

Determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección Electroquímica de Dopamina, Empleando Electroodos de Carbón Vítreo Modificados con Compositos a base de Dendrimeros PAMAM G4.0-OH y Materiales Nanoparticulados

Erika Bustos,^a Ma. Guadalupe García,^b Luis A. Godínez^a

^a Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica
Parque Tecnológico Querétaro Sanfandila, Pedro Escobedo 76700, Querétaro, México.
ebustos@cideteq.mx

^b Instituto de Investigaciones Científicas, Universidad de Guanajuato
Lascuráin de Retana 5, Col. Centro, 36000, Guanajuato, México.

RESUMEN

La dopamina es un neurotransmisor del sistema nervioso central, y su cuantificación usualmente se lleva a cabo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detector amperométrico, empleando como electrodo de trabajo carbón vítreo. Sin embargo, es necesario modificar el electrodo para evitar la pasivación del material. En este contexto, presentamos la síntesis y caracterización de compositos formados a base de nanopartículas de Ir, Os, Pd, Pt, Rh y Ru, confinadas dentro de dendrimeros de poliamidoamina generación 4.0 con 64 grupos hidroxilo periféricos, los cuales fueron inmovilizados en un electrodo de carbón vítreo que forma parte del detector amperométrico de un CLAR. Estos electrodos modificados fueron posteriormente evaluados en términos de su aplicación en la detección electroquímica de dopamina presente en muestras reales sin pre-tratamiento, vía oxidación electro-catalítica.

1. INTRODUCCIÓN

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que juega un papel importante en el funcionamiento del sistema nervioso central, así como en el sistema cardiovascular, renal y hormonal [1]. De ahí que la cuantificación analítica de la DA ha sido muy estudiada en muestras de orina por electroforesis capilar con detección luminiscente [2] y por detección electroquímica a partir de muestras microdializadas [3]. Sin embargo, este tipo de determinaciones requiere de un pre-tratamiento de muestra, con el fin de eliminar problemas de matriz, los cuales pueden interferir en la determinación y en los límites de detección del compuesto en muestras biológicas.

Además, la detección y el monitoreo de la DA por técnicas electroquímicas usando electrodos de carbón son importantes en neuroquímica [4], en donde los métodos de pre-concentración en interfases electrodo-solución son muy utilizados con el fin de incrementar la sensibilidad analítica en los protocolos de detección amperométrica [5]. En este contexto, se ha reportado el uso de electrodos modificados con monocapas de dendrimeros de poliamidoamina (PAMAM), los que interaccionan específicamente con moléculas orgánicas para disminuir límites de detección [6].

Asimismo, se ha reportado la detección amperométrica de la DA en muestras de sangre de cerebro de rata in situ, las cuales previamente fueron pre-tratadas con microdialisis para posteriormente ser separados los neurotransmisores y metabolitos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), la que utiliza un detector amperométrico de multicanales con la finalidad de estudiar el estado depresivo de la rata y equipararlo con el mostrado por el ser humano.

De esta manera, se propuso la aplicación de los electrodos de carbón vítreo modificados con compósitos de dendrimeros PAMAM G4.0-OH y nanopartículas metálicas del grupo del platino, con el fin de usarlos en un detector electroquímico acoplado a un detector espectrofotométrico en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. De esta manera se sensó la dopamina en muestras reales de orina sin pre-tratamiento con la técnica de adición de estándar.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y reactivos.

Se emplearon dendrimeros PAMAMTM G4.0 con 64 grupos hidroxilo terminales obtenidos con alta pureza de la marca Aldrich, y usados sin previa purificación. El NaBH₄ y H₂SO₄ fueron obtenidos de

la marca J.T. Baker. Las sales de $(\text{NH}_4)_3\text{IrCl}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{OsCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{PdCl}_4$, K_2PtCl_4 , $(\text{NH}_4)_3\text{RhCl}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y $\text{K}_2\text{RuCl}_5 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ fueron obtenidas de la marca Strem Chemicals. El agua deionizada empleada tenía calidad mili-Q ($\rho \geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

La celda electroquímica usada era de BAS con 10 mL de capacidad, teniendo como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl NaCl 3M de la misma marca. El electrodo auxiliar empleado durante las pruebas de Voltamperometría Cíclica (VC) fue de alambre de Pt, y para la detección amperométrica con el cromatógrafo se empleó acero inoxidable, ambos electrodos eran de la marca BAS.

