los monómeros de Pluronic F-127 y de MTF que permiten explicar la formación de heteromicelas entre el polímero y el fármaco <sup>8,62</sup>.

A fin de corroborar que el pico que aparece a potenciales intermedios se deba a la transferencia del fármaco asociado a Pluronic F-127, se llevaron a cabo

experimentos a diferentes concentraciones de MTF manteniendo constante la concentración de polímero. Estos resultados se muestran en la Figura 9.12.



**Figura 9.12** Perfiles de corriente para Pluronic® F-127 y el Fármaco MTF en distintas condiciones. Composición de la fase acuosa: (-) MTF 1 mM, (-) MTF 1,1 mM, (-) MTF 1,25 mM, (-) MTF 1,50 mM, (-) MTF 1,75 mM + Pluronic® F-127 0,1 mM + KCl 10 mM. Composición de la fase orgánica: TPhAsDCC 10 mM. Velocidad de barrido 0.050 mV.s<sup>-1</sup>. Inserto: Variación de la corriente de pico positiva vs concentración de MTF.

Como se puede observar, a medida que aumenta la concentración de fármaco aumenta la corriente de pico en el potencial propuesto para la transferencia de MTF en asociación con Pluronic F-127. En el inserto de la Figura 9.12b se graficó la corriente a este potencial en función de la concentración de fármaco, como se observa si la concentración continúa aumentando se alcanza una meseta, donde la corriente se mantiene constante. Esto se debería a una saturación de las moléculas del polímero debido el fármaco esta en exceso respecto del polímero.

Los resultados obtenidos hasta el presente son promisorios en cuanto al estudio de la interacción entre fármaco y polímero con esta metodología. Como proyección futura se prevé la realización de experimentos adicionales que permitan obtener la constante de asociación entre estas especies, así como también su estequiometría.

## 9.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta sección muestran que el comportamiento del polímero Pluronic F-127 en la interfaz agua/ 1,2 DCE no presenta una señal de transferencia directa, sino que él mismo actúa como

ligando para la transferencia facilitada de los cationes desde la fase acuosa hacia la orgánica. Teniendo en cuenta la importancia de este polímero debido a sus aplicaciones biomédicas, los resultados de este capítulo pretenden contribuir con el estudio de las interacciones de Pluronic F-127 con diferentes iones, algo de vital importancia para optimizar el empleo de este polímero para vehicular drogas hidrofóbicas.

Por otra parte, se estudió la interacción de Pluronic F-127 con el fármaco MTF, debido a la posible toxicidad del fármaco en su forma libre. Los resultados de voltametría cíclica sugieren una difusión facilitada del fármaco a través de la interfaz, donde el polímero actuaría como ligando disminuyendo el potencial de transferencia facilitada del fármaco en comparación al correspondiente a la transferencia del fármaco de forma directa.

Teniendo en cuenta los resultados de esta sección resultaría interesante continuar con el estudio del comportamiento del polímero Pluronic F-127 en la interfaz agua/ 1,2 DCE de forma tal de poder dilucidar constantes de formación de este polímero con los cationes mostrados en este capítulo. Resultaría interesante profundizar el estudio de la interacción de dicho polímero con MTF de forma tal de obtener parámetros como la constante de formación del complejo polímero-fármaco como así también la estequiometría de dicho complejo. Esto mejoraría el empleo del polímero como nanotransportador optimizando el sistema Pluronic F-127-MTF.

## 9.6. Bibliografía

- [1] E.V. Batrakova, A.V. Kabanov, J. Controlled Release 130 (2008) 98–106.
- [2] J. Oyama, D.S.S.L. Lera-Nonose, Á.C.F.H. Ramos-Milaré, F.B. Padilha Ferreira, C.F. de Freitas, W. Caetano, N. Hioka, T.G.V. Silveira, M.V.C. Lonardoní, A Trop. 192 (2019) 11–21.
- [3] M.H.M. Nascimento, M.K.K.D. Franco, F. Yokaichyia, E. de Paula, C.B. Lombello, D.R. de Araujo, Int. J. Biol. Macromol. 111 (2018) 1245–1254.

