

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LIGANDOS
HIDROXILADOS DE BASE DE SCHIFF.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE SENSORES Y
BIOSENSORES**

MÓNICA REVENGA PARRA

Madrid, Julio de 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LIGANDOS
HIDROXILADOS DE BASE DE SCHIFF.
APLICACIÓN AL DESARROLLO DE SENSORES Y
BIOSENSORES**

Memoria que presenta la Licenciada
MÓNICA REVENGA PARRA
para optar al grado de Doctor en Ciencias (Químicas)



FELIX PARIENTE ALONSO, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor Titular en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMA:

Que el trabajo descrito en la memoria presentada, titulado
**“Síntesis y caracterización de Ligandos Hidroxilados de base de Schiff.
Aplicación al Desarrollo de Sensores y Biosensores”**

ha sido desarrollado bajo mi dirección y codirigido por Dña. **MARÍA ENCARNACIÓN LORENZO ABAD** Doctora en Ciencias Químicas y Catedrática de Universidad en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado por Dña **MÓNICA REVENGA PARRA** en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid.

Que los resultados obtenidos por Dña. Mónica Revenga Parra constituyen una aportación de interés en la síntesis y aplicaciones de nuevos compuestos en el desarrollo de sensores y biosensores para el reconocimiento de substratos de interés agroalimentario, medioambiental y clínico.

Asimismo, también hace constar que el trabajo descrito en dicha memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que, como director y tutor del trabajo de investigación realizado, **autorizo su presentación** para que pueda ser defendida por la doctoranda como Tesis Doctoral en acto público en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste firmo el presente documento en Madrid, a 12 de Mayo de 2009.

Fdo. Félix Pariente Alonso

Fdo. M^a Encarnación Lorenzo Abad

V. B. Del Departamento

D. Jesús Rodríguez Procopio
Química Analítica y Análisis Instrumental.

A todos los que con vuestros conocimientos, consejos y apoyo habéis hecho posible que esta Tesis se llevara a cabo y sentís que, en parte, también es vuestra...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Sensores electroquímicos. Electrodo modificado químicamente	4
1.1. Métodos de preparación de electrodo modificado químicamente.....	6
A. Adsorción directa del reactivo a la superficie del electrodo	7
B. Unión química por formación de enlace covalente.....	8
C. Mezcla de un modificador con una matriz conductora	8
D. Recubrimiento físico de la superficie eléctrica con polímeros.....	9
1.2. Aplicaciones de los electrodo modificado químicamente	11
1.3. Uso de compuestos de bases de Schiff como mediadores redox	16
2. Biosensores.....	23
2.1. Biosensores electroquímicos de ADN.....	24
A. Tipo de transductor.....	27
B. Inmovilización de la sonda de ADN.....	28
C. Hibridación con la secuencia complementaria.....	29
D. Detección del evento de hibridación mediante una señal electroquímica.....	30
E. Uso de compuestos de base de Schiff en procesos biológicos.....	34
F. Tendencias futuras.....	35
 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	 39
 MATERIALES Y MÉTODOS	 43
1. Reactivos y disoluciones.....	45
2. Materiales.....	49
3. Procedimientos	51
3.1. Síntesis de compuestos en disolución	51
A. N,N'-bis(2,3-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (2,3-DHsalophen).....	51
B. N,N'-bis(2,5-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (2,5-DHsalophen).....	51
C. N,N'-bis(3,4-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHsalophen).....	51
3.2. Síntesis de compuestos en estado sólido.....	52
A. N,N'-bis(2,3-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (2,3-DHsalophen).....	52
B. N,N'-bis(2,5-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (2,5-DHsalophen).....	52
C. N,N'-bis(3,4-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHsalophen).....	52

3.3. Preparación del $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-(N,N'-Bis(2,5-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno [Ni-2,5-DHsalophen]}^{2+}$	53
3.4. Pretratamiento de electrodos	53
A. Activación de electrodos de carbón vítreo.....	53
B. Activación de electrodos de oro	53
3.5. Modificación de electrodos	54
A. Modificación de electrodos de carbón vítreo con ligandos DHsalophen mediante electrodeposición	54
B. Modificación de electrodos de carbón vítreo con ligandos DHsalophen mediante adsorción directa.....	54
C. Modificación de electrodos de carbón vítreo con el complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ mediante electrodeposición.....	55
D. Modificación de electrodos de oro con CT-ADN por adsorción directa	55
E. Modificación de electrodos de oro con oligonucleótidos sintéticos por quimisorción de tioles	55
F. Hibridación de la sonda tiolada con distintas secuencias	56
G. Acumulación de 3,4-DHsalophen en electrodos modificados con ADN	56
3.6. Medidas electroquímicas	56
A. Cálculo de la capacitancia de los electrodos de carbón vítreo.....	56
B. Cálculo del recubrimiento superficial de material adsorbido sobre la superficie de los electrodos	57
C. Cálculo de la constante heterogénea de transferencia de carga (k_s)	57
D. Cálculo de la constante catalítica de transferencia electrónica entre el sustrato y el mediador inmovilizado.....	58
E. Cálculo del recubrimiento de CT-ADN y sondas tioladas sobre la superficie de los electrodos de oro.....	58
3.7. Medidas espectrofotométricas	58
A. Cálculo de la concentración de CT-ADN y oligonucleótidos tiolados	58
B. Titulación UV-vis con CT-ADN y los derivados del DHsalophen. Cálculo de la constante intrínseca de unión.....	59
C. Cálculo del porcentaje de efecto hipocrómico.....	59
D. Titulación de fluorescencia con CT-ADN y los derivados del DHsalophen. Cálculo de la constante de Stern-Volmer.....	60
E. Cálculo de la temperatura de desnaturalización del CT-ADN	60

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
------------------------	----

CAPÍTULO I

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LIGANDOS DERIVADOS DEL DHsalophen	65
1. Síntesis de los ligandos.....	65
2. Caracterización espectroscópica de los ligandos sintetizados	68
3. Caracterización electroquímica en medio no acuoso	72

CAPÍTULO II

MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO CON ISÓMEROS DEL DHsalophen	79
1. Electrodeposición de los derivados del DHsalophen sobre electrodos de carbón vítreo en medio acuoso	81
2. Modificación de electrodos de carbón vítreo con películas de los derivados DHsalophen directamente adsorbidas.....	83
2.1. Influencia de la velocidad de barrido. Cálculo de la constante heterogénea de transferencia de carga.....	88
2.2. Influencia del pH en la respuesta de los electrodos modificados	91
2.3. Propiedades electrocatalíticas de los electrodos modificados con películas adsorbidas de DHsalophen	93
A. Oxidación electrocatalítica de NADH.....	94
B. Oxidación electrocatalítica de hidracina.....	97

CAPÍTULO III

DESARROLLO DE UN SENSOR DE HIDRACINA BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADO CON PELÍCULAS ADSORBIDAS DE 3,4-DHsalophen	103
1. Efectos de la activación del electrodo en la oxidación electrocatalítica de hidracina.....	105
2. Influencia de velocidad de barrido en la corriente catalítica. Cálculo de la constante cinética del proceso de oxidación electrocatalítica de hidracina	107
3. Efecto del pH en la oxidación electrocatalítica de hidracina.....	110
4. Influencia de la concentración de hidracina en la intensidad de pico	111
5. Determinación de las propiedades analíticas del sensor	113

CAPÍTULO IV

MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO CON EL COMPLEJO [Ni-2,5-DHsalophen] ²⁺	117
1. Preparación y caracterización del complejo [Ni-2,5-DHsalophen] ²⁺	117
2. Estudios de optimización del proceso de modificación	122
3. Cinética de transferencia electrónica para películas electrodepositadas de [Ni-2,5-DHsalophen] ²⁺	127
4. Influencia del pH en la respuesta de los electrodos modificados	130
5. Electrooxidación de alcoholes sobre electrodos de carbón vítreo modificados con [Ni-2,5-DHsalophen] ²⁺	132

CAPÍTULO V

DESARROLLO DE UN SENSOR DE METANOL BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADO CON [Ni-2,5-DHsalophen] ²⁺	141
1. Influencia de la velocidad de barrido en la corriente catalítica	143
2. Influencia del pH en la oxidación electrocatalítica de metanol	144
3. Influencia de la concentración de alcohol en la respuesta catalítica. Determinación de alcoholes alifáticos lineales de cadena corta	146

CAPÍTULO VI

INTERACCIÓN ENTRE LOS ISÓMEROS DEL DHsalophen Y ADN	157
1. Caracterización del modo de interacción entre los isómeros del DHsalophen y ADN de timo de ternera por métodos espectrofotométricos	158
1.1. Estudios de absorción molecular	158
1.2. Estudios de fluorescencia molecular	164
1.3. Efecto de la temperatura en las propiedades fluorescentes	169
1.4. Efecto de la presencia de desactivadores aniónicos de fluorescencia	171
1.5. Estudios de la variación de la temperatura de desnaturalización	174
2. Estudio de la interacción del 3,4-DHsalophen con CT-ADN por métodos electroquímicos	176
2.1. Interacción del 3,4-DHsalophen con CT-ADN en disolución	177
2.2. Respuesta electroquímica del 3,4-DHsalophen en electrodos modificados con CT-ADN	182

CAPÍTULO VII

DISEÑO DE UN GENOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE UNA SECUENCIA DE <i>Helicobacter pylori</i>	189
1. Etapas en el desarrollo del biosensor	191
1.1. Inmovilización de la sonda	191
1.2. Hibridación con la hebra diana	194
1.3. Detección del evento de hibridación. Acumulación del indicador a circuito abierto	195
2. Propiedades analíticas del biosensor	197
3. Detección de una secuencia con una base desapareada usando 3,4-DHsalophen como indicador electroquímico	199
CONCLUSIONES	203
BIBLIOGRAFÍA	207
PUBLICACIONES	227

INTRODUCCIÓN

Las bases de Schiff fueron descritas por primera vez en 1864 por Hugo Schiff, a quien deben su nombre. Son el producto de condensación de una amina y una cetona o aldehído, generándose un grupo azometino. El interés real generado por esta clase de compuestos es principalmente debido a la facilidad de su preparación y la posibilidad de modificar su estructura con distintos sustituyentes, dada la diversidad existente de aminas y compuestos con grupos carbonilo.

Dentro de la gran variedad de bases de Schiff descritas en la literatura, son particularmente interesantes los derivados de la condensación del ácido salicílico, y sus análogos, con diaminas alquílicas o alifáticas. El resultado de estas reacciones de condensación son compuestos que contienen en su estructura dos oxígenos y dos nitrógenos capaces de formar complejos estables con metales con diversos estados de oxidación en un entorno fácilmente alterable. Las aplicaciones de este tipo de ligandos y sus complejos metálicos se centran fundamentalmente en su capacidad para actuar como catalizadores tanto en catálisis homogéneas como heterogéneas. Además, estos compuestos están involucrados en diferentes reacciones biológicas, ya sea como precursores de algunas drogas o como modelos miméticos de enzimas.

En la actualidad, su facilidad de preparación, sus propiedades como catalizadores y su aplicación en distintos procesos biológicos hace que, los ligandos de base de Schiff sean moléculas especialmente atractivas para ser utilizadas en el diseño de sensores y biosensores.

1. Sensores electroquímicos. Electroodos modificados químicamente

De acuerdo con la IUPAC, un sensor químico es un dispositivo integrado capaz de proporcionar información química específica cuantitativa o semicuantitativa, formado por un elemento de reconocimiento el cual está en contacto directo con un elemento de transducción (<http://goldbook.iupac.org/>). Por tanto, un sensor químico es un dispositivo capaz de convertir la información química en una señal analítica útil. En general, deben ser dispositivos de pequeñas dimensiones, de bajo coste, de fácil utilización y que presenten tiempos de respuesta cortos. De forma esquemática, un sensor químico estaría básicamente compuesto por un sistema químico de reconocimiento, acoplado a un transductor apropiado, que transforma el evento de reconocimiento del analito en una señal medible, que posteriormente es detectada y procesada. Por todo esto, los sensores químicos representan un área muy interesante y en expansión dentro de la investigación en química analítica, especialmente indicada para medidas in situ.

Cuando el elemento de reconocimiento está en contacto con un transductor electroquímico, estos instrumentos se denominan sensores electroquímicos. Comparados con otros tipos de sensores, los electroquímicos son dispositivos muy simples y fácilmente miniaturizables, lo que permite hacer medidas en pequeños volúmenes de muestras o en zonas de dimensiones reducidas. Además, presentan un intervalo de respuesta más amplio que la mayoría de los sensores químicos basados en otros principios y unos límites de detección suficientes para la mayor parte de las muestras de interés analítico. En general, se obtienen respuestas rápidas y los dispositivos no tienen un coste muy elevado. Por último, otra ventaja es la disponibilidad de diferentes tipos de transductores (electrodos), lo que permite obtener un número elevado de sensores diferentes para una gran variedad de aplicaciones (Alegret, 2004). Sin embargo, durante las décadas de los 50 y 60 los materiales más utilizados (mercurio, platino, carbono) permitían realizar determinaciones extraordinariamente sensibles de diversos analitos pero de escasa selectividad. Ha sido en los años 70 cuando han aparecido nuevas alternativas capaces de superar la escasa selectividad de los electrodos convencionales usados como

transductores.