Como electrodo de trabajo, se empleó un microelectrodo de carbón vítreo (CV), con área de 0.07 cm^2 para la VC y 0.28 cm^2 para el sensor amperométrico del cromatógrafo, ambos marca BAS.

Para realizar la separación cromatográfica, se empleó un cromatógrafo de Hewlett Packard Serie 1050, con una fase estacionaria (columna cromatográfica) Hypersil C18 ODS (ODS = octadecilsilano con 18 átomos de carbono; $250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) marca Supelco, Inc que es de fase reversa; además se usó una fase móvil compuesta de 475 mL de H_2O , 4.7 g de ácido monocloroacético, 75 mg de octil sulfato de sodio, 93 mg de EDTA hidratado, 25 mL de MeCN y 4 mL de tetrahidrofurano; esta solución se ajustó a un pH de 3.2 con NaOH de 6 M. El volumen de la muestra fue de $20 \mu\text{L}$ (se diluyó en 95 % fase móvil y 5 % agua) con un tiempo de análisis de 30 min, manteniendo la columna caliente a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, el flujo a 0.5 mL min^{-1} y una presión entre 80 a 90 psi. La activación de la columna se realizaba lavando con agua al 100 %, luego con 30 % : 70 % de agua : MeCN y finalmente con 100 % con MeCN.

El equipo usado para la espectroscopía de UV-Vis fue de la marca Agilent modelo 6483 con arreglo de diodos y 2 nm de resolución. Además, el equipo empleado para la espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) fue de la marca PerkinElmer.

Los experimentos de Microscopía de Barrido Electrónico y el Microanálisis se realizaron con el equipo Jeol JSM-5400LV Scanning Microscope con 14 kV de voltaje de aceleración en promedio y $90 \mu\text{A}$. La Espectroscopía de Impedancia Electroquímica se desarrolló con el potencióstato

BAS-Zanher, con una amplitud de 10 mV y 500 puntos muestreados.

2.2. Síntesis de los Compósitos de Dendrimeros PAMAM G4.0 – OH – Nanopartículas Metálicas

La síntesis de dendrimeros que encapsulan nanopartículas (DENS) en solución se prepararon en tres pasos básicos de acuerdo a lo descrito en la literatura [7]: (A) preparación de complejos dendrímero – ión, (B) reducción de los iones encapsulados entre las moléculas de dendrímero y, (C) diálisis para purificar los DENS.

En la primera etapa, se prepararon soluciones 2 mM de cada una de las sales metálicas en presencia de $50 \mu\text{M}$ de dendrímero PAMAM G4.0 con terminación hidroxilada. Estas mezclas fueron posteriormente mantenidas en agitación constante durante 65 h, con el fin de que los iones metálicos se complejaran con las aminas internas de los dendrimeros mediante enlaces supramoleculares no covalentes.

En la segunda etapa, los compósitos dendrímero – nanopartícula metálica cero-valente fueron sintetizados por adición de 2 mL de NaBH_4 0.5 M. Una vez que se realizó la reacción de reducción, se ajustó el pH a 1 con HCl concentrado en cada una de las soluciones, las cuales se mantuvieron en la oscuridad durante 12 h con agitación constante para favorecer la reducción química y no foto-química de los iones, y finalmente, completar la síntesis de las nanopartículas metálicas cero-valentes.

En el tercer y último paso, la solución fue dializada por 48 h usando una membrana de celulosa de masa molecular 12 000 (Sigma Diagnostics, Inc.), con el fin de eliminar las posibles impurezas de las sales empleadas para realizar la interacción ión-dendrímero, así como los iones metálicos libres que no formaron parte de la nanopartícula metálica cero-valente.

2.3. Construcción de los Electroodos de Carbón Vítreo Modificados con Compósitos de Dendrimeros PAMAM G4.0 – OH – Nanopartículas Metálicas del Grupo del Platino

El carbón vítreo (CV) fue pulido con alúmina de diferentes tamaños (1.0 , 0.3 y $0.05 \mu\text{m}$) sobre un paño Buehler y entre cada tamaño de alúmina era enjuagado con agua abundante. Posteriormente, con el fin de eliminar los residuos de alúmina sobre el electrodo, éste se colocaba en un vaso con agua desionizada y se sonicaba durante 10 min [7]. Este tipo de pre-tratamiento expone en la superficie del

CV diferentes grupos funcionales como hidroquinona, anhídrido ftálico, cetonas y ácidos carboxílicos evaluados por voltamperometría cíclica (VC) [8].