- [4] Y. Jung, W. Park, H. Park, D.-K. Lee, K. Na, *Carbohydr. Polym.* 156 (2017) 403–408.
- [5] B.H. Vilsinski, D.M.B. Murtinho, M.E.S. Serra, E.F.P. Soares, P.F. Cruz, G. Braga, O. Borges, E.C. Muniz, A.F. Rubira, W. Caetano, A.J.M. Valente, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 532 (2017) 583–591.
- [6] J.K. Valenzuela-Oses, M.C. García, V.A. Feitosa, J.A. Pachioni-Vasconcelos, S.M. Gomes-Filho, F.R. Lourenço, N.N.P. Cerize, D.S. Bassères, C.O. Rangel-Yagui, *Mater. Sci. Eng. C* 81 (2017) 327–333.
- [7] L. Alonso, A. Alonso, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1858 (2016) 1160–1164.
- [8] V.A. Feitosa, V.C. de Almeida, B. Malheiros, R.D. de Castro, L.R.S. Barbosa, N.N.P. Cerize, C. de O. Rangel-Yagui, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 180 (2019) 177–185.
- [9] P.S. Toth, A.K. Rabiou, R.A.W. Dryfe, *Electrochem. Commun.* 60 (2015) 153–157.
- [10] P.S. Toth, Q.M. Ramasse, M. Velický, R.A.W. Dryfe, *Chem. Sci.* 6 (2015) 1316–1323.
- [11] J.S. Riva, K. Bierbrauer, D.M. Beltramo, L.M. Yudi, *Electrochimica Acta* 85 (2012) 659–664.
- [12] D.W.M. Arrigan, M.J. Hackett, R.L. Mancera, *Curr. Opin. Electrochem.* 12 (2018) 27–32.
- [13] J.S. Riva, R. Iglesias, L.M. Yudi, *Electrochimica Acta* 107 (2013) 584–591.
- [14] B.M.B. Felisilda, D.W.M. Arrigan, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8470–8477.
- [15] M. Vignali, R.A.H. Edwards, M. Serantoni, V.J. Cunnane, *J. Electroanal. Chem.* 591 (2006) 59–68.
- [16] B.N. Viada, A.V. Juárez, E.M. Pachón Gómez, M.A. Fernández, L.M. Yudi, *Electrochimica Acta* 263 (2018) 499–507.
- [17] T. Kakiuchi, M. Chiba, N. Sezaki, M. Nakagawa, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 701–704.
- [18] L.E. Nita, A.P. Chiriac, M. Bercea, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 119 (2014) 47–54.
- [19] R. Basak, R. Bandyopadhyay, *Langmuir* 29 (2013) 4350–4356.
- [20] J.D. Willott, T.J. Murdoch, G.B. Webber, E.J. Wanless, *Prog. Polym. Sci.* 64 (2017) 52–75.
- [21] J.L. Liu, R. Kou, G. Liu, *Soft Matter* 13 (2016) 68–80.

- [22] H.I. Okur, J. Hladílková, K.B. Rembert, Y. Cho, J. Heyda, J. Dzubiella, P.S. Cremer, P. Jungwirth, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 1997–2014.
- [23] S. Chabba, R. Vashishat, R.K. Mahajan, *J. Mol. Liq.* 222 (2016) 691–702.
- [24] T.J. Murdoch, B.A. Humphreys, E.C. Johnson, G.B. Webber, E.J. Wanless, *J. Colloid Interface Sci.* 526 (2018) 429–450.
- [25] B.A. Deyerle, Y. Zhang, *Langmuir* 27 (2011) 9203–9210.
- [26] S.E. Hill, D. Feller, E.D. Glendening, *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 3813–3819.
- [27] S. Yagi, S. Nakamura, D. Watanabe, H. Nakazumi, *Dyes Pigments* 80 (2009) 98–105.
- [28] E. Arunkumar, P. Chithra, A. Ajayaghosh, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6590–6598.
- [29] J.D. Willott, T.J. Murdoch, G.B. Webber, E.J. Wanless, *J. Am. Chem. Soc.* 64 (2017) 52–75.
- [30] E.L. Britton, “Effects of Hofmeister Ions on Gelation of Gelatin and Pluronic Hydrogels” 2018. The University of Akron.
- [31] A.M. Hyde, S.L. Zultanski, J.H. Waldman, Y.-L. Zhong, M. Shevlin, F. Peng, *Org. Process Res. Dev.* 21 (2017) 1355–1370.
- [32] E. Florin, R. Kjellander, J.C. Eriksson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* 80 (1984) 2889–2910.
- [33] F.A. Long, W.F. McDevit, *Chem. Rev.* 51 (1952) 119–169.
- [34] S.R. Erlander, *J. Macromol. Sci. Part - Chem.* 2 (1968) 1065–1072.
- [35] N.C. Deno, C.H. Spink, *J. Phys. Chem.* 67 (1963) 1347–1349.
- [36] P. Perez-Tejeda, A. Maestre, P. Delgado-Cobos, J. Burgess, *Can. J. Chem.* 68 (1990) 243–246.
- [37] P.K. Nandi, D.R. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 1299–1308.
- [38] S.Z. Moghaddam, E. Thormann, *J. Colloid Interface Sci.* 465 (2016) 67–75.
- [39] K.P. Ananthapadmanabhan, E.D. Goddard, *J. Colloid Interface Sci.* 113 (1986) 294–296.
- [40] L.H.M. da Silva, W. Loh, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 10069–10073.
- [41] K.P. Ananthapadmanabhan, E.D. Goddard, *Langmuir* 3 (1987) 25–31.
- [42] G.W. Gokel, W.M. Leevy, M.E. Weber, *Chem. Rev.* 104 (2004) 2723–2750.
- [43] T.V. Plisko, A.V. Penkova, K.S. Burts, A.V. Bilyukevich, M.E. Dmitrenko, G.B. Melnikova, R.R. Atta, A.S. Mazur, A.A. Zolotarev, A.B. Missyul, *J. Colloid Interface Sci.* 580 (2019) 339–358
- [44] S. Llamas, A.J. Mendoza, E. Guzmán, F. Ortega, R.G. Rubio, *J. Colloid Interface Sci.* 400 (2013) 49–58.

