



**Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires**

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO Y ESTUDIOS DE APLICABILIDAD DE MATERIALES
HÍBRIDOS BIO-INSPIRADOS
DERIVADOS DE POLIANFOLITOS Y POLIELECTROLITOS.**

Lic. Lucía Victoria Lombardo Lupano.

Directora: Dra. Viviana Campodall' Orto.

Lugar de trabajo: Cátedra de Química Analítica.
IQUIFIB-CONICET.

Año 2016

A la memoria de mi abuelo: Ing. Oscar Alberto Lupano

*"Hay una cualidad que tanto al artista como al científico les ayuda a ser únicos: **la imaginación**"*

Juan Carlos Ispizúa

Agradecimientos:

A la Universidad de Buenos Aires, especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por la formación de grado; y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por el espacio físico brindado y la posibilidad de realizar mi doctorado en esta casa de estudios.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada para llevar a cabo este trabajo y los subsidios que posibilitaron su concreción.

A la Cátedra de Química Analítica (FFyB-UBA) y al IQUIFIB-CONICET, por el espacio brindado y el equipamiento para llevar adelante esta labor. En particular, a la Dra. Irene Rezzano.

A la Dra. Viviana Campodall' Orto, por su disposición para dirigir mi trabajo, por su ayuda y su paciencia en todo momento, y sus valiosas observaciones y comentarios durante la lectura de los distintos capítulos.

Al Dr. Juan Manuel Lázaro Martínez por las mediciones de NMR, reactivos y todos los provechosos aportes dados a lo largo de estos años; al personal de la cátedra de Química Orgánica de la FFyB por facilitar materiales y reactivos, en especial, a la Dra. Graciela Y. Buldain; al instituto FaMAF-UNC, por las mediciones de NMR.

A las Dras. Rosa Torres y Mariela Fernández, por la asistencia con las mediciones de potencial zeta, por haberme enseñado a usar el equipo y por haber sido siempre tan hospitalarios, toda vez que concurrí al CETMIC-CEC de Gonnet.

A los Dres.: Lidia Piehl, por las mediciones de ESR y Emilio Rubín de Celis, por sus simulaciones, que contribuyeron a la elucidación de mecanismos de producción de radicales.

A los Dres. Jorge Vega y Mariana Yossen de INTEC-Santa Fe, por las determinaciones de exclusión molecular.

A las Cátedras de Tecnología Farmacéutica y Biotecnología, de la FFyB-UBA por las liofilizaciones y por la enzima peroxidasa (SBP), respectivamente.

Al Dr. Eduardo Acosta, de GLOmAe-FIUBA, por facilitarme el equipo para las mediciones de viscosidad.

A la Dra. Rosa Erra-Balsells por los experimentos de MALDI y sus valiosas contribuciones a la elucidación estructural de los oligómeros solubles.

A la Farm. Pamela González Clar y la Est. Laura del Río, no sólo por su colaboración con los experimentos (de remoción de colorantes, Pame y de CZE y diálisis, Laura) sino también por haber estado en las épocas fundacionales del LIP...

Al Lic. Martín Ramallo (DBBE-FCEN-UBA) por enseñarme el uso del micrótopo y por las imágenes de microscopía óptica de los materiales insolubles

Al Bioq. Lisandro Roberto Denaday por su colaboración en la realización de los experimentos relacionados con la etapa de desarrollo del biorreactor enzimático.

A todos mis compañeros de la cátedra de QA-FFyB-UBA durante estos años, por los momentos compartidos, el apoyo y los consejos.

A la Lic. Eugenia Carrera, por la contención y el acompañamiento durante este y otros procesos de mi vida.

Al eterno, inefable y siempre presente "Staff Ingrávido"; a Juli, mi amiga desde mis primeros tiempos en la facultad y que es en gran parte responsable de mi incursión en el mundo de la química; a las Anitas y a todos los que la FCEN puso en mi camino y que hicieron tan especiales los años de estudio transcurridos...

A los amigos del "ámbito-no académico" porque después de todo, tenemos una vida afuera: Mariela, Agus, Dani, Fernando, Cristina y "los demás..." Por escucharme cuando necesitaba "hablar de la tesis" y por distraerme cuando no quería hablar de eso... Eternas gracias.

A mi mamá, por su vocación investigadora, por su amor y defensa de la Educación Pública, por ser un ejemplo de esfuerzo y consecuencia con sus ideas, a la familia que está atrás, a mi tía Haydee y a Gladys, que es como de la familia...

A los que estuvieron en algún momento de este camino y son parte también de esta tesis, a los que están, a los que llegan, y con distintas contribuciones, supieron dejar una impronta en estas páginas...

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	10
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	12
1.1. Antecedentes	12
1.2. Objetivos de la Tesis	26
1.3. Referencias del Capítulo 1.	27
Capítulo 2: POLÍMEROS INSOLUBLES EN AGUA	29
2.1. Caracterización de polímeros insolubles y sus complejos con Co(II) y Cu(II)	29
2.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	29
2.1.2. Resonancia magnética nuclear (NMR)	31
2.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TG)	35
2.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDS)	37
2.1.5. Propiedades ácido-base	40
2.1.6. Conclusiones de la Sección 2.1	47
2.2. Estudios de captación de gases, de iones inorgánicos, iones orgánicos y compuestos biológicos, por los polímeros insolubles en agua	48
2.2.1. Captación de N ₂ y de vapor de H ₂ O	48
2.2.2. Captación de Co(II) y Cu(II)	51
2.2.3. Captación de Direct Blue 273 (DB273), un colorante azo aniónico	57
2.2.4. Adsorción de la enzima peroxidasa de cáscara de semilla de soja (SBP) y obtención de un reactor enzimático	64
2.2.4.1. Caracterización del lote de <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	64
2.2.4.2. Caracterización del complejo SBP- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	65
2.2.4.3. Estabilización del complejo SBP- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	65
2.2.4.4. Parámetros cinéticos de SBP libre e inmovilizada, en batch.	66
2.2.4.5. Desempeño del reactor basado en el complejo SBP- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	67
2.2.4.5.1. Ensayos con diferentes sustratos dadores de electrones	67
2.2.4.5.2. Caracterización cinética del reactor en el sistema de flujo. Determinación de parámetros enzimáticos y restricciones difusionales.	68
2.2.5. Conclusiones de la Sección 2.2.	72
2.3. Estudios de activación de H ₂ O ₂ catalizada por los complejos Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI), Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA) y Cu(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	74
2.3.1. Activación de H ₂ O ₂ con Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	74

2.3.2. Activación de H ₂ O ₂ con Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA) y con Cu(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	75
2.3.3. Producción de radicales libres	77
2.3.3.1. Identificación de radicales libres en el sistema heterogéneo Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) / H ₂ O ₂	77
2.3.3.2. Identificación de radicales libres en los sistemas heterogéneos Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA) / H ₂ O ₂ y Cu(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA) / H ₂ O ₂	82
2.3.4. Estudio comparativo de activación de H ₂ O ₂ en sistemas con Co(II) y Cu(II)	84
2.3.4.1. Producción de radicales libres empleando complejos con Co(II)	84
2.3.4.2. Producción de radicales libres empleando complejos con Cu(II)	84
2.3.5. Producción de O ₂	94
2.3.6. Mediciones potenciométricas	95
2.3.7. Estados de oxidación de los iones metálicos en los complejos	96
2.3.8. Posibles mecanismos de activación de H ₂ O ₂	97
2.3.8.1. Sistemas con Co(II)	97
2.3.8.2. Sistemas con Cu(II)	98
2.3.9. Conclusiones de la Sección 2.3	101
2.4. Referencias del Capítulo 2	103
Capítulo 3: OLIGÓMEROS SOLUBLES EN AGUA.	106
3.1. Síntesis de material derivado de EGDE, IM y MAA, soluble en agua	106
3.1.1. Monitoreo de la síntesis por espectroscopía FT-IR	107
3.1.2. Discusión de la evidencia obtenida	111
3.2. Caracterización por NMR	112
3.3. Caracterización por electroforesis capilar (CZE)	115
3.4. Propiedades ácido-base	118
3.5. Caracterización por mediciones de potencial zeta (ζ), de viscosidad y estudios de solubilidad	121
3.6. Determinación de peso molecular del producto “oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)”	127
3.7. Conclusiones del Capítulo 3	134
3.8. Referencias del Capítulo 3	136
Capítulo 4: ESTUDIOS DE APLICABILIDAD DE LOS MATERIALES DESARROLLADOS	137
4.1. Decoloración de Naranja de metilo (MO)	137

4.1.1. Complejo de <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) con Co(II)	139
4.1.1.1. Estudios cinéticos	139
4.1.1.2. Estudios de estabilidad química del MO captado por las partículas de catalizador	141
4.1.1.3. Efecto de las proporciones catalizador / solución de MO	142
4.1.1.4. Estudio de los mecanismos probables de degradación de MO	144
4.1.1.5. Reciclado del catalizador y estabilidad química	146
4.1.2. Complejos de <i>Poly</i> (EGDE-DA) con Co(II) y con Cu(II)	148
4.1.2.1. Estudios cinéticos	148
4.1.2.2. Comparación de eficiencia de los sistemas catalíticos basados en <i>Poly</i> (EGDE-DA) con Co(II) y con Cu(II)	149
4.1.2.3. Decoloración de MO en presencia de <i>Poly</i> (EGDE-DA)	151
4.1.2.4. Evidencia sobre los productos de degradación obtenidos	151
4.1.2.5. Estudio de los mecanismos probables de degradación de MO	153
4.1.3. Conclusiones de la Sección 4.1	155
4.2. Oxidación parcial de Epinefrina	156
4.2.1. Estudios cinéticos	156
4.2.2. Conclusiones parciales de la Sección 4.2	158
4.3. Decoloración de soluciones del colorante aniónico Direct Blue 273 (DB273) empleando oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)	159
4.3.1. Estudios cinéticos y caracterización del macroagregado insoluble	159
4.3.2. Conclusiones de la Sección 4.3	161
4.4. Aplicación de oligómeros (EGDE-IM-co-MAA) en la preparación de esferas huecas	162
4.4.1. Desarrollo de las esferas huecas y caracterización del material constitutivo	162
4.4.2. Conclusiones de la Sección 4.4	164
4.5. Aplicaciones analíticas del reactor enzimático basado en SBP-<i>Poly</i>(EGDE-MAA-2MI)	164
4.5.1. Análisis de <i>Ilex paraguariensis</i> (yerba mate)	165
4.5.2. Análisis de vino tinto	167
4.5.3. Conclusiones de la Sección 4.5	172
4.6. Referencias del Capítulo 4	173
Capítulo 5: CONCLUSIONES GENERALES	175
Capítulo 6: EXPERIMENTAL	181
6.1. Síntesis de materiales poliméricos	181
6.1.1. Reactivos empleados	181
6.1.2. Método de síntesis del polianfolito insoluble en agua denominado	181

<i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	181
6.1.3. Método de síntesis del polielectrolito insoluble en agua denominado <i>Poly</i> (EGDE-DA)	181
6.1.4. Método de síntesis de oligómeros solubles en agua denominados <i>oligómeros</i> (EGDE-IM- <i>co</i> -MAA)	181
6.2. Preparación de complejos y métodos de caracterización	182
6.2.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR), análisis elemental y espectroscopía UV-visible	182
6.2.2. Resonancia magnética nuclear (NMR)	182
6.2.3. Microscopías	183
6.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TG)	183
6.2.5. Estudios del equilibrio de captación de Co(II) por <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	183
6.2.6. Estudios del equilibrio de captación de Co(II) por <i>Poly</i> (EGDE-DA)	184
6.2.7. Estudios del equilibrio de captación de Cu(II) por <i>Poly</i> (EGDE-DA)	184
6.2.8. Estudios del equilibrio de captación de Direct Blue 273 por <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	184
6.2.9. Ajuste de datos experimentales por regresión no lineal y procedimiento para juzgar la bondad del ajuste	185
6.2.10. Preparación del complejo Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) para su uso como catalizador	185
6.2.11. Preparación del complejo Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA) y Cu(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA) para su uso como catalizador	185
6.2.12. Determinación de las isotermas de adsorción de N ₂ y de H ₂ O	186
6.2.13. Determinación de densidad de grupos funcionales por titulación potenciométrica	186
6.2.14. Potencial zeta (ζ)	186
6.2.15. Electroforesis capilar (CZE)	187
6.2.16. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	187
6.2.17. Mediciones de viscosidad	187
6.2.18. Espectrometría de masa: UV MALDI-TOF MS (desorción / ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo)	187
6.3. Estudios de activación de H₂O₂ catalizada por complejos con Co(II) y Cu(II)	188
6.3.1. Determinación de H ₂ O ₂	188
6.3.2. Detección de radicales libres por Resonancia de Spin Electrónico (ESR)	188
6.3.3. Medición de presión parcial de O ₂	189
6.3.4. Medición de potencial rédox (<i>E</i>)	189
6.3.5. Medición de Co(II) y Cu(II) unidos al catalizador y liberados al medio de reacción	189
6.3.6. Decoloración de soluciones de Naranja de Metilo(MO)	189
6.3.6.1. Decoloración de MO empleando Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	190
6.3.6.2. Decoloración de MO empleando Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA) y Cu(II)-	191

<i>Poly</i> (EGDE-DA)	191
6.3.7. Oxidación parcial de Epinefrina	191
6.4. Aplicaciones de oligómeros solubles en agua	192
6.4.1. Decoloración de soluciones del colorante DB273 con oligómeros solubles en agua	192
6.4.2. Formación de cápsulas huecas con oligómeros solubles en agua	192
6.5. Obtención de un reactor enzimático para aplicaciones analíticas en un sistema de flujo	192
6.5.1. Instrumental	192
6.5.2. Preparación del complejo SBP- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) y determinación de proteína inmovilizada	192
6.5.3. Experimentos cinéticos de oxidación de fenol catalizada por SBP, en batch	192
6.5.4. Preparación y caracterización del reactor en flujo de SBP inmovilizada	192
6.5.5. Preparación de extractos de yerba mate	194
6.5.6. Preparación de las muestras de vino tinto	194
6.6. Referencias del Capítulo 6	195
ABREVIATURAS	196

RESUMEN

Este trabajo de Tesis aborda la obtención y caracterización de materiales bio-inspirados, particularmente complejos de coordinación con Co(II) y Cu(II) que emulan la actividad selectiva de moléculas biológicas, así como los estudios de aplicabilidad de estos nuevos productos en procesos de interés ambiental, industrial, biotecnológico y analítico.

Se procedió a la obtención y caracterización de los complejos denominados Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) y Co(II)-*Poly*(EGDE-DA), a la vez que se completó la caracterización del complejo Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA).

Para los polímeros insolubles en agua y sus complejos se efectuó una caracterización exhaustiva por FT-IR, NMR en sólidos, análisis térmico (DSC y TG), microscopía electrónica (SEM y EDS), y estudios de las propiedades ácido-base. A partir de esta información experimental fue posible confirmar la coordinación de los iones metálicos mediante los grupos donores de electrones de la red polimérica, el aumento en el grado de reticulación y rugosidad de los materiales, y la disminución en su estabilidad térmica.

Sobre los materiales poliméricos insolubles se efectuaron estudios de los equilibrios de captación de los iones metálicos (Co(II) y Cu(II)), que contribuyeron a elucidar la naturaleza de la interacción y la energía asociada.

Se estudió la captación del colorante Direct Blue 273 sobre *Poly*(EGDE-MAA-2MI), como modelo de compuesto orgánico con sustituyentes cargados negativamente en su interacción con un polianfolito. Llevando más adelante esta idea, se estudió la adsorción de la enzima SBP sobre otro lote de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) con el fin de preconcentrarla e inmovilizarla para la preparación de un biorreactor en sistema de flujo.

Una de las propiedades más interesantes de los complejos de coordinación obtenidos fue su actividad catalítica en la activación de H₂O₂ para dar lugar a la formación de radicales libres y O₂. Era ya conocida la actividad activadora de los complejos con Cu(II), que fue verificada para el sistema heterogéneo Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA).

Para todos los sistemas heterogéneos con Co(II) y Cu(II) se efectuaron estudios de ESR que permitieron identificar los radicales libres producidos, mediante la estrategia de atrapamiento de spin con DMPO. Para el caso de los complejos con Co(II), se pudo verificar que se obtenían radicales O₂^{•-} y OH[•]. Esta evidencia junto con la detección de O₂ y con la información de los ensayos de XPS permitió delinear mecanismos de producción de radicales libres por activación de H₂O₂ en sistema heterogéneo.

La modificación del proceso de síntesis de polianfolitos insolubles permitió obtener un nuevo producto bio-inspirado, soluble en agua. Se trata de un nuevo material bio-inspirado porque posee en su estructura residuos -COO⁻ y restos imidazol (IM) polimerizados, que emulan la composición de biomoléculas. La modificación en concreto consistió en el agregado secuencial de los reactivos, comenzando por la obtención a 60° C de *Poly*(EGDE-IM) cuyas propiedades habían sido descriptas en trabajos precedentes del grupo. A continuación se agregó MAA, y el tiempo de incubación a 60° C por más de 12 horas resultó determinante de la solubilidad en agua del producto final. Con el agregado de peróxido de benzoilo se obtuvo un material gomoso que se disolvió lentamente en agua destilada.

Una estructura probable para el producto heterogéneo obtenido es de una mezcla de oligómeros constituidos por dos bloques, donde el tamaño de los bloques podría ser diferente en cada molécula. Este modelo en bloque sería válido para la mayoría de las fracciones.

En una segunda etapa se abordó la exploración de posibles aplicaciones de los productos obtenidos.

Se utilizaron los sistemas heterogéneos $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) / H}_2\text{O}_2$, $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA) / H}_2\text{O}_2$ y $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA) / H}_2\text{O}_2$ en la decoloración de soluciones de MO, modelo de efluentes de la industria textil. Se determinó que la decoloración ocurría por los procesos paralelos de captación y degradación oxidativa, a través de una cinética de pseudo-primer orden. De los sistemas heterogéneos probados, el complejo con Cu(II) resultó ser el más eficiente en cuanto a la velocidad de decoloración y a la proporción de MO oxidada.

Se verificó la actividad catalítica de los complejos en la activación, a partir del reciclado del material. Se evaluó la disminución en la eficiencia del material por pérdida del Co(II) unido, y se estableció que mediante recarga del ion se recupera la actividad.

Los sistemas generadores de $\text{O}_2^{\bullet-}$ fueron empleados para un proceso de oxidación parcial de interés industrial: la conversión de epinefrina en adrenocromo.

Los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) fueron utilizados como agentes precipitantes en conjunto con Fe(II) para la co-precipitación *in situ* del colorante azo-aniónico DB273, y resultaron más eficientes que los adsorbentes poliméricos insolubles.

La adición de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) a una solución de Fe(II) y ácido cítrico en proporciones adecuadas dio lugar a la formación de esferas huecas, por coordinación y agregación de los oligómeros en la interfase por efecto del pH ácido. Su solubilidad a valores de pH iguales o superiores a 7.0 las vuelve potencialmente adecuadas para la liberación intestinal de fármacos en el contexto de liberación controlada.

Finalmente, se exploró la aplicabilidad del biorreactor basado en $\text{SBP-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ en la clasificación de alimentos, particularmente en bebidas. Las muestras de yerba mate pudieron ser discriminadas por marca comercial, relacionadas con su origen geográfico y/o diferente método de elaboración.

El reactor también generó resultados de utilidad analítica en muestras de vino libre de sulfito. Las muestras produjeron inhibición de la respuesta a catecol. Este comportamiento pudo ser explotado para mejorar la autenticación de vino mediante análisis multivariado, por combinación de estos datos con otros parámetros enológicos. Estos son los primeros estudios de aplicabilidad de SBP en el ámbito analítico.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La naturaleza ha sido una fuente de inspiración en la síntesis de nuevos materiales. Millones de años de evolución han permitido el surgimiento de estructuras con propiedades excepcionales, y una increíble funcionalidad. Desde tiempos remotos, el hombre observó las estructuras del entorno que lo rodeaba y desde un principio quiso emular sus sorprendentes características.

Pero no fue hasta que pudo tener un desarrollo técnico suficiente que pudo producir las innovaciones necesarias que le permitieran entender íntimamente estas estructuras y así reproducir sus propiedades más relevantes.

De este modo intentó reproducir estructuras originadas naturalmente ya sea con un paralelismo en la manera que estas se originan, por procesos sintéticos similares; ya sea en el aspecto estructural; ya sea en el funcional, de modo de obtener materiales sintéticos con similares propiedades, pero siempre con el fin último de introducir mejoras respecto del material original utilizado como fuente de inspiración.

La biomimética es un campo interdisciplinario emergente en ciencia e ingeniería de materiales, en la cual el estudio de las estructuras biológicas es la base de diseño y la síntesis de nuevos y mejorados materiales [1].

Estos materiales, denominados materiales bioinspirados acaparan cada vez más atención, debido a las significativas ventajas que poseen por sobre sus contrapartes naturales: la habilidad de diseñar (a través de la síntesis) precisamente sus estructuras respecto de un amplio rango de propiedades físicas y químicas, con un aumento en su estabilidad y una mejora en su procesabilidad [2].

Entre las muchas aplicaciones para los materiales bioinspirados se cuentan: proteínas artificiales, virus, enzimas, estructuras celulares y antenas captoras de luz [3], además de *imprinting* (reconocimiento molecular), en ingeniería de tejidos, catálisis para la obtención de productos con valor agregado o en remediación, acoplados con enzimas para la generación sensores/biosensores o como adsorbentes y absorbentes.

Dentro del gran espectro de materiales bioinspirados así como sus contrapartes de la naturaleza, se centrará la atención en los hidrogeles, ya que son los materiales utilizados en este trabajo de Tesis.

Aunque no existe una definición química rigurosa, la descripción más usual de un hidrogel lo detalla como un material natural o sintético constituido por polímeros hidrofílicos entrecruzados en forma de red tridimensional, que al entrar en contacto con el agua se hinchan, generando compuestos elásticos, blandos, flexibles y además son capaces de retener una cantidad significativa de este solvente.

Las proteínas son un ejemplo biológico de hidrogel polimérico. Asimismo, son zwitteriones, moléculas que portan tanto grupos ácidos como básicos y por lo tanto, existe un pH al cual su carga neta es cero. Esta característica les permite establecer interacción con otras moléculas o

iones, a través del establecimiento de uniones covalentes, uniones de tipo par iónico o la formación de complejos (como los hemo, porfirinas, entre otros). Materiales sintéticos, inspirados en estas proteínas pueden servir como adsorbentes, absorbentes, complejantes. Acoplados con enzimas pueden utilizarse como sensores o como productores de metabolitos o productos de interés. Los hidrogeles sensibles a estímulos han sido utilizados en una variedad de aplicaciones novedosas: sistemas enzimáticos inmovilizados, liberación controlada de fármacos, procesos de separación, celdas de combustible y desarrollo de sensores.

Un campo de aplicación de los materiales bioinspirados es la química ambiental. En los últimos años han cobrado mayor relevancia los problemas relacionados con la contaminación de cuerpos de agua. Es importante el caso de los colorantes provenientes de la industria textil, los cuales son vertidos en los efluentes. A su vez, existe el problema de presencia de iones de metales pesados en las aguas.

Entre las alternativas de remediación, la más sencilla es la remoción por adsorción. Adsorbentes tales como grafeno, carbón activado, arcillas minerales/arcillas modificadas, almidón y celulosa fueron ampliamente empleados con este propósito han sido empleados como adsorbentes en la remoción de colorantes y metales pesados [4,5]. Sin embargo, los hidrogeles poliméricos resultan los mejores adsorbentes para la remoción de metales pesados debido a su eficacia, rapidez y gran capacidad de absorción de agua [6].

A su vez, el carbón activado pese a su gran capacidad de adsorción, resulta un proceso demasiado caro y dificultoso para esta actividad (remoción) [7,8].

Por lo señalado, los hidrogeles sintéticos surgen como una alternativa interesante en el tratamiento de esta problemática. Algunos beneficios de los hidrogeles que se pueden mencionar son: alta capacidad de adsorción, estabilidad química, bajo costo de producción y un proceso sintético sencillo.

En este sentido, existen numerosas investigaciones que dan cuenta de soluciones para estos inconvenientes. En particular, los hidrogeles con capacidad de polianfolito o polielectrolito han atraído un particular interés en el área de química macromolecular debido a su versatilidad como adsorbentes de compuestos químicos [9].

Asimismo, para el tratamiento de estas problemáticas no sólo se emplean procesos físicos como los ya detallados, sino también procesos químicos.

Los procesos avanzados de oxidación que emplean radicales libres, son reconocidos como vías efectivas en la degradación de contaminantes orgánicos disueltos en agua [10].

El H_2O_2 es un poderoso oxidante inespecífico que puede ser usado en combinación con catalizadores o luz UV. La acción conjunta de estos genera la producción de radicales libres solubles que ejercen este poder oxidante [11]. El radical oxhidrilo (OH^\bullet) es una de las principales especies que reaccionan con compuestos orgánicos insaturados para alcanzar la parcial o total degradación de estos [11].

Por otra parte, se sabe que los cationes de elementos de transición coordinados producen la activación de H_2O_2 en reacciones de tipo Fenton, ventaja que es utilizada en química ambiental en la remoción de contaminantes por oxidación. El reactivo de Fenton es una combinación de $Fe(III)$ y H_2O_2 empleada en la oxidación de hidrocarburos aromáticos y fenoles, pero es sólo factible en condiciones ácidas [12-14].

Esta reacción tiene la ventaja de consistir en un medio químico adecuado, tiene la desventaja de la generación de lodos [4].

El ion Cu(II) puede ser utilizado en reemplazo del catión Fe(III) en aplicaciones similares, pero con la ventaja de poder ser utilizado en un amplio rango de pH [11].

La actividad catalítica del ion cobre genera principalmente radical OH^\bullet . Se ha encontrado que esta actividad aumenta drásticamente por complejación del ion metálico con piridina, ácidos orgánicos, aminoácidos entre otros agentes quelantes, pero la recuperación de estos catalizadores es dificultosa, dado que son completamente solubles en agua [15-18].

Lo atractivo es que puede hacerse un uso conjunto de los hidrogeles poliméricos bioinspirados y de estos procesos avanzados de oxidación.

La combinación de estos materiales bioinspirados con metales de transición, entonces, aporta varias ventajas interesantes respecto de las reacciones de tipo Fenton en fase homogénea. Por empezar, la reacción puede efectuarse de la misma manera, pero la fracción insoluble puede ser recuperada.

De esta manera, los materiales bioinspirados pueden efectuar la captación de metales de transición, lo que permite no sólo para la remoción de estos de soluciones acuosas sino que se puede producir el aprovechamiento de la capacidad activadora de estos nuevos materiales complejados para la remediación por oxidación de compuestos contaminantes.

Estas características constituyen una alternativa interesante, ya que combinan efectividad con facilidad en la recuperación del catalizador, como fue mencionado en el párrafo anterior.

Según evidencias experimentales, el cobalto parece ser un buen agente de transferencia de oxígeno en la oxidación de olefinas [19]. A pesar de la buena performance de los catalizadores insolubles de Co(II), sólo fue reportado en literatura un número limitado de complejos [19-21].

Los agentes oxidantes suaves, producen compuestos parcialmente oxidados en lugar de una mineralización completa. Esta característica, que constituye una desventaja en la química ambiental, sin embargo, tiene un aspecto positivo. Existen moléculas que por oxidación parcial producen compuestos parcialmente oxidados de interés, que si son aislados, pueden ser utilizados como intermediarios de síntesis.

Otro gran campo de aplicabilidad de estos materiales bioinspirados es la inmovilización enzimática. La inmovilización de enzimas sobre soportes y su confinamiento en reactores para procesos industriales o bien con propósitos analíticos ofrece una serie de ventajas prácticas: fácil recuperación de la enzima (catalizador biológico) con reducción significativa de costos; provisión de un ambiente más compacto con el propósito de incrementar las velocidades globales de conversión de sustrato; reducción de los volúmenes de reactor y protección del biocatalizador contra las condiciones ambientales adversas [22].

Existe un número importante de técnicas de inmovilización de enzimas sobre una variedad de soportes naturales y sintéticos con una pérdida mínima de actividad catalítica. Las técnicas convencionales incluyen adsorción física, unión covalente, entrecruzamiento, inclusión y encapsulación.

Los materiales usados para la inmovilización enzimática son: sílica mesoporosa [23], esferas de vidrio-aminopropil activadas con glutaraldehído [24], polímeros [25,26], resinas intercambiadoras de iones [27], cáscara de semillas tratadas con glutaraldehído [28], entre otros. Las esferas de vidrio de tamaño de poro controlado juegan un rol importante en la inmovilización

enzimática debido a su estrecha distribución de tamaño, fuerza mecánica, rigidez estructural e inercia química que satisface los requerimientos de los sistemas de flujo en línea [24,29,30].

Las síntesis que rinden materiales oligoméricos también tienen un lugar de importancia en la investigación.

Entre los trabajos de investigación recientes que involucran materiales oligoméricos se pueden mencionar: oligómeros como filtros de bacterias [31]; monómeros de quitosano: en medicina, en la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas [32]; oligómeros de plásticos de descarte, pueden ser utilizados como materia prima para la síntesis de oligómeros que a su vez se utilizan, por ejemplo, en la elaboración de espumas plásticas [33].

Existen propiedades de oligómeros que son compartidas con sus contrapartes poliméricas. Es sabido que los polianfolitos en bloque, constituidos por subunidades homopoliméricas diferentes unidas por enlaces covalentes, tienen un comportamiento en solución distinto de los polianfolitos con grupos distribuidos al azar. Los polímeros pueden adaptar diferentes estructuras tridimensionales, supeditadas a la relación entre la extensión de los distintos bloques poliméricos. Estas estructuras pueden ser desde grandes agregados moleculares hasta micelas de tamaño bien definido con un núcleo formado por bloques de carga opuesta y una corona constituida por el bloque más cargado [34-36]. El factor de estabilización que previene la formación de infinitos agregados frente al incremento en la concentración del polímero es la repulsión electrostática entre moléculas.

Las propiedades fisicoquímicas y, en consecuencia, la aplicabilidad de estos materiales han demostrado estar relacionados con la proporción de los grupos catiónicos respecto de grupos aniónicos en el producto resultante, la densidad de grupos cargados en la red, y el grado de reticulación de las cadenas [37,38]. En este sentido, una gran variedad de ejemplos prácticos evidencia la dependencia de las propiedades poliméricas resultantes sobre la funcionalización racional de la red acerca de la proporción de grupos ionizables. Hidrogeles zwitteriónicos, betaínas y sistemas de carga mixta que contienen una mezcla homogénea a nivel molecular de las regiones cargadas positiva y negativamente han demostrado características antiadherentes, por ejemplo eliminación de la adsorción inespecífica de proteínas [38,39].

Existen muchos ejemplos exitosos en que las características resultantes del material están fuertemente relacionadas a la proporción de grupos funcionales ionizables en la mezcla inicial de reacción.

Técnicas de caracterización: ¿para qué las utilizamos?

Es esencial, en la producción de materiales novedosos o en el desarrollo de innovaciones sobre materiales previamente desarrollados, acompañar y preceder los estudios de aplicabilidad con una exhaustiva caracterización, para tener una completa comprensión de las características y propiedades de los materiales. Además, porque esto permite hacer ajustes del proceso de síntesis para optimizar los atributos deseables o dirigir las propiedades del nuevo material hacia estas características. Entre las numerosas técnicas de caracterización que existen, se esbozará un breve resumen de las técnicas utilizadas en el trabajo de Tesis, poniendo el enfoque en la información en particular que suministró en cada caso:

- Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Es una técnica sencilla que permite la identificación de grupos funcionales. En el ámbito de la síntesis orgánica posibilita seguir cambios en la intensidad de las señales por la desaparición o aparición de grupos funcionales por el establecimiento de nuevos enlaces químicos. De esta manera se puede verificar que un paso de síntesis se completó por aparición o desaparición de cierta señal y a su vez para establecer estructuras presentes en el producto final de una síntesis. Estas señales también se ven afectadas por procesos de interacción intermolecular aunque no signifiquen el establecimiento de enlaces químicos (por ejemplo, el establecimiento de puentes de H).

Si la muestra es sólida, los procesos de captación de iones metálicos pueden seguirse por espectroscopía IR en pastilla. En particular, la técnica de FT-IR con accesorio de ATR nos permite ver de manera simultánea el progreso de una reacción sintética que se está llevando a cabo en solución, a partir de la observación de cambios en los grupos funcionales conforme ésta procede.

Para materiales solubles, se puede hacer el seguimiento de procesos de precipitación por interacción con iones a partir de las modificaciones en las señales de IR. Así se puede determinar, por ejemplo, que grupos funcionales están principalmente implicados en procesos de precipitación por cationes o por cambios en la polaridad del solvente de disolución.

- Resonancia magnética nuclear (NMR)

Se sabe que NMR es una herramienta poderosa porque permite determinar el ambiente en el que se encuentra cada C o H de una molécula. En sólidos, las señales obtenidas son anchas debido a las interacciones anisotrópicas, que son promediadas por el movimiento molecular en el NMR en solución. Por lo tanto, debe emplearse polarización cruzada y rotación de ángulo mágico (CP-MAS).

MAS consiste en la rotación de la muestra a un ángulo y velocidad determinados a fin de producir un efecto similar al que sucede cuando se promedian las anisotropías por rotación (en otras palabras, se emula la rotación que sucede naturalmente en solución). La velocidad de rotación debe ser mayor que la rotación anisotrópica y el ángulo de giro ($54,74^\circ$) es siempre el mismo y fue determinado experimentalmente.

CP, de manera sencilla, consiste en transferir polarización desde los núcleos más abundantes a los menos abundantes. Esto incrementa la intensidad de las señales de los últimos y por consiguiente la sensibilidad. Es particularmente útil para los elementos de baja abundancia isotópica, como el ^{13}C , cuya abundancia natural es del 1%.

Es sabido que iones paramagnéticos en interacción con la muestra producen una disminución dramática en el T_1 de relajación, por introducir una nueva fuente de relajación. En particular, esta disminución se observa cuando se producen cambios en la estructura de un material como consecuencia de modificaciones en su nivel de reticulación o por interacción con orbitales electrónicos de otros elementos (como el caso de hidrogeles con metales de transición).

Es por esto que la espectroscopía de ^{13}C -RMN de estado sólido, resulta muy útil para el estudio y la caracterización de complejos entre metales de transición y materiales poliméricos, debido a que los primeros afectan el T_1 de relajación de los C. Estos cambios en los valores de T_1 , pueden observarse concretamente por la variación en el perfil de las señales en los espectros (ensanchamiento o angostamiento de señales, o por variación en su altura).

A partir de las modificaciones observadas se pueden hacer inferencias respecto de procesos de captación, así como evaluar cambios en la cristalinidad y estabilidad de los complejos formados. Esta técnica se puede utilizar con fines comparativos, ya que es posible, a partir del análisis de los espectros, establecer diferencias entre materiales obtenidos por variaciones del proceso de síntesis.

Por integración de las señales de NMR en solución se puede estimar la composición monomérica, a partir de las relaciones entre las distintas señales. En el caso de muestras solubles de distinta composición, se puede hacer la precipitación diferencial con distintos solventes y comparar las señales de los componentes aislados.

- Isotermas de adsorción

Cuando un gas o un soluto en una solución impacta sobre una superficie sólida, puede rebotar o quedar fijado sobre la superficie, es decir, *adsorberse*. La molécula adsorbida puede difundir (moverse) sobre la superficie, permanecer fija, sufrir una reacción química o disolverse en el interior del sólido (este último proceso es conocido como *absorción*). Pueden distinguirse dos comportamientos límites de adsorción (fisorción y quimisorción), aunque es frecuente observar comportamientos intermedios.

En la adsorción física o fisorción, las moléculas se mantienen unidas a la superficie del sólido por medio de fuerzas de Van der Waals (interacciones dipolares, dispersión y/o inducción). En adsorción química o quimisorción, las moléculas se mantienen unidas a la superficie formando un enlace químico fuerte, las entalpías de quimisorción son mucho mayores que las de fisorción, y generalmente son procesos exotérmicos que se detienen tras la formación de una monocapa sobre la superficie (ya que implica la formación de un enlace entre adsorbato y el adsorbente). La quimisorción implica la rotura y formación de enlaces, por lo que la molécula quimisorbida no mantiene la misma estructura electrónica que en la otra fase.

Se pueden utilizar las isotermas de adsorción de gases para cuantificar el área superficial específica de partículas de sólidos. Esta información resulta interesante ya que nos da una idea de su superficie de intercambio o de captación, proceso que como ya fue mencionado tienen una gran utilidad en aplicaciones medioambientales o industriales.

Es importante la información de tamaño de poro brindada por este estudio, ya que hay fenómenos que se ven favorecidos en materiales nano o mesoporosos, implican un enorme incremento superficial que es esencial en fenómenos de catálisis heterogénea. También es útil conocer esta información cuando el objetivo es inmovilizar enzimas o microorganismos ya que poros muy grandes producen la pérdida del material y poros demasiado pequeños hacen imposible este objetivo.

En este trabajo de Tesis reviste particular interés la captación de iones metálicos Co(II) y Cu(II) por hidrogeles sintéticos. El estudio del equilibrio de captación de cationes sobre partículas sólidas puede ser estudiado con el objeto de elucidar los mecanismos involucrados en la interacción, y de estimar parámetros termodinámicos que definen el comportamiento del sistema. Para caracterizar estos sistemas es posible recurrir al ajuste de los datos experimentales empleando varios modelos de adsorción teóricos y semiempíricos. A continuación, se detallan los aspectos teóricos de los modelos de adsorción de cationes metálicos utilizados en este trabajo.

Las isotermas de adsorción más utilizadas en el ajuste de los datos experimentales son las de Langmuir, Freundlich, Temkin y Dubinin-Radushkevich (D-R). La primera isoterma mencionada

deriva de modelos teóricos y permite estimar la afinidad entre adsorbato y adsorbente, la isoterma de Freundlich puede derivarse teóricamente suponiendo que la superficie contiene diferentes tipos de centros de adsorción, en tanto que las restantes son funciones matemáticas empíricas.

El modelo de Langmuir, el caso más sencillo, propone que la adsorción se produce en una monocapa, y que el calor asociado al fenómeno no se modifica durante todo el proceso de cubrimiento

$$q_e = \frac{q_m \times C_e}{K_L + C_e} \quad (1)$$

Los parámetros K_L y q_m , representan a la constante de equilibrio de disociación y la capacidad máxima de adsorción de iones en la monocapa del adsorbente en estudio, respectivamente. C_e , en tanto, representa la concentración de iones en equilibrio con q_e , la cantidad de iones adsorbidos por unidad de peso del material en estudio. A su vez, K_L es una medida de la energía de adsorción del ion. El cambio en la energía libre relacionada con la captación del ion puede ser calculada a partir de $K_a = 1/K_L$

$$\Delta G = -R \times T \times \ln K_a \quad (2)$$

Donde R es la constante de los gases ($8.314 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T la temperatura termodinámica.

El cumplimiento del modelo de Langmuir supone que la superficie del adsorbente posee un número fijo de sitios de adsorción; cada sitio puede ser ocupado por una sola molécula del adsorbato, por lo que la adsorción máxima corresponde a la formación de una monocapa completa; el calor de adsorción es el mismo para todos los sitios de la superficie, y no depende de la fracción de superficie cubierta; no existe interacción entre las moléculas adsorbidas.

La ecuación de Freundlich es una isoterma empírica cuyo cumplimiento implica que la superficie no alcanza un recubrimiento máximo y que la energía de adsorción decrece exponencialmente al aumentar la superficie cubierta.

$$q_e = K_F (C_e)^{1/n} \quad (3)$$

Siendo K_F el coeficiente de distribución o de sorción, que representa la cantidad de ion adsorbido sobre la superficie del polímero, normalizada por la concentración del ion en el equilibrio. $1/n$ es una medida de la heterogeneidad de la superficie y oscila entre cero y uno, indicando una mayor heterogeneidad para valores cercanos a cero.

Este modelo supone que la energía de adsorción sobre la superficie del material se distribuye de modo heterogéneo, en forma de “parches”; cada uno de ellos agrupa sitios que presentan la misma energía de sorción (la energía de interacción entre un adsorbente y su adsorbato) en toda su superficie. Cada parche es independiente de los otros (no existe interacción entre ellos) y cada uno puede describirse con la ecuación de Langmuir. Es decir, que una superficie de Freundlich, sería una suerte de combinación lineal de superficies de Langmuir.

La isoterma de Temkin, que deriva de la de Langmuir adiciona la condición de que la energía de adsorción (que es función de la temperatura) de todas las moléculas en la capa decrecerá linealmente en vez de logarítmicamente con el grado de cubrimiento de la superficie.

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln (K_T C_e) \quad (4)$$

Como se dijo previamente, el modelo de Langmuir presupone que todos los sitios de la superficie tienen idéntica energía, mientras que los modelos de Freundlich y Temkin suponen la disminución de la energía de los sitios a medida que la superficie se recubre. Esta última circunstancia debe ser la más cercana a la mayoría de los casos reales, y solo es justificable el uso del modelo de Langmuir si la evidencia experimental hace pensar que en la superficie existen sitios con valores de energía de adsorción muy poco diferentes.

La isoterma de Dubinin-Radushkevich es una ecuación semiempírica que fue originalmente desarrollada para vapores sub-críticos en sólidos microporosos, donde el proceso de adsorción sigue un mecanismo de llenado de poros:

$$q_e = q_m e^{-B_D \varepsilon^2} \quad (5)$$

q_m representa la cantidad máxima de adsorbato que puede ser adsorbido en los microporos, y B_D es una constante relacionada con la energía asociada a la interacción. Los datos de adsorción a partir de una fase líquida también pueden ser analizados mediante la ecuación siguiente, donde la cantidad adsorbida correspondiente a cualquier concentración de adsorbato es considerada función gaussiana del potencial de Polanyi (ε),

$$\varepsilon = RT \ln \left(1 + \frac{1}{C_e} \right) \quad (6)$$

La ecuación se aplica generalmente para expresar el mecanismo de adsorción con una distribución gaussiana de energía sobre una superficie heterogénea. La aproximación se emplea usualmente para distinguir la adsorción física de cationes de la adsorción química mediante la siguiente expresión:

$$E = \frac{1}{\sqrt{2 B_D}} \quad (7)$$

El parámetro E es la energía libre media de sorción, cuya magnitud se relaciona con el tipo de interacción establecida entre ambas fases, constituyendo así la característica más relevante del modelo. Si E es menor que 8 kJ mol^{-1} , implica que el mecanismo de sorción está afectado por interacciones físicas débiles, como puente de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals.

Cuando el valor se encuentra entre 8 y 16 kJ mol^{-1} , el proceso de sorción puede explicarse por intercambio iónico. Cuando el valor es mayor a 16 kJ mol^{-1} , el proceso de sorción se explica por otro tipo de interacciones químicas más fuertes, como por ejemplo la coordinación.

- Técnicas de análisis de superficies

Los materiales insolubles desarrollados en el contexto de este trabajo de Tesis han sido estudiados en procesos de captación. Como este puede ser un fenómeno superficial, resulta esencial contar con estudios que nos permitan determinar las características de las superficies.

- Microscopías: son útiles ya que permiten hacer un análisis visual de los materiales.
 - ✓ Microscopía óptica: permite una visión general de materiales particulados (por su menor poder de resolución y límite de tamaño respecto de microscopías electrónicas). Si además se efectúan cortes con micrótopo, se puede tener una visión del interior y exterior del material.
 - ✓ Microscopía electrónica de barrido (SEM): permite observar el aspecto superficial de un material, la existencia de poros, y otras estructuras superficiales. A su vez, es útil a fines comparativos, ya que permite vislumbrar cambios en una superficie luego de haber sido sometida a un proceso de captación de un catión metálico, por ejemplo rugosidad. No permite estimar valores de área superficial, ni cambios en ésta.
 - ✓ Espectroscopía de energía dispersiva (EDS): es una técnica que permite obtener información cuali-cuantitativa. Hace uso los electrones que se producen secundariamente al proceso de SEM. Puede obtenerse una identificación sencilla de elementos, ya que tienen transiciones electrónicas características, de acuerdo con su Z. Esta técnica permite la determinación de la composición elemental de zonas muy cercanas, ya que pueden barrerse áreas pequeñas. Sin embargo, los límites de detección no permiten el análisis de trazas.
- Espectroscopía fotoelectrónica por rayos X (XPS) es una técnica de análisis de superficies por excelencia. De hecho, la información que suministra se limita a las capas más externas de un sólido, cuantitativamente entre 1 y 10 monocapas (es decir, 100 Å). Determina el estado de oxidación de un átomo y a su vez, de los átomos adyacentes en la red. Proporciona información sobre la composición elemental, el estado de oxidación de cada elemento, la posición de los átomos con respecto a la estructura cristalina del material, la homogeneidad superficial y el estado de adsorbatos. A su vez, brinda información sobre la energía de unión de electrones: ésta es característica de un átomo y de su nivel electrónico. La energía de enlace de los picos asociados a la emisión de fotoelectrones está muy bien definida, lo que permite identificar el estado de oxidación de cationes y aniones. Así, átomos no equivalentes del mismo elemento (diferencia en el estado de oxidación, en las moléculas que lo rodean o en la posición en la red) provocan un cambio apreciable (típicamente entre 1-3 eV) en la energía de enlace llamado “desplazamiento químico”.

- Análisis térmico

Permite observar los cambios que se producen en la estructura de un material durante procesos de calentamiento de éste. Cuando se le suministra calor a un sistema, la energía aportada a los enlaces químicos produce cambios de estado, que se pueden observar tanto como cambios en la capacidad calorífica como en el peso de un material.

✓ Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En esta técnica de análisis térmico, se grafican las diferencias entre la cantidad de calor aportado a una sustancia incógnita y la cantidad de calor aportado a una sustancia de referencia, en función de la temperatura, cuando ambas muestras son sometidas al mismo programa de temperatura controlado.

En los espectros se observan procesos endotérmicos, como la fusión, como un pico negativo. Procesos exotérmicos como la cristalización, son observados como un pico positivo. En materiales termoplásticos, durante el calentamiento, antes del pasaje del estado sólido al líquido, se pasa por un estadio intermedio donde las moléculas tienen baja movilidad y se producen cambios en las propiedades intensivas. La temperatura a la que esto sucede se denomina temperatura de transición vítrea (T_g). Si bien hay un cambio en la capacidad calorífica del sistema, no existe ganancia ni pérdida de calor, por lo que no hay un cambio en la pendiente de la curva, pero sí una modificación en la línea de base.

✓ Termogravimetría (TG)

Consiste en el registro de la variación de la masa de una muestra sometida al calentamiento en condiciones de atmósfera controlada. El aumento de temperatura durante el proceso se lleva a cabo de forma lineal. Principalmente permite determinar la estabilidad térmica de un dado material.

• Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica interesante ya que permite la elucidación de estructuras. La técnica de desorción por ionización láser asistida por matriz (MALDI) tiene la ventaja más destacada de permitir la elucidación estructural de compuestos termolábiles de alto peso molecular, difícilmente ionizables por otros métodos. MALDI permite también identificar por separado componentes de una mezcla. Como se lleva a cabo en condiciones suaves, no son fracciones moleculares producto de la fragmentación las que se observan, sino moléculas intactas. Para el éxito de esta técnica, resulta importante la matriz que se utilice. De hecho, es posible que no se consiga la ionización de todos los componentes de la muestra sino que solamente se produzca la desorción de ciertas fracciones.

En el caso de esta Tesis, se empleó una matriz estándar y no una desarrollada *ad hoc* para el producto en estudio. Como en el proceso de síntesis polimérica utilizado en este trabajo, pueden formarse oligómeros de distinta longitud, el análisis de cada fragmento permite reconstruir estructuras sintéticas mayores o más complejas a partir de la relación m/q de los distintos fragmentos de un compuesto.

• Electroforesis capilar zonal (CZE)

La electroforesis capilar zonal es una herramienta sencilla y poderosa para la caracterización de densidades de carga en polímeros solubles, aún cuando el grado de polimerización y la hidrofobicidad afecten claramente el comportamiento electroforético [40,41].

De manera sencilla, es una electroforesis que procede dentro de un capilar de vidrio pretratado de manera tal que se produce la desprotonación de los grupos silanol, que deja expuestos grupos alcóxido. De esta manera, se establece una capa de contraiones positivos provenientes del medio de corrida que interactúa con los silanoles desprotonados. Frente a la aplicación de un potencial

eléctrico, se genera un flujo electroosmótico proveniente de la migración de esta capa de iones positivos hacia el cátodo. Este flujo produce la migración de los componentes de la muestra, según su relación q/m los cuales migran hacia el detector. Los componentes más positivos son los que aparecen primero en el frente de corrida, seguidos de los neutros y por último los negativos, en el modo de operación normal.

Cuando las corridas electroforéticas se hacen a diferentes valores de pH, se obtiene información sobre los grupos cargados presentes en el material a partir de la comparación de los diferentes electroferogramas. Hay que tener en consideración que el voltaje, si es muy elevado, puede producir disrupciones en ciertas estructuras que se establecen en solución.

- Resonancia de spin electrónico (ESR)

Esta técnica espectroscópica consiste en irradiar la muestra con radiación electromagnética en la región de las microondas (energía de radiofrecuencia), a fin de que se produzcan transiciones electrónicas.

La muestra debe ser paramagnética. Con esta técnica se pueden determinar geometrías de metales de transición y perfiles de especies radicalarias. Por monitoreo de su variación cuali-cuantitativa en función del tiempo, se pueden elucidar mecanismos que involucren especies radicales.

Desafortunadamente, no es siempre posible la observación directa de los radicales libres de interés, cuya concentración puede estar por debajo del límite de detección de los espectrómetros de ESR. Además, algunos radicales, aún cuando presentan una concentración por encima de este límite de detección, no resultan observables a temperatura ambiente o fisiológica debido a que los tiempos de relajación son muy cortos, lo que genera un ancho de línea demasiado amplio para ser observados por ESR. Algunos ejemplos de radicales de vida media corta son los OH^\bullet , radicales alcoxilo, y radicales centrados en azufre, así como los radicales libres cisteinil o glutatil. El atrapamiento de spin provee, en principio, una herramienta para subsanar estos problemas. En particular, 5-5-dimetil,1-pirrolín-*N*-óxido (DMPO) permite la detección de radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet y C^\bullet (centrados en C) mediante la formación de aductos de spin (DMPO/OOH, DMPO/OH y DMPO/C, respectivamente) [42,43].

En el grupo de trabajo fue observado previamente que ciertos hidrogeles complejados con Cu(II) producían la activación del H_2O_2 , con la generación de radical OH^\bullet . Estos estudios fueron continuados y profundizados en este trabajo de Tesis.

- Viscosimetría

La viscosidad de un fluido es una medida de su resistencia a las deformaciones graduales producidas por tensiones cortantes o tensiones de tracción. Dicho de otro modo: es la resistencia a fluir. Las mediciones de viscosidad suministran información sobre cambios conformacionales de un material en función del pH del medio. En materiales con propiedad de polianfolito con ordenamiento al azar de sus grupos funcionales, puede observarse que en las inmediaciones del punto isoeléctrico (*IEP*) la solubilidad del material disminuye drásticamente y con ella la viscosidad. A valores de pH en los que el material se encuentra óptimamente solvatado y sus cadenas expandidas, la viscosidad de la solución aumenta.

- Potencial zeta (ζ)

Se denomina potencial zeta (ζ) al potencial medido en la zona en que se unen la capa de Stern y la capa difusa de contraiones, para una partícula en contacto con una solución. Puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. Esta técnica es asiduamente empleada en la industria farmacéutica para evaluar estabilidad de formulaciones, y permite determinar el *IEP* de las partículas porque allí ζ adopta el valor cero.

- Titulación ácido base

Dentro de los distintos grupos funcionales hidrofílicos presentes en los hidrogeles y en polímeros solubles se encuentran los grupos intercambiadores de protones. En particular, en la caracterización de estos materiales, resulta importante determinar el comportamiento que presentan estos grupos funcionales ácidos y básicos frente al intercambio de protones, así como las constantes relacionadas con estos procesos, debido a que le confieren propiedades definidas al material al que están unidos.

Sin embargo, no resulta sencillo, porque hay muchos de estos grupos funcionales que tienen un comportamiento opuesto (por ejemplo, carga eléctrica opuesta) y están unidos físicamente, es decir, la distancia entre ellos es fija. Por esta restricción en la movilidad no se obtiene un promedio de estas influencias, como sucede con las moléculas en solución, las cuales tienen todos los grados de libertad de movimiento. En consecuencia, el análisis y la comprensión del comportamiento frente al intercambio de H^+ se complejiza.

Sin embargo, del análisis de los datos experimentales, se pueden obtener parámetros empíricos que describen de manera satisfactoria el comportamiento ácido-base de materiales complejos como estos.

Hay que tomar en cuenta que durante la titulación, el material como un todo va modificando su carga y su porcentaje de protonación de manera continua, a diferencia de especies pequeñas que sólo cuentan con un estado protonado y uno desprotonado, o a lo sumo, tienen pocos estados intermedios entre la protonación y la completa desprotonación, y cuya variación de estado puede ser completamente determinada y por lo tanto, medida con exactitud. Por consiguiente, la K_a en los hidrogeles y en polímeros solubles también varía. Es por ello que, en estos casos, se determina su valor aparente. Esta constante, se ve afectada por y varía con el grado de disociación ácida (α). Este parámetro adopta el valor cero (0) cuando el polímero está completamente protonado y el valor máximo de uno (1) cuando se disocia completamente.

Como se trata de un modelo empírico, las condiciones específicas de cada caso se detallan en la sección correspondiente.

De esta manera, se puede obtener la estandarización de las propiedades de un dado material, así como prever el comportamiento de distintos lotes, hechos que resultan esenciales para después poder llevar el material a escalas de producción, en un proceso de transferencia tecnológica.

- Análisis elemental

Consiste en la determinación del número de moles totales presentes en una muestra de un dado elemento químico: C, H, N, por lo que con esta técnica es posible calcular rendimientos de síntesis de manera más exacta. Para materiales como los descritos en este trabajo de Tesis, si se

compara esta información con datos obtenidos por potenciometría se puede determinar cuántos grupos funcionales ácido-base se han generado, respecto de los grupos funcionales que podrían generarse teóricamente. Esto permite justificar las características ácido-base de un material observadas, respecto de las esperadas teóricamente, así como justificar otras propiedades como la solubilidad, respecto a esta relación entre moles de átomos totales y moles de grupos titulables.

Antecedentes del grupo de trabajo referidos a la obtención, caracterización y estudios de aplicabilidad de polímeros funcionalizados:

En nuestro grupo de trabajo se desarrolló una línea de investigación con hidrogeles bioinspirados obtenidos por reacción del diepóxido etilenglicol diglicidil éter (EGDE) con monómeros funcionalizados (ácidos y básicos) tales como ácido metacrílico (MAA), y N-heterociclos como imidazol (IM) 2-metilimidazol (2MI), pirazol (PYR), triazol (TRZ) [44].

Estas síntesis constituyeron un antecedente original, ya que el empleo de EGDE como monómero de síntesis en combinación con MAA y N-heterociclos no estaba descrito en la literatura. A su vez, el hecho de que el producto sea obtenido en un único paso le confiere la ventaja de ser una síntesis rápida y sencilla.

El proceso sintético del polielectrolito insoluble en agua denominado *Poly*(EGDE-MAA) implicó la apertura de los grupos epóxido del EGDE por reacción con MAA y una polimerización radicalaria iniciada por peróxido de benzoilo, de los segmentos de MAA covalentemente unidos a EGDE. Cuando en el medio de reacción fue agregado además imidazol (IM), los grupos epóxido resultaron abiertos tanto por el ácido carboxílico del MAA como por el nitrógeno tipo piridínico del N-heterociclo, y se obtuvo un polianfolito estadístico insoluble en agua, denominado *Poly*(EGDE-MAA-IM) [19,20,45]. Cuando se produjo la mezcla entre EGDE e IM en ausencia del iniciador de polimerización radicalaria, se obtuvo un polielectrolito insoluble en agua, denominado *Poly*(EGDE-IM). También se efectuaron las síntesis de nuevos polianfolitos y polielectrolitos por reemplazo del N-heterociclo IM por una variedad de otros N-heterociclos, como 2-metilimidazol (2MI), pirazol (PYR), y triazol (TRZ) [44,46,47].

Estos materiales poliméricos presentaron propiedades de hidrogel, por lo que fue evaluado su carácter coordinante, con Cu(II) como ion modelo. El mecanismo de captación fue evaluado por NMR en estado sólido.

Los materiales fueron extensamente caracterizados por técnicas espectroscópicas, espectrofotométricas, de análisis térmico, análisis elemental, potenciometría y ζ .

El polianfolito *Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue exitosamente aplicado en el desarrollo de un catalizador basado en su complejo con Cu(II), para la activación de H₂O₂. Por ensayos de ESR y XPS se pudo verificar la producción y hacer la identificación de los radicales generados, y esbozar un mecanismo para la reacción de activación de H₂O₂.

Como ejemplo de aplicación, estos materiales fueron empleados en la degradación un colorante azo, Naranja de Metilo (MO) por oxidación a partir de la activación de H₂O₂ [11,44].

Este tipo de materiales altamente funcionalizados encuentran aplicabilidad en diferentes áreas de trabajo: catálisis, remediación de efluentes industriales, desarrollos analíticos y biotecnológicos.

En el área ambiental, los colorantes con uniones azo representan el grupo de colorantes industriales mayoritario y son resistentes a la degradación en condiciones aeróbicas [48]. Por otra

parte, si bien la unión azo puede ser reducida en condiciones anaeróbicas, el proceso genera aminas aromáticas, que pueden ser tóxicas y carcinogénicas [23]. En las investigaciones llevadas adelante por el grupo de investigación se utiliza particularmente el colorante Naranja de Metilo (MO) como compuesto modelo. MO es usado como indicador de pH en solución acuosa al 0,1 %, así también como en tinciones de prendas textiles. Es considerada una sustancia peligrosa de acuerdo con OSHA 29 CFR 1910.1200. Es químicamente estable, persiste en agua y suelo y su movilidad es elevada.

Los productos de degradación de MO, resultado de la acción de especies del oxígeno altamente reactivas son bien conocidos. La degradación foto-Fenton de MO produce 4-dimetilamino anilina, probablemente por clivaje del enlace azo. Las especies hidroxiladas y no hidroxiladas han sido identificadas por Baiocchi y cols. A su vez, fue estudiada la fitotoxicidad y toxicidad del colorante y de algunos de los productos de degradación en microorganismos. Se encontró que MO es tóxico y que los metabolitos obtenidos, tales como ácido 4-amino sulfónico y N,N-dimetil p-fenildiamina, no son tóxicos para las plantas experimentales (*Triticum aestivum* y *Phaseolus mungo*) y bacterias (*Kocuria rosea*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii*).

Otro colorante utilizado por el grupo es el denominado Direct Blue 273 (DB273), empleado habitualmente en la industria del papel, cuya decoloración fue reportada recientemente [50].

En este trabajo de Tesis, se presentará la estrategia de oxidación mediada por radicales para decoloración de MO, y un proceso de separación de fases por co-precipitación para DB273.

El ámbito de aplicación industrial de los polímeros funcionalizados se extiende a muchas áreas, entre las que puede mencionarse la biotecnología y la química analítica. Según un análisis del mercado de enzimas industriales, hay una demanda creciente por parte de diferentes sectores, de incorporar biocatalizadores con actividad oxido-reductasa. Particularmente las peroxidasas, se obtienen en abundancia a partir de tejidos vegetales y hongos, y catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos empleando H₂O₂ o bien otros peróxidos, mediante un mecanismo de tipo ping-pong [51]. Estas enzimas han sido empleadas en la remoción de contaminantes fenólicos, en la industria de pulpa de papel, y en el ámbito del análisis químico y clínico (kits de diagnóstico) [52,53]. La isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRP) ha sido la más investigada, pero existe interés en la búsqueda de fuentes alternativas debido a su elevado costo. En este sentido, la peroxidasa de cáscara de semilla de soja (SBP) es una alternativa atractiva presente en elevada concentración en la cáscara, que es un producto secundario de la industria alimentaria [54]. Se trata de una glicoproteína aniónica de 40662 Da con un punto isoeléctrico de 4,1. Puede ser extraída con una solución buffer y la cáscara podría ser luego empleada como alimento animal. La SBP se caracteriza por tener una estabilidad química y térmica inusualmente elevada, aún en medio ácido. Existen muy pocos reportes de su aplicación en la literatura: se menciona su uso en remoción de compuestos fenólicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos [55-57], en aguas residuales [58], y en reacciones de bromación, pero nunca había sido empleada con fines analíticos [59,60]. A su vez, en los escasos reportes en que se encuentra su utilización, siempre se menciona una purificación previa [25,28].

1.2. Objetivos de la Tesis

Los objetivos de este trabajo de Tesis se enmarcan en un proyecto que abarca el desarrollo de materiales bio-inspirados altamente funcionalizados, y el estudio de su aplicabilidad en el área industrial y ambiental. En este contexto, se pretende reunir las funcionalidades presentes en biomoléculas (residuos carboxilo y bases nitrogenadas) para emular su capacidad de carga, así como su selectividad en ciertos procesos químicos en condiciones de reacción que desnaturalizarían a la mayoría de los biopolímeros y proteínas.

Los objetivos generales del trabajo son:

- ✓ La obtención y caracterización de materiales bio-inspirados: complejos de coordinación con Co(II) y Cu(II) que emulan la actividad selectiva de moléculas biológicas; macromoléculas funcionalizadas con grupos donores de electrones, capaces de formar macroagregados o estructuras supramoleculares de interés industrial.
- ✓ Los estudios de aplicabilidad de las nuevas estructuras en procesos de interés ambiental, analítico o biotecnológico.

Los objetivos específicos pueden ser agrupados de la siguiente manera:

I. Obtención y caracterización de complejos bio-inspirados, insolubles en agua.

I.1. Obtención y caracterización del complejo con Co(II) del polianfolito denominado *Poly*(EGDE-MAA-2MI)

I.2. Obtención y caracterización del complejo con Co(II) del polielectrolito denominado *Poly*(EGDE-DA) (material derivado de EGDE y 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano).

I.3. Caracterización del complejo con Cu(II) de *Poly*(EGDE-DA).

I.4. Estudios de las propiedades catalíticas de los complejos con Co(II) y Cu(II) en la activación de H₂O₂ para la generación de radicales libres.

I.4.1. Identificación de los productos radicalarios y demás especies.

I.4.2. Estudios cinéticos del consumo de H₂O₂.

I.4.3. Postulación de mecanismos probables de activación de H₂O₂.

I.5. Estudio de captación de compuestos iónicos empleando *Poly*(EGDE-MAA-2MI).

I.5.1. Captación de un compuesto orgánico aniónico.

I.5.2. Captación de una enzima para su inmovilización.

II. Obtención y caracterización de un material bio-inspirado, derivado del diepóxido EGDE, de MAA y del N-heterociclo IM, soluble en agua, denominado *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA).

II.1. Desarrollo del método de síntesis.

II.2. Caracterización estructural.

II.3. Postulación de estructuras químicas probables.

III. Estudios de aplicabilidad de los materiales y sus complejos.

III.1. Evaluación del desempeño de los complejos con Co(II) y Cu(II) como catalizadores heterogéneos en la degradación oxidativa de compuestos orgánicos.

- III.1.1. Estudios cinéticos de la decoloración de soluciones acuosas de Naranja de Metilo (MO) un colorante azo, que constituyen un equivalente a un efluente de la industria textil, empleando H₂O₂ y los complejos insolubles. Evaluación de la eficiencia de cada material y la posibilidad de reciclado.
- III.1.2. Evaluación del rol del catalizador heterogéneo en las diferentes etapas del proceso de decoloración.
- III.2. Evaluación del desempeño de los complejos con Co(II) en la obtención de un producto parcialmente oxidado (adrenocromo) con fines industriales.
- III.3. Decoloración de soluciones acuosas mediante co-precipitación *in situ* del colorante con los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA).
- III.4. Formación de esferas huecas solubles a pH superior a 7.0, a partir de los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA), Fe(II) y ácido cítrico.
- III.5. Desarrollo de un biorreactor enzimático empleando *Poly*(EGDE-MAA-2MI) como soporte, para su aplicación en el análisis de alimentos.

A continuación se desarrollarán los temas enunciados, en tres capítulos. El Capítulo 2 abarca la obtención y caracterización exhaustiva de los complejos con Co(II) y Cu(II), insolubles en agua. Se presentarán y discutirán las propiedades de estos hidrogeles que se relacionan directamente con los estudios de aplicabilidad presentados en el Capítulo 4. El Capítulo 3 está dedicado al desarrollo de un nuevo material soluble en agua, altamente funcionalizado, cuya caracterización permitió comprender su naturaleza heterogénea y esbozar una estructura probable. En este caso también se utiliza la información recabada para planificar los estudios de aplicabilidad descriptos en el Capítulo 4.

1.3. Referencias del Capítulo 1

1. Sarikaya M. Microsc Res. Tech. 27 (5) (1994) 360.
2. Sun, J.; Zuckermann, R.N. ACS Nano 7 (6) (2013) 4715.
3. Yang, X., Shang, H., Ding, C., Li, J.; Polym. Chem. 6 (2015) 668.
4. Yusuf, M., Elfghi, F.M., Zaidi, S.A., Abdullah, E.C., Khan, M.A. RSC Advances 5 (62) (2015) 50392.
5. Biswas, B., Sarkar, B., Rusmin, R., Naidu, R; Environ. Int. 85 (2015) 168.
6. Souda, P. ; Sreejith, L.; J. Environ. Chem. Eng. 3 (3) (2015) 1882.
7. Mall, I.D.; Srivastava, V.C. ; Agarwal, N.K. ; Mishra, I.M. Chemosphere 61(2005) 492.
8. Pollard, S.J.T. ; Fowler, G.D. ; Sollars, C.J. ; Perry, R. Sci. Total Environ. 116 (1992) 31.
9. Campbell V.E.; Chiardelli, P.A. ; Kaul S.; Malkiat, S. Chem Mater. 17 (2005)186.
10. Lombardo Lupano, L.V.; Lázaro Martínez, J.M.; Piehl, L.L.; Rubín de Celis, E.; Campo Dall' Orto, V. Appl. Catal. A. 467 (2013) 342.
11. Lázaro Martínez, J. M.; Leal Denis, M. F.Piehl, L. L.; Rubín de Celis, E.; Buldain, G. Y.; Campo Dall' Orto, V. Appl. Catal. B. Environ. 82 (2008) 273.
12. Dunford, H. B. Coord. Chem. Rev. 233/234 (2002) 311.
13. Kang, N.; Lee, D.S.; Yoon, J. Chemosphere 47 (2002) 915.
14. Nam, K.; Rodriguez, W.; Kukor, J.J. Chemosphere 45 (2001) 11.
15. Meng, X.-G.; Zhu, J.; Yan, J.; Xie, J.-Q.; Kou, X.-M.; Kuang, X.-F.; Yu, L.-F.; Zeng, X.-C. J. Chem. Technol. Biotechnol. 81 (2006) 2.
16. Lin, T.-Y.; Wu, C.-H. J. Catal. 232 (2005) 117.
17. Shah, V.; Verma, P.; Stopka, G. Gabriel, J.; Baldrian, P. Nerud, F. Appl. Catal. B 46 (2003) 287.
18. Nerud, F.; Baldrian, P.; Gabriel, J.; Ogbeifun, D. Chemosphere 44 (2001) 957.
19. E.K. Beloglazkina, A.G. Majouga, R.B. Romashkina, N.V. Zyk, Tetrahedron Lett. 47 (2006) 2957.
20. Gao, D.; Q. Gao, Q. Catal. Commun. 8 (2007) 681.

21. Zhang, Y.; Li, Z.; Sun, W.; Xia, C. *Catal. Commun.* 10 (2008) 237.
22. Kobayashi, J.; Mori, Y.; Kobayashi, S. *Chem. Commun.* (2006) 4227.
23. Salis, A.; Pisano, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Sanjust, E. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 58 (2009) 175
24. Gómez, J.L.; Bódalo, A.; Gómez, E.; Bastida, J.; Hidalgo, A.M.; Gómez, M. *Enzyme Microb. Tech.* 39 (2006) 1016.
25. Magri, M.L.; Miranda, M.V.; Cascone, O. *Biocatal. Biotransfor.* 23 (2005) 339.
26. Shukla, S.P.; Devi, S. *Process Biochem.* 40 (2005) 147.
27. Peralta-Zamora, P.; Esposito, E.; Pellegrini, R.; Groto, R.; Reyes, J.; Durán, N. *Environ. Tech.* 19 (1998) 55.
28. Magri, M.L.; Loustau, M.N.; Miranda, M.V.; Cascone, O. *Biocatal. Biotransfor.* 25 (2007) 98.
29. Jin, J.; Muroga, M.; Takahashi, F.; Nakamura, T. *Bioelectrochemistry*; 79 (2010) 147.
30. Girelli, A.M.; Mattei, E.; Messina, A. *Sensor Actuat. B-Chem.* 121 (2007) 515.
31. Marjeh I¹, Meir O¹, Zaknoon F¹, Mor A²; *Appl Environ Microbiol.* 81(1) (2015) 74.
32. Ngo, D.H., Vo, T.-S., Ngo, D.N., Kang, K.H., Je, J.Y., Pham, H.N.D., Byun, H.G., Kim, S.K.; *Food Hydrocolloid*; 51; (2015); pp 200.
33. Tran, TKN; Passetto P.; Pillard J.F.; *J Appli Poly Sci.* 132 (1) (2014) Article number 41326.
34. Shusharina, N. P.; Zhulina, E. B.; Dobrynin, A. V.; Rubinstein, M. *Macromolecules* (2005) 8870.
35. Goloub, T.; De Keizer, A.; Stuart, M. A. C. *Macromolecules* (1999) 8441.
36. Creutz, S.; Garcia, M.; Mahltig, B.; Stamm, M.; Je, R. *Macromolecules* (2000) 6378.
37. Lowe, A.B.; McCormick, C. L. *Chem. Rev.* 102 (2002) 4177.
38. Tah, T.; Bernards, M. T. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 93 (2012) 195.
39. Schroeder, M. E.; Zurick, K. M.; McGrath, D. E.; Bernards, M. T. *Biomacromolecules* 14 (2013) 3112.
40. J. Schriever, J. C. *Leyte Polymer* 18 (1977) 1185.
41. D. A. Hoagland, D. L. Smisek, D. Y. Chen, *Electrophoresis* 17 (1996) 1151.
42. Y. Mizuta, T. Masumizu, M. Kohno, A. Mori, L. Packer; *Biochem. Mol. Biol. Int*; 43 (5) (1997) 1107.
43. S. Yue Quian M. D. Kadiiska; Q. Guo, R.P. Mason; *Free Radic. Biol. Med.*; 38 (1) (2005) 125.
44. Lázaro Martínez, J. M. Tesis de Doctorado: Síntesis, Caracterización y Estudios de Aplicabilidad de Nuevos Materiales Poliméricos. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Fecha de defensa: 23 de marzo de 2011.
45. Tamami, B.; Ghasemi, S. *Appl. Catal. A* 393 (2011) 242.
46. Lu, W.; Chen, W.; Li, N.; Xu, M.; Yao, Y. *Appl. Catal. B* 87 (2009) 146–151.
47. Leal Denis, M.F.; Carballo, R.R.; Spiaggi, A.J.; Dabas, P.C.; Campo Dall'Orto, V.; Lázaro Martínez, J.M.; Buldain, G.Y. *React. Funct. Polym.* 68 (2008) 169.
48. Dos Santos, A. B.; Cervantes, F. J.; Van Lier, J. B. *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2369.
49. Chung, K. T.; Cerniglia, C. E. *Mutat. Res.* 277 (1992) 201.
50. González Clar, P. Y. Levin, G.; Miranda, M. V. Campo Dall'Orto, V. *Adv. Oxid. Technol. - Sustain. Solut. Environmental Treat.* Balkema, CRC Press, Taylor and Francis Group, (2014), 131.
51. H.B. Dunford, in: *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Vol. 2, J. Everse, K.E. Everse, M.B. Grisham (Ed.), CRC Press, Boca Raton, (1991).
52. Husain, Q.; Husain, M.; Kulshrestha, Y. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 29 (2009) 94.
53. Hamid, M.; Khalil ur-Rehman *Food Chem.* 115 (2009) 1177.
54. Gillikin, J.W.; Graham, J.S. *Plant Physiol.* 96 (1991) 214.
55. Kim, Y.H.; An, E.S.; Song, B.K.; Kim, D.S.; Chelikani, R. *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 1521.
56. Kennedy, K.; Alemany, K.; Warith, M. *Water Res.* 28 (2002) 149.
57. Kinsley, C.; Nicell, J.A. *Bioresour. Technol.* 73 (2000) 139.
58. Caza, N.; Bewtra, J.K.; Biswas, N.; Taylor, K.E. *Water Res.* 33 (1999) 3012.
59. Munir, I.Z.; Dordick, J.S. *Enzyme Microb. Tech.* 26 (2000) 337.
60. McEldoon, J.P.; Pokora, A.R.; Dordick, J.S. *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 359.

CAPÍTULO 2

POLÍMEROS INSOLUBLES EN AGUA

Los materiales insolubles derivados de EGDE, MAA y N-heterociclos son redes altamente funcionalizadas con residuos hidrofílicos, que facilitan su interacción con especies iónicas presentes en muestras de interés analítico, industrial y/o ambiental. La heterogeneidad de su estructura y la complejidad de sus propiedades físico-químicas resultan de la combinación de los reactivos en adecuada proporción en la mezcla de síntesis [1-3]. En el caso del material denominado *Poly(EGDE-MAA-2MI)*, el proceso continúa con el agregado de peróxido de benzoilo, en tanto que *Poly(EGDE-DA)* no requiere este reactivo. El contacto de estos materiales con soluciones de ciertos cationes de elementos de transición da lugar a la formación de los complejos correspondientes.

En este Capítulo de la Tesis se presenta la obtención y caracterización de los complejos *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* y *Co(II)-Poly(EGDE-DA)*, así como los estudios adicionales del complejo *Cu(II)-Poly(EGDE-DA)* obtenido en una etapa precedente [3]. En primer lugar, se hizo el análisis espectroscópico de las modificaciones producidas en los materiales como consecuencia de la captación de cationes de elementos de transición. Luego, el análisis calorimétrico y termogravimétrico proveyó información complementaria de los cambios en la estabilidad de los materiales producto de la captación de iones. Con la finalidad de obtener información adicional sobre la naturaleza de este proceso, se realizaron las isotermas de adsorción y su ajuste a distintos modelos teóricos y empíricos. Los valores obtenidos fueron contrastados con determinaciones experimentales de capacidad de carga. Se complementó con área superficial específica, así como con microscopía electrónica de barrido, a fin de ver cambios ocurridos a nivel de la superficie debido a la adición de cationes.

También se estudió la captación de un colorante azo-aniónico por las partículas del polianfolito *Poly(EGDE-MAA-2MI)*, y la captación de una enzima (peroxidasa) para su inmovilización en un biorreactor en sistema de flujo, con la correspondiente caracterización de los productos obtenidos.

En otra etapa se evaluó la función de los complejos con *Co(II)* y *Cu(II)* en el proceso de activación de H_2O_2 . Se abordó la identificación de los productos radicalarios obtenidos mediante resonancia de spin electrónico (ESR), y se discutieron los posibles mecanismos involucrados.

2.1. Caracterización de polímeros insolubles y sus complejos con Co(II) y Cu(II)

2.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se empleó espectroscopía FT-IR con el fin de determinar cuáles son los grupos funcionales involucrados en el proceso de captación de metal.

Poly(EGDE-MAA-2MI)

En la Figura 1 se presenta el espectro de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (inferior) y sucesivos espectros del material con cantidades crecientes de *Co(II)*. Sólo a altas concentraciones de *Co(II)* se observó una disminución relativa de la señal a 1570 cm^{-1} correspondiente al estiramiento

asimétrico de -COO^- y de la señal a 1730 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico del C=O .

Es decir, no se observaron modificaciones en las señales de FT-IR (para carboxilo) a bajas concentraciones de metal. Tampoco se manifestaron desplazamientos significativos de las bandas en los espectros FT-IR como consecuencia de la captación de catión, sin embargo existió una disminución general de la intensidad de las bandas causada por la heterogeneidad estructural que resulta de esta captación. Las partículas del complejo habrían presentado un crecimiento en su diámetro en función de la cantidad de Co(II) incorporado, originando un patrón de interferencia característico en los últimos espectros.

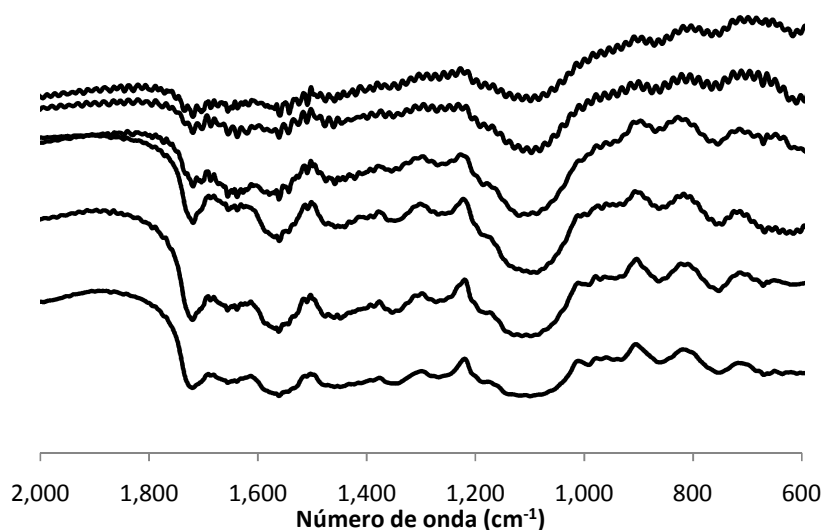


Figura 1. Espectro FT-IR de Poly(EGDE-MAA-2MI) (inferior), y con cantidades crecientes de Co(II) (superiores). Se utilizaron los materiales obtenidos de la isoterma de captación de Co(II) .

Poly(EGDE-DA)

En general para ambos complejos (con Co(II) y con Cu(II)), la resolución de los espectros FT-IR del material complejado resultó mayor que para el hidrogel nativo, ya que luego de la complejación, la rigidez aumentó, hecho que facilita su fragmentación en partículas más pequeñas, mejores para la técnica.

El espectro FT-IR correspondiente al material nativo (es decir, al producto a granel) presentó baja resolución por la presencia de partículas amorfas en el gel, debido a la dificultad en la pulverización homogénea del material (Figura 2). Sin embargo, se observaron algunas bandas a 1112 cm^{-1} , (correspondientes al estiramiento del enlace C-O de los éteres), 1460 y 1650 cm^{-1} (deformación del enlace -O-CH_2 y -N-H , respectivamente), 2930 cm^{-1} (estiramiento de C-H) y $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento de los grupos N-H / O-H).

Al igual que en el caso de *Poly(EGDE-MAA-2MI)*, los espectros de los complejos de *Poly(EGDE-DA)* con Co(II) y con Cu(II) presentaron mejor resolución que el del polielectrolito sin complejar. En particular, el material con Cu(II) presentó mejor resolución espectral debido a su mayor rigidez y menor tamaño de partícula. Esto se debe a que, el polielectrolito captó más

cantidad de Cu(II) que de Co(II) con un refuerzo de las interacciones entre las cadenas poliméricas y este catión.

Para el complejo con Cu(II), se observó una nueva banda en 603 cm^{-1} asociada con el estiramiento de la unión S–O del SO_4^{2-} que actúa como contracción del Cu(II). Se encontraron bien resueltas las bandas correspondientes al balanceo de los átomos del enlace N–H en 880 cm^{-1} y también la banda de estiramiento de N–H a $3566\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$. Este perfil resultó indicativo de la participación del grupo –NH₂ en el enlace covalente coordinado con Cu(II).

En el caso del complejo con Co(II), el espectro FT-IR exhibió bandas similares a las observadas para el complejo con Cu(II), pero mucho más débiles debido a la menor cantidad de Co(II) adsorbido.

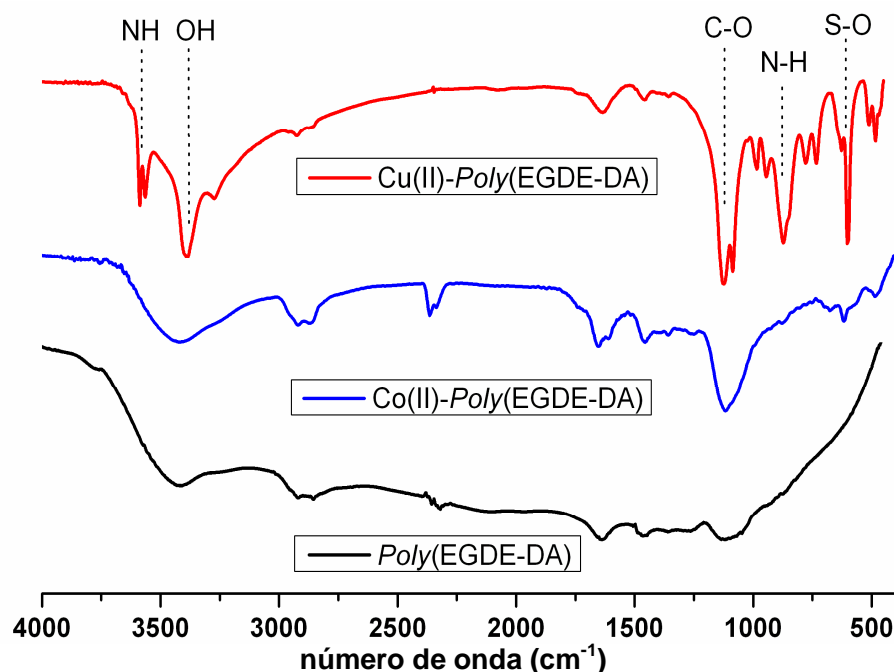


Figura 2. Espectros FT-IR de *Poly(EGDE-DA)*, *Cu(II)-Poly(EGDE-DA)* y *Co(II)-Poly(EGDE-DA)* conteniendo 107 mg de Cu(II) y 23 mg de Co(II) por gramo de polímero.

2.1.2. Resonancia magnética nuclear (NMR)

La espectroscopía de ^{13}C -RMN en estado sólido, resulta muy útil para el estudio y la caracterización de complejos entre metales de transición y materiales poliméricos.

En particular, los cambios en la estructura de un material, como consecuencia de modificaciones en su nivel de reticulación o por interacción con orbitales electrónicos de otros elementos (como el caso de los hidrogeles mencionados con metales de transición), producen modificaciones en el tiempo de relajación T_1 . Estos cambios, pueden observarse concretamente por la variación en el perfil de las señales en los espectros (ensanchamiento o angostamiento de señales), o por variación en su altura.

Para los casos en estudio, eran esperables las modificaciones que fueran producto de la coordinación entre el ion metálico y la matriz polimérica. Estos cambios se deben a que los iones paramagnéticos constituyen una nueva fuente fuerte de relajación, lo que produce una disminución en el T_1 de relajación y un ensanchamiento de la señal.

Para el caso del polianfolito, se observó previamente [1] que la señal de carbono carboxílico es un parámetro sensible para evaluar la unión de Cu(II).

Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)

En estudios precedentes se asignaron las señales correspondientes a los diferentes tipos de C de la estructura probable del polianfolito utilizado como ligando [2,3]. En el Esquema 1 aparecen numerados los C que se mencionan en la Figura 3.

Esquema 1: Estructura probable de *Poly(EGDE-MAA-2MI)*. Fue representado el residuo 2MI monosustituido. Los números en negro señalan los diferentes tipos de C asignados por ^{13}C CP-MAS.