Los electrodos de CV se pre-trataron y modificaron con la técnica de amperometría durante 1 h a 1.6 V vs. Ag/AgCl NaCl 3 M que era el potencial al cual aparece el par redox anhídrido ftálico – ácidos carboxílicos de acuerdo a las VC obtenidas anteriormente. Además, los grupos funcionales se verificaron con pruebas de Espectroscopia de Infrarojo con Transformada de Fourier (FT-IR).

Después del pre-tratamiento del CV, éste fue modificado con los DENs de manera covalente, lo cual se favoreció al tener una superficie con homogeneidad química. La modificación se realizó sumergiendo el electrodo de CV en NaF 0.1 M que contenía alrededor de 20 μ M de cada solución de DENs. Posteriormente se realizaron las amperometrías de 1 h aplicando 1.6 V vs. Ag/AgCl NaCl 3 M. Se verificó la presencia de las DENs sobre el CV con microscopía electrónica de barrido, así como su correspondiente microanálisis de las partículas metálicas presentes en la superficie. Así mismo, la interacción entre la DENs y el CV se analizó con espectroscopia de impedancia electroquímica, y el correspondiente análisis del espectro de Nyquist con el circuito equivalente de Randles corregido con una fase constante.

Cuando se quería trabajar de nuevo la superficie de CV, ésta recibía una limpieza electroquímica durante 50 s a 2200 mV vs. Ag/AgCl en H₂SO₄ 0.5 M, con el fin de promover la sobre-oxidación del CV y eliminar cualquier impureza sobre éste. Posteriormente, se comenzaba el procedimiento de pre-tratamiento con amperometría si se deseaba reutilizar el electrodo de CV, para su posterior modificación.

2.4. Detección Electroquímica de la Dopamina con Electroodos de Carbón Vítreo Modificados con Compósitos de Dendrímeros PAMAM G4.0 – OH – Nanopartículas Metálicas del Grupo del Platino

Una vez que los electrodos de CV modificados con DENs fueron caracterizados en el apartado anterior, se usaron en la determinación amperométrica de DA en CLAR, y su sensibilidad y selectividad fueron comparadas con las obtenidas en el detector espectrofotométrico. De ahí, que los parámetros utilizados para las detecciones espectroscópicas y electroquímicas fueron obtenidos a partir de los

espectros de UV-Vis y los experimentos de VC respectivamente.

La DA fue detectada y cuantificada con la señal de absorbancia a 281 nm para el detector espectrofotométrico, así como con la densidad de corriente de oxidación a 900 mV vs. Ag/AgCl NaCl 3 M para el detector amperométrico. El potencial anterior se eligió por encontrarse en la zona difusional en todas las DENs para la reacción electroquímica $DA - 2e^- \rightarrow DOQ + 2H^+$, donde la DOQ es la o-quinona de la DA [9].

Cabe señalar, que para determinar la DA en la muestra real de orina, se realizó la detección por el método de adición de estándar. En dichas detecciones se determinó el Límite de Detección (LD) y Cuantificación (LC), correspondientes a $3\sigma/m$ y $10\sigma/m$ respectivamente, donde σ es la desviación estándar de los datos y m es la pendiente de la curva de calibración.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Síntesis de los Compósitos de Dendrímeros PAMAM G4.0 – OH – Nanopartículas Metálicas

Para corroborar la formación de las DENs, se analizaron cada una de las soluciones sintetizadas en cada paso mediante espectroscopia de UV-Vis. De esta manera, fue interesante notar el cambio de los espectros de las soluciones en presencia de sales metálicas, cuando el borohidruro de sodio fue adicionado para llevar a cabo la reducción química de los iones metálicos y, una vez formadas las nanopartículas metálicas cero-valentes.

Los espectros de las soluciones con iones hidratados mostraron señales espectroscópicas debidas a los acuacomplejos formados entre 400 y 600 nm aproximadamente (Fig. 1.A). En cuanto a los espectros de las soluciones de iones – dendrímeros, estos presentaron señales de transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$ entre 250 y 650 nm aproximadamente, las cuales son características de la interacción aminas terciarias – iones (Fig. 1.B). Finalmente, en los espectros de las soluciones con DENs apareció una nueva señal [10], alrededor de 300 nm, correspondiente a la transición $d - d$ propia del complejo metal – ligando y denominado pico plasmón (Fig. 1.C), ya que este complejo no se comporta ni como partícula ni como ión, sino una especie intermedia entre estos dos.