- [45] S. Yang, G. Wen, S. Pispas, K. You, *Polymer* 172 (2019) 66–74.
- [46] T.J. Murdoch, B.A. Humphreys, E.C. Johnson, G.B. Webber, E.J. Wanless, J. *Colloid Interface Sci.* 526 (2018) 429–450.
- [47] Y. Man, S. Li, Q. Diao, Y.-I. Lee, H.-G. Liu, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 570 (2019) 377–385.
- [48] T.V. Plisko, A.V. Penkova, K.S. Burts, A.V. Bilyukevich, M.E. Dmitrenko, G.B. Melnikova, R.R. Atta, A.S. Mazur, A.A. Zolotarev, A.B. Missyul, *J. Membr. Sci.* 580 (2019) 336–349.
- [49] D. Homolka, K. Holub, V. Mareček, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 138 (1982) 29–36.
- [50] Z. Samec, V. Mareček, J. Weber, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 100 (1979) 841–852.
- [51] M. Durmaz, E. Zor, E. Kocabas, H. Bingol, E.G. Akgemci, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 5316–5321.
- [52] S.A. Dassie, L.M. Yudi, A.M. Baruzzi, *J. Electroanal. Chem.* 464 (1999) 54–60.
- [53] Y. Shao, S.N. Tan, V. Devaud, H.H. Girault, *J Chem Soc Faraday Trans* 89 (1993) 4307–4312.
- [54] K.-C. Shih, Z. Shen, Y. Li, M. Kröger, S.-Y. Chang, Y. Liu, M.-P. Nieh, H.-M. Lai, *Soft Matter* 14 (2018) 7653–7663.
- [55] M.J. Hey, D.P. Jackson, H. Yan, *Polymer* 46 (2005) 2567–2572.
- [56] T. Kakiuchi, M. Senda, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 300 (1991) 431–445.
- [57] H. Wang, G.R. Williams, J. Wu, J. Wu, S. Niu, X. Xie, S. Li, L.-M. Zhu, *Int. J. Pharm.* 559 (2019) 289–298.
- [58] M. Managa, J. Britton, E. Prinsloo, T. Nyokong, *Polyhedron* 152 (2018) 102–107.
- [59] M. Managa, J. Britton, E.K. Amuhaya, T. Nyokong, *J. Lumin.* 185 (2017) 34–41.
- [60] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton, *Macromolecules* 27 (1994) 2414–2425.
- [61] I. Venditti, *J. King Saud Univ. - Sci.* 31 (2019) 398–411.
- [62] B. de Castro, P. Gameiro, J.L.F.C. Lima, C. Matos, S. Reis, *Mater. Sci. Eng. C* 18 (2001) 71–78.

---

Parte IV:

Conclusiones

---

---

# Capítulo 10

## Conclusiones

---



## 10. Conclusiones

La presente tesis pretende contribuir al conocimiento del comportamiento electroquímico de surfactantes de distinta naturaleza en la interfaz formada por dos soluciones electrolíticas inmiscibles, ITIES por sus siglas en inglés: Ion transfer at the interfacial two immiscible electrolyte solutions, mediante diferentes técnicas como voltametría cíclica (VC), voltametría de pulso diferencial (VPD), voltametría de corriente alterna, ACV por sus siglas en inglés y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE). Estas técnicas permitieron determinar parámetros importantes de los surfactantes como su concentración micelar crítica (CMC), número de agregación como así también correlacionar el mecanismo de transferencia con la estructura de los mismos. Además se estudió la actividad superficial de tensioactivos aniónicos perfluorados en la interfaz agua/ aire mediante el análisis de las isothermas de Langmuir y microscopía de ángulo de Brewster (BAM). También se evaluó su interacción con monocapas y vesículas de fosfolípidos mediante nefelometría y dispersión dinámica de luz (DDL). Se estudiaron los siguientes surfactantes aniónicos perfluorados ácido perfluorooctanoico (PFO), ácido perfluorononanoico (PFN), ácido perfluorodecanoico (PFD) y ácido perfluorooctanosulfónico (PFOS), el surfactante zwitteriónico Miltefosina (hexadecilfosfocolina) y el surfactante no-iónico polimérico Pluronic F-127.