Como una de estas alternativas surgen los electrodos químicamente modificados cuyas características y respuestas electroquímicas dependen de la modificación realizada en su superficie. En las últimas tres décadas, ha aumentado el interés y se han realizado grandes avances en este campo, siendo la investigación de las características de su superficie y sus aplicaciones una de las áreas de investigación más activas en la electroquímica y en la química analítica actual. En comparación con los electrodos tradicionales, los electrodos químicamente modificados proporcionan cinéticas de transferencia electrónica entre el analito y el electrodo más rápidas y muestran una mejor selectividad, sensibilidad y estabilidad, permitiendo obtener una respuesta a medida de las necesidades analíticas (IUPAC, 1998). Por tanto, estos electrodos ofrecen no sólo la variabilidad de sus características redox, sino también la posibilidad de elegir las propiedades físicas y químicas deseadas, como la carga, la polaridad, la quiralidad o la permeabilidad. Como ocurre con cualquier otro tipo de sensor, la aplicación con éxito de los electrodos modificados con fines analíticos depende principalmente de su capacidad para transducir la identidad o la concentración de analito con las siguientes propiedades: estabilidad, reproducibilidad, respuesta bien definida, posibilidad de determinar el parámetro de interés en un elevado intervalo de concentración y ausencia de interferencias. Por tanto, el material modificador se elige de tal manera que sea o bien selectivo (e incluso específico) a un analito en particular, o bien capaz de mediar reacciones redox que son lentas, o incluso imposibles, sobre el electrodo sin modificar. De esta forma, los procesos redox que ocurren entre el electrodo y el analito en disolución están fuertemente influidos por las características del modificador empleado. En definitiva, la modificación de un electrodo le dota de la selectividad de la que éste carecía.

1.1. Métodos de preparación de electrodos modificados químicamente

En general, los materiales utilizados como soportes en el diseño de electrodos modificados químicamente suelen ser electrodos metálicos (Pt, Au) o derivados del grafito como los electrodos de carbón vítreo o de grafito pirolítico, la fibra de carbono o los electrodos de pasta de carbono. Como especies modificadoras, se han utilizado metales y sus aleaciones, óxidos y complejos metálicos, polímeros, materiales compósitos, enzimas o materiales orgánicos.

La capa de modificador debe permitir la comunicación electroquímica entre el material del electrodo y la disolución que contiene el analito, lo cual se asegura normalmente gracias a la presencia de un grupo electroactivo en dicha capa modificadora o, en algunos casos, mediante el empleo de polímeros conductores. La unión de estos centros mediadores al soporte electródico puede conseguirse por alguno de los métodos descritos en la literatura, basado en los procedimientos generales que se describen a continuación (Figura 1).

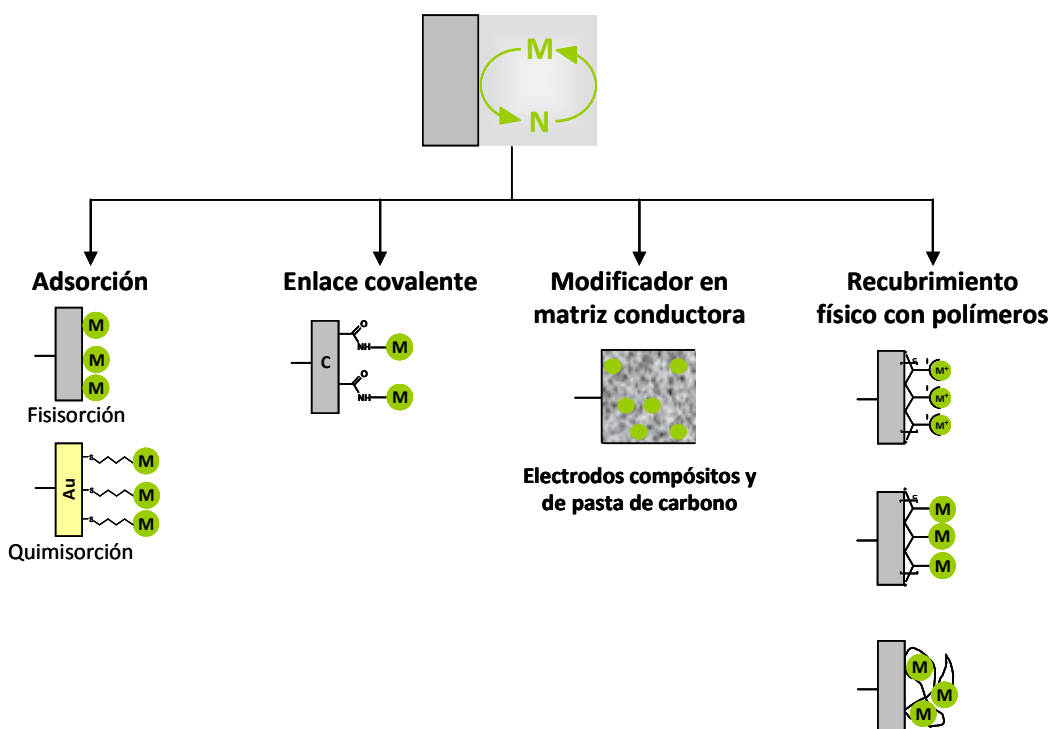


Figura 1: Representación esquemática de los distintos métodos de preparación de electrodos modificados químicamente

La elección de un método u otro de modificación del electrodo se hará persiguiendo los siguientes objetivos: una unión fuerte del modificador y la superficie electródica, una alta transferencia de carga entre el modificador y el electrodo y, por último, la presencia de una concentración alta de centros activos en la superficie para obtener señales analíticas altas.

A. Adsorción directa del reactivo a la superficie del electrodo

Muchos de los electrodos modificados químicamente descritos se fundamentan en la adsorción de moléculas a diferentes tipos de electrodos. La adsorción se puede conseguir mediante la aplicación de un potencial (electroadsorción) o sencillamente depositando el material disuelto y dejando evaporar el disolvente. Esta estrategia es adecuada cuando la solubilidad del modificador en medio acuoso es baja.

La modificación de electrodos mediante adsorción puede basarse tanto en interacciones físicas (fisorción) como químicas (quimisorción). Un ejemplo típico de fisorción, es la adsorción de moléculas con anillos aromáticos con múltiples enlaces π deslocalizados sobre electrodos de grafito. Así, se han utilizado fenacinas, fenoxacinas, fenotiacinas, quinonas, porfirinas (Dong y cols, 1995; Gorton y cols, 1984; Persson, 1990; Torstensson y Gorton, 1981; Tse y Kuwana, 1978). Otro ejemplo, sería la adsorción de olefinas sobre electrodos de Pt gracias a la formación de enlaces Pt-C (Lane y Hubbard, 1973a, b). Según distintos estudios, la activación de electrodos de carbón vítreo favorece la fisorción de distintos compuestos (Shamsipur y cols, 2001a).

Los problemas de estabilidad que presentan los electrodos modificados químicamente por fisorción pueden resolverse mediante la preparación de monocapas autoensambladas por quimisorción. Probablemente el ejemplo más conocido sea la quimisorción de tioles sobre superficies metálicas, principalmente oro. La fuerte afinidad entre ambos hace que sea un método sencillo de modificación muy utilizado. Mediante estos sistemas se pueden obtener superficies modificadas altamente ordenadas, compactas y estables (Darder y cols, 1999).

B. Unión química por formación de enlace covalente

Este tipo de enlace se establece entre determinados grupos del reactivo modificador y de los soportes electródicos. La generación de los grupos funcionales sobre la superficie electródica se realiza mediante tratamientos químicos o por derivatización con moléculas que poseen grupos funcionales.

La unión covalente puede, también, tener lugar directamente sobre la superficie del electrodo. Este enlace directo puede llevarse a cabo por varios métodos, como la abrasión mecánica o pirolisis en vacío (Sharp y cols, 1979), cuando las superficies son de platino o carbono. Hay reactivos que se pueden unir covalentemente mediante reducción, como sucede con las sales de diazonio (Delamar y cols, 1992).

Otra alternativa es la generación previa de grupos funcionales en el material electródico. Entre los grupos funcionales que pueden utilizarse para modificar las superficies electródicas se encuentran los grupos carboxílicos, amino, hidroxilo y diazonio. La silanización del electrodo o la modificación de la superficie con ácidos carboxílicos permite la formación de enlaces covalentes con grupos funcionales presentes en la estructura del modificador (Bourdillon y cols, 1980).

C. Mezcla de un modificador con una matriz conductora

Otro método de modificación de electrodos consiste en introducir el modificador en una dispersión homogénea de partículas de grafito en matrices líquidas del tipo de las parafinas, aceites minerales o siliconas (electrodos de pasta de carbono) o matrices sólidas del tipo de epoxys, teflon o ceras (electrodos compósitos). Estos sistemas ofrecen numerosas ventajas en cuanto a rapidez y facilidad de preparación de los electrodos, bajo coste, rigidez, rapidez de respuesta y una buena relación señal-ruido. Poseen una superficie renovable por pulido y, sobre todo, permiten su modificación casi con cualquier tipo de sustancia útil para el diseño de sensores: mediadores redox (Weissenbacher y cols, 1992), reactivos complejantes (Baldwin y cols, 1986; Molina-Holgado y cols, 1995), cambiadores iónicos (Wang y cols, 1984), materiales biológicos (Gorton, 1995) o nanomateriales (Manso y cols, 2007). Recientemente, se ha publicado una extensa

revisión sobre los electrodos de pasta de carbono y sus aplicaciones en el electroanálisis (Svancara y cols, 2009).

D. Recubrimiento físico de la superficie electródica con polímeros

Una de las técnicas más extendidas para la preparación de electrodos modificados químicamente consiste en el recubrimiento de la superficie del electrodo con películas poliméricas. Este método de modificación presenta varias ventajas como son la estabilidad física y química de los electrodos resultantes, la buena conducción y la simplicidad de su preparación. Siendo la ventaja más significativa que los recubrimientos poliméricos obtenidos proporcionan una zona de reacción tridimensional en la superficie del electrodo que provoca un aumento en el flujo de las reacciones que ocurren en dicha superficie, lo que a su vez produce un incremento de la sensibilidad.

Existen diferentes técnicas para preparar las matrices poliméricas. El polímero puede depositarse utilizando disoluciones de polímeros preformados, por precipitación electroquímica a partir de una disolución del polímero preformado, o puede generarse por polimerización electroquímica (Emr y Yacynych, 1995; Imisides y cols, 1991). Este último sistema es el más empleado, pues permite controlar el número de capas de polímero por medio de la intensidad o del potencial aplicado a la disolución.

Se pueden distinguir tres grandes grupos de polímeros usados en sistemas electroquímicos (Pingarrón, 1999).

- **ELECTROACTIVOS o REDOX:** estos polímeros contienen grupos unidos covalentemente a su esqueleto polimérico (electroquímicamente inactivo) capaces de oxidarse o reducirse. El transporte de carga ocurre por un mecanismo que involucra el salto de electrones de un sitio redox a otro. Como ejemplo cabe destacar el polivinilferroceno.
- **IONÓMEROS (polímeros intercambiadores de iones):** son polímeros formados por grupos redox activos unidos electrostáticamente (tales como iones de complejos metálicos multivalentes) dispersos en una matriz a través de un proceso de

intercambio iónico. En este caso, la movilidad de la carga puede producirse bien por difusión física de los grupos electrostáticamente atrapados o bien por salto electrónico entre grupos vecinos como en el caso de los polímeros redox. Los ejemplos más representativos de este grupo de polímeros son el Nafion, el chitosano y la polivinilpiridina (PVP). Por ejemplo, los grupos piridina presentes en la PVP son capaces de unir electrostáticamente distintos aniones. El movimiento de los aniones es la causa de la conducción del polímero.

- **ELECTROCONDUCTORES:** son polímeros orgánicos electroconductores que poseen en su estructura enlaces conjugados entre sus grupos electroactivos, por tanto presentan una buena conducción electrónica en un amplio intervalo de potencial. Algunos ejemplos de este tipo de polímeros son el polipirrol, la polianilina, el politiofeno o el poliacetileno. En general, pueden considerarse intercambiadores iónicos puesto que los procesos redox que tienen lugar en el polímero, normalmente, están acompañados por la incorporación de iones en la matriz polimérica. En la revisión de Lange y colaboradores (Lange y cols, 2008) se trata ampliamente el tema de la obtención de electrodos modificados con películas poliméricas empleando este tipo de polímeros, incluyendo un número importante de aplicaciones en el desarrollo de sensores.