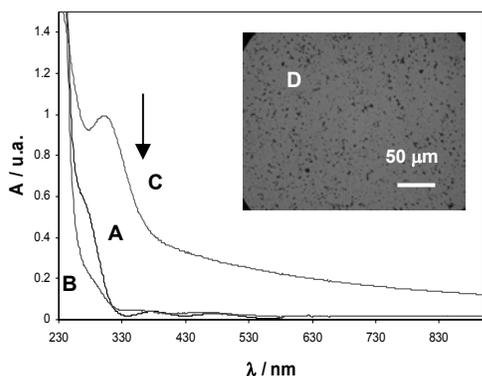


Fig. 1. Espectros de UV-Vis de la DENs - Rh: (A) sal metálica, (B) iones metálicos complejados con las aminas terciarias internas de los dendrímeros y, (C) DENs. Imagen del microscopio óptico a 200 x, correspondientes a las soluciones de DENs - Rh (D).

Además, de acuerdo a la literatura, el pico plasmón se presenta cuando se tienen nanopartículas con un diámetro entre 1 nm y 10 nm (tamaño intermedio entre moléculas pequeñas y metales másicos). Las propiedades físicas resultantes no son ni de metales másicos ni de compuestos moleculares y dependen en gran medida del tamaño de partícula, distancia inter-particular, naturaleza de la corteza orgánica protectora, forma de las nanopartículas, así como de las propiedades del medio en que se encuentran (específicamente la constante dieléctrica) [11].

Por otra parte, con el fin de verificar que se estaban sintetizando los compósitos dendrímero - nanopartícula metálica en solución, se realizó un estudio de imagen con el microscopio óptico y EDX de cada una de las soluciones de DENs, las cuales previamente se colocaron sobre un porta-objetos y se secaron con una pistola de aire (Fig. 1.D). De esta manera, por las condiciones de síntesis a pH ácido y la manera en que se preparó la muestra para este estudio, las DENs se agregaron con una distribución estadística de su tamaño que en promedio eran de 5 μm.

3.2. Construcción de los Electrodo de Carbón Vítreo Modificados con Compósitos de Dendrímeros PAMAM G4.0 - OH - Nanopartículas Metálicas del Grupo del Platino

Las superficies se observaron en SEM (Fig. 2.A), sólo fueron evidentes los agregados de Ir, Pt, Rh y muy poco en Ru, en forma de agregados superficiales con su correspondiente señal de EDX (Fig. 2.B). Mientras que el Os y Pd sólo mostraron

algunos agregados en SEM, por lo que posiblemente no existía la cantidad de nanopartículas suficientes como para observar una señal evidente de los metales en EDX.

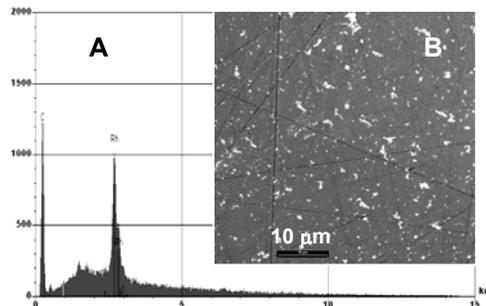


Fig. 2. Micrografías de SEM (A) y microanálisis de EDX (B) de los DENs - Rh. Pruebas obtenidas con una aceleración de electrones de 15 kV a 2 000 x.

3.3. Detección Electroquímica de la Dopamina con Electrodo de Carbón Vítreo Modificados con Compósitos de Dendrímeros PAMAM G4.0 - OH - Nanopartículas Metálicas del Grupo del Platino

Con los dos detectores ensamblados y con las condiciones de operación cromatográfica establecidas, los cromatogramas para cada detector fueron obtenidos con un tiempo de elusión de 13 min para la DA.

Posteriormente, se obtuvieron las curvas de calibración (Fig. 3) donde el electrodo CV-DEN-Rh mostró la mejor respuesta en la detección de la DA, caracterizada por un incremento en sensibilidad de aproximadamente veinte veces que el obtenido para el electrodo de CV y de nueve veces más comparado con el electrodo modificado de CV con el dendrímero PG4.0-OH, como se muestra en la Tabla 2.