En lo que respecta a los resultados obtenidos para PFO, PFN y PFD se propone la voltametría cíclica en las interfaces líquido / líquido como una metodología útil para la determinación de la CMC de tensioactivos cargados, siempre que puedan transferirse a través de la interfaz. Los valores de CMC se evalúan a partir del cambio brusco de la corriente voltamétrica en función de la concentración de surfactante. Los valores obtenidos concuerdan con los determinados por métodos convencionales, validando la técnica propuesta en la presente tesis. Del mismo modo, el coeficiente de

difusión de las micelas pudo determinarse a partir de los valores obtenidos por voltametría cíclica, previa evaluación del número de agregación mediante métodos espectrofluorimétricos. Los experimentos de espectroscopía de impedancia mostraron que a altas concentraciones de surfactante la actividad superficial del tensioactivo es mayor formando dominios descubiertos y cubiertos, en la interfaz líquido / líquido. Estos resultados contribuyen al conocimiento del comportamiento de tensioactivos y micelas en una interfaz formada por dos solventes inmiscibles, lo cual es particularmente importante considerando las principales aplicaciones de las micelas. Estas estructuras pueden transportar diferentes sustancias a través de distintos medios, ya que pueden generar un ambiente polar o apolar dependiendo del caso, haciéndolas muy útiles como nano transportadoras para un diverso número de compuestos. La posibilidad de controlar la entrada y salida de estas especies del agua al solvente orgánico, y viceversa, aplicando una diferencia de potencial, es una estrategia interesante para predecir el comportamiento de las micelas en tales interfaces, lo cual contribuye a evaluar su utilidad industrial, como la formación de espuma, humectación, emulsión y solubilización de compuestos de interés.

Se estudió el efecto del PFD<sup>-</sup> sobre monocapas de fosfolípidos formadas en la interfaz agua/ aire proponiendo que el mismo depende fundamentalmente de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los fosfolípidos que componen la monocapa y el surfactante aniónico. Los fosfolípidos empleados para este estudio fueron: 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfato (DSPA), 1,2-diestearoil-sn-3-fosfoetanolamina (DSPE), y 1,2-dilauril-sn-glicerol-3-fosfato (DLPA). PFD mostró un efecto sobre las monocapas de estos fosfolípidos, siendo éste mayor sobre DLPA, lípido que forma la monocapa menos compacta. Las imágenes obtenidas a través de microscopía de ángulo de Brewster concuerdan con los resultados anteriores. PFD afecta la nucleación y compactación de dominios de DLPA generando películas miscibles con este fosfolípido, no así con DSPA y DSPE. Por otra parte, PFD es capaz

de penetrar monocapas preformadas de los fosfolípidos estudiados en valores de presión superficial superiores a  $25\text{-}30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , valor promedio de presión de la membrana celular. Con respecto al efecto sobre vesículas se evidenció que el surfactante se inserta en estos agregados aumentando su tamaño promedio. Finalmente, estos resultados sugieren que PFD podría tener efectos negativos en sistemas biológicos dado que puede penetrar en modelos de membranas (LUVs o monocapas) a valores de presión superficial similares a los propuestos para la presión lateral en una bicapa celular, independientemente de la composición lipídica. Este hecho puede tener varios efectos, modificando la bicapa desde un punto estructural y alterando su funcionalidad. Estos efectos cobran importancia si se considera que estas moléculas son un tipo de contaminantes, cuya presencia en el ambiente han adquirido relevancia en los últimos años.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, se propuso una metodología para la detección y cuantificación de los surfactantes perfluorados en muestras de interés ambiental. De esta manera, se logró una detección ultrasensible de PFOS<sup>-</sup> basada en una etapa de preconcentración a potencial constante durante cinco minutos seguido de una etapa voltamétrica que permite la detección de niveles picomolares del analito en solución acuosa. Se demostró que los PFCs se pueden detectar en la interfaz líquido-líquido mediante un arreglo de  $\mu\text{TIES}$  soportadas en una membrana de vidrio. Esto último abre la posibilidad de emplear este sistema para desarrollar un sensor portátil que permita la detección y seguimiento de surfactantes perfluorados de interés ambiental "in situ" utilizando un método relativamente rápido y sencillo.

De esta manera la presente tesis contribuye con el estudio de surfactantes perfluorados desde 3 enfoques. El primero respecto al comportamiento interfacial de los compuestos tanto como monómeros como en sus estructuras auto agregadas,

logrando determinar parámetros importantes de los mismos. El segundo, respecto a la posible toxicidad de estos tensioactivos evaluando su efecto sobre monocapas y vesículas de distintos fosfolípidos empleados como modelos de membranas biológicas. El tercero, que surge como consecuencia del segundo, se relaciona con la detección de surfactantes perfluorados en el ambiente.