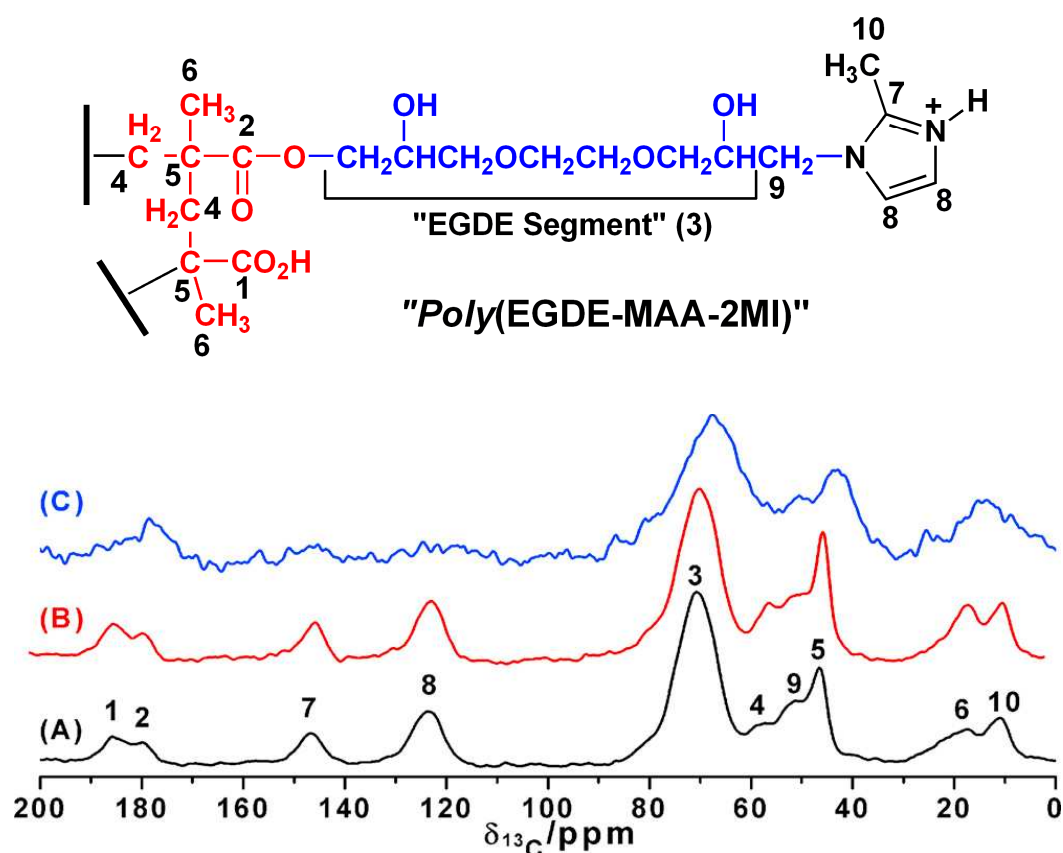


Figura 3. El espectro ^{13}C CP-MAS de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (A) y de sus complejos con Co(II), siendo (B) con 9 y (C) con 29 mg de catión por gramo de material.

Se empleó la espectroscopía NMR en estado sólido para caracterizar los complejos con Co(II) con el propósito de obtener una aproximación de los grupos funcionales involucrados en la esfera de coordinación del ion metálico en la matriz polimérica. Para evaluar la variación en la intensidad y el ancho de las señales de NMR, en función de la concentración de Co(II) sobre el material, se emplearon dos niveles de concentración de este catión.

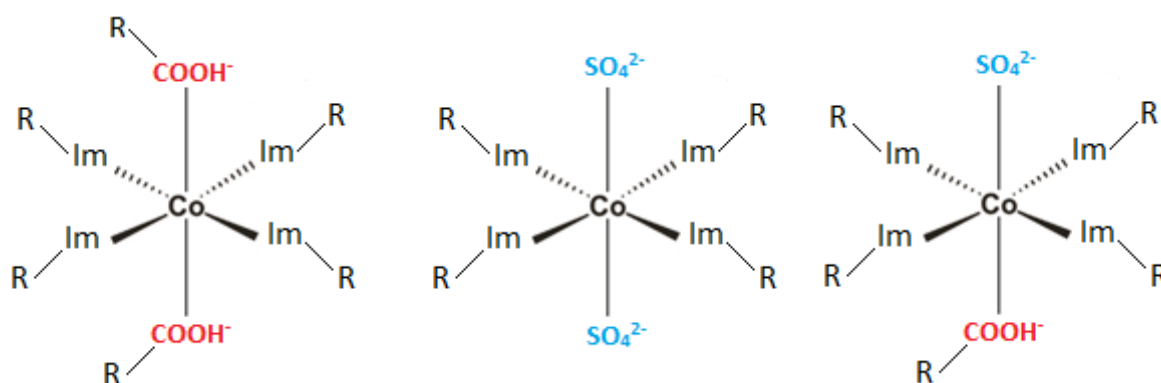
Los cambios más significativos que se observaron por NMR, para el caso del complejo con mayor cantidad de Co(II) captado, se produjeron en las señales de los átomos de C del anillo imidazólico, ($\text{C}_{7,8}$) y el C carboxílico (C_1), las cuales desaparecieron por completo del espectro.

Este comportamiento indica que existe una fuerte interacción entre los centros paramagnéticos y estos ligandos, lo que originó el ensanchamiento y la desaparición de las señales de resonancia a $29 \text{ mg Co(II) g}^{-1}$. Por este motivo, el tiempo de contacto de polarización cruzada en los experimentos de ^{13}C CP-MAS fue reducido a $800 \mu\text{s}$ en lugar de los $1500 \mu\text{s}$ del otro espectro de ^{13}C CP-MAS.

Otro factor que afectó la intensidad de las señales de NMR es el grado de disustitución de los residuos 2MI en el polímero. La muestra de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* complejoado con Co(II) se obtuvo de un lote de síntesis distinto que una muestra del polianfolito complejoado con Cu(II) descrita en trabajos anteriores [1]. Como la síntesis produce un polímero estadístico, el grado de disustitución de los restos 2MI es variable entre lotes, lo que justifica la diferencia en las señales de NMR. Dado que la matriz empleada particularmente en estos experimentos no presentó dominios positivos permanentes (es decir, hubo ausencia de disustitución N_1, N_3 en los residuos 2MI polimerizados, según se demostró por mediciones de potencial zeta y en las titulaciones potenciométricas), se observó una completa reducción de las señales de 2MI porque estos grupos actuaron como ligandos de Co(II) . En cambio, en los complejos con Cu(II) se había encontrado un 45 % de disustitución N_1, N_3 de las unidades 2MI polimerizadas [1], por lo tanto esa fracción no estaba disponible para coordinar el catión y la señal de C no desapareció del espectro ^{13}C CP-MAS.

A bajos niveles de Co(II) unido ($9 \text{ mg Co(II) g}^{-1}$), se observó un leve efecto de los iones sobre la intensidad de las señales de los C_9 y C_{10} (se produjo su ensanchamiento y disminución de intensidad). Aunque este cambio podría ser atribuido a modificaciones en la reticulación del material, las señales de los ligandos ($\text{C}_{1-7,8}$) no se vieron alteradas. Una diferencia con los complejos del mismo material con Cu(II) , estudiados en trabajos precedentes [1], se observó en la señal del C_1 que se vio especialmente afectada a partir de $8 \text{ mg de Cu(II) g}^{-1}$, teniendo presente que los iones Cu(II) producen mayor reducción de los tiempos de relajación de ^1H que los iones Co(II) [4]. Con estos resultados, se concluyó que los iones Co(II) deben estar coordinados con los átomos de O de $-\text{COO}^-$ y los N de 2MI, en el material con $29 \text{ mg Co(II) g}^{-1}$ (Esquema 2) [5].

Esquema 2: Posibles estructuras químicas de los complejos $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$. La geometría más probable es plano cuadrada u octaédrica, con el ion Co(II) coordinado en diferentes combinaciones a los grupos $-\text{COO}^-$.



Poly(EGDE-DA)

En este caso se efectuó un estudio comparativo entre el material nativo y sus versiones complejadas con Co(II) y Cu(II), en un único nivel de concentración.

El Esquema 3 representa la estructura probable del material [3] y los números en negro corresponden a los diferentes tipos de C asignados por ^{13}C CP-MAS que se observan en la Figura 4. La señal más intensa (en verdad, la única señal del espectro), observada a 70 ppm, correspondió a los C de los grupos metileno unidos directamente a átomos de O ($-\text{CH}_2-\text{O}-$), presentes tanto en los segmentos "EGDE" como en los "DA". Sin embargo, no se obtuvo información respecto de los C unidos a directamente a N. En estudios precedentes del espectro de Cu(II)-*Poly(EGDE-MAA-2MI)* [1], se destacó la pérdida de la señal del C metilénico unido a N, como un hombro de la señal principal, alrededor de 50 ppm, consecuencia del entrecruzamiento del sistema en presencia de iones Cu(II).

Esquema 3. Estructura probable del hidrogel denominado *Poly(EGDE-DA)*.

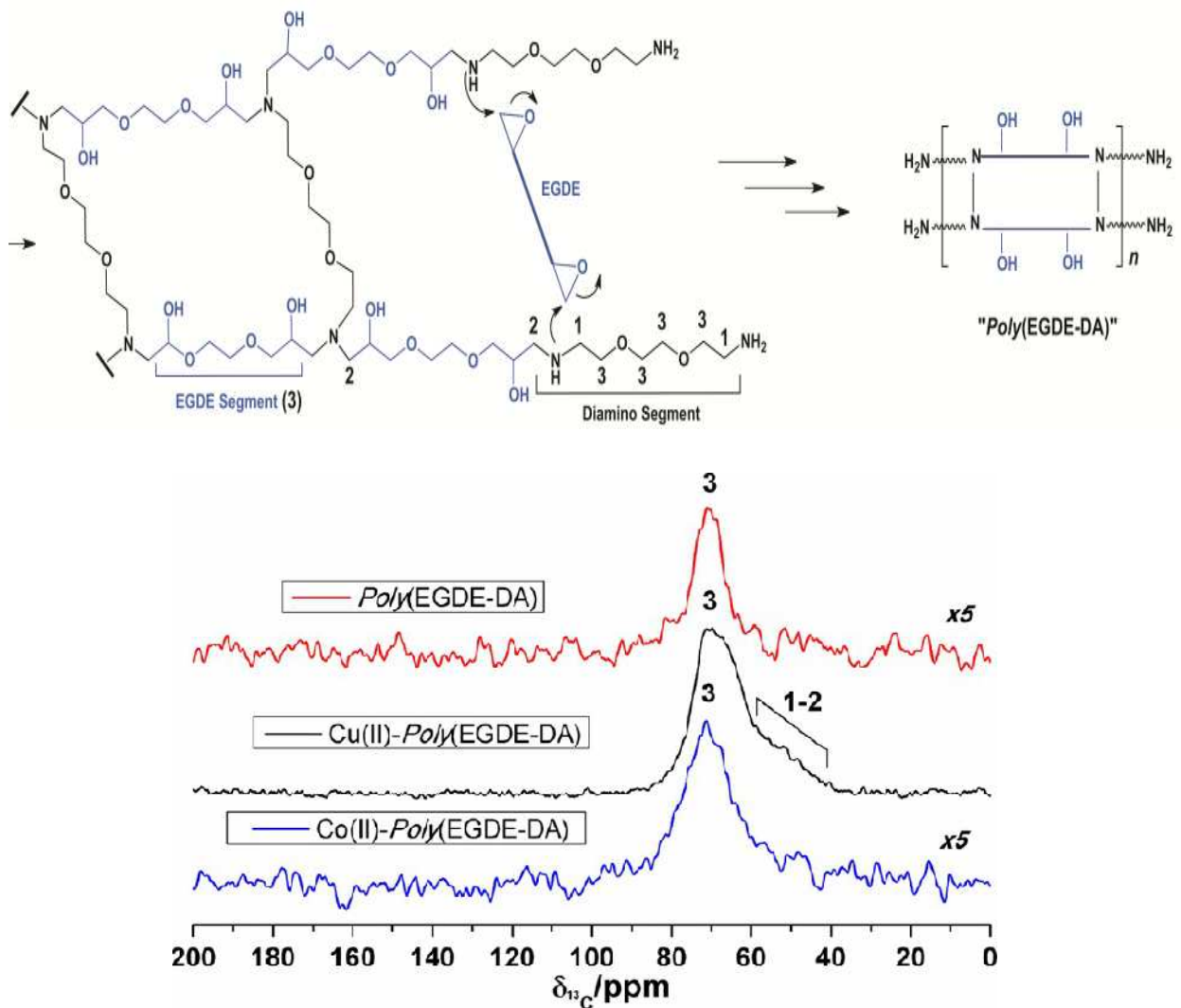


Figura 4. Espectros ^{13}C CP-MAS de *Poly(EGDE-DA)* y de sus complejos con Cu(II) y Co(II) conteniendo 107 y 23 mg de catión por gramo de polímero, respectivamente.

En general, con la captación de catión, hubo una mejora en la relación señal / ruido debido a que los iones Cu(II) inducen la reticulación del sistema, lo que produce un aumento en la señal. Sin embargo, aún con esta influencia, los iones paramagnéticos también favorecen la relajación de los C en la proximidad del ion metálico, que ocasiona el efecto opuesto, con un predominio del fenómeno producido por el ion paramagnético. Por esta razón, la influencia del segundo efecto fue más marcada y en la sumatoria, se observa que la señal del C metilénico no se resolvió completamente.

Por último, para el caso de los complejos de *Poly*(EGDE-DA) con Co(II), el espectro de ^{13}C CP-MAS fue similar al del material sin complejar, por lo que no hubo evidencia de coordinación por este método. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias en los espectros obtenidos con la técnica de FT-IR (Figura 2), atribuibles a cambios en la heterogeneidad del material y tamaño de partícula.

2.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TG)

Los resultados de la espectroscopía NMR señalaron diferencias en el grado de reticulación entre el material complejado y sin complejar.

Con la finalidad de analizar las modificaciones en el grado de reticulación y en la termoestabilidad, tanto de los hidrogeles como de sus complejos de coordinación, se llevaron a cabo estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TG).

Con la primera técnica, se pueden determinar los valores de entalpía relacionados con cambios de estado. Para los materiales poliméricos, es importante la determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g). Esta consiste en una transición entre un estado vítreo aparentemente sólido, de movilidad extremadamente baja, y uno líquido. Por encima de la T_g los enlaces secundarios de las moléculas son mucho más débiles que el movimiento térmico de estas, por ello el polímero se torna gomoso y adquiere cierta elasticidad y capacidad de deformación plástica sin fractura. Este comportamiento es específico de polímeros termoplásticos y no ocurre en polímeros termoestables.

Poly(EGDE-DA)

La Figura 5 exhibe los resultados de DSC obtenidos para el polielectrolito y sus complejos. El valor T_g obtenido a partir de las curvas de DSC fue de 120°C , mientras que para el complejo con $131\text{ mg Cu(II) g}^{-1}$ fue de 169.5°C . Este desplazamiento a mayores valores de temperatura, se debe al efecto estabilizador del electrón d del ion Cu(II) coordinado, como se espera, y también es otra consecuencia del entrecruzamiento entre las cadenas del polímero y el ion Cu(II) [6]. Para el complejo con Co (II) el valor de T_g fue de 134.1°C , menor que para el caso del Cu(II), en concordancia con la menor cantidad de ion Co(II) adsorbido sobre el material polimérico, lo que redujo el número de entrecruzamientos entre las cadenas del material y el ion metálico.

Como complemento, se efectuaron análisis termogravimétricos sobre todas las muestras (Figura 6). Se observó en todos los casos una pérdida de peso inicial, debida a la evaporación de moléculas de agua adsorbida, a una temperatura que coincidió con un pico endotérmico determinado en el primer ciclo de barrido en la DSC (resultados no mostrados). Para el material nativo, la descomposición se inició a $\sim 300^\circ\text{C}$, y se verificó la mayor pérdida de masa a 377°C .

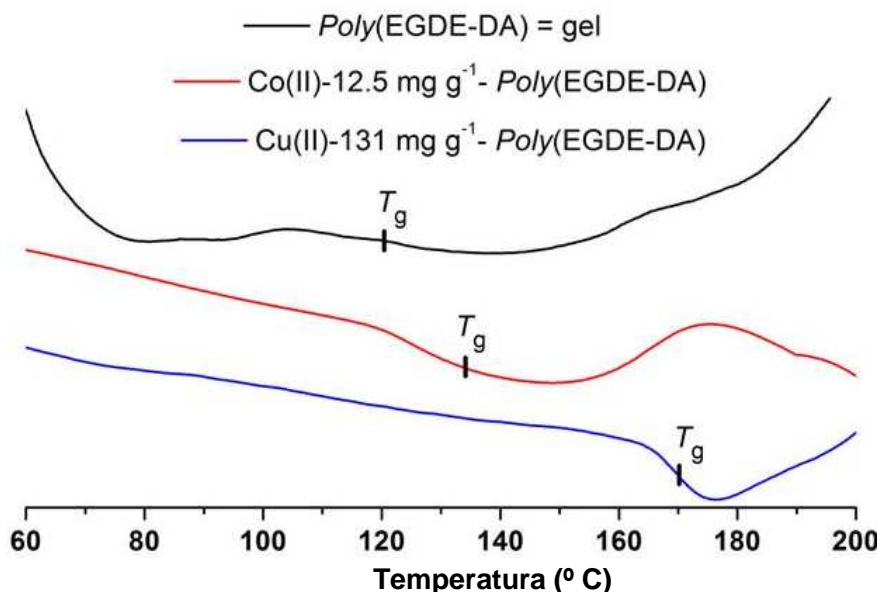


Figura 5: Curvas de DSC para *Poly(EGDE-DA)* y sus complejos con Co(II) y Cu(II), correspondientes al segundo barrido, en un rango de temperatura de 60 a 200 °C.

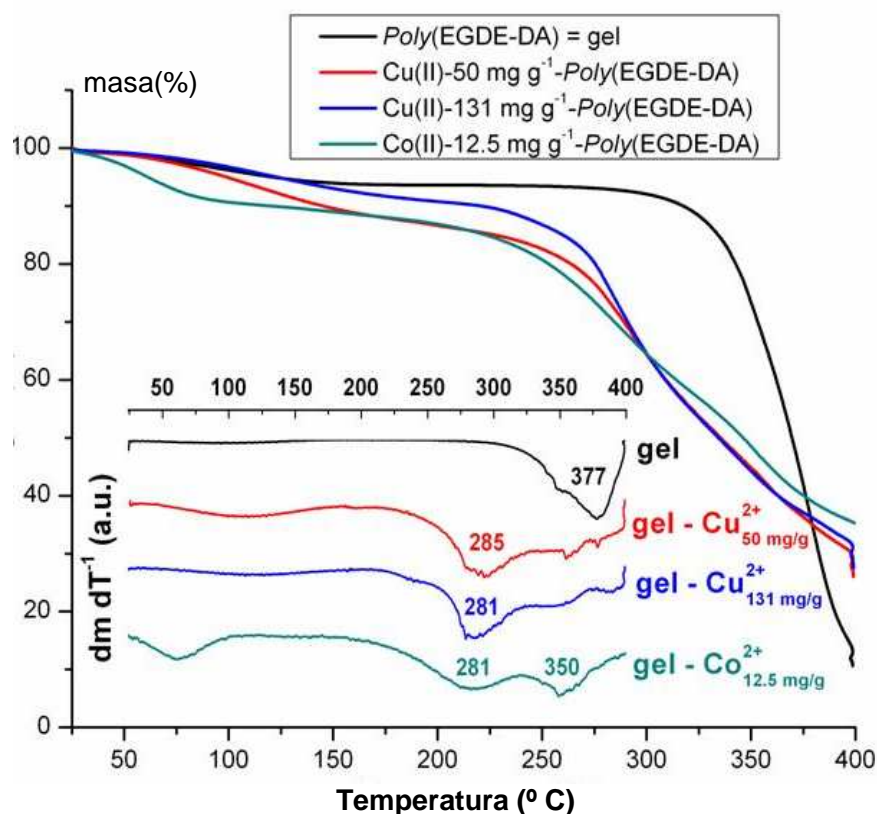


Figura 6. Termogravimetrías realizadas en *Poly(EGDE-DA)* y sus complejos.

En el caso del *Poly(EGDE-DA)* complejado, para ambos cationes se observó una disminución en la temperatura de descomposición térmica. Estos fenómenos denotan que la disminución en la estabilidad de la estructura del material se vio fuertemente afectada por la captación de iones metálicos, aun cuando la proporción de éstos fue baja, como es el caso del *Poly(EGDE-DA)* con

Co (II). El material complejado con Cu(II) tuvo una temperatura de descomposición de $\sim 200^\circ$ C. La presencia de un centro de Cu(II) paramagnético, ocasionó cambios en la densidad electrónica en las proximidades del centro metálico, que produjo el debilitamiento de las uniones químicas [6]. Este efecto resultó ser independiente de las concentraciones de Cu(II) captado, como bien lo muestran los perfiles termogravimétricos para los complejos con 50 o 131 mg de Cu(II) g^{-1} . Por otra parte, el complejo con Co(II) exhibió un perfil termogravimétrico similar a los de los complejos con Cu(II) [6].

2.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDS)

Se obtuvieron imágenes con microscopio electrónico de barrido con el propósito de poner en evidencia modificaciones en la topografía de las partículas poliméricas como consecuencia de la complejación con cationes de elementos de transición. Como complemento se efectuaron estudios de espectroscopía por energía dispersiva (EDS) con el fin de confirmar la identidad de los elementos presentes y a su vez, verificar que no hubiese artefactos.

Poly(EGDE-MAA-2MI)

Para ambos materiales (*Poly(EGDE-MAA-2MI)* y *Poly(EGDE-DA)*), se observaron cambios en el grado de homogeneidad de la superficie, como consecuencia de la captación de los cationes. Si bien el método no permite determinar área superficial, las imágenes obtenidas luego de la captación del catión parecerían corresponderse con un incremento de ésta (Figura 7.A y B).

Mediante EDS se verificó la identidad de los contraiones (Figura 7.C-E). Se observó señal para el azufre, cuando se utilizó $CoSO_4$ para obtener el complejo con Co(II), lo que evidencia que el SO_4^{2-} permaneció como contraion. La señal del azufre estuvo ausente en el control correspondiente a complejos preparados a partir de acetato de cobalto. La presencia de SO_4^{2-} , es una evidencia de la existencia de cargas positivas fijas sobre la superficie del material, provenientes del Co(II) y/o residuos $2MIH^+$ polimerizados. Eventualmente el sulfato puede intercambiarse por otros aniones, como se verá en la Sección 2.3.

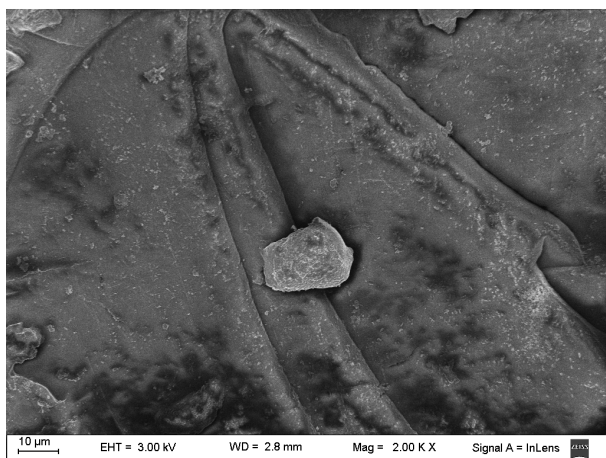
Poly(EGDE-DA)

Los complejos de *Poly(EGDE-DA)* con Cu(II) y Co(II) fueron caracterizados con microscopía SEM para evidenciar cambios en la morfología, respecto del material nativo. En este caso, la diferencia en la homogeneidad de la superficie fue visualmente más marcada que para el caso del *Poly(EGDE-MAA-2MI)*. En el caso del polielectrolito nativo, se visualizó la superficie homogénea, en tanto que se percibieron las irregularidades de los materiales como consecuencia de la complejación.

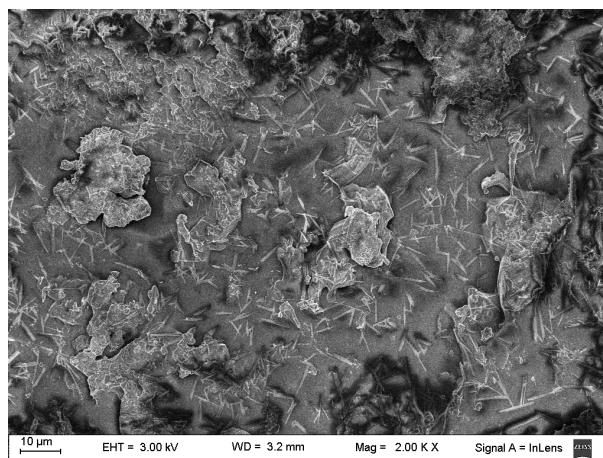
Además, las imágenes del complejo Co(II)-*Poly(EGDE-DA)* con magnificación 1000 X exhibieron arreglos regulares de macroporos, de 5 a 10 μm de diámetro, no observadas en otras muestras (Figura 8.C).

La identidad del cobre y el cobalto, así como la de los contraiones de sus sales, fue verificada mediante espectros de EDS (Figura 9). Por esta técnica, se detectó la presencia del elemento azufre (consistente con los resultados obtenidos por FT-IR), debido a que fueron empleadas sales de $CoSO_4$ y $CuSO_4$ para la obtención de los complejos respectivos, en tanto que la señal de azufre

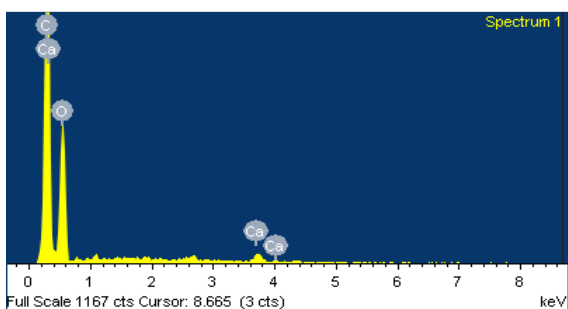
estuvo ausente en los complejos producidos a partir de acetato de cobalto. La presencia de SO_4^{2-} evidenció la existencia de cargas positivas fijas sobre la superficie de las partículas: Co(II) , Cu(II) , y/o $-\text{R}_2\text{NH}^+$. El ion SO_4^{2-} eventualmente podría ser intercambiado por otros aniones.



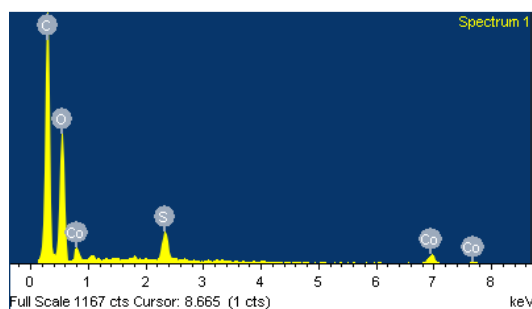
SEM de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (A)



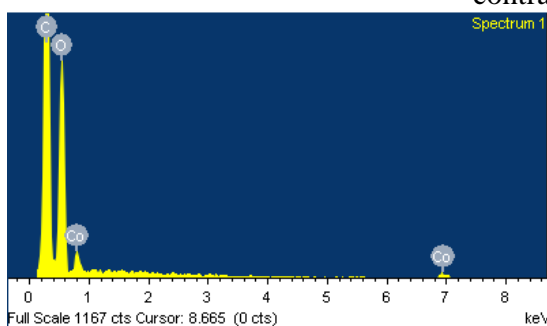
SEM de *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* (B)



EDS de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (C)



EDS de *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* contraion SO_4^{2-} (D)



EDS de *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* contraion acetato (E)

Figura 7. Imágenes SEM de la superficie de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (A) y *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* (B) en una magnificación 2K X. Espectros EDS de *Poly(EGDEMAA-2MI)* (C), *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* obtenido de CoSO_4 (D) y *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* obtenido de acetato de cobalto (II) (E).

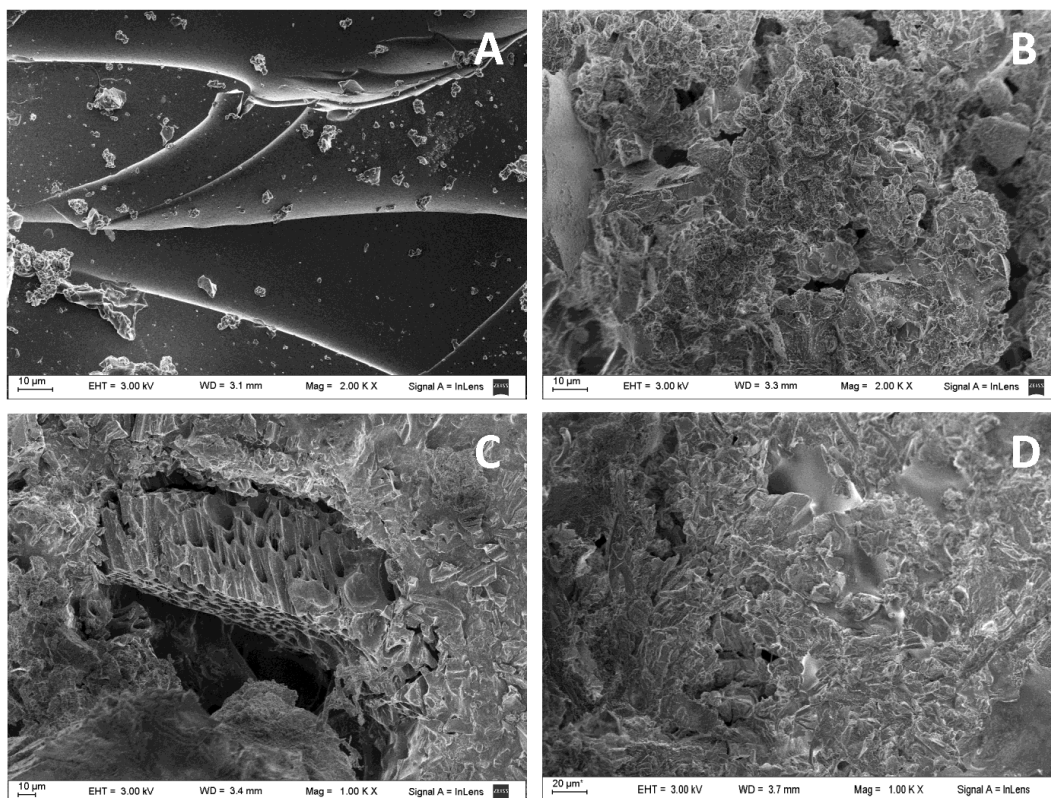


Figura 8. Imágenes SEM de *Poly(EGDE-DA)* (A), *Co(II)-Poly(EGDE-DA)* (B y C) y *Cu(II)-Poly(EGDE-DA)* (D).

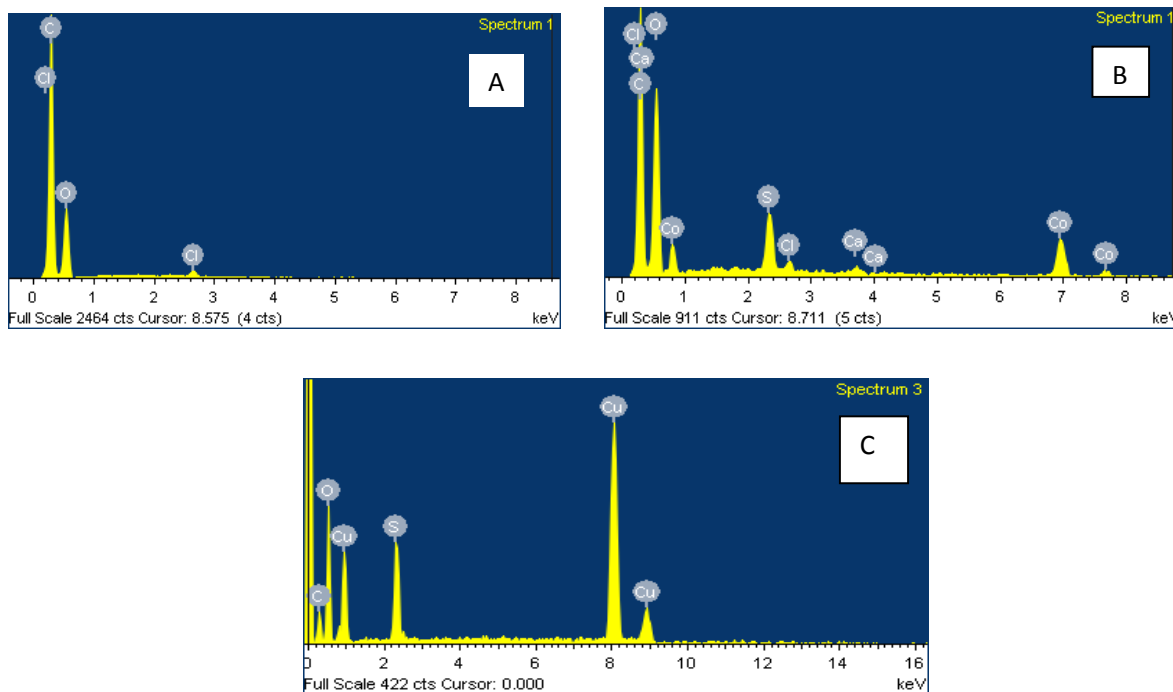


Figura 9. Espectros EDS de *Poly(EGDE-DA)* (A), *Co(II)-Poly(EGDE-DA)* (B) y *Cu(II)-Poly(EGDE-DA)* (C).

2.1.5. Propiedades ácido-base

Poly(EGDE-MAA-2MI)

Teniendo en cuenta los grupos funcionales presentes en el polianfolito se procedió a estudiarlo por titulación ácido-base para cuantificar los residuos $-\text{COOH}$ y/o 2MI polimerizados. Se puso en contacto el material con exceso de solución valorante de HCl, y se obtuvieron dos tipos de grupos protonados: $-\text{COOH}$ y 2MIH^+ . A continuación se efectuó la titulación potenciométrica del polianfolito, empleando una solución valorante de NaOH (Figura 10). Los puntos de inflexión fueron determinados teniendo en cuenta la primera y segunda derivada.

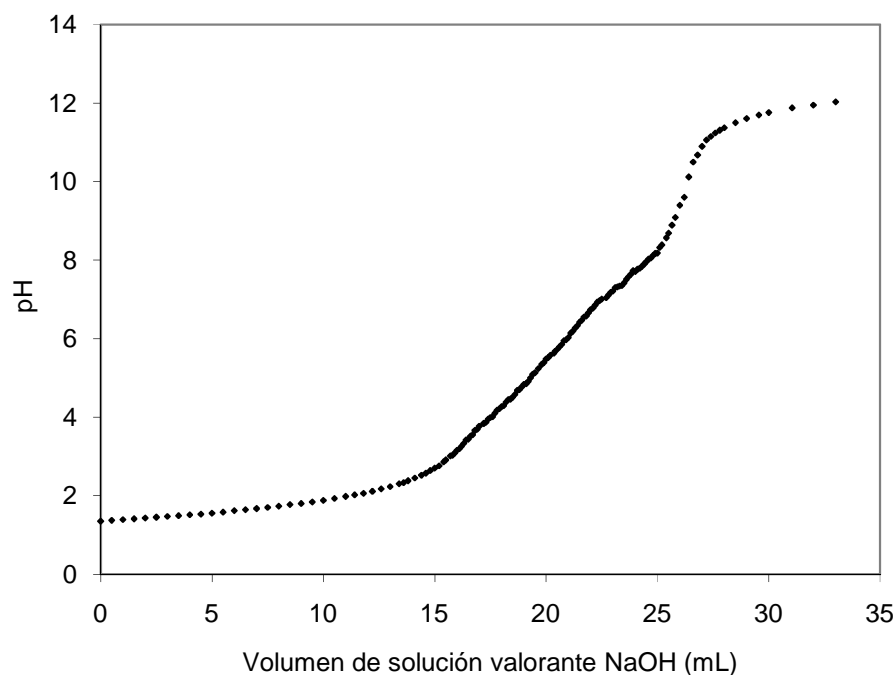


Figura 10. Curva de titulación de la forma ácida del polianfolito *Poly(EGDE-MAA-2MI)*.

Una vez obtenidos los datos experimentales, se procedió a calcular el número de sitios protonados en función del pH, mediante un balance de cargas, para luego obtener la densidad de residuos protonables que se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros empíricos para *Poly(EGDE-MAA-2MI)* estimados a partir de la titulación potenciométrica.

	grupo $-\text{COOH}$	grupo 2MI
densidad de grupo (mmol g^{-1})	0.89	1.09 (2MI tituable)
pK_a°	4.79	7.58
pK_a monómero	4.66	7.86
n	1.29	1.38

Para *Poly*(EGDE-MAA-2MI), donde coexisten dos grupos con propiedades ácido-base diferentes, podemos definir dos constantes de disociación ácida partiendo de la unidad polimérica completamente protonada (H_2P^+):



Donde H_2P^+ representa el polímero que posee $-COOH$ y $2MIH^+$ polimerizados; HP^\pm representa el polímero con grupos $-COO^-$ y grupos $2MIH^+$ polimerizados y por último P^- representa el polímero con grupos $-COO^-$ y $2MI$ polimerizados. K_{a1} indica la constante de disociación ácida del grupo $-COOH$ del MAA polimerizado y la K_{a2} a la constante de los grupos $2MIH^+$ polimerizados [3,6].

A su vez, el grado de disociación ácida (α) para H_2P^+ se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{[Na^+]_a + [H^+] - [OH^-]}{C_{total}} \quad (3)$$

Donde $[Na^+]_a$ representa la concentración de iones sodio provenientes de la base fuerte agregada tras la neutralización del HCl en exceso, $[H^+]$ y $[OH^-]$ son las concentraciones de iones hidronio e hidróxido obtenidas de cada punto de titulación, respectivamente, y C_{total} es la concentración total de restos ácidos ($-COOH$ y $2MIH^+$) en la mezcla.

Por otra parte, y en ausencia de cargas eléctricas permanentes, la carga promedio de la matriz polimérica (q_p) se encuentra relacionada con el grado de disociación de la siguiente manera:

$$q_p = (\text{Fracción molar de 2MI tituable}) - \alpha \quad (4)$$

Conforme avanza la titulación con solución valorante de NaOH, disminuye el número de sitios protonados sobre el material y por tanto, la carga neta positiva del polímero disminuye. Cuando la carga promedio es cero, el grado de disociación coincide con la fracción molar de 2MI polimerizado tituable (es decir, 2MI monosustituido y accesible a la titulación). De esta manera puede obtenerse el punto isoeléctrico (*IEP*) en polianfolitos que contienen solamente grupos neutralizables débiles y sin cargas fijas permanentes (tipo amonio cuaternario) [3,6].

Por último y con el objetivo de estudiar las interacciones electrostáticas entre grupos vecinos con cargas opuestas se presentan las siguientes ecuaciones:

$$pH = pKa^\circ + n \times \log \frac{\alpha_i}{1 - \alpha_i} \quad (5)$$

Ecuación de Henderson–Hasselbalch modificada

$$pKa = pKa^\circ + (n - 1) \times \log \frac{\alpha_i}{1 - \alpha_i} \quad (6)$$

Donde α_i representa el grado de disociación ácida para $-COOH$ y por lo tanto la fracción molar de $-COO^-$ que depende del pH y varía conforme avanza la titulación ($\alpha_{-COO^-} : [MA^-]/C_{total\ MAA}$). También α_i representa el grado de disociación ácida para $2MIH^+$ y por lo tanto la fracción molar

de 2MI que depende del pH ($\alpha_{2MI} = [2MI]/C_{total\ 2MI}$). Estos valores se calculan a partir del volumen de valorante gastado en cada punto de la curva y la densidad de $-COOH$ y de $2MIH^+$ titulables. El pKa_1° es el pKa_1 a un $\alpha_{-COO^-} : 0.5$ y el pKa_2° es el pKa_2 a un $\alpha_{2MI} : 0.5$. Los valores de pKa para los grupos ionizables son aparentes, siendo afectados por esta interacción electrostática, y pueden calcularse a partir del pH y el α_i mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch tradicional para cada punto de la curva de titulación (Figuras 11 y 12).

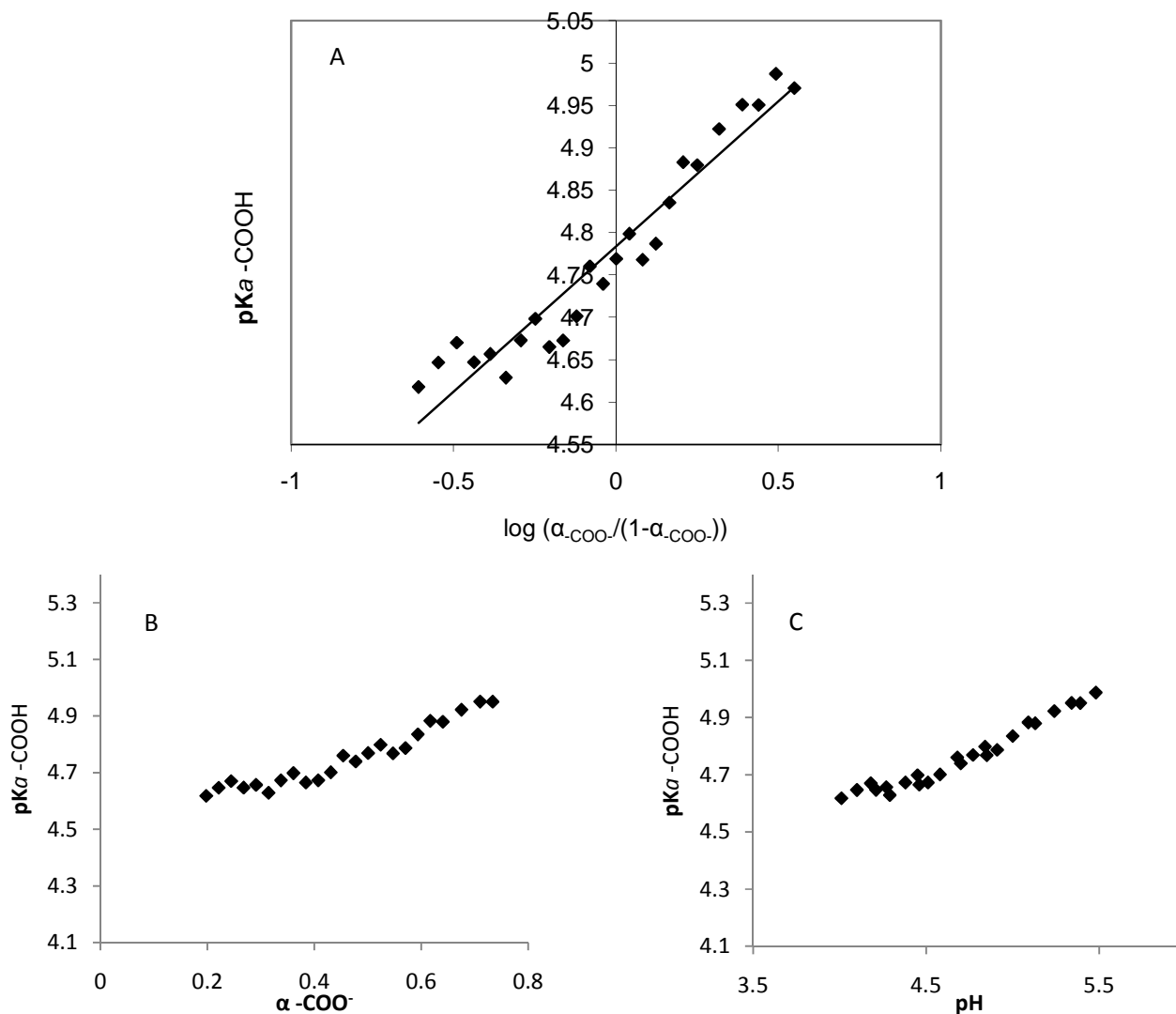


Figura 11. Representación de pKa calculado a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch vs. el término log relacionado con el grado de disociación ácida de los residuos MAA polimerizados (A); pKa vs. fracción molar de MA^- (α_{-COO^-}) (B); pKa vs. pH (C).

El parámetro n está relacionado con la fuerza de la interacción electrostática entre los vecinos próximos a un grupo en estudio. También n se relaciona con la hidrofobicidad/hidrofilicidad del entorno ya que su magnitud puede ser vista como un índice de accesibilidad del H^+ en la reacción ácido-base. El cálculo de este valor n constituye una manera empírica de cuantificar la influencia de este entorno y brinda una medida de la desviación de los polímeros estudiados con respecto al comportamiento de pequeñas moléculas, generalmente solubles, que presentan una constante de

disociación marcadamente definida y n igual a 1. Valores más altos de n nos indican que la disociación de H^+ se ve afectada por el grado de disociación y el pH [3,6].

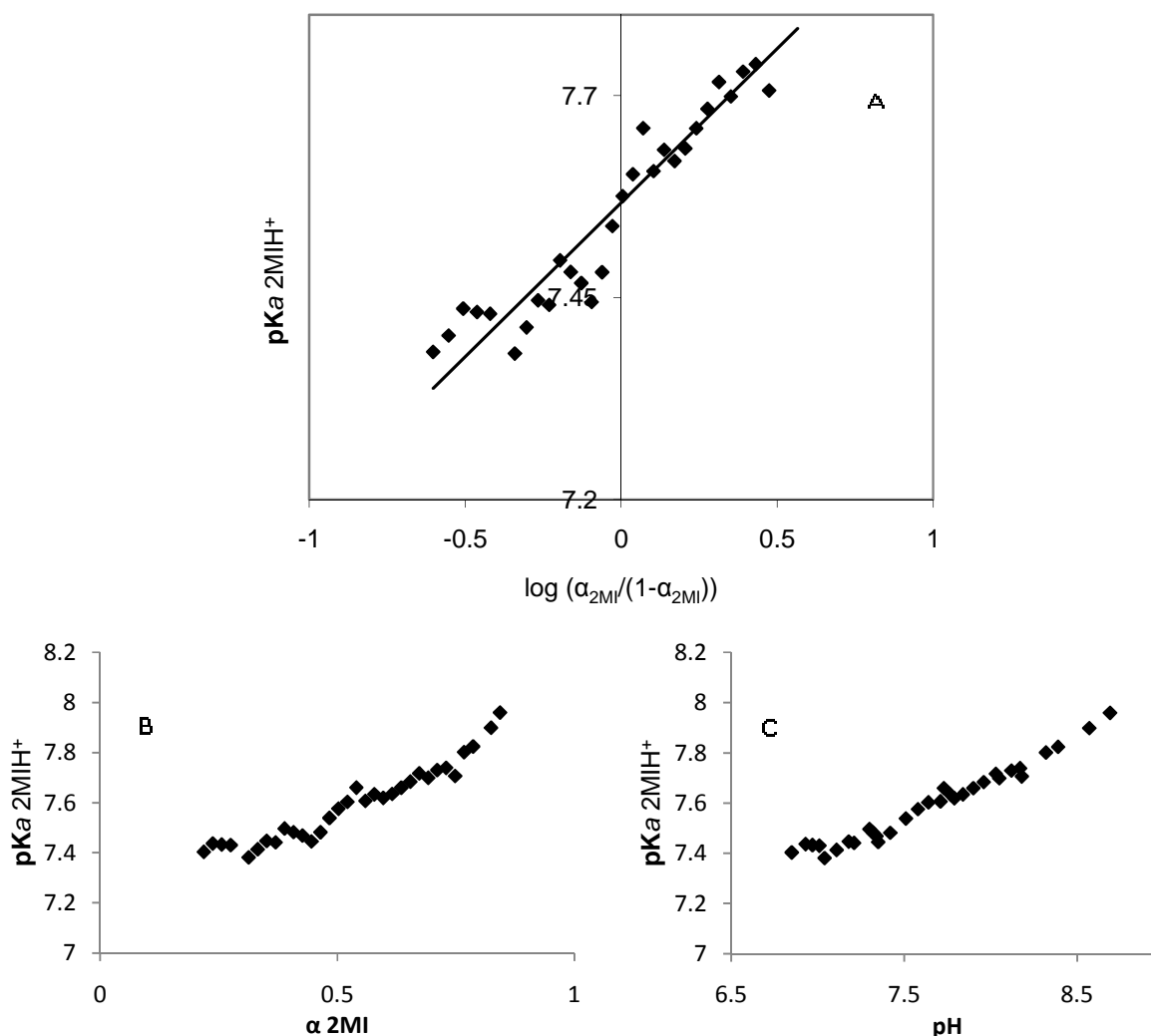


Figura 12. Representación de pK_a calculado a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch vs. el término \log relacionado con el grado de disociación ácida de los residuos $2MIH^+$ polimerizados (A); pK_a vs. fracción molar de 2MI ($\alpha\ 2MI$) (B); pK_a vs. pH (C).

Así, los valores de pK_a resultaron aparentes porque fueron sensibles a las cargas que se encuentran en el entorno del grupo protonable en estudio, esto quiere decir que variaron de acuerdo a las condiciones en las proximidades donde se ubica el grupo en cuestión. La Tabla 1 presenta los parámetros estimados a partir de los resultados obtenidos en la titulación del lote de polianfolito empleado en la captación de $Co(II)$. El parámetro empírico n resultó bajo para este polianfolito cuando fue comparado con polielectrolitos y betaínas, posiblemente debido a la presencia de segmentos neutros de las unidades EGDE que actúan apantallando los sitios cargados [6].

El pK_a° del grupo $-\text{COOH}$ en el polímero resultó mayor que el pK_a del monómero, y esto puede asociarse a la hidrofobicidad y / o el grado de entrecruzamiento en el polímero en coincidencia con una cierta cercanía entre sitios $-\text{COO}^-$ que dificulta la disociación del H^+ . A pH inferior a 4.0 y $\alpha_{-\text{COO}^-}$ inferior a 0.4, el pK_a se mantuvo estable en el valor más bajo, que coincidió con el pK_a del monómero.

Por otra parte, el pK_a° del grupo 2MIH^+ en el polímero resultó menor que el del monómero, probablemente asociado a una distribución en cluster de los residuos 2MI monosustituidos (protonables). La repulsión electrostática entre grupos vecinos cercanos facilitarían la disociación de H^+ . El valor de n resultó también ligeramente más alto para este grupo funcional.

El punto isoeléctrico (IEP) calculado a partir de la información de los grupos funcionales titulables fue 6.75 [2]. Este valor resultó similar al IEP experimental de 6.77 obtenido a partir de las mediciones de potencial zeta (ζ) (Figura 13). Esta coincidencia nos indica que en este lote de polianfolito no existen residuos de 2MI disustituidos y con carga positiva permanente (2MI^+).

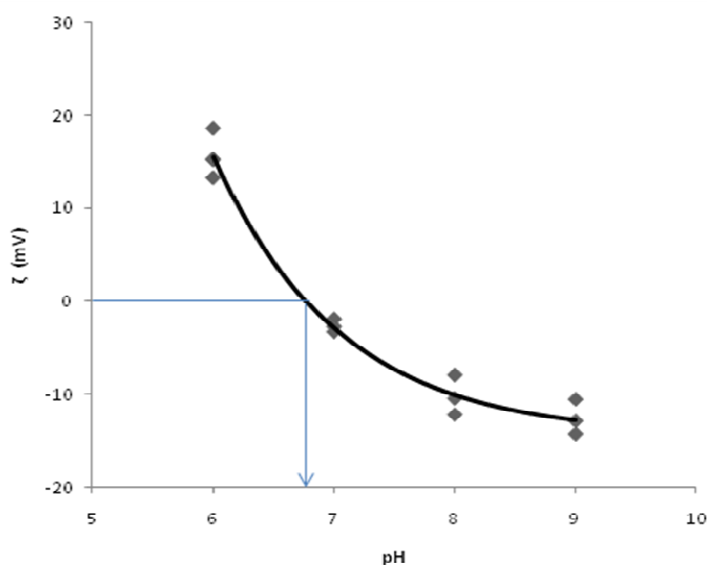


Figura 13. Valores de ζ para partículas de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* en $\text{KCl } 10^{-3} \text{ M}$ en función de pH. La flecha indica el IEP .

El análisis elemental de este lote de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* fue: C: 51.03 %; H: 8.19 % y N: 5.98 %. Esto indica que la cantidad total de 2MI polimerizado en el material fue de 2.13 mmol g^{-1} . Si se compara el número de mmoles de 2MI accesibles a la titulación con el número total de mmoles de 2MI determinado por análisis elemental, se encontró que solamente el 51.4 % fue accesible a la reacción ácido-base. A partir de las mediciones realizadas por dispersión de la luz (en las determinaciones de ζ) se encontró que el diámetro aparente de partícula promedio de este lote de polianfolito fue de $64 \pm 4 \mu\text{m}$.

Poly(EGDE-DA)

La cantidad de grupos protonables fue determinada mediante el agregado de un exceso de solución valorante de HCl con posterior titulación con solución valorante de NaOH (Figura 14). El primer punto final correspondió a la neutralización del exceso de HCl. El segundo punto final correspondió a la neutralización de los H^+ unidos a los grupos básicos del polielectrolito. Estos

pueden ser aminas primarias, secundarias o terciarias formadas a partir del monómero DA, y representadas como $-R_2N$, donde R puede ser H o bien cadena orgánica. El número de grupos básicos titulables determinados por potenciometría fue $0.978 \text{ mmol g}^{-1}$.

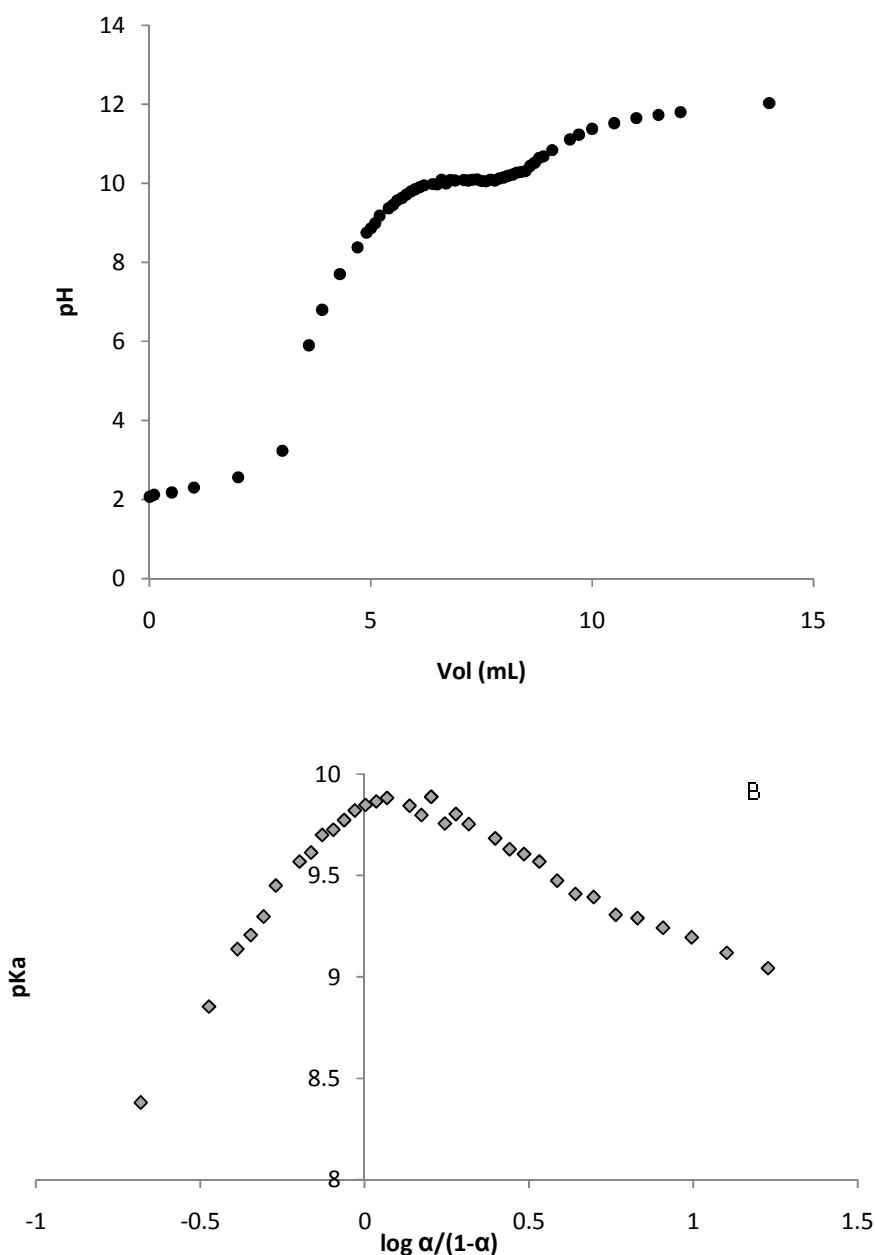


Figura 14. Titulación potenciométrica de *Poly*(EGDE-DA) en presencia de un exceso de solución valorante de HCl, empleando solución valorante de NaOH (A). Representación de pKa vs $\log (\alpha / (1-\alpha))$ a partir de los datos de la curva de titulación (B).

Por otra parte, la composición elemental de las partículas poliméricas resultó: N: 5.1 %; C: 52.1 %; H: 9.2 %. A partir de este resultado se dedujo que 1.82 mmoles de DA están unidos a segmentos EGDE por gramo de polímero, y que habría 3.64 mmoles de grupos básicos g^{-1} . Aquí se encontró que solamente el 27 % de los átomos de N constituyeron sitios básicos titulables. A

diferencia de los materiales que contienen IM o derivados, este polímero no presenta cargas positivas permanentes en su estructura.

En la curva de la Figura 14 se observó una región buffer a un pH alrededor de 10.0, debida a la presencia de grupos $-R_2N / -R_2NH^+$ en la red. Paralelamente, el *IEP* determinado mediante medición del potencial de difusión fue de 10.5 (Figura 15). Es decir, las partículas presentaron cargas positivas a valores de pH inferiores al *IEP*, y a valores de pH superiores al *IEP* el material resultó neutro.

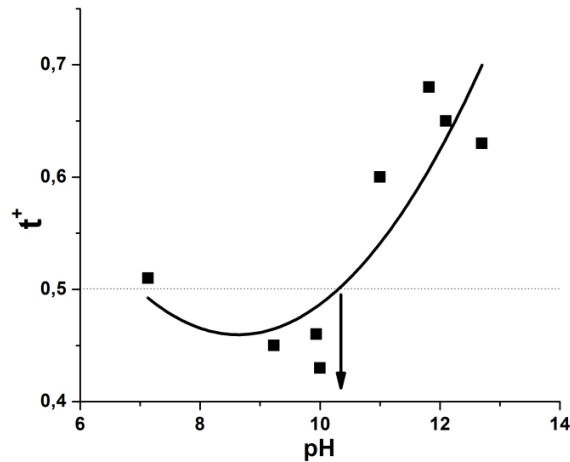
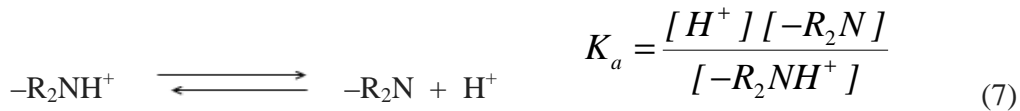


Figura 15. Número de transporte (t^+) vs pH a partir del método de potencial de difusión usado para determinar el *IEP* de la superficie de las partículas.

El equilibrio de disociación ácida del polielectrolito protonado ($-R_2NH^+$) se rige por la correspondiente constante aparente de equilibrio (K_a):



El grado de disociación ácida (α) para el grupo $-R_2NH^+$ se calculó a partir de cada punto del experimento de titulación de acuerdo con la expresión derivada a partir del balance de carga, representada en la Ecuación 3, siendo C: $[-R_2NH^+] + [-R_2N]$.

Para analizar la interacción electrostática entre grupos cargados, se empleó la ecuación de Henderson-Hasselbalch modificada. El valor de pK_a resultó aparente debido a que fue sensible al efecto de cargas eléctricas del mismo signo cercanas en el entorno, y también resultó sensible a cambios conformacionales.

Los parámetros y errores estándar estimados para la ecuación de Henderson-Hasselbalch modificada fueron:

$$\begin{aligned} \text{Para } \alpha < 0.5 \quad pK_a^0: 9.96 \pm 0.03 \quad n: 3.24 \pm 0.09 \\ \text{Para } \alpha > 0.5 \quad pK_a^0: 9.97 \pm 0.02 \quad n: 0.21 \pm 0.02 \end{aligned}$$

La Figura 14.B muestra la relación entre pK_a y el grado de disociación ácida del material protonado. Aquí, cuando más del 50 % de los grupos accesibles se encontraba protonado ($\alpha <$

0.5), el efecto electrostático repulsivo de $-R_2NH^+$ provocó que estas unidades fueran más ácidas y se observó una disminución de los valores de pK_a respecto de pK_a^o cuando el pH era bajo (Figura 14.B); el parámetro n fue significativamente mayor a 1.

Cuando menos del 50 % de los grupos accesibles permanecían protonados, el efecto electrostático resultó menos significativo debido a la disminución de la densidad de cargas eléctricas en la red. La disminución de pK_a respecto de pK_a^o cuando α se incrementó (Figura 14.B) podría atribuirse a cambios conformacionales como resultado de la desolvatación del material con la neutralización, y como resultado de la disminución de la repulsión electrostática entre cadenas. Es posible que dentro de la trama polimérica existiera una menor constante dieléctrica que hiciera más dificultosa la asociación de H^+ [6-9]. Visto desde otro ángulo, la ausencia de carga superficial a valores de pH elevados habría favorecido la exposición de regiones hidrofóbicas que repelieron las cargas positivas y así la acidez aumentó.

2.1.6. Conclusiones de la Sección 2.1

Mediante diversos métodos espectroscópicos y microscópicos fue demostrado que estos materiales altamente funcionalizados pueden captar Co(II) y Cu(II).

Los espectros FT-IR de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) mostraron un ensanchamiento general de las bandas de absorción como resultado de la captación de iones Co(II), y evidenciaron un aumento en el tamaño de las partículas.

La técnica ^{13}C CP-MAS brindó información inequívoca sobre la participación de los grupos $-COO^-$ y 2MI en la coordinación de Co(II), dado que las señales de los átomos de C cercanos al núcleo paramagnético se debilitaron y desaparecieron del espectro en función de la cantidad de Co(II) unido. Se observó un aumento en la rugosidad de las partículas de polianfolito luego de la captación del catión, a la vez que se determinó la presencia de SO_4^{2-} como contraión.

La tendencia a ceder protones por parte de los grupos $-COO^-$ y $2MIH^+$ polymerizados se vio afectada por el entorno en la trama polimérica, traduciéndose en valores aparentes de pK_a dependientes del pH y del grado de disociación del material. El *IEP* del polianfolito estimado en forma teórica coincidió con el valor experimental (6.77), lo que indica que el material no presentó cargas positivas permanentes y por lo tanto no se había producido la disustitución de los residuos 2MI en el lote de síntesis utilizado para la captación de Co(II). La densidad de sitios titulables totales fue de 1.98 mmoles g^{-1} .

El hidrogel denominado *Poly*(EGDE-DA) presentó residuos de tipo amino que, junto con los grupos $-OH$ provenientes de la apertura de epóxidos del EGDE, permitieron la captación de los iones Co(II) y Cu(II). Los espectros FT-IR del polielectrolito y sus complejos evidenciaron un aumento en la resolución de las bandas debido a un incremento en la reticulación y rigidez de las partículas por captación del catión. El incremento fue mucho más notorio en los complejos con Cu(II), en cuyos espectros también se encontró evidencia de la presencia de SO_4^{2-} como contraión. Los espectros de ^{13}C CP-MAS presentaron una única señal importante, correspondiente a átomos de C de la red, sin resolución.

Los resultados obtenidos por DSC evidenciaron aumentos en la T_g en presencia de los cationes, más significativo para el Cu(II), y fueron consistentes con el incremento en el grado de entrecruzamiento de las cadenas del polímero. La captación de los iones también generó una disminución en la estabilidad térmica del material, y un aumento en la rugosidad de la superficie

de las partículas. Las mediciones por EDS demostraron la presencia de SO_4^{2-} como contraión. Aproximadamente el 27 % de los átomos de N del polielectrolito resultaron sitios básicos titulables ($0.978 \text{ mmol g}^{-1}$). El *IEP* de *Poly*(EGDE-DA) determinado experimentalmente fue 10.5, ligeramente superior a una zona de pH estable debida al equilibrio $-\text{R}_2\text{N} / -\text{R}_2\text{NH}^+$. Los valores de *pKa* se vieron particularmente afectados por el entorno cuando el grado de disociación ácida del polímero fue bajo.

2.2. Estudios de captación de gases, de iones inorgánicos, iones orgánicos y compuestos biológicos, por los polímeros insolubles en agua

La elevada funcionalidad de estos materiales los vuelve aptos para procesos de captación de diversas especies químicas presentes en ambientes tales como efluentes industriales, extractos vegetales, fluidos biológicos, entre otros.

En esta sección se presentan los estudios cinéticos y/o del equilibrio de unión de gases, iones inorgánicos y orgánicos, así como de proteínas. El objetivo es conocer la capacidad de carga de los materiales usados, estimar la afinidad de éstos por la especie captada y adquirir el conocimiento necesario para poder predecir su aplicabilidad en la resolución de diferentes problemas analíticos, industriales o ambientales.

2.2.1. Captación de N_2 y de vapor de H_2O

La primera etapa en el estudio de las propiedades de superficie de las partículas suele ser la obtención de la isoterma de adsorción de N_2 , que brinda información sobre el área superficial específica, la existencia y las dimensiones de los poros en las partículas.

La adsorción de N_2 sobre los diferentes materiales estudiados (Figuras 16-18) fue modelada con la isoterma de Brunauer-Emmet-Teller (BET) y los resultados se presentan en la Tabla 2:

Tabla 2: Área superficial de las partículas y ancho medio de poro estimados mediante adsorción de N_2

Muestra	área superficial BET ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$)	Ancho medio de poro de adsorción (Å)
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	0.6	n.d.
<i>Poly</i> (EGDE-DA)	0.2145	24.9151
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	0.4525	49.5847
Cu(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	2.7870	285.9206

El área superficial específica determinada mediante la adsorción de N_2 resultó significativamente baja en ambos polímeros, probablemente debido a su naturaleza hidrofílica que repele en alguna medida los adsorbatos hidrofóbicos. El área accesible para el gas resultó incrementada con la cantidad de cationes adsorbidos, probablemente como consecuencia de la expansión de la red polimérica debido a la repulsión electrostática.

De acuerdo con los resultados tabulados, *Poly*(EGDE-DA) podría ser clasificado como un material mesoporoso, con un ancho medio de poro de adsorción en el límite inferior de esta categoría [10]. Los mesoporos de tamaño significativamente mayor que se observaron en sus

complejos con Cu(II) resultarían de la expansión de las cadenas como consecuencia de la repulsión electrostática entre cationes adsorbidos.

Sin embargo, los valores extremadamente pequeños de área superficial específica obtenidos a partir de la isoterma BET pone en dudas la utilidad de este método (basado en adsorción de N₂) para la determinación de área en estos materiales altamente hidrofílicos.

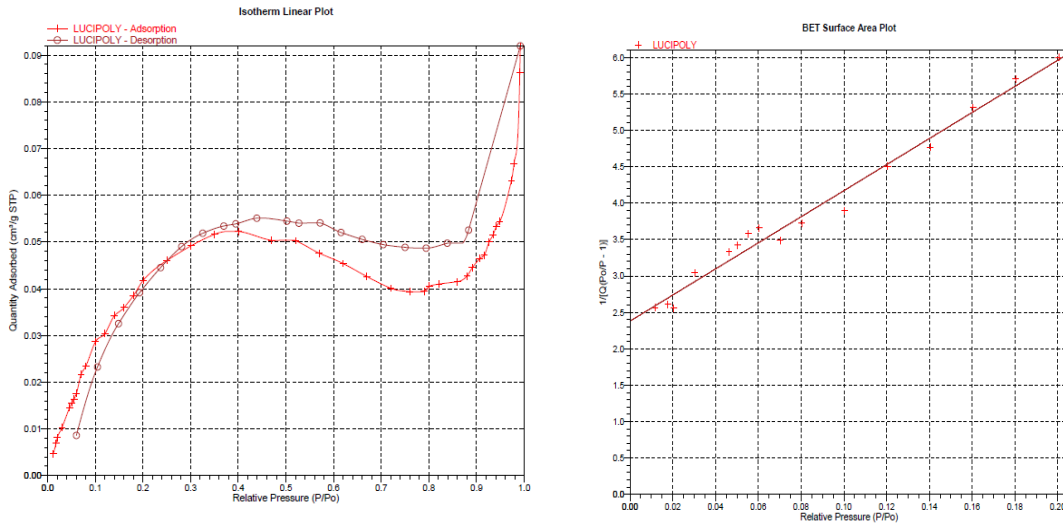


Figura 16: Cantidad de N₂ adsorbido sobre *Poly*(EGDE-DA) en función de la presión relativa para la adsorción (rojo) y la desorción (lila). Representación de la isoterma BET para los datos experimentales y los resultados del ajuste.

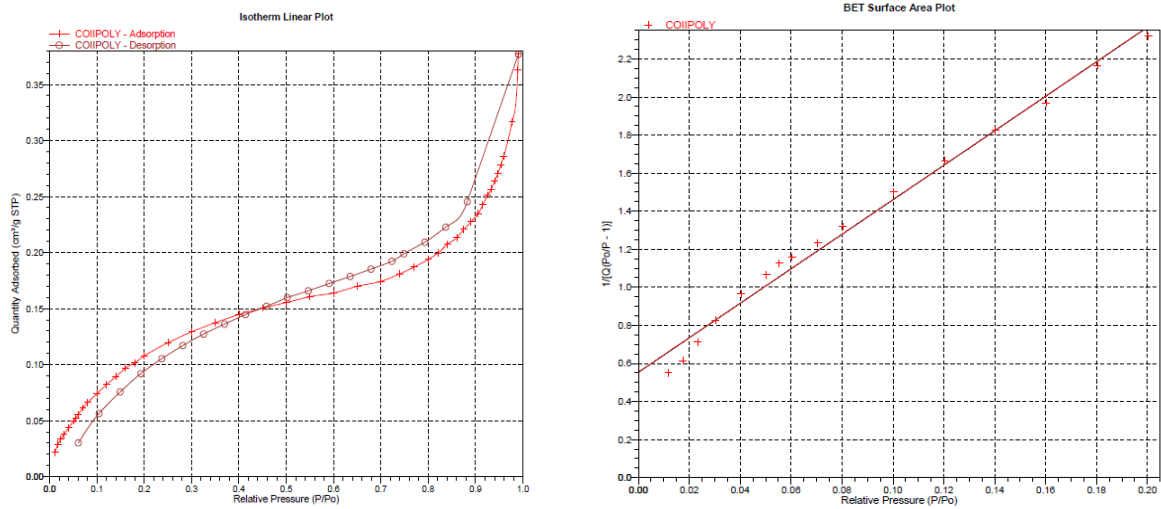


Figura 17: Cantidad de N₂ adsorbido sobre Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) en función de la presión relativa para la adsorción (rojo) y la desorción (lila). Representación de la isoterma BET para los datos experimentales y los resultados del ajuste.

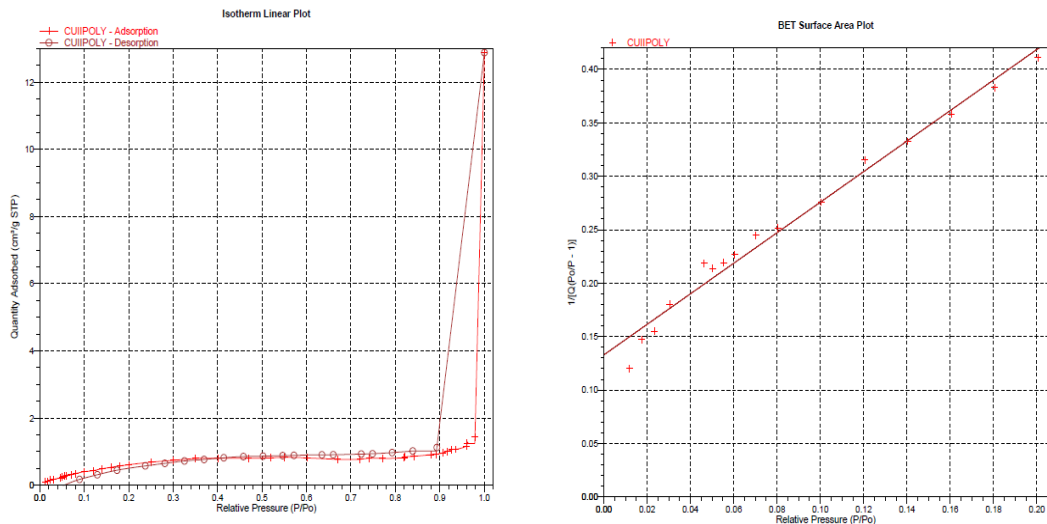


Figura 18: Cantidad de N₂ adsorbido sobre Cu(II)-Poly(EGDE-DA) en función de la presión relativa para la adsorción (rojo) y la desorción (lila). Representación de la isoterma BET para los datos experimentales y los resultados del ajuste.

Frente a esta situación, se realizó la adsorción de vapor de agua sobre Poly(EGDE-MAA-2MI) con el fin de estudiar el comportamiento del material frente a adsorbatos hidrofílicos y compararlo con la adsorción de N₂, de característica hidrofóbica.

Existen numerosas ecuaciones empíricas y semiempíricas que se emplean para correlacionar la humedad de equilibrio con la a_w de diferentes adsorbentes, particularmente de alimentos. Sin embargo, las más utilizadas en la industria de los alimentos son las ecuaciones de B.E.T y la de G.A.B. (Guggenheim-Anderson-de Boer). Dado el rango de a_w (0.11-0.97) que abarca este estudio, la caracterización de las isotermas de sorción (Figura 19) se efectuó por medio de la ecuación de GAB (Ecuación 8). Esta consiste en un modelo a tres parámetros y cuya expresión matemática es:

$$(8)$$

donde m es el contenido de humedad de equilibrio, m_m es el contenido de humedad de la monocapa y fue estimado en 0.081 ± 0.023 g H₂O en 1 g de masa seca, C es la constante de Guggenheim relacionada con el calor de sorción de la monocapa estimada en 2.4 ± 2.8 , y k es un parámetro que corrige la diferencia entre las propiedades del agua en la multicapa respecto al agua libre estimado en 0.919 ± 0.027 . El coeficiente de correlación, expresado como R^2 , en este estudio fue de 0.9823.

El área de adsorción fue determinada mediante el siguiente cálculo:

$$A = \frac{N \cdot a_{H_2O} \cdot m_m}{M} = \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol} \times 10.6 \times 10^{-20} \text{ m}^2 \times m_m}{18.0 \text{ g/mol}} = 3545 \times m_m \quad (9)$$

que da como resultado un área de adsorción de vapor de agua de $287 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Aquí es necesario destacar la notable diferencia entre los valores que surgieron de la adsorción de N₂ y el de adsorción de agua. La magnitud del área estimada en este último caso indicaría que las moléculas

de agua han tenido acceso a la totalidad del material, por lo que su unión no se restringió a la superficie sino que se extendió también al seno de la partícula, e hizo indistinguible el núcleo de la región superficial.

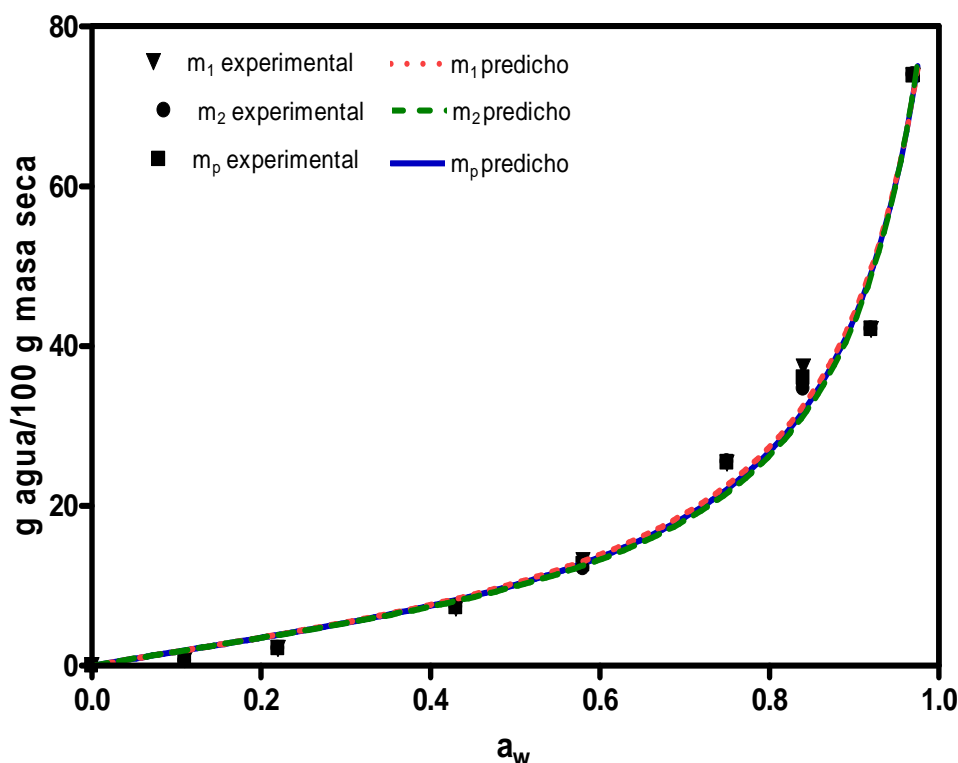


Figura 19. Valores del contenido de agua de equilibrio en función de la a_w , experimentales (símbolos) y predichos por la ecuación de GAB (líneas).

2.2.2. Captación de Co(II) y Cu(II)

En este segmento se presentan y discuten los estudios de captación de iones metálicos de transición por los hidrogeles *Poly*(EGDE-MAA-2MI) y *Poly*(EGDE-DA). El objetivo de este trabajo consistió en obtener información experimental para estimar los parámetros empíricos que describen los equilibrios de unión. Así es posible comparar la capacidad de carga de los polímeros para cada ion en estudio, la afinidad, y la estabilidad.

La importancia de estos experimentos radica en que estos materiales organo-metálicos se comportan como análogos de proteínas biológicas (materiales bioinspirados), según se verá en la Sección 2.3. Es ampliamente conocido que los iones de metales de transición coordinados producen la activación de H_2O_2 en reacciones de tipo Fenton [11], ventaja que es utilizada en química ambiental para la remoción de contaminantes por oxidación.

Se estudió particularmente la captación de Cu(II) por *Poly*(EGDE-DA), y la captación de Co(II) por *Poly*(EGDE-MAA-2MI) y por *Poly*(EGDE-DA) (Figura 20).

En el análisis microscópico de las partículas de los polímeros puestas en contacto con soluciones de Co(II) y Cu(II) fue imposible de distinguir el núcleo de la superficie, lo que indica que los iones han alcanzado el interior de las partículas. En los cortes de las partículas se observó toda la superficie de la sección homogéneamente coloreada (Figura 21). Si se produjera adsorción del

ion metálico solamente sobre la superficie expuesta, debería observarse un núcleo blanco. Esto nos permite concluir que el fenómeno de interacción con el metal no fue superficial sino que el catión alcanzó el seno del material, por lo que no deberíamos referirnos a procesos de adsorción sino de captación de metal.



Figura 20. Foto superior: *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (izquierda) y *Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)* (derecha). Foto inferior: Partículas de *Cu(II)-Poly(EGDE-DA)* (derecha), *Poly(EGDE-DA)* (centro), y *Co(II)-Poly(EGDE-DA)* (izquierda).

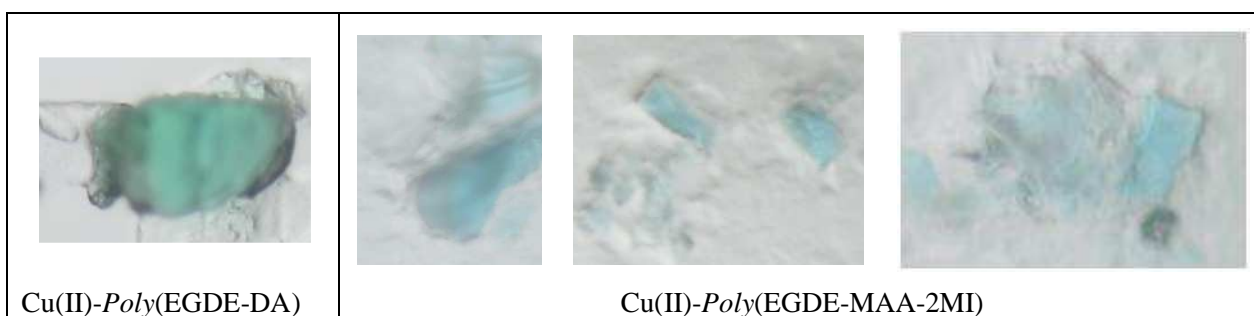
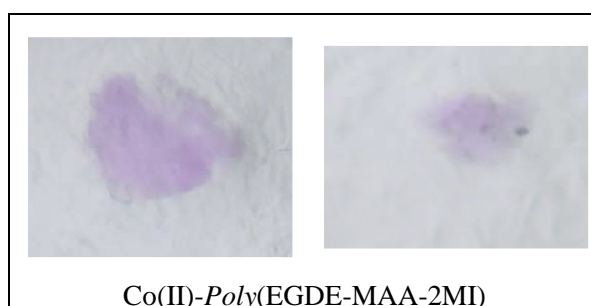


Figura 21. Fotografías de cortes de partículas de complejos poliméricos.

Analizando particularmente el polianfolito, en una primera etapa sus propiedades de hidrogel se vieron favorecidas como resultado de la expansión de las cadenas por repulsión electrostática de los iones Cu(II) unidos a residuos 2MI polimerizados, $-\text{OH}$ y/o a un grupo $-\text{COO}^-$ [6]. Esto

produjo el hinchamiento progresivo del material en contacto con la solución de Cu(II) o Co(II). Como resultado, estos iones quedarían retenidos en el interior, serían **absorbidos**, y tendrían acceso a los sitios de unión internos ($-\text{COO}^- / 2\text{MI} / -\text{OH}$) que actúan como ligandos.

El argumento de que la captación de iones no se restringió a sitios de superficie, se correspondió con el hecho de que el valor de área de adsorción de las partículas de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) obtenido mediante estudios de adsorción de vapor de agua fue llamativamente elevado (Sección 2.2.1).

Si bien la unión de los iones no se restringió a la superficie de las partículas, se procedió a estudiar los resultados experimentales del equilibrio mediante su ajuste a modelos teóricos y empíricos que habitualmente se aplican a procesos superficiales.

Poly(EGDE-DA) resultó saturado por Co(II) en todo el rango de concentraciones del ensayo realizado. Entonces, se estudió la captación de Cu(II) por *Poly*(EGDE-DA) y de Co(II) por *Poly*(EGDE-MAA-2MI) a 24° C y pH 6.0 [12,13].

El pH de trabajo fue seleccionado en ese valor considerando diferentes aspectos. El uso de valores de pH superiores habría favorecido el predominio de grupos $-\text{COO}^-$ y 2MI o $-\text{R}_2\text{N}$ sobre sus formas protonadas, pero al mismo tiempo habría provocado la precipitación de los hidróxidos de los cationes. Así, la estabilidad del ion metálico en solución resulta crucial para obtener resultados confiables, y el pH 6.0 es un valor de compromiso que asegura soluciones estables y disponibilidad de ligandos.

Se realizaron los ajustes de los valores experimentales a cuatro diferentes modelos: Freundlich, Temkin, Dubinin-Radushkevich (D-R) y Langmuir. Los resultados experimentales se representan en la Figura 22, y los parámetros estimados se presentan en las Tablas 3 y 4, junto con los coeficientes de regresión no lineal e indicadores estadísticos de ponderación del mejor modelo (ver Capítulo 6).

Los resultados de la interacción de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) con Co(II) ajustaron a los modelos de D-R, Freundlich y Temkin, en tanto no obtuvo soporte estadístico el modelo de Langmuir. Esto indicó que el material es heterogéneo en cuanto a la distribución de energía de unión del ion. El modelo semi-empírico de D-R permitió estimar el parámetro E (energía libre media de sorción) en un valor superior a 16 kJ mol^{-1} . Esto sugiere la coordinación de Co(II) con los grupos $-\text{COO}^-$ y/o 2MI polimerizados, y avala la suposición de heterogeneidad dado que estos sitios de unión hacen posibles diferentes combinaciones y estequiometrías.

El color violeta intenso de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI), fue otra evidencia a favor de la coordinación, característico de los complejos de metales de transición con sus ligandos (Figura 20).