Además, el detector amperométrico a base del electrodo modificado de CV con las DENs-Rh (Tabla 1) es más sensible (mayor pendiente) que el detector espectrofotométrico (Tabla 2), indicando que la detección amperométrica con CV-DENs-Rh es mejor para determinar la concentración de DA que la espectrofotométrica.

Al observar que la DENs con Rh mostraba la mejor sensibilidad en la detección de DA que las demás partículas metálicas, se evaluó sometió a calentamiento el electrodo modificado a 50°C durante 72h con el fin de realizar una reacción de Retro-Michael para destruir el dendrímero. Una vez

realizada la reacción, se trató de obtener una curva de calibración con esta superficie, pero solo se observó eliminación de sensibilidad y consecuente pasivación. Con este resultado se comprobó que era necesario tener la matriz dendrímero – nanopartícula para favorecer a la permeabilidad de la DA para su consecuente detección, así como la protección de las nanopartículas interfacialmente para eliminar su oxidación y posterior pasivación por el medio circundante.

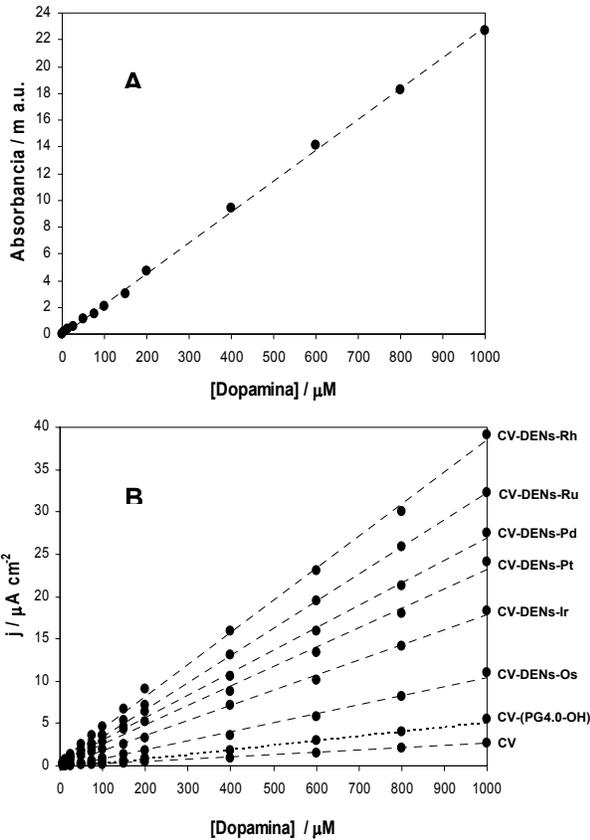


Fig. 3 Curvas de calibración del detector espectrofotométrico (A) y electroquímico (B) de muestras sintéticas de DA, usando diferentes electrodos modificados: CV, CV-(PG4.0 - OH), así como CV con DENs de Ir, Os, Pd, Pt, Rh y Ru.

Por otra parte, una vez que las muestras sintéticas fueron analizadas usando el detector espectrofotométrico y electroquímico acoplados, se decidió probar muestras reales. Por tal motivo, se emplearon muestras de orina sin pre-tratamiento para detectar la concentración de DA presente usando la técnica de adición de estándar, por considerar a las muestras de orina como una matriz compleja en su composición [12].

Tabla 1. LD y LC para la detección electroquímica de DA en muestras sintéticas usando CV (1), CV – (G4-OH) (2), CV–DENs de Ir (3), Os (4), Pd (5), Pt (6), Rh (7) y Ru (8). Ecuación: $y [\mu A cm^{-2}] = m [\mu M DA] + b$.

Detector	Ecuación	R ²	LD/μM	LC/μM
1	$y=0.003x-0.058$	0.9941	3.01	10.02
2	$y=0.005x-0.115$	0.9941	1.72	5.73
3	$y=0.018x+0.031$	0.9979	0.29	0.97
4	$y=0.011x-0.231$	0.9941	0.73	2.44
5	$y=0.027x+0.445$	0.9982	0.18	0.61
6	$y=0.023x+0.337$	0.9965	0.25	0.82
7	$y=0.046x+0.100$	0.9981	0.15	0.51
8	$y=0.032x+0.268$	0.9998	0.22	0.72

Tabla 2. LD y LC para la detección espectrofotométrica de DA en muestras sintéticas.