Otro surfactante estudiado fue el fármaco miltefosina (MTF). Existen diversas técnicas de cuantificación de este. Sin embargo dichas técnicas tienen muchas desventajas ya que se trata de métodos complejos y generalmente muy costosos. Además, la MTF no posee grupos cromóforos, con lo cual su cuantificación por métodos espectroscópicos no es viable. Teniendo en cuenta esto, se puede proponer a la voltametría cíclica en interfaces líquidas como una metodología útil para la cuantificación de MTF en ITIES. Se obtuvo una respuesta lineal de la corriente con la concentración de fármaco en un intervalo aceptable, esto se logra empleando una metodología que consiste en esperar determinados tiempos a circuito abierto, logrando una concentración adecuada del fármaco en la interfaz lo cual mejora la respuesta analítica. De esta manera se puede emplear esta metodología como alternativa a los métodos convencionales para la cuantificación de MTF.

El polímero Pluronic F-127 es un surfactante no-iónico y capaz de formar micelas, lo que le permite actuar como nanotransportador, una aplicación muy importante en la industria farmacéutica. En base a esto y a su capacidad de interaccionar con el fármaco MTF se estudió su comportamiento en ITIES, concluyendo que la señal obtenida en experimentos de voltametría cíclica cuando pluronic F-127 está presente en la fase acuosa no se deben a la transferencia directa del mismo, sino a que actúa como ligando para la transferencia facilitada de cationes desde la fase acuosa hacia la orgánica. Por otra parte, los resultados voltamétricos indicarían una posible interacción de Pluronic F-127 y el fármaco MTF lo cual puede

contribuir a mejorar el empleo del fármaco y disminuir sus efectos colaterales observados en su administración oral.

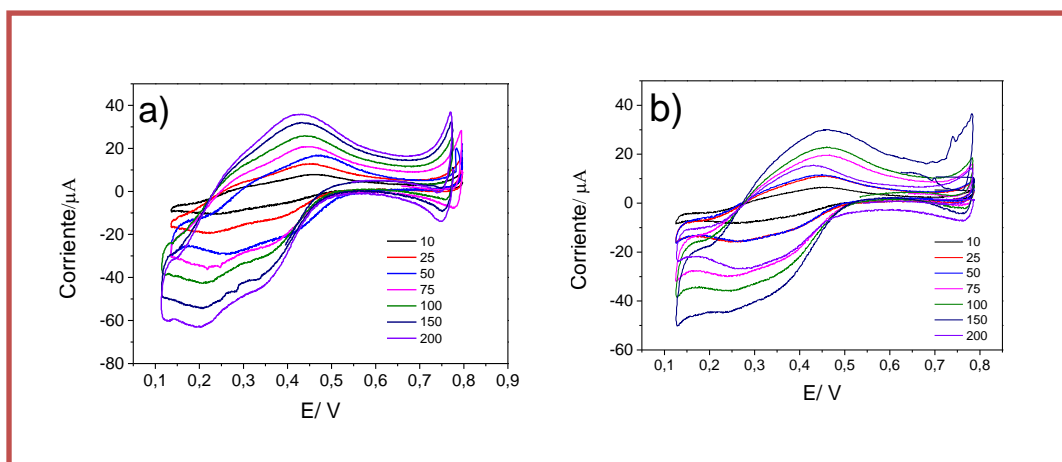
Los resultados obtenidos en la presente tesis permiten concluir que la interfaz formada por dos soluciones electrolíticas inmiscibles constituye un sistema idóneo para el estudio de surfactantes cargados. Mediante diferentes técnicas electroquímicas se logró estudiar el comportamiento de estos compuestos, de las nanopartículas formadas por estos y sus interacciones con otras moléculas. Por otra parte, se logró la cuantificación de tensioactivos mediante el uso de una microinterfaz, demostrando que las técnicas electroquímicas en interfaces líquidas no solo permiten estudiar el comportamiento de surfactantes sino también emplearlas con fines analíticos.