Como fuera mencionado previamente, cuando se estudió el equilibrio de captación de Co(II) con el polielectrolito *Poly*(EGDE-DA), el material resultó saturado en todo el rango de concentraciones usadas, y se obtuvo un producto de color marrón (Figura 20).

Para el complejo Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), el mejor ajuste de los datos experimentales se obtuvo con Temkin, Langmuir y D-R. El modelo de Freundlich no tuvo soporte estadístico según la R.E. basada en el criterio corregido de Akaike (AIC_c). En este polielectrolito, la distribución de energía de adsorción del ion resultaría menos heterogénea que en caso del polianfolito, funcionalizado con grupos de naturaleza muy diversa.

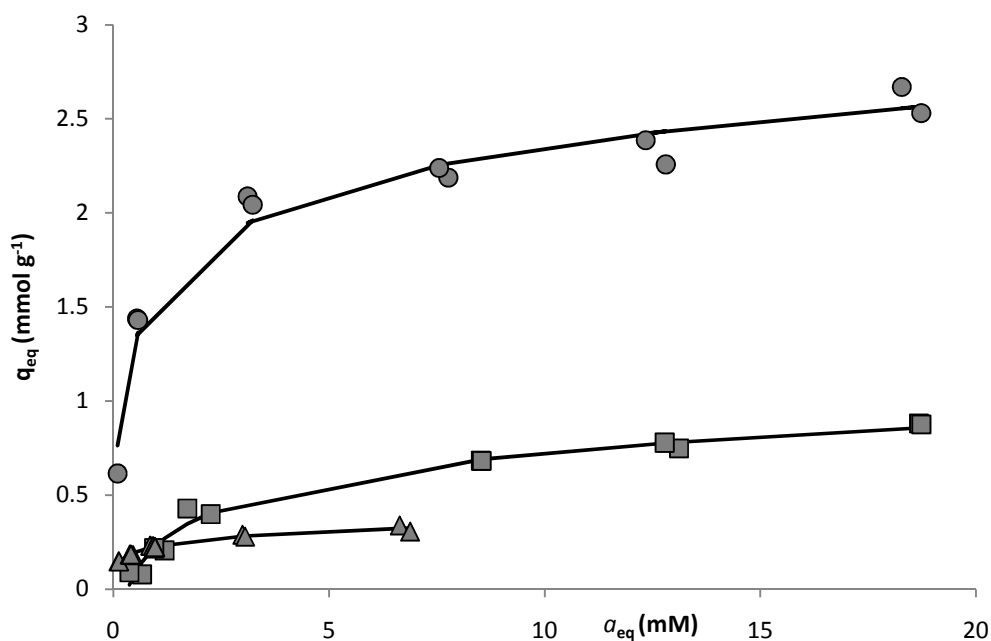


Figura 22. Isothermas de captación de: Cu(II) usando *Poly(EGDE-DA)* (círculos) ajustada al modelo de Temkin; Cu(II) usando *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (cuadrados) ajustada al modelo de Temkin [6]; Co(II) usando *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (triángulos) ajustada al modelo de D-R. Temperatura: 24° C. a_{eq} representa la actividad del ion en la solución en situación de equilibrio.

Tabla 3: Parámetros y errores estándar estimados para cada modelo, incluyendo coeficiente de regresión no lineal (R), criterio corregido de Akaike (AIC_C) y relación de evidencia (R.E.).

Modelo	Parámetros para Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)	R ²	AIC _C	R.E.
Temkin	$K_T: 54.5 \pm 2.7 \text{ L mmoles}^{-1}$ ó $(92.5 \pm 4.6) \times 10^{-2} \text{ L mg}^{-1}$ $b: 168 \pm 42 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9652	-134.26	5.14
Langmuir	$q_m: (30.5 \pm 1.4) \times 10^{-2} \text{ mmoles g}^{-1}$ ó $17.97 \pm 0.80 \text{ mg g}^{-1}$ $K_L: (23.5 \pm 4.5) \times 10^{-2} \text{ mmoles L}^{-1}$ ó $13.8 \pm 2.7 \text{ mg L}^{-1}$ $\Delta G: -20.633 \pm 0.083 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.8328	-108.87	1680244
D-R	$q_m: (60.9 \pm 2.6) \times 10^{-2} \text{ mmoles g}^{-1}$ ó $35.9 \pm 1.5 \text{ mg g}^{-1}$ $B_D: (169.0 \pm 7.6) \times 10^{-5} \text{ mol}^2 \text{ kJ}^{-2}$ $E: 17.18 \pm 0.39 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9753	-137.54	1
Freundlich	$K_F: (226.0 \pm 2.7) \times 10^{-3}$ $n: 5.13 \pm 0.25$	0.9712	-135.26	3.11

Tabla 4: Parámetros y errores estándar estimados para cada modelo, incluyendo coeficiente de regresión no lineal (R), criterio corregido de Akaike (AICc) y relación de evidencia (R.E.).

Modelo	Parámetros para Cu(II)-Poly(EGDE-DA)	R ²	AIC _c	R.E.
Temkin	$K_T: 7.17 \pm 0.43 \text{ L mmoles}^{-1}$ ó $1.45 \pm 0.52 \text{ L mg}^{-1}$ $b: 92 \pm 33 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9687	-44.89	1
Langmuir	$q_m: 2.436 \pm 0.061 \text{ mmoles g}^{-1}$ ó $154.8 \pm 3.9 \text{ mg g}^{-1}$ $K_L: 0.395 \pm 0.067 \text{ mmoles L}^{-1}$ ó $25.1 \pm 4.3 \text{ mg L}^{-1}$ $\Delta G: -19.351 \pm 0.074 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9517	-40.12	10.84
D-R	$q_m: 4.22 \pm 0.28 \text{ mmoles g}^{-1}$ ó $268 \pm 18 \text{ mg g}^{-1}$ $B_D: (1.78 \pm 0.20) \times 10^{-3} \text{ mol}^2 \text{ kJ}^{-2}$ $E: 16.75 \pm 0.94 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9495	-39.63	13.88
Freundlich	$K_F: 1.509 \pm 0.076$ $n: 5.31 \pm 0.62$	0.9259	-35.41	114.20

El signo negativo de la variación de energía libre (ΔG) calculada a partir de K_L^{-1} en el modelo de Langmuir, indicó la naturaleza espontánea de la captación. Por otra parte, el modelo de Temkin predijo un incremento de las interacciones entre las especies unidas en función del grado de cubrimiento [14].

El valor de E estimado a partir del modelo D-R fue superior a 16 kJ mol^{-1} , indicativo de la coordinación del Cu(II) con los grupos de tipo $-R_2N$ (amina primaria, secundaria y/o terciaria), con residuos $-OH$ o bien $-O-$ (éter) del polímero. El color verde de las partículas fue otra evidencia de coordinación (Figura 20).

Otra evidencia de coordinación fue aportada por el espectro ESR de Cu(II)-Poly(EGDE-DA) (Figura 23). Estos experimentos fueron realizados por el Dr. J. M. Lázaro Martínez con el fin de elucidar la esfera de coordinación del catión [5]. Si bien las estructuras hiperfinas en la región paralela no fueron resueltas, existiría más de un modo de coordinación diferente en este material en conjunto con cierto grado de interacción dipolar Cu-Cu o intercambio de acoplamiento como resultado de una distancia corta entre complejos con Cu(II) ($10\text{-}15 \text{ \AA}$). Los autores propusieron la participación de átomos de N y de O en la captación del catión [5].

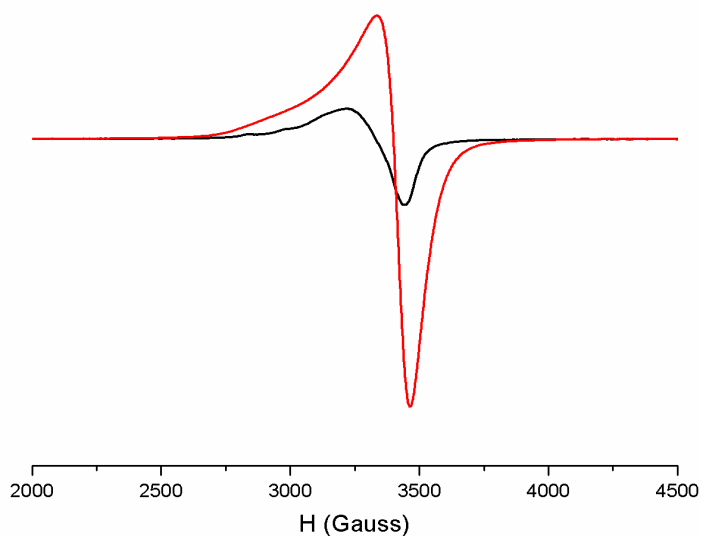


Figura 23. Espectros ESR para Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) conteniendo 40 (negro) o 125 mg de Cu(II) por gramo de polímero (rojo).

Como complemento de los estudios del equilibrio, se determinó experimentalmente la máxima capacidad de carga de cada ion sobre los polímeros. Los materiales fueron puestos en contacto con soluciones de cada ion en concentración 0.1 M con el objeto de lograr la saturación del material (o aproximarse a ella). Luego se determinó la cantidad de ion captado en el complejo mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X. En la Tabla 5, los resultados experimentales se comparan con los valores estimados mediante el modelo más adecuado.

Tabla 5: Máxima captación de iones estimada por el mejor modelo de unión (q_m), y máxima captación de iones en cada material obtenida experimentalmente (q_{exp}).

Material	q_m y E.E. estimados		q_{exp} y D.E. experimentales	
	Cu(II)	Co(II)	Cu(II)	Co(II)
<i>Poly</i> (EGDE-DA)	2.436 ± 0.061	0.258 ± 0.049	1.68 ± 0.18	0.39 ± 0.05
	mmol g ⁻¹	mmol g ⁻¹	mmol g ⁻¹	mmol g ⁻¹
	154.8 ± 3.9	15.2 ± 2.9	107 ± 12	23 ± 3
	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	0.90 ± 0.03	0.609 ± 0.026	0.66 ± 0.08	0.44 ± 0.05
	mmol g ⁻¹	mmol g ⁻¹	mmol g ⁻¹	mmol g ⁻¹
	57.0 ± 2.0	35.9 ± 1.5	42 ± 5	26 ± 3
	mg g ⁻¹ [2]	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹	mg g ⁻¹

Se observó que los parámetros q_m obtenidos a partir del ajuste a modelos de los datos experimentales estuvieron sobreestimados con respecto a los valores de q_{exp} , excepto en la captación de Co(II) por *Poly*(EGDE-DA). En la determinación de q_{exp} , el nivel de concentración de catión en la solución puesta en contacto con el sólido correspondía a una situación de

saturación, de acuerdo a lo observado en las isotermas. Entonces, la repulsión electrostática producida entre cationes adsorbidos impediría en algún punto la ocupación de todos los sitios de unión disponibles. Este efecto podría ser más notable en el interior del hidrogel, cuando el estiramiento de las cadenas poliméricas alcanza un valor límite. Con respecto a los valores experimentales de captación de Co(II), encontramos que no hubo diferencia significativa entre materiales, si bien la densidad de sitios de unión determinada por titulación fue diferente en cada caso (1.98 mmoles de sitios titulables por gramo de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) vs 0.978 mmoles de sitios titulables por gramo de *Poly*(EGDE-DA)). Sin embargo, la unión de Cu(II) al polielectrolito presentó un incremento del 155 % comparado con el polianfolito.

Por otra parte, la captación de Cu(II) ha sido superior a la de Co(II) en ambos materiales. Ambos iones hidratados presentan configuración octaédrica: Co(II) presenta un radio iónico de 0.74 Å, en tanto que Cu(II) presenta distorsión de Jahn-Teller con radio iónico de 0.62 Å en el plano ecuatorial y 0.94 Å axial. Dado que ambos cationes son divalentes, la diferencia en la capacidad de carga podría explicarse considerando la distorsión de Jahn-Teller en el acuocomplejo con Cu(II) de partida [15].

Aquí se considera que el impedimento estérico que ofrecen entre sí las moléculas voluminosas de polímero al competir con las moléculas de agua para formar enlaces covalentes coordinados en $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, es superior al caso de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. En este último complejo, la elongación de los enlaces metal-ligando en el eje *z* disminuye la repulsión electrostática entre el par de electrones del ligando y los electrones que se encuentran en los orbitales del metal que tienen una componente *z*. De hecho, las dos distancias axiales Cu–O son de 2.38 Å, mientras que las cuatro distancias ecuatoriales Cu–O son de 1.95 Å. Esto incrementaría la capacidad del Cu(II) para deformar la nube de electrones de los residuos en *Poly*(EGDE-DA), y en menor medida en *Poly*(EGDE-MAA-2MI), con desplazamiento de moléculas de agua de la esfera de coordinación.

2.2.3. Captación de Direct Blue 273 (DB273), un colorante azo aniónico

Considerando que el material *Poly*(EGDE-MAA-2MI) puede presentar sitios 2MI protonables así como residuos 2MI disustituidos que involucran cargas positivas permanentes, se realizó el estudio de captación de un compuesto aniónico. Para estas pruebas se seleccionó Direct Blue 273 (DB273, Esquema 4) un colorante sintético aniónico con uniones azo (–N=N–), extensivamente usado en la industria textil, perteneciente al grupo de compuestos que causan seria contaminación ambiental [16,17]. La caracterización de la interacción entre DB273 y *Poly*(EGDE-MAA-2MI) permitiría determinar si el polímero resulta apto para la captación de especies aniónicas y si presenta propiedades adsorbentes tales que permitan su aplicación en remediación de aguas contaminadas. Es bien sabido que las matrices sintéticas suelen tener una mejor capacidad de carga respecto a adsorbentes naturales [18].

Con motivo de verificar esta afirmación, se hicieron estudios de captación pertinentes cuyos resultados fueron modelados a las ecuaciones teóricas y empíricas conocidas. Las isotermas se realizaron a tres temperaturas distintas y se ajustaron a los modelos tradicionales. Los resultados se observan en la Figura 24 en tanto que los parámetros estimados se presentan en las Tablas 6, 7 y 8.

Esquema 4: estructura química de DB273.

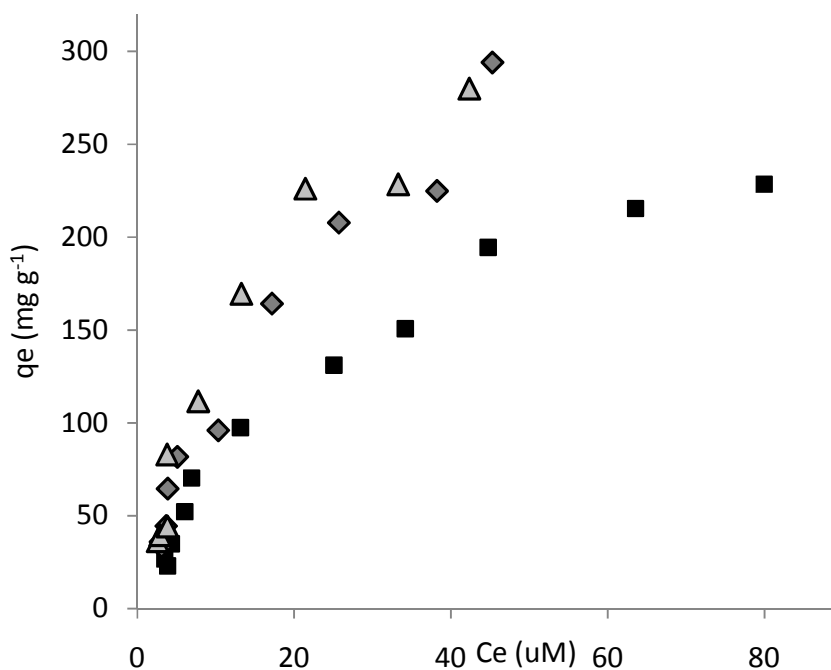
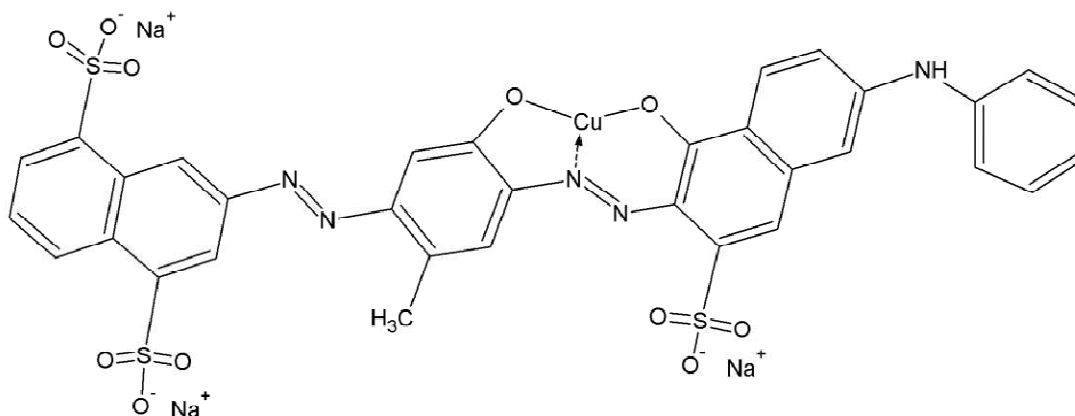


Figura 24. Isotermas de captación de DB273 sobre *Poly*(EGDE-MAA-2MI) a 4° C (■), 18° C (◆) y 24° C (▲).

A 18° C todos los modelos evaluados presentaron soporte estadístico, y el mejor ajuste fue obtenido con la ecuación de Freundlich. La capacidad de unión promedio predicha por el modelo de Langmuir fue del orden de $0.46 \pm 0.08 \text{ mmol g}^{-1}$, y resultaron ocupados el 39 % de los sitios positivos de unión en el polímero (el número total de sitios fijos positivos en el lote de material usado fue determinado en 1.19 mmol g^{-1} , siendo $0.36 \text{ mmoles de } 2\text{MI}^+$ disustituidos g^{-1} y $0.83 \text{ mmoles de } 2\text{MI}$ titulables g^{-1}).

Tabla 6: Parámetros y errores estándar (E.E.) de la isoterma de captación de DB273 a 4° C y pH 6.0 sobre *Poly*(EGDE-MAA-2MI). Coeficientes de regresión, valores del criterio AIC_c y relación de evidencia (R.E.) para diferentes modelos.

Modelo	Parámetros para T: 277 K	R ²	AIC _c	R.E.
Langmuir	$q_m: 335 \pm 24 \text{ mg g}^{-1}$ $K_L: 36 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ $\Delta G: -23.3 \pm 1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9861	56.74	1
D-R	$q_m: (2.94 \pm 0.56) \times 10^3 \text{ mg g}^{-1}$ $K_{DR}: (5.30 \pm 0.40) \times 10^{-3} \text{ mol}^2 \text{ kJ}^{-2}$ $E: 9.71 \pm 0.37 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9763	63.25	25.9
Freundlich	$K_F: (6.4 \pm 2.9) \times 10^4$ $n: 1.67 \pm 0.13$	0.9681	66.72	147
Temkin	$K_T: 0.371 \pm 0.027 \text{ L mg}^{-1}$ $b: 0.0351 \pm 0.0013 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9859	56.94	1.1

q_e (mg g⁻¹) vs C_e (mg L⁻¹) excepto para D-R en el que C_e está en g g⁻¹.

Tabla 7: Parámetros y E.E. de la isoterma de captación de DB273 a 18° C y pH 6.0 sobre *Poly*(EGDE-MAA-2MI). Coeficientes de regresión, valores del criterio AIC_c y relación de evidencia (R.E.) para diferentes modelos.

Modelo	Parámetros para T: 291 K	R ²	AIC _c	R.E.
Langmuir	$q_m: 482 \pm 68 \text{ mg g}^{-1}$ $K_L: 31.0 \pm 7.9 \text{ mg L}^{-1}$ $\Delta G: -24.8 \pm 1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9733	63.05	1.5
D-R	$q_m: (6.2 \pm 1.5) \times 10^3 \text{ mg g}^{-1}$ $K_{DR}: (5.2 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ mol}^2 \text{ kJ}^{-2}$ $E: 9.81 \pm 0.38 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9737	63.78	2.1
Freundlich	$K_F: 23.1 \pm 3.8$ $n: 1.48 \pm 0.11$	0.9712	62.29	1
Temkin	$K_T: 0.531 \pm 0.064 \text{ L mg}^{-1}$ $b: 0.0289 \pm 0.0020 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9583	67.74	15.3

q_e (mg g⁻¹) vs C_e (mg L⁻¹) excepto para D-R en el que C_e está en g g⁻¹.

Tabla 8: Parámetros y E.E. de la isoterma de captación de DB273 a 24° C y pH 6.0 sobre *Poly*(EGDE-MAA-2MI). Coeficientes de regresión, valores del criterio AIC_c y relación de evidencia (R.E.) para diferentes modelos.

Modelo	Parámetros para T: 297 K	R ²	AIC _c	R.E.
Langmuir	$q_m: 403 \pm 44 \text{ mg g}^{-1}$ $K_L: 17.9 \pm 4.1 \text{ mg L}^{-1}$ $\Delta G: -26.7 \pm 2.7 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9714	53.24	1.93
D-R	$q_m: (4.3 \pm 1.4) \times 10^3 \text{ mg g}^{-1}$ $K_{DR}: (4.30 \pm 0.50) \times 10^{-3} \text{ mol}^2 \text{ kJ}^{-2}$ $E: 10.78 \pm 0.63 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9531	57.71	18.13
Freundlich	$K_F: 33.8 \pm 7.3$ $n: 1.69 \pm 0.20$	0.9444	59.24	38.86
Temkin	$K_T: 0.613 \pm 0.069 \text{ L mg}^{-1}$ $b: 0.0289 \pm 0.0017 \text{ kJ mol}^{-1}$	0.9753	51.92	1

q_e (mg g⁻¹) vs C_e (mg L⁻¹) excepto para D-R en el que C_e está en g g⁻¹.

La capacidad de carga predicha por la isoterma de Langmuir resultó mayor, comparada con la adsorción de otros colorantes catiónicos y aniónicos sobre adsorbentes inorgánicos reportada en literatura [19-21], pero menor, comparada con resinas de intercambio iónico comerciales disponibles [22]. Las constantes de equilibrio de disociación a diferentes temperaturas (K_L , expresadas en unidades de M) fueron menores que las reportadas para los ejemplos mencionados. Al aumentar la temperatura se produjo un incremento de la espontaneidad de la captación, produciendo un desplazamiento a valores más negativos de ΔG .

Los valores de entalpía y entropía de adsorción fueron obtenidos a partir de los gráficos de van't Hoff. El valor de ΔH determinado fue 21 kJ mol⁻¹ y el valor de ΔS fue 0.16 kJ mol⁻¹. El valor positivo para ΔH indica que la captación resultó un proceso endotérmico. Típicamente, la entalpía de un proceso de fisisorción tiene un valor menor que 40 kJ mol⁻¹, que se atribuye a un conjunto de interacciones físicas que involucran interacción electrostática, interacciones no-polares, formación de puentes con moléculas de H₂O, y uniones H entre moléculas de colorante y las estructuras adsorbentes [23]. En este caso, se espera que los residuos -SO₃⁻ del colorante interactúen con los residuos protonados de 2MI polimerizado (2MIH⁺) así como con las cargas positivas fijas de las unidades 2MI disustituidas en la red (2MI⁺). Si bien la presencia simultánea de residuos -COO⁻ en la red podría generar un efecto opuesto de debilitamiento en la unión por repulsión electrostática, el efecto resultante fue de captación del colorante.

El valor positivo de ΔS indicó que se produjo un incremento en el grado de desorden del sistema interfase sólido / solución con la liberación de moléculas de agua desde las partículas hacia la solución frente a la captación de moléculas de colorante, dado el mayor tamaño de estas últimas [24].

A continuación se comparó la capacidad de unión del colorante a diferentes materiales relacionados estructuralmente, mediante un análisis de los espectros UV-visibles de las soluciones sobrenadantes a pH 6.0 (Figura 25).

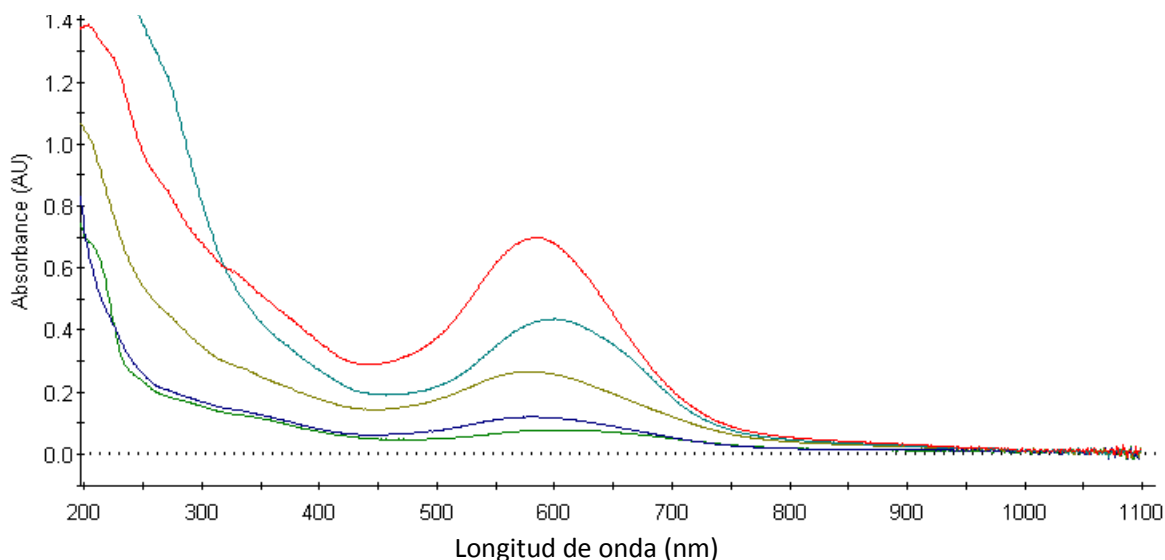


Figura 25. Espectros UV-visible de soluciones de DB273 (rojo); DB273 luego del contacto con: Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) (turquesa), Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) (mostaza), Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) (violeta), *Poly*(EGDE-MAA-2MI) (verde).

Se observó mayor unión del colorante DB273 en las soluciones puestas en contacto con *Poly*(EGDE-MAA-2MI) y con Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI). Este último material incorporó 0.44 mmoles de Co(II) g^{-1} y el lote de polianfolito usado en ambos casos contenía 0.89 mmoles de grupos $-\text{COO}^- \text{g}^{-1}$ y 1.09 mmoles de sitios 2MI titulables (protonables) g^{-1} . Los sitios de unión de DB273 probables resultan ser los grupos 2MIH^+ (a través de sus grupos $-\text{SO}_3^-$), así como las regiones hidrofóbicas (a través de sus anillos aromáticos). La presencia de Co(II) en el material parecería haber ocupado algunos sitios de unión del colorante, dado que la absorbancia de la solución de DB273 sobrenadante al complejo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue ligeramente superior a la de la solución en contacto con el polianfolito sin complejar.

Por otra parte, en la solución sobrenadante a Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) se encontró mayor cantidad de colorante en solución. Aquí debemos mencionar que la densidad de Cu(II) unido al polianfolito ($0.66 \text{ mmoles g}^{-1}$) fue superior a la de Co(II) ($0.44 \text{ mmoles g}^{-1}$), tal vez debido a la ocupación de mayor proporción de sitios 2MI polimerizados, que dejó menos residuos 2MIH^+ polimerizados disponibles al colorante negativo.

La menor proporción de DB273 unido al material se produjo en el caso de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), en coincidencia con un corrimiento en el máximo de absorción del colorante hacia longitudes de onda mayores. En este complejo, la densidad de Cu(II) ($1.68 \text{ mmoles g}^{-1}$) resultó superior a la de los casos anteriores, y la naturaleza del material polimérico influyó en el efecto observado de captación: los sitios de unión de DB273 serían $-\text{NH}_3^+$, pero en el polielectrolito había solamente $0.978 \text{ mmoles de } -\text{NH}_2 \text{ titulables g}^{-1}$. Todo esto indica que los residuos estaban

afectados a la interacción con Cu(II), por eso la unión de DB273 fue pobre. También cabe la posibilidad de que DB273 en solución contribuyera a desorber Cu(II) del complejo con el polielectrolito, en el que se encontraba en alta densidad, y formara con este catión un complejo soluble que ocasionó el corrimiento batocrómico de la banda de absorción en el visible (y aparición de otra banda en el UV).

En la Figura 26 se observan las imágenes de secciones de partículas de diferentes materiales que han captado DB273. El colorante accedió a toda la partícula, ya que no se distingue un núcleo del color del material nativo. Sin embargo, en Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) se observaron regiones de diferente coloración, con lo cual se infiere que allí el Cu(II) permaneció unido, no ha sido completamente desplazado por el colorante, y DB273 no se incorporó a la esfera de coordinación del catión inmovilizado.

Asimismo, mediante un sistema consistente en DB273 125 μM , KNO_3 en diferentes niveles de concentración y *Poly*(EGDE-MAA-2MI) se estudió el efecto de la fuerza iónica del medio en la adsorción del colorante. La concentración de DB273 en el equilibrio de captación en función de la composición del medio se presenta en la Tabla 9. Se observó la disminución de la concentración de DB273 en presencia del polianfolito, sin embargo la cantidad remanente en solución resultó claramente dependiente de la concentración salina y por lo tanto de la fuerza iónica.

Tabla 9: Efecto salino sobre la captación de DB273 sobre la superficie de *Poly*(EGDE-MAA-2MI)

Sistema	[DB273]* (μM)
DB273 en agua	124.8
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + DB273 en agua	20.0
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + DB273 en KNO_3 1.0 M	36.5
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + DB273 en KNO_3 0.2 M	38.9
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + DB273 en KNO_3 0.05 M	44.4

* en el equilibrio

Frente la adición de KNO_3 , la cantidad de DB273 captada por el polímero disminuyó en un rango entre 16 y 23 %, en comparación con la unión del colorante disuelto en agua pura. La competencia del NO_3^- con el colorante aniónico por los sitios de unión positivos sobre la superficie del material fue menos significativa en el mayor nivel de concentración ensayado (1.0 M), lo que se atribuye a una actividad iónica menor.

Se investigó el efecto de las especies iónicas en la desorción del colorante de las superficies poliméricas a partir de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) complejado con DB273 (Tabla 10), empleando especies iónicas modelo: dodecil sulfato sódico (SDS) y KNO_3 . La desorción del DB273 de las partículas de DB273-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) resultó despreciable con KNO_3 1.0 M y con SDS 1.0 mM, en tanto que una solución de SDS 80 mM produjo la liberación de un 10 % del DB273 unido.

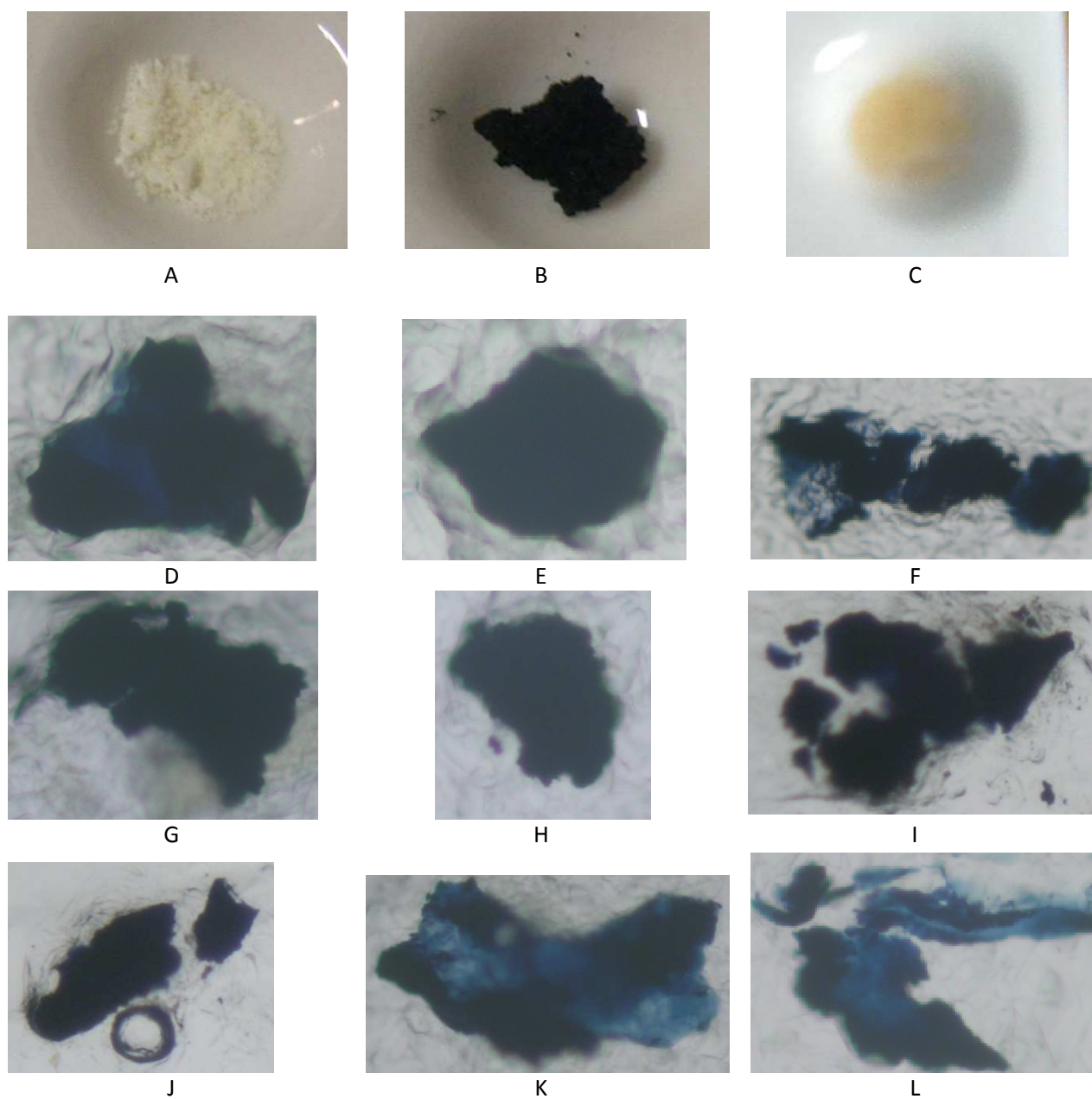


Figura 26. Imágenes de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* dividido en partículas (A), polianfolito cargado con DB273 (B) y luego tratado con NaClO 0.1 M (C). Imágenes de cortes de las partículas cargadas con DB273, usando los siguientes materiales: *Poly(EGDE-MAA-2MI)* (D-F); $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ (G-H); $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ (I-J); $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)}$ (K-L).

Tabla 10: Efecto salino en la desorción de DB273 captado por partículas de *Poly*(EGDE-MAA-2MI)

Sistema	[DB273]* (μ M)
DB273- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + agua	0
DB273- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + 1.0 M KNO ₃	0
DB273- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + 1.0 mM SDS	0.4
DB273- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI) + 80 mM SDS	13.4

* en el equilibrio

Por último, el sistema DB273-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue tratado con soluciones de NaClO como agente oxidante durante 4 horas en dos niveles de concentración: 0.10 y 0.35 M. La decoloración por oxidación fue efectiva en ambos casos (Figura 26), pero el tratamiento con NaClO 0.35 M produjo la degradación parcial del adsorbente.

2.2.4. Adsorción de la enzima peroxidasa de cáscara de semilla de soja (SBP) y obtención de un reactor enzimático

En esta sección, se exploró la posibilidad de unir una biomolécula (que también presenta propiedades de polianfolito) a las partículas del material denominado *Poly*(EGDE-MAA-2MI), en vistas de la potencial aplicabilidad de esta clase de complejos en el ámbito biotecnológico, analítico y ambiental. En el grupo de trabajo existía el precedente de la inmovilización de seroalbúmina bovina sobre esta clase de polímeros [7]. El objetivo actual abarca la captación de una enzima, con el desafío de adicional de garantizar estabilidad física y química del complejo formado, sin pérdida de actividad biológica.

Se empleó el polianfolito insoluble en agua *Poly*(EGDE-MAA-2MI) como soporte para la inmovilización de la enzima peroxidasa de cáscara de semilla de soja (SBP, de *IEP*: 4.1) directamente de su extracto acuoso, sin necesidad de purificación previa, con el propósito final de fabricar un biorreactor en flujo. Siendo conocida la afinidad de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) por seroalbúmina bovina (BSA, de *IEP* : 5.1) [7], la adsorción de SBP a esta matriz era predecible.

Aquí se presenta la caracterización del complejo SBP-polianfolito, así como los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada (en batch y en flujo) [25]. En el Capítulo 4 se presentará el uso del complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) en un sistema de inyección en flujo (FIA) para detectar compuestos fenólicos que son sustrato de SBP. Esta enzima cataliza la oxidación de compuestos fenólicos por H₂O₂ con la liberación de productos radicalarios. Fue seleccionado el método amperométrico para monitorear la respuesta catódica de la forma oxidada (radical libre) de cada analito.

2.2.4.1. Caracterización del lote de *Poly*(EGDE-MAA-2MI)

El lote de síntesis de material polimérico particulado fue caracterizado para determinar la densidad de grupos funcionales que podrían actuar como sitio de anclaje de la proteína. Se determinó el *IEP* del lote usado en 8.2, y el diámetro aparente de las partículas fue de 64 μ m

(D.E.: 4). Estas partículas poseen grupos $-\text{COOH}$ (1.39 mmol g^{-1}), grupos $-\text{OH}$, y residuos 2MI polimerizados. Mediante los resultados del análisis elemental, las mediciones de potencial zeta (ζ) y las titulaciones potenciométricas se pudo estimar el número total de residuos 2MI polimerizados en 2.39 mmol g^{-1} , con 1.41 mmol g^{-1} de residuos 2MI monosustituídos y titulables (protonables), y 0.91 mmol g^{-1} de residuos disustituídos (2MI^+) con carga permanente positiva.

2.2.4.2. Caracterización del complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI)

Las partículas del polímero fueron tratadas en medio alcalino para eliminar oligómeros parcialmente solubles que pudieran interferir en la adsorción de la enzima. Luego, el extracto enzimático diluido en buffer fosfato 25 mM pH 6.0 fue puesto en contacto con el polímero, y se observó un perfil de SBP unida vs SBP libre que ajustó al modelo de Langmuir. Los parámetros del ajuste fueron: q_m : $2.5 \times 10^{-9} \text{ mol g}^{-1}$ (E.E.: 0.3×10^{-9}) ó 0.10 mg g^{-1} ; K_L : $1.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ (E.E.: 0.5×10^{-8}); R^2 : 0.9204 .

Existen varios reportes referidos a la afinidad entre polielectrolitos y proteínas [7,26-29]. La interacción de proteínas con una superficie cargada es esencialmente de tipo electrostática, combinada con puentes de hidrógeno múltiples, y/o apilamiento de tipo π - π , re-arreglos estructurales en la biomolécula (y posiblemente también en las partículas), y cambios en la hidratación [28-31].

El balance entre repulsión y atracción resulta ser un fenómeno importante y característico asociado con las interacciones de los polianfolitos [29]. En nuestro sistema, SBP es también un polianfolito con carga neta negativa a pH 6.0 , en tanto que *Poly*(EGDE-MAA-2MI) posee carga neta positiva (con un valor de potencial zeta de $+30 \text{ mV}$). Sin embargo, ambas especies presentan dominios positivos y negativos y podrían ser tratados como dipolos. Concretamente, a pH 6.0 este lote de polianfolito poseía el 96% de los grupos carboxilo en su forma disociada ($-\text{COO}^-$). El campo eléctrico de los dominios negativos de SBP puede polarizar en cierto grado el polianfolito sintético, acercar hacia sí las unidades con carga positiva y alejar las unidades con carga negativa. Así, la atracción electrostática podría ser el principal mecanismo de interacción [29], modulado por la fuerza iónica de la solución [7,28].

2.2.4.3. Estabilización del complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI)

El complejo entre SBP y el polianfolito fue finalmente estabilizado por entrecruzamiento de la enzima y otras biomoléculas conjuntamente adsorbidas del extracto acuoso, mediante tratamiento con vapores de glutaraldehído en una atmósfera saturada. El tiempo de exposición a los vapores influencia fuertemente la actividad catalítica posterior: poco tiempo conlleva una pérdida de proteína en un medio salino (especialmente en sistemas en flujo); largo tiempo de contacto puede inactivar a la enzima o bien los sitios activos pueden resultar inaccesibles al sustrato.

Se probaron tres tiempos de exposición a la atmósfera de glutaraldehído: 30 , 60 y 120 minutos. El tiempo óptimo de contacto fue de 60 minutos, porque produjo la mayor velocidad inicial de reacción de fenol con H_2O_2 .

Las otras macromoléculas sin actividad enzimática procedentes del extracto que se unieron a las partículas contribuirían a estabilizar el complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) y generaron un microambiente adecuadamente solvatado para la enzima.

2.2.4.4. Parámetros cinéticos de SBP libre e inmovilizada, en batch.

En este paso, se compararon los parámetros cinéticos para evaluar los cambios en la actividad catalítica de SBP que han resultado de los procedimientos de inmovilización y estabilización. Se empleó un reactor en batch bajo agitación continua para minimizar las restricciones en el transporte de masa de reactivos y productos.

En este sistema, se estudió la influencia de la concentración de fenol (sustrato) en la velocidad de catálisis de SBP libre e inmovilizada (Figura 27), a pH 6.5 y 20 ° C. La enzima fue saturada con H₂O₂ y la velocidad inicial de la reacción enzimática se determinó según

$$V = \frac{V_{\max} [\text{fenol}]}{K_m + [\text{fenol}]} \quad (10)$$

Donde V_{\max} es la máxima velocidad de la reacción enzimática cuando la enzima es también saturada por fenol. K_m representa la constante de Michaelis para fenol cuando H₂O₂ es mantenido en condiciones de saturación [32]. Los parámetros cinéticos estimados se presentan en Tabla 11

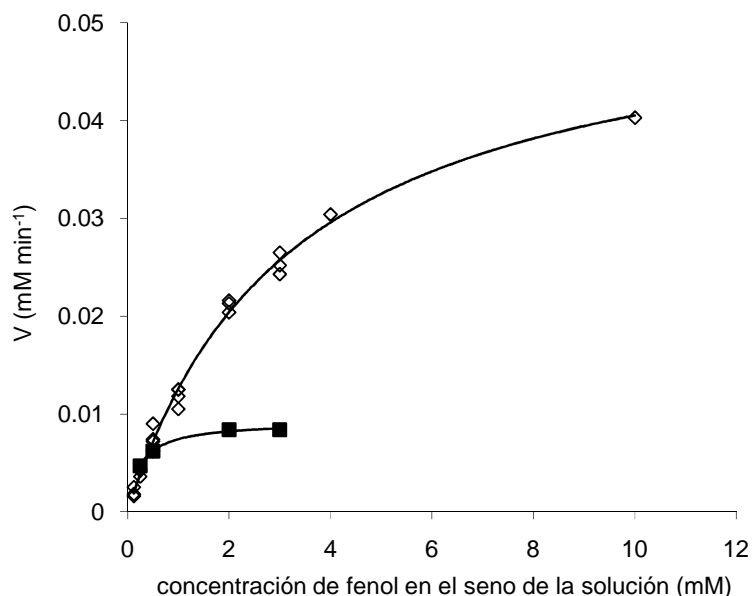


Figura 27. Velocidad inicial de oxidación de fenol vs concentración de fenol en el seno de la solución, para experimentos en batch con SBP libre (◇) e inmovilizada sobre *Poly*(EGDE-MAA-2MI) (■).

Tabla 11: Parámetros cinéticos y E.E. de la oxidación enzimática de fenol en batch con SBP libre e inmovilizada.

Parámetros	SBP Libre	SBP inmovilizada
V_{\max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	54 ± 2	9.2 ± 0.2
K_m (mM)	3.3 ± 0.2	0.24 ± 0.02
R	0.9967	0.9976

La constante de Michaelis de SBP inmovilizada para fenol resultó significativamente inferior al valor de K_m para la SBP libre. Esto podría deberse al nuevo microambiente que se estableció alrededor de la enzima inmovilizada luego de los tratamientos y que puede haber afectado la

difusión de sustratos y productos, lo que produjo una alteración en los parámetros cinéticos y del equilibrio.

En estos experimentos se empleó la misma cantidad de enzima libre e inmovilizada, pero solamente se logró el 17 % de la actividad catalítica máxima en la situación de inmovilización, resultado atribuible a una pérdida parcial de actividad enzimática y/o inaccesibilidad del sitio activo luego del tratamiento. La cinética de las enzimas inmovilizadas en grietas de las partículas suele ser afectada debido a efectos difusionales que dependen de las características físicas y químicas del soporte [33,34].

2.2.4.5. Desempeño del reactor basado en el complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI)

2.2.4.5.1. Ensayos con diferentes sustratos dadores de electrones

El biorreactor, construido según se detalla en el Capítulo 6, fue conectado al sistema de flujo y el H₂O₂ (uno de los sustratos de la enzima) fue agregado a la solución carrier. Cada analito (compuesto fenólico, co-sustrato de la enzima) fue inyectado en el sistema de flujo y el producto oxidado de la reacción catalizada fue detectado amperométricamente a un potencial de trabajo reductor.

Existen diferentes reportes relacionados con la detección electroquímica de productos oxidados del catecol y otros compuestos fenólicos obtenidos a partir de su reacción con H₂O₂ catalizada por sistemas miméticos de peroxidasa [35,36]. En este trabajo se seleccionó el transductor amperométrico sobre la base de esta información.

La actividad catalítica del biorreactor fue determinada con catecol y otros compuestos polifenólicos hallados en plantas, considerados sustratos potenciales de SBP. Estos experimentos fueron realizados con un carrier constituido por H₂O₂ 0.2 mM y solución de fosfato 30 mM pH 6.5 a 20 ° C.

Algunos de los compuestos seleccionados no generaron respuesta amperométrica en este sistema analítico. El ácido gálico no pudo ser detectado en estas condiciones, probablemente debido a la elevada reactividad del producto radicalario que podría polimerizar antes de alcanzar la superficie de electrodo. La rutina (glicósido flavonoide que mejora la circulación sanguínea) no fue detectada en este experimento. El galato de epigallocatequina (hallado en té verde pero ausente en té negro) no fue detectado probablemente debido a la baja estabilidad del producto oxidado junto con un elevado volumen molecular, que podría afectar su interacción con la enzima. El catecol y el ácido clorogénico (compuesto polifenólico hallado en café, bambú y yerba mate) dieron respuesta amperométrica en el sistema en flujo (Esquema 5).

El rango óptimo de pH para la oxidación catalítica de catecol y de ácido clorogénico resultó ser entre 5.0 y 8.0, coincidente con un rango de pH óptimo reportado en la literatura entre 4 y 10 para compuestos fenólicos [37,38]. Por esta razón, se fijó el pH del carrier en 6.5. El potencial óptimo para el electrodo de trabajo resultó ser +100 mV vs Ag/AgCl para ambos analitos.

A modo de control, estos compuestos fenólicos fueron inyectados en el sistema en flujo en ausencia del reactor, y sus respuestas electroquímicas fueron despreciables. Otro control realizado consistió en inyectar estos compuestos fenólicos en el sistema en flujo con reactor y en ausencia de H₂O₂, y no se obtuvo respuesta electroquímica en ningún caso. De esta manera quedó demostrada la actividad de la enzima SBP inmovilizada en el reactor, en el sistema de flujo.

La Tabla 12 resume los parámetros analíticos obtenidos a una velocidad de flujo de 0.6 mL min⁻¹ en el rango lineal de la respectiva curva de calibración.

Esquema 5. Estructuras químicas de catecol (A) y de ácido clorogénico (B).

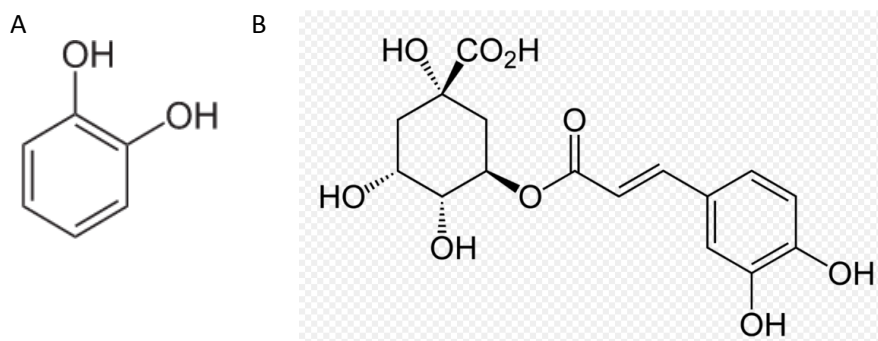


Tabla 12: Rango lineal, sensibilidad (y E.E.), coeficiente de regresión (R) y límite de detección (LoD) de catecol y de ácido clorogénico con el sistema de flujo basado en SBP a 0.6 mL min⁻¹ y potencial de electrodo de trabajo en +100 mV vs Ag/AgCl.

Sustrato	Rango lineal (mM)	Sensibilidad ($\mu\text{Coul mM}^{-1}$)	R^2	LoD (μM)
catecol	0.030 – 0.200	2.968 ± 0.055	0.9963	26 ^a
ácido clorogénico	0.100 – 1.200	0.869 ± 0.014	0.9993	62 ^b

^a Calculado según el criterio $3 \times S_{\text{Blanco}}$.

^b Calculado según el criterio $3 \times S_{y/x}$.

La sensibilidad a catecol resultó 3.40 veces superior a la de ácido clorogénico, lo que indica un comportamiento selectivo del reactor enzimático. Las respuestas amperométricas a 0.6 mL min⁻¹ para una serie de 7 inyecciones consecutivas de 20 μL de catecol 0.100 mM produjo un desvío estándar relativo (D.E.R.) de 2.7 % para un valor promedio de señal de 0.2310 μCoul (área de pico; D.E.: 0.0062 μCoul).

La estabilidad del reactor enzimático fue estudiada cada semana monitoreando las pendientes de la respuesta amperométrica a catecol en su rango lineal de concentración. La actividad enzimática resultó estable durante 2 meses, cuando el reactor se conservó en agua destilada a 5° C durante la noche. El procedimiento de preparación pudo ser reproducido tres veces sin que se observaran cambios significativos en la performance del reactor.

2.2.4.5.2. Caracterización cinética del reactor en el sistema de flujo. Determinación de parámetros enzimáticos y restricciones difusionales.

El grado de hinchamiento de este material polimérico varió entre 1.4 y 5.3 g g⁻¹, y resultó fuertemente dependiente del pH, lo que ocasionó una elevada resistencia al flujo de carrier en un

sistema continuo [6]. Como consecuencia, se presentaron limitaciones al transporte de masa de los sustratos a los sitios catalíticos.

La adsorción de proteína ocurrió solamente sobre la superficie externa de las partículas de polianfolito (y eventualmente en fracturas o grietas) debido a que el tamaño de poro del polímero soporte fue demasiado pequeño en relación con las dimensiones de SBP (glicoproteína aniónica de 40662 Da). El ancho de poro promedio determinado por isothermas BET fue de 11.62 Å (es una aproximación válida, si bien el material presentó pocos sitios de adsorción de N₂). En consecuencia, se esperaban solamente limitaciones externas a la transferencia de masa del sustrato a los sitios catalíticos.

Cuando la reacción química procede mucho más rápido que el transporte de masa de los reactivos, existe un control difusional. La velocidad de reacción efectiva (V') debería ser menor que la velocidad de reacción sin limitaciones de transferencia de masa. Y la constante aparente de Michaelis (K'_m) debería ser mayor que K_m debido a que no todas las moléculas de enzima estarían en contacto con el sustrato en un rango de concentración similar al del seno de la solución [39,40].

Estas limitaciones difusionales externas fueron investigadas mediante el procedimiento descrito por Girelli [41] y otros autores [39,40]. En el sistema en flujo se inyectaron soluciones de catecol en diferentes concentraciones a distintas velocidades de flujo. A partir de estos resultados experimentales se estimaron las constantes cinéticas aparentes K'_m y V'_{max} obtenidas bajo restricciones difusionales (Figura 28).

La concentración efectiva del sustrato dentro del microambiente resultó más baja que en el seno de la solución debido a la depleción del sustrato por la reacción. En este sentido, el tratamiento de la reacción consecutiva a la difusión en el estado estacionario satisface:

$$h_s (S_0 - S) = \frac{V_{max} S}{(K_m + S)} \quad (11)$$

donde h_s es el coeficiente de transporte del sustrato, S_0 y S son las concentraciones de sustrato en el seno de la solución y en la superficie catalítica, respectivamente. V_{max} y K_m son los parámetros intrínsecos de la enzima inmovilizada, que difieren de los parámetros intrínsecos de la enzima libre y están condicionados por el nuevo microambiente. Los valores de h_s para diferentes velocidades de flujo fueron determinados de acuerdo con la metodología desarrollada por Engasser y Horvath [40], también descrita por Girelli [41].

Los valores de h_s crecieron linealmente con la velocidad de flujo, lo que confirma el control difusional de la reacción enzimática, y fueron significativamente inferiores a los valores típicos registrados para reactores de lecho empacado. Pudo estimarse la actividad enzimática en ausencia de limitaciones difusionales externas, y pudieron obtenerse los parámetros cinéticos intrínsecos de SBP inmovilizada en el reactor [40,41]. La K_m intrínseca fue 0.08 mM (E.E.: 0.01), inferior a los valores obtenidos de K'_m y coherente con la presencia de restricciones difusionales externas.

La Tabla 13 exhibe los parámetros en función de la velocidad de flujo.

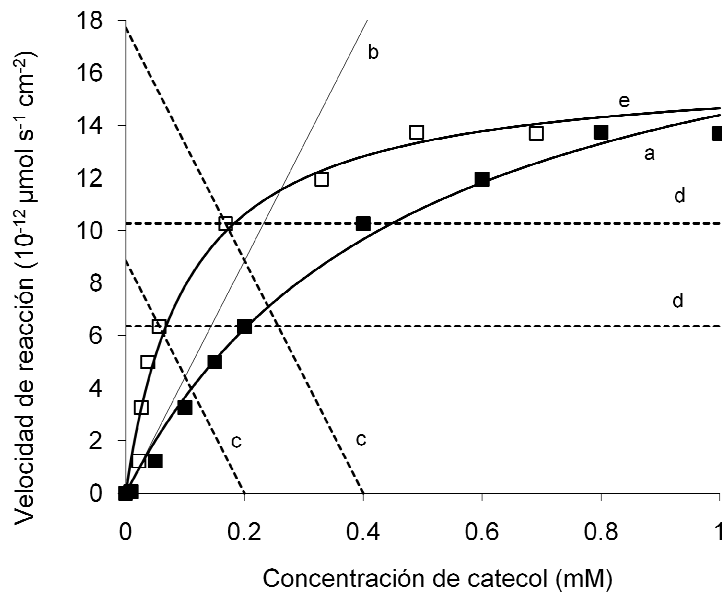


Figura 28. Método de Engasser para la determinación de parámetros cinéticos intrínsecos de la enzima SBP inmovilizada (V_{max} y K_m). La velocidad inicial de reacción fue graficada en función de la concentración de catecol en el seno de la solución (línea a; ■). El valor de h_s fue determinado a partir de la tangente de la curva experimental al origen (línea b). Para cada punto determinado experimentalmente (sobre curva a) una línea c (---) fue graficada con pendiente igual a $-h_s$ a partir de la posición apropiada en el eje horizontal. La concentración de catecol superficial se obtiene por la intersección de esta línea con la posición horizontal que representa la velocidad de reacción (línea d). Estos puntos determinados gráficamente (□ sobre la curva e) fueron usados para determinar los parámetros cinéticos intrínsecos. Velocidad de flujo: 0.2 mL min^{-1} .

Tabla 13. Constante de Michaelis aparente (K_m'), velocidad máxima aparente (V_{max}'), V_{max} intrínseca para SBP inmovilizada, modulus de sustrato para difusión externa (μ) y coeficiente de transporte (h_s) para catecol en el sistema en flujo como una función de la velocidad de flujo, con catecol y H_2O_2 como sustratos.

Vel flujo (mL min^{-1})	h_s ($10^{-12} \text{ cm s}^{-1}$)	μ	K_m' (mM)	V_{max}' (10^{-12} $\mu\text{mol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	V_{max} (10^{-12} $\mu\text{mol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)
0.2	44.3	4.3	0.48	21	16
0.4	130	5.0	0.64	83	55
0.6	184	6.1	0.88	162	95
0.8	254	4.8	0.64	162	103

La V_{max} intrínseca creció linealmente con la velocidad de flujo, y se desvió de la linealidad más allá de 0.6 mL min^{-1} . Esta evolución podría atribuirse a un incremento de los sitios activos enzimáticos disponibles cuando aumenta la presión en el sistema de flujo.

Las representaciones gráficas del comportamiento enzimático puede ser facilitada si se utilizan dos cantidades adimensionales

$$\sigma_0 = S_0 / K_m \quad (12)$$

$$\mu = \frac{V_{\max}}{h_s K_m} \quad (13)$$

donde σ_0 es la concentración adimensional del sustrato en el seno de la solución y μ es el modulus del sustrato para la difusión externa.

Los gráficos de Eadie – Hofstee normalizados para diferentes valores de μ demuestran la importancia relativa de las limitaciones en la difusión externa sobre las velocidades de reacción observadas (Figura 29).

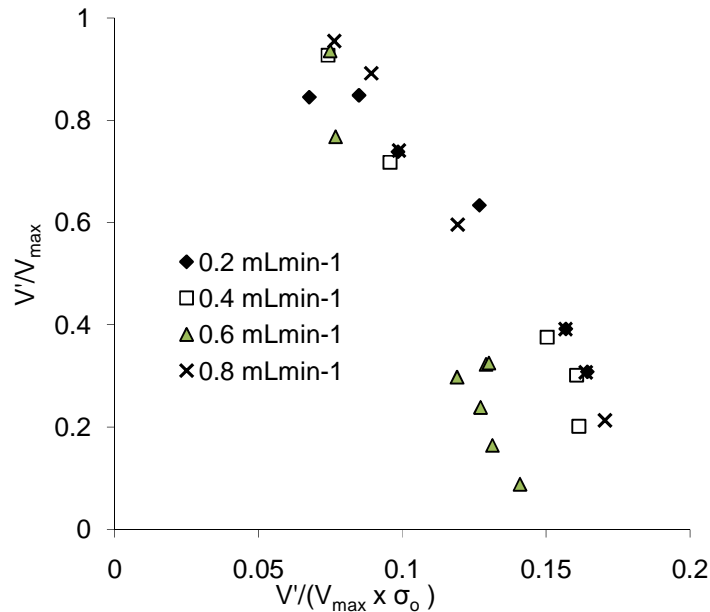


Figura 29. Gráficos normalizados tipo Eadie – Hofstee para diferentes valores de μ , el modulus de sustrato para difusión externa, a las diferentes velocidades de flujo indicadas en la leyenda inserta.

En estos experimentos se obtuvieron valores de μ entre 4.6 y 6.5, coherentes con un control difusional. El sistema catalítico habría estado bajo control cinético si μ hubiera sido inferior a 0.1. Las restricciones difusionales internas no existieron, en coherencia con la ausencia de mesoporos accesibles para la enzima. Esto se confirmó al observar que el perfil de los gráficos de Eadie-Hofstee no presentó curvas sigmoidales [39,40].

Puede observarse que K'_m evolucionó linealmente con μ hasta una velocidad de flujo de 0.6 mL min⁻¹, y se confirmó de esta manera la influencia de las restricciones en la transferencia de masa externa sobre este parámetro aparente (Tabla 13).

Existen dos factores que pudieron afectar K'_m : el tiempo de contacto entre el catecol y SBP, y el espesor de la capa límite para la difusión de catecol hacia la enzima inmovilizada. El incremento de la velocidad de flujo produce una disminución del tiempo de contacto y esto generaría un incremento de K'_m . En paralelo, las velocidades de flujo crecientes dan lugar a capas límite más delgadas para la difusión de catecol y esto produciría una disminución de K'_m . Entre 0.2 y 0.6 mL min⁻¹, el tiempo de contacto (primer factor) fue determinante en la evolución de K'_m , pero a 0.8 mL min⁻¹ el efecto del espesor de la capa difusional (segundo factor) prevaleció y se produjo una disminución en este parámetro aparente [40].

2.2.5. Conclusiones de la Sección 2.2.

En esta sección se presentaron los estudios de captación de diferentes especies, junto con la caracterización de esta unión, con el propósito de obtener parámetros empíricos útiles en predicciones de comportamiento, estabilidad y desempeño de los complejos obtenidos.

En primer lugar se abordó el estudio del área superficial específica de las partículas, mediante la adsorción de N_2 . En paralelo se obtuvo el área de adsorción de H_2O , que serviría de información complementaria para evaluar la utilidad de los datos obtenidos por isoterma BET.

Si se compara el valor de área de adsorción estimado para *Poly*(EGDE-MAA-2MI) a partir de la isoterma de adsorción de H_2O con el área de adsorción específica de la isoterma de adsorción de N_2 , se observa que en el primer caso, el área determinada fue más de 200 veces mayor. Esto sugiere que *Poly*(EGDE-MAA-2MI) es mayoritariamente hidrofílico, debido a la gran cantidad de grupos funcionales superficiales. El bajo valor obtenido con N_2 indicaría, entonces, que las regiones hidrofóbicas son muy pequeñas y/o escasas.

Por otra parte, los valores que surgieron de la isoterma BET para los polímeros son característicos de un sistema con baja adsorción superficial, similar al comportamiento de partículas de sílice. En tanto que la isoterma de adsorción de agua para *Poly*(EGDE-MAA-2MI) dio fuertes indicios de que gran parte del agua fue **absorbida** (ya no se trataría de un proceso restringido a la superficie).

A continuación, se abordó la captación de los cationes Co(II) y Cu(II). Se demostró que los materiales se comportaron como hidrogeles, que la captación de cationes hidratados no se restringió a la superficie de las partículas y que resultaron accesibles los sitios ubicados en todo el seno de la red. Los resultados experimentales del estudio del equilibrio de captación ajustaron a modelos empíricos indicadores de heterogeneidad en la energía de unión. Los sistemas en estudio son materiales heterogéneos, ya que exponen diferentes tipos de ligandos. En el polianfolito se encuentran residuos 2MI polimerizados, $-OH$, $-O-$ de éteres y $-COO^-$. Por estudios precedentes de FT-IR, se pudo concluir que los iones metálicos se coordinan en una primera etapa con el grupo 2MI y luego con los grupos $-COO^-$ [3,5], por lo que era esperable que la energía de unión se modificara durante el proceso. En el mismo sentido, el polielectrolito presenta residuos $-NH_2$, $-OH$ y $-O-$ con electrones no compartidos que pueden formar uniones covalentes coordinadas.

Con respecto a los parámetros del ajuste, no fue posible elaborar conclusiones acerca de la afinidad de los materiales estudiados por los iones utilizados, dado que los parámetros estimados no correspondieron a modelos teóricos. Por otra parte, q_m resultó sobreestimado (excepto en Co(II)-*Poly*(EGDE-DA)), probablemente debido a la repulsión electrostática entre los cationes unidos que desfavoreció la captación de nuevos iones en niveles elevados de concentración. Se puede concluir que la capacidad de captación del ion Cu(II) fue superior a la de Co(II) en los dos materiales ensayados. Por otra parte, la capacidad máxima de carga de Co(II) resultó similar en ambos materiales, independientemente de la naturaleza de sus sitios de unión y de la densidad de residuos.

En este sentido, se puede afirmar que la determinación experimental de capacidad de carga, así como las fotografías de los cortes de las partículas cargadas con los diversos iones, permitieron obtener un panorama más realista de la interacción. Estos experimentos fueron confirmatorios de una captación de iones a nivel de toda la partícula, no restringida a la superficie, lo cual resulta

altamente satisfactorio para una potencial aplicación de los materiales en procesos de purificación de efluentes industriales contaminados con iones y moléculas pequeñas.

En este mismo sentido, *Poly*(EGDE-MAA-2MI) resultó ser una matriz efectiva para la captación del colorante aniónico a un pH cercano a la neutralidad. Los datos experimentales ajustaron al modelo de Langmuir, lo que indica que las energías de unión de los sitios activos en el polianfolito eran equivalentes en toda la partícula (teniendo presente que no se restringió a la superficie). La capacidad de carga del polianfolito para este colorante aniónico resultó mayor cuando se comparó con la adsorción de otros colorantes iónicos sobre sorbentes inorgánicos, pero resultó ligeramente inferior a la capacidad de resinas de intercambio iónico comerciales. Por otra parte, la constante de equilibrio de disociación estimada (K_L , expresada en unidades M) resultó inferior, motivo por el que las sales que pudieran estar disueltas en la muestra no afectarían significativamente la eficiencia de captación del colorante sobre el material empleado. La decoloración del polianfolito cargado con DB273 fue conseguida por tratamiento con el agente oxidante NaClO 0.10 M con preservación de la estructura química del material. Como corolario, puede afirmarse que la preconcentración del colorante en la partícula del polímero permitió minimizar la cantidad de oxidante necesario para lograr la degradación.

El desafío continuó con la captación de una biomolécula activa, pasando así de solutos de volumen pequeño a una macromolécula con múltiples sitios iónicos capaces de interactuar con polímeros sintéticos funcionalizados. En este contexto se desarrolló un reactor basado en la enzima SBP, empleando el polianfolito insoluble *Poly*(EGDE-MAA-2MI) como soporte de la biomolécula. El complejo obtenido fue parte integral de un sistema de inyección en flujo acoplado a un detector amperométrico diseñado para el análisis de potenciales sustratos de SBP. El polianfolito, con sus grupos $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$ y 2MI, resultó ser una matriz conveniente para la inmovilización de SBP a partir de su extracto vegetal sin purificación previa. Esto trae implícitas las ventajas de bajo costo de producción y fácil preparación. Por otra parte, se debe remarcar que esta enzima está presente en muy altas proporciones en la cáscara de semilla de soja, que es una fuente de costo mínimo porque se trata de un producto secundario de la industria alimentaria.

Con respecto a las variables operativas del reactor, puede afirmarse que la resistencia al flujo de la solución carrier ofrecida por el complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) en el reactor, se debió a la elevada densidad de grupos funcionales y el alto grado de hinchamiento del soporte. Este problema se pudo minimizar mezclando físicamente partículas de sílicagel con el complejo SBP-polianfolito, según se detalla en el Capítulo 6.

La fijación de SBP inmovilizada mediante el uso de vapores de glutaraldehído permitió retener la macromolécula sobre el soporte en el sistema de flujo, con conservación de parte de su actividad biológica. Se obtuvieron los parámetros cinéticos y del equilibrio de la enzima inmovilizada en el sistema de flujo usando catecol como sustrato. El análisis de las velocidades experimentales de reacción en función de la velocidad de flujo permitió detectar las restricciones difusionales externas en la transferencia de masa.

2.3. Estudios de activación de H_2O_2 catalizada por los complejos Co(II) -*Poly*(EGDE-MAA-2MI), Co(II) -*Poly*(EGDE-DA) y Cu(II) -*Poly*(EGDE-DA)

Una propiedad conocida de los compuestos de coordinación con Cu(II) es la actividad catalítica en el proceso de activación de H_2O_2 para la generación de especies reactivas del oxígeno. Nuestro

grupo de trabajo posee experiencia previa en la caracterización del proceso de activación de H₂O₂ por Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) y Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM), empleando la espectroscopía de resonancia de spin electrónico (ESR) [6,42,43]. Esta técnica se utiliza para identificar especies paramagnéticas, y en nuestro caso particular, radicales libres. A su vez, esta clase de espectroscopía se emplea de manera convencional a la investigación de la geometría de complejos metálicos así como la naturaleza de la unión entre el ion metálico y sus ligandos, especialmente complejos con Cu(II) [5].

En los trabajos precedentes, nuestro grupo demostró que los complejos con Cu(II) de materiales obtenidos a partir de EGDE y otros monómeros catalizan la activación de H₂O₂, el cual genera radicales libres que difunden a la solución y pueden ser detectados por ESR. Como se trata de radicales de corta vida media, estos deben ser estabilizados con 5,5-dimetil-1-pirrolin-*N*-óxido (DMPO) para poder ser detectados [6,42,43]. El radical principalmente identificado en esos trabajos fue el OH[•] (aunque también en algunos casos se detectaron nitroxilo y radicales centrados en C, pero en menor proporción respecto de OH[•]). Por experimentos de XPS, pudieron verificarse los estados de oxidación del catión, fuerte evidencia que respaldó un mecanismo de catálisis que involucra las especies Cu(II) y Cu(I) [43].

En este Capítulo de Tesis se evalúa el proceso de activación de H₂O₂ empleando Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), y se aborda por primera vez el estudio de activación de H₂O₂ empleando los sistemas heterogéneos con Co(II). El objetivo es, entonces, estudiar la propiedad de estos complejos de participar en la generación de especies reactivas del oxígeno en vistas de su potencial aplicabilidad en el área ambiental y de síntesis orgánica.

En una primera etapa se procedió de la siguiente manera: se estudió el decaimiento de la concentración de H₂O₂ y la identidad de los productos obtenidos en cada sistema heterogéneo. En una segunda etapa, se efectuó un estudio comparativo entre los sistemas heterogéneos basados en ligandos poliméricos con aquellos sistemas que empleaban ligandos monoméricos, mediante la evaluación de eficiencias en el proceso de activación. Luego se abordó el estudio de los mecanismos de de activación para cada situación, mediante la evaluación del papel del metal central y de los ligandos involucrados.

2.3.1. Activación de H₂O₂ con Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI)

En estudios precedentes se demostró que H₂O₂ en presencia de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) no presentó una actividad oxidante frente a un colorante modelo (Naranja de Metilo, MO). También se había observado que la actividad oxidante de H₂O₂ frente a Cu(II) en solución era mínima. Por otra parte, la activación de H₂O₂ tenía lugar cuando el catión Cu(II) formaba complejo con materiales poliméricos insolubles funcionalizados [42].

Se abordó entonces el estudio de la activación de H₂O₂ por complejos con Co(II), dado que nuestros estudios preliminares con Co(II) habían puesto de manifiesto esta actividad. El material Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue puesto en contacto con H₂O₂ 42 mM en presencia de Na₂SO₄ 0.1 M y la concentración de H₂O₂ fue monitoreada en función del tiempo (Figura 30). La reacción siguió una cinética de pseudo-primer orden, de acuerdo con el Criterio de Akaike (ver Capítulo 6):

$$[H_2O_2]_t = [H_2O_2]_{\infty} + [H_2O_2]_{\text{deg}} \times e^{-k \times t} \quad (14)$$

siendo $[H_2O_2]_{\infty} : 37.53 \pm 0.30$ mM, $[H_2O_2]_{deg} : 4.63 \pm 0.45$ mM, y $k: 0.076 \pm 0.018$ min⁻¹, con R² de 0.9642. Se observó una caída rápida de la concentración de H₂O₂ durante los primeros 20 minutos de reacción, seguida de una aproximación asintótica a 37.53 mM. Cuando se utilizaron concentraciones iniciales de H₂O₂ más elevadas, los cambios en la concentración fueron menos significativos.

El desprendimiento de un cierto número de burbujas sugirió la formación de O₂ como resultado del proceso de activación de H₂O₂. Se midió la presión parcial del gas en el sistema contenedor del catalizador antes y después de la adición de H₂O₂ al sistema heterogéneo, y fue detectado un incremento del 66 % durante los primeros 5 minutos de reacción. Complementariamente, se detectó que el pH del medio de reacción disminuyó de 6.0 a 4.8 durante la activación.

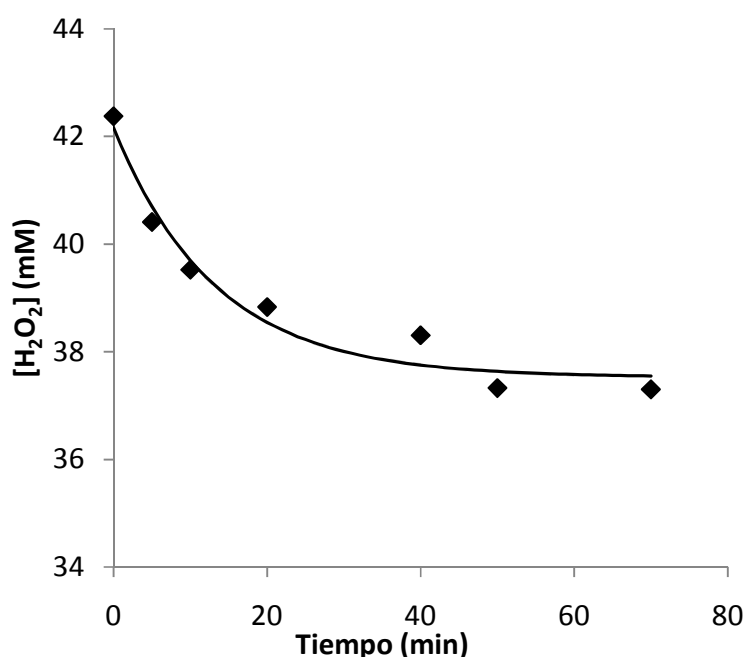


Figura 30. Perfil de concentración de H₂O₂ en el sistema heterogéneo Na₂SO₄ 0.1 M / Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI).

2.3.2. Activación de H₂O₂ con Co(II)-Poly(EGDE-DA) y con Cu(II)-Poly(EGDE-DA)

Los complejos fueron puestos en contacto con sendas soluciones de H₂O₂ 42 mM y la concentración de H₂O₂ fue monitoreada en función del tiempo. En cada caso, la reacción siguió una cinética de pseudo-primer orden, de acuerdo con el Criterio de Akaike (Figura 31).

$$[H_2O_2]_t = [H_2O_2]_{deg} \times e^{-k \times t} \quad (15)$$

Para Co(II)-Poly(EGDE-DA), los parámetros y sus errores estándar estimados fueron: $[H_2O_2]_{deg} : 41.86 \pm 0.31$ mM, y $k: (3.7 \pm 0.2) \times 10^{-3}$ min⁻¹, con R²: 0.9735. Para Cu(II)-Poly(EGDE-DA), los parámetros y sus errores estándar estimados fueron: $[H_2O_2]_{deg} : 41.82 \pm 0.19$ mM, y $k: (9.0 \pm 0.6) \times 10^{-4}$ min⁻¹, con R²: 0.9597.

El decaimiento de la concentración de H₂O₂ fue pequeño pero evidente. La liberación de burbujas de gas sobre la superficie de las partículas de Co(II)-Poly(EGDE-DA) con la adición de H₂O₂ y

sólo en presencia de Co(II) inmovilizado, resultó indicativa de la formación de O₂, que coincidió con el decrecimiento en una unidad de pH a los 10 minutos de reacción. El aumento de la presión de O₂ fue determinado experimentalmente y fue particularmente notorio en los complejos, pero también ocurrió con el polielectrolito *Poly*(EGDE-DA).

De la misma manera, el sistema heterogéneo Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H₂O₂ produjo burbujas de gas que se correspondieron con un incremento de la presión parcial de O₂ sin detectarse cambios de pH en el medio de reacción.

Esta información resulta fundamental para delinear mecanismos que incluyan la liberación de O₂ y la liberación de H⁺ en el sistema con Co(II).

La evolución de burbujas de gas desde la superficie de las partículas de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI), de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) como consecuencia de la adición de H₂O₂ y sólo en presencia de Co(II) y Cu(II) coordinados por los materiales poliméricos funcionalizados con grupos donores de electrones, es una clara evidencia de que la activación del H₂O₂ no procedió por catálisis en medio homogéneo sino que se trató de un fenómeno de interfase.

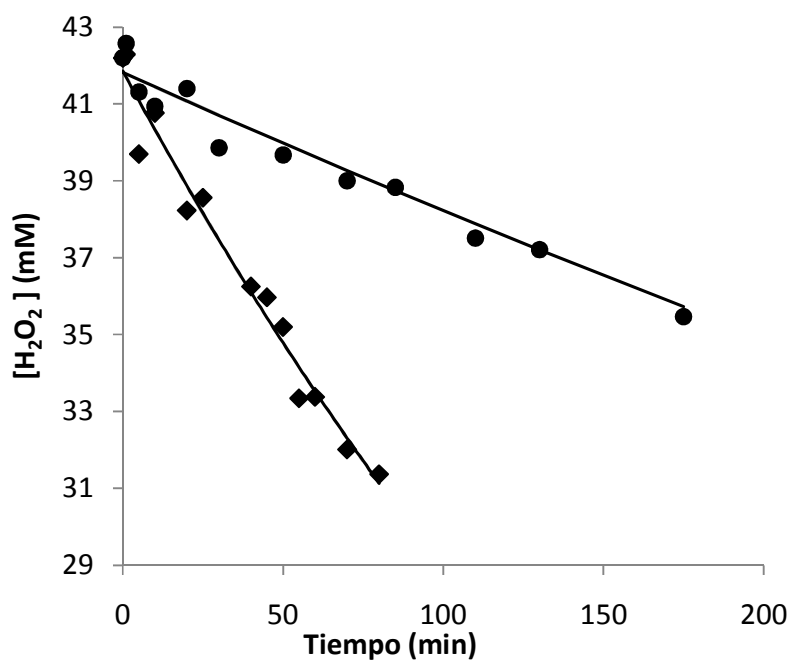


Figura 31. Perfil de concentración de H₂O₂ en el sistema heterogéneo Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H₂O₂ (◆) y en Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H₂O₂ (●).

2.3.3. Producción de radicales libres

Una vez verificado el decaimiento en la concentración de H₂O₂ por interacción con los complejos con Co(II) y Cu(II), se realizaron experimentos de ESR con la finalidad de confirmar que esta disminución fuera a través de un proceso de generación de radicales.

2.3.3.1. Identificación de radicales libres en el sistema heterogéneo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂

La producción de radicales libres que difundieron a la solución fue confirmada por experimentos de atrapamiento de spin con DMPO. La Figura 32.A. muestra el espectro ESR de onda continua (CW) producido por DMPO en contacto con alícuotas del sobrenadante del sistema heterogéneo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂ 63 mM luego de 10 minutos de la adición de H₂O₂ en un medio de Na₂SO₄ 0.1 M. La Figura 33 muestra el perfil de la intensidad de la señal generada por los radicales libres en función del tiempo, lo que denota un máximo de producción a los 10 minutos de reacción, y alcanzó un nivel de producción constante más allá de los 20 minutos.

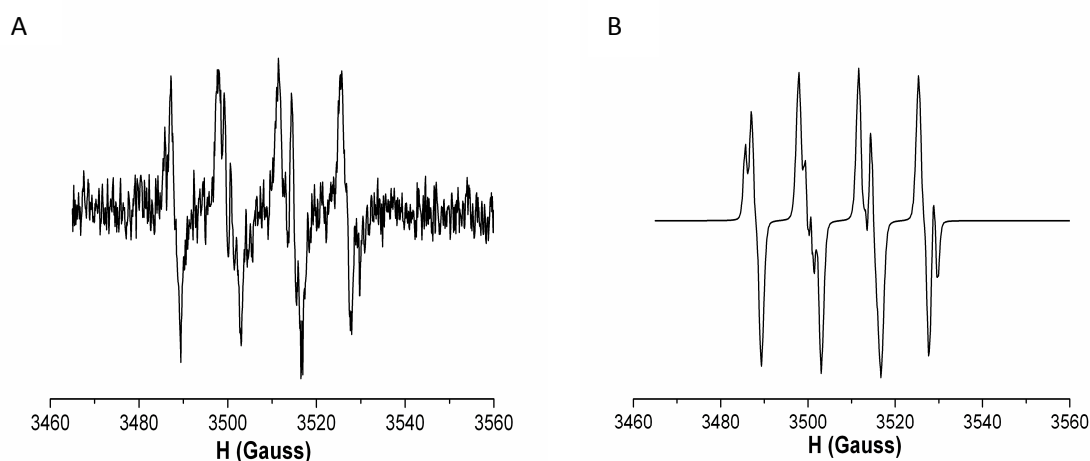


Figura 32. Espectros CW ESR en banda X experimental (A) y simulado (B) CW obtenidos en los experimentos de atrapamiento de radicales con DMPO. Sistema heterogéneo: Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / 63 mM H₂O₂ en Na₂SO₄ 0.1M. La simulación y ajustes del espectro experimental permitió establecer la presencia de dos especies: aductos DMPO/OOH y DMPO/OH. Las fracciones molares de DMPO/OOH y DMPO/OH fueron 0.88 y 0.12, respectivamente.

Para determinar la identidad de los radicales libres se requirieron experimentos adicionales. De acuerdo con el perfil de la señal, los aductos probables serían: DMPO/OSO₃H a partir de SO₄^{•-} [44] y DMPO/OOH a partir de O₂^{•-} [45].

La primera opción, SO₄^{•-}, fue considerada la menos probable debido al elevado potencial redox estándar (E°) para este radical, superior en comparación con el E° del OH[•] (E° OH[•] / H₂O: +2.8 V vs ENH). Entonces, para descartar definitivamente la posibilidad de que la señal fuera debida a la especie SO₄^{•-}, se repitió el experimento en agua destilada, en vez de hacerlo en Na₂SO₄ 0.1 M. El espectro obtenido en agua destilada no cambió significativamente del obtenido en Na₂SO₄ 0.1 M (Figuras 34 y Figura 32.A, respectivamente).

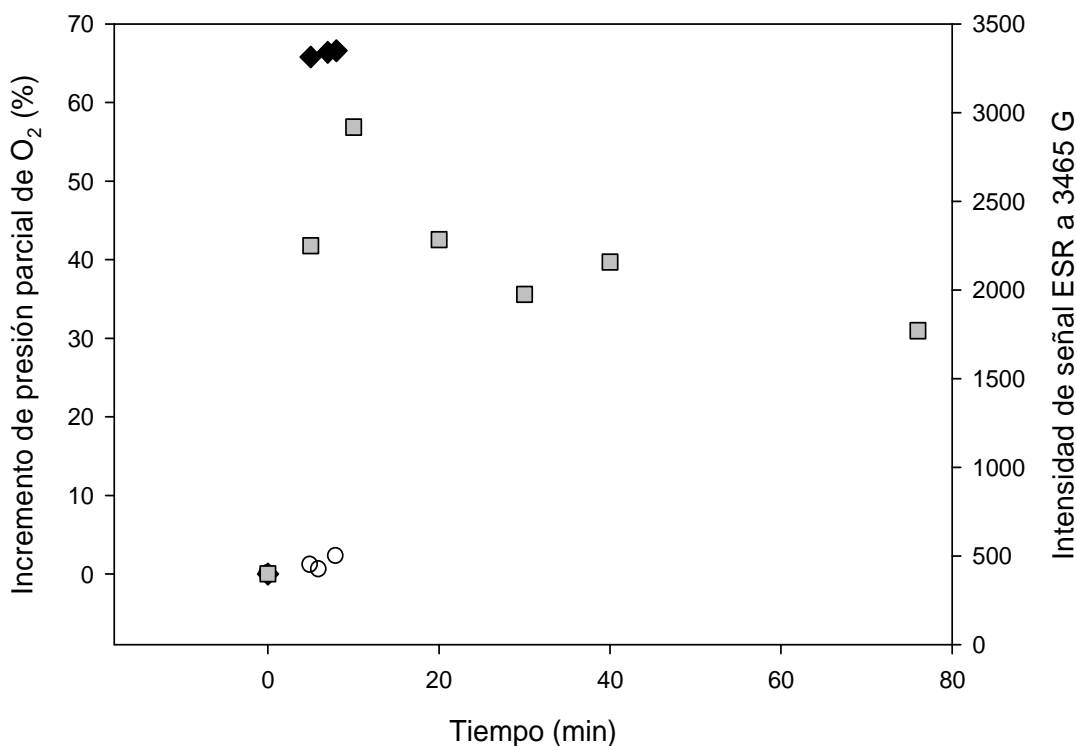


Figura 33. Evolución de productos de la activación de H_2O_2 en el sistema heterogéneo $Co(II)$ - $Poly(EGDE-MAA-2MI)$ / $63\text{ mM } H_2O_2$: incremento de la presión parcial de O_2 en presencia (◆) y en ausencia (○) de $Co(II)$ - $Poly(EGDE-MAA-2MI)$; intensidad de la señal ESR producidas por aductos de DMPO de las especies reactivas del oxígeno (■), medida a 3489 G .