Ecuación: $y [m a.u.] = m [\mu M DA] + b$.

Detector	Ecuación	R ²	LD / μM	LC / μM
UV-Vis	$y=0.02x+0.06$	0.9974	0.14	0.47

A partir del hecho que el electrodo modificado de CV–DEN–Rh fue el más sensible para detectar a la DA en muestras sintéticas, sólo este electrodo fue el que se probó para evaluar DA en muestras reales de orina con el sensor espectrofotométrico y amperométrico.

Una vez realizadas estas pruebas, como se puede ver en la Fig. 4.A, la pendiente, que refleja la sensibilidad de la detección espectrofotométrica fue diferente para las muestras sintéticas y reales; lo cual da indicio de la presencia de efectos de matriz por errores paralelos, es decir, se pierde sensibilidad en la detección de la DA debido a otros compuestos que son detectados en las muestras reales en la misma longitud de onda para sensor DA, como claramente se puede notar en el cromatograma de la Fig. 5.A. En cambio, cuando se observa la detección electroquímica en la Fig. 4.B, la sensibilidad es la misma para muestras sintéticas y reales, por lo que se considera que este detector es más selectivo para sensor DA debido a que no mostró un efecto de matriz [12]; es decir, que los demás compuestos de la orina no interfirieron en la señal electroquímica de la DA (Fig. 5.B).

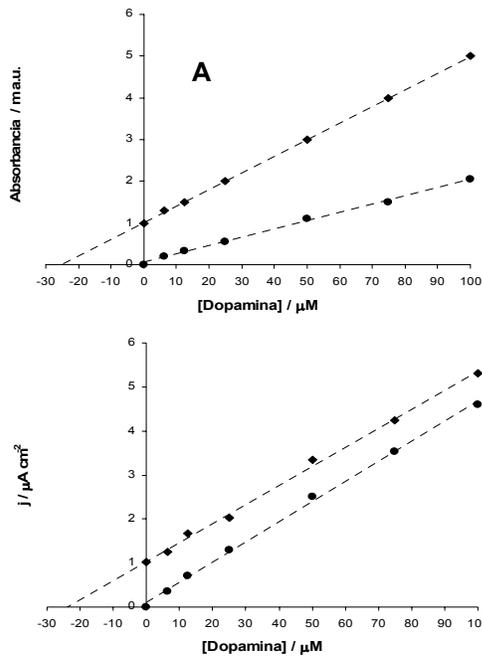


Fig. 4. Curvas de calibración con adición de estándar durante la detección espectrofotométrica (A) y electroquímica (B), empleando el electrodo modificado de CV-DEN-Rh para sensar DA usando muestras sintéticas (●) y reales de orina sin pre-tratamiento (◆).

Además, la selectividad del detector electroquímico se reafirma porque el pico de la señal de DA se puede integrar de forma más correcta (Fig. 5.B - i) que en el cromatograma del detector espectrofotométrico (Fig. 5.A - i).

Tabla 3. Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para la determinación espectrofotométrica (A) y electroquímica (B) de DA en muestras de orina sin pre-tratamiento, usando el electrodo de CV-DEN-Rh.

Detector	m	b	R ²	LD/μM	LC/μM
A	0.04	1.01	0.9999	0.07	0.23
B	0.04	1.04	0.9973	0.16	0.54

La concentración de DA en las muestras reales se determinó con la ordenada al origen de las curvas de calibración, la cual fue de 24 μM con ambos detectores (Fig. 4) que muestran prácticamente la misma sensibilidad (Tabla 3, m es la pendiente), sin embargo con el detector electroquímico se observa menos ruido y por lo tanto se elimina el efecto de matriz de la muestra de orina. Además, estas

curvas no pasan por el origen debido a que se estaba detectando la DA en la orina aún sin la adición del estándar, así que cuando se incrementaba la concentración del estándar se sentaba éste más la DA ya existente en la muestra real.