Otros compuestos utilizados como recubrimientos poliméricos son los polímeros de complejos organometálicos y de otros compuestos inorgánicos como los cianuros metálicos polinucleares, las zeolitas y arcillas, o los óxidos metálicos. En concreto, la electrodeposición de complejos organometálicos como los derivados de las porfirinas y las ftalocianinas han sido ampliamente estudiados (Cox y cols, 1991).

1.2. Aplicaciones de los electrodos modificados químicamente

Las aplicaciones electroanalíticas de los electrodos modificados están en su mayoría orientadas a la consecución de un cierto grado de selectividad, que puede entonces añadirse a la gran sensibilidad que puede conseguirse con las modernas técnicas electroquímicas. Esta selectividad puede lograrse por un efecto de acumulación del analito de interés, por una permeabilidad selectiva a través de la membrana o seleccionando las propiedades de la capa modificadora de modo que catalice una reacción específica. Por tanto, las principales aplicaciones de los electrodos modificados en el área del electroanálisis son la preconcentración, la electrocatálisis y la eliminación de interferencias. Estas tres formas de utilizar analíticamente los electrodos modificados no son áreas aisladas sino que a menudo es posible aplicar, mediante una modificación apropiada, varias de ellas simultáneamente. En la bibliografía existen diversas revisiones generales acerca de los electrodos modificados químicamente y de sus aplicaciones (Kutner y cols, 1998; Shaidarova y Budnikov, 2008; Wang, 1994; Zen y cols, 2003).

En general, los electrodos modificados químicamente han sido empleados en análisis potenciométricos o amperométricos (Bakker y Telting-Diaz, 2002), como detectores en cromatografía líquida y/o inyección en flujo (Baldwin y Thomsen, 1991) o como electrodos selectivos de iones (Bakker, 2004). Un caso particular lo constituyen aquellos electrodos que utilizan sistemas biológicos para llevar a cabo el evento de reconocimiento de especies particulares. Este tipo de sistemas reciben el nombre específico de biosensores y su importancia es tal que constituyen *per se* un grupo homogéneo e independiente dentro de los sensores químicos. Por esta razón, se tratarán con más detalle a lo largo de esta Introducción.

Puesto que el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha enfocado a la modificación de electrodos con el objeto de obtener sistemas de reconocimiento con propiedades electrocatalíticas, en esta Introducción se ha optado por desarrollar únicamente esta aplicación.

Electrocatalisis

En ocasiones, las cinéticas electrónicas hacen que los procesos redox que sufre una especie ocurran a potenciales mucho más positivos o negativos que lo predicho por la termodinámica. Con el fin de disminuir los elevados potenciales requeridos para la detección directa de algunos analitos de interés ambiental, agroalimentario o biológico, se ha recurrido al empleo de mediadores redox. Por tanto, la modificación de la superficie del electrodo de manera adecuada puede reducir ese sobrepotencial (η) desplazando el potencial hacia un valor donde puede determinarse el analito de interés sin interferencias (Figura 2).

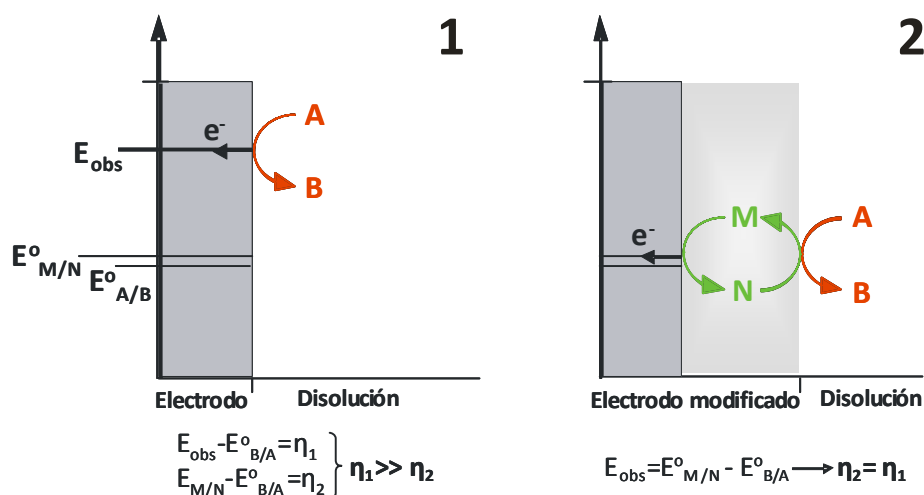


Figura 2: Representación esquemática de una reacción de oxidación ($A \rightarrow B$) en un electrodo sin modificar (1) y en otro modificado con un mediador redox ($M \rightarrow N$) (2).

Como consecuencia, la disminución del potencial de detección supone la mejora en los límites de detección y en la selectividad, ya que, por una parte, mejora la relación señal-ruido y por otra, es menor el número de compuestos electroactivos que pueden sufrir algún tipo de reacción redox. Además, algunas veces, el cambio en el potencial de medida debido a efectos electrocatalíticos permite que procesos electroquímicos que en condiciones normales ocurren a potenciales cercanos o superiores al límite del disolvente, se desplacen a un potencial de medida útil. Además del desplazamiento de potencial, la electrocatalisis, generalmente, lleva asociado un aumento de la señal analítica.

La naturaleza del soporte al cual está enlazado el mediador redox puede variar desde matrices poliméricas, hasta metales, grafito o pasta de carbono. En cuanto a los mediadores redox, existen una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados para este fin.

Debido a la sencillez de su preparación, los electrodos modificados mediante adsorción (fisorción o quimisorción) son ampliamente utilizados en aplicaciones analíticas, en concreto en electrocatálisis. Por ejemplo, se han depositado un gran número de moléculas orgánicas para la detección de ácido ascórbico, hidracina, compuestos organohalogenados o mercaptanos, entre otros (Zen y cols, 2003). Recientemente, se ha descrito la preparación de electrodos de carbón vítreo modificados con nanotubos de carbono y diferentes mediadores redox para la determinación de hidracina (Salimi y cols, 2008b; Zare y Nasirizadeh, 2007). Por otro lado, el empleo de monocapas autoensambladas también se ha utilizado para este tipo de aplicaciones. Los aminoácidos o péptidos que contienen grupos tioles terminales en su estructura (cisteína, metalotioninas) se han utilizado como modificadores para el estudio de la oxidación electrocatalítica de CO o dopamina (Shi y cols, 2001; Wang y cols, 2002).

La modificación mediante enlace covalente de superficies de carbono con radicales arilo mediante la reducción de sales de diazonio ha sido ampliamente estudiada. Este tipo de modificación ha sido utilizada, recientemente, en electrodos serigrafados de carbono para la determinación amperométrica de ácido ascórbico en frutas y hortalizas (Nassef y cols, 2008).

Por lo que se refiere a los electrodos modificados con polímeros conductores, puede decirse que se han utilizado para la determinación de analitos como dopamina, ácido ascórbico, ácido úrico, NADH, morfina o serotonina (Heras y cols, 2007; Ho y cols, 2005; Li y Lin, 2007; Lupu y cols, 2002; Wang y cols, 2007). Se han utilizado películas poliméricas derivadas del tiofeno para la oxidación electrocatalítica de algunos neurotransmisores, catecoles y ácido ascórbico (Kelley y cols, 2006). En comparación con los electrodos de carbón vítreo, estas películas ofrecen la posibilidad de separar las señales voltamperométricas del ácido ascórbico, el catecol y *p*-aminofenol. Además, se han

estudiado las propiedades electrocatalíticas de estas películas sintetizadas en presencia de ciclodextrinas frente a la oxidación de dopamina y ácido ascórbico (Lupu y cols, 2003). Recientemente, Mathiyarasu y colaboradores han incorporado nanopartículas de oro en películas poliméricas derivadas del tiofeno para mejorar la determinación de dopamina (Mathiyarasu y cols, 2008). También se han utilizado nanopartículas de oro y nanotubos de carbono en el desarrollo de películas poliméricas de pirrol y los electrodos resultantes se han utilizado para la detección de serotonina en presencia de ácido ascórbico (Li y Lin, 2007).

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la preparación de electrodos de pasta de carbono mezclando polvo de grafito, aglutinante y un mediador redox es un sencillo proceso para la preparación de electrodos modificados químicamente útiles en la determinación electrocatalítica de un número importante de analitos, tanto inorgánicos como orgánicos. Así, se ha descrito la preparación de este tipo de electrodos usando como mediadores redox distintos viológicos para la determinación de NADH (Malinauskas y cols, 2000; Munteanu y cols, 2001), óxido de mercurio para la determinación de metales (Metelka y cols, 2000), un derivado de la antraquinona para determinar Pb^{2+} (Mousavi y cols, 2001). En la revisión llevada a cabo por Zen se incluyen un número importante de aplicaciones tanto de electrodos de pasta de carbono como de electrodos compósitos cerámicos (Zen y cols, 2003).

Como es bien sabido, el uso de nanopartículas metálicas mejora las propiedades analíticas de los electrodos (Hernandez-Santos y cols, 2002). La incorporación de metales en películas poliméricas mejora frecuentemente sus propiedades electrocatalíticas, elimina los efectos de envenenamiento y aumenta la estabilidad de las respuestas de los electrodos modificados. El aumento en la actividad catalítica es debido a la formación de depósitos altamente dispersos que provocan la mejora de la electroconducción del polímero. A este respecto, Shaidarova y Budnikov revisan el uso de metales en la preparación de electrodos modificados proporcionando una extensa bibliografía sobre las aplicaciones más interesantes (Shaidarova y Budnikov, 2008).

El grupo de Bedioui ha publicado un trabajo sobre la preparación de materiales híbridos entre nanotubos de carbono y metaloporfirinas o metalofalocianinas y su aplicación a la reducción electrocatalítica de oxígeno y peróxido de hidrógeno o la oxidación de óxido nítrico o tioles (Zagal y cols, 2009). Nyokong también ha estudiado las mejoras que supone la presencia de nanotubos de carbono en las propiedades electrocatalíticas de las metalofalocianinas (Nyokong, 2008). En la revisión de Tacconi se trata el tema sobre la electrosíntesis, caracterización y aplicaciones de derivados metálicos de hexacianoferrato (de Tacconi y cols, 2003). En concreto, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un sensor para la determinación de sulfitos a partir de electrodos de carbón vítreo modificados con películas poliméricas de hexacianoferrato de hierro (García y cols, 2005).

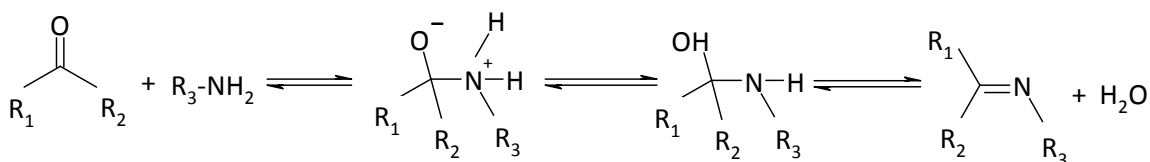
Las propiedades catalíticas de los electrodos modificados químicamente se han utilizado para el análisis voltamperométrico tanto de compuestos inorgánicos y orgánicos con estructuras sencillas (NO, CO, hidracina, etanol,...), como compuestos biológicamente activos (ácido ascórbico, serotonina,...). Asimismo, se ha demostrado su uso como detectores en cromatografía líquida y/o inyección en flujo, sensores químicos con respuesta amperométrica, y como transductores en el desarrollo de biosensores. Estos electrodos se pueden utilizar en el control de procesos industriales o en el control de contaminantes medioambientales. Son también útiles en el análisis de medicamentos, alimentos y materiales biológicos, así como en el estudio de reacciones bioquímicas.

El desarrollo de electrodos modificados con nuevos compuestos con propiedades catalíticas es importante no sólo para la química electroanalítica, sino también para otros campos de la ciencia como la electrosíntesis orgánica y la preparación de nuevos agentes anticorrosivos. Los electrodos modificados químicamente con mediadores incorporados pueden encontrar aplicación en la tecnología de la producción de microchips y pruebas biológicas. El desarrollo de estos electrodos también está siendo interesante en campos relacionados con el desarrollo de algunas células de combustible basadas en la electrocatálisis.

1.3. Uso de compuestos de bases de Schiff como mediadores redox

En la presente tesis se han utilizado ligandos y complejos de base de Schiff como mediadores redox en el desarrollo de electrodos modificados químicamente. Cabe mencionar que a pesar del gran número de aplicaciones que hay descritas en la literatura de complejos metálicos de base de Schiff, no sucede lo mismo en el caso de los ligandos.