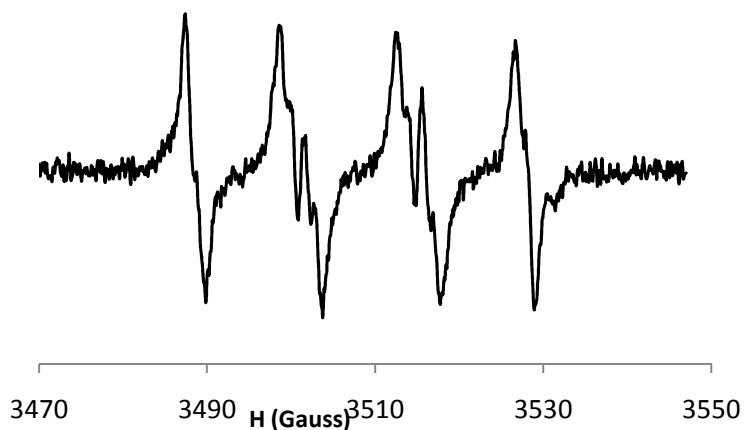


Figura 34. Espectro CW ESR en banda X experimental obtenido en los experimentos de atrapamiento de radicales con DMPO. Sistema heterogéneo: $Co(II)$ - $Poly(EGDE-MAA-2MI)$ / $63\text{ mM } H_2O_2$ en agua destilada.

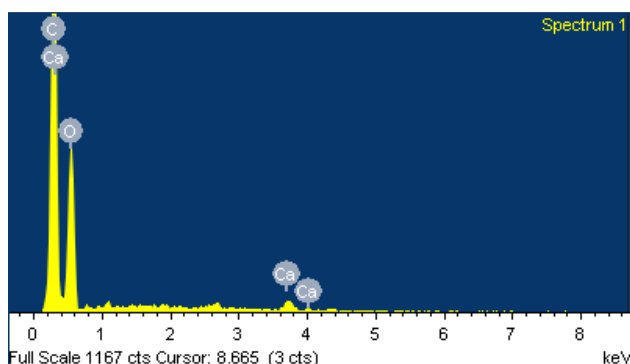
Sin embargo, la especie $SO_4^{\bullet-}$ podría provenir de los contraiones de los sitios positivos sobre las partículas de $Co(II)$ - $Poly(EGDE-MAA-2MI)$, porque el complejo se obtuvo a partir de una solución concentrada de $CoSO_4$. Por esta razón se repitió el experimento en agua destilada con el

catalizador $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ obtenido a partir de acetato de cobalto en vez de CoSO_4 . Nuevamente se registró el mismo perfil en el espectro de ESR.

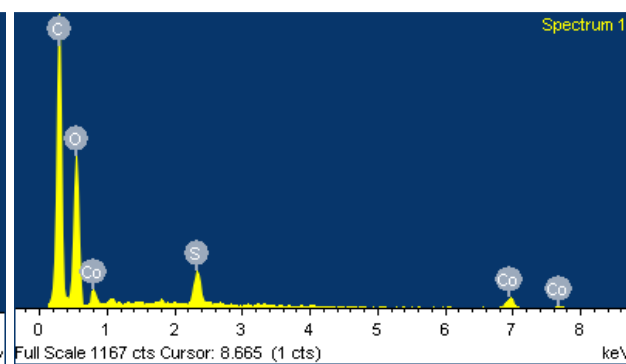
En resumen, se realizaron los experimentos control presentados en la Tabla 14, y la presencia o ausencia de azufre en cada material fue confirmada por EDS (Figura 35).

Tabla 14: Resumen correspondiente a las reacciones de control efectuadas con $\text{Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ y diversas sales de Co(II) , modificando el medio de reacción.

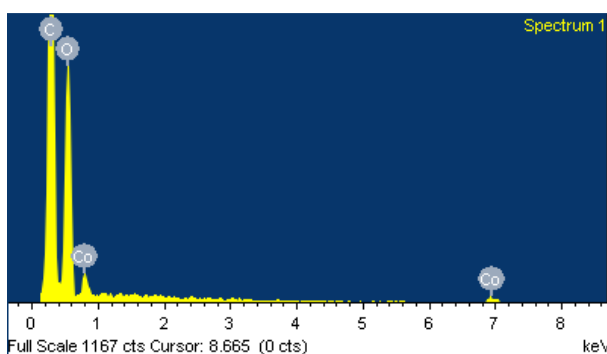
Muestra	Medio de reacción	Función
$\text{Poly(EGDE-MAA-2MI)}$	H_2O_2 en agua destilada	Control negativo para Co(II) y SO_4^{2-}
$\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ con SO_4^{2-} como contraion	H_2O_2 en agua destilada	Control positivo para Co(II) y SO_4^{2-}
$\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ con SO_4^{2-} como contraion	H_2O_2 en Na_2SO_4 0.1 M	Control positivo para Co(II) y SO_4^{2-} e influencia de la composición del medio
$\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ con acetato como contraion	H_2O_2 en agua destilada	Control positivo para Co(II) y negativo para SO_4^{2-}



EDS $\text{Poly(EGDE-MAA-2MI)}$



EDS $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ contraion SO_4^{2-}



EDS $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ contraion acetato

Figura 35. Espectros EDS del polianfolito y sus complejos con Co(II) obtenidos a partir de diferentes sales.

En la Figura 35, se observan los elementos presentes en cada muestra. Se verificó ausencia de cobalto y azufre en el polianfolito sin complejar; ausencia de azufre y presencia de cobalto para el control en el que se utilizó acetato como contraión, y presencia de ambas señales para el control con SO_4^{2-} como contraión.

En todos los espectros de ESR se observó el mismo perfil (Figura 36), lo que permitió descartar definitivamente la hipótesis de que la señal podría deberse a la formación de $\text{SO}_4^{\bullet-}$.

Cuando se consideró la segunda opción, formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, se realizaron simulaciones y ajustes del espectro de la Figura 32.A que condujeron a postular la presencia de dos especies: DMPO/OOH y DMPO/OH aductos de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet} , respectivamente (Figura 32.B) [46].

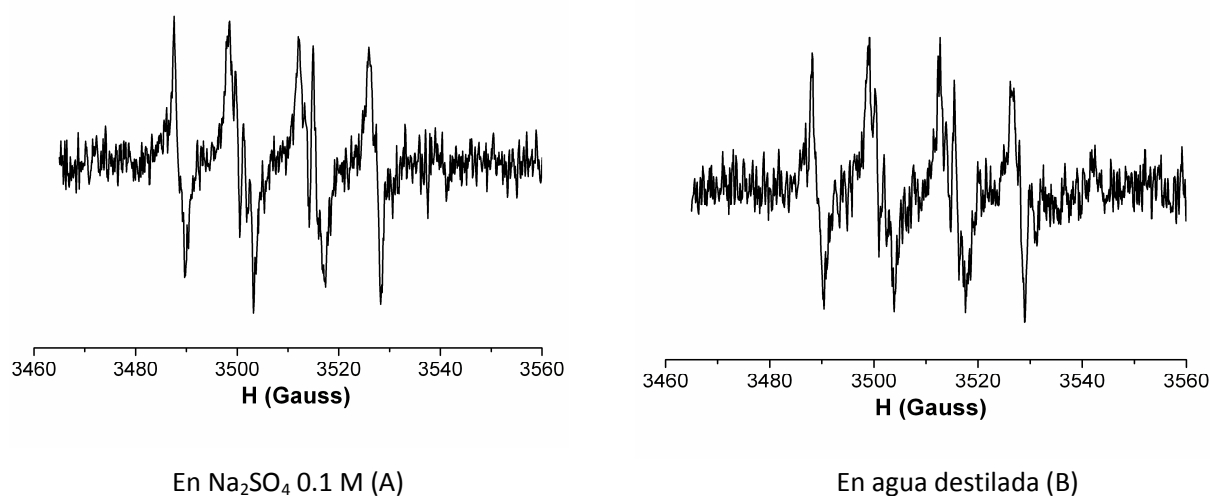


Figura 36. Espectros de ESR banda X correspondientes a experimentos de atrapamiento de spin con DMPO. Sistema heterogéneo: Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) contraion SO_4^{2-} / H_2O_2 63 mM en 0.1 M Na_2SO_4 (A) agua destilada (B).

Las fracciones molares de los aductos en la Figura 32 fueron 0.88 para DMPO/OOH y 0.12 para DMPO/OH. La Figura 37 muestra la simulación de las señales de los aductos DMPO/OOH y DMPO/OH. Los espectros simulados de las Figuras 32.B y 37.C se obtuvieron mediante la suma de aquellas señales simuladas, ponderadas por cada fracción molar. La Tabla 15 muestra las constantes de interacción hiperfinas para los aductos.

Tabla 15: Valores de las constantes de interacción hiperfina para los aductos DMPO/OOH y DMPO/OH. Los datos se obtuvieron de la simulación y ajustes de los espectros experimentales.

Radical	a_N (G)	$a_{H\beta}$ (G)	$a_{H\gamma}$ (G)
DMPO/OOH	13.8	11.0	No resuelta
DMPO/OH	14.7	13.8	-----

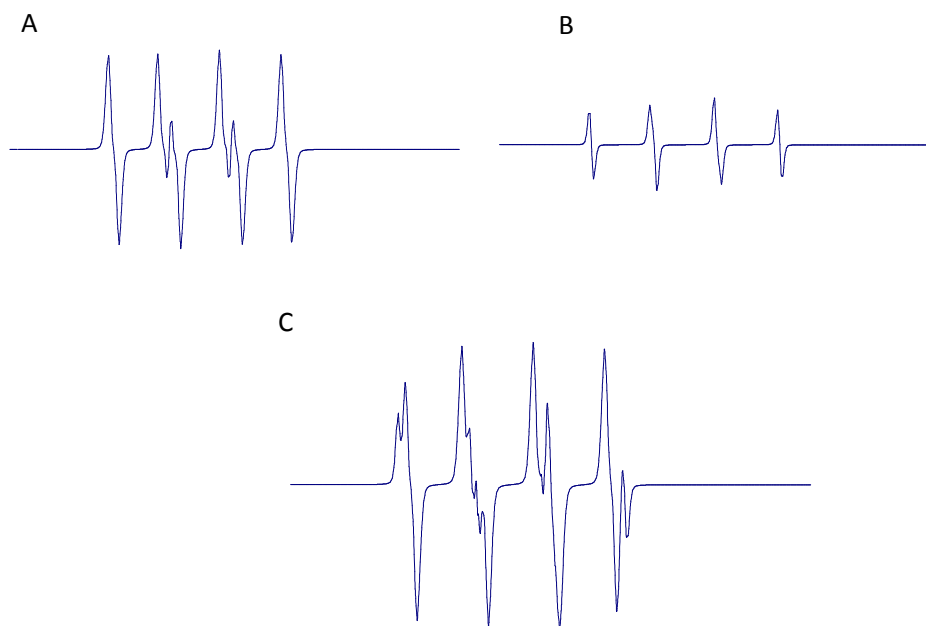


Figura 37. Aducto simulado DMPO/OOH (A), aducto simulado DMPO/OH (B) y espectro simulado de la Figura 3.B (C) obtenido por la adición de (A) y (B). Cabe mencionar que la interacción hiperfina $H\gamma$ del aducto DMPO/OOH no fue resuelto.

A partir de este hecho, dada la posibilidad de que se tratase de una mezcla de ambas especies, se pensó la estrategia de eliminar la contribución de una de las señales, la proveniente del aducto con $O_2^{\bullet-}$, por empleo de la enzima superóxido dismutasa (SOD) con una actividad de 200 U mL^{-1} . Se esperaba obtener la dismutación del radical superóxido y la ausencia de su contribución en la señal o bien ausencia completa de señal. El resultado obtenido fue la señal característica del aducto DMPO/OH debido a OH^{\bullet} (Figura 38), y resultó independiente del medio de reacción (agua destilada o $Na_2SO_4\ 0.1\text{ M}$).

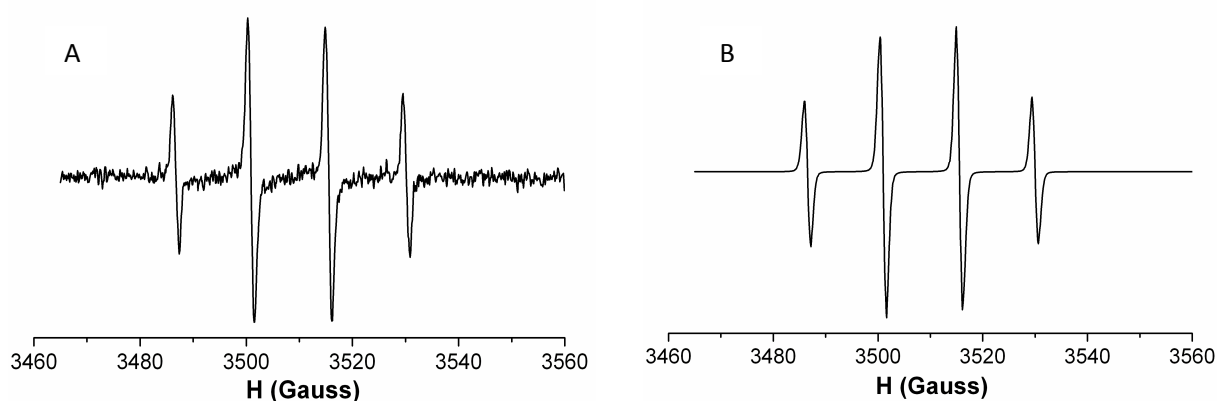


Figura 38. Espectros CW ESR en banda X de experimentos de atrapamiento de spin con DMPO: experimental (A) y simulado (B). Sistema heterogéneo: $Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)$ / $H_2O_2\ 63\text{ mM}$ con SOD 200 U mL^{-1} , en agua destilada. La simulación y los ajustes al espectro experimental permitieron establecer la presencia de DMPO/OH. Cabe mencionar que el aducto DMPO/OOH no está presente.

De acuerdo con esto, se concluyó que se producía la eliminación de la señal originada por $O_2^{\bullet-}$ mediante agregado de SOD, en tanto que se conservaba la señal correspondiente al OH^{\bullet} . Se confirmó entonces, por un lado, la identidad de los dos radicales y, por el otro, que la complejidad exhibida por el espectro se debía al hecho de estar compuesto por la superposición de dos señales espectrales.

2.3.3.2. Identificación de radicales libres en los sistemas heterogéneos $Co(II)-Poly(EGDE-DA) / H_2O_2$ y $Cu(II)-Poly(EGDE-DA) / H_2O_2$

El sistema heterogéneo $Co(II)-Poly(EGDE-DA) / H_2O_2$ también produjo radicales libres que difundieron a la solución y fueron detectados por experimentos de atrapamiento de radicales con DMPO (Figura 39.A). La simulación y los ajustes del espectro experimental permitieron establecer la presencia de dos especies: el aducto DMPO/OOH debido al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) con una fracción molar de 0.93 y el aducto DMPO/OH debido al radical hidroxilo (OH^{\bullet}) con la fracción molar de 0.07 (Figura 40.A). La adición de la enzima SOD al medio de reacción dio lugar a un espectro de la forma característica que genera el aducto DMPO/OH (Figura 41).

Por otra parte, el sistema heterogéneo $Cu(II)-Poly(EGDE-DA) / H_2O_2$ generó un espectro que se muestra en la Figura 39.B. La simulación y los ajustes del espectro experimental permitieron establecer la presencia del aducto DMPO/OH formado a partir de OH^{\bullet} (Figura 40.B).

Esto permitió considerar que, independientemente de la naturaleza de los ligandos usados, el H_2O_2 en presencia de $Co(II)$ en el sistema heterogéneo dio lugar a la formación de $O_2^{\bullet-}$ (y tal vez OH^{\bullet}), además de O_2 y H^+ . En tanto que H_2O_2 en presencia de $Cu(II)$ en el sistema heterogéneo originó OH^{\bullet} , además de O_2 .

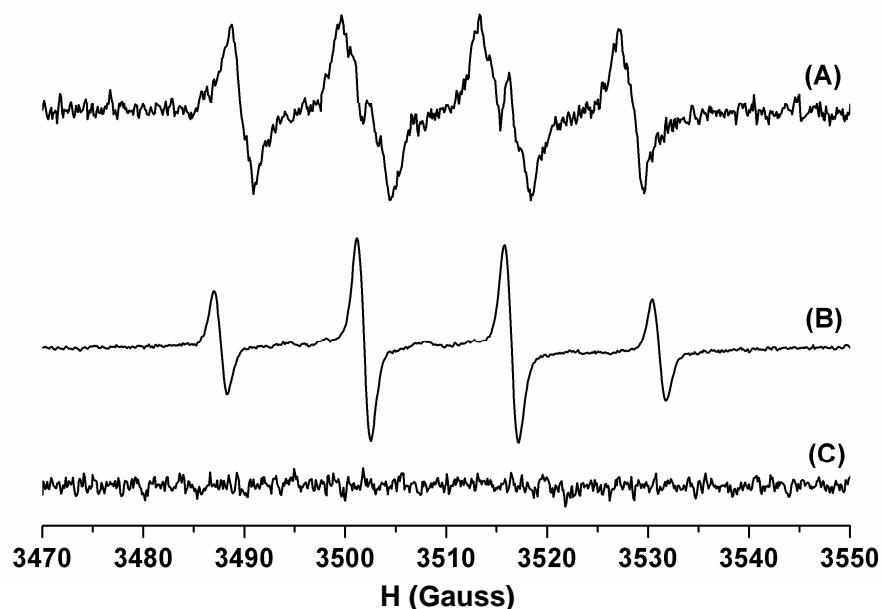


Figura 39. Espectros experimentales CW ESR en banda X de experimentos de atrapamiento de spin con DMPO obtenidos luego de 10 minutos de la adición de H_2O_2 . Sistema heterogéneo: $Co(II)-Poly(EGDE-DA) / H_2O_2$ 63 mM (A); Sistema heterogéneo: $Cu(II)-Poly(EGDE-DA) / H_2O_2$ 63 mM (B). El espectro ESR de DMPO (control) es C.

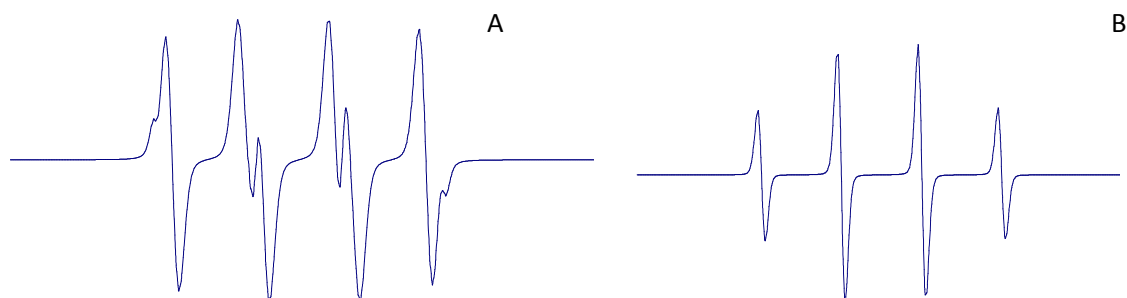


Figura 40. Espectros simulados de los experimentos de atrapamiento de spin con DMPO presentados en la Figura 10.A. Sistema heterogéneo: $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ / H_2O_2 63 mM. La simulación y los ajustes al espectro experimental permitieron establecer la presencia de dos especies: los aductos DMPO/OOH y DMPO/OH. Las fracciones molares de DMPO/OOH y DMPO/OH fueron 0.93 y 0.07, respectivamente (A).

Espectros simulados de los experimentos de atrapamiento de spin con DMPO presentados en la Figura 10.B. Sistema heterogéneo: $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)}$ / H_2O_2 63 mM. La simulación y los ajustes al espectro experimental permitieron establecer la presencia del aducto DMPO/OH (fracción molar: 1.00) (B).

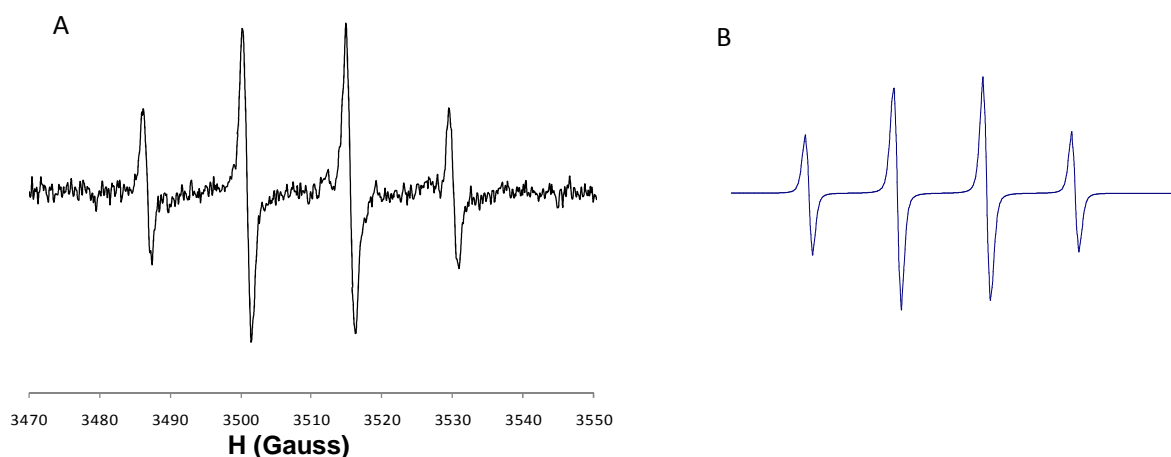


Figura 41. Espectros CW ESR en banda X de experimentos de atrapamiento de spin con DMPO: experimental (A) y simulado (B). Sistema heterogéneo: $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ / H_2O_2 63 mM en presencia de SOD 200 U mL^{-1} . La simulación y los ajustes al espectro experimental permitieron establecer la presencia del aducto DMPO/OH (fracción molar: 1.00).

2.3.4. Estudio comparativo de activación de H_2O_2 en sistemas con Co(II) y Cu(II)

Frente a estas evidencias preliminares se procedió al estudio de la activación de H_2O_2 en una serie diversa de complejos con Co(II) para evaluar el efecto de la naturaleza del ligando sobre la eficiencia del proceso.

2.3.4.1. Producción de radicales libres empleando complejos con Co(II)

La simulación y los ajustes de los espectros experimentales de activación de H₂O₂ por diferentes complejos insolubles de Co(II) permitió establecer la presencia de dos aductos: DMPO/OOH proveniente de O₂^{•-}, y DMPO/OH proveniente de OH[•].

Por el contrario, para el caso del control con Co(II) soluble en ausencia de H₂O₂ se detectó una señal de OH[•] débil (1.55 x 10⁶ U.A. a 3500 G). Cuando el H₂O₂ fue añadido, la señal correspondió únicamente al aducto DMPO/OOH y no se obtuvieron contribuciones de OH[•].

Los estudios cinéticos de activación de H₂O₂ por parte de los diferentes complejos con Co(II) mostraron producción de radicales libres durante los 60 minutos de duración del experimento, con una prevalencia neta de O₂^{•-}. Es necesario mencionar que la relación molar de estos radicales libres se mantuvo estable durante todo el experimento.

La amplitud de la señal a 3488 G fue utilizada para comparar la producción de radicales libres con los diferentes catalizadores con Co(II). La producción promedio de los radicales libres totales (y la eficiencia de la activación H₂O₂) dependió de la naturaleza del complejo.

En la Tabla 16 se exhiben las especies radicalarias obtenidas a partir de H₂O₂ activado por complejos con Co(II): fracción molar promedio (y D.E.), amplitud promedio de la señal a 3488 G o amplitud máxima de la señal y tiempo en la que se produce.

Se observó un estado estacionario en la producción de O₂^{•-} y OH[•] por el sistema con Co(II)-*Poly*(EGDE-2MI). El mismo comportamiento fue observado en la producción de OH[•] por el sistema con Cu(II)-*Poly*(EGDE-2MI), como se verá más adelante.

La liberación de radicales libres de los complejos Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM), Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) y Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) disminuyó en función del tiempo durante el período monitoreado. En cambio, se observó un incremento en la producción cuando fueron evaluados los materiales Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-PYR) y Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-TRZ).

La menor producción de radicales se obtuvo con Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI). La presencia de un ligando débil como TRZ o fuerte como IM, mejoró indistintamente la liberación de O₂^{•-}. Por otra parte, el papel de -COO⁻ como activador no resultó claro. La presencia de -COO⁻ en la red de 2MI afectó negativamente la producción de O₂^{•-}. Y TRZ como ligando del polianfolito resultó mejor activador para Co(II) que para Cu(II), como se verá luego.

Respecto de la naturaleza de los productos, la evidencia indica que el OH[•] podría ser liberado tanto del sitio de Co (II) como de los átomos de N en los ligandos mencionados anteriormente [47]. Este último aspecto, que será ampliado en la siguiente sección, es avalado por otros autores, quienes encontraron incrementos en actividad electrocatalítica en materiales con mayor contenido de N tipo pirrónico y sitios con menor densidad electrónica.

2.3.4.2. Producción de radicales libres empleando complejos con Cu(II)

Como se ha visto, la identidad de los radicales libres está directamente relacionada con el catión implicado en el sitio catalítico. Cuando el Cu(II) coordinado fue usado como catalizador en la activación, el H₂O₂ produjo OH[•]. El pH no varió significativamente al tiempo que la presión parcial de O₂ se incrementó junto con la concentración de los radicales libres.

El control, consistente en Cu(II)-H₂O en solución no produjo ningún radical libre detectable por nuestro sistema de medida. Sin embargo el aducto DMPO/OH fue observado luego de la adición de H₂O₂. Esto indica una pequeña capacidad activadora del Cu(II) en solución, aunque la

intensidad de la señal resultó muy baja respecto de la de los sistemas con ligandos orgánicos (Tabla 17).

Tabla 16: Especies radicalarias y su fracción molar promedio, obtenidas por activación de H₂O₂ usando complejos con Co(II). Amplitud de la señal a 3488 G en estado estacionario, o bien amplitud máxima de la misma.

Complejo	O ₂ ^{•-}		OH [•] fracción molar promedio	Amplitud de la señal en el estado estacionario y D. E. (x 10 ⁶ U.A.)		Amplitud máxima de la señal y D. E. (x 10 ⁶ U.A.), y tiempo (min)
	promedio y D.E.	1		D. E.	-	
Co(II)-H ₂ O			-	15.41 ± 0.21	-	-
Co(II)-Poly(EGDE-DA)	0.932 ± 0.022		0.068	-	4.14 ± 0.10 (10 min)	
Co(II)-Poly(EGDE-MAA)	n.d.		n.d.	9.64 ± 0.61	-	
Co(II)-Poly(EGDE-2MI)	0.912 ± 0.038		0.088	15.9 ± 2.8	-	
Co(II)-Poly(EGDE-MAA-IM)	0.961 ± 0.040		0.039	-	23.91 ± 0.10 (5 min)	
Co(II)-Poly(EGDE-MAA-TRZ)	0.912 ± 0.038		0.088	-	18.76 ± 0.16 (60 min)	
Co(II)-Poly(EGDE-MAA-PYR)	n.d.		n.d.	-	3.47 ± 0.10 (60 min)	
Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)	0.893 ± 0.045		0.107	-	2.97 ± 0.23 (10 min)	

n.d.: no determinado debido a la baja relación de señal/ruido

Tabla 17: Complejos con Cu(II) en la activación de H₂O₂.

Amplitud de la señal de ESR (en estado estacionario o máxima) para el aducto DMPO/OH medida a 3500 G.

Complejo q Cu(II) [6]	Amplitud de señal en estado estacionario y D.E. (x 10 ⁶ A.U.)	Máxima amplitud de señal, D.E. (x 10 ⁶ A.U.), y tiempo	Incremento máximo promedio en la presión parcial de O ₂ (%)	Potencial rédox (mV vs Ag/AgCl)
			complejo ligando	complejo ligando
Cu(II)-H ₂ O	4.10 ± 0.10			
Cu(II)-Poly(EGDE-DA) 127 mg g ⁻¹	49.8 ± 3.4	-	164	+233
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA) 1 mg g ⁻¹	6.90 ± 0.17	-	10	+360
Cu(II)-Poly(EGDE-2MI) 63 mg g ⁻¹	12.75 ± 0.84	-	n.d.	n.d.
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-IM) 67 mg g ⁻¹	-	19.11 ± 0.40 (60 min)	55	+355
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-IM) 8 mg g ⁻¹	-	5.20 ± 0.25 (60 min)	n.d.	n.d.
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-TRZ) 60 mg g ⁻¹	-	8.49 ± 0.56 (60 min)	23	+360
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-PYR) 38 mg g ⁻¹	3.5 ± 0.42	-	1	+377

Los controles realizados con materiales poliméricos sin catión metálico complejado, no produjeron especies radicales en ausencia de H₂O₂. Sin embargo, el aducto DMPO/OH fue detectado luego de la adición de H₂O₂ a la suspensión de material polimérico sin catión, y su señal fue monitoreada luego de 10 minutos de contacto. Debe remarcarse que la activación de H₂O₂ por los complejos con Cu(II) con la formación de OH[•] resultó más eficiente en todos los casos, cuando se la comparó con los materiales poliméricos sin ion metálico (Tabla 18). Esta activación de H₂O₂ puede estar relacionada con la presencia de átomos de N de tipo pirrólico en los polímeros, que generan un ambiente más deficiente en electrones, lo que favorece la movilidad de cargas [47].

Cuando se examinaron los perfiles cinéticos de producción de radicales libres de los sistemas heterogéneos con Cu(II), estos resultaron claramente dependientes de la naturaleza de los ligandos. Aquí se trabajó unificando la cantidad de masa de cada complejo en el sistema heterogéneo. Sin embargo, como la capacidad máxima de captación de un ion está influenciada por la naturaleza del ligando, la cantidad de ion metálico para una misma masa de catalizador, varía entre materiales. A su vez, como la producción de radicales es dependiente de la cantidad de ion metálico, se esperaban variaciones en la cantidad de radicales generados en función de la densidad de sitios catalíticos.

Tabla 18: Intensidad de la señal ESR a 3500 G, medida a **10 minutos de reacción** luego de la adición de H₂O₂ al sistema heterogéneo.

	Amplitud de señal ESR y D.E. (x 10 ⁶ A.U.)	
	Polímero sin Cu(II)	Polímero cargado con Cu(II)
<i>Poly</i> (EGDE-DA)	3.78 ± 0.92	47.9 ± 1.8
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-IM)	3.54 ± 0.14	4.32 ± 0.27
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-TRZ)	2.16 ± 0.36	5.21 ± 0.42
<i>Poly</i> (EGDE-MAA-PYR)	2.33 ± 0.35	3.60 ± 0.23

Tabla 19: Intensidad de la señal ESR a 3500 G del aducto DMPO/OH luego del agregado de H₂O₂, e incremento de la presión parcial de O₂. Potencial rédox en sistemas heterogéneos con Cu(II) en ausencia de H₂O₂.

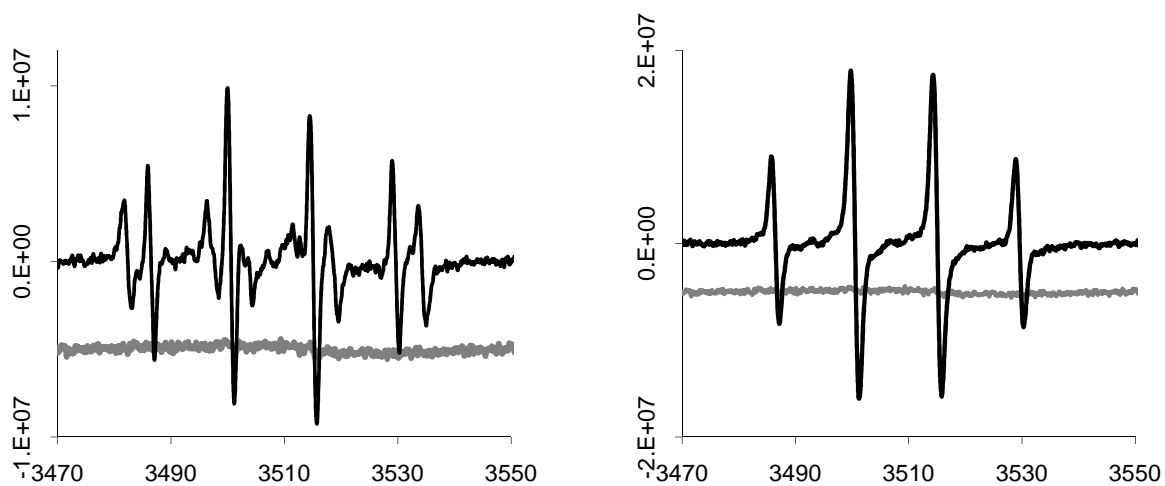
Complejo	Amplitud de señal en estado estacionario y		Máximo incremento	
	D.E. (x 10 ⁶ A.U.)	Máxima amplitud de señal, D.E. (x 10 ⁶ A.U.) y tiempo	promedio de presión parcial de O ₂ (%)	Potencial rédox (mV vs Ag/AgCl)
Cu(II)-H ₂ O	4.10 ± 0.10	-	n.d.	n.d.
Cu(II)-MAA en agua	-	34.52 ± 0.74 (40 min)	n.d.	n.d.
Cu(II)-MAA en etanol	-	7.14 ± 0.56 (10 min)	105	+376
Cu(II)-2MI	2.44 ± 0.40	-	n.d.	n.d.
Cu(II)-TRZ	-	8.54 ± 0.23 (60 min)	n.d.	n.d.
Cu(II)-PYR	12.16 ± 0.81	-	104	+380
Cu(II)- <i>Poly</i> (AA)	-	39.75 ± 0.95 (30-40 min)	n.d.	n.d.

La Figura 42 resume los resultados experimentales de atrapamiento de radicales obtenidos a partir de complejos con Cu(II).

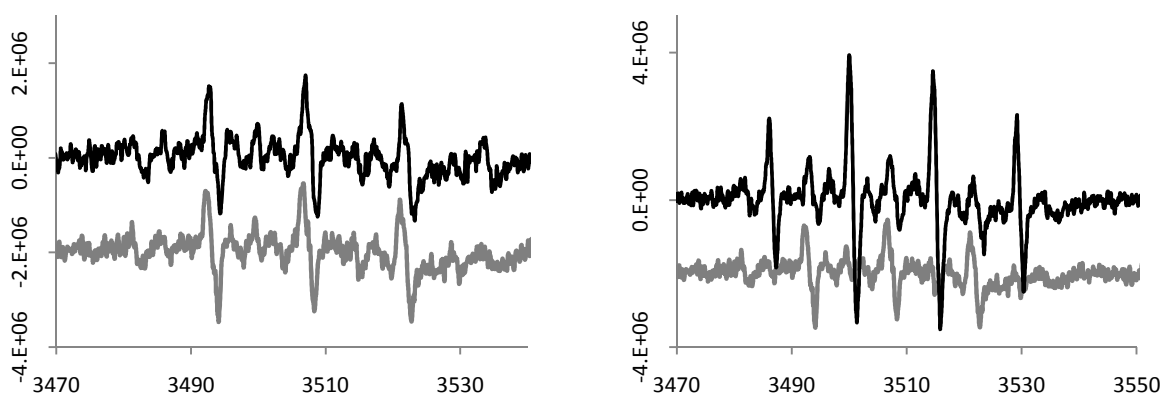
Figura 42: Espectros ESR del medio de reacción en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de H₂O₂ a los sistemas con Cu(II), obtenidos luego del agregado de DMPO a la alícuota de muestra. En gris se exhiben los espectros control.

Espectro ESR del medio de reacción en ausencia de H ₂ O ₂	Espectro ESR del medio de reacción en presencia de H ₂ O ₂
<p>Negro: DMPO en contacto con medio de reacción antes del agregado de H₂O₂.</p> <p>Gris: DMPO en agua.</p>	<p>Tiempo de reacción: 10 min</p> <p>Negro: aductos de DMPO con radicales originados en la activación de H₂O₂.</p> <p>Gris: DMPO en agua.</p>

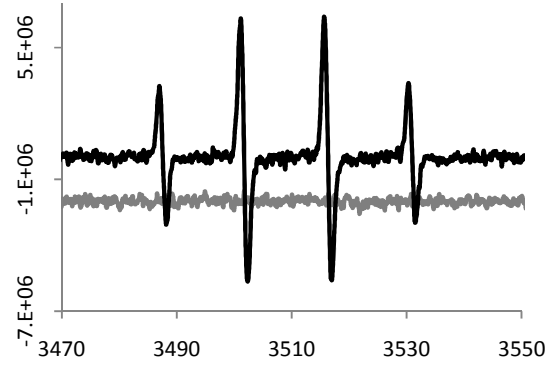
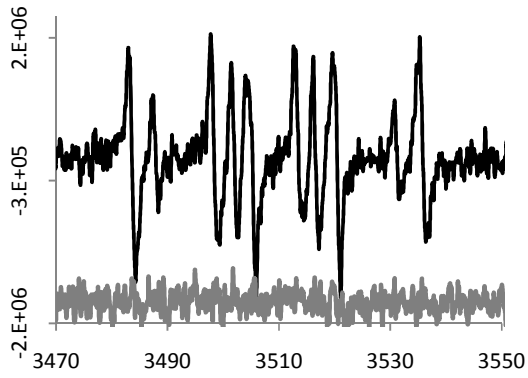
Cu(II)-Poly(EGDE-DA)



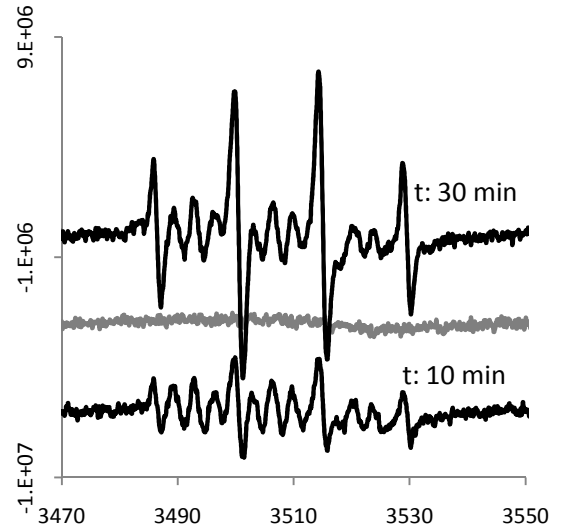
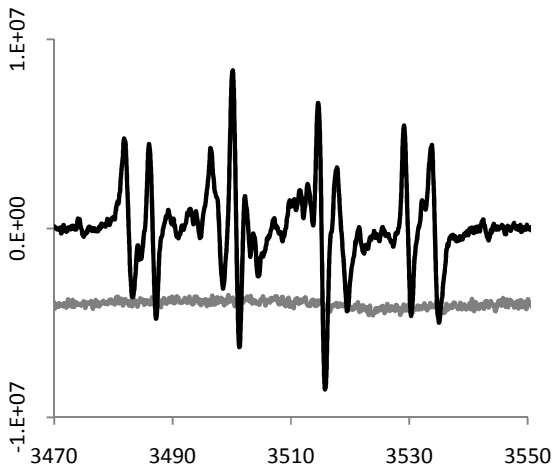
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA)



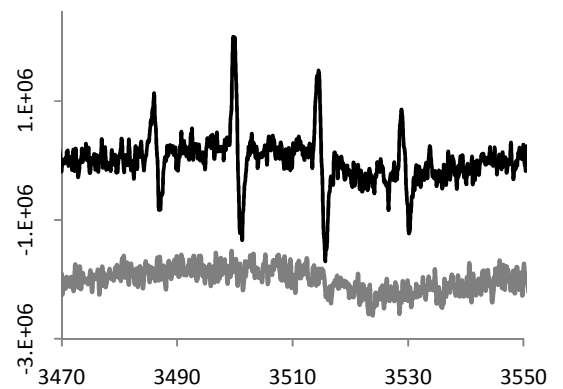
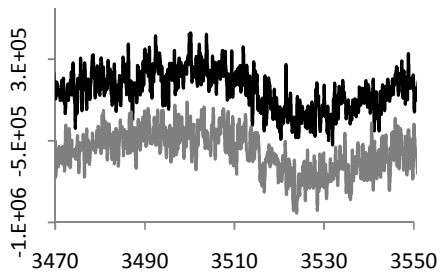
Cu(II)-Poly(EGDE-2MI)



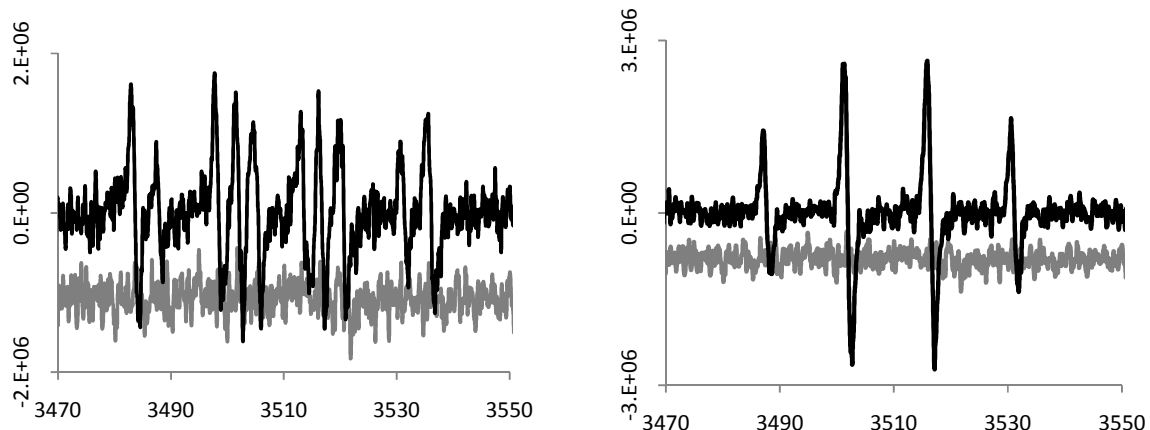
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-IM) $q: 67 \text{ mg g}^{-1}$



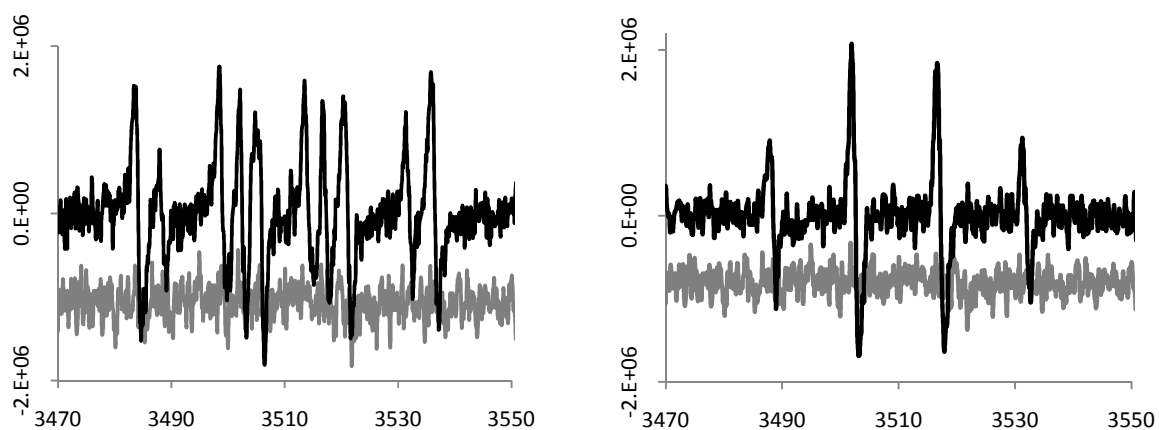
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-IM) $q: 8 \text{ mg g}^{-1}$



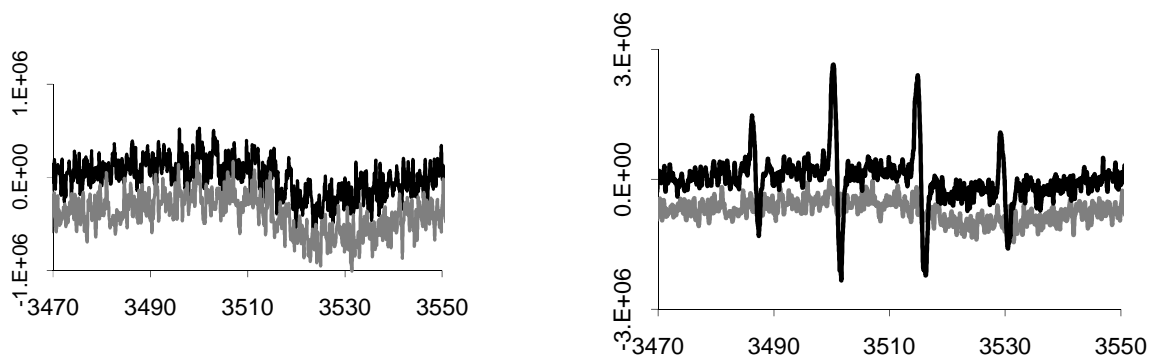
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-TRZ)



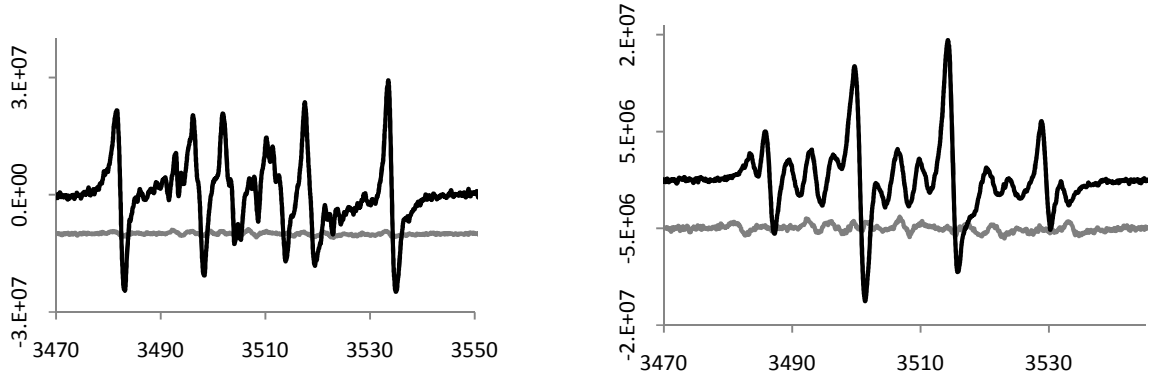
Cu(II)-Poly(EGDE-MAA-PYR)



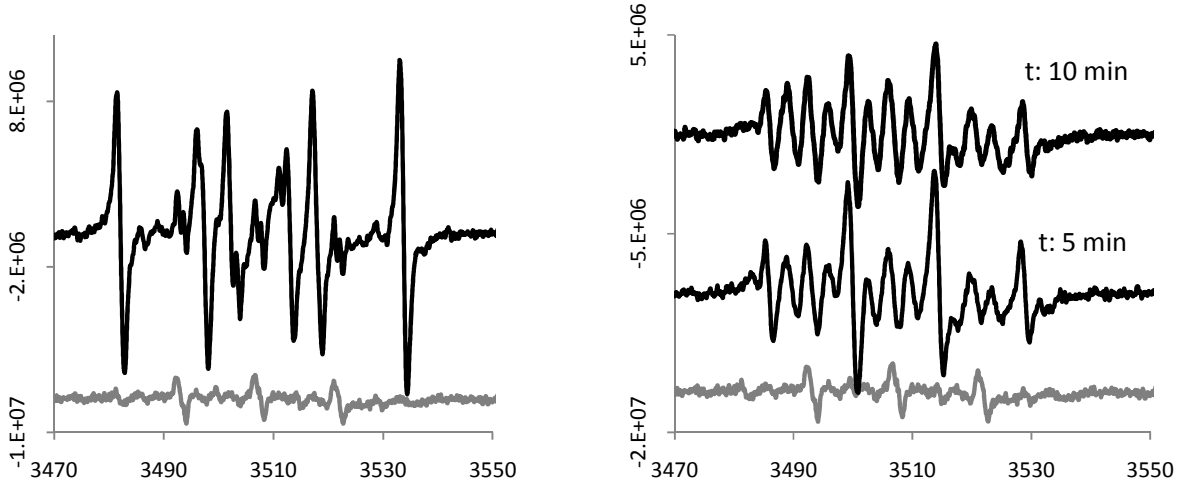
Cu(II)-H₂O



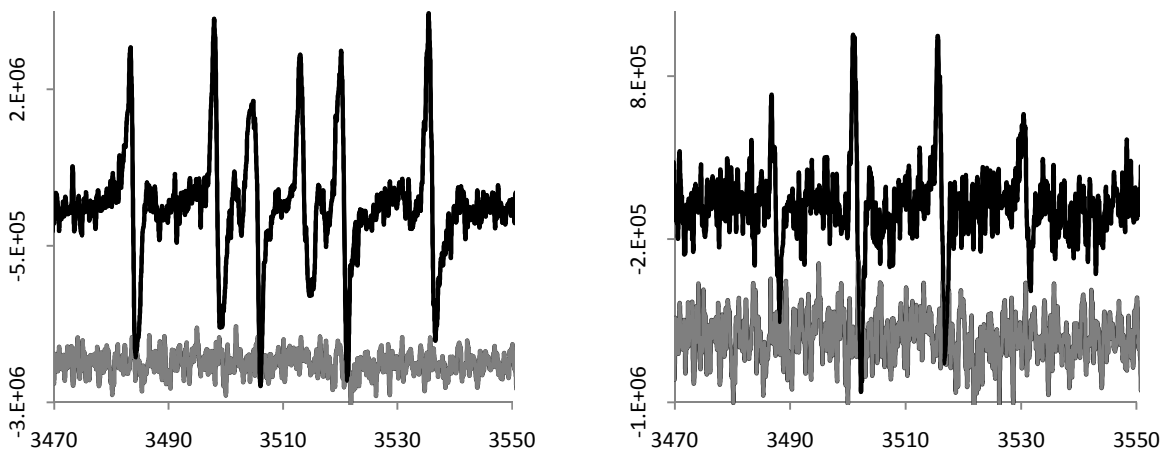
Cu(II)-MAA en agua



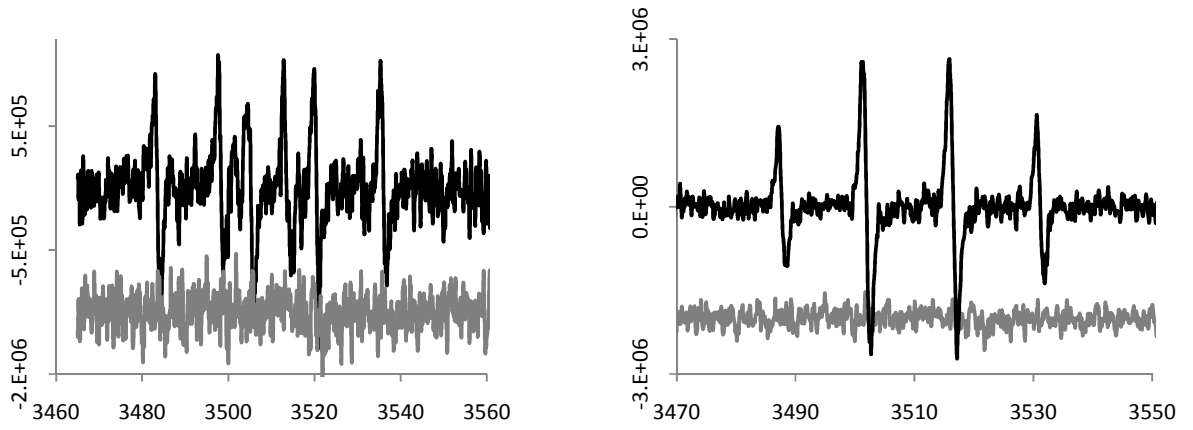
Cu(II)-MAA en etanol



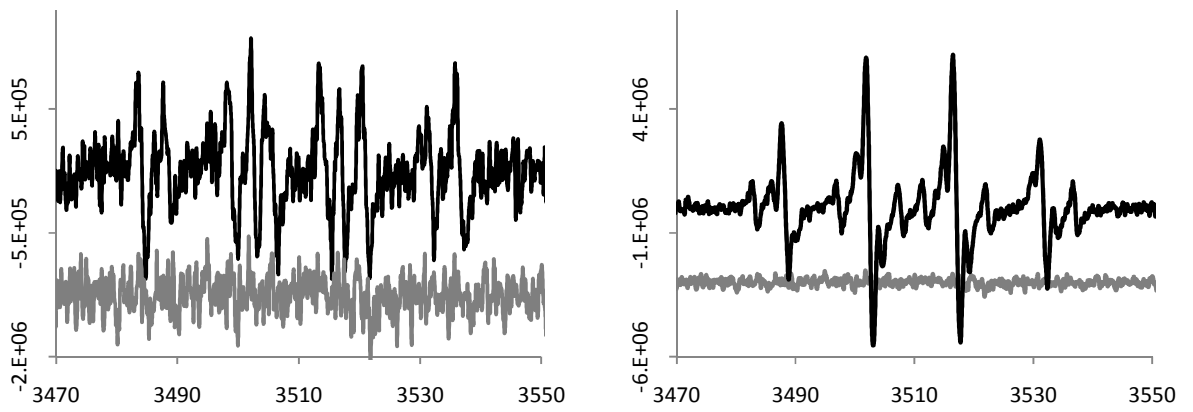
Cu(II)-2MI



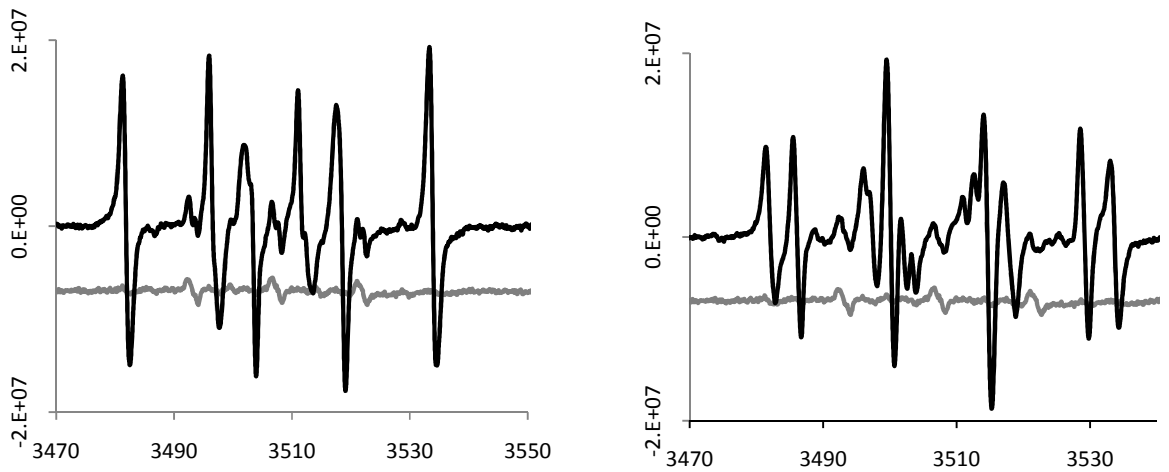
Cu(II)-TRZ



Cu(II)-PYR



Cu(II)-Poly(AA)



Eje x: H (Gauss). Eje y: Intensidad de señal de ESR en unidades arbitrarias.

En primer lugar, es necesario remarcar que el O₂ disuelto fue activado por estos complejos con Cu(II), dando lugar a mezclas de especies radicalarias cuya identificación excede los objetivos de este trabajo de Tesis porque no se les ha encontrado utilidad en el área ambiental o industrial.

En la evaluación de la eficiencia de activación de H₂O₂ de los complejos con Cu(II) para diferentes ligandos, se vio que la máxima producción del aducto DMPO/OH a partir de OH[•] se obtuvo con el material Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), seguido por Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) 67 mg g⁻¹ (Tabla 17).

En el caso del Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), el estado estacionario se alcanzó luego de los primeros 5 minutos y se mantuvo hasta el final del experimento. En cambio, la producción de OH[•] fue marcadamente irregular en el sistema con Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) 67 mg g⁻¹. La menor cantidad de OH[•] detectada coincidió con la alta producción de una mezcla de otros radicales libres no identificados (Figura 42). Este patrón superpuesto a la señal del aducto DMPO/OH podría, en principio, indicar cierta liberación de material proveniente de partículas degradadas de polianfolito. Sin embargo, los datos experimentales no coincidieron con el ajuste para aductos de radicales libres centrados en C.

La cantidad de Cu(II) unido a *Poly*(EGDE-MAA-IM) afectó claramente la cinética y la eficiencia de la activación de H₂O₂. Cuando la captación fue de 8 mg Cu(II) g⁻¹, la amplitud de la señal del aducto DMPO/OH tuvo un incremento gradual (y menor) durante los 60 minutos del experimento, en tanto que no se registraron especies adicionales.

La excepcional actividad catalítica de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) puede estar relacionada con la gran densidad de sitios de Cu(II) (o carga de Cu(II), *q*) en el hidrogel (Tabla 17), significativamente mayor que la cantidad de Cu(II) captada por otros materiales, combinada con la naturaleza del grupo donador de electrones del polímero en cuestión. Es bien sabido que, en la serie espectroquímica, -NH₂ es un ligando de campo fuerte, en tanto que IM o -COO⁻ son más débiles, lo que es consistente con los resultados observados.

El papel del N-heterociclo como donador de electrones en los complejos con Cu(II) se hizo evidente en la activación de H₂O₂. Cuando el N-heterociclo fue TRZ, la máxima captación de Cu(II) fue comparable con los valores para los polímeros con IM y 2MI, pero la amplitud de la señal del aducto DMPO/OH fue menor.

El polielectrolito Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA) presentó la menor densidad de sitios catalíticos. Sin embargo, la eficiencia relativa en la producción de OH[•] fue mayor que para el sistema con Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) 8 mg g⁻¹. Esta particular diferencia de comportamiento en la activación de H₂O₂ parece estar directamente relacionada con la naturaleza del ligando. Claramente, el ligando -COO⁻ en los complejos con Cu(II) resultó mejor activador del H₂O₂ que los N-heterocíclicos. En el caso de los polianfolitos con IM con baja carga de Cu(II), los complejos con Cu(II) fueron establecidos de modo predominante con residuos IM polimerizados [5]. Asimismo, se demostró que el -COO⁻ fue incluido como ligando sólo en el caso en que la cantidad de catión unido era cercana a la saturación del material. En este sentido, se puede concluir que la eficiencia catalítica de Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) se vio incrementada significativamente en condiciones de alta captación de Cu(II) debido a la contribución del grupo -COO⁻.

Otra comparación equivalente puede hacerse entre Cu(II)-*Poly*(EGDE-2MI) y Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM). La captación de Cu(II) resultó similar en ambos casos, pero la máxima eficiencia de activación de H₂O₂ parecería estar incrementada por efecto del -COO⁻ en el polianfolito (aunque de todos modos fue alta para ambos catalizadores).

Cuando el N-heterociclo en el polianfolito fue PYR, la captación de Cu(II) disminuyó en un 40 % y la producción de radicales fue, comparativamente, pobre. Otra característica particular del complejo Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-PYR) es que los átomos de los ligandos involucrados en la esfera de coordinación fueron independientes de la cantidad de Cu(II) captado [5]. Las moléculas de PYR covalentemente unidas a la red polimérica son donores débiles de electrones; el grupo NH⁺ piridínico presentó un pK_a menor a 3.7 debido a su proximidad con el N unido a EGDE [3]. Coincidentemente, en ambos polianfolitos con PYR y con TRZ, la producción de radicales libres catalizada por sus complejos con Cu(II) presentó un mínimo a los 30 - 40 minutos de reacción.

También se estudió la actividad catalítica del complejo soluble en agua Cu(II)-*Poly*(AA). En ausencia de H₂O₂ produjo un radical centrado en C y un radical nítróxido. En este caso pudo observarse la influencia del O₂ disuelto en la (in)estabilidad de la estructura, y la amplitud a 3481 G fue de 29.3 x 10⁶ U.A. Cuando se adicionó H₂O₂, los radicales libres identificados fueron OH[•] y alrededor de 45.4 ± 9.6 % de radicales centrados en C (Tabla 19). La respuesta a 3500 G resultó aún mayor que la señal producida por los complejos basados en monómeros MAA (Figura 42).

A continuación se presentan los resultados de los experimentos de activación de H₂O₂ con complejos con Cu(II) y ligandos monoméricos, a modo de control (Tabla 19).

Cuando se los comparó con sistemas poliméricos insolubles, estos complejos basados en ligandos monoméricos presentaron como principal desventaja su inestabilidad química en el medio de reacción, evidenciada por la producción, principalmente, de radicales libres centrados en C. La consecuencia de esto es el incremento del impacto ambiental junto con la dificultad de su recuperación y reciclado. Sin embargo, la eficiencia de activación de estos sistemas homogéneos fue relativamente alta, y fue resultado de la mayor densidad de sitios catalíticos.

La producción del aducto DMPO/OH a partir de H₂O₂ en contacto con Cu(II)-2MI alcanzó un estado estacionario. En ausencia de H₂O₂, se registró una señal correspondiente a un aducto DMPO/C, y la respuesta fue de 3.93 x 10⁶ U.A. a 3500 G, originada por la activación de O₂.

En cambio, la producción de OH[•] por H₂O₂ en contacto con Cu(II)-TRZ presentó un decrecimiento con un mínimo a los 30 minutos (2.30 x 10⁶ U.A.), seguida de un incremento. La respuesta en ausencia de H₂O₂ se correspondió con dos especies diferentes de radicales centrados en C.

Los complejos de Cu(II)-PYR en contacto con H₂O₂ produjeron OH[•] y una especie de radical centrada en C. La relación molar de C[•] fue estable en 0.0872 ± 0.0061 hasta 40 minutos de reacción, para disminuir a 0.031 a los 60 minutos.

El complejo Cu(II)-MAA, fue evaluado en agua y etanol. Este catalizador evaluado en agua y en ausencia de H₂O₂ produjo una señal de gran intensidad (40.28 x 10⁶ U.A. a 3500 G) presumiblemente originada por dos especies radicales centradas en C. El O₂ activado podría eventualmente atacar el grupo vinilo de los monómeros MAA, y la intensidad de esta respuesta puede estar asociada tanto con la reactividad del grupo vinilo como con la naturaleza del -COO⁻ como un ligando fuerte. Cuando se adicionó H₂O₂ a la solución, se detectó una producción importante de OH[•] junto con la presencia minoritaria de especies paramagnéticas no

identificadas. La señal del aducto DMPO/OH a 3500 G fue alta, aún en períodos cortos de tiempo (21.5×10^6 U.A. a los 5 minutos), y aumentó en el tiempo hasta un valor máximo en 40 minutos. En este caso, la influencia del $-\text{COO}^-$ como ligando resultó muy evidente.

Cu(II)-MAA en etanol dio lugar a OH^\bullet como producto principal durante los primeros 5 minutos posteriores al agregado de H_2O_2 . En adelante, fue detectada una mezcla de especies paramagnéticas no identificadas en la cual no pudo ser distinguido el OH^\bullet del resto.

En resumen, la mayor producción de OH^\bullet fue catalizada por Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), y $-\text{NH}_2$ resultó el ligando donador de electrones más fuerte. La cantidad de Cu(II) unido (y la densidad de sitios catalíticos) también afectó el nivel de producción de radicales libres. La naturaleza de los N-heterociclos determinó tanto la capacidad de carga del material como la eficiencia de activación de H_2O_2 . El grupo $-\text{COO}^-$ resultó más activador que IM, aún en polímeros con baja densidad de sitios con Cu(II).

2.3.5. Producción de O_2

A su vez, se determinó el incremento de la presión parcial de O_2 tras la adición de H_2O_2 para los distintos materiales constituyentes del sistema heterogéneo. En la Tabla 19 se presentan los incrementos debidos a los complejos con Cu(II) y los respectivos ligandos y en la Tabla 20, los complejos con Co(II) y los respectivos ligandos.

Tabla 20: Incremento en la presión parcial de O_2 debido a la adición de H_2O_2 a los diferentes sistemas heterogéneos con Co(II). La misma información para los ligandos en ausencia de catión. Potencial rédox para los sistemas heterogéneos con Co(II) en ausencia de H_2O_2 . El desvío estándar relativo % (D.E.R.) resultó menor al 20 % excepto en los casos señalados con *.

Complejo	Incremento máximo promedio en la presión parcial de O_2 (%)		Potencial rédox (mV vs Ag/AgCl)	
	Complejo	Ligando	Complejo	Ligando
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	221	13	+262	+233
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA)	5	5*	+340	+360
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-2MI)	71*		+289	+363
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-IM)	13.5 (5 mM)** 30 (100 mM)**	3*	+320	n.d.
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-TRZ)	4	7	+348	+343
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-PYR)	3	n.d.	+285	+368
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	248	n.d.	+270	n.d.

*D.E.R. % entre 35 y 48%

** Diferentes concentraciones iniciales de H_2O_2

Los catalizadores que resultaron más eficientes para la liberación de O_2 fueron los complejos de *Poly*(EGDE-DA) con Co(II) y Cu(II), y Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI). Otros complejos con ligandos 2MI o IM también tuvieron un buen desempeño como activadores. Se puede inferir que los ligandos básicos contribuyeron a incrementar la producción de O_2 independientemente de la naturaleza del ion metálico.

A su vez, se halló un aumento no esperado en la relación entre la producción de O_2 respecto de $\text{O}_2^{\bullet-}$ para Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI), siendo particularmente baja

la señal del aducto DMPO/OOH. Se detectó la misma relación elevada de O_2 a OH^\bullet para el Cu(II)-MAA en etanol. Tanto en el primero como en el último caso, esto podría ser atribuido a una pérdida de radicales libres por reacción con la matriz, avalado por el hecho de que la matriz con DA se oscurece con el tiempo (lo que indica una sensibilidad a las especies de O_2) y el grupo vinilo del MAA tiene cierta labilidad debido a su reactividad. Evidenciando este planteo, la Figura 42 muestra el espectro de ESR para la activación de H_2O_2 en el sistema homogéneo Cu(II)-MAA en etanol, luego de 10 minutos de reacción. Durante los primeros 5 minutos de reacción, el principal aducto identificado fue DMPO/OH. El radical OH^\bullet podría atacar el doble enlace C=C del MAA, e iniciar la polimerización del ligando.

Se mencionó la inesperadamente baja producción de $O_2^{\bullet-}$ cuando Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue puesto en contacto con H_2O_2 . En este sentido, una fracción de $O_2^{\bullet-}$ podría no ser liberada de la solución, pero sí estar involucrada en la formación de especies intermediarias del tipo [(HO)O]-Co(III) sobre la superficie catalítica [48]. La influencia del $-COO^-$ fue asimismo observada en este experimento. La esfera de coordinación fue bien estudiada anteriormente en complejos con Cu(II) [5]. Para el caso de Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-PYR), donde la liberación de O_2 fue mínima, los átomos ligandos eran 3N,1O o 2N,2O. En cambio, los Cu(II)-polianfolitos con IM y TRZ, que presentaron un incremento en la producción de O_2 del 55 % y 22 %, tenían como ligandos en la esfera de coordinación 1N,3O. Además, luego del tratamiento con un gran exceso de H_2O_2 , Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) exhibió un cambio en la esfera de coordinación (3N,1O / 4N) conjuntamente con la pérdida de actividad catalítica.

Respecto de los catalizadores con Cu(II) y ligandos monoméricos, cuentan con un gran contenido de ion metálico por gramo de complejo (en relación con los complejos poliméricos), lo que permitiría explicar la alta producción de gas. Por supuesto, la labilidad de estas estructuras no permitió la recuperación ni el reciclado de los catalizadores.

Las estructuras sin un metal central en presencia de H_2O_2 también produjeron una pequeña pero distinguible liberación de O_2 , en paralelo con la liberación de OH^\bullet . Como fue discutido previamente, la producción de radicales catalizada por *Poly*(EGDE-DA) fue inferior a la obtenida con el complejo de coordinación con Cu(II). Por otra parte, estos materiales pueden pasivarse fácilmente en presencia de compuestos orgánicos, por lo que la actividad catalítica no resulta significativa para una aplicación medioambiental [13].

2.3.6. Mediciones potenciométricas

Se efectuaron mediciones de potencial redox (E) vs Ag/AgCl en una condición de equilibrio, a fin de elucidar si los ligandos tenían algún tipo de influencia sobre éste. Para estos experimentos se prepararon suspensiones de los materiales en agua destilada, en la proporción que se usa para las reacciones catalizadas, pero esta vez en ausencia de H_2O_2 . Los materiales usados fueron los polímeros sin complejar, o sus complejos con Co(II) o Cu(II).

Los sistemas con polímeros sin complejar en suspensión exhibieron un valor de E cercano a +360 mV, excepto para el caso de *Poly*(EGDE-DA), que resultó 130 mV más bajo.

Los valores de E para los complejos con Cu(II) estuvieron alrededor de los +360 mV (Tabla 17), cercano al valor para Cu(II) en solución (+374 mV), y la solución de H_2O_2 (+350 mV).

Es conocida la tendencia del IM de incrementar el E de la cupla Cu(II)/Cu(I) mientras que los ligandos que contienen grupos $-NH_2$ tienen tendencia a disminuirla [49]. De hecho, fue

observada una disminución del potencial de la cupla Cu(II)/Cu(I) cuando el ligando fue el grupo $-NH_2$ de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), en relación con los ligandos derivados de IM, lo que indica que probablemente existan trazas de Cu(I) en los complejos que aún no han tenido contacto con H_2O_2 .

Los valores bajos de E pueden estar asociados a la tendencia de los complejos a producir una elevada cantidad de OH^\bullet en los experimentos de activación de H_2O_2 [50]. De hecho, el menor E correspondió al sistema Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), el cual estuvo asociado a una alta producción de OH^\bullet y una alta liberación de O_2 en la activación de H_2O_2 (Tabla 17). Una explicación paralela puede encontrarse en la gran densidad de sitios catalíticos en Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) en comparación con otros complejos, lo que contribuye a la eficiencia, junto con la baja actividad redox del sistema. Por otra parte, los E aquí comparados no resultaron suficientemente diferentes como para afectar la producción de OH^\bullet . Por esa razón, la densidad de sitios catalíticos constituyó un factor determinante de la eficiencia.

Luego se realizó la adición de H_2O_2 a los sistemas Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) y Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-PYR), y una vez alcanzado el equilibrio, el valor E aumentó hasta +400 mV. En el caso de la adición de H_2O_2 a Cu(II)- H_2O en solución, el E se desplazó desde +374 mV hasta +350 mV. En este experimento, el valor de E fue determinado por la cupla redox O_2/H_2O_2 , considerando tanto la identidad como la cantidad de los compuestos intervinientes.

Por otra parte, para los catalizadores con Co(II) se encontraron dos grupos con potenciales distintos: uno con un E cercano a +270 mV; y otro relacionado con polímeros que contienen 2MI, DA o PYR, alrededor de +330 mV (Tabla 20). Y desde otro punto de vista, podría decirse que los complejos Co(II)-*Poly*(EGDE-2MI) y Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-PYR) dieron lugar a un E entre 60 – 70 mV inferior al que generaron sus ligandos sin catión. En este caso, los estudios preliminares de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) indicaron que la cupla redox en estos catalizadores está constituida por los estados Co(III) / Co(II). Podríamos inferir que la naturaleza de los ligandos como donores de electrones, definió la proporción Co(III) / Co(II).

2.3.7. Estados de oxidación de los iones metálicos en los complejos

Los polímeros complejados con Cu(II) diseñados por nuestro grupo habían sido utilizados como catalizadores heterogéneos para la activación de H_2O_2 y la degradación de Naranja de Metilo (MO), un colorante azo [12].

Las propiedades catalíticas de Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) habían sido confirmadas por reciclado del complejo en seis experimentos consecutivos de decoloración de MO. A su vez, se habían observado muchos cambios en el espectro de XPS de Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) luego del tratamiento con H_2O_2 , y complementando con el espectro Auger, se determinó la presencia predominante de Cu(I) [43].

Otra evidencia de la formación de Cu(I) fue hallada en la mediciones de ESR de Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) 67 mg g^{-1} luego del tratamiento con H_2O_2 [5]: los centros paramagnéticos de Cu(II) fueron reducidos principalmente a centros diamagnéticos de Cu(I), sólo permaneció un 5 % de centros Cu(II). Los átomos de ligandos en la esfera de coordinación del Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) 67 mg g^{-1} fueron 1N,3O, y cambiaron a 3N,1O/4N luego del tratamiento con H_2O_2 . Además, los parámetros de ESR luego del tratamiento con H_2O_2 fueron similares a los obtenidos con Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) 8 mg g^{-1} , donde el principal ligando fue IM.

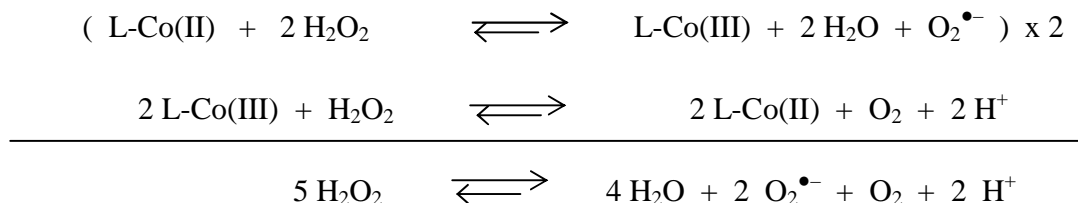
En cuanto al ion cobalto, como se mencionara previamente, existen estudios preliminares de XPS que indicaron la presencia de Co(II) y Co(III).

2.3.8. Posibles mecanismos de activación de H₂O₂

2.3.8.1. Sistemas con Co(II):

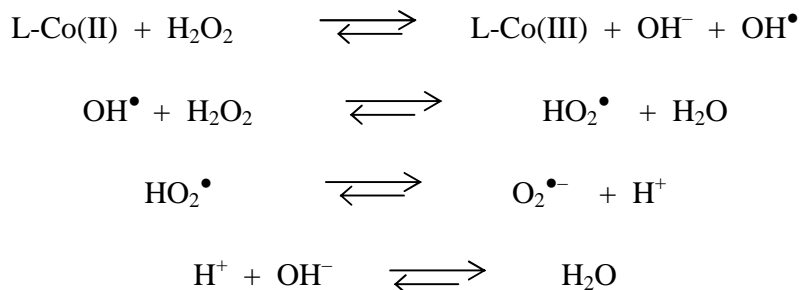
Existen dos mecanismos probables de activación de H₂O₂ catalizada por Co(II) inmovilizado descritos en la literatura que resultaron consistentes con los resultados expuestos.

El mecanismo más probable de activación implica la producción de O₂, O₂^{•-} y H⁺ de acuerdo con [45]:



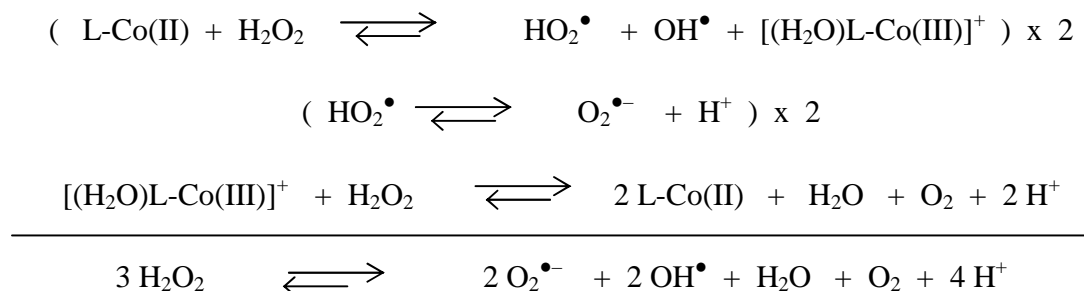
donde L-Co(II) representa Co(II)-polímero.

Los espectros ESR evidenciaron la señal del aducto DMPO/OH proveniente de OH[•] como un producto minoritario de la reacción, y como el principal producto luego de la adición de SOD [12,13]. El OH[•] detectado en estos experimentos podría ser liberado por la matriz polimérica (ver Tabla 18). De hecho, cuando se añadió H₂O₂ al control con Co(II)-H₂O soluble, la señal correspondió únicamente al aducto DMPO/OOH y no se obtuvieron contribuciones de OH[•]. Otra explicación puede hallarse cuando se divide el primer paso de la reacción propuesta, de la siguiente manera:



La etapa de degradación de OH[•] debería ser la más lenta (aún en presencia de la enzima SOD), para explicar también la observación de la señal de DMPO/OH.

Otro mecanismo probable de activación, compatible con la producción de O₂ y radicales libres sería el siguiente [51]:



Este segundo mecanismo posible predice una fracción molar igual a 0.5 para cada especie radicalaria (HO_2^\bullet y OH^\bullet), que en principio no es consistente con la evidencia experimental de la preponderancia de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en todos los casos observados (Tabla 16).

Una tercera alternativa debería ser considerada. B. Agboola y colaboradores presentaron evidencia espectroscópica de la formación de especies intermediarias de cobalto con actividad catalítica ($[\text{L-Co(III)(OOH)}]$), cuando los catalizadores homogéneos con Co(II) fueron oxidados por H_2O_2 [48,51].

Los experimentos preliminares de XPS realizados por nuestro grupo de trabajo presentaron indicios de la formación de Co(III) (resultados no mostrados) en coincidencia con los mecanismos propuestos y también con estas especies intermediarias hipotéticas $[\text{L-Co(III)(OOH)}]$.

Aquí debe considerarse que las superficies de estos catalizadores son heterogéneas en términos de composición química. Las diferentes combinaciones probables de los ligandos en la esfera de coordinación de Co(II) en estos catalizadores heterogéneos explicaría cierta heterogeneidad en los E de los sitios activos (Tabla 20) y por lo tanto la probable coexistencia de los mecanismos propuestos.

En los sistemas heterogéneos presentados en este trabajo de Tesis, tanto el posible intermediario $[\text{L-Co(III)(OOH)}]$ como los radicales libres, podrían eventualmente, reaccionar con sustratos orgánicos. En ese contexto se exploró la posible formación de especies intermediarias sobre las partículas de los compuestos de coordinación. Para $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ no se encontró evidencia experimental de formación de intermediarios de cobalto con actividad catalítica sobre las partículas en contacto con H_2O_2 , tal como se verá posteriormente en el Capítulo 4. En cambio, para $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ se encontraron ciertos indicios de la formación de especies intermedias oxidadas sobre las partículas por reacción con H_2O_2 . Concretamente, cuando se empleó este material en la oxidación de Naranja de Metilo (MO), ésta no pudo ser justificada solamente por la acción de las especies en solución $\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^\bullet (ver el Capítulo 4).

2.3.8.2. Sistemas con Cu(II):

Los sistemas con Cu(II) en presencia de H_2O_2 produjeron burbujas de gas y OH^\bullet . El pH no varió significativamente al tiempo que la presión parcial de O_2 se incrementó junto con la concentración de radicales libres.

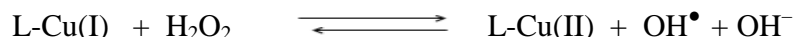
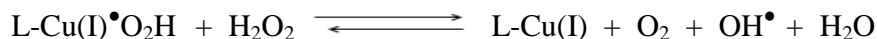
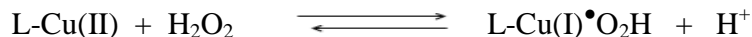
Estos resultados encontraron un paralelismo con los experimentos en fase homogénea de Ozawa y Hanaki [52]. Estos autores indicaron que, cuando fueron mezcladas soluciones acuosas del complejo de etilendiamina (Cu(II)(en)_2) con H_2O_2 , no se observó el espectro de ESR típico de complejos con cobre, y el espectro visible de Cu(II)(en)_2 (λ_{max} 555 nm) desapareció por completo, hecho que indicó que el ion de Cu(II) paramagnético fue reducido a ion Cu(I), diamagnético. De este modo, cuando incluyeron DMPO en el sistema $\text{Cu(II)(en)}_2/\text{H}_2\text{O}_2$, obtuvieron por ESR un espectro típico del aducto DMPO/OH.

En este sentido, Pecci y cols.[53] determinaron que el H_2O_2 y el Cu(II) interactúan produciendo la liberación de O_2 por medio de dos procesos distintos, relacionados con el estado de coordinación del Cu(II).

Sobre la base de los estudios de activación de H₂O₂ para los complejos con Cu(II) recién mencionados, se plantea una posible reacción [42,43]:



Y dos mecanismos que justifican esta estequiometría. Un mecanismo de *esfera interna*, el cual queda definido de esta manera:

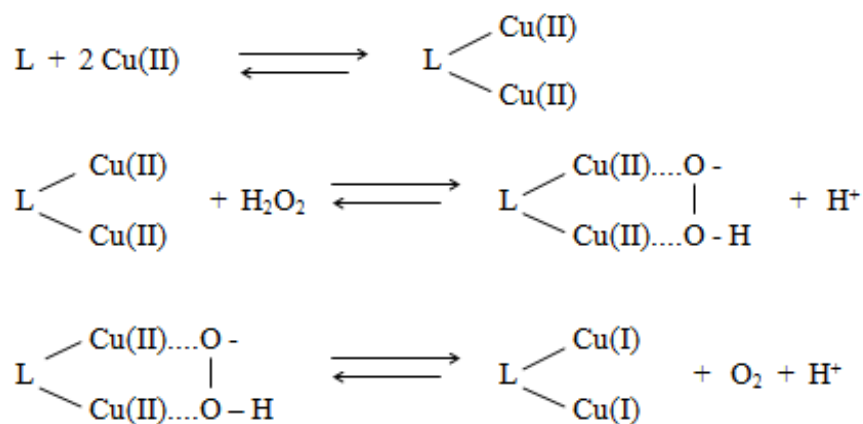


Pecci y colaboradores [53] por un lado, describieron un complejo transiente de Cu(I)([•]O₂H) en equilibrio con el complejo Cu(II)(O₂H)⁻ a través del intercambio reversible de un electrón. Frente a la adición de neocuproina (NC) a la solución, el equilibrio fue desplazado hacia la formación del quelato estable Cu(I)(NC)₂ y la generación de O₂^{•-}. En nuestros estudios de ESR con DMPO, el aducto con anión superóxido no fue detectado en el medio de reacción, para ninguno de los casos en que se emplearon complejos con Cu(II) y diferentes ligandos insolubles.

Por otra parte, hemos simulado espectros de mezclas de aductos DMPO/OH y DMPO/OOH en diferentes relaciones molares. Se observó que la relación entre DMPO/OOH y DMPO/OH debía ser mayor a 0.25 para poder ser estimada por deconvolución.

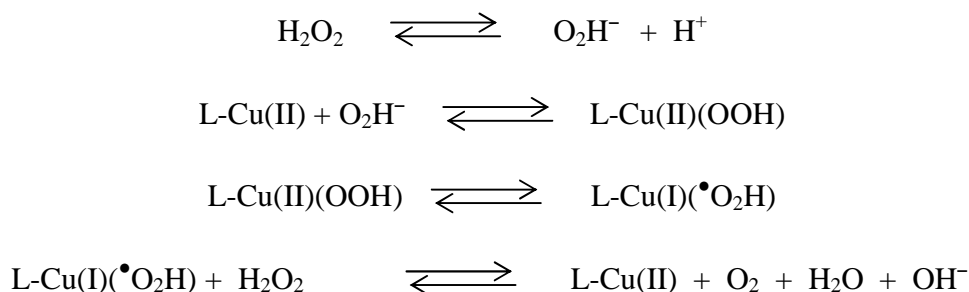
En cambio, la reacción de *esfera interna* propuesta por Masarwa y colaboradores [54] implica la reacción de L_m-Cu(I) con H₂O₂ para producir un complejo L_{m-1}-Cu(I)(O₂H)⁻ + H₃O⁺. Este complejo transiente puede descomponerse en L_m-Cu(II) + OH[•] + OH⁻, o bien puede reaccionar con un sustrato orgánico como alcoholes de cadena corta (etanol, 2-propanol, o 2-butanol). Cabe acotar que no se consideró la liberación de O₂ en este mecanismo.

Sobre la base de las investigaciones de Yamamoto y Kawanishi [55], otra explicación para la liberación de O₂ puede ser la unión del H₂O₂ con dos átomos de Cu(II), que origina un complejo hidroperoxo-dicobre y la formación de O₂ por transferencia de dos electrones, sin producción del intermediario O₂^{•-}.