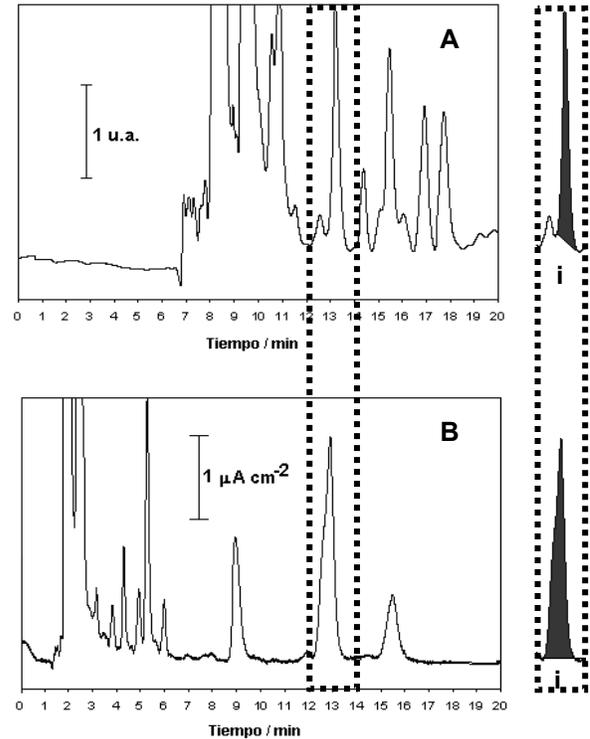


Fig. 5. Cromatogramas de la detección espectrofotométrica (A) y amperométrica (B) de DA en muestras reales de orina sin pre-tratamiento. i = Integración del pico de DA.

4. CONCLUSIONES

El electrodo de carbón vítreo modificado con compósitos de dendrímero PAMAM G4.0 con terminación hidroxilada y nanopartículas metálicas del grupo de platino presentó una opción viable para detectar dopamina en muestras sintéticas, incrementando los límites de detección y cuantificación respecto a los mostrados con carbón vítreo sin modificar o sólo modificado con los dendrímeros.

Por otra parte, el electrodo de carbón vítreo modificado con compósitos de dendrímero PAMAM G4.0-OH y Rh (CV-DEN-Rh) fue el más sensible a la detección de dopamina en muestras sintéticas, en comparación con los demás detectores

amperométricos (CV, CV-(PAMAM G4.0-OH), CV-DENSs-Ir, CV-DENSs-Os, CV-DENSs-Pd, CV-DENSs-Pt y CV-DENSs-Ru). Además, fue el más selectivo por mostrar mayor tolerancia a la presencia de otros componentes de matriz a diferencia del detector espectrofotométrico. De esta manera se elimina el pre-tratamiento de la muestra de orina, así como la pasivación de la superficie del electrodo de CV modificado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Beca 45157) por su soporte financiero.

REFERENCIAS

- [1] S. S. Kumar, J. Mathiyarasu y K. L. Phani, *J. Electroanal. Chem.* **578** (2005) 95.
- [2] R. Zhu y W. T. Kok, *Anal. Chem.* **69** (1997) 4010.
- [3] T. J. O'Shea, M. W. Telting-Díaz, S. M. Lunte y C. E. Lunte, *Electroanalysis* **4** (1992) 463.
- [4] K. Kinoshita, *Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties*, John Wiley & Sons, New York (1988).
- [5] M. A. Schwarz y P. C. Hauser, *Anal. Chem.* **75** (2003) 4691.
- [6] E. Bustos Bustos, T. W. Chapman, F. Rodríguez-Valadez and L. A. Godínez. *Electroanalysis*, **18** (2006) 21, 2092.
- [7] R. M. Crooks, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 692.
- [8] D. T. Richens, *The Chemistry for Aqueous Ions: Synthesis, Structure and Reactivity. A Tour Through the Periodic Table of the Elements*. John Wiley & Sons. West Sussex, England (1997)
- [9] S. S. Kumar, J. Mathiyarasu y K. L. Phani, *J. Electroanal. Chem.* **578** (2005) 95.
- [10] M. Zhao y R. M. Crooks, *Angew. Chem.* **111** (1999) 375.
- [11] B. Lamprecht, G. Schider, R. T. Lechner, H. Dittbacher, J. R. Krenn, A. Leitner y F. R. Aussenegg, *Phys. Rev. Lett.* **84** (2000) 4721.
- [12] V. R. Meyez, *Practical High-Performance. Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, 3rd edition, West Sussex England (1998).