Las iminas o bases de Schiff se sintetizan haciendo reaccionar una amina con un compuesto carbonílico mediante una adición nucleófila formando un hemiaminal, seguido de una deshidratación para generar la imina (Esquema 1). Como consecuencia, el grupo azometino o base de Schiff es un grupo funcional que contiene un doble enlace C=N, con el N unido a un grupo arilo o alquilo, pero nunca a un hidrógeno. La fórmula general es $R_1R_2C=N-R_3$, donde R_3 representa un grupo arilo o alquilo que hacen que la base de Schiff sea una imina estable. La química del doble enlace C=N ha jugado un papel vital en el progreso de la química. Debido a la presencia de un par de electrones desapareados del átomo de N y del carácter general donador del doble enlace, los compuestos con grupos azometino (bases de Schiff) han sido usados como ligandos coordinantes de metales de transición en la formación de complejos (Hobday y Smith, 1972) o como reactivos en la síntesis de importantes drogas como antibióticos, antihistamínicos, antiinflamatorios y agentes antitumorales (Layer, 1963). Algunos autores han descrito que la presencia en la molécula del grupo C=N, con diversos sustituyentes, promueve la actividad anticancerosa (Kuz'min y cols, 2005).



Esquema 1: Reacción general de la obtención de una imina

Dentro de los compuestos de base de Schiff, los ligandos que contienen en su estructura dos oxígenos y dos nitrógenos, como átomos donadores, han sido ampliamente

estudiados por su capacidad para formar complejos con diversos metales de transición. En particular, la condensación de dos equivalentes del **salicilaldehído** con la **orto-fenilendiamina** genera el ligando (N,N'-ortofenilenebis(salicilaldimina)) (**salophen**). Los derivados de este ligando y de su análogo **salen** (etilendiamina o ciclohexildiamina, en vez de *orto*-fenilendiamina. Nombres IUPAC: N,N'-etilenebis(salicilaldimina) y N,N'-ciclohexilenebis(salicilaldimina)) han sido usados como ligandos de un gran número de metales y estos complejos han sido empleados para muchos y diversos propósitos.

En general, son ligandos tetradentados que forman enlaces de coordinación con los metales a través de los nitrógenos de los grupos imina y los oxígenos de los grupos hidroxilo (N, N, O⁻, O⁻). Solamente se ha encontrado una excepción en la literatura, descrita por Stinziano y colaboradores, donde el ligando es tridentado, uniéndose al metal mediante enlace con N, N, O⁻ (Stinziano-Eveland y cols, 2000). El interés real generado por esta clase de compuestos es principalmente debido a la facilidad de su preparación y la posibilidad de modificar su estructura con distintos sustituyentes. La gran versatilidad de estos compuestos proviene de la capacidad que tienen de acomodar diferentes metales con diversos estados de oxidación en un entorno fácilmente alterable. Esto queda claramente ilustrado por el conjunto de diferentes reacciones nucleófilas-electrófilas que catalizan estos complejos y por su aplicación en distintos procesos biológicos.

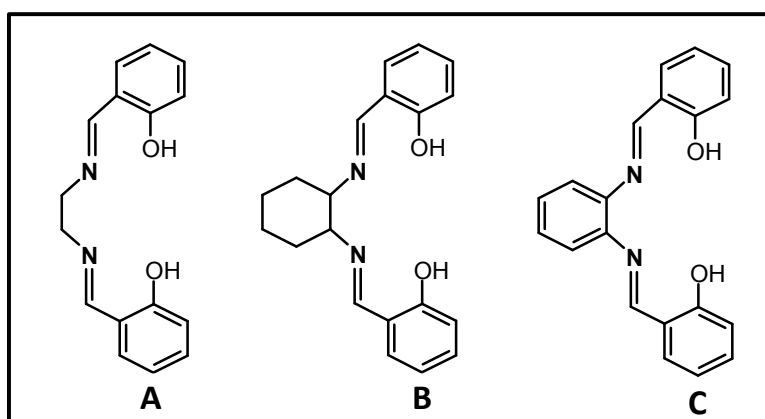


Figura 3: Estructura de (A) N,N'-etilenebis(salicilaldimina) (salen); (B) N,N'-ciclohexilenebis(salicilaldimina) (salen); (C) N,N'-ortofenilenebis(salicilaldimina) (salophen).

Los complejos de metales de transición con ligandos tetradentados de base de Schiff (Hobday y Smith, 1972) son utilizados como potentes catalizadores en un gran número de reacciones químicas (Canali y Sherrington, 1999) como la reducción electroquímica de haluros de alquilo en disolventes apróticos (Bakac y Espenson, 1986; Isse y cols, 1998); la oxigenación de indoles, fenoles o flavones (Eichhorn y cols, 1997; Ramnauth y cols, 2004); la oxidación de hidrocarburos (Lee y cols, 1998); la oxidación de sulfuro a sulfóxido (de Azevedo Marques y cols, 2007); la reducción de organohaluros (Duprilot y cols, 1985); la alquilación de aldehídos (Maeda y cols, 2004) o la oxidación de alcoholes (Aranha y cols, 2007), entre otros. Por otro lado, la formación del complejo de un derivado hidroxilado del salophen con Cd(II) ha permitido que, recientemente, se haya desarrollado un sensor óptico de membrana basado en la inmovilización del ligando en triacetilcelulosa para la detección de iones Cd (II) (Ensafi y cols, 2008). Como ejemplo de las muchas aplicaciones que los complejos con ligandos tetradentados de base de Schiff tienen, en la Tabla 1 se recogen algunos de los ejemplos más representativos de las aplicaciones de complejos metálicos con ligandos derivados de salen y salophen.

METAL	LIGANDO	APLICACIÓN	Referencias
Ru (II)	salophen / salen	Catalizador de la oxidación de alcoholes	(Karvembu y cols, 2003)
Cr (III ,V)	salen	Epoxidación de olefinas	(Samsel y cols, 1985)
Co (II, III)	salen	Apertura asimétrica de epóxidos	(Ready y Jacobsen, 2001)
Zn (II)	salen	Sensores de ión sulfato	(Shamsipur y cols, 2001b)
Al (III)	salen	Adición de Michael a imidas α , β -insaturadas	(Taylor y Jacobsen, 2003)
Nb (IV, V) Mo (II, IV) Ti (II, III) V (II, III)	salophen	Componentes potenciales de baterías moleculares	(Floriani y cols, 2001; Franceschi y cols, 1999; Franceschi y cols, 2000)

Tabla 1: Aplicaciones de complejos metálicos con ligandos derivados de salen y salophen.

En general, estos complejos se han utilizado en reacciones homogéneas de electrocatálisis (Gosden y cols, 1981). Sin embargo, hay autores que han aprovechado la facilidad de preparación de electrodos modificados con estos compuestos, mediante electropolimerización de los monomeros en disolventes débilmente donadores, para su utilización en distintas aplicaciones. En este sentido, Horwitz y Murray sintetizaron complejos de un derivado del salen con Ni (II), Co (II) y Mn (III) y electropolimerizaron estos compuestos sobre superficies de platino (Horwitz y Murray, 1988). Simultáneamente, Goldsby y colaboradores electropolimerizaron el complejo Ni-salen en electrodos de platino (Goldsby, 1988). El grupo de Bedioui ha investigado la electropolimerización anódica de complejos de salen con Ni (II), Co (II) y Mn (III) en electrodos de carbón vítreo en acetronitrilo (Bedioui y cols, 1991). El desarrollo de este tipo de electrodos ha permitido su uso en reacciones de electrocatálisis heterogénea. De hecho, los electrodos modificados obtenidos mediante la electropolimerización del complejo Ni-salen sobre carbón vítreo en medio básico han resultado muy eficaces en la oxidación electrocatalítica de etanol, metanol e hidracina (Trevin y cols, 1997). Por otro lado, Dahm y Peters han usado los electrodos modificados con películas electropolimerizadas de Ni-salen para la reducción de iodoetano, 2-iodopropano y α - ω -dihaloalcanos (Dahm y Peters, 1994, 1996). Otros autores han utilizado electrodos de níquel para formar "in situ" el complejo con el ligando salophen. La formación del complejo sobre la superficie del electrodo modificado se comprobó mediante espectroscopia infrarroja y mediante microscopía de barrido electrónico. En este caso, los electrodos modificados tienen la capacidad de catalizar la electrooxidación de metanol en medio básico (Golikand y cols, 2009).

Además de los electrodos modificados mediante electrodeposición de películas electroactivas de complejos de base de Schiff, se han encontrado en la literatura electrodos de pasta de carbón modificados con distintos complejos de cobalto con derivados del salophen para la determinación de distintos analitos como penicilamina, cisteína, ácido ascórbico, un inhibidor enzimático como captopril o dopamina (Shahrokhian y cols, 2005; Shahrokhian y cols, 2004; Shahrokhian y Zare-Mehrjardi, 2007).

Además, se han descrito varios electrodos de pasta de carbón modificados con nanotubos de carbono y con Co-salophen para la detección de N-acetilcisteína o triptófano (Amini y cols, 2003; Shahrokhian y Fotouhi, 2007). La inmovilización de moléculas sobre los nanotubos de carbono ha atraído la atención de muchos investigadores, por el aumento de la conductividad eléctrica que presentan estos electrodos modificados, así como el aumento del área superficial o la buena estabilidad química. En este sentido, se ha utilizado un complejo de base de Schiff de vanadio para modificar un electrodo de carbón vítreo modificado previamente con nanotubos de carbono. El uso de nanotubos de carbono afecta significativamente a la reacción de oxidación de V(IV)/V(V) debido a la fuerte interacción que existe entre los grupos aromáticos del complejo de base de Schiff con los nanotubos de carbono. El electrodo modificado es eficaz frente a la reducción electrocatalítica de aniones iodato, periodato y nitrito a unos valores de potencial inusualmente positivos en medio ácido (Salimi y cols, 2006).

Distintos complejos de salen con metales como Fe, Co, Mn, Cd se han utilizado también como ionóforos en el diseño de sensores potenciométricos para la determinación de diversos analitos. Para ello, se han modificado con éxito membranas de policloruro de vinilo (PVC) con los complejos metálicos, o bien se han preparado electrodos modificados de pasta de carbón (Fatibello-Filho y cols, 2007). Ganjali y colaboradores han desarrollado electrodos con membranas de PVC modificadas con complejos metal-salen y han determinado iones nitrito en muestras de leche y salchichas (Ganjali y cols, 2003), iones tiocianato en leche (Ganjali y cols, 2001) o iones fosfato monohidrogenado en fertilizantes (Ganjali y cols, 2006). Por su parte, Badr ha utilizado como ionóforos los complejos de salen con Co(II), Cr(III) y Al (III) para el desarrollo de electrodos modificados con membranas de PVC sensibles a aniones como el tiocianato, el nitrito o fluoruros (Badr, 2006). Además de su uso para la determinación de aniones, también se ha descrito el diseño de electrodos modificados con membranas de PVC para la determinación de metales como Ni(II) (Jain y cols, 2005) o Cu(II) (Fakhari y cols, 2005).

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los sensores electroquímicos descritos en la literatura basados en complejos metálicos de ligandos derivados de salen y salophen.

ANALITO	MODIFICADOR	INMOVILIZACIÓN	Referencias
<u>SENSORES POTENCIOMÉTRICOS</u>			
Ioduro	Mn-salen	Electrodo de pasta de carbón	(Shamsipur y cols, 2000)
Fluoruro	Ga-salen	Membrana de PVC	(Meyerhoff y cols, 2005)
Nitrito	Co-salen	Membrana de PVC	(Badr, 2006)
Tiocianato	Cr-salen	Membrana de PVC	(Badr, 2006)
Cu (II)	<i>o</i> -Me-salen	Membrana de PVC	(Fakhari y cols, 2005)
	<i>m</i> -Me-salen		
	<i>p</i> -Me-salen		
<u>SENSORES AMPEROMÉTRICOS</u>			
Ácido ascórbico	Co-salen	Película electropolimerizada	(Liu y cols, 2000a)
Óxido nítrico	Ni-salen	Película electropolimerizada	(Mao y cols, 1998)
Nitrito	VO-salophen	Electrodo de pasta de carbón	(Kamyabi y Aghajanloo, 2008)
Ácido úrico Glucosa	Fe-salen	Adsorción directa	(Lieu y Wang, 2000)
Oxoaniones	VO-salen	Adsorción directa	(Salimi y cols, 2008a)
Amoxicilina Cisteína Piridoxina	VO-salen	Electrodo de pasta de carbón	(Bergamini y cols, 2006; Teixeira y cols, 2005; Teixeira y cols, 2004)

Tabla 2: Aplicaciones de sensores modificados con complejos metálicos de ligandos derivados de salen y salophen.