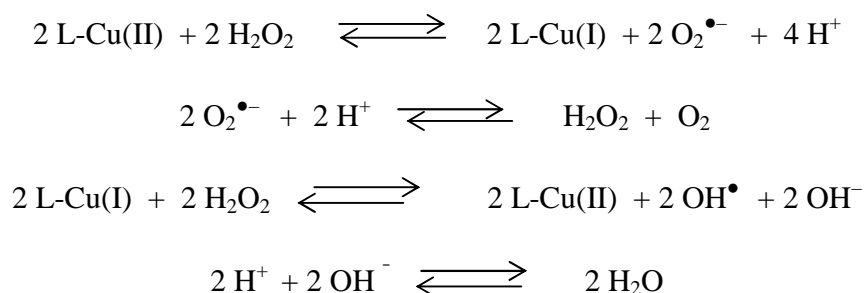
A su vez, fue reportado que los complejos con Cu(II) pueden catalizar la descomposición de H₂O₂ sólo cuando la esfera de coordinación del metal no está saturada por ligandos [56,57] lo que sugiere que los complejos ternarios L-Cu(II)-*peroxo* están involucrados en la reacción [58].

Una pequeña modificación en el mecanismo de *esfera interna* que implica la formación de un intermediario de Cu(I) sería [59,60]:



Aunque esta alternativa no parece que describa los hechos, ya que no se genera OH[•]. Los ligandos pueden inducir la liberación de OH[•] aún en ausencia de un ión metálico central (Tabla 18), pero los efectos deletéreos del OH[•] en moléculas blanco como el Naranja de metilo (MO) sólo se obtuvieron cuando los complejos con Cu(II) o Co(II) de polímeros funcionalizados catalizaron la activación de H₂O₂ [13,42] (ver Capítulo 4).

Otra alternativa es el siguiente mecanismo de reacción de *esfera externa*, consistente con la estequiometría de la reacción [61-64]:



La producción de Cu(I) y O₂^{•-} se ha considerado tanto en ausencia [65-69] como en presencia [52,70-74] de ligandos orgánicos.

Ambos mecanismos, el de *esfera externa* y el de *esfera interna* son consistentes con los resultados experimentales del presente trabajo de Tesis, en los que se prevé un valor de pH estable, junto con la liberación de O₂ y de OH[•] a través de una reacción de tipo Fenton entre Cu(I) y H₂O₂. El intermediario soluble O₂^{•-} esperado para el mecanismo de *esfera externa*, no fue detectado por nuestro método de ESR lo que constituye una fuerte evidencia que sustenta el primer tipo de mecanismo frente al segundo tipo.

Las especies intermediarias consideradas en el mecanismo de *esfera interna* no han podido ser evidenciadas por ESR en los sistemas heterogéneos aquí estudiados. Por esta razón, el H₂O₂ fue activado por Cu(II)-*Poly(AA)* soluble y el sistema homogéneo fue monitoreado por ESR. Los espectros simulados en función del tiempo representaron OH[•] (fracción molar 0.48) y dos especies de radicales centradas en C, probablemente provenientes de una degradación parcial de

Poly(AA). No se observaron cambios en los desplazamientos químicos de las señales de ESR cuando se compararon con DMPO/OH; el valor resultó igual al promedio de (3508 ± 1) Gauss para todos los sistemas con Cu(II) aquí evaluados. En otros artículos, fueron informados desplazamientos de 7 G entre los aductos DMPO/OH y los complejos L-Cu(II)-radical [74].

El sistema Cu(II)-PYR también resultó ser homogéneo después de la adición de H₂O₂. Pese a que el catalizador se disolvió y su color cambió de azul a verde, el desplazamiento químico de la señal de ESR se mantuvo en 3509 G. Los espectros simulados, obtenidos en el tiempo de reacción, ajustaron a las especies DMPO/OH (en una relación molar 0.90 ± 0.08) y a otra especie radical no identificada.

La presencia necesaria de cierta cantidad de Cu(I) para apoyar estos mecanismos fue detectada por XPS [43]. Estas mediciones fueron realizadas a muestras pretratadas con H₂O₂ luego de un período de contacto relativamente largo en el cual H₂O₂ fue consumido. En esta condición de agotamiento de H₂O₂, la etapa más lenta de este ciclo catalítico podría determinar la forma final del catalizador en la muestra analizada. Según estos mecanismos, Cu(I) requiere H₂O₂ para su conversión a Cu(II). De acuerdo con los resultados de XPS y Auger, la conversión de L-Cu(I) a L-Cu(II) debería ser el paso más lento, de modo que L-Cu(I) se acumularía frente al consumo de H₂O₂, para predominar finalmente sobre Cu(II) en el material analizado.

2.3.9. Conclusiones de la Sección 2.3

En esta sección se describieron los productos de la activación del H₂O₂ por empleo de diferentes sistemas, homogéneos y heterogéneos, y se plantearon probables mecanismos sobre la base de evidencia espectroscópica, información de la literatura especializada y experimentos previos de nuestro grupo de trabajo.

En las condiciones experimentales elegidas para los sistemas Me(II)-polímero / H₂O₂, nos encontramos en una situación de gran exceso de H₂O₂ respecto de la cantidad de sitios de catión metálico. La hipótesis es que si la activación de H₂O₂ se tratara simplemente de una reacción química rédox con el ion complejado, el catión implicado resultaría ser el reactivo limitante, por lo que debería existir un único estado de oxidación para éste en la situación de equilibrio. Por el contrario, la coexistencia de dos estados de oxidación para el ion metálico, indicaría que, efectivamente se trata de un catalizador, ya que actúa a nivel de trazas y se recicla entre dos estados de oxidación. A su vez, nos permite esbozar un mecanismo de reacción, a partir de los estados de oxidación experimentalmente determinados.

En experimentos previos, la reacción de activación de H₂O₂ catalizada por Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) siguió una cinética de tercer orden con una k de $1.26 \times 10^4 \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ s}^{-1}$ para una concentración inicial de H₂O₂ 0.1 mM. Sin embargo, para altas concentraciones de H₂O₂ inicial, se observó una pérdida del ajuste a este modelo empírico [42]. De esta misma forma, se puso en contacto Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) con H₂O₂ 42 mM, cuya concentración decayó con una constante cinética de pseudo-primer orden.

En los sistemas evaluados (que involucran Cu(II) o Co(II)), el modelo cinético de consumo de H₂O₂ dependió de la concentración inicial del peróxido. Para valores de 0.1 mM, el orden cinético coincidió con el orden de reacción. Al comparar Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) con Co(II)-*Poly*(EGDE-DA), el complejo con Cu(II) presentó un consumo de H₂O₂ más lento, pero un mayor nivel de liberación de radicales libres.

Se realizó una comparación entre diferentes sistemas catalíticos, a fin de elucidar el papel de la naturaleza de los ligandos en la activación de H_2O_2 . Se trabajó con materiales obtenidos a partir de la complejación con Cu(II) y Co(II) de distintos tipos de ligandos carboxílicos, N-heterocíclicos, y aminas, tanto monoméricos como poliméricos. De acuerdo con esto, se esperaba que, según el ligando interviniente en la complejación, hubiera diferencias en la eficiencia catalítica, ya que es diferente la densidad del catión presente en cada material y se trabajó con el mismo peso de complejo, en todos los casos. De esta manera, se analizó la influencia de estos factores por separado así como la contribución de ambos factores simultáneamente.

A partir de las simulaciones, se determinó que algunos materiales poliméricos (sin ion metálico) activaron H_2O_2 , originaron la especie OH^\bullet y una cantidad minoritaria de O_2 . Para los materiales complejados con Cu(II), también se detectaron los productos OH^\bullet y O_2 . Los estudios cinéticos de producción de OH^\bullet demostraron diferente comportamiento en cuanto a la cantidad de radical detectado, según el ligando involucrado en el complejo activador de H_2O_2 . En algunos casos se obtuvieron además radicales libres centrados en C.

Para los materiales con Co(II), la activación de H_2O_2 generó $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet y O_2 . La información que se obtuvo reveló que la proporción de las especies a través del tiempo se mantenía relativamente estable, con el predominio de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Aquí se consideró que OH^\bullet podría provenir de la actividad propia de la matriz polimérica y/o de la actividad del complejo.

De los experimentos efectuados se observó que los ligandos involucrados en cada complejo pueden afectar la reactividad del Co(II) o Cu(II) y/o la cantidad de producto liberado, por tres vías posibles [50]: por disminución del E de las cuplas Cu(II)/Cu(I) o Co(III)/Co(II) a expensas de la reacción tipo Fenton; por secuestro de los radicales OH^\bullet / $\text{O}_2^{\bullet-}$ liberados a la solución; y actuando como ligandos inactivadores de OH^\bullet / $\text{O}_2^{\bullet-}$. Este último caso hace referencia a aquellos compuestos orgánicos que forman complejos y mantienen un adecuado E , pero inactivan los radicales libres a medida que se van formando mediante la generación de metabolitos inocuos.

Por otra parte, debe considerarse la importancia de la densidad de sitios activos catalíticos en cada material, lo que constituye una variable relevante en la eficiencia catalítica observada. En el sistema Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) / H_2O_2 la producción de OH^\bullet resultó incrementada junto con la densidad de sitios Cu(II). Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA), Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-IM) y Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-TRZ) exhibieron valores de E entre +355 y +360 mV, pero el primero de estos tres complejos presentaba una densidad de sitios con Cu(II) inferior y produjo menores cantidades de OH^\bullet y O_2 .

En los sistemas evaluados, el valor de E no resultó una variable sensible para evaluar la eficiencia de los catalizadores porque el rango de E para los complejos con Cu(II) presentó una amplitud de solamente 50 mV, y para los complejos con Co(II) fue inferior a 90 mV. No obstante, el mayor valor de E fue obtenido con Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-PYR), que resultó ser el catalizador con Cu(II) menos eficiente.

Cuando se emplearon ligandos monoméricos o bien *Poly*(AA) soluble, la densidad de sitios catalíticos fue mayor. La eficiencia en la producción de OH^\bullet mejoró cuando estuvieron involucrados los grupos $-\text{COO}^-$ o PYR. En cambio, Cu(II)-2MI ejerció un efecto aparentemente inhibitorio en comparación con el Cu(II)- H_2O disuelto en agua. No se obtuvo una evidencia concreta de que el ligando 2MI se comportara como inactivante; los resultados de ESR solamente dan indicios cuantitativos de disminución de la producción de radicales libres, y los espectros

ajustaron al aducto DMPO/OH. El 2MI podría bloquear sitios disponibles sobre la esfera de coordinación de Cu(II), donde el H₂O₂ debería establecer interacción [50,75].

A partir de la inspección visual y de los espectros ESR atípicos, resultó evidente que algunos ligandos pequeños fueron más sensibles a los efectos deletéreos de los radicales libres que los polímeros. MAA y PYR resultaron particularmente lábiles a los productos (o a la elevada cantidad de ellos), se convirtieron en moléculas blanco de estas especies reactivas, y los espectros ESR obtenidos fueron la resultante de la contribución de las diferentes especies radicalarias (algunas de ellas surgieron de la acción de los radicales oxigenados sobre moléculas de ligandos). El conjunto de la evidencia experimental permitió plantear los posibles mecanismos de activación de H₂O₂ con cada catión. Con respecto a los mecanismos de activación empleando complejos con Co(II), existen diferentes modelos reportados en la literatura en los que participa la especie Co(III) (detectada en estudios preliminares de XPS), además de O₂, O₂^{•-}, OH[•] y H⁺. La formación de especies intermediarias de cobalto del tipo L-Co(III)(OOH) con actividad catalítica en las partículas no ha podido ser demostrada fehacientemente en esta Tesis, si bien se han encontrado ciertos indicios de su formación.

Para los complejos con Cu(II), los modelos planteados involucran Cu(I) (identificado por XPS), OH[•] y O₂. En la literatura se reportan dos grandes grupos de mecanismos posibles: de *esfera interna* y de *esfera externa*. Dentro del primer grupo, se planteó la formación de los intermediarios L-Cu(II)(OOH), L-Cu(I) (•OOH) o la producción de O₂ a partir de un complejo hidroperoxo-dicobre. El mecanismo propuesto de *esfera externa* involucra O₂^{•-} como especie intermediaria. Los resultados obtenidos fueron consistentes con ambos grupos, sin embargo no se encontró evidencia de las especies intermediarias, salvo la formación de Cu(I).

2.4. Referencias del Capítulo 2

1. Lázaro Martínez, J.M.; Chattah, A.K.; Monti, G.A.; Leal Denis, M.F.; Buldain, G.Y.; Campo Dall'Orto, V. *Polymer* 49 (2008) 5482.
2. Lázaro Martínez, J.M.; Leal Denis, M.F.; Campo Dall'Orto, V.; Buldain, G.Y. *Eur. Polym. J.* 44 (2008) 392.
3. Lázaro Martínez, J.M.; Chattah, A.K.; Torres Sánchez, R.M.; Buldain, G.Y.; Campo Dall'Orto, V. *Polymer* (2012) 1288.
4. Bertini, I.; Turano, P.; Vila, A.J. *Chem. Rev.* 93 (1993) 2833.
5. Lázaro Martínez, J. M.; Monti, G. A.; Chattah, A. K. *Polymer* 54 (2013) 5214.
6. Lázaro Martínez, J. M. Tesis de Doctorado: Síntesis, Caracterización y Estudios de Aplicabilidad de Nuevos Materiales Poliméricos. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Fecha de defensa: 23 de marzo de 2011.
7. Leal Denis, M. F.; Carballo, R. R.; Spiaggi, A. J.; Dabas, P. C.; Campo Dall'Orto, V.*; Lázaro Martínez, J. M.; Buldain; G. Y. *React. Funct. Polym.* 68 (2008) 169.
8. Annenkov, V.V.; Danilovtseva, E.N.; Saraev, V.V.; Mikhaleva, A.I. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 41 (2003) 2256.
9. Casolaro, M.; Bottari, S.; Cappelli, A.; Mendichi, R.; Ito, Y. *Biomacromolecules* 5 (2004) 1325.
10. Rouquerol, J.; Avnir, D.; Fairbridge, C. W.; Everett, D. H.; Haynes, J. H.; Pernicone, N.; Ramsay, J. D. F.; Sing, K. S. W.; Unger, K. K. *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 1739.
11. Canals, M.; Gonzalez-Olmos, R.; Costas, M.; Company, A. *Environ. Sci. Technol.* 47(17) (2013) 9918.
12. Lombardo Lupano, L.V.; Juan Manuel Lázaro Martínez, J.M.; Piehl, L.L.; Rubín de Celis, E.; Campo Dall'Orto, V.*. *Appl. Catal. A* 467 (2013) 342.
13. Lombardo Lupano, L.V.; Juan Manuel Lázaro Martínez, J.M.*; Piehl, L.L.; Rubín de Celis, E.; Torres Sánchez, R.M.; Campo Dall'Orto, V.*. *Langmuir* 30(10) (2014) 2903.

14. Aharoni, C.; Sparks D. L. Kinetics of soil chemical reactions-A theoretical treatment. En: Sparks, D. L.; Suarez D. L. (Eds.) Rates of Soil Chemical Processes; Soil Science Society of America, Madison, WI, (1991) 1-18.
15. Jahn H.; Teller, E. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences (1934-1990) 161 (905) (1937) 220.
16. Venkata Mohan, S., Krishna Prasad, K., Chandrasekhara Rao, N., Sarma, P.N. Chemosphere 58 (2005) 1097.
17. Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B. Bioresour. Technol. 98 (2007).2369.
18. Copello, G.J.; Díaz, L.E.; Campo Dall'Orto, V. J. Hazard. Mater. 217– 218 (2012) 374.
19. Khaled, A., El Nemr, A., El-Sikaily, A., Abdelwahab, O. J. Hazard. Mater. 165 (2009) 100.
20. Lin, Y.-F., Chen, H.-W., Chien, P.-S., Chiou, C.-S., Liu, C.-C. J. Hazard. Mater. 185 (2011) 1124.
21. Tehrani-Bagha, A.R., Nikkar, H., Mahmoodi, N.M., Markazi, M., Menger, F.M.. Desalination 266 (2011) 274.
22. Wawrzekiewicz, M. Chem. Eng. J. 173 (2011) 773.
23. Cestari, A.R., Vieira, E.F.S., Vieira, G.S., Almeida, L.E. J. Colloid Interf. Sci. 309 (2007) 402.
24. Sevim, A.M., Hojiyev, R., Gül, A., Çelik, M.S. Dyes Pigments 88 (2011) 25.
25. Denaday, L.R.; Miranda, M.V.; Torres Sánchez, R.M.; Lázaro Martínez, J.M.; Lombardo Lupano, L.V.; Campo Dall'Orto, V. Biochem. Eng. J. 58-59 (2011) 57.
26. Matsumoto, H.; Koyama, Y.; Tanioka, A.J. Colloid Interf. Sci. 264 (2003) 82.
27. Hattori, T.; Hallberg, R.; Dubin, P.L. Langmuir 16 (2000) 9738.
28. Seyrek, E.; Dubin, P.; Tribet, C.; Gamble, E. Biomacromolecules 4 (2003) 273.
29. Bowman, W.A; Rubinstein, M.; Tan, J.S. Macromolecules 30 (1997) 3262.
30. M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer, J. Lyklema, W. Norde, J.M.H.M. Scheutjens, Adv. Colloid Interface Sci. 34 (1991) 477.
31. Dobrynin, A.V.; Colby, R.H.; Rubinstein, M. J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys. 42 (2004) 3513.
32. Cornish-Bowden, A.; Jamin, M.; Saks, V. Cinétique Enzymatique, en: J. Bornarel (Ed.), Collection Grenoble Sciences, EDP Sciences, Grenoble, 2005.
33. Martins, A.S.; Peixoto, D.N.; Paiva, L.M.C.; Panek, A.D.; Paiva, C.L.A. Enzyme Microb. Technol. 38 (2006) 486.
34. Kotwal, S.M.; Shankar, V. Biotechnol. Adv. 27 (2009) 311.
35. Franzoi, A.C.; Peralta, R.A.; Neves, A.; Cruz Vieira, I. Talanta 78 (2009) 221.
36. de Oliveira, I.R.W.Z.; Neves, A.; Cruz Vieira, I. Sensor Actuat. B-Chem. 129 (2008) 424.
37. N. Caza, J.K. Bewtra, N. Biswas, K.E. Taylor, Water Res. 33 (1999) 3012.
38. Kamal, J.K.A.; Behere, D.V. J. Inorg. Biochem. 94 (2003) 236.
39. Goldstein, L. Kinetic behavior of immobilized enzyme systems, en: Colowick, S.P.; Kaplan, N.O. (Eds.-in-Chief), Methods in Enzymology, Mosbach, K. (Ed.), vol. 44: Immobilized Enzymes, Academic Press Inc., New York, (1976) 397–450.
40. Engasser, J-M.; Horvath, C. en: Wingard, L.B.; Katchalski Kazir, E.; Goldstein, L. (Eds.), Applied Biochemistry and Bioengineering, vol. 1, Academic Press Inc., New York (1976) 127–220.
41. Girelli, A.M.; Mattei, E.; Messina, A. Sensor Actuat. B-Chem. 121 (2007) 515.
42. Lázaro Martínez, J.M.; Leal Denis, M.F.; Piehl, L.L.; Rubín de Celis, E.; Buldain, G.Y.; Campo Dall'Orto, V. Appl. Catal. B, 82 (2008) 273.
43. Lázaro Martínez, J.M.; Rodríguez-Castellón, E.; Torres Sánchez, R.M.; Denaday, L.R.; Buldain, G.Y.; Campo Dall'Orto, V. J. Mol. Catal A: Chem. 339 (2011) 43.
44. Zamora, P.L.; Villamena, F.A. J. Phys. Chem. A 116 (2012) 7210.
45. Liang, S-X; Zhao, L-X.; Zhang, B-T.; Lin, J-M. J. Phys. Chem. A 112 (2008) 618.
46. Buettner, G.R. Free Radical Bio. Med. 3 (1987) 259.
47. Liu, D.; Zhang, X.P.; Sun, Z.C.; You, T.Y. Nanoscale, 5 (2013) 9528.
48. Agboola, B.; Ozoemena, K. I.; Nyokong, T. J. Mol. Catal A: Chem. 227 (2005) 209.
49. Hay R.W. Bio-Inorganic Chemistry, Ellis Horwood. Ltd, Chichester, UK. (1987).
50. Gaubert, S.; Bouchut, M.; Brumas, V.; Berthon, G. Free Radic. Res. 32 (2000) 451.
51. Shen, C.; Song, S.; Zang, L.; Kang, X.; Wen, Y.; Liu, W.; Fu, L. J. Hazard. Mater. 177 (2010) 560.
52. Ozawa, T.; Hanaki, A. J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1991) 330.
53. Pecci, L.; Montefoschi, G.; Cavallini, D. Biochem. Biophys. Res. Commun. 235 (1997) 264.

54. Masarwa, M.; Cohen, H.; Meyerstein, D.; Hickman, D. L.; Bakac, A.; Espenson, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4293.
55. Yamamoto, K.; Kawanishi, S. *J. Biol. Chem.* 264(26) (1989) 15435.
56. Robbins, M.H.; Drago, R.S. *J. Catal.* 170 (1997) 295.
57. Sigel, H.; Flierl, C.; Griesser, R. *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 1061.
58. Ninh Pham, A.; Xing, G.; Miller, C.J; Waite, T.D. *J. Catal.* 301 (2013) 54.
59. Otto, M.; Lerchner, J.; Pap, T.; Zwanziger, H.; Hoyer, E.; Inczedy, J.; Werner, G. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 43 (1981) 1101.
60. Skounas, S.; Methenitis, C.; Pneumatikakis, G.; Morcellet, M. *Bioinorg. Chem.Appl.* (2010) 1.
61. Haber, H.; Weiss, J. *Proc. R. Soc. Lond. A* 147 (1934) 332.
62. Burkitt, M.J. *Prog. React. Kinet. Mech.* 28 (2003) 75.
63. Burkitt, M.J. *Free Radic. Res. Commun.* 18 (1993) 43.
64. Carvalho do Lago, L.; Matias, A.C.; Nomura, C.S; Cerchiaro, G. *J. Inorg. Biochem* 105 (2011) 189.
65. Perez-Benito, J.F.. *Monatsh. Chem.* 132 (2001) 1477.
66. Luo, Y.; Kustin, K.; Epstein, I.R. *Inorg. Chem.* 27 (1988) 2489.
67. Millero, F.J.; Sharma, V.K.; Karn, B. *Mar. Chem.* 36 (1991) 71.
68. Moffett, J.W.; Zika, R.G. *Environ. Sci. Technol.* 21 (1987) 804.
69. Perez-Benito, J.F. *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 430.
70. Davies, G.; Higgins, R.; Loose, D.J. *Inorg. Chem.* 15 (1976) 700.
71. Goldstein, S.; Czapski, G. *Inorg. Chem.* 24 (1985) 1087.
72. Goldstein, S.; Czapski, G. *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 2244.
73. Nerud, F.; Baldrian, P.; Gabriel, J.; Ogbeifun, D. *Chemosphere* 44 (2001) 957.
74. Shah, V.; Verma, P.; Stopka, P.; Gabriel, J.; Baldrian, P.; Nerud, F. *Appl. Catal. B Environ.* 46 (2003) 287.
75. Ueda, J-I.; Anzai, K.; Miura, Y.; Ozawa, T. *J. Inorg. Biochem.* 76 (1999) 55.

CAPÍTULO 3

OLIGÓMEROS SOLUBLES EN AGUA

En este Capítulo se presenta la síntesis de un nuevo material derivado de EGDE, MAA e IM, mediante un método novedoso que consiste en la adición secuencial de los reactivos. Cabe la comparación con los materiales insolubles que precedieron este desarrollo, cuya síntesis constaba de un solo paso mezclando todos los reactivos. La nueva estrategia utilizada resultó determinante de la solubilidad en agua del producto obtenido, así como del tamaño y funcionalidad de las moléculas. A continuación se describen todas las etapas de caracterización que permitieron elucidar una estructura probable y las propiedades del nuevo material, que fue denominado *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA). El conocimiento de estas propiedades permitió planificar racionalmente las potenciales aplicaciones del producto, que se describen en el Capítulo 4.

3.1. Síntesis de material derivado de EGDE, IM y MAA, soluble en agua

La síntesis del material soluble, fue realizada en tres etapas a temperatura constante de 60° C. Esta es la diferencia fundamental con la estrategia de síntesis de materiales insolubles e hidrogeles [1].

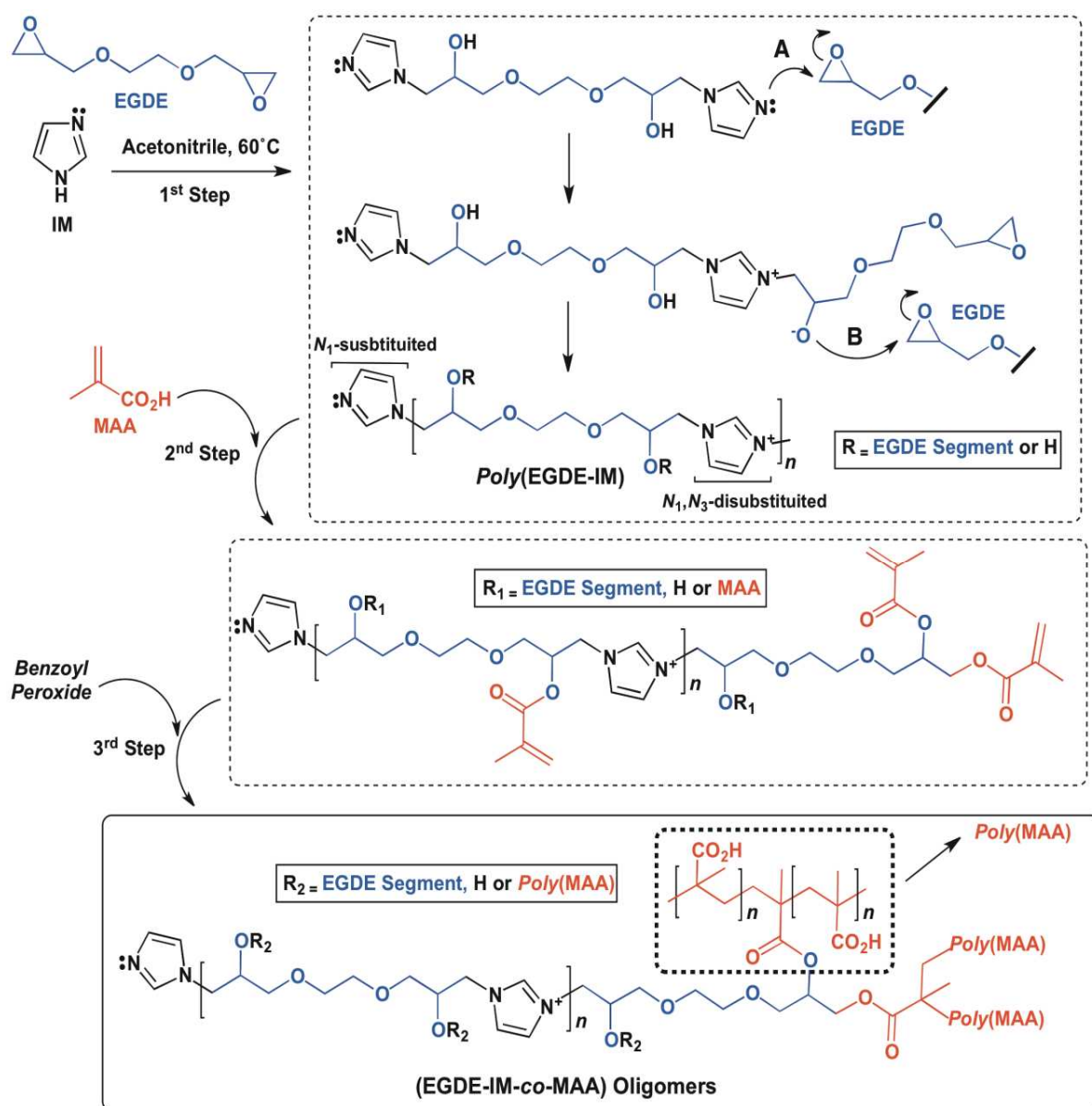
En una primera etapa, se hizo reaccionar EGDE con IM durante 24 horas. De este proceso, resultó el hidrogel *Poly*(EGDE-IM), producto de la apertura de los grupos epóxido de EGDE, debido al carácter nucleofílico de IM [1,2].

En una segunda etapa, se adicionó MAA y se dejó reaccionar durante 12 horas. La reacción que procedió fue la esterificación del ácido con los grupos -OH del hidrogel *Poly*(EGDE-IM) y la apertura de los anillos oxirano remanentes con esterificación del ácido, según la evidencia espectroscópica que se presentará en este Capítulo.

La última etapa, consistió en la adición de peróxido de benzoilo [1]. Este reactivo produjo la polimerización radicalaria del doble enlace vinílico del MAA. En este paso, las variables significativas fueron: temperatura, convección y cantidad de peróxido. Como es bien sabido, la polimerización no procede si la temperatura es menor de 60° C. El inicio de la reacción de polimerización radicalaria se evidenció por la aparición de una turbidez. Para ello, resultó fundamental que el peróxido fuera agregado en cantidades adecuadas y que hubiera una elevada concentración local, para que se generaran núcleos de polimerización; es por esto que se eliminó la agitación luego del agregado del peróxido. La reacción procedió hasta que todo el material producido se separó de la solución, transcurrida una hora desde el agregado.

Finalmente, se recuperó el sólido al que se adicionó la mínima cantidad de agua necesaria para que se produjera, con agitación, la solubilización completa. La concentración final alcanzada fue de 300 mg mL⁻¹ y el rendimiento de la reacción fue del 43 %. El Esquema 1 presenta las etapas de la reacción, los productos intermedios y finales probables.

Esquema 1. Etapas de síntesis y estructura probable de *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA)



3.1.1. Monitoreo de la síntesis por espectroscopía FT-IR

Primera etapa

Las asignaciones de las bandas observadas en los espectros de la Figura 1 se encuentran en la Tabla 1. Se siguió el progreso de la reacción por ATR/FT-IR. Los cambios más notables, se produjeron en las señales a 1256 cm⁻¹, correspondientes al anillo oxirano (Figura 2), cuya disminución evidenció el ataque y posterior apertura del anillo, por acción de IM. En el mismo sentido, se observó la desaparición de las bandas débiles a 703 cm⁻¹, y 980 cm⁻¹. Asimismo, las bandas características de los enlaces C=C y C=N de IM (1258, 1330, 1480 y 1530 cm⁻¹) presentaron un significativo desplazamiento, lo que evidencia los cambios estructurales de la

molécula a causa del establecimiento de una nueva red covalente, propia del polímero. La desaparición de las bandas correspondientes a IM en solución, situadas entre 2600 y 3120 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones N-H implicadas en uniones H, resultó otra evidencia de que la reacción con los grupos epóxido se produjo.

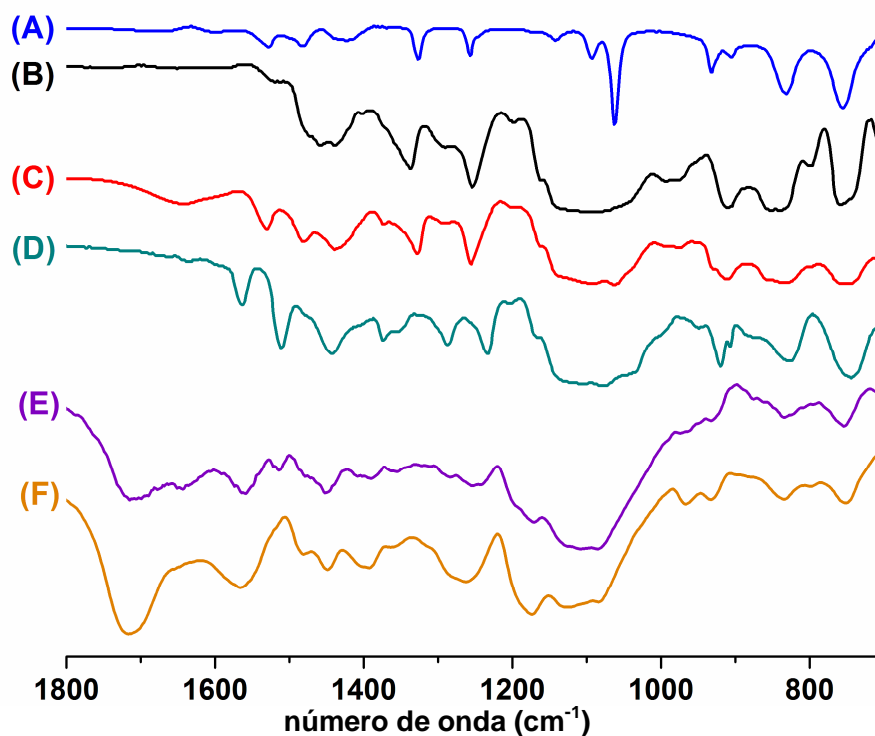


Figura 1. Espectros ATR/FT-IR de IM (A) y EGDE (B) en acetonitrilo, mezcla de reacción de EGDE e IM en acetonitrilo a tiempo 0 h (C) y a tiempo: 24 h (D) a 60° C. FT-IR de pastilla de oligómeros (EGDE-IM-co-MAA) (E) y esferas huecas (F).

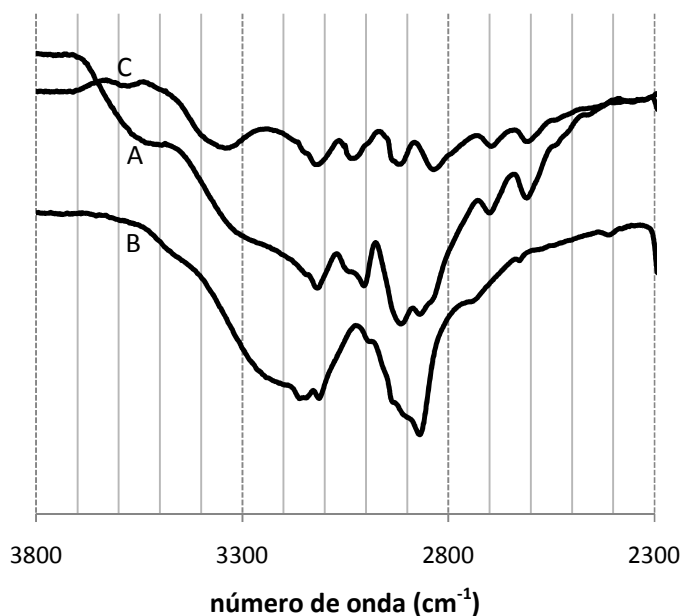


Figura 2. Espectros ATR/FT-IR de la mezcla de reacción de EGDE e IM en acetonitrilo a t: 0 (A) y a t: 24 h (B) a T: 60° C; IM en acetonitrilo (C).

Tabla 1. Asignaciones FT-IR para los espectros obtenidos por ATR de la Figura 1.

		Número de onda vibracional (cm ⁻¹)							
	ν_{CN} y δ_{CH}	δ_{CH}	$\nu_{\text{C=N}}$	$\nu_{\text{C=C}}$	N-H	C-O-C	anillo oxirano	$\nu_{\text{C=C}}$ y $\nu_{\text{C=N}}$	
A	1258	1330	1480	1530	2610-2698- 2919-3033-3119	1100	980-1256	663-832-932	
B	1234	1287	1510	1565	3114	1100	-	663-832	
C	1258	1330	1480	1530	2610-2698-2835 2919-3033-3119	-	-	663-832-932	
D	-	-	-	-	-	1100	703-980-1256	-	

A: mezcla de reacción de EGDE y IM en acetonitrilo a t: 0 h, T: 60 °C;

B: mezcla de reacción de EGDE y IM en acetonitrilo a t: 24 h, T: 60 °C;

C: IM en acetonitrilo;

D: EGDE.

Segunda etapa

Los cambios que sucedieron en los espectros de ATR/FT-IR fueron la aparición de la señal típica de carbonilo, a 1700 cm^{-1} , como se esperaba. También apareció la señal ancha a 3500 cm^{-1} , correspondiente al grupo -COO^- , dado que la adición de MAA se produjo en un medio básico. Y se observó un aumento relativo en la intensidad de la banda a 1565 cm^{-1} (Figura 3). Esta banda, observada en los espectros del polielectrolito *Poly*(EGDE-IM), se atribuye a los estiramientos vibracionales de los dobles enlaces $\text{C}=\text{C}$ de los residuos IM polimerizados. Sin embargo, también se adjudica a los estiramientos asimétricos del grupo -COO^- , en los polianfolitos [3].

La composición elemental presentada en la Tabla 2 indicó una cantidad promedio de 6.0 mmol N g^{-1} y $3.0\text{ mmol IM g}^{-1}$ en el producto final (producto a granel o producto crudo de reacción). Además, los porcentajes de otros elementos fueron consistentes con una estequiometría de $3\text{ mmol de MAA g}^{-1}$, $2.5\text{ mmol de EGDE g}^{-1}$ y $5\text{ mmol de H}_2\text{O g}^{-1}$. Si bien por este método se hallaron cantidades equimolares de MAA e IM en el producto a granel, este material está constituido por una mezcla de oligómeros con bloques de diferentes tamaños (como se verá luego) y por eso fue denominado “*oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)*”.

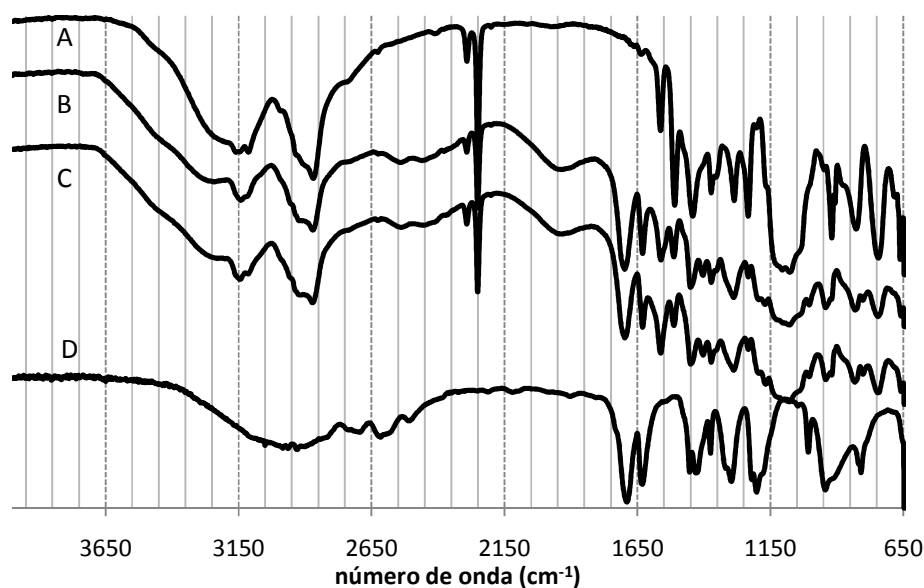


Figura 3. Espectros ATR/FT-IR de la mezcla de reacción a 60° C de EGDE e IM en acetonitrilo a t : 24 h (A); con MAA a t : 0 h desde la adición de MAA (B) y con MAA a t : 24 h desde la adición de MAA (C); MAA (D).

En este sentido se puede mencionar que la mezcla inicial de monómeros contenía una mayor proporción de IM y que, por otra parte, la composición de los diferentes lotes de síntesis del producto a granel y de su forma ácida resultó reproducible.

El Esquema 1 resume las estructuras más probables obtenidas en cada paso de síntesis y muestra los principales grupos funcionales integrados a la red.

Por otra parte, el espectro FT-IR del material oligomérico soluble se comparó con el espectro del material insoluble obtenido a partir de los mismos monómeros en la estrategia de un único paso

(Figura 4). Los perfiles obtenidos en ambos casos fueron similares. Esto indicaría que los grupos funcionales unidos a la red serían los mismos, independientemente de la solubilidad (como se verá a continuación, ésta resultó dependiente de la estrategia sintética).

Tabla 2. Análisis elemental para el producto a granel de dos lotes de síntesis de los *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA), sus formas ácidas, y la composición más probable derivada de estos datos experimentales.

	% C	% H	% N	mmol MAA g ⁻¹	mmol IM g ⁻¹	mmol EGDE g ⁻¹	mmol H ₂ O g ⁻¹
mezcla inicial				3.3	4.1	2.5	
Lote I	50.28	7.56	8.49	3.0	3.0	2.5	5
Lote I forma ácida	51.43	7.71	5.31	4.3	1.9	2.5	4
Lote II	49.64	7.49	8.2	3.2	2.93	2.5	4.5
Lote II forma ácida	50.08	7.56	5.08	4	1.81	2.5	5

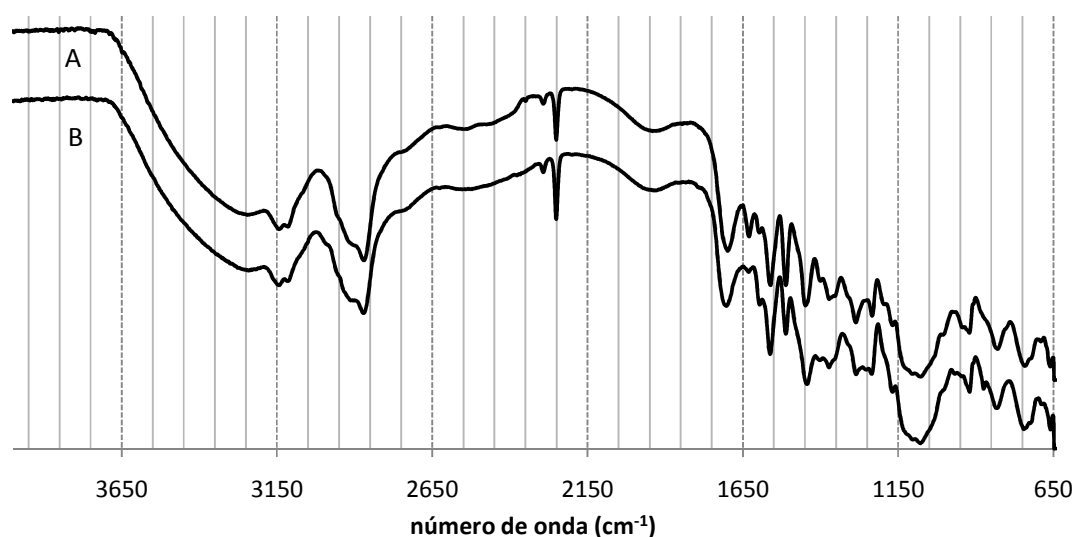


Figura 4. Espectros obtenidos por ATR/FT-IR de *Poly*(EGDE-MAA-IM) insoluble (A) y *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) solubles en agua (B). El análisis de cada material fue hecho antes de su contacto con agua.

3.1.2. Discusión de la evidencia obtenida

La hipótesis que se plantea respecto de la dependencia de la solubilidad con la estrategia de síntesis puede resumirse de la siguiente manera: en una síntesis secuencial, se favorecería el establecimiento de bloques de polimerización que resulta en un material con regiones ácidas y otras regiones básicas separadas físicamente y coexistiendo en una misma molécula, permitiendo una solvatación más eficiente, lo que incrementa su solubilidad en agua.

En el primer paso de síntesis se formó el hidrogel *Poly*(EGDE-IM), previamente caracterizado en profundidad [4]. Allí se generaron unidades de imidazol N₁-monosustituidas (IM) y N₁-N₃-disustituidas (IM⁺), presentando estas últimas una carga positiva permanente. Los grupos monosustituidos pueden ser protonados con soluciones ácidas que dan lugar a residuos de IM polimerizado protonado (IMH⁺), cuyo grado de disociación depende del pH del medio.

En este punto resulta provechoso realizar una comparación entre la síntesis ya reportada de los polianfolitos insolubles en agua como *Poly*(EGDE-MAA-IM) y la síntesis de *Poly*(EGDE-IM) [1]. En el primer caso, se mezclan todos los monómeros en una única etapa inicial y se forman pares iónicos IMH^+MA^- antes de que ocurra la reacción con EGDE. En estas condiciones, la polieterificación es más rápida que la formación de aductos EGDE-IM debido a la baja concentración de IM monomérico libre (Esquema 1, etapa A) [2]. La mayor cantidad de poliéter da lugar a la formación de polímeros que resultan insolubles en la mayor parte de los solventes [1,3,5]. En cambio, cuando se sintetiza el hidrogel *Poly*(EGDE-IM), prevalece la formación de aductos EGDE-IM (Esquema 1 etapa A) sobre la polieterificación (Esquema 1 etapa B), que da lugar a un polielectrolito integral altamente solvatado en contacto con agua, con carga eléctrica positiva aún a pH 11.0 debido a los residuos IM disustituidos (IM^+) [1].

En el segundo paso de síntesis, el agregado de MAA a la mezcla de reacción constituyó una etapa crucial para la solubilidad en agua del producto final. En estos experimentos se encontró que si la incubación a 60° C antes del agregado de peróxido de benzoilo duraba menos de 12 horas, el producto final era insoluble en agua, pero si se prolongaba por más de 12 horas se obtenía un producto soluble en agua.

Luego de la adición del monómero de MAA, la reacción más rápida fue la formación de un par iónico entre MAA e IM (es decir, la reacción ácido-base con el IM libre, o bien IM monosustituido que forma parte de *Poly*(EGDE-IM)), y las reacciones más lentas fueron la apertura de grupos epóxido remanentes para formar ésteres de MAA, en paralelo con la esterificación de los grupos -OH en *Poly*(EGDE-IM) con el ácido carboxílico de MAA. Aquí, la dispersión del monómero de MAA en *Poly*(EGDE-IM) contribuyó a favorecer la solubilidad del producto final en agua luego de la polimerización de los segmentos de MAA con la adición del peróxido. De esta manera, la correcta funcionalización de la red polimérica con carga positiva mediante dominios de *Poly*(MAA) con carga negativa dependiente del pH, ocurre solamente en el caso de que cierta cantidad (pequeña) de monómeros de MAA esté químicamente unida al hidrogel (esterificados). De no ser así, el carácter insoluble de *Poly*(EGDE-IM) prevalecería aún cuando existan monómeros de MAA libres en la mezcla de reacción en el período inferior a 12 horas.

3.2. Caracterización por NMR

Con la finalidad de analizar las características estructurales del material y determinar la existencia de diferencias con los polianfolitos insolubles sintetizados con la técnica de único paso, se efectuaron estudios de NMR en sólidos y en solución.

Primero, con el objeto de purificar y analizar las diferentes fracciones de producto que surgieron del proceso sintético, el material fue precipitado desde una solución acuosa con acetonitrilo o con metanol. La fracción precipitada con acetonitrilo fue redisuelta en D_2O y estudiada también por NMR en solución (la fracción precipitada con metanol resultó insoluble). En los espectros de CP-MAS de los oligómeros solubles se observó una superposición de las señales de C del grupo carboxílico y el éster en 183.8 ppm (Figura 5), en vez de las dos señales bien resueltas a 180.0 y 185.0 ppm en *Poly*(EGDE-MAA-IM) insoluble (Figura 6). Esto indica que los entornos de esos átomos de C fueron modificados por esta nueva metodología de síntesis.

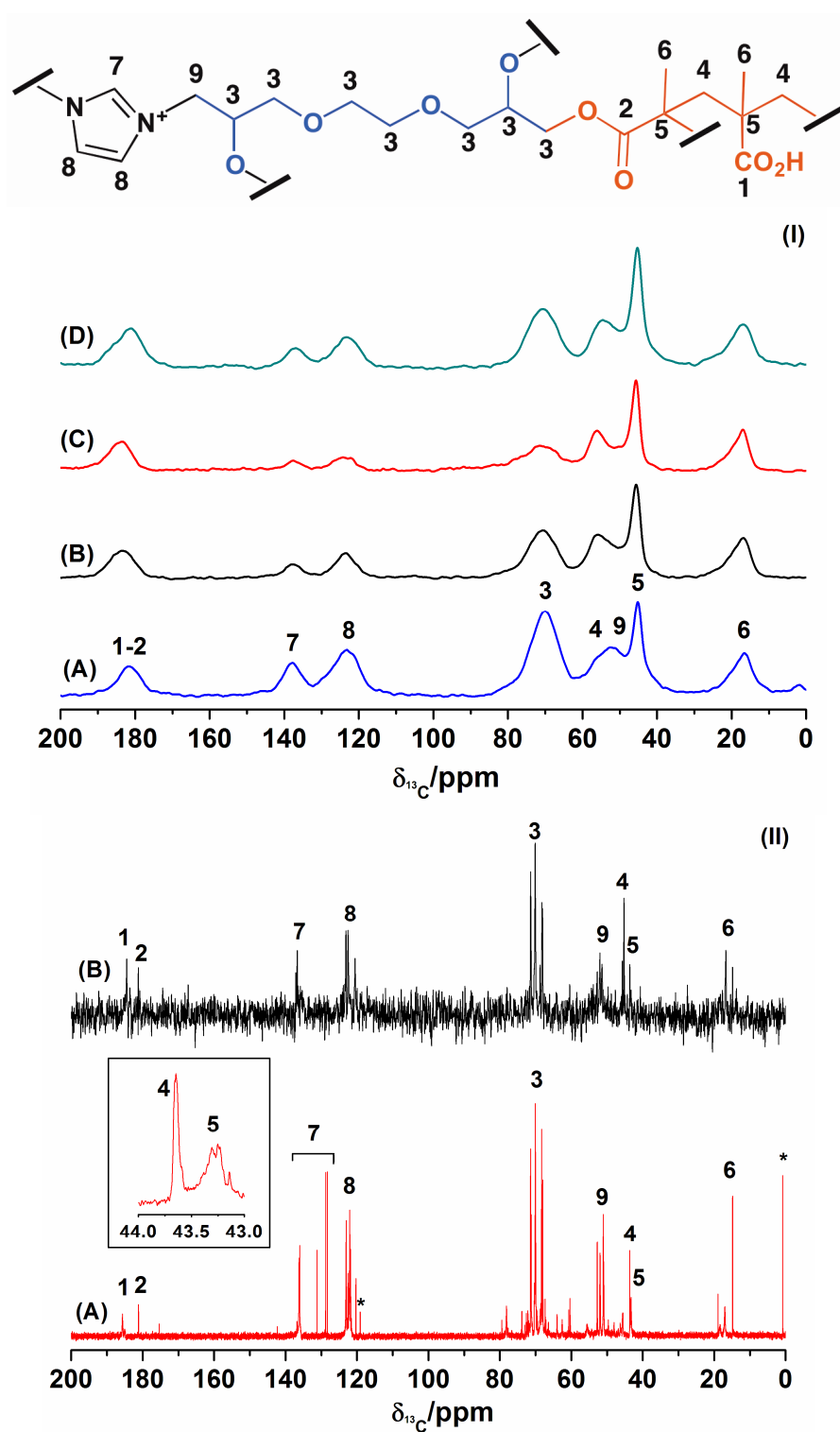


Figura 5. Espectros ^{13}C CP-MAS para el granel de *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) (A); material precipitado con acetonitrilo (B) o con metanol (C) a partir de una solución acuosa de oligómeros; material de esferas huecas (D) (I). Espectros ^{13}C -NMR para el granel de *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) en D_2O (A) y el material precipitado con acetonitrilo a partir de una solución acuosa de oligómeros y luego disuelto en D_2O (B) (II). Las señales de acetonitrilo residual fueron indicadas con asteriscos.

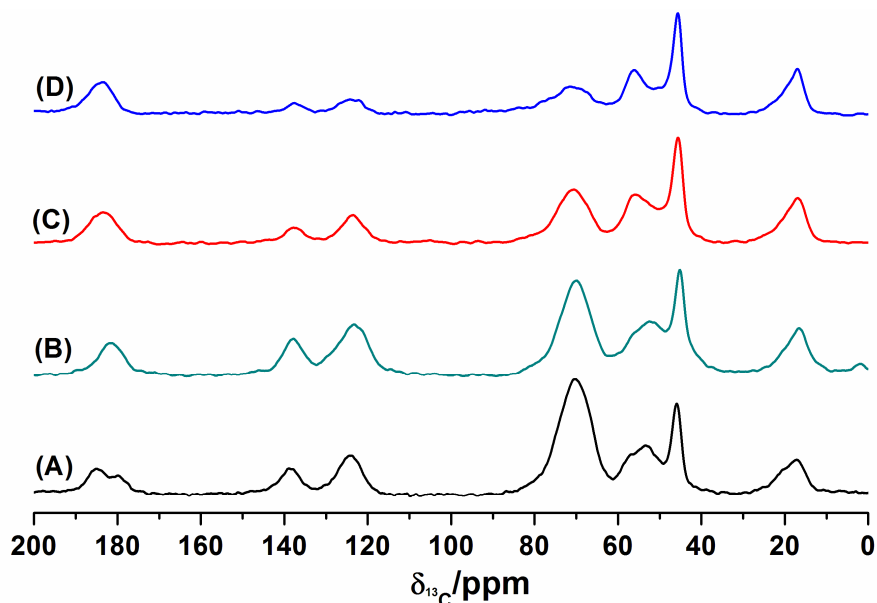


Figura 6. Espectros ^{13}C CP-MAS para *Poly(EGDE-IM-MAA)* insoluble (A), granel de *oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)* (B) y *oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)* precipitados en acetonitrilo (C) o en metanol (D) a partir de una solución acuosa.

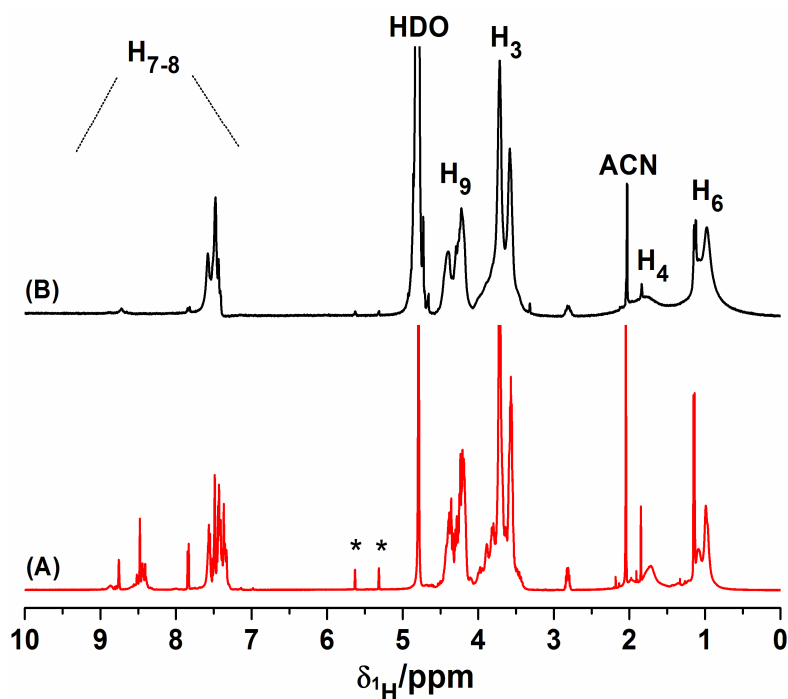


Figura 7. Espectros ^1H -NMR para el granel de *oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)* en D_2O (A) y para el material precipitado con acetonitrilo a partir de una solución acuosa y luego redissuelto en D_2O (B). Los restos de acetonitrilo se indican como ACN.

El sólido obtenido de metanol (espectro C en la Figura 5.I) presentó una disminución importante en las señales provenientes de los segmentos IM y EGDE, en tanto que las regiones de MAA polimerizado prácticamente no presentaron cambios (si se compara con el producto crudo o con

el sólido precipitado a partir de acetonitrilo) (espectros A y B en Figura 5.I). Esto explicaría la insolubilidad del sólido precipitado con metanol, atribuible a una mayor proporción de segmentos de *Poly*(MAA). Estas evidencias indican que en la síntesis del material soluble se habrían generado por lo menos dos poblaciones: una rica en MAA polimerizados, insoluble en agua luego de su precipitación con metanol (más hidrofóbica) y otra, con un menor contenido de MAA polimerizados, más hidrofílica (precipitó con acetonitrilo, menos polar que el metanol, pero se redisolvió en agua).

El producto crudo de oligómeros y la fracción precipitada con acetonitrilo fueron disueltos en D₂O y estudiados por NMR en solución. El espectro ¹³C-NMR en solución del producto crudo presentó un mayor número de señales de resonancia correspondientes a C₇₋₈ de IM y de C₉ del EGDE en la unión con IM, en comparación con el espectro del material precipitado con acetonitrilo. También se resolvieron las señales de C₁ y C₂, confirmando la presencia de ésteres de MAA, además de -COOH (Figura 5.II). Paralelamente en ¹H-NMR se observaron diferencias entre materiales en la región alrededor de (7 - 9) ppm, indicando que existen al menos dos dominios diferentes en términos de estructura química (Figura 7). Además fue posible estimar la composición monomérica IM : EGDE : MAA del producto crudo en 1.1 : 1.0 : 1.2 y del material precipitado con acetonitrilo en 1 : 1 : 2. Con estas evidencias, el contenido relativo de MAA polimerizado fue mayor en el segundo caso (pero inferior al contenido de MAA del precipitado con metanol). También se encontró que los monómeros remanentes sin polimerizar en el producto crudo (luego de eliminar el exceso de solvente de reacción) fue inferior al 0.05% (asterisco en Figura 7).

3.3. Caracterización por electroforesis capilar

El comportamiento en solución acuosa de oligómeros que presentan grupos ácidos y básicos es determinado por interacciones coulombimétricas entre especies aniónicas y catiónicas localizadas en diferentes unidades monoméricas. La electroforesis capilar zonal (CZE) permite caracterizar la densidad de carga de polímeros solubles aún si el grado de polimerización y su hidrofobicidad afectan de alguna manera su comportamiento electroforético [6,7].

Se tomaron muestras de las soluciones acuosas del material crudo denominado *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA), y se dializaron usando membranas de celulosa con un cut-off de 12 kDa para eliminar residuos de solvente y eventualmente de monómeros. Estas muestras dializadas y el material crudo sin purificar fueron analizadas por CZE con polaridad normal a valores de pH comprendidos entre 4.0 y 9.0.

Se observó la presencia de al menos tres bandas principales por delante de DMF (marcador de flujo electroosmótico: EOF), que fueron resueltas a pH 7.0. (Figura 8). La banda atribuida a las especies con mayor densidad de carga positiva corrió delante de DMF a todos los valores de pH probados.

A valores de pH comprendidos entre 4.0 y 6.0, se observó una banda ancha, a *tr* menores de *tr* de DMF, lo que indica una dificultad en la separación de las especies positivas de polianfolito de distinta relación *carga / radio*. Además, el *tr* del marcador de EOF, se vio notoriamente afectado por la muestra, y aumentó con el número de corridas. Este efecto es una fuerte evidencia de la interacción del material con carga positiva con el tubo capilar cargado negativamente, que propendió a disminuir el EOF, debido a la neutralización de cargas [6].

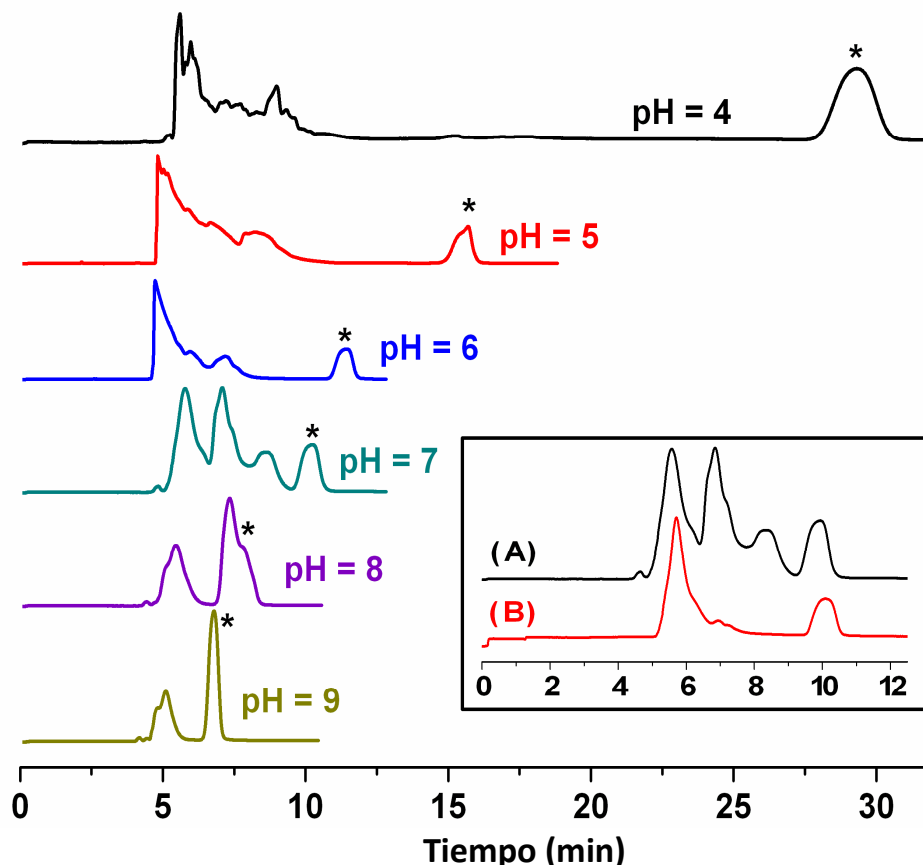


Figura 8. CZE de oligómeros (EGDE-IM-co-MAA) solubles en solución de fosfato 0.05 M a diferentes valores de pH. * pico de DMF (marcador neutro agregado). Inserto: CZE a pH 7.0 de la muestra de oligómeros no dializada (A) y dializada durante 2 días (B). La solución no dializada fue diluida 1 en 25 mL (la concentración final a pH 6.0 o superior, fue 12 mg mL^{-1}), y la solución dializada fue diluida 1 en 2 mL.

Una buena resolución de las tres bandas se consiguió a pH 7.0. Otras dos bandas se neutralizaron a un pH cercano a 8.0, y corrieron junto con el marcador neutro de EOF a pH 9.0. Si se considera que en el material crudo existen cantidades equimolares de MAA y de IM mono y disustituido (según $^1\text{H-NMR}$), una posible explicación para la carga neta positiva en una población de oligómeros aún a pH 9.0 consiste en la existencia de ciertas moléculas con grandes bloques de *Poly*(EGDE-IM) unidos covalentemente a bloques más pequeños de *Poly*(MAA), con preponderancia de sitios positivos permanentes (IM^+).

Cuando la muestra se corrió en modo reverso a pH 9.0, no se detectó ningún pico a 214 nm durante los 30 minutos de observación. Además se analizó un estándar de 35 mg mL^{-1} de poliacrilato de sodio (*Poly*(A^-)) en polaridad normal, y se obtuvo una banda muy pequeña con un *tr* superior al del DMF. El bajo coeficiente de extinción de *Poly*(A^-) (y eventualmente del polimetacrilato, *Poly*(MA^-)) explicaría la ausencia de bandas con carga neta negativa a pH alcalino en los electroferogramas de la muestra, esperables para fracciones oligoméricas con un importante exceso de bloques de *Poly*(MAA) en su estructura.

Cuando se corrió la muestra sin dializar junto a un patrón del monómero IM, se observó un pequeño pico a 3.5 minutos, correspondiente a este último compuesto, pero en una proporción insignificante respecto del producto de síntesis. Esto indica que el exceso de IM libre permaneció en el solvente de reacción y fue descartado con él.

En general, las bandas obtenidas fueron anchas y presentaron “tailing”, hecho que denota interacción del producto con la pared del capilar y/o heterogeneidad en la composición química. Para confirmar si los resultados se debían a la obtención de una mezcla de compuestos de distintos pesos moleculares, se realizó la diálisis de muestras empleando membrana de diálisis de 12 kDa de cut-off y se hicieron corridas de alícuotas extraídas a distintos tiempos. Se observaron perfiles similares cuando una muestra no dializada fue comparada con una dializada y con la solución externa a la membrana de diálisis luego de 24 horas de purificación. Estos resultados evidenciaron que el peso promedio de las moléculas sintetizadas estaba por debajo de los 12 kDa, y permitieron confirmar que el producto crudo estaba constituido por una mezcla de oligómeros. La banda más positiva continuó observándose en la solución dializada aún luego de dos días de comenzado el proceso de diálisis, con cambios frecuentes del agua destilada externa, en tanto que las restantes se diluyeron (Figura 8 inserto y Figura 9).

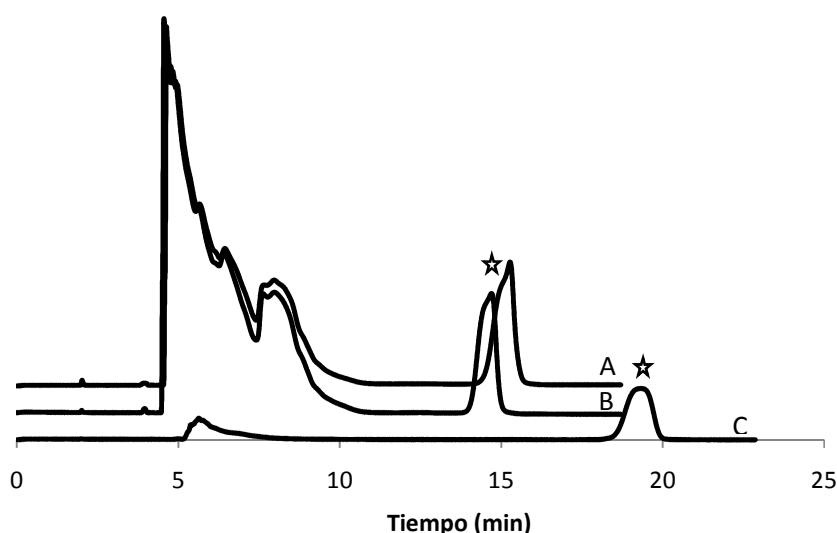


Figura 9. CZE de oligómeros (EGDE-IM-co-MAA) solubles, en solución de fosfato 0.05 M a pH 5.0.

* pico de DMF (marcador neutro agregado). Oligómeros no dializados (A), medio externo de la diálisis de oligómeros luego de 24 h (B), oligómeros dializados durante 2 días, con cambio de la solución externa (C).

Al comparar la intensidad relativa de las bandas principales de CZE en las muestras dializadas y sin dializar se observaron diferencias cuantitativas entre ellas. La señal correspondiente a las fracciones poliméricas con mayor densidad de carga positiva, se mantuvo intensa; mientras que las otras bandas, menos positivas, disminuyeron en intensidad. De acuerdo con los resultados, se concluye que las especies de menor solubilidad, que cristalizaron luego de largos períodos de diálisis, fueron las que presentaron menor densidad de carga eléctrica. Una razón probable de esta modificación en la solubilidad puede estar relacionada con la capacidad de estas macromoléculas

de formar macroagregados (como se verá luego) en un proceso que aparenta ser reversible. Es posible que por diálisis se lograra revertir este proceso, se liberaran las especies menos solubles que se encontraban en el interior de los macroagregados solubles, y se provocara su precipitación en el medio. Más exactamente, durante la diálisis se observó cómo la solución se tornó opalescente, seguida de la insolubilización de una fracción del polímero en forma de precipitado dentro de la bolsa de diálisis. Los cristales traslúcidos obtenidos por secado de esta fracción insoluble fueron analizados por FT-IR. Los perfiles de los espectros, tanto de la fracción soluble como de la cristalizada, fueron similares en número de bandas y esta situación se mantuvo a diferentes valores de pH.

3.4. Propiedades ácido-base

Con el fin de estudiar las propiedades ácido-base del material soluble, se procedió de manera análoga a lo realizado con el material insoluble. La muestra fue puesta en contacto con un exceso de solución valorante de NaOH. En esta condición, el material crudo fue considerado como una base oligomérica (*Olig*) constituida por dos tipos de grupos funcionales protonables ($-\text{COO}^-$ y residuos IM monosustituidos), y fue titulada con una solución valorante de HCl.

En los distintos lotes titulados, cuando el pH alcanzado en la titulación fue cercano a 6.0, comenzó a observarse el enturbiamiento de la solución y la formación de agregados en suspensión, frente a la adición de HCl.

La curva de titulación (Figura 10) exhibió sólo dos puntos de inflexión, lo que sugirió que sólo era posible determinar un comportamiento ácido-base promedio del material. Se utilizaron los volúmenes de solución valorante de HCl para el cálculo de densidad de sitios protonables, que resultó ser 3.6 mmol g^{-1} (D.E.: 0.3), significativamente mayor que para el caso de los hidrogeles insolubles, como se vio en el Capítulo 2.

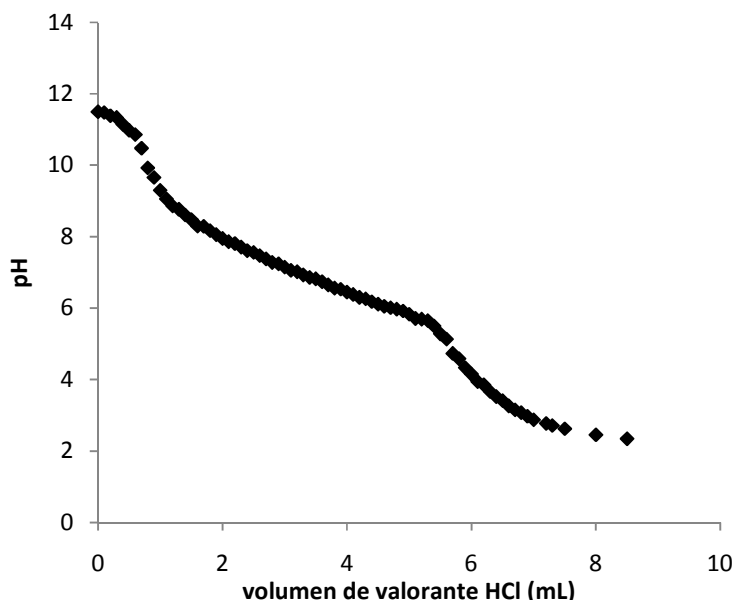


Figura 10. Curva de titulación de la forma básica de los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA).

Para explorar la tendencia al intercambio de protones, se obtuvieron los parámetros empíricos a partir de los datos experimentales. Es posible definir una reacción de disociación ácida para la unidad oligomérica protonada ($OligH^+$), donde K_a es la constante de disociación ácida aparente, afectada por el grado de disociación ácida. La fracción molar de la especie protonada $OligH^+$ (α_0) puede ser calculada con la Ecuación 1:

$$\alpha_0 = 1 - \alpha_1 = \frac{[Cl^-] + [OH^-] - [H_3O^+]}{C_{Total}} \quad (1)$$

Donde α_1 es la fracción molar de la forma oligomérica básica ($Olig$), $[Cl^-]$ es la concentración de solución estándar de HCl agregada después de la neutralización del exceso de NaOH, $[H^+]$ y $[OH^-]$ son las concentraciones de protón y oxhidrilo en cada punto de la titulación, y C_{Total} es la concentración total de residuos protonables en la muestra.

El pK_a se vio afectado como consecuencia de las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados vecinos. La dependencia del pK_a con α_1 se describe en la ecuación de Henderson-Hasselbalch modificada:

$$pK_a = pK_a^0 + (n - 1) \times \log \frac{\alpha_1}{1 - \alpha_1} \quad (2)$$

El pK_a puede ser calculado a partir de la ecuación de Henderson – Hasselbalch tradicional para cada valor de pH, y está relacionado con un valor particular de α_1 en la titulación. Del gráfico de las dos variables, se obtuvieron el pK_a^0 (correspondiente a α_1 : 0.5) y el parámetro n de los oligómeros, estimados en 6.92 (E.E.: 0.01) y 1.98 (E.E.: 0.01), respectivamente (Figura 11).

Se analizó la evolución del pK_a con la variación de α (Figura 11.B y C). A α_1 inferior a 0.25, correspondiente a un pH inferior a 6.0, el pK_a fue de 6.5 y no se vio afectado por el grado de disociación. Luego, cuando α_1 fue superior a 0.25, el valor de pK_a se incrementó con α_1 hasta disociación completa de H^+ ; el pK_a adquirió un valor puntual de 6.9 a α_1 : 0.50, coincidente con el pK_a del monómero IMH^+ . En esta región se observó el efecto de cargas eléctricas vecinas: cargas negativas de $-COO^-$, y cargas positivas de IM^+ / IMH^+ . El efecto de interacción con el vecino cercano, reflejado en el parámetro n , fue levemente mayor en magnitud que en los polianfolitos insolubles [5,8]. A valores de pH superiores a 6.0 se produjo un incremento del valor de pK_a debido a la influencia de los residuos básicos del entorno que desfavorecieron la disociación del H^+ .

Si bien el valor de pK_a^0 obtenido fue cercano al pK_a de IMH^+ , los grupos que intercambiaron H^+ serían mayoritariamente $-COOH$ (porque, como se vio en la Sección 3.3, en el bloque *Poly*(EGDE-IM) existiría una proporción alta de IM^+), y es sabido que el pK_a del residuo MAA aumenta en un entorno polimérico hidrofóbico [4]. En la Sección 3.6 se demostrará que se produjeron macroagregados de oligómeros en solución, por lo tanto es factible que se generaran regiones donde la carga de los residuos $-COO^-$ resultara compensada por la de los residuos IM^+ . En ese entorno se vería desfavorecida la liberación de H^+ a partir de $-COOH$. Además, existe la posibilidad de que el pH de este entorno en el interior del macroagregado soluble fuera diferente del pH de la solución externa como consecuencia de una disminución de la constante dieléctrica por condensación de los iones de carga opuesta. Por otra parte, se ha reportado en la literatura que el pK_a de *Poly*(MAA) varía entre 6.0 y 7.0 en función de valores de α . Esto se asemeja al perfil determinado para los oligómeros, en el que el rango de pK_a varió desde 6.4 hasta 8.1 [4].

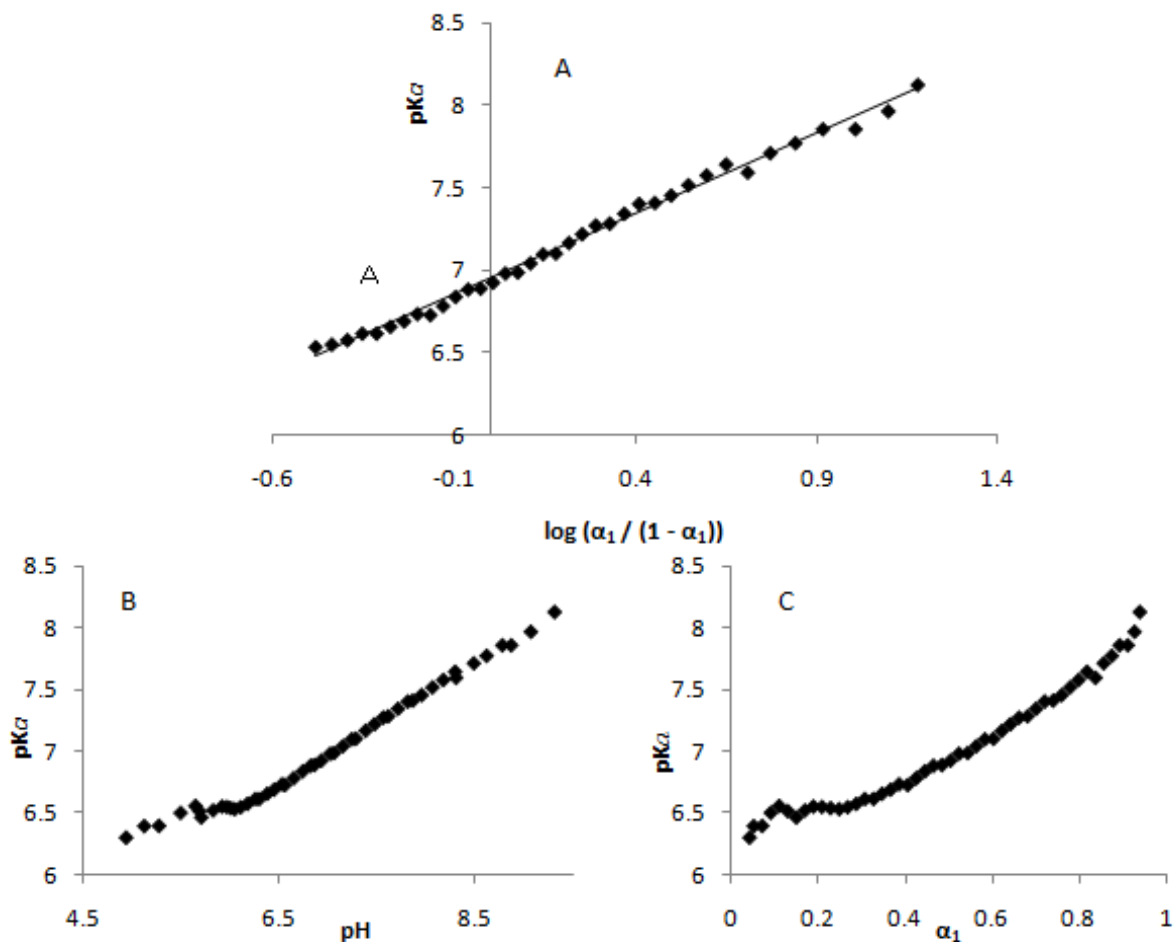


Figura 11. Representación de pKa calculado a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch vs. el término \log relacionado con el grado de disociación ácida de los productos (A); pKa vs. pH (B); pKa vs. grado de disociación ácida (α_1) (C).

En este punto es posible realizar una comparación con la titulación de *Poly(EGDE-IM)* [1]. Para el polielectrolito, el pKa resultó igual a 6.5 a valores de pH en los que el material se encontraba completamente protonado. Luego el pKa aumentó hasta 7.7 para una fracción molar de la forma protonada igual o menor a 0.3, y permaneció constante a pH mayores [1]. Aquí se percibe una diferencia sustancial entre el comportamiento de los *oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)* y el polielectrolito *Poly(EGDE-IM)*: los rangos de valores de α_1 en los que pKa no resultó afectado por el grado de disociación ácida fueron a α_1 bajo en los oligómeros, y a α_1 alto en el polielectrolito. Y esta estabilidad de pKa se relacionó con la región de pH en la que existió una menor carga eléctrica en la molécula observada.

Los resultados de análisis elemental, electroforesis capilar y NMR de las muestras de *oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)*, aportaron información adicional sobre los grupos ionizables. Como ya fue mencionado, por análisis elemental se determinaron cantidades equimolares de grupos MAA e IM en el material crudo (3 mmol g^{-1} , de cada uno). La integración de las señales de $^1\text{H-NMR}$ arrojó una composición monomérica IM : EGDE : MAA de 1.1 : 1.0 : 1.2. Sin embargo, el

número de sitios protonables detectados por titulación ácido-base, resultó menor (3.6 mmoles de sitios titulables totales g^{-1}). Esto implica que algunos grupos no pudieron ser detectados por el método potenciométrico. En este sentido, es importante recordar que los residuos IM podrían encontrarse monosustituídos y por lo tanto, contar con un grupo protonable (IMH^+), o disustituídos, con una carga positiva permanente (IM^+). Esta carga permanente (IM^+) puede establecer uniones con OH^- como contraión, al comienzo de la titulación al agregar un exceso de OH^- . Sin embargo, la neutralización del OH^- contraión no puede distinguirse por potenciometría del OH^- libre agregado en exceso, por lo tanto estos sitios IM^+ no se incluyeron en la cuantificación por titulación. Por otro lado, los monómeros de MAA pueden estar polimerizados, con los grupos $-\text{COOH}$ disponibles como intercambiadores de H^+ , o, por el contrario, parte de ellos pueden estar esterificados, como se confirmó por ^{13}C -NMR (Figura 5.II).

Considerando que las cantidades de MAA e IM total en la red polimérica del material crudo determinadas por análisis elemental fueron equimolares, una posible explicación al hecho de la permanencia de la carga positiva a pH 9.0 en algunas moléculas podría ser a causa de la formación de grupos éster por reacción de MAA con grupos epóxido de EGDE. Esto llevaría a que en realidad, los grupos $-\text{COOH}$ intercambiadores de protón ya no fueran equivalentes en número a los grupos con carga positiva y que hubiera, por lo tanto, un exceso de carga positiva. Es decir, la esterificación de MAA sumado a la existencia de residuos IM^+ , resulta en que la densidad de sitios titulables sea inferior a la estimada por análisis elemental y NMR.

3.5. Caracterización por mediciones de potencial zeta (ζ), de viscosidad y estudios de solubilidad

Aunque los experimentos de CZE no pusieron en evidencia la existencia de estructuras con carga neta negativa, la presencia de cantidades equimolares de grupos ácidos y básicos en el producto a granel sumada a la evidencia espectroscópica de bloques de *Poly*(MAA), permitiría suponer la existencia de un punto isoeléctrico (*IEP*) para la mezcla oligomérica. La Figura 12 presenta los datos de potencial zeta (ζ) en función de pH, a partir de los que se estimó un (*IEP*) de 5.7 para el material crudo.

Los espectros ζ obtenidos a pH cercano a 6.0 exhibieron dos señales correspondientes a una población positiva y a una negativa. Por otra parte, los espectros obtenidos a valores de pH por debajo del *IEP* presentaron varias bandas anchas al mismo tiempo que se producía una separación de fase; aquellos obtenidos a pH superior al *IEP* presentaron una banda predominante con carga neta negativa y una pequeña banda neutra.

El perfil de viscosidad en función de pH entre 6.0 y 12.0 siguió la misma tendencia que ζ , con una marcada disminución cerca de pH 6.0 debido a la precipitación de una fracción oligomérica. Sin embargo, a pH 12.0 se observó una disminución inesperada de la viscosidad. Este hecho experimental, podría explicarse a partir de un cambio conformacional del material cuando se encuentra en un medio de fuerza iónica elevada. La solvatación resultó más baja, lo que derivó en un colapso en la estructura, que se comprimiría y disminuiría la viscosidad de la solución.

Aunque fue posible detectar un *IEP* mediante las mediciones de ζ para el producto a granel, su solubilidad en función del pH resultó un nuevo indicio de que el material era una mezcla heterogénea de oligómeros con una relación variable entre grupos ácidos y básicos.

Lowe y McCormick explicaron que los polianfolitos estadísticos tienden a ser solubles a un pH alrededor del *IEP*, en tanto que los polianfolitos en bloque tienden a ser solubles a valores de pH superiores o inferiores del *IEP* pero precipitan alrededor del pH crítico [9].

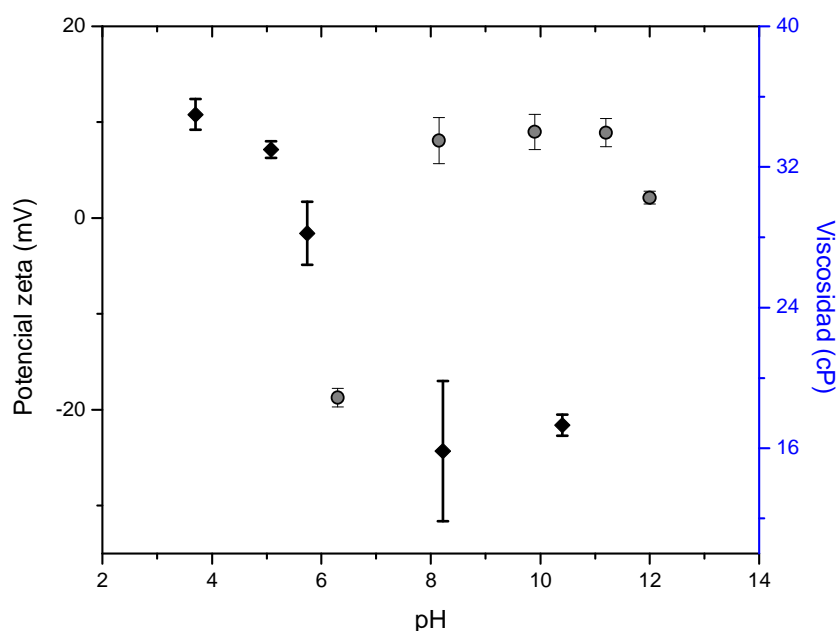


Figura 12. Valores de ζ o potencial zeta (◆) y viscosidad (●) en función del pH para los *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA). La concentración de oligómeros fue de 15 mg mL^{-1} para las mediciones de ζ y 200 mg g^{-1} para las mediciones de viscosidad.