---

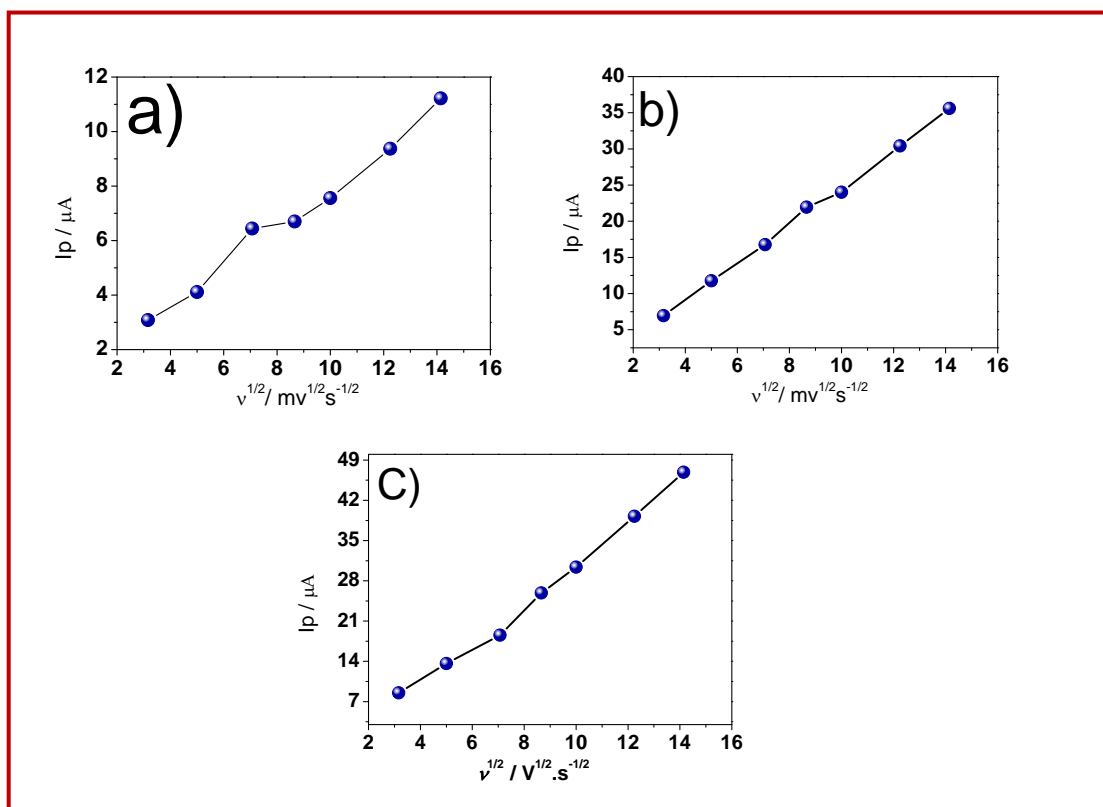
# Anexo

---

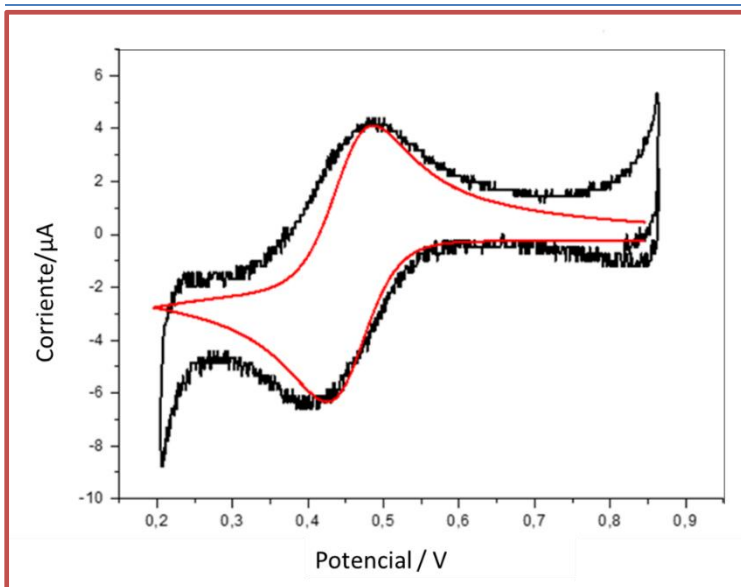
## Anexo



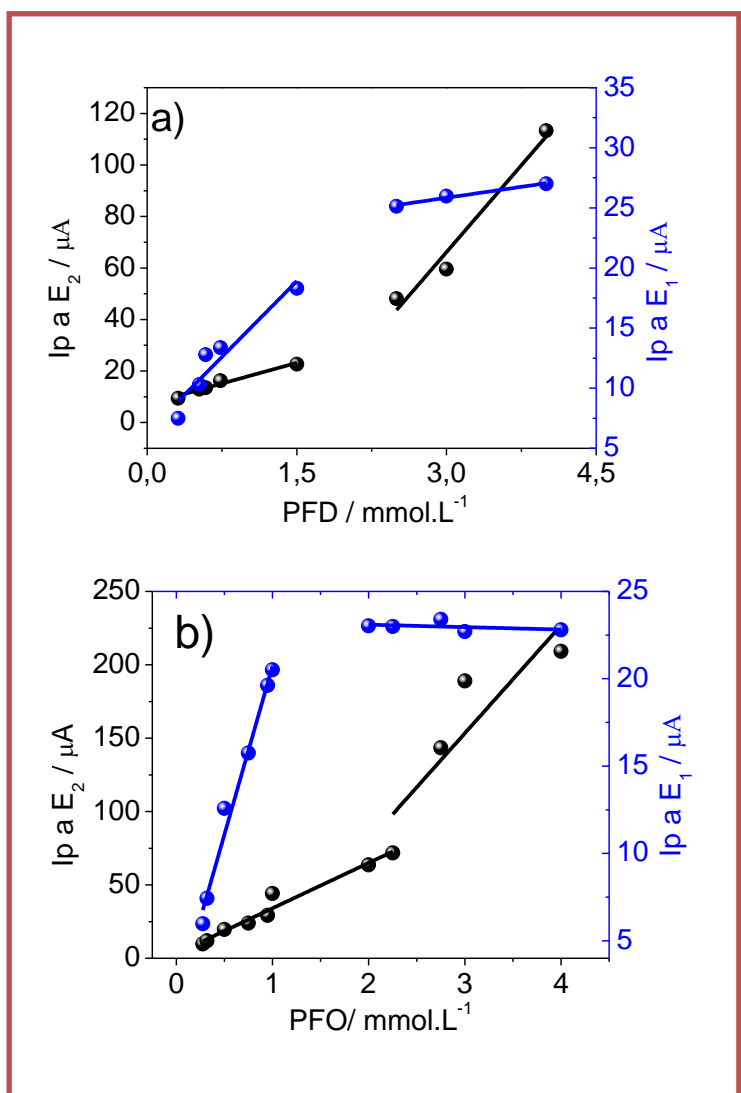
**Anexo Figura 1.** CVs para la transferencia a) PFD o b) PFO en la interfaz agua/1,2-dicloroetano a diferentes velocidades de barrido. Composición de la fase acuosa: PFD o PFO + LiCl 10 mM Composición de la fase orgánica: TPnATCIPhB 10, mM.  
 $V = 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.150$  y  $0.200 \text{ Vs}^{-1}$