En conclusión, el empleo de sensores basados en electrodos modificados con complejos de metales de transición con ligandos tetradentados de base de Schiff para el análisis de muestras alimentarias, industriales, medioambientales o farmacéuticas ha aumentado significativamente en la última década. Por una parte, los electrodos desarrollados para la determinación potenciométrica de distintos analitos son fáciles de preparar y muestran una buena sensibilidad a la vez que amplios intervalos de respuesta lineal. La alta selectividad, los bajos límites de detección, la alta estabilidad junto con la rapidez de respuesta hacen que estos electrodos sean útiles para la determinación de la concentración de un número importante de analitos en una gran variedad de muestras, sin la necesidad de etapas de pretratamiento o preconcentración. Por otro lado, los electrodos modificados desarrollados para la determinación amperométrica presentan una buena capacidad electrocatalítica frente a la oxidación o reducción de distintos analitos provocando una disminución del sobrepotencial y/o un aumento en las corrientes de pico. Por tanto, la síntesis de nuevos ligandos tetradentados de base de Schiff y de sus complejos con metales de transición, para su uso como ionóforos o modificadores redox, es un área de interés para su aplicación en la determinación de diversos analitos.

2. Biosensores

Un grupo especialmente importante dentro de los sensores en general es el constituido por los biosensores. Para describir un biosensor puede usarse una definición similar a la ya establecida para los sensores químicos, con una sustancial diferencia: el sistema de reconocimiento asociado al transductor físico debe ser un sistema biológico.

El desarrollo de los biosensores tiene lugar a comienzos de los años 60 con el objetivo de dotar a algunas de las técnicas analíticas existentes, de la selectividad suficiente como para permitir la utilización en muestras reales complejas, sin necesidad de realizar procedimientos separativos previos. Se trataba además de buscar sistemas capaces de detectar la presencia de los analitos en condiciones de tiempo real, lectura en continuo y en la medida de lo posible por control remoto. Los avances en biología molecular y en las técnicas de análisis instrumental han permitido la mejora de los sistemas diseñados; especialmente en cuanto a sencillez, miniaturización, automatización, coste y aplicabilidad. Esto ha permitido el desarrollo de biosensores con aplicaciones en campos tan diversos como la medicina, el control medioambiental, la agricultura, el control de procesos industriales, la seguridad y la defensa (Ivnitski y cols, 2000; Moscone, 1997; Whittman, 1997).

Los biosensores pueden ser clasificados utilizando distintos criterios. Uno de estos criterios es la naturaleza del proceso biológico empleado. Así, existen los biosensores catalíticos y los biosensores de afinidad. Los primeros se basan en una reacción catalizada por macromoléculas que están presentes en su medio biológico original. Como receptores pueden usarse enzimas, tejidos o microorganismos. Los biosensores de afinidad se basan en procesos de interacción entre moléculas. Entre estos se encuentran los inmunosensores, los biosensores de receptores y los biosensores de hibridación de ADN.

Los biosensores pueden también ser clasificados en función del elemento transductor utilizado, como: electroquímicos, ópticos, y piezoeléctricos. Los dispositivos electroquímicos son los que mayor desarrollo han experimentado en las últimas décadas y los más utilizados en el desarrollo de biosensores debido, como ya se ha comentado en el

caso de los sensores, principalmente a las ventajas que presentan estos sistemas de transducción y que se pueden resumir en:

- Posibilidad de medir directamente en la muestra, minimizando o eliminando los pretratamientos de muestra
- Relativa simplicidad en su construcción, bajo coste y fácil miniaturización
- Obtención rápida de señales
- Posibilidad de realizar las medidas en muy poco volumen
- Buena sensibilidad de las técnicas electroquímicas
- Disponibilidad de diferentes tipos de transductores

En la mayoría de los biosensores electroquímicos, el tipo de detección está basado en sistemas voltamperométricos, aunque también se han utilizado sistemas potenciométricos, impedimétricos o conductimétricos (Cai y cols, 2006; Kim y cols, 2000; Koncki y cols, 1998; Wang y cols, 1998b).

2.1. Biosensores electroquímicos de ADN

Los continuos avances producidos en lo relativo a la comprensión de la estructura, organización y funciones del componente genético en los seres vivos han permitido establecer, en un buen número de casos, que este componente genético está detrás de muchas patologías. A nivel molecular se está viendo que errores de replicación en una sola base pueden dar lugar a genes mutados que, a su vez, pueden ser la causa directa de una patología o de forma indirecta del aumento de la predisposición del individuo a sufrirla. Por lo tanto, el reconocimiento de secuencias de ADN y la detección de errores puntuales de secuencia, más comúnmente llamado polimorfismo de un solo nucleótido, juega un papel importante en el desarrollo de diagnósticos clínicos, en la prevención de epidemias, diseño de fármacos, en la protección medioambiental,... Aunque los métodos tradicionales de análisis de ADN basados en radioisótopos son altamente sensibles, este proceso complejo, que utiliza reactivos radiactivos, presenta algunos problemas entre los

que se incluyen el peligro potencial de los analistas y del medioambiente, así como el largo tiempo de análisis necesario. Por estas razones, el desarrollo de dispositivos capaces de determinar secuencias específicas de ADN de una manera exacta, sencilla y barata ha suscitado un gran interés en los últimos años.

Con el fin de lograr este objetivo, se han desarrollado los biosensores de ADN. La hibridación de secuencias de ADN de cadena simple (sonda) que presentan un grado total o parcial de complementariedad con la secuencia del ADN objeto de análisis (hebra diana) se ha utilizado como evento de biorreconocimiento en el diseño de un gran número de biosensores de ADN, debido a su alta especificidad. La eficacia del biosensor estriba en su capacidad de generar señales analíticas medibles, que de forma fiable establezcan si se ha producido o no la hibridación entre la sonda y la hebra diana. Además, debe poderse cuantificar la magnitud de este proceso de biorreconocimiento. Cómo se reconozca tal evento, en los distintos biosensores, va a depender del método utilizado para la transducción de la señal final. Así, existen métodos ópticos, piezoeléctricos y electroquímicos (Downs y cols, 1988; Kuswandi y cols, 2005; Wang, 2002).

Una de las trabas en el desarrollo de biosensores basados en secuencias de ADN ha sido la dificultad de obtener muestras puras y en cantidad suficiente para ser inmovilizadas sobre la superficie del transductor. En los últimos años, estas dificultades están siendo superadas gracias a dos grandes avances. El primero ha sido el gran desarrollo adquirido en la síntesis de oligonucleótidos de cadena sencilla que permite la preparación y por tanto, la disponibilidad en el laboratorio de cualquier secuencia de ADN en concentración adecuada y relativamente a bajo coste. El segundo desarrollo tiene que ver con la generalización de los procedimientos de amplificación de secuencias mediante ciclos de reacción con la correspondiente polimerasa (PCR). Este sistema permite, a partir de unas pocas moléculas de un determinado fragmento de ADN, obtener de forma amplificada réplicas exactas en un tiempo razonable. La conjunción de estos dos grandes avances ha sentado las bases para el gran desarrollo de los biosensores de ADN como técnica de análisis del futuro.

Al igual que sucedía en el caso de los sensores, en general, los métodos electroquímicos han sido muy utilizados para el desarrollo de biosensores de ADN debido a que las reacciones electroquímicas proporcionan una señal analítica directa y es posible su miniaturización.

En general, la construcción de un biosensor electroquímico de ADN implica los siguientes procedimientos:

- Selección del transductor
- Inmovilización de la sonda modificada de forma adecuada
- Hibridación con la secuencia complementaria o hebra diana (analito)
- Detección electroquímica del evento de hibridación

A continuación, se van a describir brevemente cada una de estas etapas.

A. Tipo de transductor

Para el desarrollo de biosensores de ADN se han utilizado distintos tipos de transductores electroquímicos, fundamentalmente diversos tipos de superficies de carbono y electrodos metálicos.

ELECTRODOS DE CARBONO	Referencias
Electrodos de pasta de carbono	(Wang y cols, 1998a)
Electrodos de carbón vítreo	(Piro y cols, 2005; Zhang y cols, 2004)
Electrodos de grafito	(de Los-Santos-Alvarez y cols, 2002; Ozsoz y cols, 2003)
Electrodos serigrafiados de carbono	(Fojta y cols, 2006; Hernandez-Santos y cols, 2005)
Electrodos compósitos de carbono	(Merkoci y cols, 2005b; Pividori y cols, 2003)
Electrodos modificados con nanotubos de carbono	(Cai y cols, 2003; Kerman y cols, 2005)
ELECTRODOS METÁLICOS	Referencias
Electrodos de oro	(del Pozo y cols, 2005a)
Electrodos serigrafiados de oro	(Lucarelli y cols, 2005)
Electrodos modificados con nanopartículas de oro	(Garcia y cols, 2008a)
Electrodos de platino	(Cha y cols, 2003)
Electrodos formados por óxidos de indio y estaño (ITO)	(Komarova y cols, 2005)

B. Inmovilización de la sonda de ADN

La inmovilización de la sonda es un paso muy importante en el desarrollo de un biosensor de ADN. El logro de una alta sensibilidad y selectividad requiere una eficiencia máxima del evento de hibridación y minimizar las adsorciones no específicas, respectivamente. El control de la superficie y del recubrimiento es esencial para asegurar una alta reactividad, orientación, accesibilidad y estabilidad de la sonda unida a la superficie, así como para evitar los eventos de unión-adsorción no específicos.

Existen numerosas metodologías de inmovilización de sondas de ADN sobre distintos electrodos. A continuación, se muestra un resumen de las más usadas.

MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN	Referencias
Inmovilización por adsorción	(Del Pozo y cols, 2005b)
Inmovilización mediante formación de monocapas autoensambladas de sondas tioladas	(Nakayama y cols, 2002; Peng y cols, 2006; Steel y cols, 1998; Zhao y cols, 1998)
Inmovilización mediante enlace covalente	(Popovich y cols, 2002; Xie y cols, 2004)
Inmovilización en matrices poliméricas	(Komarova y cols, 2005; Thompson y cols, 2003)
Inmovilización en membranas bilipídicas	(Fajkus y Hianik, 2002; Siontorou y cols, 1997)
Inmovilización mediante la interacción avidina-biotina	(Hernandez-Santos y cols, 2004; Huang y cols, 2002)
Inmovilización por inclusión en pasta de carbono	(Wang y cols, 1998a)

Mediante el enlace covalente o a través de la interacción avidina-biotina, se obtienen superficies modificadas con ADN más ordenadas, orientadas y a la vez más controladas. Además, estos métodos implican una disposición perpendicular de las hebras

inmovilizadas, lo que favorecerá la reacción de hibridación. Lo mismo sucede con los métodos de inmovilización mediante la formación de monocapas autoensambladas sobre la superficie de electrodos de oro.

C. Hibridación con la secuencia complementaria

La hibridación entre cadenas complementarias de ADN constituye el evento de biorreconocimiento de estos biosensores y es el proceso que proporciona la gran especificidad que muestran estos sistemas.

Se habla de hibridación cuando las bases nitrogenadas de una cadena sencilla de polinucleótidos se unen con las bases nitrogenadas de otra cadena sencilla de polinucleótidos a través de puentes de hidrógeno formando pares de bases para dar una cadena doble de polinucleótidos. La adenina (A) y timina (T) son bases complementarias, y se unen mediante dos puentes de hidrógeno; mientras que guanina (G) es la base complementaria de citosina (C) y se unen mediante tres puentes de hidrógeno. Este apareamiento entre bases permite establecer una complementariedad altamente específica entre las bases nitrogenadas. Por otro lado, la reacción de hibridación es una reacción reversible. En condiciones especiales de temperatura, pH o en presencia de algunos agentes desnaturizantes, la doble hélice de ADN puede desnaturizarse dando lugar a dos hebras sencillas. Por tanto, la reacción de hibridación presenta dos características que le confieren ventajas para su aplicación analítica, especificidad (unión específica entre bases) y reversibilidad (hibridación-desnaturización); y por ello es el fundamento químico en el que se basan la mayoría de los ensayos de ácidos nucleicos. Existen ciertas condiciones del medio que hay que tener en cuenta para conseguir que la hibridación entre dos cadenas sencillas sea total: pH y fuerza iónica del medio de hibridación, temperatura, composición de las bases (% guanina+citosina) (Wang, 2002).

D. Detección del evento de hibridación mediante una señal electroquímica

Los métodos de detección del evento de hibridación pueden clasificarse en directos o indirectos, en función de la necesidad o no de utilizar marcas o indicadores para llevar a cabo la detección.