En cambio, los *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) resultaron totalmente solubles solamente a pH superior a 6.0, se formó una suspensión estable cuando el pH se llevó a valores entre 4.0 y 6.0, y se obtuvo un material tipo látex a pH inferior a 4.0.

Se hicieron estudios de solubilidad con la finalidad de determinar las características y propiedades de las distintas fracciones presentes en el producto a granel. Se trabajó con distintos solventes, por modificación de la acidez del medio y por variación de la naturaleza del catión precipitante.

Algunas fracciones del material precipitaron a partir de su solución acuosa bajo ciertas condiciones experimentales tales como simple dilución con agua destilada, en mezcla con metanol o acetonitrilo, mezcla con soluciones de diversos cationes (Fe(II), Fe(III), Al(III), Cu(II)), mezcla con HCl diluido y como consecuencia de una diálisis prolongada en agua destilada (Figura 13).

En los FT-IR de los distintos precipitados obtenidos, se observaron cambios cualitativos: desaparición de la banda a 1510 cm^{-1} en el espectro del material precipitado con acetonitrilo o metanol y en el espectro del material cristalizado por diálisis (Figura 14).

Se observó un desplazamiento de la banda desde 1510 a 1522 cm^{-1} cuando se usó Fe(II) como agente de precipitación. Esta señal se atribuye a los modos vibracionales de los enlaces C=N de las unidades de IM cuando se produce la protonación de los N piridínicos, ya que la banda permaneció tanto en los espectros del material nativo como en los de su forma ácida (Figura 14). En este caso, el desplazamiento podía ser indicador de interacción entre el heterociclo y el

Fe(II). Es conveniente remarcar que los estudios de NMR arrojaron una conservación de la aromaticidad que, en este contexto, implica la conservación de la estructura de IM luego de formada la red polimérica. Además, el desplazamiento de la señal de 1560 cm^{-1} hacia 1590 cm^{-1} , posiblemente se deba a una interacción del catión con -COO^- y/o los restos IM polimerizados. Las bandas de estos compuestos fueron mucho más intensas y mucho mejor resueltas que las obtenidas para el material liofilizado o bien para la forma ácida del polímero, como se espera de una reacción de coordinación.

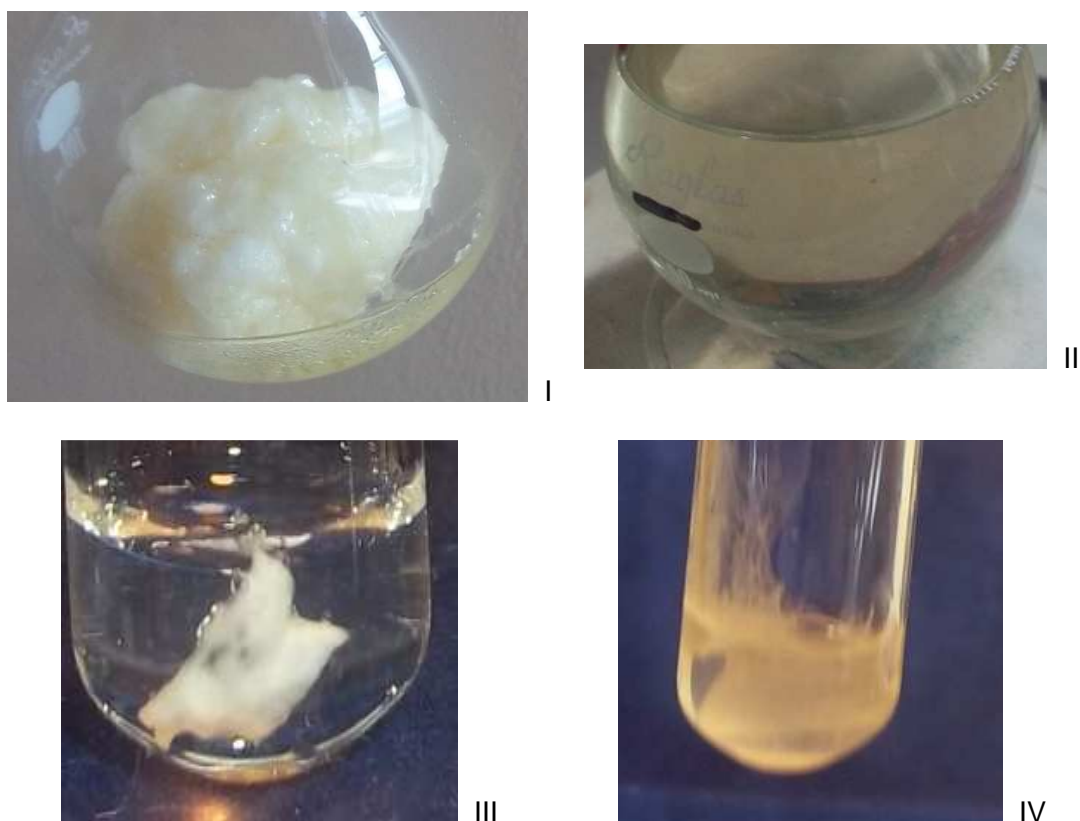


Figura 13. Imágenes de *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA): antes de la disolución en agua (I); disueltos en agua (II); agregados con solución de HCl (III); agregados con solución de FeSO_4 (IV).

Se hicieron estudios de FT-IR del producto de agregación Al(III)-(EGDE-IM-*co*-MAA) a diferentes concentraciones de $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, y se observaron cambios espectrales evidentes a concentraciones de sal superiores a 10^{-2} M (Figura 15). En esos casos, los espectros obtenidos fueron la resultante de la adición de las señales de la sal a las bandas de los oligómeros, con una mejora en la intensidad y resolución de las señales. Como control, se demostró que el anión SO_4^{2-} a partir de sales de Na^+ o K^+ no indujo precipitación de fracciones oligoméricas.

Se observó una banda a 1640 cm^{-1} en el espectro de la fracción precipitada con acetonitrilo, metanol, HCl, o cristalizada por diálisis. Esta banda podría surgir ya sea de la flexión de los enlaces H-O-H de las moléculas de agua o de los grupos C=O internos que forman puentes de H. Esta última posibilidad podría tener lugar en regiones donde las unidades MAA están unidas (regiones de *Poly*(MAA)). De hecho, los precipitados a partir de metanol o acetonitrilo

presentaron un desplazamiento de la banda de C=O de 1710 cm^{-1} a 1695 cm^{-1} , característico de los enlaces de H internos o dímeros cíclicos con MAA de cadenas cercanas (Figura 14) [10]. Asimismo, la banda de C=O fue significativamente menos intensa en los precipitados a partir de acetonitrilo.

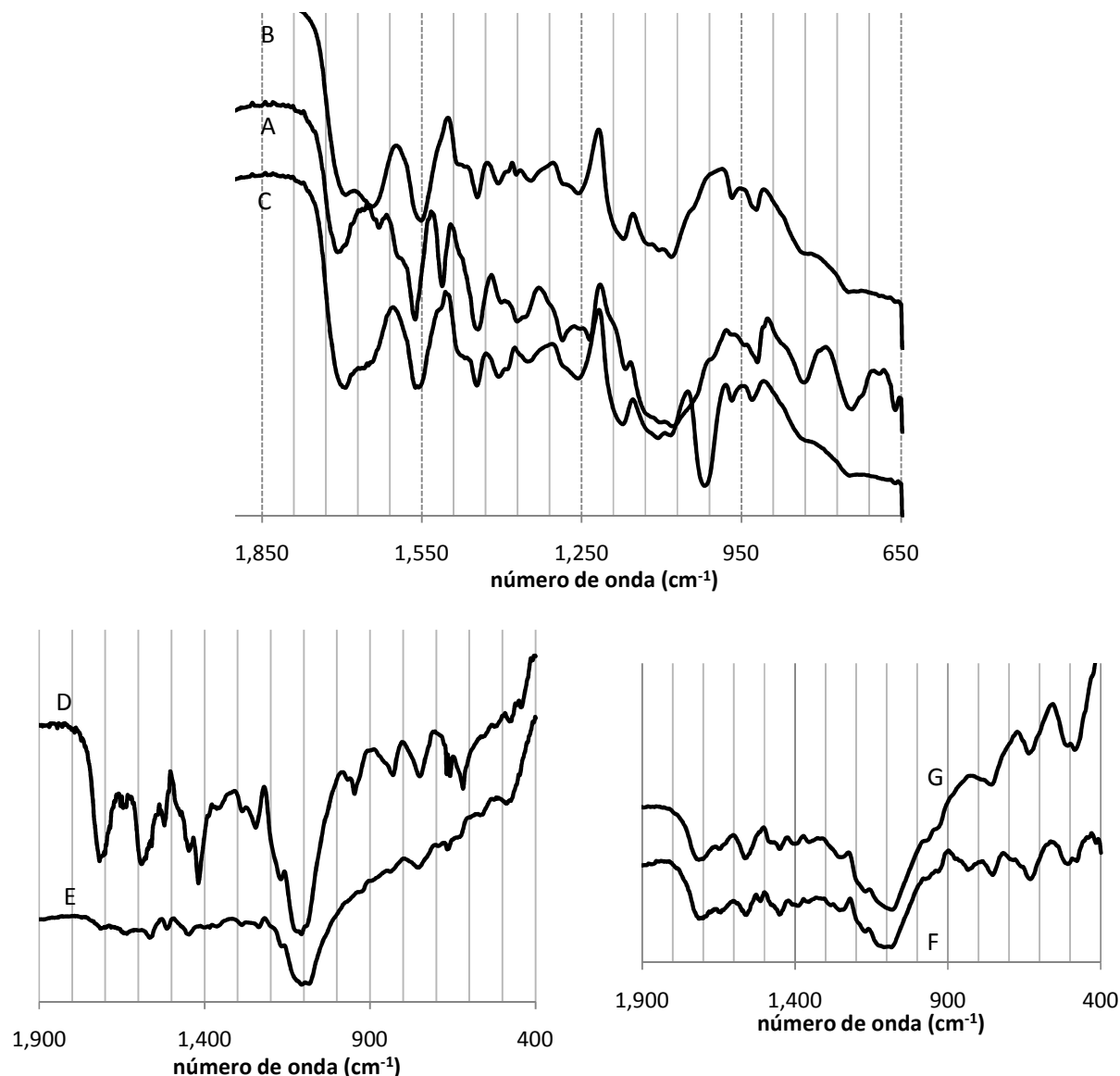


Figura 14. Espectros FT-IR de: *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) antes de su disolución en agua (A); oligómeros agregados por adición de acetonitrilo (B) o metanol (C); oligómeros agregados en solución de FeSO_4 0.02 M (D); oligómeros agregados en solución de HCl (E); oligómeros liofilizados (F); oligómeros cristalizados por diálisis (G).

Tomando en cuenta todos estos resultados experimentales, es posible realizar un resumen y elaborar una serie de conclusiones. Las fracciones precipitadas por adición de acetonitrilo o metanol, presentaron un contenido elevado de unidades de MAA, más alto en el caso del sólido precipitado a partir de metanol. Este residuo MAA podría estar involucrado en la esterificación con residuos EGDE y/o unido por polimerización radicalaria a través de los grupos vinilo. Estas fracciones podrían tener, además, un menor contenido de residuos IM polimerizados, dado que

las señales a 832 cm^{-1} y 1510 cm^{-1} del heterociclo unido a EGDE dejaron de detectarse en su espectro (Figura 14), evidencia que se corresponde con los resultados de CP-MAS. Así es que estas estructuras con mayor proporción de restos MAA polymerizados deberían tener mayor densidad de carga neta negativa en un amplio rango de pH (si es que la esterificación no predomina en la red), y efectivamente fueron detectadas por mediciones de ζ a pH superiores al *IEP* (aunque no se detectaron por CZE).

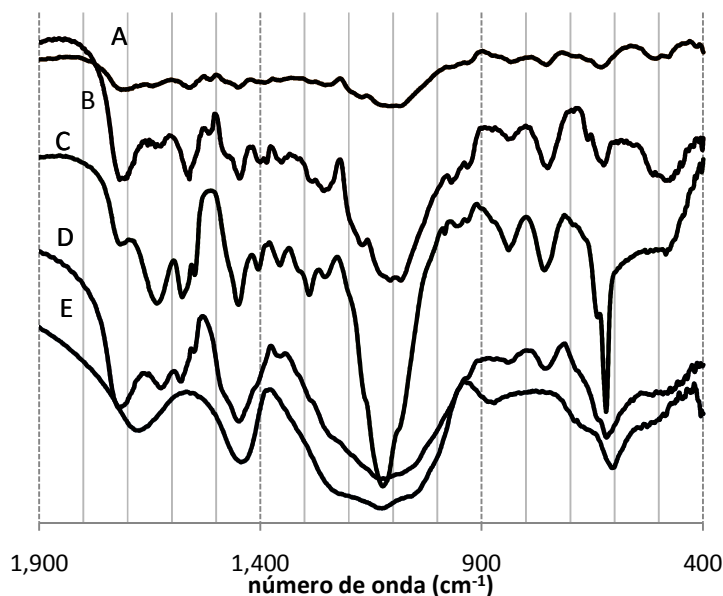


Figura 15. Espectros FT-IR de: *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) liofilizados (A); oligómeros agregados con $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 10^{-3} M (B), 10^{-2} M (C) y 10^{-1} M (D); $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ (E).

En este contexto cabe mencionar que la fracción oligomérica cristalizada por diálisis podría también tener un bajo contenido de residuos IM polymerizados, respaldado por la pérdida de las señales a 832 cm^{-1} y 1510 cm^{-1} , correspondientes al heterociclo polymerizado.

No se observó una separación de fases en medio alcalino. Además, a pH 9.0 el pK_a del granel de *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) fue cercano a 8.0 y el grado de disociación ácida (α_1) fue 0.92, lo que indica que la cantidad de residuos IMH^+ polymerizados sería baja. Así, para aquella población de oligómeros que alcanzó la neutralidad a pH 9.0, las cargas negativas de los grupos $-\text{COO}^-$ estarían compensadas mayoritariamente por los residuos IM^+ permanentes. Sorprendentemente, estas moléculas neutras permanecieron solubles en solución acuosa a pH 9.0. Cuando el producto a granel fue disuelto en agua destilada, el pH varió entre 6.2 y 6.5 entre lotes de síntesis. En este rango de pH, el producto presentó carga neta negativa con un pequeño (en magnitud) valor de ζ pero suficiente como para asegurar la estabilidad de la solución.

A un pH inferior a 6.0, una fracción del material se separó de la solución, en tanto que otras fracciones permanecieron solubles. Fue posible hallar información adicional en el análisis elemental presentado en la Tabla 2 para el producto a granel (liofilizado) y su forma ácida obtenida por precipitación con HCl: las fracciones ácidas exhibieron mayor proporción de MAA y menor cantidad de residuos IM polymerizados en la red.

Para comprender todos estos resultados, deberíamos considerar oligómeros constituidos por dos bloques como estructura probable, donde el tamaño de los bloques podría ser diferente en cada

molécula. Es decir, podría suponerse una distribución estadística del tamaño de cada bloque en las moléculas de oligómeros. Este modelo en bloque sería válido para la mayoría de las fracciones, excepto para aquella detectada como neutra por CZE a pH 9.0. En este último caso, su solubilidad podría explicarse de dos maneras diferentes: a) es un oligómero constituido por dos bloques que en solución está formando parte del núcleo de macroagregados; b) que se trata de un oligómero con propiedad de anfolito que presenta una distribución estadística de los monómeros en su trama, y por ello es soluble al pH del *IEP* [9]. Considerando además, que el voltaje usado en CZE podría producir la disrupción de los macroagregados solubles, la opción b) para la estructura de la fracción neutra a pH 9.0 parece más probable.

Como es bien sabido, pueden existir soluciones de oligómeros con un nivel bajo de entrecruzamiento con una estabilidad prolongada, en forma de soluciones acuosas de baja viscosidad o dispersiones, en tanto que, un cambio de pH a la proximidad del *IEP* produce la coacervación iónica, (con la consiguiente pérdida de solubilidad) [9]. Sin embargo, aunque no se observó precipitación del material en medio alcalino, sí ocurrió a pH inferior a 6.0. Para explicar este comportamiento, la estructura del compuesto obtenido debe ser tal que las cadenas de *Poly*(MAA) deben estar unidas covalentemente a las cadenas de *Poly*(EGDE-IM) por medio de los grupos éster establecidos entre $-COOH$ de *Poly*(MAA) y grupos funcionales de EGDE (Esquema 1).

Por una parte, es un hecho probado que los bloques de *Poly*(EGDE-IM) fueron formados en el primer paso de síntesis [4]. Con respecto a los residuos MAA, una cierta proporción de estas unidades podría estar involucrada en la formación de grupos éster, según la evidencia de ^{13}C NMR.

Por otra parte, el pK_a estimado para el producto a granel fue cercano a 6.5 a pH ácido, además α_1 fue 0.22 a pH 6.0 y 0.14 a pH 5.7 (Figura 11 B y C), lo que indica que la mayoría de los grupos $-COOH$ de MAA estaría presente en la forma neutra, probablemente formando parte de puentes de H internos [10]. Esta conformación particular en regiones de bloques ácidos relativamente grandes afectaría significativamente la solubilidad de una fracción de la muestra de oligómeros con exceso de grupos MAA (aún con la inclusión de las cargas positivas de IMH^+ e IM^+), posiblemente formando regiones donde la hidrofiliidad estaría sustancialmente disminuida. En coincidencia con esta hipótesis, se ha reportado que las interacciones fuertes entre grupos carboxilo en cadenas poliméricas causan la formación de películas interfaciales gruesas en emulsiones de tipo aceite-agua a valores bajos de pH [10]. Esto se evidenció también en la forma ácida del material obtenida por precipitación, con predominio de residuos MAA polimerizados y baja proporción de IM polimerizado.

La estructura planteada de oligómeros en dibloque solubles en agua es consistente con la estrategia aplicada para la síntesis, en la que IM reacciona con EGDE en una primera instancia formando bloques de los aductos EGDE-IM, seguida por la adición de MAA (en la cual se produce la formación de algunos grupos éster) y un tratamiento final con peróxido de benzoilo para polimerizar los grupos vinílicos del MAA (libre y esterificado). Esta estructura sería configuracional y tridimensionalmente diferente de los polianfolitos estadísticos insolubles obtenidos mediante una estrategia de síntesis en un solo paso, pero con la conservación de los grupos funcionales. En los polianfolitos insolubles, la polieterificación prevalecería sobre la formación de aductos de tipo EGDE-IM.

Concluyendo la discusión, es posible afirmar que las diferentes poblaciones de oligómeros exhibieron diferencias en la longitud/tamaño de cada bloque constitutivo, pero aún así fue posible determinar un *IEP* para el granel de síntesis. Además, el sólido que precipitó a un pH inferior a 4.0 presentó un exceso de residuos MAA polimerizados, en tanto que por CZE se detectaron moléculas neutras a un pH superior a 6.0 que permanecieron en solución.

3.6. Determinación de peso molecular de los oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)

A partir de la diálisis se obtuvo información preliminar respecto del peso molecular del producto a granel: las membranas de cut-off 12 kDa resultaron permeables a todas las fracciones.

Los ensayos de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) fueron realizados en solución acuosa de acuerdo con protocolos de separación de polianfolitos derivados de MAA y grupos amino [11]. Se detectaron bandas de alrededor de 300 - 400 kg mol⁻¹ (sobre la base de un estándar de pululanos), cuando se inyectó en el sistema una solución acuosa 10 mg mL⁻¹ de producto a pH 8.5. Estas bandas fueron detectadas en dos lotes sintéticos diferentes (Figura 16 y Tabla 3). Las mismas bandas fueron observadas para soluciones de material previamente precipitado en acetonitrilo o en metanol.

Estos resultados constituyen una evidencia a favor de la formación de macroagregados solubles de las moléculas oligoméricas. Los números de agregación detectados resultaron (n): 2, 20, 35 y 60, cuando se tomó como referencia la banda de menor peso molecular (15.0 kg mol⁻¹). Este hecho es consistente con que los polianfolitos en bloque forman micelas en un amplio rango de valores de pH, a ambos lados del *IEP* [12,13]. Asimismo, se observó que el tamaño de los macroagregados aumentó en forma proporcional al tiempo de preparación de la solución.

Durante la diálisis, se podría producir la ruptura de los macroagregados solubles como consecuencia de la dilución, lo que habría permitido la difusión de las moléculas individuales hacia el medio externo de la bolsa de diálisis.

La estabilidad de estos macroagregados también podría verse afectada en los experimentos de CZE, donde las muestras fueron analizadas empleando una diferencia de potencial de 5 kV (contra 16 V en las mediciones de ζ). Han sido reportadas evidencias de que bajo la influencia de campos eléctricos fuertes los polímeros funcionalizados cambian su estructura espacial a una configuración totalmente extendida y sólo una pequeña fracción de la muestra permanece con su estructura organizada [14]. Este hecho también podría explicar el comportamiento particular de estas muestras a un pH superior al *IEP*, donde se observó la movilidad positiva en algunas fracciones por CZE. Serán necesarios estudios complementarios para una mayor comprensión de este fenómeno.

Se obtuvo información adicional de peso molecular a partir de la espectrometría de masas (MALDI-TOF) (Figura 17), realizada con la finalidad de obtener información estructural confirmatoria o complementaria a la obtenida por métodos espectroscópicos.

Así fueron detectados oligómeros de bajo peso molecular con un rango de masas de entre 300 y 900. Fueron particularmente abundantes los picos de m/z 483, 551 y 607. Las estructuras propuestas compatibles con estos valores de m/z son consistentes con el mecanismo de síntesis planteado que involucra reacciones de esterificación de monómeros de MAA con EGDE mediante la apertura de los anillos oxirano, o esterificación del MAA por reacción con los grupos -OH del EGDE formados luego de la apertura del anillo por reacción con IM.

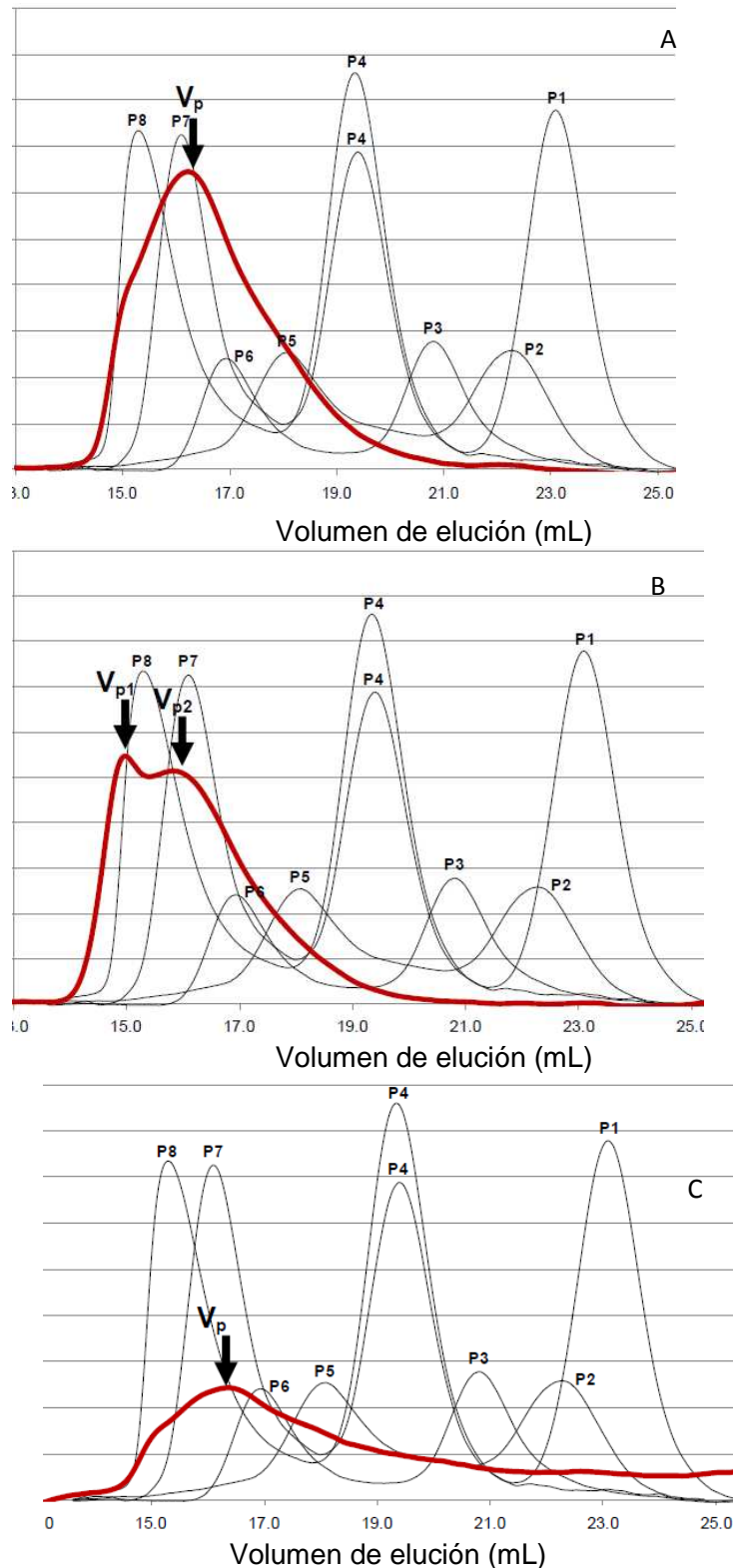
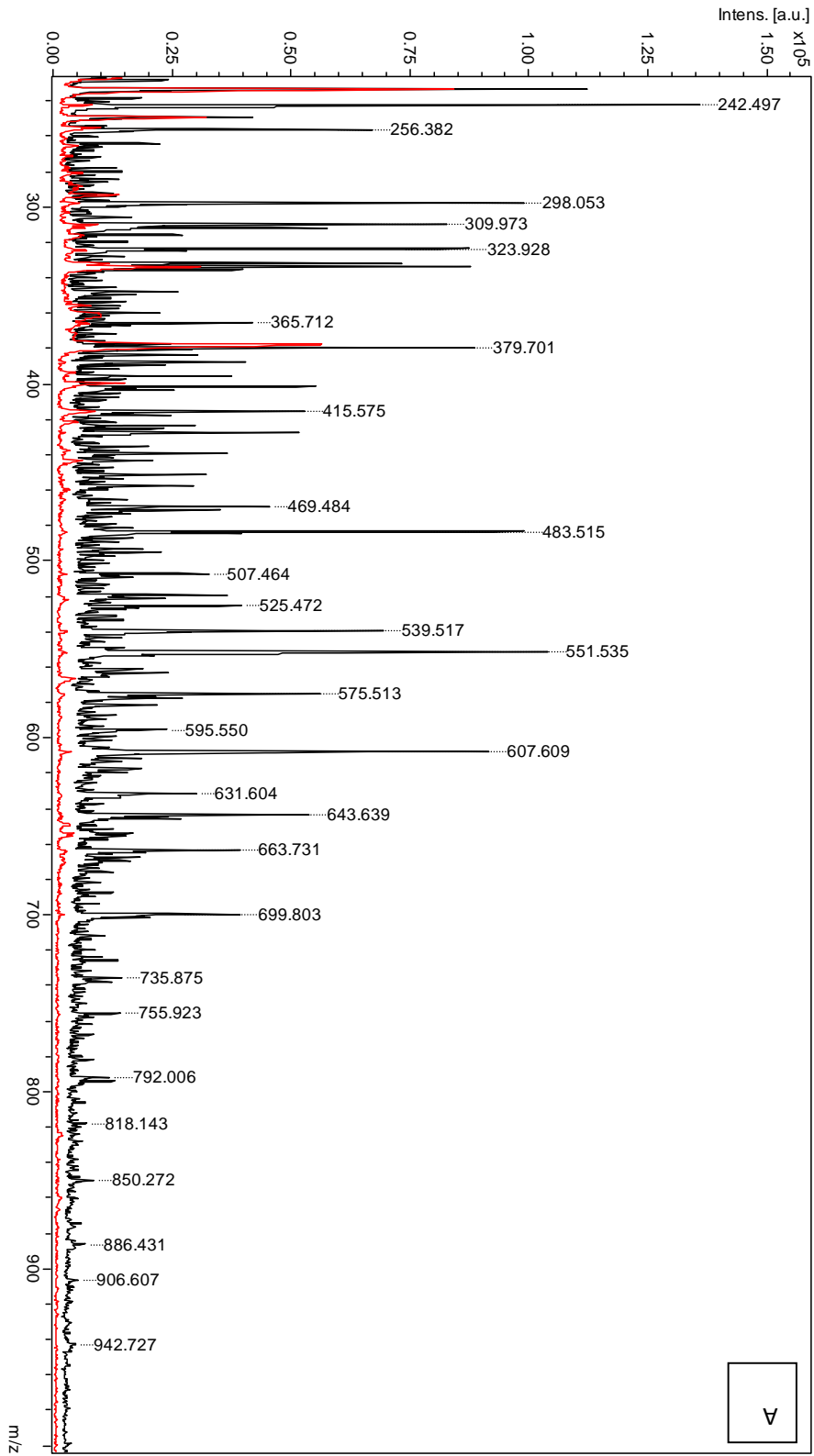


Figura 16. Cromatogramas de exclusión molecular de dos lotes sintéticos de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) 10 mg mL^{-1} (línea roja) usando fase móvil II (MPII buffer TRIS 0.050 M, pH 8.50, KCl 0.10 M): lote I (A); lote II (B); solución de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) previamente precipitados con acetonitrilo, lote I (C). Los picos denominados P1 – P8 corresponden a estándares de masa molar de pululanos (línea negra).



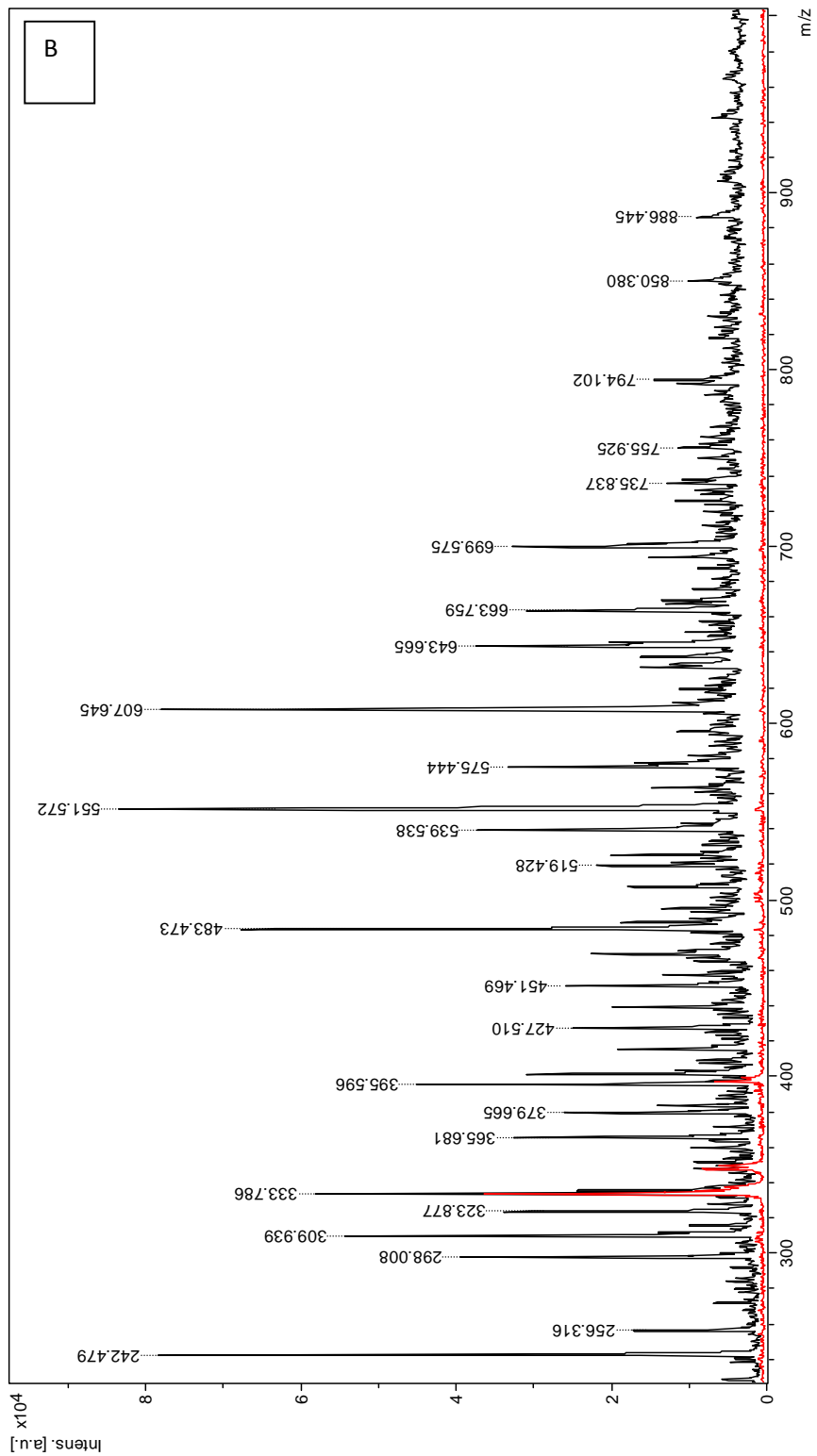
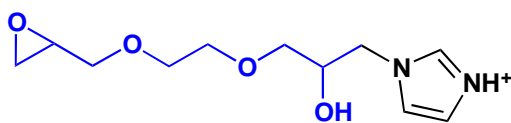
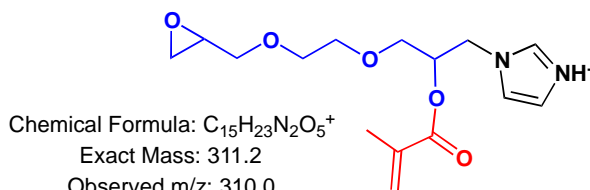


Figura 17. Espectros MALDI-TOF de *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) en matriz CHCA (línea negra) y matriz CHCA (línea roja) (A); y espectros MALDI-TOF de *oligómeros* (EGDE-IM-*co*-MAA) en matriz nHo (línea negra) y matriz nHo (línea roja) (B).

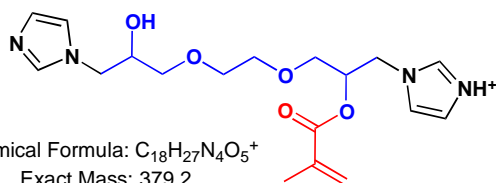
Las estructuras probables para las m/z más abundantes son:



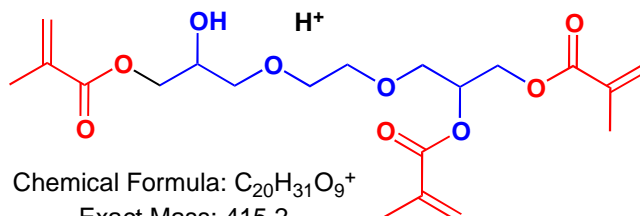
Chemical Formula: $C_{11}H_{19}N_2O_4^+$
Exact Mass: 243.1
Observed m/z: 242.5



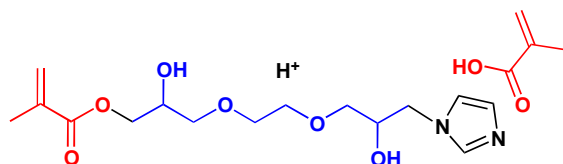
Chemical Formula: $C_{15}H_{23}N_2O_5^+$
Exact Mass: 311.2
Observed m/z: 310.0



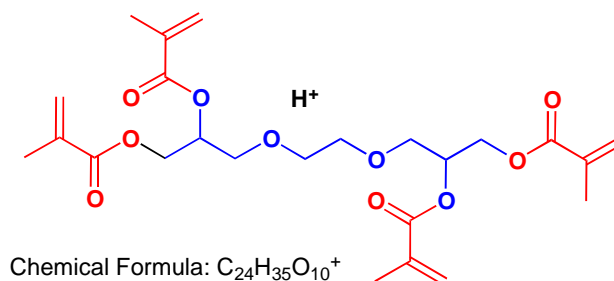
Chemical Formula: $C_{18}H_{27}N_4O_5^+$
Exact Mass: 379.2
Observed m/z: 379.7



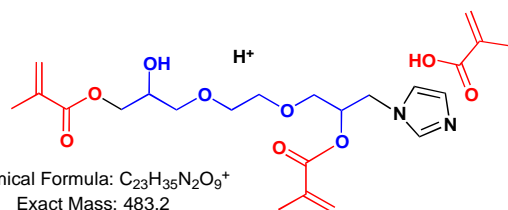
Chemical Formula: $C_{20}H_{31}O_9^+$
Exact Mass: 415.2
Observed m/z: 415.6



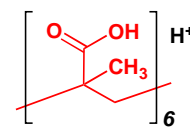
Chemical Formula: $C_{19}H_{31}N_2O_8^+$
Exact Mass: 415.2
Observed m/z: 415.6



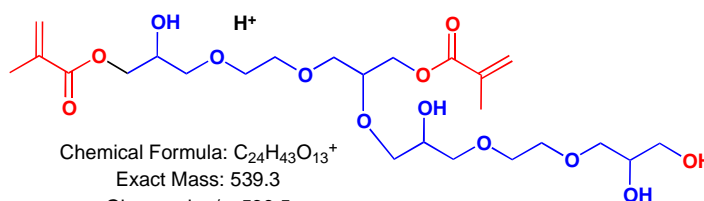
Chemical Formula: $C_{24}H_{35}O_{10}^+$
Exact Mass: 483.2
Observed m/z: 483.5



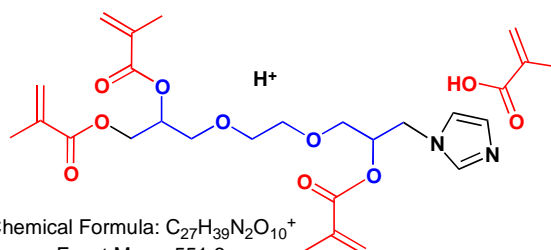
Chemical Formula: $C_{23}H_{35}N_2O_9^+$
Exact Mass: 483.2
Observed m/z: 483.5



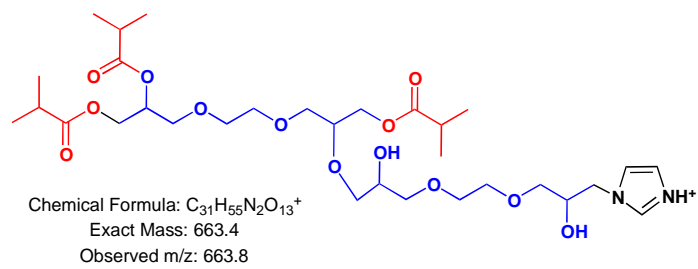
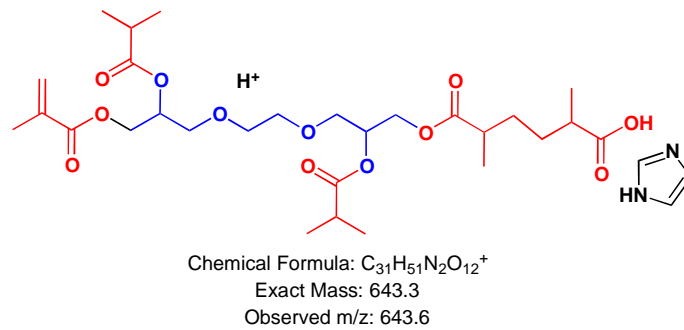
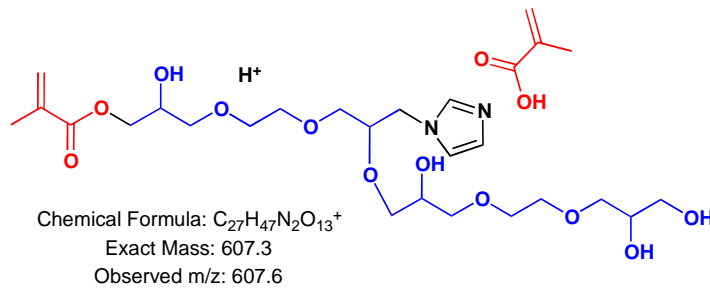
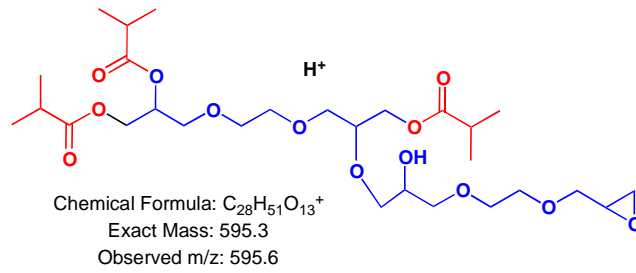
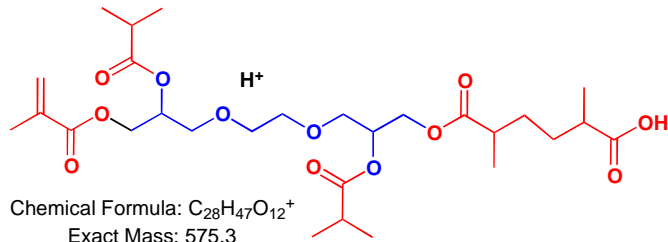
Chemical Formula: $C_{24}H_{39}O_{12}^+$
Exact Mass: 519.2
Observed m/z: 519.4

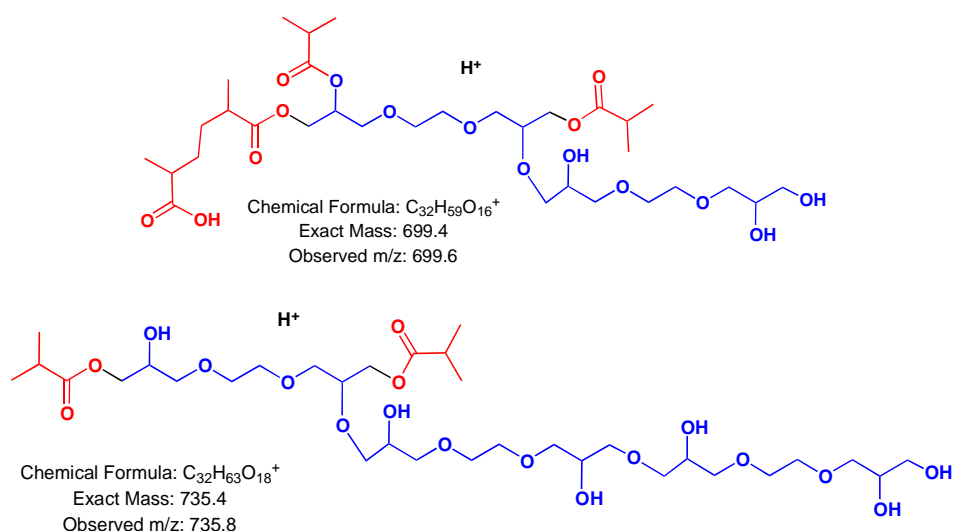


Chemical Formula: $C_{24}H_{43}O_{13}^+$
Exact Mass: 539.3
Observed m/z: 539.5



Chemical Formula: $C_{27}H_{39}N_2O_{10}^+$
Exact Mass: 551.3
Observed m/z: 551.5





El pico más abundante correspondió a una relación m/z 551, consistente con una estructura de par iónico, formada en el segundo paso luego del agregado de MAA (Figura 17). Podemos concluir que una fracción de este compuesto intermediario no resultó atacada por los radicales libres generados en el tercer paso y permaneció en la mezcla de reacción como un producto secundario.

Tabla 3. Masas moleculares para picos que eluyen de las columnas SEC. La fase móvil I (MPI) fue buffer TRIS 0.050 M, pH 8.50, KCl 1.00 M; la fase móvil II (MPII) fue buffer TRIS 0.050 M, pH 8.50, KCl 0.10 M.

Muestra	Pico	Masa molar ($kg\ mol^{-1}$)	
		MPI	MPII
Lote I	1	344	337
Lote II	1	739	716
	2	414	432
	3	28.3	n.d.
	4	15.0	n.d.
Lote I tratado con acetonitrilo	1	339	311
Lote I tratado con metanol	1	213	n.m.

n.d.: no detectado n.m.: no medido

La estructura de m/z 735 confirmó la existencia de redes menos hidrofílicas debido a cierto grado de polieterificación que ocurrió cuando la concentración del monómero IM decreció en la reacción. Los espectros de FT-IR y NMR evidenciaron que *Poly*(EGDE-IM) unido a *Poly*(MAA) constituye la mayor proporción de los productos de reacción en el material crudo. Si bien el

método MALDI-TOF no permitió detectar oligómeros de mayor tamaño con bloques de *Poly*(EGDE-IM) unidos covalentemente a *Poly*(MAA), la existencia probada de aductos de tipo EGDE-IM permitiría explicar todas las propiedades descritas en este Capítulo [1]. Es necesario considerar que en el primer paso de síntesis se forma *Poly*(EGDE-IM), que los aductos EGDE-IM fueron detectados por nuestro grupo en trabajos precedentes usando el método ESI-MS [1] (aunque no fueron detectados por MALDI-TOF), y que las fracciones con carga neta positiva fueron detectadas mediante CZE.

3.7. Conclusiones del Capítulo 3

La evidencia experimental sustentó la formación de oligómeros con una estructura química probable basada en copolimerización en bloque.

La adición secuencial de los reactivos y la incubación por más de 12 horas, previas a la polimerización radicalaria resultó determinante para la condición de solubilidad en agua de la mezcla de oligómeros basada en EGDE, IM y MAA. El primer paso de la reacción produjo un gel de *Poly*(EGDE-IM) en el cual la disustitución de IM generó cargas positivas permanentes sobre la molécula (IM^+). Luego, se agregó MAA a la mezcla que formó pares iónicos con los sitios básicos y reaccionó lentamente con otros grupos funcionales de la red, con una baja cantidad de grupos éster. Finalmente, la polimerización a través de los grupos vinilo de MAA estableció bloques de *Poly*(MAA), que pueden adquirir carga negativa en función del pH, y que permanecieron unidos a *Poly*(EGDE-IM) por medio de estos grupos éster.

La unión covalente de bloques polianiónicos al gel de *Poly*(EGDE-IM) mediante uniones éster resultó fundamental para incrementar la solubilidad en agua del producto final. La formación de grupos éster requirió la incubación de *Poly*(EGDE-IM) con MAA a 60° C por más de 12 horas. El método de FT-IR permitió monitorear las reacciones químicas durante la síntesis. El espectro FT-IR del producto final presentó indicios de que la naturaleza de los grupos funcionales en estos materiales solubles en agua era la misma que la de los insolubles.

La caracterización por NMR del producto a granel de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) y de fracciones precipitadas con solventes orgánicos exhibió señales de ^{13}C e 1H consistentes con la unión covalente de los monómeros IM a la molécula de EGDE. Además, se verificó la conservación de la aromaticidad de los heterociclos y la apertura de los anillos oxiranos. Los entornos químicos de los grupos $-COOH$ en los oligómeros solubles en agua, fueron distintos que en el caso de los materiales no solubles. La formación de ésteres entre MAA y EGDE fue confirmada por ^{13}C -NMR, y a su vez evidenciada por MALDI-TOF, junto con la existencia de *Poly*(MAA) y *Poly*(EGDE).

Es importante tener presente que la existencia del gel *Poly*(EGDE-IM) ha sido demostrada anteriormente [1,5]. La prevalencia en la formación del aducto EGDE-IM por sobre la polieterificación ha sido estudiada en esa ocasión por ESI-MS, y han sido identificados oligómeros de 500 Da en una fracción particular soluble en agua.

El incremento de la solubilidad en agua a valores de pH superiores al *IEP* puede estar relacionado con la formación de bloques de *Poly*(MAA), en asociación con bajo grado de polieterificación, la existencia de cargas positivas permanentes en oligómeros que posean una elevada relación de *Poly*(EGDE-IM) / *Poly*(MAA), y/o la posibilidad de formación de macroagregados altamente solvatados.

Estos oligómeros solubles interactuaron con un grupo de cationes y como consecuencia se formaron precipitados (agregados tipo látex). La naturaleza de la interacción podría estar relacionada con las cualidades intrínsecas del catión. La precipitación por Fe(II)/Fe(III), procedería a través del establecimiento de compuestos de coordinación. Cuando los grupos -COO^- fueron neutralizados por H^+ a valores de pH inferiores al *IEP*, la formación de puentes de H internos entre -COOH explicaría la disminución de la solvatación de las cadenas en los bloques largos de *Poly(MAA)* unidos a bloques *Poly(EGDE-IM)* más pequeños, lo que dio como resultado una masa de material agregado tipo látex.

El producto a granel presentó un *IEP* de 5.7 determinado por mediciones de ζ . Las propiedades descritas en este capítulo pueden ser explicadas por las asimetrías en tamaño/longitud de sus bloques constitutivos para cada población de oligómero presente. Es decir, la naturaleza del material crudo resultó claramente heterogénea; no fue posible determinar la existencia de una única entidad, ya que se trataría de una mezcla de poblaciones de moléculas constituidas esencialmente por dos tipos de bloque con diferentes longitudes de cadena, siempre inferior a 12 kDa.

Del conjunto de las evidencias, se concluye que las fracciones que pudieron ser ionizadas y detectadas con el método MALDI-TOF correspondieron esencialmente a intermediarios de reacción que no han participado en el último paso de polimerización radicalaria, pero permanecieron en el producto a granel. Si bien los oligómeros de más de 700 Da no fueron observados por MALDI-TOF, probablemente por su dificultad para ser ionizados y desprendidos de las matrices usadas, la sumatoria de los experimentos efectuados constituye prueba suficiente para demostrar su existencia.

La técnica de CZE permitió poner de manifiesto cierto porcentaje de disustitución de residuos IM (IM^+) que generaron moléculas con carga neta positiva (y permanente) a pH 9.0. Por otra parte, las mediciones de ζ dieron indicios de que a pH alcalino existen fracciones con carga neta negativa, no detectadas por CZE. Toda esta evidencia demuestra la obtención de una mezcla de oligómeros, con carga neta positiva o negativa (cuya densidad es dependiente del pH).

Las fracciones neutras detectadas a pH superior a 6.0 en los experimentos de CZE y ζ permanecerían en solución posiblemente como parte de macroagregados solubles en agua, o bien porque se trata de oligómeros con distribución estadística de grupos funcionales [9]. La formación de estos macroagregados de oligómeros, solubles en agua, cuyo tamaño se vio incrementado con la edad de la solución, fue confirmada por SEC y por experimentos de medición de tamaño de partícula por dispersión de la luz. Estos macroagregados solubles podrían experimentar disrupción por efecto de la dilución en la bolsa de diálisis, con el pasaje de algunas moléculas al medio externo y la cristalización de otras en el medio interno. También podrían desagregarse bajo el campo eléctrico usado en los experimentos de CZE, lo que permitiría la observación de las moléculas constitutivas.

La aplicabilidad de estos materiales en la formación de cápsulas huecas y de agregados con colorantes, resultó un último indicio a favor de la obtención de oligómeros funcionalizados, como se verá en el Capítulo 4 [15]. En vista de la versatilidad de los materiales obtenidos y de su aplicabilidad en diferentes áreas, en el año 2013 fue presentada la solicitud de patente de esta estrategia novedosa de síntesis [16].

3.8. Referencias del Capítulo 3

1. Lázaro Martínez, J.M.; Chattah, A.K.; Torres Sánchez, R.M.; Buldain, G.Y.; Campo Dall'Orto, V. *Polymer* 2012, 53, 1288.
2. Heise, M.S.; Martin, G.C. *J. Appl. Polym. Sci.* 1990, 39, 721.
3. Leal Denis, M.F.; Carballo, R.R.; Spiaggi, A.J.; Dabas, P.C.; Campo Dall'Orto, V.*; Lázaro Martínez, J.M. *React. Funct. Polym.* 2008, 68, 169.
4. Denaday, L.R.; Miranda, M.V.; Torres Sánchez, R.M.; Lázaro Martínez, J.M.; Lombardo Lupano, L.V.; Campo Dall'Orto, V. *Biochem. Eng. J.* 2011, 58-59, 57.
5. Lázaro Martínez, J.M.; Leal Denis, M.F.; Campo Dall'Orto, V.; Buldain, G.Y*. *Eur. Polym. J.* 2008, 44, 392.
6. Schriever, J., Leyte, J.C. *Polymer* 1977, 18, 1185.
7. Hoagland, D.A.; Smisek, D.L.; Chen, D.Y. *Electrophoresis* 1996, 17, 1151.
8. Zhao, T.; Chen, K.; Gu, H. *J. Phys. Chem. B* 2013, 117, 14129.
9. Lowe, A.B.; McCormick, C.L. *Chem. Rev.* 2002, 102, 4177.
10. ElMiloudi, K.; Benygzer, M.; Djadoun, S.; Sbirrazzuoli, N.; Geribaldi, S. *Macromol. Symp.* 2005, 230, 39.
11. Patrickios, C.S.; Strittmatter, J.A.; Hertler, W.R.; Hatton, T.A. *J. Colloid Interf. Sci.* 1996, 182, 326.
12. Goloub, T.; De Keizer, A.; Stuart, M.A.C. *Macromolecules* 1999, 8441.
13. Creutz, S.; Garcia, M.; Mahltig, B.; Stamm, M.; Je, R. *Macromolecules* 2000, 6378.
14. Mironov, M.A.; Shulepov, I.D.; Ponomarev, S.; Bakulev, V.A. *Colloid Polym. Sci.* 2013, 291, 1683.
15. Lombardo Lupano, L.V.; Lázaro Martínez, J.M.; Vizioli, N.M; Torres, D.I.; Campo Dall'Orto, V*. *Macromol. Mater. Eng.* 301 (2) (2016) 167.
16. Solicitud de Patente nº: 20130101144. Fecha de solicitud: 09/04/2013. Fecha de publicación: 28/01/2015. Nº de documento: AR091332 A1. Inventores: Campodall'Orto V., Lombardo Lupano, L.L., Del Rio L.A., Lázaro Martínez J.M. Título: "Proceso para preparar plianfolitos solubles en agua derivados de ácido metacrílico, imidazoles y un diepóxido."

CAPÍTULO 4

ESTUDIOS DE APLICABILIDAD DE LOS MATERIALES DESARROLLADOS

En este Capítulo se exploran potenciales aplicaciones de los materiales desarrollados, seleccionadas sobre la base de sus propiedades físicas y químicas. Los polímeros resultaron aptos para la adsorción o captación de iones disueltos debido a su elevada funcionalización, y se exploró este aspecto particular con compuestos modelo que pueden encontrarse en efluentes de la industria textil. Asimismo, los complejos con cationes de elementos de transición resultaron excelentes catalizadores de la activación de H_2O_2 , un agente oxidante de bajo impacto ambiental que puede utilizarse en procesos de decoloración de estos efluentes.

Las macromoléculas solubles en agua pudieron ser ensambladas en combinación con Fe(II) / ácido cítrico para dar lugar a esferas huecas que podrían emplearse en formulaciones para la liberación controlada de fármacos.

Y el complejo peroxidasa – polianfolito pudo ser incorporado en un sistema de análisis por inyección en flujo para la detección directa o indirecta de sustratos de la enzima.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada caso y se discuten los potenciales ámbitos de aplicación.

4.1. Decoloración de Naranja de metilo (MO)

Los colorantes sintéticos con uniones azo constituyen el mayor grupo de colorantes industriales producidos anualmente y son resistentes a la degradación en condiciones anaeróbicas.

En trabajos precedentes se describió la captación de compuestos orgánicos (modelo de contaminantes de cuerpos de agua) sobre los materiales insolubles sintetizados por nuestro grupo, así como su degradación mediante oxidación [1].

Considerando las características de los complejos con Co(II) y Cu(II), desarrolladas en los Capítulos precedentes se decidió evaluar el desempeño de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI), Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) como catalizadores de la activación de H_2O_2 para la oxidación radicalaria de Naranja de Metilo (MO), colorante azo-aniónico usado como compuesto modelo.

En los sistemas heterogéneos, la decoloración de soluciones de MO ocurre por dos fenómenos paralelos: captación del colorante sobre el material particulado y degradación oxidativa por especies reactivas del oxígeno [1].

Se espera que el proceso de degradación oxidativa sea más lento que el de captación, porque en este último sólo está involucrado un fenómeno de transporte de masas y la formación de enlaces no covalentes. En cambio, la degradación oxidativa involucra el transporte de masa del H_2O_2 al catalizador insoluble, la formación de radicales libres sobre la superficie de la partícula, el transporte de masa de los productos radicalarios hacia el seno de la solución y la reacción química de oxidación del colorante en solución, en paralelo con la eventual aparición de especies intermediarias con actividad catalítica en los sitios activos de las partículas. En este último caso, las moléculas de MO deberían ser transportadas a la superficie de las partículas para ser oxidadas por las especies intermediarias.

Los objetivos del trabajo abarcaron el estudio de la eficiencia del fenómeno de decoloración así como también el estudio de los fenómenos inherentes al proceso. En primer lugar, se quiso verificar la actividad oxidante de H₂O₂ activado por los complejos estudiados. Luego, se abordó la elucidación de detalles del proceso tales como si era efectivamente una reacción en fase heterogénea. Asimismo, si, al ser un catalizador, como tal, debería mantener su actividad catalítica luego de varios ciclos de catálisis.

En los estudios preliminares realizados empleando complejos de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI), se observó una captación muy notoria del colorante sobre las partículas del catalizador, motivo por el que se utilizaron soluciones de MO en Na₂SO₄ 0.1 M para minimizar esta interacción. En este caso, se estableció una competencia entre ambas especies iónicas por los sitios de unión del polímero, que resultó en una menor captación del colorante. Para preparar el medio de reacción se seleccionó SO₄²⁻, se descartaron nitratos, cloruros (producen *quenching* de radicales libres) y fosfatos (favorecen la desorción del Co(II) por lo que parte de la catálisis ocurre en medio homogéneo). Esta estrategia también fue ensayada para los complejos de *Poly*(EGDE-DA), pero el uso del catalizador en presencia de iones SO₄²⁻ favoreció su desintegración.

En una primera aproximación, se verificó la disminución de la concentración de MO en la solución por simple captación por el material particulado, en tanto que para el estudio de decoloración que involucra captación y degradación, se trabajó en presencia de H₂O₂. Para demostrar que el material actuaba como catalizador del proceso de activación de H₂O₂, se realizaron varios ciclos de reacción recuperando y reutilizando la misma muestra del sólido, tal como se describe en el Capítulo 6.

Por último, se realizaron experimentos con la finalidad de elucidar detalles relativos al mecanismo de degradación oxidativa del MO: el rol de la matriz sólida, la posible participación de los centros metálicos como especies intermediarias en la reacción de oxidación, como un posible centro peroxo-metálico.

Los estudios cinéticos de decoloración de MO en ausencia y en presencia de H₂O₂ exhibieron un decaimiento exponencial y fueron ajustados al modelo empírico de pseudo-primer orden.

$$[MO]_t = [MO]_{capt} \times e^{-k_{capt} \times t} + [MO]_{deg} \times e^{-k_{deg} \times t} + [MO]_{\infty} \quad (1)$$

Los parámetros se distribuyen en tres términos de la ecuación, dos de los cuales corresponden a un proceso diferente de decoloración y el tercero se refiere al MO que permanece en solución. Así, $[MO]_{capt}$ es la cantidad total de MO por litro de solución que sería removida por captación; y $[MO]_{deg}$ es la cantidad total de MO por litro de solución que sería removida por degradación en presencia de H₂O₂. $[MO]_{\infty}$ representa el MO libre que permanece en solución sin degradarse; o bien se descompone a una velocidad muy baja, ya que generalmente se observa remoción completa luego de 24 horas de reacción en presencia de H₂O₂. A cada proceso se le asignó una constante de pseudo-primer orden (k).

Comentario: Se observó que los valores de los parámetros relacionados con el proceso de captación presentaban una diferencia entre replicados superior a la de los parámetros relacionados con el proceso de degradación. Esto puede deberse a la dependencia de la captación con la convección en el sistema heterogéneo, difícil de reproducir de manera exacta entre experimentos. Se constató que los valores de k_{deg} no diferían significativamente entre replicados.

Por esta razón en las Figuras de este Capítulo se presentan los resultados experimentales de uno de los replicados de cada experimento.

4.1.1. Complejo de *Poly(EGDE-MAA-2MI)* con Co(II)

4.1.1.1. Estudios cinéticos

En la Tabla 1.A y B se exhiben los parámetros estimados para Co(II)-*Poly(EGDE-MAA-2MI)*. La Tabla 2.A y B corresponde a Co(II)-*Poly(EGDE-DA)* y la Tabla 3.A y B corresponde a Cu(II)-*Poly(EGDE-DA)*.

En ausencia de H₂O₂, MO fue captado por Co(II)-*Poly(EGDE-MAA-2MI)* a partir de la solución 41 ± 1 μM, y la cantidad unida dependió de la composición del medio. En agua destilada, el 52 % de MO fue removido en menos de una hora. El resto fue captado más lentamente por la matriz. Por otra parte, el Na₂SO₄ disuelto, ejerció una clara inhibición de la captación del MO sobre las partículas, ya que sólo el 6.3 % de la cantidad inicial del MO resultó removido de la solución (Figura 1).

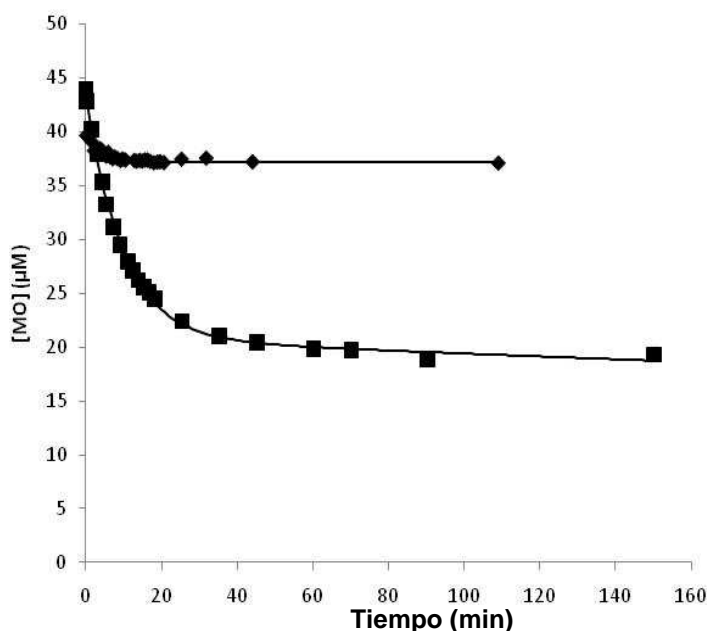


Figura 1: Perfil de concentración de MO debido a la captación sobre Co(II)-*Poly(EGDE-MAA-2MI)*: en Na₂SO₄ 0.1 M (◆) y en agua destilada (■). El experimento fue llevado a cabo en ausencia de H₂O₂, usando 0.1000 g de Co(II)-*Poly(EGDE-MAA-2MI)* en 100 mL de solución de MO 41 ± 1 μM.

En presencia de H₂O₂, se asignó el proceso de captación a aquél término de la ecuación empírica que presentó el valor más alto de *k*, debido a que es considerado el proceso más rápido (Tabla 1.B).

En un estudio comparativo, se procedió a oxidar MO en un sistema homogéneo constituido por Co(II) 0.35 mM y H₂O₂ 63 mM. En este medio se oxidó menos del 2 % del colorante en 1 hora de reacción, indicativo de que la cantidad de radicales libres generados por las especies de Co(II) solubles en su interacción con H₂O₂ fue despreciable.

Tabla 1.A. Parámetros y errores estándar estimados para los cambios en la concentración de MO debidos a la captación sobre partículas de Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI), a partir del modelo empírico presentado en la Ecuación 1. La captación fue ensayada en dos medios diferentes (Na₂SO₄ 0.1 M y agua destilada), usando 0.1000 g de sólido en 100 mL de solución de MO 41 ± 1 μM.

Captación de MO en 0.1M Na ₂ SO ₄		Captación de MO en agua	
$[MO]_{capt}$ (μM)	2.51 ± 0.10	$[MO]_{capt 1}$ (μM)	22.59 ± 0.38
k_{capt} (min ⁻¹)	0.246 ± 0.022	$k_{capt 1}$ (min ⁻¹)	0.1011 ± 0.0035
$[MO]_{\infty}$ (μM)	37.19 ± 0.05	$[MO]_{capt 2}$ (μM)	20.80 ± 0.36
		$k_{capt 2}$ (min ⁻¹)	0.0007 ± 0.0002
R ²	0.9545	R ²	0.9982

Tabla 1B. Parámetros y errores estándar estimados para los cambios en la concentración de MO debidos a los fenómenos conjuntos de captación sobre partículas de Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) y degradación, a partir del modelo empírico presentado en la Ecuación 1. La captación fue ensayada en dos medios diferentes (Na₂SO₄ 0.1 M y agua destilada), usando 0.1000 g de sólido en 100 mL de solución de MO 41 ± 1 μM y H₂O₂ 63 mM. El catalizador fue evaluado en su primer ciclo de uso, y en un segundo ciclo con previa recarga de Co(II).

Condición	Decoloración de MO en agua primer ciclo catalítico	Decoloración de MO en Na ₂ SO ₄ 0.1M primer ciclo catalítico	Decoloración de MO en Na ₂ SO ₄ 0.1M segundo ciclo catalítico; Co(II) recargado
	$[MO]_{capt}$ (μM)	9.09 ± 0.56	1.96 ± 0.14
k_{capt} (min ⁻¹)	0.343 ± 0.047	0.558 ± 0.079	0.036 ± 0.018
$[MO]_{deg}$ (μM)	21.96 ± 0.51	29.09 ± 0.20	19.3 ± 2.9
k_{deg} (min ⁻¹)	0.0174 ± 0.0014	0.0092 ± 0.0010	0.0075 ± 0.0024
$[MO]_{\infty}$ (μM)	9.33 ± 0.63	9.50 ± 0.22	13.7 ± 1.4
R ²	0.9990	0.9991	0.9862

Para Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) en presencia de H₂O₂ y Na₂SO₄ 0.1 M, puede observarse que sólo un 4.8 % de MO fue captado sobre el catalizador, y 71.7 % fue degradado por acción de los radicales. Además, la cantidad de MO captada fue cercana a la estimada en ausencia de H₂O₂. Por otra parte, solamente el 54.4 % de MO fue degradado en agua destilada, pero la constante cinética fue 1.89 veces mayor que la k_{deg} estimada en medio salino (Figura 2).

Considerando ambas vías de decoloración (captación y degradación), cerca del 70 % de MO fue removido de agua destilada en 120 minutos. Sin embargo, en Na₂SO₄ 0.1 M el mismo porcentaje de decoloración requirió 260 minutos.

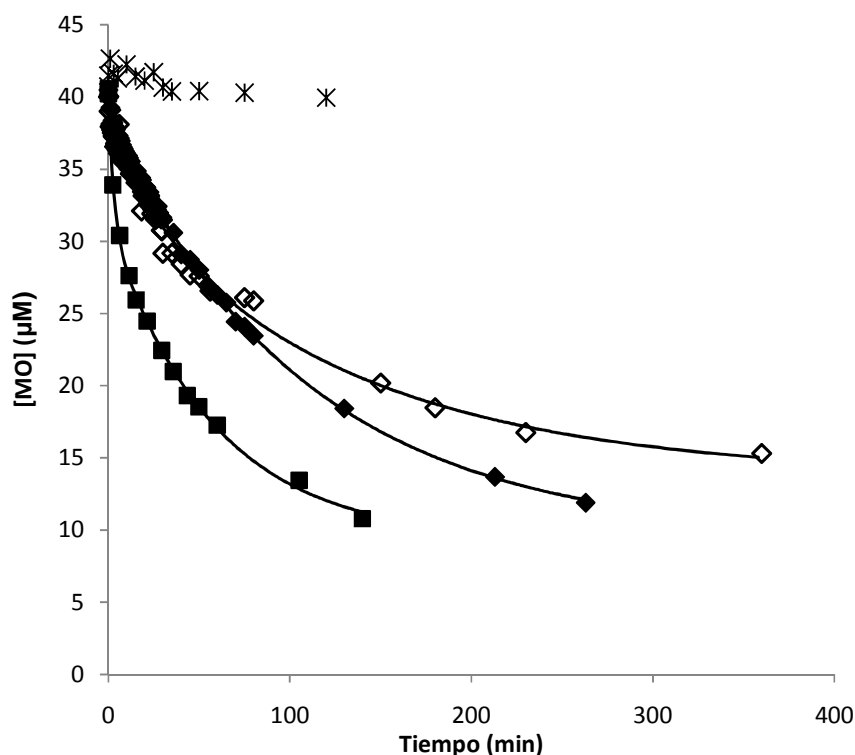


Figura 2. Perfil de concentración de MO en el sistema heterogéneo, consistente en 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) en 100 mL de MO $41 \pm 1 \mu\text{M}$ y H_2O_2 63 mM. Los medios de reacción fueron: Na_2SO_4 0.1 M (◆) y agua destilada (■). El catalizador fue recargado con Co(II) después del primer ciclo de reacción, y el experimento fue repetido en Na_2SO_4 0.1 M (◇). El sistema homogéneo también fue probado con MO 41 μM , Co(II) 0.35 mM, H_2O_2 63 mM y Na_2SO_4 0.1 M (*).

4.1.1.2. Estudios de estabilidad química del MO captado por las partículas de catalizador

Aquí es necesario mencionar que el MO adherido a las partículas de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) continuó observándose aún después de la decoloración completa de la solución de MO en contacto con H_2O_2 . Entonces, se llevaron a cabo experimentos control con el fin de medir la estabilidad química del colorante captado por las partículas.

En el primer experimento control, el MO fue adherido a partículas de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI). En paralelo, una solución de H_2O_2 fue puesta en contacto con otras partículas sólidas de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) durante 10 minutos, con el fin de activar el H_2O_2 y producir la máxima concentración de radicales libres. Luego, el Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) con el colorante adherido fue puesto en contacto con la solución de H_2O_2 activada previamente. Se observó una decoloración parcial de las partículas durante los primeros 60 minutos de contacto y la completa ausencia de MO adherido, después de 8 horas.

Cuando el experimento control fue repetido sin el paso previo de activación de H_2O_2 , es decir, la activación del H_2O_2 se produjo por el material con el colorante adherido, el color de MO sobre el material se conservó durante los primeros 60 minutos, pero fue completamente decolorado luego de 12 horas de contacto. Esto demuestra que, evidentemente, el colorante inmovilizado fue también susceptible de la degradación oxidativa, y el material pudo producir la activación del

H₂O₂, aún con el colorante adherido. Sin embargo, este MO adherido afectó en cierta medida la cinética de activación de H₂O₂.

4.1.1.3. Efecto de las proporciones catalizador / solución de MO

El efecto de la cantidad de catalizador sobre la velocidad de decoloración también fue estudiado. Cuando se modificó el volumen de solución respecto de la masa de catalizador de 1 a 2.5 en agua destilada, se registró un incremento del 33.4% en la cantidad de MO degradado por litro de solución, y una disminución del 85.6 % en la k_{deg} , comparando con los parámetros correspondientes en una relación igual a 1 (Figura 3 y Tabla 2).

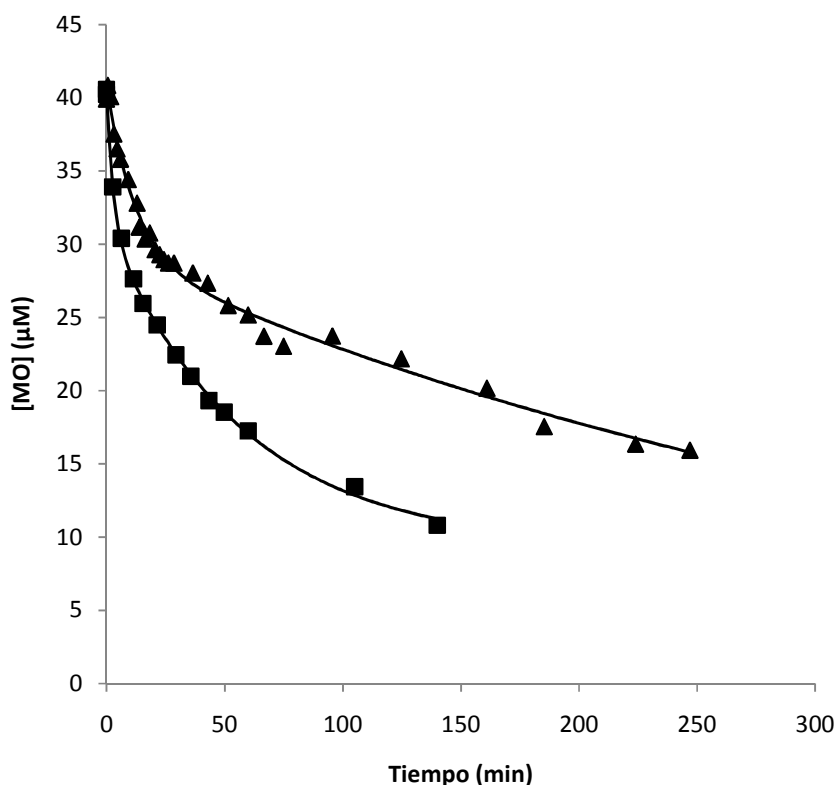


Figura 3. Perfil de concentración de MO en presencia de Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂ 63 mM en agua destilada con una relación de *volumen de solución (L) a masa de catalizador (g)* de 2.5 (▲) y 1 (■).

Además, cuando se probó una concentración inicial de H₂O₂ inferior a la que se utilizó en los primeros ensayos, se vio particularmente afectada la cantidad de MO adherido por litro de solución, y disminuyó la k_{deg} , como se esperaba.

Con respecto a los productos de degradación de MO obtenidos, en el espectro UV-visible de los extractos tratados se encontraron bandas de absorción a 400 nm aun cuando la solución se observó completamente decolorada (Figura 4). Esto fue consistente con la presencia de productos aromáticos, lo que demuestra que no fue conseguida una mineralización completa [2-4].

Tabla 2. Parámetros y errores estándar estimados para los cambios en la concentración de MO debidos a captación y degradación por el sistema heterogéneo Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂ en agua destilada, a partir del modelo empírico presentado en la Ecuación 1. La reacción fue probada usando dos diferentes concentraciones iniciales de H₂O₂ ([H₂O₂]₀) y dos diferentes relaciones de *volumen de solución* (L) / *masa de catalizador* (g).

<i>volumen</i> / <i>masa</i>	1	2.5	1	2.5
[H ₂ O ₂] ₀ (mM)	63	63	42	42
[MO] _{capt} (μM)	9.09 ± 0.56	11.53 ± 0.57	21.69 ± 0.56	20.20 ± 0.46
k _{capt} (min ⁻¹)	0.343 ± 0.047	0.0834 ±0.0095	0.0905 ± 0.0027	0.0676 ±0.0033
[MO] _{deg} (μM)	21.96 ± 0.51	29.30 ± 0.52	18.08 ± 0.28	22.70 ± 0.45
k _{deg} (min ⁻¹)	(17.4±1.4) x 10 ⁻³	(2.5±0.2)x 10 ⁻³	(11.0±0.9)x10 ⁻³	(0.8±0.2)x 10 ⁻³
[MO] _∞ (μM)	9.33 ± 0.63	-	2.95 ± 0.48	-
R ²	0.9990	0.9920	0.9999	0.9964

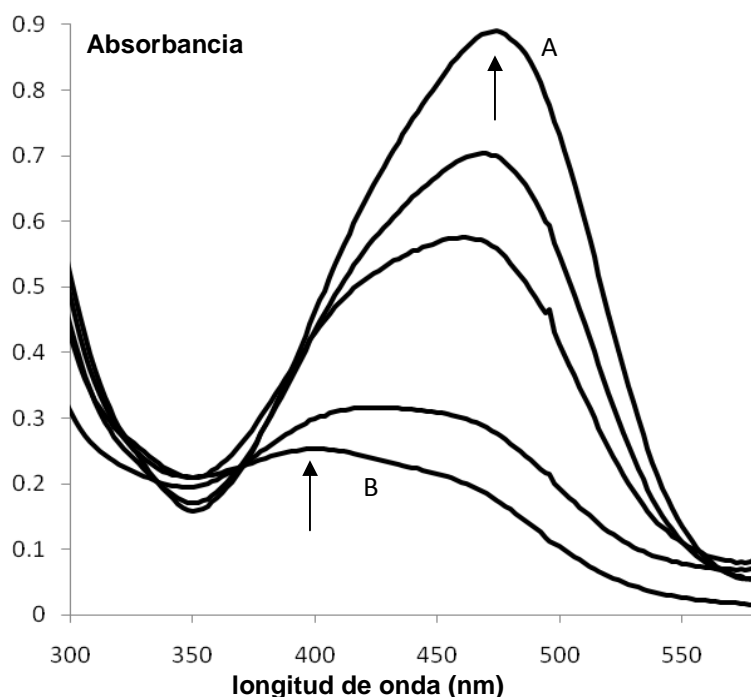


Figura 4. Espectros UV- visible de la reacción de MO 41 μM con el sistema Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂ 63 mM en Na₂SO₄ 0.1 M a diferentes tiempos de contacto: 0 (A) y 6 h (B).

4.1.1.4. Estudio de los mecanismos probables de degradación de MO

Los siguientes experimentos se planificaron con el propósito de poner en evidencia el/los mecanismo/s de degradación de MO, el papel de la matriz sólida y la potencial participación de especies intermediarias de cobalto en la reacción oxidativa de MO.

Dicho en otros términos, se quiso establecer si la oxidación de MO ocurría solamente en medio homogéneo y era debida a la acción de los radicales libres producidos por la activación de H₂O₂, o si además el H₂O₂ generaba cambios en la superficie del material transformándola en una superficie catalítica que actúa directamente sobre las moléculas de MO.

Tabla 3: Protocolo de trabajo para evidenciar productos e intermediarios

Material	Reacción ^a	Sobrenadante	Sólido	Reacción con solución de MO	Sistema final ^b
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	✓	-	✓	41 μM	Sólido activado
Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-MAA-2MI)	✓	✓	-	41 μM luego de la mezcla, al inicio del experimento	Sobrenadante activado
Me(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	✓	-	✓	41 μM	Sólido activado
Me(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	✓	✓	-	41 μM luego de la mezcla, al inicio del experimento	Sobrenadante activado

^a Reacción durante 10 minutos con H₂O₂, seguido de filtración

^b Se evaluó cada fenómeno aislado, así como la contribución de la sumatoria de ambos fenómenos.

El protocolo resumido en la Tabla 3, puede explicarse de la siguiente manera. En primer lugar, se hizo reaccionar Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) con una solución de H₂O₂ durante 10 minutos (en ese período se produce la mayor concentración de radicales libres), luego de los cuales se lo separó de la solución por filtración. El precipitado, llamado aquí “sólido activado”, se puso en contacto con una solución de MO 41 μM y se monitoreó el decaimiento de la absorbancia a 464 nm. Por otro lado, se tomó el sobrenadante y se mezcló con una solución de MO, en una concentración resultante inicial de 41 μM. Esta mezcla será denominada “sobrenadante activado”.

Se graficó la concentración de MO en función del tiempo para la reacción con el sistema completo, el control de captación de MO y un ciclo operativo obtenido con el “sobrenadante activado”. Asimismo, se graficó la contribución de fenómenos independientes (control de captación y reacción con el “sobrenadante activado”) como la suma de ambos comportamientos y se comparó con el perfil obtenido para la reacción de decoloración completa (Figura 5).

Analizando el comportamiento del “sobrenadante activado” (Figura 5) se observó que la concentración del colorante exhibió una fase lag de 10 minutos, seguida de un decaimiento exponencial de pseudo-primer orden con una k_{deg} de $(8.9 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Estos parámetros coincidieron con los determinados previamente para el sistema completo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI)/ H₂O₂ 63 mM, es decir k_{deg} de $(9.2 \pm 1.0) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (Tabla 1.B). En esta solución denominada “sobrenadante activado”, la degradación de MO puede ser atribuida exclusivamente a la acción oxidativa de los radicales libres del H₂O₂ previamente activado. Un experimento control llevado

a cabo con MO y H₂O₂ en ausencia del catalizador, no exhibió ningún cambio en la absorbancia de la solución de MO (Figura 5).

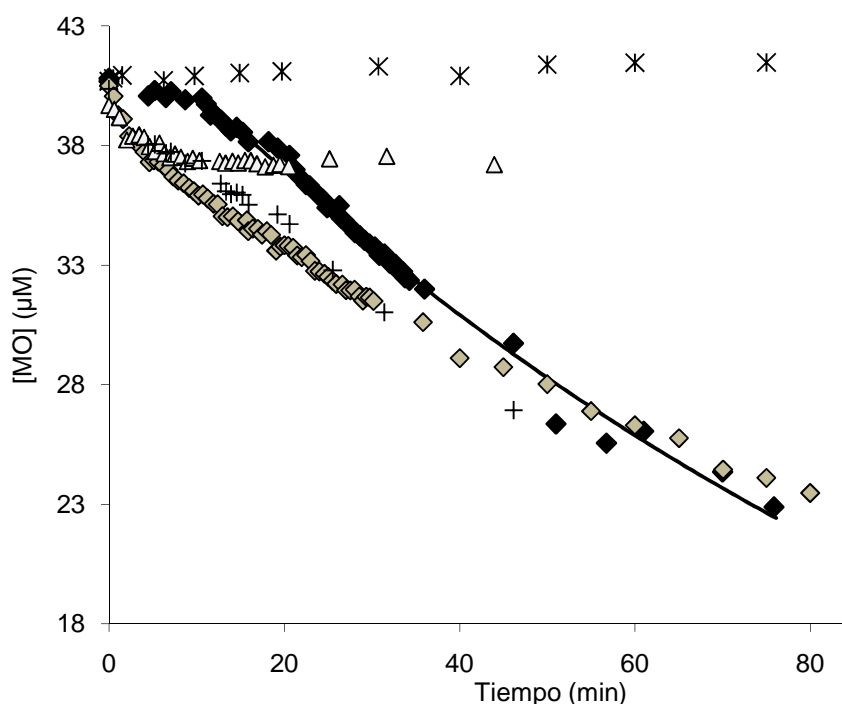


Figura 5. Perfil de concentración de MO en Na₂SO₄ 0.1 M bajo diferentes condiciones experimentales: con H₂O₂ 63 mM (*); con Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) (▲); con Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂ 63 mM (▼); con el “sobrenadante activado” usando el sistema Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂ 63 mM (tiempo de contacto con el catalizador: 10 minutos) (◆); la suma de los efectos individuales de la captación de MO y de la degradación por el “sobrenadante activado” (+).

Por otra parte, cuando fueron combinados los resultados independientes obtenidos a partir de la captación de MO sobre el catalizador, con los resultados de la degradación de MO por acción de los radicales libres en el “sobrenadante activado”, el perfil resultante coincidió claramente con la decoloración de MO realizada con el sistema heterogéneo completo ((+) y (▼), respectivamente en Figura 5).

En una segunda aproximación, se buscó poner en evidencia la formación de especies intermediarias de Co(II) y estudiar su rol en la degradación de MO. En esta ocasión, las partículas sólidas de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fueron activadas con H₂O₂ para luego ser puestas en contacto con una solución de MO. El perfil resultante de la concentración de MO resultó consistente con un proceso de decoloración por captación sobre el sólido.

Luego, la activación del sólido con H₂O₂ fue repetida dos veces más, y el “sólido activado” fue puesto en contacto con la misma solución de MO después de cada ciclo de activación, que resultó en una pequeña disminución de la concentración de MO cuando se alcanzó el equilibrio. En este caso, el MO adherido en el primer contacto parecería haber sido degradado durante el segundo ciclo de activación, con la subsecuente regeneración de algunos sitios de unión. Si alguna especie

intermediaria del Co(II) se formó durante la activación del catalizador, no se encontró suficiente evidencia sobre su actividad catalítica directa en la degradación oxidativa de MO (Figura 6).

Sobre la base de esta evidencia experimental, se concluye que el mecanismo principal de degradación de MO involucraría la acción oxidativa de los radicales libres presentes en el seno de la solución. La contribución directa en la oxidación de MO, de una hipotética especie intermediaria peroxo-cobalto en las partículas del catalizador, sería mínima. El MO unido a las partículas de catalizador no sería degradado por los sitios catalíticos; en lugar de ello el colorante sufriría el ataque oxidativo de $O_2^{\bullet-}$ presente en la solución, y sería decolorado con una cinética más lenta que la correspondiente a la degradación de moléculas disueltas.