**Anexo Figura 2.** Corriente de pico negativa ( $I_p^-$ ) del segundo proceso en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ) para a) PFO⁻, b) PFN⁻ y c) PFD⁻,  
**Composición de la fase acuosa:** Acido perfluorado 0,25 mM + LiCl 10 mM  
**Composición de la fase orgánica:** TPnATCIPhB 10,00 mM.

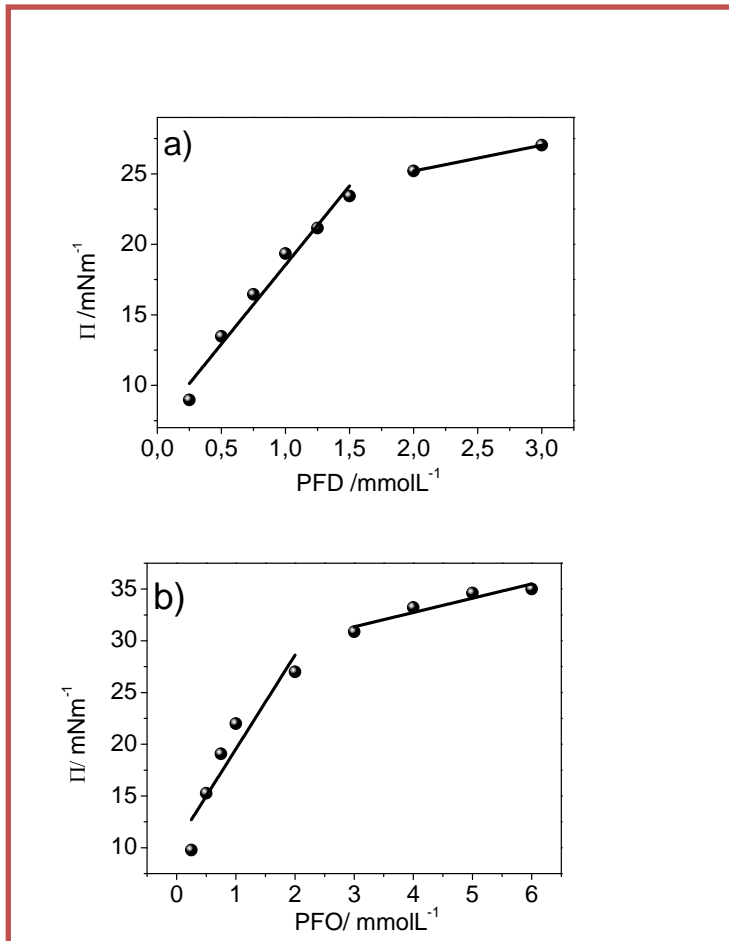


**Anexo Figura 3.** Comparación entre voltograma experimental y simulación a partir de un modelo teórico para la transferencia de PFN a través de la interfaz agua / 1,2-DCE