MÉTODO DE DETECCIÓN	Referencias
<u>DIRECTO</u>	
Electroactividad de las bases	(Kara y cols, 2002a; Lucarelli y cols, 2002; Ozkan y cols, 2002b)
Cambio en propiedades eléctricas de la interfase electrodo-disolución	(Cai y cols, 2003; Piro y cols, 2005)
<u>INDIRECTO</u>	
Uso de indicadores electroactivos	(del Pozo y cols, 2005a; Erdem y Ozsoz, 2001; Millan y Mikkelsen, 1993; Ozkan y cols, 2002a)
Marcaje de hebras con enzimas	(Kim y cols, 2003; Suye y cols, 2005)
Marcaje de hebras con nanopartículas	(Merkoci y cols, 2005a; Zhu y cols, 2003)

Entre todos los métodos mencionados, hay dos tendencias fundamentales para la detección electroquímica del dúplex de ADN formado en la superficie del transductor: la detección de la señal de guanina (sin indicadores externos) y el uso de indicadores electroactivos. En general, se intenta llevar a cabo la detección de la reacción de hibridación evitando el uso de sondas marcadas.

Respecto a la detección directa cabe resaltar que los estudios pioneros sobre la electroactividad del ADN los llevó a cabo Palecek, hace aproximadamente cuarenta años,

con ADN de alto peso molecular utilizando electrodos de mercurio (Palecek, 1960). Más recientemente, la oxidación directa de ADN se ha llevado a cabo mediante voltamperometría de adsorción-redisolución o directamente sobre electrodos sólidos de carbón vítreo o de oro (Ferapontova y Dominguez, 2003; Palecek, 1988). La mayor parte de los estudios de oxidación de ADN se basan en la oxidación de la adenina y guanina. Residuos de guanina y adenina se pueden oxidar en electrodos de carbono y en electrodos sólidos de platino, cobre, plata y oro. La oxidación de la guanina ha sido estudiada en electrodos de pasta de carbono y de grafito empleando la cronopotenciometría como técnica electroquímica, aunque también se ha utilizado la voltamperometría diferencial de impulsos y la voltamperometría de onda cuadrada (Meric y cols, 2002; Wang y cols, 1999). La limitación en este caso es que el ADN a investigar, necesariamente, tiene que poseer guaninas. Tras la hibridación, si el analito también contiene guaninas existiría un solapamiento en la respuesta proporcionada por la oxidación de esta base. Puesto que la electrooxidación del ADN desnaturalizado, debido a la oxidación de adenina y guanina, ocurre a +1.10 V frente a un electrodo de calomelanos, se han diseñado sistemas de detección que ayuden a solventar los problemas que presenta el trabajar a potenciales tan extremos. Por ejemplo, existen métodos de oxidación de cadenas de ADN que suponen el uso de mediadores solubles en agua capaces de catalizar la electrooxidación de bases purinas, especialmente la guanina (Armistead y Thorp, 2000, 2001).

El otro tipo de detección supone la utilización de moléculas electroactivas capaces de asociarse intrínsecamente a la doble hélice de ADN de manera más eficiente que a la cadena sencilla de ADN. El uso de pequeñas moléculas electroactivas para discriminar entre cadena sencilla y cadena doble de ADN fue estudiado por primera vez por Mikkeelsen, quien estudió la interacción del complejo $\text{Co}(\text{fenantrolina})_3$ con ADN inmovilizado sobre la superficie de electrodos de carbono (Millan y Mikkelsen, 1993). También, el $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ se ha usado como molécula marcadora de eventos de hibridación en películas de oro con ADN adsorbido a la superficie mediante grupos tiol (Steel y cols, 1998). En los últimos años un gran número de compuestos, incluidos tintes y complejos metálicos, han sido probados como indicadores redox en el diseño de biosensores de

ADN, consiguiéndose buenos resultados en la discriminación entre cadenas doble y sencilla. Por ejemplo, se han estudiado como indicadores redox de hibridación distintos complejos de metales de transición (Co, Fe, Os, Ru o Cu) con ligandos como fenantrolinas, bipyridinas, tetrapiridilpirazinas (Armistead y Thorp, 2000; Aslanoglu y cols, 2000; Erdem y cols, 1999; Millan y Mikkelsen, 1993; Welch y Thorp, 1996; Xu y Bard, 1995); y moléculas orgánicas como azul de metileno, equinomicina o epirubicina (Erdem y Ozsoz, 2001; Jelen y cols, 2002; Kara y cols, 2002b; Ozkan y cols, 2002a; Ozkan y cols, 2002c). La naturaleza de las interacciones entre estas moléculas y el ADN puede ser muy variada. Algunas de estas uniones pueden darse covalentemente y de forma irreversible, aunque también hay uniones reversibles de pequeñas moléculas con la doble hélice, las cuales se llevan a cabo predominantemente por medio de tres modelos:

- **Interacción electrostática:** Esta unión se produce entre el esqueleto de azúcar-fosfato que se encuentra cargado negativamente preferentemente con moléculas cargadas positivamente. Se realiza a lo largo de la doble hélice y no posee selectividad entre cadena simple y doble de ADN. Entre las moléculas que presentan este tipo de interacción se encuentran complejos metálicos como $[\text{Co}(\text{fenantrolina})_3]^{3+}$ o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (Millan y Mikkelsen, 1993; Steel y cols, 1998). Aunque es la interacción más genérica, es a su vez la menos específica.
- **Interacción con los surcos del ADN:** Se produce por la unión a los surcos principal y secundario de la doble hélice de pequeños ligandos mediante enlaces de hidrógeno o por interacciones electrostáticas y de Van der Waals. Esta interacción ha sido descrita en el caso de derivados del antraceno, de complejos metálicos o de antibióticos como la neocarzinostatina, cuyas propiedades como indicadores redox no han sido estudiadas; y el ligando Hoechst 33258 que está descrito como indicador redox (Dasgupta y Goldberg, 1985; Kashanian y cols, 2007; Kumar y cols, 2000; Kumar y cols, 1993; Vijayalakshmi y cols, 2000; Wang y cols, 2003).
- **Intercalación:** Es un tipo de unión en la cual una molécula se desliza entre los pares de bases que se encuentran apiladas en la cadena doble de ADN. La planaridad de las moléculas es un factor necesario para que se produzca una intercalación

eficiente. Compuestos que presentan una estructura aromática planar y que poseen 2 ó 3 anillos pueden intercalarse en diversas orientaciones y lugares a lo largo de toda la doble hélice de ADN. Este tipo de unión es la más fuerte de todas. Dentro de los intercaladores típicos el más emblemático ha sido el bromuro de etidio, que ha sido ampliamente empleado para detectar fragmentos de ADN separados mediante electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida. A esta molécula le han seguido otras como naranja de acridina, antraciclinas, viológenos, entre otros (Li y cols, 2005; Mascini y cols, 2001; Pang y Abruna, 2000; Reinhardt y Krugh, 1978).

La consecuencia de estas interacciones entre moléculas con actividad redox y el ADN son muy variadas. En unos casos se observan actividades de tipo nucleásico (Sigman, 1986) que derivan en cortes en la secuencia por los puntos en los que se ha producido la unión. En otros casos pueden cambiar las propiedades redox de las bases implicadas, fundamentalmente guanina (Johnston y cols, 1995; Johnston y Thorp, 1996).

Por otra parte, las respuestas que ofrecen las interacciones entre el ADN y los indicadores redox se basan principalmente en las diferencias en el comportamiento electroquímico de estas moléculas en ausencia y presencia de la doble hélice de ADN. Los cambios electroquímicos que se presentan incluyen cambios de los potenciales formales del indicador redox o la reducción de la corriente de pico resultado de un decrecimiento del coeficiente de difusión aparente después de asociarse con la cadena doble de ADN (Carter y cols, 1989; Chu y cols, 1998).

Por tanto, el desarrollo de nuevos indicadores electroactivos que ofrezcan una mejor diferenciación entre la hebra sencilla y doble de ADN es necesario con el fin de mejorar la sensibilidad y selectividad del dispositivo resultante. Es por esto por lo que existe un gran interés en el diseño de nuevos marcadores de hibridación sensibles y selectivos.

E. Uso de compuestos de base de Schiff en procesos biológicos

A lo largo de esta Introducción se ha puesto de manifiesto las propiedades de los complejos metálicos de base de Schiff como mediadores redox en catálisis homogénea y heterogénea. En las últimas décadas, las aplicaciones en procesos biológicos de estos complejos metálicos con ligandos tetradentados de base de Schiff han aumentado significativamente. Algunos de estos complejos son capaces de unirse de manera reversible al oxígeno molecular y, por este motivo, se han utilizado en estudios de transportadores naturales de oxígeno como son la hemoglobina, la mioglobina o la hemocianina (Chen y cols, 1989; Niederhoffer y cols, 1984); y en estudios sobre las propiedades catalíticas de algunos citocromos, que están involucrados en reacciones biológicas de oxidación. En concreto, algunos complejos de manganeso con ligandos tetradentados de base de Schiff han sido estudiados como modelos miméticos artificiales de enzimas biológicas, como peroxidasa (Law y cols, 1999; Maneiro y cols, 2003), superóxido dismutasa o catalasa (Abashkin y Burt, 2004). Asimismo, complejos de cobalto con este tipo de ligandos han sido ampliamente usados como modelos miméticos de coenzimas como la vitamina B₁₂ o como agentes antimicrobianos (Polson y cols, 1997). A continuación, se citan de manera esquemática otras aplicaciones de este tipo de compuestos.

METAL	LIGANDO	APLICACIÓN	Referencias
Fe (III)	salen	Metaloproteínas artificiales	(Ueno y cols, 2004)
		Interacción con ADN	(Silvestri y cols, 2004)
Mn (III, V)	salen	Modelo mimético de la catalasa	(Abashkin y Burt, 2004)
Cu (II)	salen	Ruptura o daño de ADN	(Lamour y cols, 1999)

Varios autores han estudiado la interacción entre el ADN de alto peso molecular y diferentes complejos de metales de transición con ligandos tetradentados de base de Schiff, mediante técnicas espectroscópicas. En general, la interacción tiene lugar a través de los surcos o bien se intercalan entre los pares de bases de la cadena doble de ADN

(Kashanian y cols, 2007; Liu y cols, 2000b; Vaidyanathan y cols, 2002; Vijayalakshmi y cols, 2006). Sin embargo, no se han encontrado trabajos donde se estudie la interacción de ligandos tetradentados de base de Schiff con el ADN.

En esta tesis se utilizarán ligandos hidroxilados de base de Schiff derivados del salophen que poseen las características estructurales necesarias para que exista una posible interacción con el ADN y, además, sean electroactivos con la finalidad de poder utilizarlos como indicadores redox del evento de hibridación.

F. Tendencias futuras

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en la investigación y en el desarrollo de biosensores de ADN miniaturizados que permitan la determinación simultánea de diferentes secuencias de ADN, los microarrays. Entre las aplicaciones de los microarrays o biochips de ADN están el análisis de la expresión génica, la caracterización de perfiles genéticos, la farmacogenómica o el diagnóstico molecular.

En general, los dispositivos desarrollados deben reunir cualidades tales como una alta calidad de respuesta, simplicidad, rapidez y bajo coste. En la mayoría de los microarrays se utilizan sondas marcadas y se hace uso de detección fluorescente. Sin embargo, cada vez adquieren más importancia los métodos de detección basados en la no utilización de sondas marcadas, como la detección electroquímica, entre otras. La gran sensibilidad de los transductores electroquímicos compatibles con las tecnologías de microfabricación y miniaturización, bajo coste y un equipamiento sencillo hacen que, los dispositivos electroquímicos sean especialmente atractivos a la hora de desarrollar biochips con nuevas aplicaciones. Aunque el principal propósito de la tecnología de chips de ADN ha sido eliminar la PCR de sus protocolos, este objetivo todavía no se ha alcanzado en los chips electroquímicos. La detección de la hibridación en los microarrays de ADN puede ser directa, por medio de fenómenos de oxidación del ADN sobre electrodos o indirectamente mediante indicadores redox activos que se unen fuertemente al ADN de cadena doble. Las tres compañías principales productoras de chips electroquímicos de ADN son GeneOhm Sciences Inc., Toshiba Corp. y Motorola Life

Sciences Inc.

Las tendencias en los nuevos desarrollos tecnológicos es perseguir una mejora de la fiabilidad, sensibilidad e integración (Lab-on-a-chip). Los dispositivos “lab-on-a-chip” permiten miniaturizar e integrar los procesos más complejos de laboratorio, logrando la optimización de protocolos, reducción de los volúmenes de reacción e integración de múltiples ensayos en un único chip. El objetivo final será la integración de la preparación de la muestra, la purificación, almacenamiento, mezcla, detección y otras funciones en el interior del chip con una elevada sensibilidad y selectividad, pero esto todavía está lejos de alcanzarse con muestras complejas. El mercado de los Lab-on-a-chip se encuentra en una fase más temprana que en el caso de los microarrays.