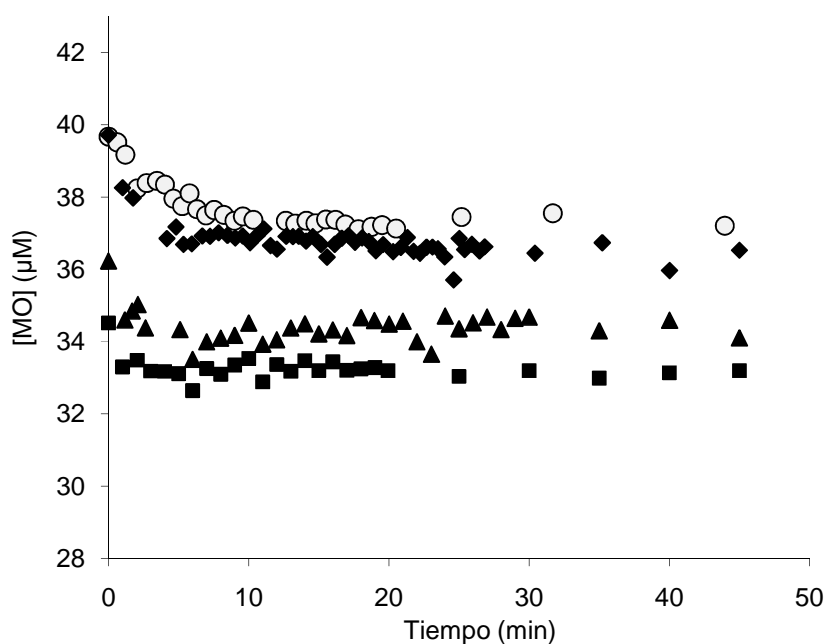


Figura 6. Perfil de concentración de MO en presencia de Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) activado y en ausencia de H_2O_2 : primer (◆), segundo (▲) y tercer (■) ciclo de contacto con solución de MO en Na_2SO_4 0.1 M. La captación de MO sobre Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) no activado en ausencia de H_2O_2 también es presentada (O).

4.1.1.5. Reciclado del catalizador y estabilidad química

Se recuperó el complejo Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) para su reutilización en tres ciclos operativos de 30 minutos cada uno, con el propósito de confirmar que este material no es un reactivo oxidante, y para demostrar la actividad catalítica del sólido.

Durante el primer ciclo operativo de 30 minutos en Na_2SO_4 0.1M se produjo la captación en simultáneo con la degradación de moléculas de MO, por lo que se esperaba que en los dos ciclos sucesivos sólo tuviera lugar el proceso de degradación. En el tercer ciclo, sólo el 27 % de MO fue degradado, y la k_{deg} resultó ser el 82 % del valor obtenido en el primer ciclo operativo (Figura7).

Sobre la base de estos resultados, se consideró que la pérdida de eficiencia en los ciclos sucesivos podría deberse a una pérdida de iones Co(II). Para ello, se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia atómica, el Co(II) remanente en solución para tres ciclos operativos de catálisis. La máxima capacidad de carga del polianfolito para el ion Co(II) fue determinada en $26 \pm 3 \text{ mg g}^{-1}$.

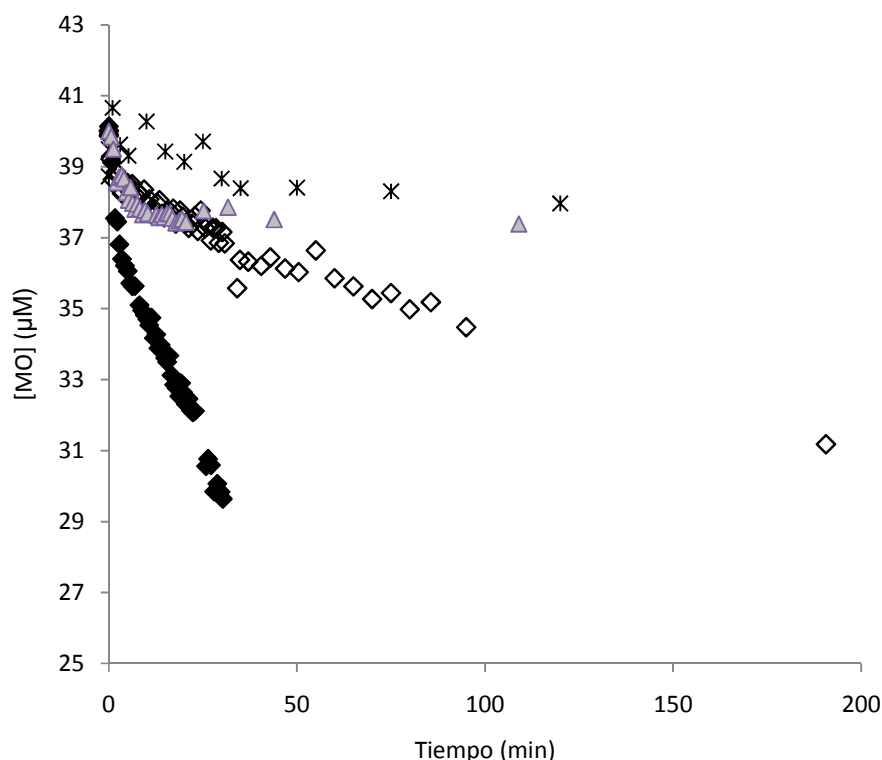


Figura 7. Perfil de concentración de MO en presencia de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂ 63 mM en Na₂SO₄ 0.1M: primer ciclo operativo de catálisis (◆) y tercer ciclo operativo de catálisis (◇). Control de captación de MO en ausencia de H₂O₂ (▲); reacción de MO y H₂O₂ en presencia de Co(II), en sistema homogéneo (*).

En nuestro sistema, se encontró una liberación de 88.4 μg de Co(II) en 10.0 mL de reacción una vez alcanzado el equilibrio luego del primer ciclo operativo, lo que representó el 34.0 % del total de Co(II) en el sistema. Debemos destacar que esta solución recuperada del primer ciclo operativo no exhibió actividad catalítica cuando se le agregó más MO y H₂O₂; es decir, si bien había Co(II) en solución, éste no se encontraba complejado con ligandos orgánicos o bien el complejo formado en solución no logró activar el H₂O₂ adicionado. Por otra parte se observó que la cantidad de Co(II) liberado no dependió de la composición iónica del medio de reacción.

Para el segundo y tercer ciclo operativo de catálisis, se detectó 19.4 μg (7.46 %) y 0.92 μg (0.35 %), respectivamente. Esto implica que cerca del 40 % del Co(II) captado interactuó débilmente con el polianfolito, en tanto que la otra fracción fue fuertemente retenida por la matriz y estuvo disponible en los sucesivos ciclos operativos. Aquí, el H₂O₂ actuando como ligando de Co(II) en la reacción de activación, competiría con los ligandos más débiles del polímero por la coordinación del catión, lo que condujo a la liberación de una fracción del Co(II) del catalizador heterogéneo.

A partir de esta información se evaluó la posibilidad de recargado del material para devolver al sistema las condiciones iniciales y ver si en ese caso se restauraban sus propiedades. Para explorar la regeneración del catalizador luego del primer ciclo operativo, el material usado fue recuperado, recargado con Co(II) y evaluado nuevamente en la activación de H₂O₂ para la decoloración de soluciones de MO (Figura 2). Aquí se observó que la k_{deg} no varió significativamente cuando fue comparada con la del primer ciclo catalítico, lo que mostró que la

eficiencia en activación de H₂O₂ se recuperó con la recarga de Co(II) (Tabla 1B). Por otra parte, la k_{capt} decreció en un 93.5 % en tanto que $[MO]_{capt}$ no presentó una variación significativa, lo que indicaría que se produjeron ciertos cambios reversibles (probablemente conformacionales) en las partículas de catalizador como resultado del tratamiento. Las moléculas de MO con carga negativa debida a la presencia de grupos $-SO_3^-$, interactuarían con los residuos 2MI polimerizados a medida que estos grupos resultan protonados luego de la liberación de H⁺ en el proceso de activación de H₂O₂.

A partir de estos resultados se concluyó que el catalizador necesita ser recargado con Co(II) entre ciclos operativos para conseguir la mayor eficiencia.

4.1.2. Complejos de *Poly*(EGDE-DA) con Co(II) y con Cu(II)

4.1.2.1. Estudios cinéticos

El proceso de decoloración de MO también se probó con los sistemas heterogéneos Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H₂O₂ 63 mM y Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H₂O₂ 63 mM.

En reportes precedentes se menciona que el Cu(II) en presencia de H₂O₂ en sistema homogéneo, al igual que el Co(II), oxida menos del 10 % del MO disuelto en una hora [1].

Los primeros estudios de interacción entre MO y los materiales mencionados fueron realizados en ausencia de H₂O₂, y se observó que el 64.4 % del MO fue captado por Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y 47.7 % por Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) (Tabla 4).

Los sitios de unión más probables de las moléculas de MO con carga negativa sobre estos materiales, son los residuos $-R_2NH^+$ provenientes del monómero DA y los cationes adheridos.

En presencia de H₂O₂ 63 mM, la cantidad de MO unida fue menor en ambos sistemas. La fracción de MO degradada por H₂O₂ activado fue 40 % con Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y 71 % con Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA). El parámetro k_{deg} relacionado con la oxidación de MO fue 17.2 veces mayor con Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) que con Co(II)-*Poly*(EGDE-DA).

Tabla 4. Parámetros y errores estándar estimados del modelo cinético de pseudo-primer orden para la decoloración de soluciones de MO mediante activación de H₂O₂ empleando Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) o Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA). Concentración de MO inicial: 42 μM.

Parámetros	1 ^{er} ciclo operativo de	Captación de MO por	1 ^{er} ciclo operativo de	Captación de MO por
	Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	Co(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	Cu(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)	Cu(II)- <i>Poly</i> (EGDE-DA)
	[H ₂ O ₂] ₀ : 63 mM	sin H ₂ O ₂	[H ₂ O ₂] ₀ : 63 mM	sin H ₂ O ₂
[MO] _{capt} (μM)	23.87 ± 0.30	28.23 ± 0.60	12.3 ± 1.4	19.46 ± 0.71
k_{capt} (min ⁻¹)	0.2867 ± 0.0077	0.234 ± 0.012	2.9 ± 1.4	0.81 ± 0.06
[MO] _{deg} (μM)	15.58 ± 0.25	-	29.7 ± 1.3	-
k_{deg} (min ⁻¹)	0.0102 ± 0.0006	-	0.175 ± 0.011	-
[MO] _∞ (μM)	-	15.50 ± 0.44	-	21.37 ± 0.18
R ²	0.9972	0.9893	0.9957	0.9706

La Figura 8 muestra que el 87 % de MO fue removido en 10 minutos con Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), en tanto que demoró 110 minutos con Co(II)-*Poly*(EGDE-DA). Cuando los catalizadores fueron reciclados, los sitios de captación para MO permanecieron ocupados por las moléculas unidas en la primera etapa, y se observó que $[MO]_{\infty}$ se incrementó en los dos ciclos sucesivos.

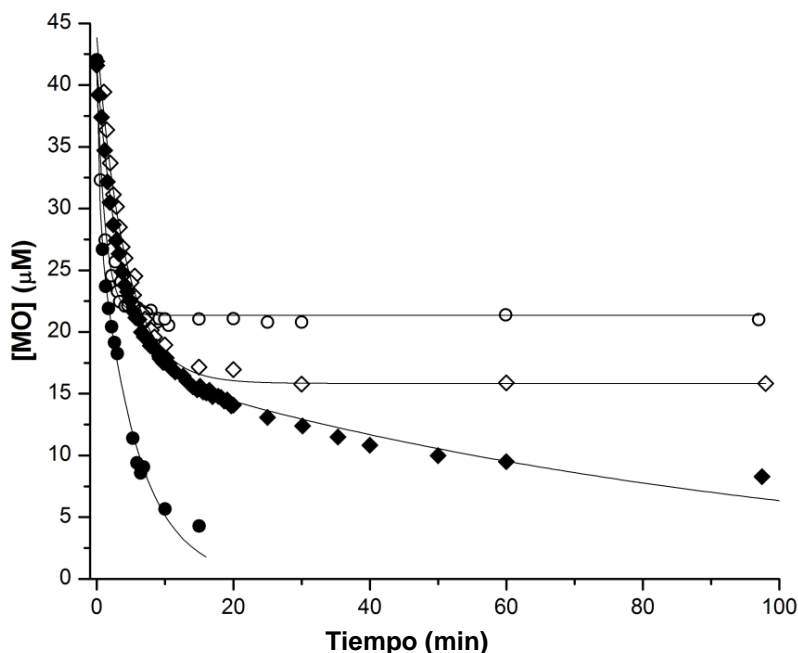


Figura 8. Perfil de concentración de MO en el sistema heterogéneo, que consistió en 100 mL de solución de MO 42 μ M en contacto con: 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y H₂O₂ 63 mM (◆); 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) (◇); 0.1000 g de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) y H₂O₂ 63 mM (●); y 0.1000 g de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) (○).

4.1.2.2. Comparación de eficiencia de los sistemas catalíticos basados en *Poly*(EGDE-DA) con Co(II) y con Cu(II)

Se comparó la eficiencia normalizada de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA). Cuando se usaron cantidades equimolares de sitios catalíticos en el medio de reacción (0.6 mmoles de sitios por litro de solución de MO), el 40.9 % del MO inicial fue decolorado por acción de H₂O₂ con Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) contra el 77.9 % con Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), y la k_{deg} fue 1.66 veces mayor para el catalizador con Cu(II) (Figura 9). El experimento control en ausencia de H₂O₂ mostró 67.3 % de captación de MO sobre Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) contra el 39.5 % sobre Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA), consistente con la mayor masa de complejo con Co(II) y menor masa de complejo con Cu(II) necesarias para obtener un número equimolar de sitios por volumen de solución.

A la luz de estos resultados, el catalizador con Cu(II) fue claramente más eficiente en términos cinéticos, y su menor capacidad de captación de MO colaboró para minimizar la pasivación de la superficie activa.

Para mejorar el desempeño del catalizador Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y evaluar la influencia de solutos adicionales, la decoloración de MO fue evaluada en dos diferentes medios de reacción: agua destilada y Na₂SO₄ 0.1 M. La cantidad de MO decolorado por degradación se incrementó un 50 % en presencia de sales inorgánicas, pero la k_{deg} resultó 3.39 veces mayor en agua destilada. Si

bien los iones inorgánicos contribuyeron a minimizar la captación de MO, produjeron cierto efecto inhibitorio sobre la oxidación química. Además, la estabilidad química de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) fue afectada en presencia de Na^+ y SO_4^{2-} , ya que se observó una pérdida parcial de complejo luego de cada ciclo operativo.

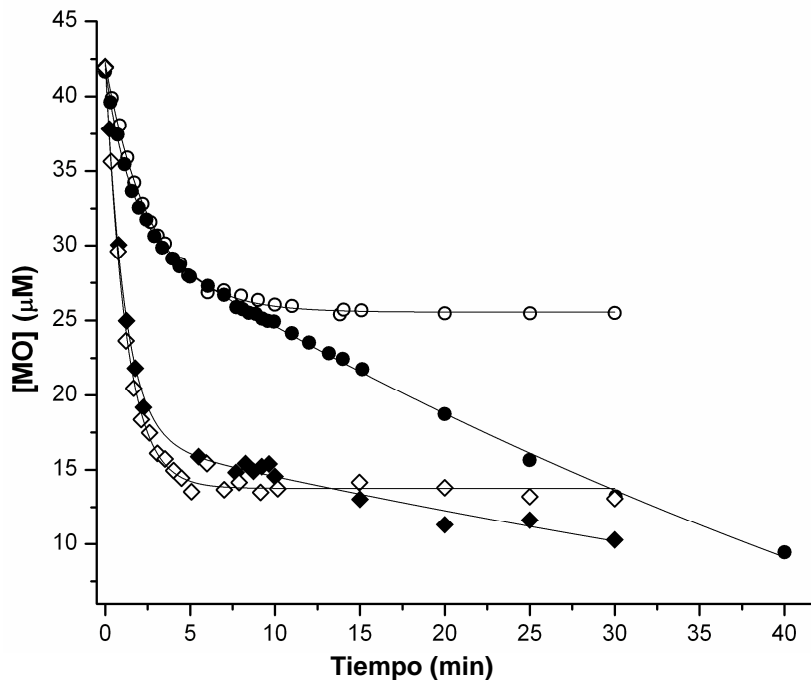


Figura 9. Perfil de concentración de MO en el sistema heterogéneo, que consistió en 0.06 mmol de sitios en 100 mL de solución de MO 42 μM . Las cantidades de complejos fueron: 0.6 mmol de Co(II) L^{-1} usando Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) en presencia de H_2O_2 63 mM (\blacklozenge); 0.6 mmol de Co(II) L^{-1} usando Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) (\diamond); 0.6 mmol de Cu(II) L^{-1} usando Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) en presencia de H_2O_2 63 mM (\bullet); 0.6 mmol de Cu(II) L^{-1} usando Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) (\circ).

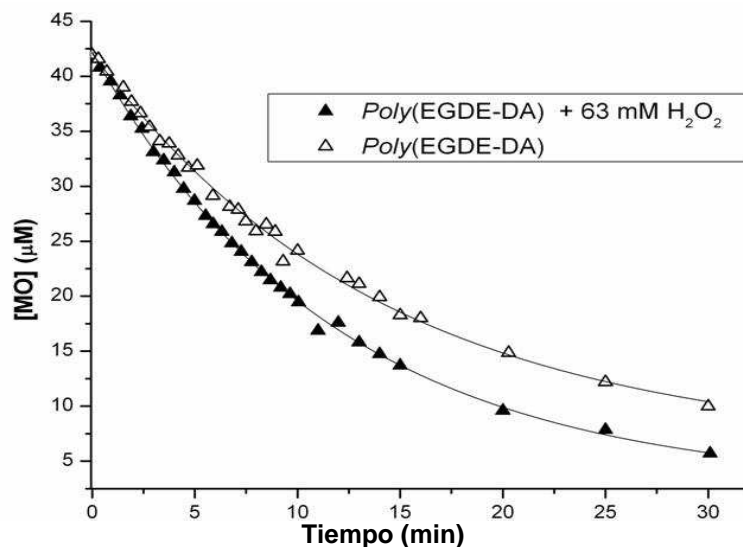


Figura 10. Perfil de concentración de MO en el sistema heterogéneo, que consistió en 100 mL de MO 42 μM en contacto con: 0.1000 g de *Poly*(EGDE-DA) y H_2O_2 63 mM (\blacktriangle); y 0.1000 g de *Poly*(EGDE-DA) (\triangle).

4.1.2.3. Decoloración de MO en presencia de *Poly*(EGDE-DA)

La concentración de MO también fue monitoreada en presencia de *Poly*(EGDE-DA). La cantidad de MO removida por captación sobre la superficie positiva del polielectrolito fue significativamente mayor que la cantidad de MO captada por las partículas de los complejos con Co(II) y Cu(II). En otro experimento con *Poly*(EGDE-DA) en presencia de H₂O₂, se produjo la liberación de O₂ y la decoloración de la solución mayoritariamente por captación del MO sobre las partículas, junto con una reacción alternativa (oxidativa) que involucraría los grupos funcionales del polielectrolito (-R₂N, ver Capítulo 2) y contribuyó solamente con un 8.4 % de la remoción de MO (Figura 10).

4.1.2.4. Evidencia sobre los productos de degradación obtenidos

Los espectros UV-visible de las soluciones de MO se presentan en la Figura 11.

De la misma manera que en el sistema heterogéneo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / H₂O₂, la evidencia sobre los productos de degradación se basó en los espectros UV-visible de MO en solución acuosa. El espectro de MO se vio modificado por el agregado de H₂O₂, que produjo una banda ancha de absorción por debajo de 300 nm (curvas negra y azul, respectivamente, de la Figura 11.A). La reacción de degradación comenzó cuando se agregó Co(II)-*Poly*(EGDE-DA): la banda a 464 nm disminuyó su intensidad a lo largo de 100 minutos y la intensidad del color naranja de la solución de MO también resultó afectada, al tiempo que una nueva banda centrada en 310 nm fue incrementando su absorbancia.

Así, es posible concluir que el primer paso de la degradación oxidativa implicó el daño de la estructura conjugada de MO, al tiempo que se formó un producto de degradación mayoritario. El máximo de absorbancia a 310 nm fue consistente con la presencia de un derivado de tipo *p*-bencenodiamino. Otros productos de degradación posibles relacionados con *p*-amino bencenosulfonato tienen una pequeña banda de absorción cerca de 300 nm.

De la misma manera, en la Figura 11.B, la curva I representa el espectro de MO en solución acuosa. La adición de H₂O₂ produjo una banda ancha a longitudes de onda inferiores a 300 nm. La reacción de degradación comenzó cuando se agregó Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA): la banda a 464 nm disminuyó rápidamente en intensidad durante los primeros 10 minutos y la intensidad del color naranja de la solución de MO también resultó significativamente afectada (espectro en línea azul). Pasados los 10 minutos se observó la aparición de opalescencia en la solución junto con el incremento de la absorbancia en el rango por debajo de 400 nm (espectros en línea marrón). Posteriormente, más allá de los 300 minutos, la solución viró del amarillo pálido y translúcido al incoloro, y la absorbancia se mantuvo baja a longitudes de onda superiores a 300 nm (espectros en color gris, curvas II y III).

Analizando estos resultados, se puede concluir que el primer paso de la degradación oxidativa llevó al daño de la estructura conjugada del MO, a medida que tenía lugar la reacción de decoloración. Durante el segundo paso, los intermediarios oxidados con anillos bencénicos presentaron apertura del anillo y generaron los compuestos alifáticos con grupos oxidados. Eventualmente, estos productos seguirían su degradación oxidativa hasta la producción de CO₂ y H₂O.

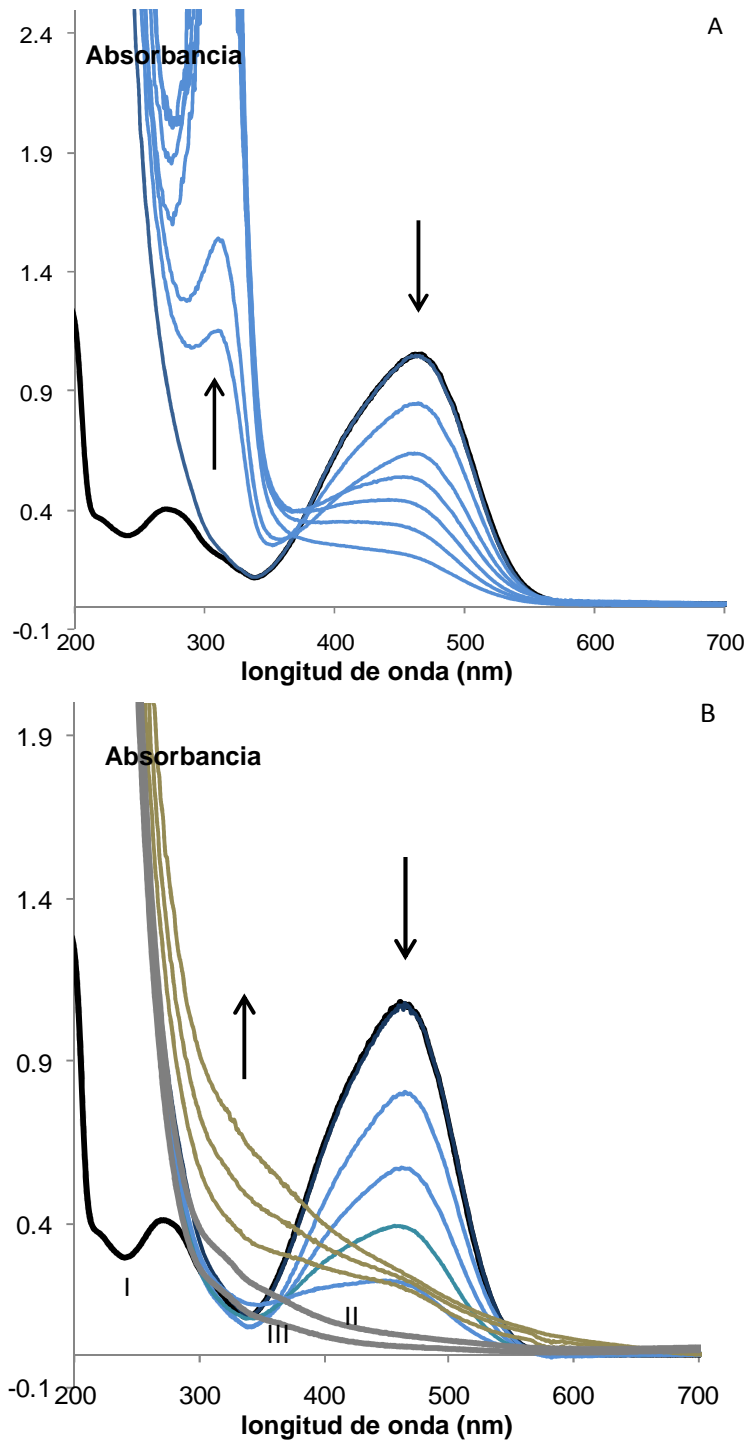


Figura 11. Espectros UV-visible a diferentes tiempos de reacción para la solución de MO 42 μM con $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA) / H}_2\text{O}_2$ 63 mM (A) y con $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA) / H}_2\text{O}_2$ 63 mM (B).

También se estudió la capacidad de captación de MO por diferentes materiales, mediante el análisis de los espectros UV visible de las soluciones sobrenadantes (Figura 12). Este colorante con carga neta negativa presentó afinidad relativamente baja por los materiales probados, en líneas generales. En el polianfolito sin complejar, el MO parece haber ocupado sitios de unión diferentes de los que ocupa el Cu(II) , en tanto que se unió muy poco a $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-}$

2MI) y a Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA). Cabe destacar que el MO es una molécula pequeña, y posee un solo grupo $-\text{SO}_3^-$, lo cual parece desfavorecer (o en alguna medida, debilitar) su anclaje a los polímeros.

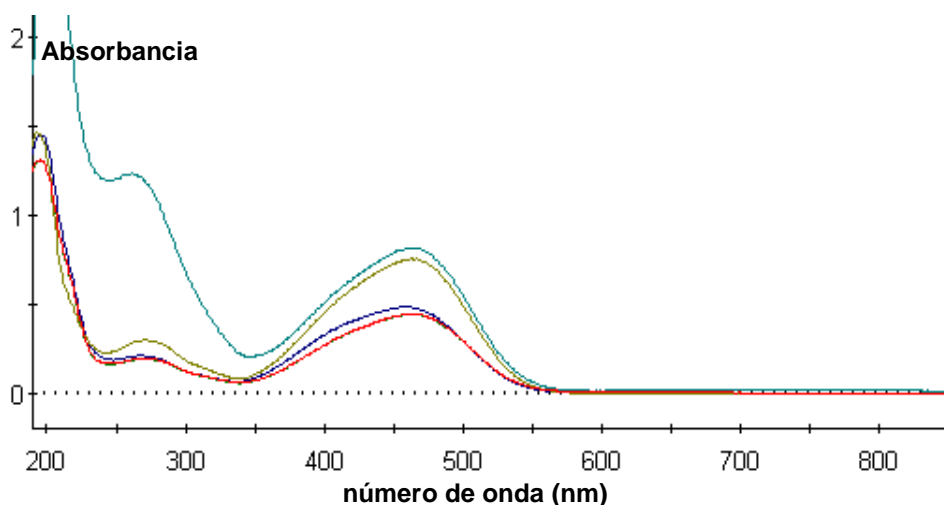


Figura 12. Espectros UV visible de soluciones de MO previamente puestas en contacto con diferentes materiales: Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) (turquesa); Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) (mostaza); Cu(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) (violeta); *Poly*(EGDE-MAA-2MI) (rojo).

4.1.2.5. Estudio de los mecanismos probables de degradación de MO

Los siguientes experimentos fueron realizados para evidenciar los mecanismos de degradación de MO, el rol de la matriz sólida *Poly*(EGDE-DA) y la potencial participación de las especies intermediarias de Co(II) y Cu(II) como posibles centros metal-peroxo, en la reacción de oxidación de MO.

Se comenzó con el material denominado Co(II)-*Poly*(EGDE-DA). Primero, se monitoreó la concentración de MO en la solución con H_2O_2 activado (“sobrenadante activado”), en función del tiempo, que exhibió un decaimiento exponencial de pseudo-primer orden con un valor de k_{deg} de $(3.50 \pm 0.04) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (Figura 13). El valor de este parámetro resultó ser el 34.4 % del estimado para el proceso de degradación cuando se empleó el sistema heterogéneo completo Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H_2O_2 63 mM ($0.0102 \pm 0.0006 \text{ min}^{-1}$) (Tabla 4).

El comportamiento de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) como catalizador fue diferente del observado para Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI). Se había demostrado que los radicales libres del H_2O_2 en el “sobrenadante activado” por Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fueron suficientes para degradar MO con la misma eficiencia que el sistema heterogéneo completo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) / H_2O_2 63 mM. En cambio con Co(II)-*Poly*(EGDE-DA), la oxidación química de MO en solución por acción del “sobrenadante activado” obtenido con un solo ciclo operativo no representó el proceso completo de la degradación de MO.

La diferencia observada en el comportamiento de los catalizadores con Co(II) probablemente reside en la naturaleza del ligando: *Poly*(EGDE-MAA-2MI) es un polianfolito que combina cargas positivas y negativas en la misma red, en tanto que *Poly*(EGDE-DA) es un polielectrolito positivo que intercambié H^+ por Co(II) en la formación del complejo. Por este motivo, las

especies tales como $O_2^{\bullet-}$ podrían ser repelidas hacia la solución por *Poly*(EGDE-MAA-2MI) y atraídas por *Poly*(EGDE-DA) en el proceso de activación de H_2O_2 .

Entonces se realizó la búsqueda de evidencia de especies intermediarias de Co(II) formadas sobre la superficie del catalizador por acción del H_2O_2 , que actuaran como sitios catalíticos. Las partículas activadas de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) (“sólido activado”) fueron puestas en contacto con la solución de MO, que exhibió un decrecimiento en la concentración de MO con un decaimiento exponencial. En este experimento, la cinética de decoloración fue principalmente regida por la captación de MO, sin embargo la concentración de MO resultó ligeramente inferior a la lograda en los experimentos de captación (en ausencia de H_2O_2) a tiempos superiores a 15 minutos (Figura13). Esto último podría deberse a la formación de una cierta cantidad de especies intermediarias activas en el sólido, pero no constituye una evidencia.

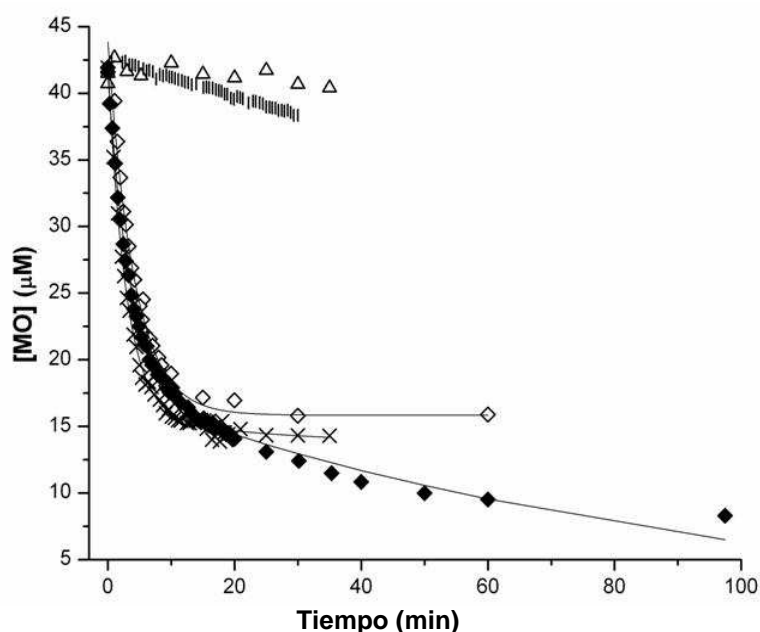


Figura 13. Perfil de concentración de MO en 100 mL de MO 42 µM en contacto con: 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y H_2O_2 63 mM (♦); 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) (◊); H_2O_2 63 mM previamente activado con 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) (+); y 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) previamente activado con H_2O_2 63 mM (x). El sistema homogéneo fue también probado con MO 42 µM, Co(II) 0.35 mM y H_2O_2 63 mM (Δ).

Luego se exploró la acción de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA). La concentración de MO en presencia de H_2O_2 en el “sobrenadante activado” exhibió un decaimiento exponencial de pseudo-primero orden con k_{deg} igual a $0.0415 \pm 0.0012 \text{ min}^{-1}$ (Figura 14), representando el 23.7 % de la constante cinética estimada para el proceso de degradación con el sistema heterogéneo Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H_2O_2 63 mM $0.175 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$ (Tabla4).

Por otra parte, la búsqueda de evidencia de especies intermediarias de Cu(II) sobre la superficie de las partículas condujo a un resultado peculiar: la cantidad de MO removido de la solución por el “sólido activado” (37.1 %) fue inferior a la removida por captación sobre el catalizador sólido sin activar (47.7 %) (Figura14). Esto podría ser atribuido a una disminución en el número de sitios de captación positivos para el MO con carga negativa, como resultado de la activación. Además, este hipotético intermediario de Cu(II) pareció ser inactivo en contacto con MO.

En el mismo sentido, la suma de los efectos del “sobrenadante activado” y del “sólido activado” sobre la concentración de MO (correspondiente al primer ciclo operativo) no explicó el proceso de decoloración completo de MO usando $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)} / \text{H}_2\text{O}_2$. En este caso, no se sumó la contribución de MO captado a la de “sobrenadante activado”, porque quedó demostrado que en presencia de H_2O_2 se une menos cantidad de MO al catalizador.

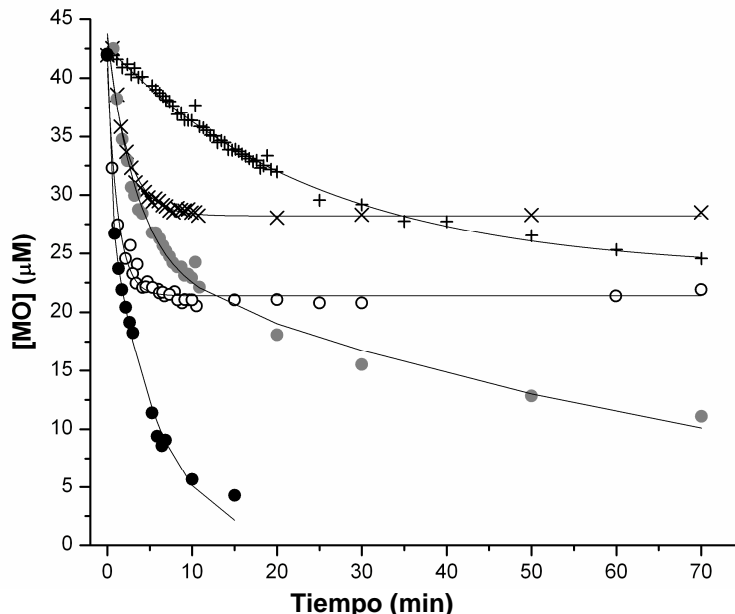


Figura 14. Perfil de concentración de MO 42 μM (100 mL) en contacto con: 0.1000 g de $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)}$ y H_2O_2 63 mM (●); 0.1000 g de $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)}$ (○); H_2O_2 63 mM previamente activado con 0.1000 g de $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)}$ (+); y 0.1000 g de $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)}$ previamente activado con H_2O_2 63 mM (x). La suma de los efectos del sobrenadante activado y del sólido activado sobre la concentración de MO también fue representada (●).

4.1.3. Conclusiones de la Sección 4.1

En el tratamiento de soluciones de MO con H_2O_2 en presencia de los activadores se observó un decaimiento exponencial de la concentración de colorante, atribuido a los procesos paralelos de captación y degradación oxidativa [7,8]

En el tratamiento no se logró la mineralización completa de MO, de acuerdo con la evidencia espectroscópica. Aquí es necesario tener presente que las soluciones de MO resultaron tóxicas para ciertas plantas y bacterias modelo, lo cual dificulta la elección de métodos biológicos como etapa inicial para la decoloración de efluentes industriales. Por lo tanto, el método de decoloración de bajo impacto ambiental propuesto en esta Tesis puede resultar adecuado para iniciar el proceso de degradación del colorante, hasta agotamiento del H_2O_2 agregado, y luego podría ser completado por microorganismos que utilizan compuestos orgánicos pequeños como fuente de C y/o N.

De los sistemas heterogéneos probados, el complejo con Cu(II) resultó ser el más eficiente en términos de k_{deg} y de $[\text{MO}]_{deg}$. Con respecto a los posibles mecanismos de decoloración de MO para el sistema $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)} / \text{H}_2\text{O}_2$, se observó que el empleo del denominado “sobrenadante activado” permitió justificar todo el proceso de degradación oxidativa del colorante. Esto implica que los radicales libres son las especies involucradas en la reacción.

Sin embargo, para el sistema $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA) / H}_2\text{O}_2$, la cantidad de radicales libres generados a partir de H_2O_2 durante los primeros 10 minutos de activación no resultó suficiente para equiparar el proceso completo de degradación de MO. Por otra parte, los resultados de los experimentos de activación de la matriz sólida por H_2O_2 indicarían cierto nivel (aunque bajo) de actividad catalítica en la degradación de MO, pero no se encontró evidencia suficiente. La degradación de MO con el sistema $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA) / H}_2\text{O}_2$ ocurrió mediante la acción de los radicales liberados al medio a lo largo de todo el proceso de activación; no se encontró evidencia que confirme la participación de especies intermediarias reactivas del Cu(II) en la matriz sólida.

También se efectuaron estudios con el fin de verificar la pérdida de Co(II) con los ciclos de catálisis del sistema $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) / H}_2\text{O}_2$. Se determinó que cerca del 40 % del Co(II) captado se perdió en dos ciclos operativos, en tanto que resultó despreciable en los ciclos subsiguientes. Es decir, el 60 % restante permaneció unido en forma estable. A partir de esta información se evaluó la posibilidad de recargado de los materiales, que permitió devolver al sistema a las condiciones iniciales. Y se observó que las moléculas de MO permanecieron unidas a los sitios de captación cuando el catalizador se recicló.

4.2. Oxidación parcial de Epinefrina

Una característica de los catalizadores basados en iones Co(II) combinados con H_2O_2 es su carácter de oxidantes suaves. El anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) puede ser útil para acelerar ciertos procesos de degradación en los que el sustrato tiene un potencial rédox bajo. En algunos casos, esta cualidad constituye una ventaja, por ejemplo dentro de la química industrial, donde frecuentemente se utilizan compuestos parcialmente oxidados como intermediarios de síntesis.

Un ejemplo de éstos es el caso de la epinefrina. La oxidación parcial controlada de esta catecolamina puede conducir al derivado adrenocromo, que es un precursor de drogas hemostáticas como el carbazocromo, lo que lo convierte en un compuesto de interés industrial.

El carbazocromo es usualmente sintetizado con Ag_2O como oxidante [9], y es deseable su reemplazo por un oxidante de impacto ambiental inferior. El adrenocromo (catecolamina *o*-quinona) es coloreado (rosado), por lo tanto, se puede monitorear fácilmente por técnicas espectrofotométricas.

4.2.1. Estudios cinéticos

Se ensayó el comportamiento de los distintos materiales poliméricos en la oxidación parcial del compuesto epinefrina con H_2O_2 .

Para monitorear la oxidación, la solución de epinefrina fue tratada con H_2O_2 en presencia del catalizador con Co(II) , y se efectuaron una serie de controles para demostrar la actividad catalítica. En las Figuras 15 y 16 se representan los resultados experimentales de uno de los replicados realizados. Cabe mencionar que no se encontraron diferencias significativas en los parámetros cinéticos empíricos obtenidos entre replicados.

Cuando se utilizó $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$, la oxidación de epinefrina alcanzó un 80 % dentro de los primeros 6 minutos, con una constante cinética de pseudo-primer orden de $0.397 \pm 0.025 \text{ min}^{-1}$. En ausencia del catalizador, la oxidación de epinefrina por H_2O_2 fue prácticamente despreciable.

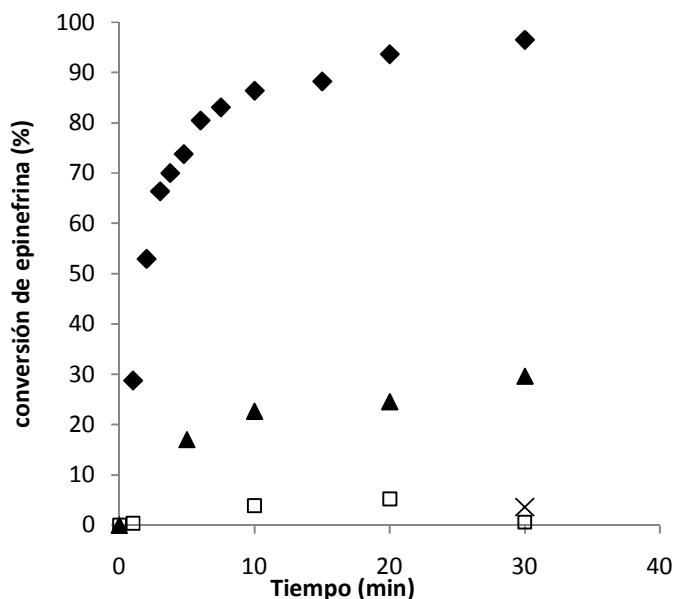


Figura 15. Porcentaje de conversión de epinefrina a adrenocromo en Na_2SO_4 0.1 M: en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ (▲), en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ con burbujeo de argón (x), en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$ y H_2O_2 46 mM (◆), y en presencia de H_2O_2 46 mM (□).

Un control efectuado sobre epinefrina con $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$, en ausencia de H_2O_2 , arrojó cierto grado de oxidación, pero apreciablemente menor que la observada en presencia del oxidante. Entonces, el experimento se repitió midiendo la absorbancia a tiempo final, pero produciendo el burbujeo de argón en la muestra de catecolamina y en una suspensión del complejo, previo a la mezcla de ambos. El objetivo de este proceso fue desplazar el O_2 adherido al material, así como el disuelto en la muestra de epinefrina, y luego saturar la atmósfera con gas inerte. En este caso, la cantidad de adenocromo producida fue despreciable, indicando que, en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$, la oxidación de adenocromo también pudo lograrse con O_2 atmosférico cuando éste fue activado de alguna manera por el catalizador.

La Figura 16 presenta los resultados de conversión de epinefrina en presencia de H_2O_2 y de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$. En 30 minutos de reacción resultó oxidado el 77 % del compuesto, con una constante cinética de pseudo-primer orden de $0.145 \pm 0.019 \text{ min}^{-1}$.

Con el precedente de la oxidación parcial de epinefrina por acción del O_2 en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)}$, se estudió este mismo efecto burbujeando argón sobre la solución de epinefrina y sobre una suspensión de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ para luego mezclarlas, agregar H_2O_2 , saturar la atmósfera de reacción con este gas inerte, y cerrar el sistema. Así se realizó una medición de absorbancia a tiempo final, y se verificó una disminución en la oxidación en un 11% con respecto al experimento precedente, lo que implica que en aquel experimento el H_2O_2 prevaleció como agente oxidante y que la contribución del O_2 disuelto en la conversión fue pobre pero evidente.

Otro experimento control con epinefrina y $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ en ausencia de H_2O_2 , mostró cierto nivel de oxidación de la catecolamina (evidenciado por aparición de color rosado en el medio), pero en menor nivel que la oxidación con H_2O_2 . El experimento control fue repetido,

habiendo previamente burbujeado la muestra y una suspensión de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ con argón, y continuando el burbujeo durante la reacción. En este caso, la conversión de epinefrina ocurrió en una proporción muy baja. Estos resultados confirman que la presencia de O_2 en este sistema también permitió la oxidación de la catecolamina, en ausencia de H_2O_2 , al ser activado por $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$; a la vez se detectó una muy pequeña contribución de oxidación de epinefrina por parte del mismo catalizador, aún si era previamente tratado con argón.

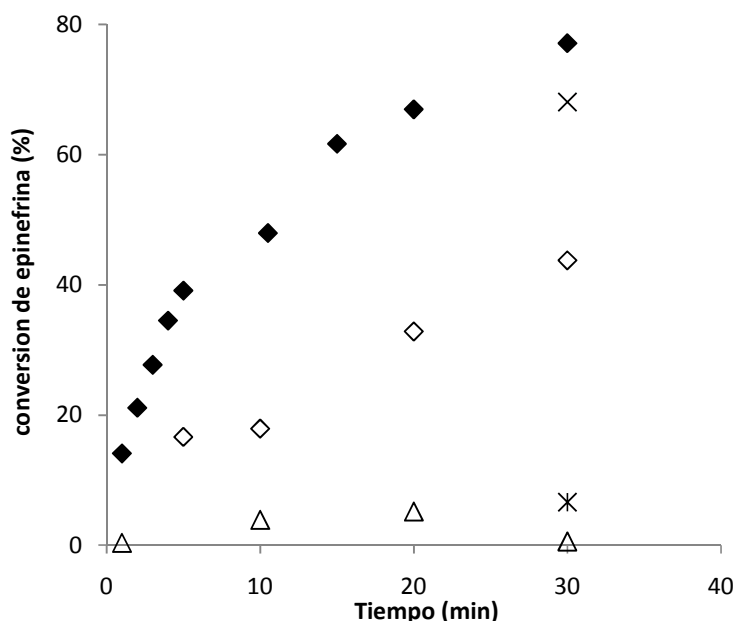


Figura 16. Conversión de epinefrina: en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ (◇), en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ con burbujeo de argón (*), en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ y H_2O_2 46 mM (◆), en presencia de $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)}$ y H_2O_2 46 mM con burbujeo de argón (X), y en presencia de H_2O_2 46 mM (Δ).

4.2.2. Conclusiones parciales de la Sección 4.2

El anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ es considerado menos reactivo que OH^\bullet , lo que permite un tratamiento oxidante suave. Esta especie fue útil para la aceleración de ciertos procesos de degradación en los que el sustrato tiene un potencial redox (E) bajo. Además, la cantidad de oxidante necesario para producir una concentración efectiva de radicales libres pudo también ser minimizada con el método propuesto en esta Tesis.

En este contexto, el método fue probado en la obtención de un producto industrial parcialmente oxidado, como el adrenocromo a partir de epinefrina (un precursor de drogas hemostáticas tales como el carbazocromo), que es usualmente sintetizado con Ag_2O como oxidante. Aquí, la Ag^+ podría ser reemplazada por un oxidante de menor impacto ambiental.

En este trabajo, también se observó que el O_2 también pudo ser activado por los complejos con Co(II) [7,8].

4.3. Decoloración de soluciones del colorante aniónico Direct Blue 273 (DB273) empleando oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)

4.3.1. Estudios cinéticos y caracterización del macroagregado insoluble

Los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) solubles generaron agregados insolubles por interacción con Fe(II) (Figura 17.A). La interacción entre ambas especies puede ser resultado de la atracción electrostática y/o la coordinación a través de los grupos donores de electrones unidos a la red.

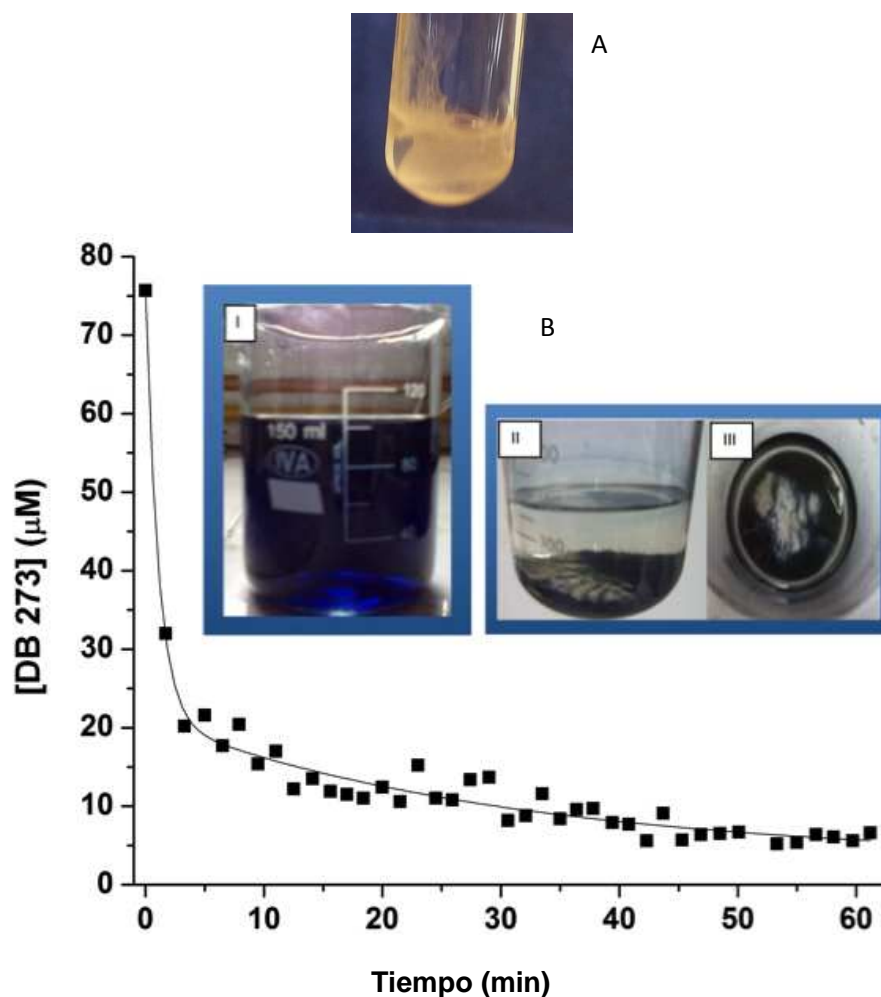


Figura 17. Material agregado a partir de una solución de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) en contacto con FeSO₄ (A). Perfil de concentración de DB273 en función del tiempo, en presencia de los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) luego de la adición de Fe(II). Inserto: imágenes de la solución de DB273 76 μM (I); la suspensión obtenida en presencia de los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) y Fe(II) en el equilibrio (II y III), (B). La remoción del colorante se estudió en una solución de DB273 76 μM (67.7 mg L⁻¹) luego de la adición de oligómeros 0.46 g L⁻¹ y Fe(II) 0.017 M.

En los estudios preliminares se observó que las partículas producto de la interacción entre los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) solubles y Fe(II) poseían una extraordinaria capacidad de captación de contaminantes iónicos cuando éstas se formaban *in situ* en el medio contaminado, lo que las convertía en una interesante alternativa de remediación.

Se utilizó el colorante azo-aniónico DB273 en una concentración igual a 76 μM , como modelo de aguas residuales de la industria textil, con el fin de demostrar la extraordinaria eficacia de este sistema en el proceso de decoloración por separación de fases.

El monitoreo de la absorbancia de una dilución de la muestra en función del tiempo posterior a la mezcla de los reactivos permitió obtener el perfil de concentración que se presenta en la Figura 17.B.

Se observó un rápido decaimiento en la concentración de DB273, que disminuyó un 73 % luego de 3.3 minutos de reacción. La unión a los sitios menos accesibles continuó con una constante cinética de pseudo-primer orden (k) de $0.041 \pm 0.016 \text{ min}^{-1}$ hasta una concentración de colorante remanente en solución del 7 % de la concentración inicial. Es decir que luego de 55 minutos, un 93 % del colorante resultó adherido a los macroagregados insolubles.

A continuación, la depuración de las aguas residuales fue optimizada, con una reducción casi 400 veces la cantidad de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) utilizado y 8 veces la cantidad de Fe(II) requerido para alcanzar la misma eficiencia de decoloración obtenida en el experimento cinético, trabajando con una solución de DB273 760 μM . Bajo estas condiciones, alrededor de 30 mmol (27 gramos) de DB273 por gramo de oligómeros, fueron removidas de la solución.

Esta capacidad de captación de DB273 puede ser comparada con la capacidad de *Poly*(EGDE-MAA-2MI). La máxima unión obtenida experimentalmente sobre el polianfolito fue 280 mg g^{-1} ; el máximo valor estimado por el modelo de Langmuir fue 403 mg g^{-1} y por el modelo de D-R resultó 430 mg g^{-1} . Esto significa que la eficiencia de depuración fue mejorada casi 100 veces con la precipitación *in situ* del adsorbente.

Se realizaron los controles correspondientes a asegurar que los oligómeros estaban involucrados en la decoloración y eran necesarios para que ocurriera la separación de fases. Así, la mezcla oligomérica fue reemplazada por el monómero IM; también se reemplazó alternativamente cada reactivo por H_2O . En la Figura 18 se observa que el reemplazo de los oligómeros por el monómero IM impidió la agregación; la solución fue observada durante los días sucesivos y se encontró que después del cuarto día se producía una separación de fases, pero la decoloración no resultó eficiente. Y las otras combinaciones ensayadas no originaron un precipitado.

De esta manera quedó demostrado que fue la presencia simultánea de los oligómeros y el catión Fe(II), la condición necesaria para que se produjera co-precipitación del colorante.

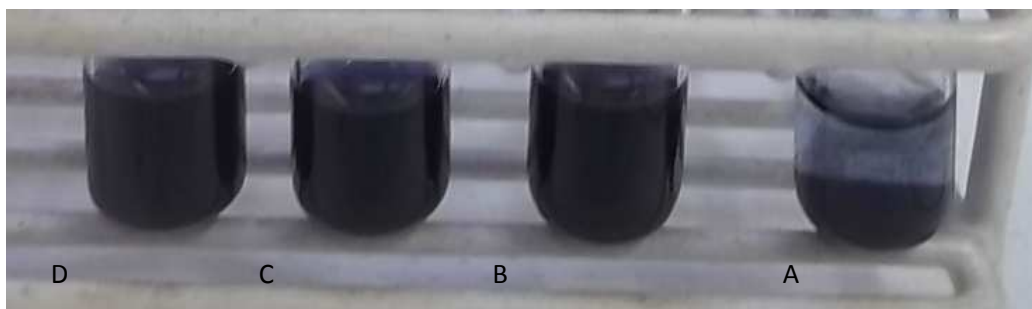


Figura 18. Oligómeros (EGDE-IM-co-MAA) agregados con Fe(II) y con DB273 (A); DB273 con Fe(II) y monómero IM (B); DB273 con monómero IM (C); DB273 con Fe(II) (D).

Se realizaron estudios de FT-IR al material precipitado con Fe(II), y luego en co-precipitación con el colorante (Figura 19). Las bandas correspondientes a los grupos funcionales principales, no sufrieron ningún desplazamiento por la adsorción del colorante. Más aún, las bandas a 1590 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} y 1198 cm^{-1} se vieron intensificadas en presencia del colorante. Esto se debió a la contribución de los estiramientos vibracionales de N-H, N=N y S=O del colorante, respectivamente.

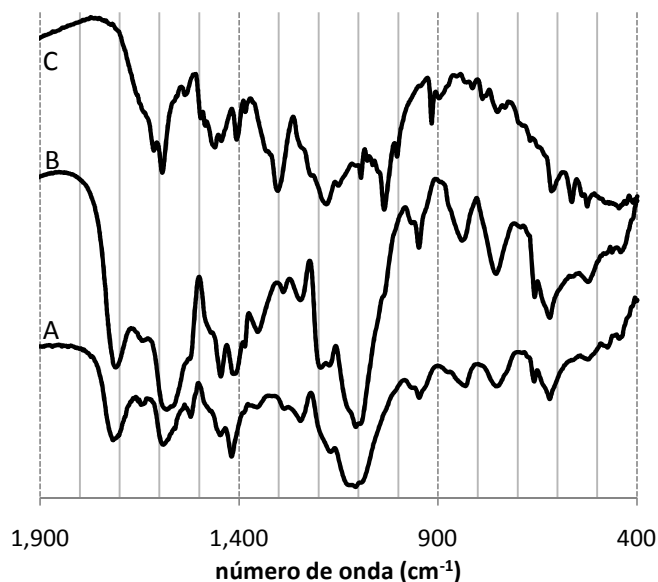


Figura 19. Espectros FT-IR de los oligómeros (*EGDE-IM-co-MAA*) agregados con Fe(II) (A) y con DB273 (B); colorante azo DB273 (C).

Sin embargo, dos bandas intensas del DB273 a (1300 y 1036 cm^{-1}) atribuidas al enlace C-N y al estiramiento S=O del grupo $-\text{SO}_3^-$, no se encontraron en el precipitado. Este último cambio sería una evidencia de la interacción electrostática entre los sitios positivos de los agregados y los grupos funcionales aniónicos de DB273. La pérdida de la banda C-N podría estar relacionada con la formación de puente de H entre el colorante y los grupos $-\text{OH}$ de los oligómeros. Cuando el DB273 se unió a las partículas del polímero insoluble *Poly*-(EGDE MAA-2MI) resultó evidente la pérdida de la banda a 1300 cm^{-1} , pero la señal a 1036 cm^{-1} podría estar superpuesta a la señal principal de C-O-C de los residuos EGDE polimerizados [10]. En este sentido, se puede afirmar que la naturaleza de la interacción del DB273 con las partículas fue esencialmente electrostática, combinada con la formación de puente de H.

4.3.2. Conclusiones de la Sección 4.3

En esta sección se exploró una aplicabilidad ambiental del nuevo producto denominado *oligómeros* (*EGDE-IM-co-MAA*) [11]. Los agregados insolubles de los oligómeros con Fe(II) presentaron una extraordinaria capacidad de inducir la co-precipitación del colorante aniónico DB273, que representó un uso potencial en el ámbito de la química verde. Es sabido que la industria textil (particularmente en nuestro país) no consigue decolorar completamente sus efluentes mediante los métodos tradicionales, de manera que las propuestas en este sentido resultan de interés.

Los controles realizados demostraron que la acción decolorante se debió a la combinación *in situ* de la solución de oligómeros y la solución de FeSO_4 en la solución de DB273. Los monómeros constitutivos de los oligómeros o el Fe(II) y sus combinaciones no produjeron este efecto. Comparando la eficiencia de decoloración de este material con la de los polímeros insolubles desarrollados en nuestro grupo, aquella resultó claramente superior. La evidencia experimental indicó que la naturaleza de la interacción del DB273 con las partículas resultó esencialmente electrostática, combinada con la formación de puentes de H.

4.4. Aplicación de oligómeros (EGDE-IM-co-MAA) en la preparación de esferas huecas

4.4.1. Desarrollo de las esferas huecas y caracterización del material constitutivo

Respecto de la preparación de las esferas huecas, generalmente constituidas por compuestos orgánicos e inorgánicos, recibieron considerable atención en el ámbito académico debido a sus aplicaciones potenciales en liberación controlada de fármacos, células artificiales, catálisis, y sensores ópticos, entre otras [12-15]. En este trabajo de Tesis se demuestra la posibilidad de formación de esferas huecas por coordinación interfásica de los oligómeros con Fe(II) / ácido cítrico en un protocolo sencillo de un paso.

Como se señaló en el Capítulo 3, los oligómeros fueron agregados y se separaron de la solución en forma de precipitados amorfos en presencia de una serie de iones metálicos, pero formaron esferas cuando fue usado el catión Fe(II) en combinación con ácido cítrico. Asimismo, cuando se omitió el Fe(II) , se obtuvo un precipitado amorfo en presencia de ácido cítrico por disminución del pH.

Concretamente, el proceso consistió en la adición gota a gota de una solución viscosa de oligómeros a una solución de Fe(II) / ácido cítrico de menor viscosidad y pH 2.1, lo que produjo la formación de esferas interfásicas en medio ácido (Figura 20.A-C).



Figura 20. Imágenes de esferas huecas en medio ácido (A), y sobre una superficie de vidrio (B y C). El radio de la esfera en función de la concentración de Fe(II) fue decreciendo de izquierda a derecha (C).

Además, fue estudiado el efecto de diferentes concentraciones de oligómeros y la relación entre las soluciones de Fe(II) / ácido cítrico en la forma y estabilidad de las cápsulas formadas.

La mejor condición se obtuvo con una mezcla de ácido cítrico /citrato monobásico 0.9 M a pH 2.1 y solución de FeSO_4 9×10^{-3} M. Sobre la solución anterior se agregó gota a gota la solución oligomérica de 300 g L^{-1} , con una pipeta automática de 1.00 mL, y se obtuvieron esferas huecas

que resultaron mecánicamente estables en el tiempo. Las esferas fueron retiradas de la solución y cortadas en mitades, a fin de verificar que efectivamente fuesen huecas.

Cuando los experimentos fueron llevados a cabo con solución de citrato de sodio, en lugar de ácido cítrico /citrato monobásico a pH 2.1, no se obtuvieron estas esferas. Cuando se usaron menores concentraciones de Fe(II) y ácido cítrico, se formó una suspensión coposa. Asimismo, también fueron probadas mayores concentraciones de la mezcla oligomérica (intentando disolver el producto a granel en cantidades menores de agua) pero la viscosidad resultó demasiado alta para formar cápsulas esféricas, lo que resultó en una forma de lágrima o estructuras con "cola". En este sentido, Driver y col. obtuvieron los mismos resultados cuando una de las soluciones poliméricas utilizadas fue demasiado viscosa [15].

El radio de las esferas decreció como resultado del consumo de Fe(II), hasta que la solución se agotó por consumo de catión. Como se observa en la Figura C, las esferas a la izquierda se formaron con la más alta concentración de Fe(II).

Cuando una alícuota de 1.00 mL de solución de Fe(II) / ácido cítrico fue utilizada, se obtuvieron cuatro esferas con un radio promedio de 4.0 ± 0.4 mm. Después, el radio se redujo en un 19 % para las próximas cuatro estructuras y en un 35 % en las últimas cuatro esferas (Figura 20.C). Al final del proceso, las esferas eran demasiado blandas para ser retiradas de la solución.

Las esferas fueron secadas a 37° C para su caracterización por espectroscopía de NMR y FT-IR. Las estructuras colapsaron como consecuencia de la deshidratación. Los espectros de ^{13}C CP-MAS para el material de las esferas se exhiben en la Figura 5 del Capítulo 3. Los desplazamientos químicos y las intensidades relativas de los picos fueron similares al perfil de los oligómeros (EGDE-IM-co-MAA), lo que es indicador de que este material estaba incluido en la estructura.

Los espectros de FT-IR de las esferas huecas fueron realizadas a partir del material desecado en pastillas de KBr. Exhibieron un decrecimiento en la intensidad de las bandas a 1510 cm^{-1} (Figura 1 del Capítulo 3), en comparación con el espectro del material original (Figura 1 del Capítulo 3), indicador de interacción entre el heterociclo IM y el Fe(II). La banda de estiramiento de C=O, a 1715 cm^{-1} y el estiramiento asimétrico de $-\text{COO}^-$ a 1570 cm^{-1} presentaron una intensidad relativa mayor. La banda a 1640 cm^{-1} decreció en intensidad en comparación con la del espectro de la forma ácida. Esto puede deberse a la pérdida de algunos puentes de H internos, unidos a los grupos C=O de las regiones de *Poly*(MAA) ahora implicadas en la coordinación de Fe(II) (ver Capítulo 3).

Para el análisis de su estabilidad química y física, las cápsulas fueron transferidas hacia soluciones de diferentes valores de pH con una agitación suave (60 rpm), resultando completamente disueltas a pH igual o mayor que 7.0. Estos resultados evidenciaron el efecto combinado de la agregación interfasial por protonación de los bloques de *Poly*(MAA) y por la coordinación del Fe(II) con grupos donores de electrones provenientes de los oligómeros. La presencia de Fe(II) o grupos carboxílicos no fue de por sí suficiente para estabilizar la estructura tridimensional de la esfera.

Las propiedades mecánicas de estas esferas limitan su aplicación en reactores de agitación continua para aplicaciones biotecnológicas o medioambientales. Estas limitaciones pueden estar relacionadas con el tamaño relativamente grande y eventualmente puede ser mejorado con el desarrollo de estructuras más pequeñas.

4.4.2. Conclusiones de la Sección 4.4

En esta sección se demostró la posibilidad de formar esferas huecas a partir del producto a granel denominado *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) [11]. Esta mezcla oligomérica formó las esferas por goteo sobre una solución menos viscosa de Fe(II) / ácido cítrico de una composición definida. El efecto combinado de la coordinación del Fe(II) y la agregación de los oligómeros en la interfase determinó la morfología de estas estructuras. Su solubilidad a valores de pH iguales o superiores a 7.0 las vuelve potencialmente adecuadas para la liberación intestinal de fármacos en el contexto de liberación controlada.

El hecho de que estos materiales formen cápsulas esféricas es un indicio que avala su tamaño molecular. No puede tratarse simplemente de oligómeros inferiores a 1000 Da (según los resultados parciales de MALDI-TOF del Capítulo 3), sino que deben co-existir especies en un rango de peso molecular entre 1 kDa y 12 kDa en el producto a granel.

4.5. Aplicaciones analíticas del reactor enzimático basado en SBP-Poly(EGDE-MAA-2MI)

En este apartado se resumen los estudios de aplicabilidad analítica del reactor enzimático reutilizable basado en SBP, descrito en el Capítulo 2. La innovación consistió en la aplicación del polianfolito insoluble en agua *Poly(EGDE-MAA-2MI)* como soporte para la inmovilización de la enzima SBP directamente de su extracto acuoso, sin necesidad de su purificación previa. La aplicabilidad del biorreactor fue estudiada en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

Así, el reactor acoplado al detector amperométrico fue probado como herramienta analítica para discriminar yerba mate por marca, y vinos tintos por naturaleza y proceso de añejamiento.

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) da origen a la infusión (mate) rica en flavonoides y compuestos fenólicos tales como ácido clorogénico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico. Luego de la cosecha, las hojas se exponen a la acción directa del fuego para detener su fermentación y oxidación. Una vez secas, son rotas y sometidas a un período de estacionamiento supervisado en el que desarrollan el flavor, color y aroma que distingue cada variedad. Allí el producto es triturado de una manera equilibrada, y empacado.

El contenido de polifenoles en infusión de yerba mate es significativamente mayor que en la de té verde [16]. La cantidad de polifenoles extraídos en el proceso es altamente dependiente del grado de trituración de las hojas, porcentaje relativo de hojas o palo en el producto comercial, y procedimiento de extracción (tiempo de contacto, temperatura, pH). En este Capítulo se presenta la comparación del método basado en el reactor de SBP con un método colorimétrico estándar para el análisis de yerba mate de diferentes marcas y origen.

Por otra parte, el vino es una muestra interesante que sufre complejas transformaciones durante la maduración y añejamiento [17,18]. El vino, especialmente el vino tinto, es una rica fuente de polifenoles tales como flavanoles (catequina, epicatequina), flavonoles (quercetina, rutina, myricetina), antocianinas (la más abundante de las cuales es malvidin-3-O-glucósido), proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico) y estilbenos (trans-resveratrol). Se ha reportado actividad biológica en muchos de estos compuestos, atribuida principalmente a su fuerte actividad antioxidante y antirradical [19].

La dosificación del O₂ que recibe el producto es una de las tareas con mayores desafíos en la elaboración del vino, dado que las cantidades que se suministren tendrán un impacto mayor en las

características organolépticas del producto terminado [20]. La micro-oxigenación resulta actualmente una elección alternativa al añejamiento en toneles de roble. En este proceso, el gas es burbujado lentamente en el vino, de esta manera se inicia una mejora en los atributos de la bebida [21]. En este Capítulo se presenta el empleo del reactor enzimático para la discriminación de vino tinto tanto por naturaleza como por estrategia de añejamiento.

4.5.1. Análisis de *Ilex paraguariensis* (yerba mate)

Se analizaron 8 marcas comerciales de yerba mate usando el reactor basado en SBP en el sistema de flujo con detección amperométrica a +100 mV vs Ag/AgCl. La solución carrier contenía H₂O₂ 0.2 mM a pH 6.5. Este valor de pH resultó el más adecuado para esta aplicación.

El sistema fue calibrado con ácido clorogénico como compuesto estándar en un rango de concentraciones entre 0.10 y 1.20 mM. El ácido clorogénico es uno de los polifenoles más abundantes hallados en la infusión. Y una solución estándar de catecol 0.10 mM fue inyectada entre muestras para monitorear la estabilidad del reactor basado en SBP.

Las señales amperométricas vistas en la Figura 21 fueron angostas para estándar de catecol y más anchas para las muestras como consecuencia de la gran variedad de sustratos oxidables allí presentes. Era de esperar que el comportamiento cinético y las restricciones difusionales en el reactor fueran fuertemente dependientes del volumen molecular de los polifenoles [16].

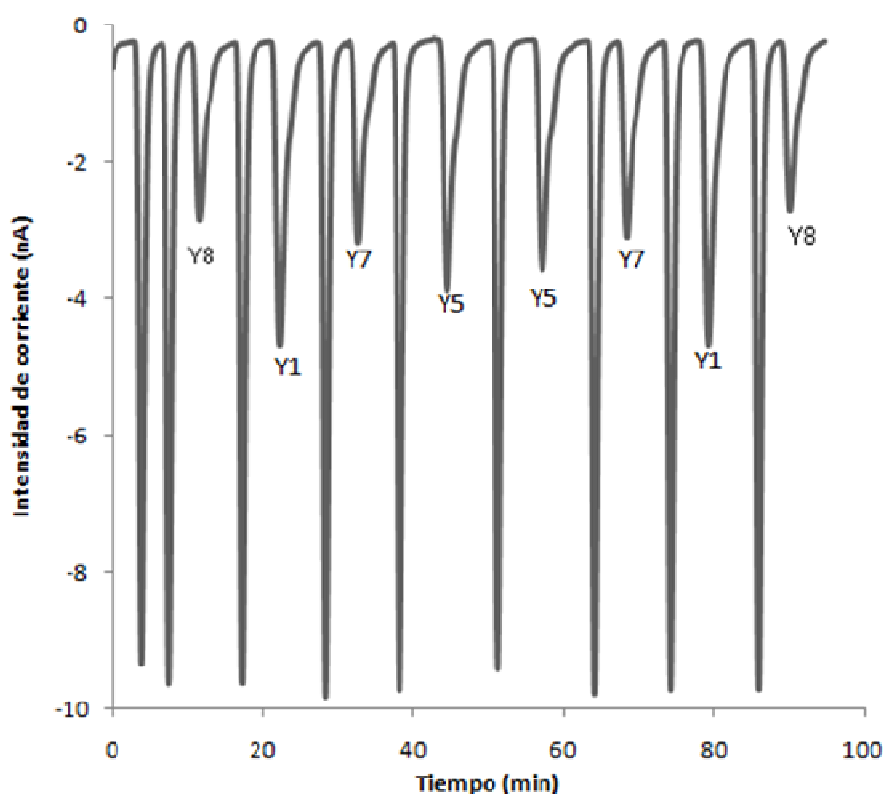


Figura 21. Respuesta amperométrica a +100 mV vs Ag/AgCl obtenida con el sistema de flujo basado en el biorreactor-SBP para inyecciones de muestras de yerba mate diluidas 1/20. Carrier: H₂O₂ 0.2 mM, solución fosfato 30 mM pH 6.5. Velocidad de flujo: 0.6 mL min⁻¹. Una solución de catecol 0.10 mM fue inyectada entre las muestras de yerba mate.

El contenido de polifenoles en los extractos de yerba mate fue estimado por interpolación de cada señal amperométrica en la curva de calibración construida con soluciones estándar de ácido clorogénico en el rango lineal. Las muestras inyectadas en el sistema en flujo sin reactor no generaron ninguna respuesta amperométrica. La Tabla 5 resume el contenido de polifenoles como un promedio de equivalentes de ácido clorogénico (EAC) extraídos de *Ilex paraguariensis*.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos y desvío estándar en muestras de *yerba mate*, expresado como equivalentes de ácido clorogénico (EAC), determinado con el reactor basado en SBP y con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (F-C), y el nivel de contenido de polifenol establecido estadísticamente.

Muestras de <i>Yerba mate</i>	EAC por SBP (mg g ⁻¹)	EAC por F-C (mg g ⁻¹)	Nivel de contenido de polifenol
Y1 (productor I)	2.227 ± 0.035	97.3 ± 3.0	Alto
Y2 (productor II)	2.15 ± 0.10	81.2 ± 2.2	Alto
Y3 (productor II)	2.05 ± 0.16	79.7 ± 1.1	Medio-alto
Y4 (productor III)	1.890 ± 0.086	77.7 ± 1.2	Medio
Y5 (productor II)	1.79 ± 0.18	67.0 ± 8.7	Medio
Y6 (productor IV)	1.66 ± 0.15	60.9 ± 8.2	Medio
Y7 (productor II)	1.45 ± 0.13	57.0 ± 2.6	Bajo
Y8 (productor V)	1.264 ± 0.055	53.2 ± 3.7	Bajo

El contenido de polifenoles también fue determinado en estas muestras por el método colorimétrico de F-C, y los resultados reportados en la Tabla 5. Como se esperaba, los contenidos de polifenoles determinados por el nuevo método fueron significativamente inferiores a aquellos obtenidos con el método de referencia (F-C). Esto puede atribuirse a la selectividad del reactor basado en SBP hacia polifenoles de bajo volumen molecular. De acuerdo con estos resultados, el reactor no sería una herramienta analítica adecuada para determinar el contenido total de estos analitos.

Por otra parte, se observó una relación lineal entre el contenido de polifenoles determinado con el reactor basado en SBP y el determinado con el método de F-C, con una pendiente de 0.0217 (E.E.: 0.0029), una ordenada al origen de 0.25 (E.E.: 0.21) y un R² de 0.9011. Este comportamiento indicaría que los resultados obtenidos con el biorreactor pueden ser usados para inferir el nivel (bajo, medio o alto) del contenido de polifenoles.

Además, para ambos métodos de análisis se determinó que los valores promedio de polifenoles en las muestras no eran todos iguales, de acuerdo con el análisis de la varianza con P<0.05. Los resultados obtenidos con el biorreactor fueron usados para agrupar las marcas comerciales en “clusters” o grupos, de acuerdo con el test de significación para el promedio de dos muestras con P<0.05 [22]. Un grupo caracterizado por el más bajo contenido de polifenoles (Y7 e Y8, de diferentes productores) presentó una diferencia significativa en el valor promedio, comparado con las otras muestras. Otro grupo caracterizado por los valores más altos en el contenido de

polifenoles (Y1 e Y2, de diferentes productores) pudo ser distinguido. En el grupo de valores intermedios se encontró una diferencia significativa entre Y4 e Y6 (ambos de la misma zona geográfica pero diferentes productores). Las muestras Y2, Y3, Y5 e Y7 provenían de la misma zona y del mismo productor pero presentaron diferentes niveles de polifenoles.

Cuando se analizaron los datos experimentales obtenidos por el método de F-C, generaron los mismos grupos. Se concluyó que las diferencias halladas en las marcas de yerba mate están relacionadas con su origen geográfico y/o diferente método de elaboración.

El reactor basado en SBP resultó una alternativa confiable para discriminar yerba mate por marca en un intento de detectar alteraciones o adulteraciones en los productos comerciales. La nueva metodología es de bajo costo y de bajo impacto ambiental, es una alternativa al uso de compuestos de molibdeno y de tungsteno propios del método de F-C.

Finalmente es importante mencionar que los extractos de té negro o té verde no generaron respuesta amperométrica con este reactor probablemente debido a un menor contenido de polifenoles (entre 5 y 50 % de la cantidad total hallado en yerba mate [16]) en conjunto con un elevado volumen molecular de estas especies químicas.

4.5.2. Análisis de vino tinto

También fue explorada la aplicación del biorreactor-SBP como herramienta analítica en la industria vitivinícola.

Los polifenoles con alto grado de polimerización presentes en vinos surgen de la condensación entre antocianinas libres y taninos, seguida de polimerización [17,18]. Era de esperar que estos polifenoles no fueran sustrato de SBP debido a su elevado volumen molecular y las restricciones difusionales halladas en este sistema de flujo. Se esperaba que fueran sustrato aquellos polifenoles solubles de bajo volumen molecular responsables de las características organolépticas de las muestras. Y en este caso, la respuesta analítica de este sistema debería reflejar cambios en el estado oxidativo del vino, relacionado con el contenido de polifenoles.

Se analizó vino tinto libre de sulfitos y otros antioxidantes externos, expuesto a diferentes procesos de oxigenación: una muestra de vino joven (producido en 2011), tres muestras de vino añejado (producido en 2009 y 2010) por micro-oxigenación, y cuatro muestras de vino suplementado con O₂.

Se utilizó el biorreactor-SBP en el sistema de flujo con detección amperométrica a +100 mV vs Ag/AgCl como una elección alternativa para la determinación del estado oxidativo del vino. La solución carrier a pH 6.5 contenía H₂O₂ 0.20 mM. Este valor de pH resultó el más adecuado para esta aplicación. El sistema fue calibrado con catecol como compuesto estándar en un rango de concentración entre 0.030 y 0.200 mM. Las muestras de vino añejado W5 y W7 dieron una respuesta electroquímica promedio equivalente a 0.0329 ± 0.0003 mM y 0.0312 ± 0.0003 mM de catecol, respectivamente. Las muestras de vino suplementadas con O₂ W6 y W8 dieron una respuesta electroquímica promedio equivalente a 0.0375 ± 0.0004 mM y 0.0337 ± 0.0002 mM de catecol, respectivamente. Las otras muestras de vino no generaron respuesta electroquímica. Por otra parte, ninguna de las muestras inyectadas en el sistema en flujo sin reactor generó respuesta amperométrica.

Esta respuesta amperométrica hallada en vinos añejados podría asociarse con los compuestos químicos de bajo volumen molecular producidos durante su envejecimiento en condiciones de micro-oxigenación, posibles sustratos de la enzima.

Las muestras fueron inyectadas sucesivamente, intercalando tres inyecciones de catecol 0.10 mM en medio. Se observó que la respuesta del catecol estándar obtenida inmediatamente después de la inyección de cada muestra de vino era menor en magnitud que la respuesta del estándar antes de la inyección de la muestra, y se recuperaba su magnitud inicial con la tercera inyección (Figura 22). Este comportamiento resultó más marcado con las muestras de vino producidas en 2011.

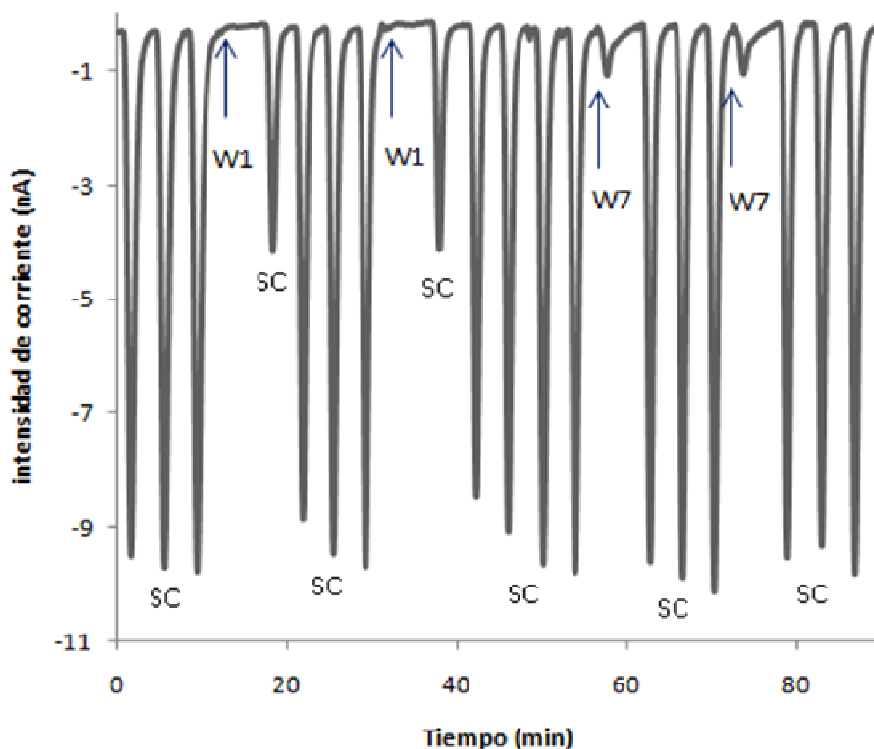


Figura 22. Respuesta amperométrica a +100 mV vs Ag/AgCl obtenida con el sistema en flujo basado en el reactor-SBP, para inyecciones de muestras de vino. Carrier H_2O_2 0.20 mM y pH 6.5. Las flechas indican el punto de inyección de la muestra. Velocidad de flujo: 0.6 mL min^{-1} . Una solución de catecol 0.10 mM fue inyectada entre muestras de vino (SC).

En este sentido, los resultados indicarían que los componentes de las muestras de vino que no son sustrato de la enzima podrían afectar la respuesta del catecol. Este comportamiento es conocido como el *efecto matriz* y fue evaluado mediante el proceso de agregado de estándar por suplemento de la muestra W7 con catecol en un rango de concentraciones entre 0.050 mM y 0.200 mM. La proporción de catecol agregado detectada amperométricamente con el biorreactor-SBP (ensayo conocido como estudio de recuperación), varió entre 68 % y 86 %. La variación de la respuesta amperométrica en función de la concentración de catecol agregado (conocida como sensibilidad a catecol) decreció en un 9 %, comparada con la sensibilidad obtenida de la curva de calibración de catecol en solución buffer; de esta manera, se evidenció el *efecto matriz*.

Finalmente, la ordenada al origen de la curva de calibración de catecol decreció un 47 % en la mezcla del sustrato con vino añejado, cuando se comparó con la ordenada al origen de la curva de concentración de catecol en solución buffer; de esta manera, fueron puestas en evidencia las *interferencias*.

Con estos resultados, se concluye que el *efecto matriz* y las *interferencias* causaron una inhibición en la respuesta de las soluciones estándar de catecol exhibidas en la Figura 22, cuando la enzima inmovilizada fue previamente expuesta a una muestra de vino en el sistema en flujo. Esta inhibición resultó ser reversible y pudo ser explotada con fines analíticos, tal como han reportado otros autores [23].

El porcentaje de inhibición (*% inhibición*) de la respuesta del catecol causada por las muestras de vino fue calculado como

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \frac{\text{área pico}_1 - \text{área pico}_2}{\text{área pico}_1} \quad (2)$$

Donde *área pico₁* es la respuesta amperométrica del estándar de catecol 0.100 mM anterior a la inyección de cada muestra de vino, y *área pico₂* es la respuesta amperométrica del estándar de catecol 0.100 mM inmediatamente posterior a la inyección de cada muestra de vino.

Este porcentaje de inhibición mostró una dependencia con la naturaleza del vino: el porcentaje decreció en los vinos añejados W5 y W7, en comparación con la muestra de vino joven W1 (Tabla 6). Además y como fuera mencionado previamente, las muestras W5 y W7 produjeron respuesta amperométrica.

La muestra W3 correspondiente a vino añejado presentó un comportamiento similar al de una muestra joven. W3 y W5, ambos de 2010, provienen de diferentes lotes de producción.

Cada muestra suplementada con O₂ produjo prácticamente el mismo porcentaje de inhibición que su respectiva muestra original, lo que indica claramente que los cambios químicos asociados con una exposición aguda a oxígeno molecular no afectaron la interacción de la muestra con el reactor enzimático.

En la Tabla 6 se presentan otros parámetros relacionados con la maduración del vino [24]: absorbancia a 512 nm de las muestras de vino diluidas (relacionada con el contenido de antocianinas [17,18]), pH, potencial rédox (E_H), r_H , y el contenido promedio de polifenoles determinado por el método de F-C expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG).

Aunque el pH no estuvo directamente asociado con la edad del vino, los valores de pH de las muestras suplementadas con O₂ fueron significativamente inferiores a los valores de las respectivas muestras originales, como resultado lógico de una oxidación aguda.

El potencial rédox E_H es el potencial de reducción relacionado con la maduración del vino. Este parámetro fue usado para monitorear el estado oxidativo de las muestras ya que es consecuencia de procesos de óxido-reducción que ocurren en el vino durante el período de añejamiento. Para las muestras originales (W1, W3, W5 y W7) el valor de E_H se incrementó con el añejamiento, mientras que en el caso de las muestras suplementadas con O₂, el E_H se incrementó significativamente en la muestra joven y en una muestra de 2010 cuando fueron comparados con la respectiva muestra original.