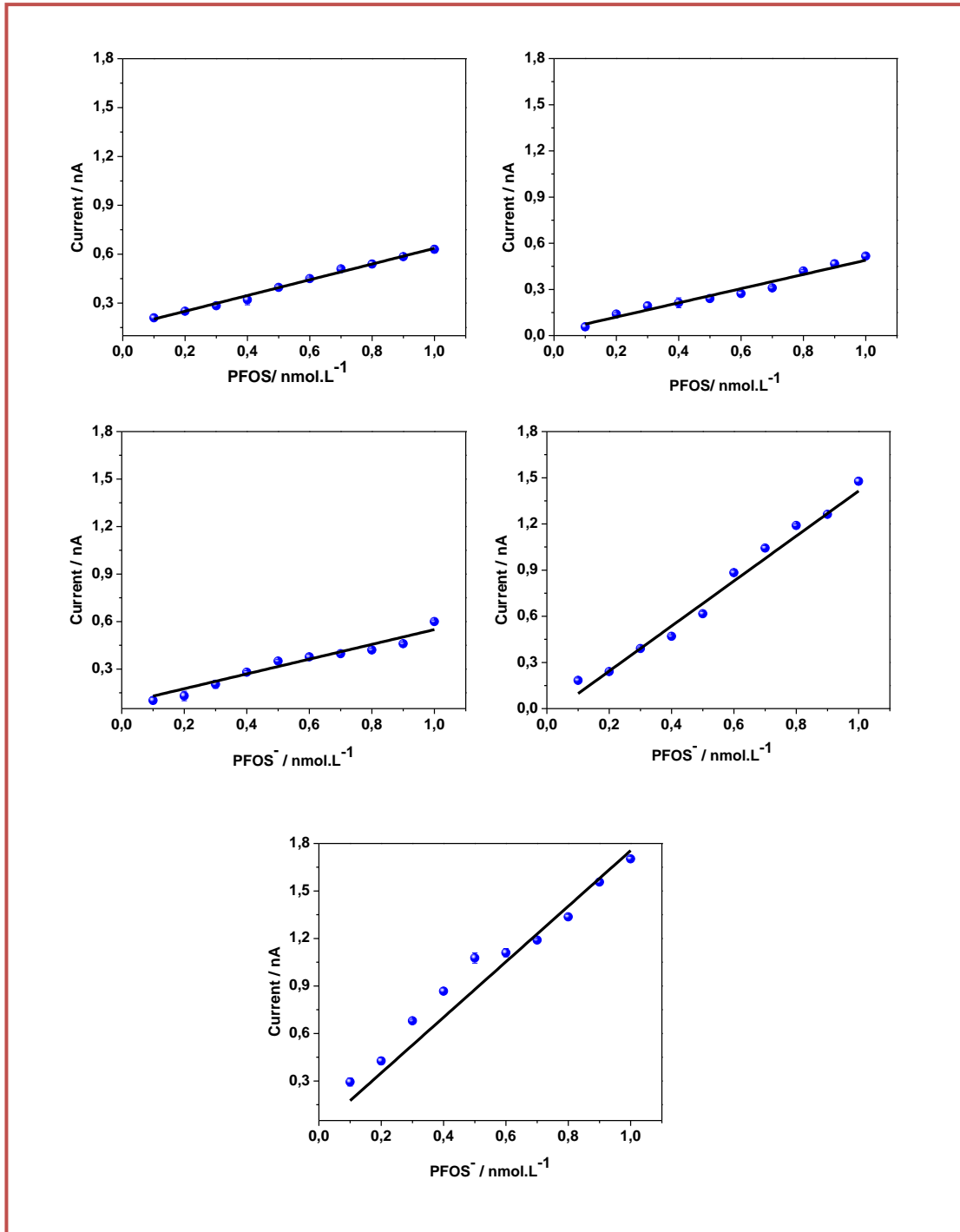


**Anexo Figura 4.** Variación de la corriente de pico positivo para los procesos del primer y segundo pico en función de la concentración para: a) PFD y b) PFO. Composición de la fase acuosa: PFD o PFO + LiCl 10mM Composición de la fase orgánica: TPnATCIPhB 10.00 mM.





**Anexo Figura 4.** Variación de la presión estacionaria ( $\pi$ ) con la concentración de: a) PFD o b) PFO. Composición de la subfase: LiCl 10mM



**Anexo Figura 5.** Variación de la corriente de pico en función de la concentración de PFOS<sup>-</sup> en los experimentos de SVPD para a) Agua filtrada, b) Agua de red, c) agua de mar, d) agua filtrada sin LiCl y e) agua de mar cin LiCl.