Por último, destacar cómo la unión entre biología y nanotecnología está adquiriendo cada vez más importancia en el diagnóstico molecular y en la bioingeniería (Rosi y Mirkin, 2005). Las características especiales que confieren las nanopartículas de oro a los biosensores ha hecho que exista un gran interés en el desarrollo de biosensores electroquímicos de ADN basados en estos nanomateriales. En concreto, debido a la gran superficie específica que presentan las nanopartículas de oro, se han desarrollado electrodos modificados con nanomateriales para aumentar la cantidad de ADN inmovilizado mejorando así las características del biosensor (Castaneda y cols, 2007). Además, el uso de nanopartículas metálicas contribuye a mejorar la transferencia electrónica entre el indicador redox y la superficie electródica (Bharathi y Nogami, 2001). Por otro lado, los nanomateriales, bien sean metálicos o semiconductores, han sido utilizados como indicadores de hibridación. El grupo de Mirkin ha descrito un novedoso esquema de detección electroquímico de ADN usando oligonucleótidos modificados con nanopartículas (Park y cols, 2002). Las últimas investigaciones se centran en conseguir separar las etapas de hibridación y detección electroquímica, llevándolas a cabo en distintas superficies. Con ello se persigue intentar evitar las adsorciones inespecíficas de las sondas sobre la superficie electródica. En particular, la combinación de esta metodología con la utilización de nanopartículas como superficie de hibridación presentan interesantes ventajas (Garcia y cols, 2008b).

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo general de la tesis es la preparación y posterior caracterización de moléculas bifuncionales que presenten capacidad para formar complejos con iones metálicos, que posean en su estructura grupos funcionales electroactivos y que, además, presenten dominios estructurales con capacidad de interactuar con distintos tipos de biomoléculas. De esta manera, los compuestos sintetizados se utilizarán como mediadores redox en el desarrollo de distintos sensores y biosensores electroquímicos.

De acuerdo con el objetivo a desarrollar, se ha elaborado el siguiente plan de trabajo:

- Se sintetizarán una serie de ligandos tetradentados de base de Schiff por combinación de la *o*-fenilendiamina y el correspondiente isómero del dihidroxibenzaldehído.
- Los compuestos sintetizados se caracterizarán mediante técnicas analíticas como la espectroscopia UV-vis y de fluorescencia, espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), análisis elemental y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). También, se estudiará el comportamiento electroquímico de dichas moléculas en disolventes orgánicos.
- Se estudiará la modificación de electrodos sólidos con estos compuestos mediante distintas metodología como la adsorción directa o la electropolimerización. Así, se caracterizarán las películas de ligandos o complejos de base de Schiff depositadas sobre los electrodos haciendo estudios sobre la estabilidad y sobre la capacidad electrocatalítica de dichos materiales frente a la oxidación de distintas moléculas, mediante voltamperometría cíclica.
- En base a estas propiedades catalíticas, se procederá al diseño y puesta a punto de distintos sensores para la determinación de analitos como hidracina y alcoholes alifáticos de cadena corta.
- Se estudiará la interacción entre estos compuestos y ADN de alto peso molecular (ADN de timo de ternera) en disolución. Para ello se utilizarán técnicas espectroscópicas y electroquímicas. Además, se estudiará la especificidad de la

interacción de las diferentes moléculas en función de la estructura de ADN empleado: ADN de cadena simple y de cadena doble.

- Se procederá al desarrollo de un biosensor para la detección específica de secuencias concretas provenientes de ADN de un microorganismo patógeno causante de enfermedades estomacales, como la bacteria *Helicobacter pylori*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y disoluciones

Los reactivos comerciales utilizados en el presente trabajo fueron todos, al menos, de calidad reactivo analítico. Salvo especificaciones, se utilizaron tal cual, sin ser sometidos a proceso de purificación o refinado alguno.

Reactivos generales

Reactivo	Proveedor
Acetona	Scharlau
Ácido acético glacial	Fluka
Ácido clorhídrico	Fluka
Ácido fosfórico	Fluka
Bicarbonato sódico	Sigma-Aldrich
Cloruro potásico	Sigma-Aldrich
Dimetilformamida (DMF)	SDS
Fosfato sódico dibásico	Riedel-de Häen
Fosfato sódico monobásico	Riedel-de Häen
Hexaciano ferrato (III) de potasio	Sigma-Aldrich
Hexaciano ferrato (II) de potasio	Sigma-Aldrich
Hidróxido potásico	Sigma-Aldrich
Hidróxido sódico	Sigma-Aldrich
Nitrato potásico	Sigma-Aldrich
Perclorato de tetrabutil amonio (TBAP)	Sigma-Aldrich
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	Fluka

Reactivos específicos

Reactivo	Proveedor
2,3-dihidroxibenzaldehído	Sigma-Aldrich
2,5-dihidroxibenzaldehído	Sigma-Aldrich
3,4-dihidroxibenzaldehído	Sigma-Aldrich
1-propanol	Riedel-de Hæn
2-propanol	Riedel-de Hæn
6-mercapto-1-hexanol (MCH)	Sigma-Aldrich
Cloruro de Hexaamín rutenio (III)	Sigma-Aldrich
Etanol	Fluka
Metanol	Fluka
N,N'-Bis(saliciliden)-1,2-fenilendiamina (salophen)	Sigma-Aldrich
n-butanol	Fluka
Nitrato de níquel (II)	Scharlau
o-fenilendiamina	Sigma-Aldrich
Sulfato de hidracina	Merck
ADN de timo de ternera de cadena doble (liofilizado y activado) [dsCT-ADN]	Sigma-Aldrich [D-4522]

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo han sido sintetizados por Sigma-Genosys y suministrados en su forma libre de sales. Las secuencias de bases son las siguientes:

Nombre	Secuencia de bases	M _w
Hp1-SH	5'-HS(CH ₂) ₆ -GCGTTCCAAAGGGCAGGATCATTGA	7929
Hp2 _C	5'-TCAATGATCCTGCCCTTTGGAACGC	7594
Hp2 _{NC}	5'-GACCGTCGAAGTAAAGGGTTCCATA	7715
Hp2 _{MS}	5'-TCAATGATCCTACCCCTTTGGAAGCG	7578

Los oligonucleótidos Hp1-SH y Hp2_C son secuencias de bases complementarias entre sí que corresponden a parte de la secuencia del gen *recA* (69A) de la bacteria *Helicobacter pylori*. Estas secuencias fueron tomadas de la Base de datos del Centro Nacional para la información biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Hp2_{NC} presenta total falta de complementariedad con respecto a Hp1-SH.

Hp2_{MS} presenta falta de complementariedad en una única base (sustitución de G por A) con respecto a Hp1-SH. El punto de mutación se indica en color rojo y en negrita.

Disoluciones

En la preparación de las disoluciones se utilizó agua purificada mediante el sistema Milli-Q y Milli-RO (Millipore) y en algunos casos, autoclavada.

Cuando fue necesario, para desoxigenar las disoluciones se hizo pasar corriente de nitrógeno suministrado por Carburos Metálicos, S. A.

- Disoluciones reguladoras de pH:
 - a. Las disoluciones de tampón fosfato se prepararon a partir de las especies correspondientes del sistema fosfórico-fosfato en función del pH requerido para cada una de ellas (3, 6-8). El valor del pH se ajustó con una disolución concentrada de NaOH o HNO₃.
 - b. La disolución tampón de acético/acetato 0.1 M a pH 5.0 se preparó a partir de ácido acético glacial y acetato sódico. El pH se ajustó con una disolución concentrada de NaOH.
 - c. La disolución tampón Tris-HCl 5.0 mM de pH 7.4 se preparó a partir del sólido puro Tris(hidroximetil)-aminometano. El valor del pH se ajustó con una disolución diluida de HCl.
 - d. La disolución de bicarbonato sódico 0.1 M se preparó disolviendo el sólido puro en agua. Cuando fue necesario, el pH se ajustó con una disolución concentrada

de NaOH.

- e. Disolución de hibridación: disolución de tampón fosfato 10.0 mM / NaCl 0.4 M pH 7.0.
- f. Disolución de desnaturalización: disolución de tampón 10.0 mM Tris-HCl / AEDT 1.0 mM pH 8.0 (Sigma-Aldrich)

- Las disoluciones de los derivados hidroxilados del salophen usadas en este trabajo (2.0-0.5 mM) se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas. Debido a la baja solubilidad de los compuestos en medio acuoso, las disoluciones se prepararon en el correspondiente disolvente orgánico (etanol, dimetilformamida, acetona).
- La disolución madre de hidracina en concentración 1.0×10^{-2} M se preparó a partir del reactivo sólido en el tampón de medida. Las disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución del volumen apropiado de las disoluciones madre con el tampón de medida.
- Las disoluciones madre de metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol y n-butanol en concentración 1.0×10^{-1} M se prepararon en NaOH 0.1 M. Las disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución del volumen apropiado de las disoluciones madre con NaOH 0.1 M.
- La disolución madre de ADN genómico de timo de ternera de cadena doble (dsCT-ADN) se preparó a una concentración de 1.0 mg ml^{-1} en el medio adecuado. La disolución se almacenó alicuotada como máximo durante 2 semanas a -20°C .
- La disolución madre de ADN genómico de timo de ternera de cadena sencilla (ssCT-ADN) se preparó a partir de la desnaturalización de ADN de timo de ternera de cadena doble. Para ello, se preparó una disolución de dsCT-ADN de concentración 1.0 mg ml^{-1} en tampón 10.0 mM Tris-HCl / AEDT 1.0 mM pH 8.0. Esta disolución se mantuvo a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente, se enfrió rápidamente en un baño de hielo. Antes de ser utilizadas, las disoluciones se mantuvieron 5 minutos a 100°C y, posteriormente, se enfriaron rápidamente en un baño de hielo para

asegurar la desnaturalización (Wolfe y cols, 1987).

- Las disoluciones madre de oligonucleótidos tiolados se prepararon a una concentración de 100 μM en tampón fosfato 10.0 mM pH 7.0.
- Las disoluciones madre de oligonucleótidos no tiolados se prepararon a una concentración de 100 μM en tampón fosfato 10.0 mM / NaCl 0.4 M pH 7.0.
- La disolución de hidróxido sódico 0.1 M y de nitrato potásico 5.0 mM se prepararon en agua bidestilada, y cuando fue necesario autoclavada, a partir de los sólidos comerciales.
- La disolución de 6-mercapto-1-hexanol (MCH) 1.0 mM se preparó en agua bidestilada y autoclavada.

2. Materiales

Aparatos

- Para llevar a cabo las medidas electroquímicas se utilizó un analizador electroquímico Autolab PGSTAT30 de EcoChemie con el software GPES 4.9.
- Las medidas espectrofotométricas se hicieron en un Espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700 de SHIMADZU dotado con un sistema de termostatación de cubetas y en un Espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian equipado con un módulo Peltier de control de temperatura en el interior de la cubeta.
- Para inhibir el efecto de las nucleasas de ADN, todas las disoluciones utilizadas en los experimentos con ADN se autoclavaron en un Autoclave Nüve OT012.

- Los análisis de caracterización estructural de los compuestos sintetizados se realizaron en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid, donde se utilizaron los siguientes equipos:
 - Espectrofotómetro FT-IR Bruker. Como soporte se emplearon pastillas de KBr.
 - Analizador elemental CHN Perkin-Elmer 2400.
 - Espectrómetro RMN Bruker AMX-300.

Electrodos y celdas electroquímicas

- Electrodo de trabajo de carbón vítreo de fabricación propia (área geométrica 0.071 cm²). En su construcción se utilizó un tubo de teflon al que se acopló un disco de carbón vítreo de unos 3 mm de diámetro y mercurio para establecer el contacto con el hilo de cobre.
- Electrodo de trabajo de oro de fabricación propia (área geométrica 0.018 cm²), elaborados fundiendo el extremo de un hilo de oro de alta pureza (99,99 %, diámetro 0,5 mm de Good fellow) hasta la formación de una bola que, posteriormente, se selló en vidrio. A continuación, se procedió a pulir el electrodo para eliminar parte del vidrio que sella la bola de oro y dejar una superficie de oro expuesta al exterior. Por último, el contacto entre el hilo de oro y uno de cobre se realizó con tela de carbón.
- El electrodo de referencia utilizado para todas las medidas fue un electrodo de calomelanos (SSCE), de fabricación propia, el cual contenía una disolución saturada de NaCl.
- El electrodo auxiliar utilizado fue un hilo de platino enrollado para aumentar su superficie.
- Para realizar las medidas electroquímicas se utilizaron celdas electroquímicas de tres

bocas de fabricación propia con adaptadores PTFE, que permiten cerrar herméticamente la celda y mantener el flujo de nitrógeno para evitar la entrada de oxígeno. También se utilizaron viales de vidrio con un tapón perforado para introducir los electrodos y permitir el flujo de nitrógeno, con el fin de eliminar el oxígeno disuelto en las disoluciones.