El parámetro r_H se calcula a partir de la ecuación de Nernst y da una medida de la capacidad de oxidación o reducción independientemente de su valor de pH [24]. El valor de este parámetro

para las muestras originales decreció con el añejamiento, en tanto que para las muestras suplementadas con O₂ resultó inferior al de cada muestra original (excepto para W8).

$$E_H = 59.16 \times (2x \text{ pH} - r_H) \quad (3)$$

Las antocianinas son responsables en gran medida del color rojo del vino tinto, pero su gran sensibilidad y reactividad frente al O₂ causa que desaparezca gradualmente en el añejamiento. El espectro UV-visible de cada muestra diluida mostró una banda de absorción con un máximo en 512 nm asignado a las antocianinas [17,18] (Figura 23). Esta banda decreció significativamente en el vino añejado W7 y W8, y resultó muy intensa en las muestras W5 y W6.

El contenido de polifenoles también fue determinado en muestras de vino mediante el método de F-C con ácido gálico como estándar. Se encontró el mayor contenido en las muestras W5 y W6 asociado al elevado contenido de antocianinas, y se halló muy disminuido en las muestras W7 y W8. El cuadrado del coeficiente de correlación lineal (R²) entre contenido de polifenoles y absorbancia a 512 nm fue de 0.8747.

Tabla 6: Valores promedio de porcentaje de inhibición de la señal de catecol y desvío estándar en el sistema de flujo para muestras de vino tinto. Otros parámetros enológicos: año de producción, absorbancia a 512 nm de muestras diluidas, pH, potencial rédox (E_H), r_H y el valor promedio de contenido fenólico total expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG):

Muestra	Año	% Inhibición	Absorbancia (512 nm)	pH	E_H (mV) ^a	r_H	EAG (mg L ⁻¹) ^b
W1	2011	65.1 ± 3.4	0.587	3.70	241	3.32	1173
W2	2011 ^c	66.6 ± 4.2	0.621	3.60	258	2.84	1097
W3	2010	51.9 ± 4.8	0.483	3.80	258	3.24	1058
W4	2010 ^c	49.4 ± 2.6	0.503	3.70	261	2.99	1047
W5	2010	24.7 ± 1.4	1.025	3.88	271	3.19	1345
W6	2010 ^c	24.6 ± 2.7	0.886	3.76	265	3.05	1305
W7	2009	9.9 ± 1.9	0.188	3.66	319	1.93	532
W8	2009 ^c	4.6 ± 3.1	0.183	3.57	300	2.07	496

^a vs. Ag/AgCl

^bD.E.R. inferior a 1.5 %

^c Muestras de vino suplementadas con O₂

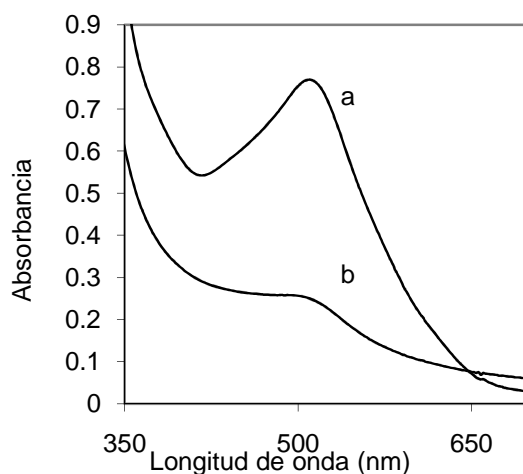


Figura 23. Espectros visible de vino joven (a) y vino añejado (b).

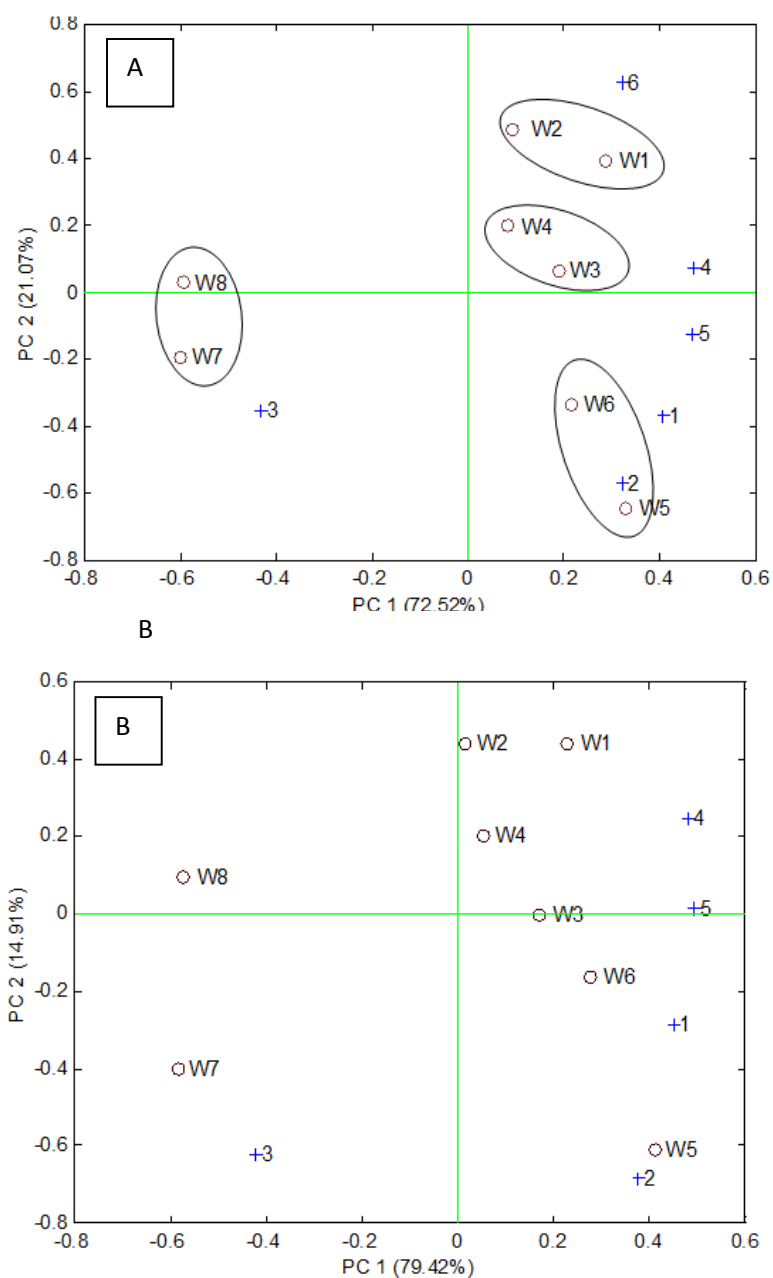


Figura 24. Biplots de componentes principales obtenidos para 8 muestras y: 6 descriptores (% inhibición incluido) (A); 5 descriptores (% inhibición excluido) (B). Scores normalizados (O); loads (+): absorbancia a 512 nm (1); pH (2); E_H (3); r_H (4); contenido de polifenoles totales (5); % inhibición (6).

El valor de R^2 para la correlación entre el porcentaje de inhibición y E_H fue de 0.7337. En este caso, un bajo valor de E_H estuvo asociado a un contenido de polifenoles elevado, los que pudieron eventualmente reaccionar con los productos radicalarios del catecol obtenidos en el reactor-SBP del sistema en flujo. En consecuencia, la respuesta amperométrica del catecol oxidado podría haber sido afectada por los polifenoles del vino inyectado previamente, si éstos fueron retenidos por el material del reactor mediante una interacción débil. Del mismo modo, un

valor alto de E_H podría asociarse con la presencia de polifenoles polimerizados y oxidados que tendrían menor capacidad de interactuar con radicales libres.

No se encontró otra correlación entre las variables analizadas para estas muestras de vino tinto. Los resultados fueron analizados por análisis de componentes principales (PCA) para la clasificación del vino según su estado de añejamiento y la naturaleza de cada muestra. Las dos primeras variables no correlacionadas (PC1 y PC2) se presentan en los biplots de la Figura 24. La comparación de la Figura 24.A con 24.B sugiere la relevancia del porcentaje de inhibición como buen descriptor en la discriminación de muestras de vino. Esta muestra permitió la separación de las muestras de 2010 y 2011.

En la Figura 24.A, W5 y W6 se ubicaron en el cuadrante IV, y caracterizadas por una elevada absorbancia a 512 nm y alto contenido polifenólico. En el cuadrante I se encontraron las muestras de vino joven W1 y W2 caracterizadas por un elevado porcentaje de inhibición, y W3 y W4 distinguidas por valores de score normalizado bajos. Las muestras W7 y W8 del año 2009 tuvieron valores negativos de score para PC1 y se distinguieron por valores elevados de E_H .

En resumen, las muestras de vino pudieron ser diferenciadas por su naturaleza y proceso de añejamiento. La administración de O_2 jugó un rol clave en la maduración del vino tinto. Se observó que el pH de todas las muestras fue afectado por el suplemento agudo de O_2 , pero que las demás variables no sufrieron cambios sistemáticos. Por otra parte, la micro-oxigenación en botellas afectó el potencial rédox (E_H), el parámetro r_H y el porcentaje de inhibición. La cantidad total de polifenoles y la presencia de antocianinas varió con el añejamiento del vino pero también con la naturaleza intrínseca de cada vino.

4.5.3. Conclusiones de la Sección 4.5

Se desarrolló un reactor basado en SBP con empleo del polianfolito insoluble *Poly*(EGDE-MAA-2MI) como soporte de la enzima. Fue parte de un sistema de inyección en flujo acoplado a un detector amperométrico diseñado para el análisis de potenciales sustratos de SBP [25].

El polianfolito, con sus grupos $-COO^-$, $-OH$ y 2MI, resultó ser una matriz conveniente para la inmovilización de peroxidasa de cáscara de semilla de soja desde su extracto acuoso sin purificación previa. Esto trae implícitas las ventajas de bajo costo de producción y fácil preparación. Por otra parte, se debe remarcar que esta enzima está presente en altas concentraciones en la cáscara de semilla de soja, que es una fuente de costo prácticamente nulo porque se trata de un producto secundario de la industria alimentaria.

El análisis de las velocidades experimentales de reacción en función de la velocidad de flujo permitió determinar la existencia de restricciones difusionales externas en la transferencia de masa de los sustratos.

Se exploró la aplicabilidad del biorreactor en la clasificación de alimentos, particularmente en bebidas: en extractos de yerba mate y en vino tinto artesanal.

Las muestras de yerba mate pudieron ser discriminadas por marca comercial, probablemente debido a diferentes procedimientos de elaboración que afectaron el contenido total de polifenoles y la respuesta analítica de cada infusión. Si bien el contenido de polifenoles determinado mediante el uso del reactor resultó inferior al contenido determinado por el método de referencia, existió una correlación lineal entre los valores hallados por ambos métodos. Aquí resultó evidente que el biorreactor resultó más selectivo a polifenoles de bajo volumen molecular, y sus resultados

podieron emplearse para inferir el nivel (bajo, medio o alto) del contenido de polifenoles. El estudio permitió concluir que las diferencias halladas en las marcas de yerba mate están relacionadas con su origen geográfico y/o diferente método de elaboración.

El reactor también generó resultados de utilidad analítica en muestras de vino. Solamente las muestras de vino añejado por micro-oxigenación dieron una respuesta amperométrica, probablemente asociada con los compuestos químicos de bajo volumen molecular producto del añejamiento, posibles sustratos de la enzima. Paralelamente se encontró que los componentes de las muestras de vino que no son sustrato de la enzima podrían afectar la respuesta amperométrica del catecol usado como estándar. Este comportamiento conocido como el *efecto matriz* fue demostrado mediante ensayos de recuperación de estándar agregado a la muestra: se vio afectada la sensibilidad al catecol y el porcentaje de recuperación. Asimismo, las variaciones en la ordenada al origen de la recta de calibrado pusieron en evidencia las *interferencias* producidas por la muestra.

Con estos resultados, se determinó que el *efecto matriz* y las *interferencias* producidas por las muestras de vino causaron una inhibición en la respuesta de las soluciones estándar de catecol cuando la enzima inmovilizada fue previamente expuesta a una muestra de vino en el sistema en flujo. Un alto porcentaje de inhibición podría asociarse con un contenido de polifenoles elevado en la muestra de vino previamente inyectada, los que pudieron eventualmente reaccionar con los productos radicalarios del catecol obtenidos en el reactor-SBP del sistema en flujo. En consecuencia, la respuesta amperométrica del catecol oxidado podría haberse afectado (ser disminuida) por los polifenoles del vino inyectado previamente si fueron retenidos por el material del reactor mediante una interacción débil. Del mismo modo, un valor bajo de porcentaje de inhibición podría asociarse con la presencia de polifenoles polimerizados y oxidados que tendrían menor capacidad de interactuar con radicales libres. Este comportamiento pudo ser explotado para mejorar la autenticación de vino mediante análisis multivariado, combinando estos datos con otros parámetros enológicos.

Estos constituyen los primeros estudios de aplicabilidad de SBP en el ámbito analítico.

4.6. Referencias del Capítulo 4

1. Lázaro Martínez, J. M. Tesis de Doctorado: Síntesis, Caracterización y Estudios de Aplicabilidad de Nuevos Materiales Poliméricos. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. 23 de marzo de 2011.
2. Dai, K.; Chen, H.; Peng, T.; Ke, D.; Yi, H. *Chemosphere* 69 (2007) 1361.
3. C. Baiocchi, M.C. Brussino, E. Pramauro, A. Bianco Prevot, L. Palmisano, G. Marcí, *Int. J. Mass Spectrom.* 214 (2002) 247.
4. Y. He, F. Grieser, M. Ashokkumar, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 974.
5. Lázaro Martínez, J.M.; Leal Denis, M.F.; Campo Dall'Orto, V.; Buldain, G.Y. *Eur. Polym. J.* 44 (2008) 392.
6. Lázaro Martínez, J.M.; A.K. Chattah, A.K.; Monti, G.A.; Leal Denis, M.F.; Buldain, G.Y.; Campo Dall'Orto, V. *Polymer* 49 (2008) 5482.
7. Lombardo Lupano, L.V.; Juan Manuel Lázaro Martínez, J.M.; Piehl, L.L.; Rubín de Celis, E.; Campo Dall'Orto, V. *Appl. Catal. A* 467(2013) 342.
8. Lombardo Lupano, L.V.; Juan Manuel Lázaro Martínez, J.M.*; Piehl, L.L.; Rubín de Celis, E.; Torres Sánchez, R.M.; Campo Dall'Orto, V.*. *Langmuir*, 30(10) (2014) 2903.
9. Alhasan, R.; Njus, D. *Anal. Biochem.* 381 (2008) 142.

10. González Clar P.Y.; Levin G.; Miranda M.V.; Campo Dall' Orto V. Eco-friendly approach for Direct Blue 273 removal from an aqueous medium. En: Bundschuh J, editor. *Adv. Oxid. Technol. - Sustain. Solut. environmental Treat.*, Balkema, CRC Press, Taylor and Francis Group.; (2014) p. 131.
11. Lombardo Lupano, L.V.; Lázaro Martínez, J.M.; Vizioli, N.M; Torres, D.I.; Campo Dall' Orto, V. *Macromol. Mater. Eng.* 301 (2) (2016) 167.
12. Wang, P.; Yook, S-H.; Jun, S-H.; Li, Y-L.; Kim, M.; Kim, H-E.; Koh, Y-H. *Mater. Lett.* 63 (2009) 1207.
13. Cui, J.; van Koeverden, M.P.; Müllner, M.; Kempe, K.; Caruso, F. *Adv. Colloid Interface Sci.* 207 (2014) 14.
14. Dalgarno, S.J.; Power, N.P.; Atwood, J.L.; *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008) 825.
15. Driver, K.; Baco, S; Khutoryanskiy, V.V. *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 4249.
16. Campo Dall' Orto, V; Vago, J.M.; Carballo, R.R.; Rezzano, I.N. *Anal. Lett.*, 38 (2005) 19.
17. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo J.C. *Anal. Chim. Acta*, 563 (2006) 238.
18. Darias-Martín, J.; Martín-Luis, B.; Carrillo-López, M.; Lamuela- Raventós, R.; Díaz-Romero, C.; Boulton, R. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 2062.
19. Šeruga, M.; Novak, I.; Jakobek, L. *Food Chem.* 124 (2011) 1208.
20. Martins, R.C.; Oliveira, R.; Bento, F.; Geraldo, D.; Lopes, V.V.; De Pinho, P.G.; Oliveira, C.M.; Silva Ferreira, A.C. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 12092.
21. Carlton, W.K.; Gump, B.; Fugelsang, K.; Hasson A.S. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 5620.
22. Miller, J.C.; Miller, J.N. en: *Statistics for Analytical Chemistry*, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana S.A., Wilmington, Delaware, U.S.A., (1993).
23. Girelli, A.M.; Mattei, E.; Papaleo, D.J. *Food Compos. Anal.* 22 (2009) 709.
24. del Álamo, M.; Nevares, I.; Carcel, L.M. *Anal. Chim. Acta*, 563 (2006) 223.
25. Denaday, L.R.; Miranda, M.V.; Torres Sánchez, R.M.; Lázaro Martínez, J.M.; Lombardo Lupano, L.V.; Campo Dall' Orto, V. *Biochem. Eng. J.* 58-59 (2011) 57.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se presentó la obtención y caracterización de los complejos bio-inspirados Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) y Co(II)-*Poly*(EGDE-DA), a la vez que se completó la caracterización del complejo Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA). Se trata de especies bio-inspiradas por contener cationes de elementos de transición que intervienen en numerosos pasos metabólicos involucrando transferencia y/ o transporte de electrones. La elevada funcionalidad de la matriz polimérica confiere selectividad, solvatación, capacidad de donar electrones para generar enlaces covalentes coordinados, que emulan estas biomoléculas y logran una mayor estabilidad de la estructura resultante.

Las metodologías modernas de análisis estructural empleadas permitieron obtener información acerca de la naturaleza de la interacción entre los iones metálicos y los hidrogeles probados. Las señales de los átomos de C del N-heterociclo y del ácido carboxílico se ensancharon y desaparecieron de los espectros de ^{13}C CP-MAS del complejo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI), lo que constituye una evidencia inequívoca de la interacción de los centros paramagnéticos con los ligandos. El hidrogel *Poly*(EGDE-DA) presentó una única señal importante en ^{13}C CP-MAS, por lo tanto la técnica más adecuada para analizar la interacción con cationes resultó ser FT-IR, en la que se encontró mejor resolución de las señales como consecuencia de la captación de estos iones.

Otras técnicas y estrategias empleadas brindaron más detalles confirmatorios de la coordinación, se encontró un aumento en el grado de reticulación y rugosidad de los materiales, y se evidenció una disminución en su estabilidad térmica.

Una de las propiedades más interesantes de los complejos de coordinación obtenidos fue su actividad catalítica en la activación de H_2O_2 para dar lugar a la formación de radicales libres y O_2 . Era ya conocida la capacidad activadora de los complejos con Cu(II), que fue verificada para el sistema heterogéneo Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA). Se exploró por primera vez el efecto particular del ion Co(II) usando dos ligandos de naturaleza diferente: *Poly*(EGDE-MAA-2MI) y *Poly*(EGDE-DA). La técnica de ESR resultó una herramienta poderosa para detectar y confirmar la formación de la especie $\text{O}_2^{\bullet-}$, además de OH^{\bullet} . Se demostró que este último producto también fue generado por los materiales que constituyen la matriz, debido a la presencia de átomos de N que facilitarían la transferencia electrónica en presencia de H_2O_2 . Toda esta información contrastada con los controles necesarios y los datos de literatura permitió postular los posibles mecanismos involucrados en la activación de H_2O_2 por catálisis heterogénea.

Sobre el complejo Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) se trabajó la posibilidad de recuperación del catalizador heterogéneo, la pérdida del catión en el ciclo operativo y su aptitud para la regeneración con el fin de recuperar la actividad catalítica. Así se determinó que el material podía recargarse con Co(II) y recuperaba su eficiencia.

Otra de las propiedades relevantes de estas matrices poliméricas fue su capacidad de adsorción y/o captación de especies iónicas, que surge de su alto grado de funcionalización. La elevada capacidad de carga de estos polímeros para las especies iónicas Co(II) y Cu(II) pudo ser estimada

y cotejada experimentalmente. Se estudió la captación del colorante Direct Blue 273 sobre un lote de *Poly*(EGDE-MAA-2MI), como modelo de compuesto orgánico con sustituyentes cargados negativamente en interacción con un polianfolito. Llevando más adelante esta idea, se estudió la adsorción de la enzima peroxidasa de cáscara de semilla de soja sobre otro lote de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) con el fin de preconcentrarla e inmovilizarla para la preparación de un biorreactor en sistema de flujo.

Paralelamente se desarrolló otro material soluble en agua, bio-inspirado funcionalizado con residuos $-\text{COO}^-$ e IM, los cuales imitan la estructura de péptidos y proteínas con la pretensión de emular sus propiedades. Para lograr una estructura diferente de la de los hidrogeles mencionados anteriormente, se optó por modificar la estrategia de síntesis, haciéndola secuencial en lugar de proceder a la mezcla simultánea de todos los reactivos. Así, en una primera etapa se obtuvo el hidrogel *Poly*(EGDE-IM), y en una segunda etapa se agregó MAA. Se encontró que el tiempo de incubación de MAA en contacto con *Poly*(EGDE-IM) determinaba la solubilidad en agua del producto obtenido. Superando las 12 horas de reacción a 60° C se logró que el hidrogel *Poly*(EGDE-IM) adquiriera la funcionalización necesaria para su posterior solubilización. Esa funcionalización consistió en la formación de grupos éster entre el MAA y los $-\text{OH}$ de *Poly*(EGDE-IM) o entre MAA y los grupos epóxido remanentes en *Poly*(EGDE-IM). La etapa final consistió en la polimerización radicalaria de los monómeros de MAA a través de su resto vinilo, formando *Poly*(MAA) que mayormente quedaba unido covalentemente a los residuos MAA esterificados con *Poly*(EGDE-IM).

El material obtenido fue heterogéneo, con bloques de *Poly*(MAA) unidos covalentemente a *Poly*(EGDE-IM), de longitud variable en las distintas moléculas. El tamaño de los oligómeros resultó inferior o igual a 12 kDa, y el producto recibió el nombre de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA).

El mecanismo de síntesis que se propone en este trabajo así como la estructura probable del producto surgió de la puesta en común de una vasta evidencia experimental obtenida por CZE, mediciones de potencial zeta (ζ), análisis elemental, titulaciones ácido-base, cromatografía de exclusión molecular (SEC) y MALDI-TOF.

NMR y FT-IR permitieron demostrar que estas moléculas poseían los mismos grupos funcionales que los polímeros insolubles, con una modificación en la proporción de los residuos polimerizados constituyentes. Se hicieron experimentos de electroforesis capilar zonal (CZE), con la finalidad de separar las diferentes fracciones en función de su relación carga / tamaño a un determinado pH. Se observó migración hacia el cátodo delante del marcador neutro, que denotó carga total positiva, excepto a pH 9.0 en que se apreció una banda neutra. Las mediciones de ζ indicaron la presencia de especies con carga positiva a pH inferior a 5.7, así como especies con carga negativa a pH superior. Se realizó un ensayo de SEC, en el que fue confirmada la formación de macro-aglomerados solubles en agua que aumentaban de tamaño con el paso del tiempo de permanencia en solución; por otra parte, se determinó que las moléculas poseían tamaño inferior a 12 kDa. Mediante ensayos de MALDI-TOF, se pudieron establecer estructuras de bajo peso molecular que evidenciaban las diferentes reacciones químicas ocurridas en el proceso de síntesis: apertura de epóxido y formación de aductos *Poly*(EGDE-IM), formación de uniones éster entre MAA y EGDE, formación de cadenas *Poly*(MAA) por polimerización radicalaria, y formación de *Poly*(EGDE) por eterificación.

En principio se detectó un *IEP* para el producto a granel disuelto en agua, en el cual no se produjo disminución de la solubilidad del material sino a valores de pH inferiores. Paralelamente se determinó que la composición del material era heterogénea, por lo que cabía la posibilidad de que algunas moléculas alcanzaran su *IEP* a pH ácido y esta situación provocara la separación de fases. Sin embargo se encontró que las formas ácidas precipitadas poseían bloques *Poly(MAA)* más extensos que las moléculas que permanecieron en solución.

Es posible afirmar que las distintas poblaciones de oligómeros exhibieron diferencias en la longitud / tamaño de cada bloque constitutivo, pero aún así fue posible determinar un *IEP* para el granel de síntesis. Además, el sólido que precipitó a un pH inferior a 4.0 presentó un exceso de residuos MAA polimerizados, en tanto que por CZE se detectaron moléculas neutras a un pH superior a 6.0 que permanecieron en solución.

Para comprender todos estos resultados, fue necesario considerar una estructura probable de oligómeros constituidos por dos bloques, donde el tamaño de los bloques podría ser diferente en cada molécula. Es decir, podría suponerse una distribución estadística del tamaño de cada bloque en las moléculas de oligómeros. Este modelo en bloque sería válido para la mayoría de las fracciones, excepto para aquella detectada como neutra por CZE a pH 9.0; su solubilidad indicaría que se trata de un oligómero con propiedad de anfolito que presenta una distribución estadística de los monómeros en su trama, en vez de bloques.

Estas moléculas presentaron la propiedad de formar macroagregados solubles en agua cuyo tamaño aumenta con el tiempo de disolución. Su disrupción por dilución (por ejemplo, como resultado de la diálisis) determinó la cristalización de aquellas formas menos solubles, posiblemente incluidas en el núcleo del macroagregado.

El conocimiento de todas estas propiedades enunciadas permitió proyectar las posibles aplicaciones plasmadas en el Capítulo 4.

Se utilizaron los sistemas heterogéneos $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)} / \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)} / \text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{Cu(II)-Poly(EGDE-DA)} / \text{H}_2\text{O}_2$ en la decoloración de soluciones de MO, modelo de efluentes de la industria textil. Se determinó que la decoloración ocurría por los procesos paralelos de captación y degradación oxidativa, a través de una cinética de pseudo-primer orden.

En el tratamiento no se logró la mineralización completa de MO, de acuerdo con la evidencia espectroscópica. Por lo tanto, este método de decoloración de bajo impacto ambiental puede resultar adecuado para iniciar el proceso de degradación de este colorante en particular, hasta agotamiento del H_2O_2 agregado, y luego podría ser completado por métodos biológicos.

De los sistemas heterogéneos probados, el complejo con Cu(II) resultó ser el más eficiente en cuanto a la velocidad de decoloración y a la proporción de MO que resulta oxidada.

La degradación de MO con el sistema $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)} / \text{H}_2\text{O}_2$, tuvo lugar por el ataque de las especies radicalarias liberadas a la solución durante los primeros 10 minutos de activación. Sin embargo, para el sistema $\text{Co(II)-Poly(EGDE-DA)} / \text{H}_2\text{O}_2$, fue necesario más tiempo de activación; si bien existen ciertos indicios de formación de especies intermediarias reactivas del Co(II) en la matriz sólida, no se pudo demostrar su existencia.

También se efectuaron estudios con el fin de verificar la pérdida de Co(II) con los ciclos de catálisis del sistema $\text{Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI)} / \text{H}_2\text{O}_2$. Se determinó que cerca del 40 % del

Co(II) captado se perdió en dos ciclos operativos, y el 60 % restante permaneció unido en forma estable. A partir de esta información se evaluó la posibilidad de recargado de este material, que permitió devolver al sistema a las condiciones cinéticas iniciales.

La degradación de MO con el sistema Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) / H₂O₂ ocurrió mediante la acción de los radicales liberados al medio a lo largo de todo el proceso de activación; no se encontró evidencia que confirme la participación de especies intermediarias reactivas del Cu(II) en la matriz sólida.

Los sistemas generadores de O₂^{•-} fueron empleados para un proceso de oxidación parcial de interés industrial: la conversión de epinefrina en adrenocromo. El anión superóxido resulta útil en la aceleración de procesos de conversión en los que el sustrato tiene un potencial redox (*E*) bajo.

Los *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) fueron utilizados en conjunto con Fe(II) para la co-precipitación *in situ* del colorante azo-aniónico DB273. Comparando la eficiencia de decoloración de este material con la de los materiales insolubles desarrollados por nuestro grupo, aquella resultó superior.

La adición de *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA) a una solución de Fe(II) y ácido cítrico en proporciones adecuadas dio lugar a la formación de esferas huecas, por coordinación y agregación de los oligómeros en la interfase por efecto del pH ácido. Su solubilidad a valores de pH iguales o superiores a 7.0 las vuelve potencialmente adecuadas para la liberación intestinal de fármacos en el contexto de liberación controlada.

Finalmente, se exploró la aplicabilidad del biorreactor basado en SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) en la clasificación de alimentos, particularmente en bebidas: en extractos de yerba mate y en vino tinto artesanal. Las muestras de yerba mate pudieron ser discriminadas por marca comercial. El biorreactor resultó más selectivo a polifenoles de bajo volumen molecular, y sus resultados pudieron emplearse para inferir el nivel (bajo, medio o alto) del contenido de polifenoles. El estudio permitió concluir que las diferencias halladas en las marcas de yerba mate están relacionadas con su origen geográfico y/o diferente método de elaboración.

El reactor también generó resultados de utilidad analítica en muestras de vino libre de sulfito. Se encontró que los componentes de las muestras de vino que no son sustrato de la enzima podrían disminuir la respuesta amperométrica del catecol usado como estándar cuando la enzima inmovilizada era previamente expuesta al vino en el sistema en flujo. Un alto porcentaje de inhibición podría asociarse con un contenido de polifenoles elevado en la muestra de vino previamente inyectada, que pudieron eventualmente reaccionar con los productos radicalarios del catecol obtenidos en el reactor-SBP del sistema en flujo. Este comportamiento pudo ser explotado para mejorar la autenticación de vino mediante análisis multivariado, combinando estos datos con otros parámetros enológicos. Estos son los primeros estudios de aplicabilidad de SBP en el ámbito analítico.

Parte del trabajo experimental y los resultados obtenidos en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

“SYNTHESIS OF WATER-SOLUBLE OLIGOMERS FROM IMIDAZOLE, ETHYLENEGLYCOL DIGLYCIDYL ETHER, AND METHACRYLIC ACID. AN INSIGHT INTO THE CHEMICAL STRUCTURE, AGGREGATION BEHAVIOR AND FORMATION OF HOLLOW SPHERES”. Lucía V. Lombardo Lupano, Juan Manuel Lázaro Martínez, Nora Matilde Vizioli, Dimas Ignacio Torres y Viviana Campo Dall’Orto. *Macromol. Mater. Eng.* 301 (2) (2016) 167 – 181.

“SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND CATALYTIC PROPERTIES OF CATIONIC HYDROGELS CONTAINING COPPER(II) AND COBALT(II) IONS.” Lucía V. Lombardo Lupano, Juan Manuel Lázaro Martínez, Lidia L. Piehl Emilio Rubín de Celis, Rosa María Torres Sánchez, and Viviana Campo Dall’Orto. *Langmuir*, 30(10) (2014) 2903–2913.

“ACTIVATION OF H₂O₂ AND SUPEROXIDE PRODUCTION USING A NOVEL COBALT COMPLEX BASED ON A POLYAMPHOLYTE”. Lucía V Lombardo Lupano; Juan M Lázaro Martínez; Lidia L. Piehl; Emilio Rubín de Celis; Viviana Campo Dall’Orto. *Appl. Catal. A*, 467(2013) 342 – 354.

“DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A POLYAMPHOLYTE-BASED REACTOR IMMOBILIZING SOYBEAN SEED COAT PEROXIDASE FOR ANALYTICAL APPLICATIONS IN A FLOW SYSTEM.” L.R. Denaday, M. V. Miranda, R.M. Torres Sánchez, J.M. Lázaro Martínez, Lucía V. Lombardo Lupano, V. Campo Dall’Orto. *Biochem. Eng. J.* 58-59 (2011) 57-68.

Solicitud de Patente n°: 20130101144. Fecha de solicitud: 09/04/2013. Fecha de publicación: 28/01/2015. N° de documento: AR091332 A1. Inventores: Campodall’Orto V., Lombardo Lupano, L.L., Del Rio L.A., Lázaro Martínez J.M. Título: “Proceso para preparar plianfolitos solubles en agua derivados de ácido metacrílico, imidazoles y un diepóxido.”

Perspectivas del trabajo futuro:

La experiencia obtenida en esta labor de Tesis, en cuanto al manejo de métodos instrumentales, desarrollo de procesos de síntesis de polímeros e interpretación de resultados, y exploración de potenciales aplicaciones de los materiales, abre un abanico de posibilidades y de nuevas líneas de trabajo en diferentes áreas del conocimiento.

Por una parte es posible modificar el método de síntesis desarrollado por el grupo para obtener materiales más homogéneos, funcionalizados de acuerdo con la aplicación directa que se les dará. Esto es posible debido a que se logró conocer a fondo el mecanismo de reacción.

Este es un paso esencial para mejorar la estabilidad de los complejos con Co(II) y Cu(II) en su proceso de activación de H₂O₂, ya que se evita de esta manera la necesidad de recargar el catalizador luego de un ciclo operativo. Se trabajaría entonces con nuevos monómeros que actuarían como ligandos más estables en el complejo.

Otro aspecto interesante consiste en mejorar la estabilidad mecánica de las esferas huecas desarrolladas. Y esto está directamente ligado al planteo precedente de modificar los pasos de síntesis y/o los monómeros utilizados. En este trabajo de Tesis se ha logrado el primer paso: obtener las esferas. Aquí se abre un panorama amplio de trabajo que abarca la optimización de la estructura supramolecular, y a continuación los estudios de aplicabilidad de estas esferas.

Se ha demostrado que los materiales presentan una elevada capacidad de carga de pequeñas moléculas iónicas e incluso biomoléculas. Esto constituye en sí una vasta posibilidad de exploración de aplicabilidades de interés ambiental y biotecnológico.

Se puede concluir que este trabajo ha generado una variedad de líneas de estudio para explorar.

CAPÍTULO 6

EXPERIMENTAL

6.1. Síntesis de materiales poliméricos

6.1.1. Reactivos empleados

Reactivos de la síntesis:

2-Metilimidazol (2MI; 99 %), imidazol (IM; 99 %), ácido metacrílico (MAA; 99 %), 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano (DA), y etilenglicol diglicidil éter (EGDE; 50 % en etilenglicol dimetil éter) fueron adquiridos a Sigma–Aldrich. Peróxido de benzoilo fue adquirido a Fluka. Acetonitrilo grado HPLC fue marca Baxter.

Otros reactivos:

Epinefrina bitartrato, 5,5-dimetil-1-pirrolin-*N*-óxido (DMPO), galato de epigalocatequina, rutina, ácido clorogénico y catecol fueron adquiridos a Sigma–Aldrich. Superoxido dismutasa (SOD) fue adquirida a Biosidus (Buenos Aires, Argentina). Metanol grado HPLC fue marca Sintorgan. Direct Blue 273 (número CAS: 76359-37-0; fórmula química: $C_{33}H_{20}CuN_5O_{11}S_3 \cdot 3Na$; PM: 891.26) fue marca Clariant. $CoSO_4$ y acetato de cobalto fueron adquiridos a Mallincrodt (USA). Na_2SO_4 y H_2O_2 (30 %) fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Germany). Naranja de metilo fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology Inc. El agua necesaria para los experimentos fue obtenida con un destilador de vidrio FIGMAY (Córdoba, Argentina). Todos los otros reactivos utilizados fueron grado analítico.

6.1.2. Método de síntesis del polianfolito insoluble en agua denominado *Poly*(EGDE-MAA-2MI)

El polianfolito utilizado en estos experimentos fue sintetizado en tubos de hemólisis. En cada tubo se mezclaron 0.10 gramos de 2-metilimidazol (1.2 milimoles de 2MI), 0.10 mL de ácido metacrílico (1.2 milimoles de MAA) y 0.20 mL de etilenglicol diglicidil éter (0.64 milimoles de EGDE) con 0.4 mL de acetonitrilo. La boca del tubo fue cubierta con papel de aluminio y la mezcla fue puesta en estufa a 60° C durante 30 minutos. Luego se agregaron 3.0 mg de peróxido de benzoilo triturado y se termostatózó la solución a 60° C durante 24 horas. Se obtuvo un monolito que fue triturado en partículas, puesto en contacto con agua destilada, lavado 3 veces y secado en estufa a 60° C. El rendimiento de la reacción fue del 50 % [1].

6.1.3. Método de síntesis del polielectrolito insoluble en agua denominado *Poly*(EGDE-DA)

En cada tubo de ensayo se añadieron 176 μ L de 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano (1.2 milimoles de DA), 0.40 mL (1.28 milimoles) de EGDE y 0.40 mL de acetonitrilo. La mezcla se calentó en estufa a 60° C durante 24 horas y posteriormente se agregaron 5 mL de agua destilada dejándolo reposar 24 horas para obtener un gel hinchado que luego se lavó y se lo dejó secar por 24 horas en estufa a 60° C [1]. El rendimiento de la reacción fue del 98 %.

6.1.4. Método de síntesis de oligómeros solubles en agua denominados *oligómeros* (EGDE-IM-co-MAA)

En un balón de 100 mL de capacidad se añadieron 6 gramos (88.2 milimoles) de IM, 24 mL de acetonitrilo y 12 mL (38.5 milimoles) de EGDE. Se agregó una barra magnética cubierta en

teflon y se cubrió la boca del balón con una lámina de aluminio. El balón con la mezcla fue puesto en un baño de glicerol termostatzado a 60° C con una placa calefactora, con agitación magnética durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo, se agregaron 6 mL (70.0 milimoles) de MAA, se cubrió nuevamente la boca del balón con la lámina de aluminio y continuó la reacción con agitación durante otras 24 horas a 60° C.

Transcurrido el tiempo se agregaron 10 mL de acetonitrilo y una porción de 200 mg de peróxido de benzoilo a la solución en agitación a 60° C. Una vez disuelto, se agregó otra porción de 300 mg de peróxido de benzoilo, se esperó hasta disolución completa en ausencia de agitación y luego de unos minutos se produjo enturbiamiento de la solución y formación de una goma de color blanquecino suspendida en el medio líquido de reacción. Se empleó una varilla de vidrio para facilitar la difusión del peróxido de benzoilo al interior del material y para facilitar la separación de las dos fases formadas, se retiró el balón del baño de glicerol y se procedió a volcar la fase líquida para separarla del elastómero mencionado.

El sólido fue retirado del balón con la ayuda de una espátula y fue colocado en un vaso de precipitados de 250 mL. Se lavó con tres porciones de 20 mL cada una de acetonitrilo y se dejó secar superficialmente en estufa a 37° C. Luego se agregaron 30 mL de agua destilada en agitación y el sólido se disolvió lentamente en su totalidad. Finalmente se agregó más agua para realizar diferentes ensayos de caracterización y aplicaciones [2].

6.2. Preparación de complejos y métodos de caracterización

6.2.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR), análisis elemental y espectroscopía UV-visible

Los espectros de FT-IR fueron obtenidos en un espectrómetro Nicolet 380 utilizando, según el caso, pastillas de KBr o un cristal de reflexión Smart Multi-Bounce HATR (reflexión total horizontal atenuada) de ZnSe, un ángulo de incidencia de 45° y un intervalo óptico de 4000 – 650 cm^{-1} .

El análisis elemental fue realizado con un equipo Carlo Erba EA 1108. Las mediciones espectrofotométricas UV-visible se realizaron usando cubetas de cuarzo con un equipo HP modelo 8452A con arreglo de diodos y un equipo Evolution Array UV-visible Spectrophotometer Thermo Scientific con arreglo de diodos.

6.2.2. Resonancia magnética nuclear (NMR)

Los espectros de NMR de alta resolución de estado sólido de ^{13}C fueron obtenidos con la secuencia de rampa $\{^1\text{H}\} \rightarrow \{^{13}\text{C}\}$ CP-MAS (polarización cruzada y giro en ángulo mágico) con desacople de protones durante la adquisición. Todos los experimentos de resonancia magnética nuclear en estado sólido (*ss*-NMR) fueron llevados a cabo a temperatura ambiente en un equipo Bruker Avance II-300 equipado con una sonda MAS de 4 mm. Las frecuencias de operación para los protones y los carbonos fueron de 300.13 y 75.46 MHz, respectivamente [3]. Se usó glicina como referencia externa para los espectros de ^{13}C y para establecer la condición de Hartmann-Hahn en los experimentos de polarización cruzada (CP). El tiempo de reciclado fue de 4 segundos. Se emplearon dos tiempos de contacto diferentes durante la CP: 800 y 1500 μs . La secuencia SPINAL64 se usó para el desacople heteronuclear durante la adquisición con un campo

de desacople de ^1H que satisface $\omega_{\text{IH}}/2\pi = \gamma_{\text{H}}\text{H}_{\text{IH}} = 62 \text{ kHz}$. La velocidad de giro para todas las muestras fue 10 kHz.

Los experimentos de NMR en solución fueron hechos en un espectrómetro Bruker Advance II-500. Se realizaron diferentes números de barridos para la adquisición de los espectros de ^{13}C en las muestras.

Para el caso particular de los oligómeros solubles en agua, una alícuota de 0.15 g del material fue disuelta en 5.0 mL de agua y mezclada con 2.0 mL de metanol o 2.0 mL de acetonitrilo. El material agregado en ambos casos fue precipitado a temperatura ambiente. Se realizaron espectros de ^{13}C CP-MAS con el fin de caracterizar las fracciones precipitadas con estos solventes orgánicos. Se realizaron espectros de ^1H NMR y ^{13}C NMR a partir de la redisolución en D_2O de fracciones de material, previamente precipitadas con acetonitrilo. Las muestras precipitadas con metanol, no pudieron ser redisueltas.

6.2.3. Microscopías

Los polímeros fueron caracterizados superficialmente utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) y la determinación de la composición elemental en cobalto y azufre en diferentes regiones de los materiales, fueron realizadas mediante espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS). Las mediciones fueron llevadas a cabo con un microscopio de barrido electrónico Field Emission SEM (Zeiss Gemini DSM 982) operado a 0.3 kV de voltaje de aceleración, para SEM y provisto de un accesorio INCA Energy (Oxford Instrument), para EDS. Las imágenes de la superficie de los materiales fueron obtenidas sin ninguna modificación.

Para elucidar si la captación de Cu(II) y colorantes ocurría solamente en la superficie de las partículas o bien en todo el material, se decidió utilizar una técnica común de histología que es la obtención de imágenes microscópicas de muestras incluidas en parafina, las cuales pueden dividirse en secciones de micrómetros de espesor. Para ello, se procedió a realizar la inclusión de las muestras en parafina para luego realizar cortes con micrótopo y finalmente observar al microscopio óptico las secciones de la muestra, de un ancho promedio de 12 μm . Las secciones de material para microscopía se obtuvieron con un micrótopo Leitz Wetzlar RD5367/12-1345-USA.

6.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TG)

La temperatura de transición vítrea (T_g) medida para el polielectrolito y sus complejos con Co(II) y Cu(II), fue determinada en un calorímetro diferencial de barrido Shimadzu 60. Las condiciones de aumento de temperatura fueron de $15^\circ \text{C min}^{-1}$ durante el segundo barrido de T, bajo purga de N_2 . El primer barrido de temperatura se hizo solamente para eliminar la humedad de la muestra. Las mediciones termogravimétricas fueron hechas con un equipo TA Instrument SDT Q600, bajo flujo de N_2 sobre un rango de temperatura entre 30 y 400°C , con una rampa de temperatura de $10^\circ \text{C min}^{-1}$. El tamaño promedio de la muestra fue 10 mg.

6.2.5. Estudios del equilibrio de captación de Co(II) por Poly(EGDE-MAA-2MI)

Los estudios de unión de Co(II) fueron hechos con 0.0500 g del polianfolito y 4.0 mL de solución de CoSO_4 en un rango de concentración entre 2.6 y 21 mM. Las muestras fueron centrifugadas y filtradas luego de 48 horas de contacto a 24°C . La concentración de Co(II) libre remanente en el

equilibrio en cada solución sobrenadante pudo ser determinada espectrofotométricamente debido a que los iones Co(II) forman un complejo con SCN^- en presencia de HCl y acetona, que absorbe a 622 nm [4].

6.2.6. Estudios del equilibrio de captación de Co(II) por *Poly*(EGDE-DA)

Los estudios de unión de Co(II) fueron hechos con 0.0500 g del polielectrolito y 4.0 mL de solución de CoSO_4 en un rango de concentración entre 5.0 y 40 mM. Las muestras fueron centrifugadas y filtradas luego de 48 horas de contacto a 24° C. La concentración de Co(II) libre remanente en el equilibrio en cada solución sobrenadante pudo ser determinada espectrofotométricamente debido a que los iones Co(II) forman un complejo con SCN^- en presencia de HCl y acetona, que absorbe a 622 nm [4].

6.2.7. Estudios del equilibrio de captación de Cu(II) por *Poly*(EGDE-DA)

Los estudios de unión de Cu(II) fueron hechos con 0.0250 g del polielectrolito y 4.0 mL de solución de CuSO_4 en un rango de concentración entre 4.0 y 70 mM. Las muestras fueron centrifugadas y filtradas luego de 48 horas de contacto a 24° C. La concentración de Cu(II) libre remanente en el equilibrio en cada solución sobrenadante pudo ser determinada espectrofotométricamente dado que el complejo $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ (formado por la adición de NH_3) absorbe radiación a 640 nm.

6.2.8. Estudios del equilibrio de captación de Direct Blue 273 por *Poly*(EGDE-MAA-2MI)

Las isotermas fueron efectuadas a 4° C, 18° C y 24° C con 0.0500 g de polianfolito y 100 mL de solución de DB273 en un rango de concentración de entre 20 y 220 μM . Las muestras fueron centrifugadas y filtradas luego de un tiempo de contacto de 48 horas, en el cual llegaron al equilibrio. La concentración de DB273 libre en la solución sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 588 nm.

Asimismo, mediante un sistema consistente en 120 mL de DB273 125 μM , KNO_3 en diferentes niveles de concentración y 0.0600 g de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) se estudió el efecto en la unión del colorante por modificación de la fuerza iónica.

Se investigó el efecto de las especies iónicas en la desorción del colorante de las partículas poliméricas empleando 0.0740 g de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) cargado con DB273, en 120 mL de solución. Las especies iónicas elegidas fueron dodecil sulfato sódico (SDS) y KNO_3 . La desorción del DB273 de las partículas de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) resultó despreciable con KNO_3 1.0 M y con SDS 1.0 mM, mientras que una solución de SDS 80 mM produjo la liberación de un 10 % del DB273 adsorbido.

Por último, 0.0740 g de *Poly*(EGDE-MAA-2MI) cargado con DB273 fueron tratados con 120 mL de soluciones de NaClO como agente oxidante durante 4 horas en dos niveles de concentración: 0.10 y 0.35 M.

6.2.9. Ajuste de datos experimentales por regresión no lineal y procedimiento para juzgar la bondad del ajuste

Los parámetros de las isotermas y los parámetros cinéticos fueron determinados por regresión no lineal, empleando un algoritmo basado en el método de Gauss-Newton. Se utilizaron los programas comerciales SigmaPlot 10.0[®] y Excel.

Se hicieron los ajustes a varios modelos empíricos y teóricos, con el fin de encontrar el que mejor describiera el proceso estudiado. La función de error empleada para evaluar el ajuste fue el criterio corregido de Akaike (AIC_c) de segundo orden [5]:

$$AIC = N \ln \left(\frac{RSS}{N} \right) + 2P \quad (1)$$

$$AIC_c = AIC + \frac{2P(P+1)}{N-P-1} \quad (2)$$

Donde P es el número de parámetros en el modelo, N el número de datos experimentales y RSS la suma de cuadrados residuales. Los pesos de Akaike asociados (W) al mejor y el peor modelo son:

$$W_{better} = \frac{1}{1 + e^{\frac{-1}{2}\Delta AIC}} \quad (3)$$

$$W_{worse} = \frac{e^{\frac{-1}{2}\Delta AIC}}{1 + e^{\frac{-1}{2}\Delta AIC}} \quad (4)$$

ΔAIC representa la diferencia en los valores de AIC entre dos modelos que compiten.

Estos pesos proveen información sobre la fuerza de la evidencia que sustenta a cada modelo, cuando son comparados de a pares. La relación entre los dos pesos de Akaike, W_{better}/W_{worse} denominada relación de evidencia (R.E.), representa la probabilidad relativa a favor del mejor de los modelos que compiten. Como fue reportado por otros autores, un valor de R.E. mayor que 20 indica una fuerte evidencia estadística a favor del mejor modelo [6,7].

6.2.10. Preparación del complejo Co(II)-Poly(EGDE-MAA-2MI) para su uso como catalizador

El complejo fue preparado mezclando 0.5000 gramos de polianfolito en polvo y 40.0 mL de $CoSO_4$ 70 mM en agua destilada a 24° C por 48 horas. Luego las muestras fueron centrifugadas, lavadas con tres porciones de 20 mL de agua destilada para remover el Co(II) débilmente adsorbido sobre las partículas, filtradas, secadas a 60° C y trituradas en un mortero.

6.2.11. Preparación del complejo Co(II)-Poly(EGDE-DA) y Cu(II)-Poly(EGDE-DA) para su uso como catalizador

Los complejos fueron preparados mezclando 0.5000 gramos de polielectrolito en polvo y 40.0 mL de $CoSO_4$ 70 mM para Co(II)-Poly(EGDE-DA) y $CuSO_4$ 140 mM para Cu(II)-Poly(EGDE-

DA), en agua destilada a 24° C por 48 horas. Luego las muestras fueron centrifugadas, lavadas con tres porciones de 20 mL de agua destilada para remover el catión débilmente adsorbido sobre las partículas, filtradas, secadas a 60° C y trituradas en un mortero.

6.2.12. Determinación de las isotermas de adsorción de N₂ y de H₂O

La isoterma de adsorción de N₂ fue colectada a 77 K con un equipo Micromeritics Gemini 2360. El área superficial específica fue calculada usando la ecuación BET (Brunauer–Emmett–Teller).

La isoterma de sorción de vapor de H₂O fue determinada con el método isopiéstico. Para ello se distribuyeron alícuotas de 0.200 g de polímero en viales de vidrio de 3 mL de capacidad y se expusieron a atmósferas de a_w constante, en desecadores evacuados a 25 °C. Éstas fueron obtenidas mediante el empleo de soluciones salinas saturadas (LiCl (0.11 %), C₂H₃O₂K (0.22 %), K₂CO₃(0.44 %), NaBr (0.58 %), NaCl (0.75 %), KCl (0.84 %), BaCl₂ (0.92 %), K₂SO₄ (0.97 %), y se pesaron periódicamente hasta peso constante. Una vez alcanzado el equilibrio, el contenido de agua se determinó por diferencia de masa antes y después del secado en estufa de vacío a 98° C, durante 48 horas.

6.2.13. Determinación de densidad de grupos funcionales por titulación potenciométrica

Las titulaciones potenciométricas de los grupos funcionales solvatados presentes en los diferentes materiales se realizaron empleando un pH-metro HANNA Instrument con electrodo de vidrio, modelo HI 8424, a 20° C en un recipiente de vidrio acondicionado adecuadamente, bajo agitación constante y en atmósfera de N₂. Para preparar las diferentes soluciones se empleó agua recientemente destilada y enfriada. A la celda se agregó la masa de muestra y 40.0 mL de H₂O. Todos los gráficos de titulación se obtuvieron por triplicado y los puntos de inflexión se determinaron teniendo en cuenta la derivada segunda.

Para el caso particular de la titulación de los lotes de *Poly*(EGDE-DA), ésta fue realizada en presencia de un exceso de solución valorante de HCl, empleando NaOH 0.100 M como valorante por retorno. Alícuota de muestra: 0.5000 g.

Para la titulación de los oligómeros solubles se utilizó la solución acuosa, midiendo 1.00 mL de la misma o bien pesando 1.0000 gramo, se adicionaron 40.0 mL de agua recientemente destilada y enfriada, una cantidad exactamente medida de solución valorante de NaOH 0.100 M hasta pH 11.5 con el propósito de neutralizar los grupos ácidos. Se tituló por retorno con solución valorante de HCl 0.100 M.

6.2.14. Potencial zeta (ζ)

Para los oligómeros solubles, las determinaciones del potencial zeta (ζ) se realizaron en un analizador ZetaPlus (Brokhaven Instruments Corporation) a 25°C y una fuerza iónica constante de 10⁻³ M KCl. El material polimérico a estudiar se dispersó en suspensión constante con la ayuda de un agitador magnético. El pH fue ajustado con KOH o HCl y el pH del sobrenadante fue medido antes y después de medir el potencial. La unidad óptica constó de un láser rojo de 35 mW (longitud de onda 660 nm). Las mediciones se llevaron a cabo con un campo eléctrico de 16 V cm⁻¹, una corriente de 15 mA y 21 adquisiciones.

Para el polielectrolito *Poly*(EGDE-DA), el punto isoeléctrico (*IEP*) fue obtenido por determinación de potencial de difusión [8]. Las mediciones de fuerza electromotriz fueron hechas con un instrumento digital Keithley 616 con electrodos de calomel de Metrohm.

6.2.15. Electroforesis capilar

Las soluciones del producto soluble a granel y las dializadas, fueron analizadas por electroforesis capilar zonal (CZE) con el fin de determinar la eventual presencia de monómeros, y la carga neta de las distintas poblaciones de productos en función del pH.

Condiciones de separación: electrolito background (BGE): 0.050 M de fosfato de sodio, pH: de 4.0 a 9.0; capilar: sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) de d.i. 50 mm x d.e. 365 mm, largo, 31 cm (longitud efectiva 21 cm); voltaje aplicado: 5 kV, polaridad normal; introducción de la muestra: 5 s a 3.45 kPa; detección: 214 nm; marcador de flujo electroendosmótico (EOF): 5×10^{-3} M dimetilformamida (DMF); Temperatura: 25° C. Entre corridas, el capilar fue lavado con agua durante 3 minutos, y buffer (BGE) por 3 minutos.

6.2.16. Cromatografía de exclusión por tamaño

La fase móvil fue preparada con 0.050 M de buffer trimetoximetilaminometano (TRIS), se prepararon dos fases móviles conteniendo 1.00 o 0.10 M en KCl, llamadas MFI y MFII, respectivamente, de pH 8.5 [9]. Se utilizaron frescas y se filtraron a través de un filtro de nylon Milipore de diámetro de poro 0.45 μm , previo a su uso. Se prepararon alícuotas de 2.0 mL de soluciones de oligómeros 10 mg mL⁻¹, obtenidas por dilución de las muestras en la fase móvil, se filtraron con un filtro de nylon Millipore de diámetro de poro 0.2 μm . La curva de pesos moleculares fue elaborada empleando estándares de pululanos.

6.2.17. Mediciones de viscosidad

Se utilizó la variación de Stormer del viscosímetro giratorio de Couette. El fluido que se debe comprobar se pone en el espacio anular entre dos cilindros circulares concéntricos. Se hace girar un cilindro con respecto al otro. Las mediciones de momento de torsión y gradiente de velocidades se pueden correlacionar con la viscosidad, como se hace mediante una calibración con líquidos de viscosidad conocida. Se utilizaron 16 mL de cada solución de oligómeros estudiada.

6.2.18. Espectrometría de masas: UV MALDI-TOF MS (desorción / ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo)

Los experimentos de UV MALDI-TOF se llevaron a cabo con la finalidad de obtener información estructural confirmatoria o complementaria a la obtenida con métodos espectroscópicos, sobre la estructura química de los oligómeros sintetizados.

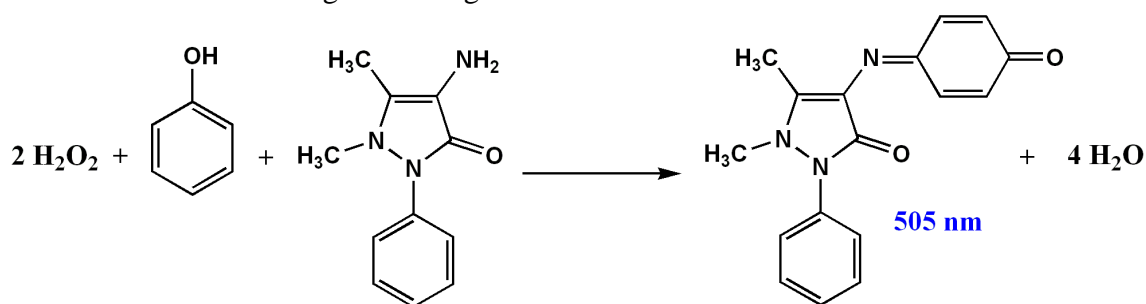
Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando tres matrices: 9H-pirido[3,4-b]indol, norharmano, nHo (Sigma-Aldrich): 1 mg mL⁻¹, acetonitrilo : agua (1:1); ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, CHCA (Sigma-Aldrich): 1 mg mL⁻¹, acetonitrilo : agua. 0.1 % ácido trifluoroacético (3:7); 2,5-ácido dihidroxibenzoico, ácido gentísico, DHBA (Sigma-Aldrich): 1 mg mL⁻¹ agua. La muestra fue evaluada en diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000.

Las muestras fueron analizadas en los modos positivo y negativo con las tres matrices, y no se obtuvieron señales en el modo negativo con dichas matrices. Tampoco se obtuvo señal en el modo positivo con la matriz DHBA. El equipo usado fue un Ultraflex II de Bruker Daltonics, con un láser de nitrógeno con una longitud de onda de emisión de 337 nm (ancho de pulso de 3 ns), utilizando un voltaje de aceleración de 20 kV.

6.3. Estudios de activación de H₂O₂ catalizada por complejos con Co(II) y Cu(II)

6.3.1. Determinación de H₂O₂

El H₂O₂ reacciona con fenol y 4-amino antipirina, catalizada por peroxidasa de soja (SBP), dando un producto coloreado que absorbe a 505 nm. La solución reactiva fue preparada a partir de 9 mg de 4-aminoantipirina y 200 mg de fenol disueltos en solución de fosfato 0.10 M pH 6.5, en un volumen final de 10 mL. La reacción se inició a partir de la mezcla de 400 µL de solución de fosfato, 100 µL de reactivo de antipirina, 60 µL de extracto de SBP 300 U mL⁻¹ y 100 µL de muestra. Se efectuó un control positivo con 100 µL de estándar de H₂O₂. La lectura de absorbancia se realizó luego de 30 segundos.



En los estudios cinéticos de consumo de H₂O₂ catalizado por los complejos de polímeros con Co(II) y Cu(II), se suspendieron 0.0500 g de cada complejo en 50 mL de H₂O₂ 42 mM. Luego se monitoreó el decaimiento de la concentración de H₂O₂ tomando alícuotas de 20 µL del medio de reacción en función del tiempo, y diluyendo adecuadamente para luego efectuar la reacción colorimétrica [10]. La reacción con Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) se efectuó en un medio de Na₂SO₄ 0.10 M.

6.3.2. Detección de radicales libres por Resonancia de Spin Electrónico (ESR)

Los espectros fueron obtenidos en un espectrómetro X-band ESR Bruker EMX Plus (Bruker Biospin GmbH, Germany). 5,5-Dimetil-1-pirrolin-*N*-óxido (DMPO) fue usado como agente atrapador de spin.

Se utilizaron 0.0500 gramos de complejo con Co(II) o con Cu(II), suspendidos en 50 mL de solución de H₂O₂ 63 mM y se monitoreó la producción de radicales libres por ESR. El medio de reacción fue alternativamente agua destilada o solución Na₂SO₄ 0.10 M.

A modo de control se utilizó un complejo obtenido a partir de acetato de cobalto en vez del clásico obtenido a partir de CoSO₄. Otro control se realizó en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) con una actividad de 200 U mL⁻¹, agregada al sistema antes que el H₂O₂, para descomponer el anión superóxido formado.

Las alícuotas de 32 μL de medio de reacción fueron tomadas a diferentes tiempos y mezcladas con 16 μL de DMPO 3 M, y luego de una incubación de 3 minutos se registraron los espectros ESR de onda continua (CW) para detectar los aductos de spin, a 20 ° C.

Los parámetros de ajuste del espectrómetro fueron los siguientes: centro de campo: 3515 G; ancho de barrido: 100 G; potencia de microondas: 100 mW; frecuencia de microondas: 9.85 GHz; tiempo de conversión: 2.56 ms; constante de tiempo: 2.56 ms; frecuencia de modulación: 50 kHz; amplitud de modulación: 0.11 G; ganancia: $2,00 \times 10^4$; resolución: 1024 puntos. Todos los espectros fueron obtenidos con una acumulación de 20 barridos.

Dado que el espectro de ESR posee formas y anchos de líneas equivalentes a diferentes tiempos, la intensidad de las señales es proporcional a la concentración de radicales. La intensidad de las señales de los aductos con DMPO fue determinada a partir de la medición de la altura total del primer pico de cada señal. Los espectros simulados se obtuvieron a partir del ajuste con el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Las relaciones molares y los valores de las interacciones hiperfinas, fueron obtenidas a partir de los espectros simulados.

6.3.3. Medición de presión parcial de O₂

La presión parcial de O₂ fue medida por triplicado en sistemas con la misma composición que los descritos para la medición de radicales libres, a los 10 minutos de reacción. Se empleó un instrumento portátil JPB-607 A Portable Dissolved Oxygen Meter.

6.3.4. Medición de potencial rédox (E)

Se prepararon suspensiones de 0.0500 g de cada material en 50 mL de solución de NaCl 1M, y fueron dejadas 24 horas en contacto y agitación para alcanzar el equilibrio. Transcurrido este tiempo, se procedió a medir el potencial rédox (E) de las soluciones empleando un electrodo indicador de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl, tomando lecturas durante 10 minutos.

En ciertas mediciones, se produjo la adición de H₂O₂ de concentración analítica 63 mM, con el fin de determinar si esto ocasionaba variaciones en el potencial. A su vez, se realizaron algunos controles con soluciones recientemente preparadas, a fin de determinar si existía una diferencia en la estabilidad del potencial en estas condiciones. Fueron efectuados controles con una solución de NaCl y una solución de CuSO₄.

6.3.5. Medición de Co(II) y Cu(II) unidos al catalizador y liberados al medio de reacción

Para determinar experimentalmente la densidad de sitios catalíticos en los sólidos, así como para determinar la pérdida de los mismos en el proceso de activación de H₂O₂ se recurrió al estudio de los sistemas con un espectrómetro de fluorescencia de rayos X Bruker con geometría de reflexión total (TR-XRF), PICOFOX modelo S2.

6.3.6. Decoloración de soluciones de Naranja de Metilo(MO)

Para el caso particular del estudio de aplicabilidad de los polímeros insolubles (*Poly*(EGDE-MAA-2MI) o *Poly*(EGDE-DA)), se decidió trabajar con el colorante MO como ejemplo de contaminante orgánico, un compuesto ampliamente utilizado en la industria textil. El seguimiento

de la variación de la concentración del colorante se produjo por espectrofotometría por su robustez y simplicidad experimental.

Se realizó el ajuste del decaimiento de la concentración de MO a modelos empíricos, tanto para las reacciones de oxidación como para los controles de adsorción.

6.3.6.1. Decoloración de MO empleando Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI)

Se suspendieron 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) en 100 mL de una solución que contenía inicialmente MO $41 \pm 1 \mu\text{M}$ y H_2O_2 63 mM. El medio de reacción usado fue alternativamente agua destilada o solución de Na_2SO_4 0.10 M (en este último caso, para minimizar la captación de compuestos orgánicos sobre las partículas del catalizador). La absorbancia de la solución fue monitoreada en función del tiempo a 464 nm. Para corrección de turbidez, se midió la absorbancia a 700 nm y se sustrajo a la absorbancia a 646 nm. El control de adsorción de MO sobre partículas del catalizador fue realizado en ausencia de H_2O_2 .

Para las verificaciones de catálisis, se emplearon ciclos operativos de 30 minutos de duración. Se efectuó, asimismo, un control de unión o captación de MO, empleando las condiciones precedentes pero en ausencia de H_2O_2 . Otro control consistió en repetir las condiciones iniciales pero en ausencia de catalizador.

El control de activación de H_2O_2 en fase homogénea se realizó con una solución de CoSO_4 0.35 mM, MO 41 μM , H_2O_2 63 mM y Na_2SO_4 0.10 M. Este control fue efectuado con el propósito de determinar si alguna forma soluble de Co(II) (acuo-complejo) podría interactuar con H_2O_2 y generar radicales libres en solución.

Para la evaluación de la estabilidad química del catalizador en su reutilización, el experimento de decoloración de MO fue repetido tres veces (es decir que se realizaron tres ciclos operativos) con el mismo catalizador reciclado y nuevas alícuotas de solución. Cada ciclo operativo tuvo una extensión de 30 minutos y se utilizó solución de MO 41 μM en Na_2SO_4 0.10 M. Luego de cada ciclo operativo, la suspensión se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el sólido se lavó dos veces con Na_2SO_4 0.10 M y una porción de agua destilada para luego secarlo a 40° C para un nuevo uso.

Para explorar la regeneración del catalizador usado luego del primer ciclo operativo, se recuperó el sólido por centrifugación, se lavó con tres porciones de agua destilada y se secó a 40° C. Luego, 0.1000 g del catalizador utilizado fueron recargados con 8.0 mL de solución de CoSO_4 70 mM en agua destilada a 24° C durante 24 horas. La mezcla se centrifugó, se lavó con 3 porciones de 20 mL de agua destilada para remover el Co(II) débilmente unido a las partículas, se filtró, se secó a 40° C y se trituroó en un mortero para ser usado en un nuevo ciclo operativo.

Se efectuaron experimentos para determinar la estabilidad química de las moléculas de MO unidas a las partículas. Una alícuota de 0.2000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue suspendida en 200 mL de una solución de MO 41 μM en Na_2SO_4 0.10 M. La suspensión fue centrifugada, el sólido fue lavado con tres porciones de agua destilada y secado a 40° C (se obtuvo así el material cargado con MO). Una alícuota de 0.1000 g del material cargado con MO fue puesta en contacto con 100 mL de una solución de H_2O_2 63 mM en Na_2SO_4 0.10 M, que había sido previamente activada con catalizador durante 10 minutos. El experimento se repitió con otra alícuota de 0.1000 g del material cargado con MO en contacto con 100 mL de una solución de H_2O_2 63 mM en Na_2SO_4 0.10 M, esta vez sin activación previa. En ambos casos se

hizo una inspección visual para determinar si se producía una disminución en la intensidad del color de las partículas.

Para la detección de especies intermediarias del Co(II) catalíticamente activas, una alícuota de 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue puesta en contacto con 100 mL de una solución de H₂O₂ 63 mM y Na₂SO₄ 0.10 M durante 10 minutos. La suspensión fue centrifugada, se descartó el sobrenadante, las partículas fueron enjuagadas con tres porciones de agua destilada y no fueron secadas. Las partículas activadas del catalizador (“sólido activado”) fueron puestas en contacto con 100 mL de solución de MO 41 μM en Na₂SO₄ 0.10 M, y la concentración de MO fue monitoreada en función del tiempo por espectrofotometría visible. La activación del sólido con H₂O₂ fue repetida dos veces, y el catalizador fue puesto en contacto con la misma solución de MO luego de cada ciclo operativo para monitorear la concentración del colorante.

Los experimentos realizados para estudiar la degradación de MO por acción de los radicales libres solubles, se realizaron con 0.1000 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) suspendidos en 80 mL de una solución de H₂O₂ 79 mM. Aquí la solución de H₂O₂ fue activada durante 10 minutos con las partículas sólidas del complejo. Luego, la suspensión fue filtrada con membrana de nylon, y el sobrenadante libre de partículas (“sobrenadante activado”) fue recuperado y mezclado con 20 mL de una solución concentrada de MO (210 μM) tal que la concentración de MO inicial resultó ser 42 μM y la concentración analítica de H₂O₂ fue 63 mM. La concentración de MO en la solución resultante fue monitoreada en función del tiempo.

6.3.6.2. Decoloración de MO empleando Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) y Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA)

El procedimiento para los estudios cinéticos que permiten verificar catálisis es el mismo que se empleó con el sistema precedente, pero el medio de reacción empleado fue siempre agua destilada (se probó una solución de Na₂SO₄ 0.10 M pero produjo degradación del catalizador).

Y siguiendo los mismos protocolos que fueron empleados con Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) se realizaron los controles de estabilidad química del catalizador en su reutilización, el estudio de degradación de MO por radicales libres en solución homogénea, la detección de especies intermediarias de Co(II) o Cu(II) catalíticamente activas. Se realizaron controles adicionales modificando la relación de *masa del catalizador* (g) a *volumen de solución* (L).

Para los experimentos con cantidades equimolares de sitios catalíticos se prepararon sistemas con 0.6 mmol de sitios L⁻¹. Para ello se suspendieron 0.1540 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) en 100 mL de MO 42 μM, y 0.0360 g de Cu(II)-*Poly*(EGDE-DA) en 100 mL de MO 42 μM. Se agregó H₂O₂ para iniciar la reacción catalítica, y estuvo ausente en el control de captación de MO.

6.3.7. Oxidación parcial de Epinefrina

Una alícuota de 0.0400 g de Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) o de Co(II)-*Poly*(EGDE-DA) fue suspendida en 20.00 mL de epinefrina 2.0 mM y H₂O₂ 46 mM (cantidades mayores resultaron menos efectivas). El medio de reacción fue Na₂SO₄ 0.10 M para Co(II)-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) y agua destilada para Co(II)-*Poly*(EGDE-DA).

La absorbancia de la solución fue monitoreada en función del tiempo a 480 nm. Para corrección de la turbidez, se midió la absorbancia a 700 nm y se restó al valor obtenido a 480 nm. Un experimento control de la oxidación de epinefrina en un sistema homogéneo fue hecho con una solución de epinefrina 2.0 mM y H₂O₂ 46 mM en el medio correspondiente. Otro control fue

realizado con 0.0400 g del catalizador con Co(II) correspondiente suspendido en 20.00 mL de epinefrina 2.0 mM en el medio de reacción en ausencia de H₂O₂. Este experimento fue repetido con previo y continuo burbujeo de argón en la solución para desplazar el O₂ disuelto; también se repitió el experimento en el sistema heterogéneo completo con previo burbujeo de argón.

6.4. Aplicaciones de oligómeros solubles en agua

6.4.1. Decoloración de soluciones del colorante DB273 con oligómeros solubles en agua

La remoción del colorante DB273 fue estudiada utilizando una solución de DB273 76 µM o 67.7 mg L⁻¹ a la que se le adicionaron 0.46 g L⁻¹ de solución de oligómero soluble y 0.017 M de Fe(II). Una vez hecha la mezcla se extrajeron alícuotas a diferentes tiempos, se centrifugaron y se monitoreó la absorbancia del sobrenadante a 588 nm. Se realizó un control con 300 mg de IM en 120 mL, en reemplazo de la muestra de oligómeros. En controles adicionales se reemplazó alternativamente cada reactivo por agua destilada.

6.4.2. Formación de cápsulas huecas con oligómeros solubles en agua

Se disolvió ácido cítrico en una solución 0.10 M de NaOH de manera de obtener una solución con una concentración analítica de 1.0 M en ácido cítrico, de pH 2.1. Una alícuota de 1.9 mL de esta solución de ácido cítrico/citrato monobásico de sodio, fue puesta en contacto con 0.10 mL de solución de FeSO₄ 0.10 M. Posteriormente, se produjo la generación de las esferas huecas por la adición gota a gota de una solución 300 g L⁻¹ de oligómeros, sobre la primera solución descrita.

6.5. Obtención de un reactor enzimático para aplicaciones analíticas en un sistema de flujo

6.5.1. Instrumental

El sistema en flujo consistió en una bomba de HPLC isocrática Spectra System P1000, una válvula de inyección Rheodyne modelo 7125 con un loop de 20 µL para la carga de muestra, una guarda columna, el biorreactor y una celda de flujo para detección amperométrica.

El reactor consistió en un cartucho de acero inoxidable de 30 x 2.1 mm de la firma Grace Davison Discovery Science. Fue empacado manualmente con el complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) físicamente mezclado con silicagel.

La detección amperométrica de los productos oxidados de la reacción catalizada fue realizada con un analizador electroquímico desarrollado por el Ing. S. Sobral. Se usó una celda de 7 µL de capacidad, de tipo capa delgada, equipada con un electrodo de trabajo de carbón vítreo (Bioanalytical Systems, 7 mm²) y un contraelectrodo de acero inoxidable, operada a potencial constante vs Ag/AgCl.

La solución carrier contenía KH₂PO₄ 30 mM, pH 6.5 y H₂O₂ 0.2 mM, adecuadamente filtrada (usando membrana de 0.45 µm de diámetro de poro) y desgasificada.

El método de 4-aminoantipirina puede ser usado para determinar la concentración de peroxidasa de cáscara de semilla de soja (SBP), de H₂O₂ o de fenol.

6.5.2. Preparación del complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) y determinación de proteína inmovilizada

La forma básica del polianfolito insoluble *Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue empleada como soporte de la enzima SBP en la construcción del reactor en sistema de flujo.

El extracto crudo de SBP fue obtenido por contacto de cáscaras de semilla de soja con una solución compuesta por acetato de sodio / ácido acético 50 mM y CaCl_2 5 mM. El homogenato fue centrifugado a $2000 \times g$ por 15 minutos y el sobrenadante fue separado. La masa de proteína en el homogenato clarificado fue 50 mg L^{-1} y la actividad catalítica de la enzima fue de 5000 U L^{-1} , determinada por comparación con el estándar provisto por Sigma: Peroxidasa extraída de *Glycine max* P-1432, 50 – 150 unidades por mg de sólido. Una unidad forma 1.0 mg de purpurogalina a partir de pirogalol en 20 seg a pH 6.0 a 20°C .

Para la construcción de la isoterma de unión de SBP al polianfolito, se prepararon soluciones de SBP en buffer fosfato 25 mM pH 6.0, entre 3.6 y 12.8 mg L^{-1} con una fuerza iónica entre 25 y 29 mM.

La forma básica del polianfolito se preparó por adición de 25 mL de NaOH 0.1 M a 1 gramo de polianfolito nativo. Luego, el sólido fue separado por filtración, lavado 3 veces con agua destilada y secado a 60°C . Previamente a los experimentos de adsorción, se pesaron alícuotas de 0.0500 g del material polimérico que fueron hidratadas con agua destilada y luego dispersas en 0.400 mL de solución de SBP en el rango de concentración mencionado, a 25°C en agitación. En el equilibrio, el sólido fue separado por centrifugación y filtración, y se midió la concentración de SBP remanente en el sobrenadante.

La estabilización del complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI) fue realizada por contacto con vapores saturados de glutaraldehído. Una cantidad de 50 mg de polianfolito fue cargada adecuadamente con SBP y distribuida sobre una superficie dentro de una cámara de 450 cm^3 saturada con 200 μL de glutaraldehído 70 %. Luego de cierto tiempo de contacto, el complejo fue lavado con agua destilada y la actividad enzimática fue probada mediante la oxidación de fenol 2.0 mM con H_2O_2 0.20 mM.

6.5.3. Experimentos cinéticos de oxidación de fenol catalizada por SBP, en batch

En un reactor en batch, se estudió la influencia de la concentración de fenol en la velocidad de catálisis de SBP libre e inmovilizada a pH 6.5 y 20°C , en agitación.

El H_2O_2 fue probado como sustrato en un rango de concentración entre 0.050 mM y 0.400 mM, y así saturó la enzima en todo el rango de concentración. Para preparar el complejo SBP-*Poly*(EGDE-MAA-2MI), se mezclaron 0.1000 g de polímero con 15 mL de SBP 12.5 mg L^{-1} en solución de fosfato 25 mM pH 6.0.

La velocidad inicial de reacción enzimática (V) fue determinada siguiendo los cambios en la concentración de fenol en función del tiempo, con el método de 4-aminoantipirina para fenol.

6.5.4. Preparación y caracterización del reactor en flujo de SBP inmovilizada

Se pesaron 0.0900 g del complejo polianfolito-SBP (con una carga de 9.0 μg de SBP) y se mezclaron con 0.0220 g de partículas de silicagel de 200 μm de diámetro promedio. Se empacó la mezcla en el cartucho de acero inoxidable y se conectó a la bomba de HPLC. La mezcla con silicagel permitió disminuir la presión en el sistema y estabilizar el flujo.

Todos los experimentos con el reactor fueron hechos a 20°C . El reactor fue almacenado a 5°C en agua destilada, durante la noche.

La solución carrier contenía KH_2PO_4 30 mM y H_2O_2 0.20 mM. La concentración de H_2O_2 se fijó en 0.20 mM porque SBP sufre inhibición por este sustrato a concentraciones mayores en este

sistema. La solución de fosfato 30 mM fue preparada con agua destilada y el pH fue fijado en 6.5 en función del rango óptimo para la oxidación catalítica de todos los compuestos fenólicos probados (el pH fue previamente evaluado entre pH 5.0 y 8.0).

Los niveles de concentración de catecol usados para la calibración química en todas las aplicaciones de este reactor, estuvieron entre 0.030 y 0.200 mM.

Los productos oxidados en las reacciones enzimáticas en el sistema de flujo fueron detectados amperométricamente a un potencial reductor. La respuesta amperométrica fue expresada como área de pico, en microCoulombs (μCoul). Los experimentos de voltametría hidrodinámica fueron realizados con cada analito estándar para encontrar las mejores condiciones de detección. Las muestras de yerba mate y de vino tinto fueron analizadas a +100 mV vs Ag/AgCl.

En el sistema en flujo se inyectaron alícuotas de 20 μL de cada muestra. Todas las muestras fueron filtradas usando membranas de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro antes de su inyección y diluidas adecuadamente con solución de fosfato 30 mM.

La mayor parte de los experimentos fue hecha empleando una velocidad de flujo de 0.6 mL min^{-1} , excepto para el estudio de restricciones difusionales en el que la variable independiente resultó ser la velocidad de flujo.

6.5.5. Preparación de extractos de yerba mate

Se seleccionaron 8 marcas comerciales de *Ilex paraguariensis* o yerba mate, para el estudio de discriminación, y fueron analizadas por triplicado.

Se pesó 1.0 gramo de cada producto comercial de yerba mate (sin molienda adicional), y se extrajo con 20.0 mL de buffer fosfato 30 mM a pH 6.5. La mezcla fue sonicada durante 10 minutos a temperatura ambiente (no se trabajó a 80° C para minimizar la polimerización de los compuestos fenólicos). La suspensión fue filtrada y el volumen se llevó a 25.00 mL finales con buffer; la solución fue centrifugada y filtrada con membranas de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro. Una alícuota de 5.00 mL de cada filtrado se diluyó a 100.0 mL finales con buffer para el análisis en el sistema de flujo.

El contenido de polifenoles totales fue determinado espectrofotométricamente mediante el método de Folin-Ciocalteu (F-C) usando ácido clorogénico como estándar [11].

Para discriminar las marcas comerciales de yerba mate se usó el análisis de la varianza y el test de significación para la media de dos muestras.

6.5.6. Preparación de las muestras de vino tinto

Las muestras de vino suplementadas con sulfito no pudieron ser analizadas por este método debido a que el sulfito produce una respuesta electroquímica al potencial de trabajo.

Se probaron muestras de vino artesanal, libre de sulfitos y otras sustancias reductoras que pudieran inhibir la formación de productos de oxidación radicalarios en el biorreactor.

Fueron analizadas 4 muestras de vino tinto, micro-oxigenadas en botellas de vidrio con tapón de corcho: una producida en el año 2011, dos producidas en 2010 y una producida en 2009.

Paralelamente se obtuvieron otras 4 muestras a partir de la suplementación de O_2 a las mencionadas anteriormente. Cada muestra fue suplementada con O_2 de la siguiente manera: una alícuota de 100.0 mL de vino fue colocada en un vaso abierto bajo agitación durante 24 horas a 20° C. Luego de este proceso, se completó el agua perdida por evaporación con H_2O destilada.

Las muestras de vino fueron filtradas con membranas de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro y analizadas en el sistema de flujo por triplicado. El contenido total de polifenoles fue determinado espectrofotométricamente por el método de F-C usando ácido gálico como estándar. Se empleó el método de análisis de componentes principales (PCA) bajo entorno MatLab 5.3® para discriminar entre diferentes muestras de vino tinto.

6.6. Referencias del Capítulo 6

1. Lázaro Martínez, J. M. Tesis de Doctorado: Síntesis, Caracterización y Estudios de Aplicabilidad de Nuevos Materiales Poliméricos. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. 23 de marzo de 2011.
2. Lombardo Lupano, L.V., Lázaro Martínez, J.M.; Vizioli, N.M.; Torres, D.I.; Campo Dall'Orto, V. *Macromol. Mater. Eng.* 301 (2) (2016) 167.
3. Fung, B. M.; Khitrin, A. K.; Ermolaev, K. J. *Magn. Reson.* 142 (2000) 97.
4. El-Brashy, A. M.; El-Sayed Metwally, M.; El-Sepai, F. A. J. *Chin. Chem. Soc.* 52 (2005) 77.
5. Hadi, M.; Samarghandi, M.R.; McKay, G. *Chem. Eng. J.* 160 (2010) 408.
6. Burnham, K.; Anderson, D.; Huyvaert, K. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65 (2011) 23.
7. Copello, G.J.; Díaz, L.E.; Campo Dall'Orto, V. J. *Hazard. Mater.* 217– 218 (2012) 374.
8. Lamas, M.C.; Torres Sánchez, R.M. *Geoderma* 85 (1998) 371.
9. Patrickios, C.S.; Strittmatter, J.A.; Hertler, W.R.; Hatton, T.A. *J. Colloid Interf. Sci.* 182 (1996) 326.
10. Ettinger, M. B.; Ruchhoft, C. C.; Lishka, R. J. *Anal. Chem.* 23 (1951) 1783.
11. Granero, A.M.; Fernandez, H.; Agostini, E.; Zon, M.A. *Talanta* 83 (2010) 249.

ABREVIATURAS

- AICc**: criterio corregido de Akaike
- ATR/FT-IR**: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y accesorio de reflectancia total atenuada
- CP-MAS**: polarización cruzada y rotación en el ángulo mágico
- CW ESR**: resonancia de espin electrónico de onda continua
- CZE**: electroforesis capilar zonal
- DA**: 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano
- DB273**: Direct Blue 273
- DE**: desvío estándar
- DER**: desvío estándar relativo
- DMF**: dimetil formamida
- DMPO**: 5,5-dimetil-1-pirrolin-N-óxido
- D-R**: Dubinin-Radushkevich
- DSC**: calorimetría diferencial de barrido
- EAC**: equivalentes de ácido clorogénico
- EAG**: equivalentes de ácido gálico
- EDS**: espectroscopía de energía dispersiva
- EE**: error estándar
- EGDE**: etilenglicol diglicidil éter
- EOF**: flujo electroosmótico
- F-C**: Folin-Ciocalteu
- FT-IR**: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
- h**: horas
- H**: campo magnético
- IEP**: punto isoeléctrico
- IM**: imidazol
- MA⁻**: metacrilato
- MAA**: ácido metacrílico
- MALDI-TOF**: ionización por desorción láser inducida por matriz con analizador por tiempo de vuelo
- min**: minutos
- MO**: naranja de metilo
- MS**: espectrometría de masas
- NMR**: resonancia magnética nuclear
- oligómeros (EGDE-IM-co-MAA)**: oligómeros solubles en agua obtenidos a partir de EGDE, IM y MAA
- PYR**: 1H-1,2-pirazol
- Poly(AA)**: ácido poliacrílico
- Poly(A⁻)**: poliacrilato
- Poly(EGDE-DA)**: polielectrolito insoluble en agua obtenido a partir de EGDE y DA
- Poly(EGDE-MAA-2MI)**: polianfolito insoluble en agua obtenido a partir de EGDE, MAA y 2MI

RE: relación de evidencia
SBP: peroxidasa de cáscara de semilla de soja
SEC: cromatografía de exclusión molecular
SEM: microscopía electrónica de barrido
T₁: tiempo de relajación espín-red
T_g: temperatura de transición vítrea
TG: termogravimetría
tr: tiempo de retención
TRZ: 1H-1,2,4-Triazol
XPS: espectroscopía fotoelectrónica por rayos X
2MI: 2-metilimidazol
ζ: potencial zeta