3. Procedimientos

3.1. Síntesis de compuestos en disolución

La síntesis de los isómeros del N,N'-bis(dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (DHsalophen) se llevó a cabo siguiendo el método tradicional en disolución, descrito previamente para uno de los tres compuestos (Charles y cols, 1999).

A. N,N'-bis(2,3-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (2,3-DHsalophen)

A una disolución de 2,3-dihidroxi-benzaldehído (0.5524 g, 4.00 mmol) en metanol (50 ml) se añadió *o*-fenilendiamina (0.2160 g, 2.00 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo, bajo agitación, durante 3 horas. El precipitado obtenido, de color naranja, se filtró y se lavó con metanol hasta que las aguas de lavado fueron incoloras. El rendimiento de la reacción fue del 63 % (0.4410 g).

B. N,N'-bis(2,5-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (2,5-DHsalophen)

A una disolución de 2,5-dihidroxi-benzaldehído (0.5524 g, 4.00 mmol) en metanol (50 ml) se añadió el *o*-fenilendiamina (0.2160 g, 2.00 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo a reflujo, bajo agitación, durante 3 horas. El precipitado obtenido, de color rojo, se filtró y se lavó con metanol hasta que las aguas de lavado fueron incoloras. El rendimiento de la reacción fue del 71 % (0.4972 g).

C. N,N'-bis(3,4-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHsalophen)

A una disolución de 3,4-dihidroxi-benzaldehído (0.5524 g, 4.00 mmol) en metanol (50 ml) se añadió el *o*-fenilendiamina (0.2160 g, 2.00 mmol) y la mezcla de reacción se

mantuvo a reflujo, bajo agitación, durante 3 horas. El precipitado obtenido, de color marrón, se filtró y se lavó con metanol hasta que las aguas de lavado fueron incoloras. El rendimiento de la reacción fue del 65 % (0.4552 g).

3.2. Síntesis de compuestos en estado sólido

A. N,N'-bis(2,3-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (2,3-DHsalophen)

En un matraz de 25 ml se mezclaron 1.00 mmol de *o*-fenilendiamina (0.1080 g) y 2.00 mmol de 2,3-dihidroxi-benzaldehído (0.2762 g). La mezcla sólida se molió a temperatura ambiente hasta conseguir un sólido finamente pulverizado. Posteriormente, la mezcla se calentó hasta 70°C durante 60 minutos. El sólido crudo que se obtuvo se recrystalizó en metanol y se obtuvieron agujas de color naranja. El rendimiento de la reacción fue del 91% (0.3167 g).

B. N,N'-bis(2,5-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (2,5-DHsalophen)

En un matraz de 25 ml se mezclaron 1.00 mmol de *o*-fenilendiamina (0.1080 g) y 2.00 mmol de 2,5-dihidroxi-benzaldehído (0.2762 g). La mezcla sólida se molió a temperatura ambiente hasta conseguir un sólido finamente pulverizado. Posteriormente, la mezcla se calentó hasta 60°C durante 60 minutos. Se obtuvo un sólido rojo que se recrystalizó en metanol. El rendimiento de la reacción fue del 94% (0.3271 g).

C. N,N'-bis(3,4-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHsalophen)

En un matraz de 25 ml se mezclaron 1.00 mmol de *o*-fenilendiamina (0.1080 g) y 2.00 mmol de 3,4-dihidroxi-benzaldehído (0.2762 g). La mezcla sólida se molió a temperatura ambiente hasta conseguir un sólido finamente pulverizado. Posteriormente, la mezcla se calentó hasta 45°C durante 60 minutos. Se obtuvo un sólido marrón que se recrystalizó en metanol. El rendimiento de la reacción fue del 87% (0.3027 g).

3.3. Preparación del $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-(N,N'-Bis(2,5-dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno [Ni-2,5-DHsalophen]}^{2+}$

La preparación del complejo se llevó a cabo "in situ" en disolución mediante la adición de la cantidad correspondiente de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a una disolución 2.0 mM del ligando 2,5-DHsalophen en acetona, considerando que la estequiometría del complejo es 1:1. La formación del complejo se corroboró por el cambio inmediato de color de la disolución del amarillo al rojo. El proceso se completó tras varios minutos bajo agitación. A partir de esta disolución madre, por dilución, se prepararon las disoluciones de menor concentración en el correspondiente disolvente acuoso.

3.4. Pretratamiento de electrodos

Antes de cada experimento, los electrodos de carbón vítreo o de oro se pulieron de modo exhaustivo con pasta de diamante de 1 μm suministrada por Buehler. Una vez pulido, el electrodo se aclaró con agua y acetona. Posteriormente, se sonicó en agua destilada durante 10 minutos para eliminar cualquier resto que pudiese quedar de la pasta de diamante sobre la superficie del electrodo.

A. Activación de electrodos de carbón vítreo

La activación se llevó a cabo por vía electroquímica. El electrodo pulido y limpio se introdujo en una disolución de bicarbonato sódico 0.1 M. Se le aplicaron al electrodo cinco barridos continuos de potencial entre -1.10 V y $+1.60\text{ V}$ a 100 mV s^{-1} (Golabi y Zare, 1999a). Una vez activado, el electrodo se aclaró con agua y se sumergió en una disolución de electrolito soporte y se realizaron barridos cíclicos sucesivos a 100 mV s^{-1} desde -0.2 V a $+0.7\text{ V}$ con el fin de obtener una corriente residual constante.

B. Activación de electrodos de oro

Los electrodos se activaron, en ausencia de oxígeno, en H_2SO_4 0.1 M mediante la aplicación de un potencial de $+2.0\text{ V}$ durante 5 segundos, seguido de barridos cíclicos sucesivos a 4 V s^{-1} entre -0.35 V y $+1.50\text{ V}$ durante 1 minuto. A continuación, se dieron

barridos cíclicos entre -0.35 V y +1.5 V a 100 mV s^{-1} para obtener una superficie de oro lo menos rugosa posible. Después del proceso de activación se dio un barrido cíclico entre 0.0 V y +1.5 V para obtener el voltamperograma característico del oro policristalino. (Sabatani y cols, 1987).

El área microscópica de los electrodos se determinó por integración del área bajo el pico catódico de reducción del óxido de oro en H_2SO_4 0.1 M usando un factor de conversión de $482 \mu\text{C cm}^{-2}$ (Oesch y Janata, 1983). El valor medio encontrado para los electrodos fue de $0.031 \pm 0.003 \text{ cm}^2$. La rugosidad de los electrodos se estimó en 1.7 para los electrodos de oro después del proceso de activación y sin ningún tipo de modificación.

3.5. Modificación de electrodos

A. Modificación de electrodos de carbón vítreo con ligandos DHsalophen mediante electrodeposición

La superficie del electrodo activado se sumergió en una disolución 0.3 mM del ligando correspondiente en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0). A continuación, se cicló el potencial entre -0.20 V y +0.45 V a 100 mV s^{-1} . Tras 15 barridos, el electrodo se aclaró con agua y se almacenó en disolución tampón hasta su uso.

B. Modificación de electrodos de carbón vítreo con ligandos DHsalophen mediante adsorción directa

La superficie del electrodo activado se modificó depositando con cuidado sobre la misma 20 μl de una disolución del ligando correspondiente 1.0 mM en etanol absoluto. Se dejó secar al aire. Posteriormente, la superficie del electrodo se aclaró con agua y acetona y se sumergió en disolución tampón hasta su uso.

C. Modificación de electrodos de carbón vítreo con el complejo [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ mediante electrodeposición

Para la modificación de la superficie de los electrodos de carbón vítreo con el complejo [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺, el electrodo se sumergió en una disolución 0.1 mM del complejo preparado en NaOH 0.1 M. El potencial se cicló entre 0.0 y +1.0 V a 100 mV s⁻¹ durante 100 ciclos. El electrodo modificado se acondicionó mediante barridos de potencial en NaOH 0.1 M entre 0.0 y +0.7 V a 100 mV s⁻¹ durante 12 minutos. Posteriormente, la superficie del electrodo se aclaró con agua y acetona. Tras el acondicionamiento en NaOH 0.1 M, los electrodos modificados con películas electrodepositadas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ presentaron un recubrimiento medio de la superficie de $(11.3 \pm 1.1) \times 10^{-9}$ mol cm⁻².

D. Modificación de electrodos de oro con CT-ADN por adsorción directa

Para estudiar la interacción entre los ligandos DHsalophen y el ADN de timo de ternera (CT-ADN) se modificaron electrodos de oro mediante adsorción directa del material genómico. Este método de inmovilización se utilizó para obtener electrodos de oro modificados con ADN de cadena doble (dsCT-ADN) o de cadena sencilla (ssCT-ADN). El procedimiento que se siguió se basó en el método publicado por Zhao y colaboradores (Zhao y cols, 1997) con algunas modificaciones. Los electrodos limpios y activados se modificaron transfiriendo 10 µl de una disolución 1.0 mg ml⁻¹ de dsCT-ADN o ssCT-ADN sobre la superficie de un electrodo de oro, limpio y activado, durante una hora a temperatura ambiente. Para eliminar posibles restos de ADN no adsorbido, los electrodos modificados se sumergieron durante 30 minutos en agua destilada y autoclavada.

E. Modificación de electrodos de oro con oligonucleótidos sintéticos por quimisorción de tioles

En el caso de electrodos modificados con secuencias tioladas, 10 µl de una disolución 40 µM de la sonda de oligonucleótido derivatizada en el extremo 5' con un grupo hexaalquiltiol, se depositó sobre la superficie del electrodo, se tapó con un tubo eppendorf para evitar la evaporación y se dejó una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, el electrodo modificado se sumergió durante 30 minutos en agua destilada y autoclavada. Para mejorar la sensibilidad y bloquear las regiones no modificadas del electrodo del oro, los electrodos ya modificados con la sonda tiolada se sumergieron en una disolución 1.0 mM de 6-mercapto-1-hexanol (MCH) en agua durante una hora (Herne y Tarlov, 1997). Por último, el electrodo modificado se sumergió durante 30 minutos en agua destilada y autoclavada.

F. Hibridación de la sonda tiolada con distintas secuencias

Los electrodos de oro modificados con la sonda tiolada y MCH, se incubaron con 20 μ l de disoluciones no tioladas de secuencias complementarias, no complementarias y secuencias con una única mutación, todas ellas preparadas en tampón de hibridación fosfato 10 mM / NaCl 0.4 M pH 7.0. Para lograr la hibridación, el electrodo se mantuvo durante una hora a 40°C. Posteriormente, los electrodos se lavaron en agua destilada y autoclavada para eliminar posibles restos de oligonucleótidos unidos inespecíficamente.

G. Acumulación de 3,4-DHsalophen en electrodos modificados con ADN

La acumulación del indicador redox en electrodos modificados tanto con cadenas de oligonucleótidos de 25 pares de bases como con CT-ADN, se llevó a cabo a circuito abierto. Para ello, los electrodos modificados se sumergieron en una disolución 50 μ M de 3,4-DHsalophen preparada en KNO₃ 5.0 mM durante el tiempo óptimo, a temperatura ambiente. A continuación, los electrodos se aclararon con agua destilada y autoclavada, y se reservaron hasta su uso.

3.6. Medidas electroquímicas

A. Cálculo de la capacitancia de los electrodos de carbón vítreo

La capacitancia de los electrodos de carbón vítreo se ha calculado a partir de la separación entre las corrientes residuales anódica y catódica del voltamperograma cíclico del electrodo en electrolito soporte, según el método descrito por Anjo y colaboradores (Anjo y cols, 1989). Para ello se utilizó la expresión:

$$C = \frac{I}{2Av}$$

Donde, C es la capacitancia por área en $\mu\text{F cm}^{-2}$, I es la separación entre las corrientes anódica y catódica al potencial elegido en la zona donde no se aprecia proceso faradaico alguno, v es la velocidad de barrido y A es el área geométrica del electrodo.

B. Cálculo del recubrimiento superficial de material adsorbido sobre la superficie de los electrodos

El recubrimiento superficial de los materiales electroquímicamente activos depositados sobre las superficies de los electrodos se estimó, a partir de los voltamperogramas cíclicos obtenidos, para el electrodo modificado en el electrolito soporte. La integración del área de los picos anódico y catódico permitió calcular la carga correspondiente a la sustancia depositada. El recubrimiento se obtuvo a partir de la expresión:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}$$

Donde, n es el número de electrones implicados en el proceso, F es la constante de Faraday, A es el área geométrica del electrodo y Q es la carga asociada al pico de oxidación o reducción.

C. Cálculo de la constante heterogénea de transferencia de carga (k_s)

La constante heterogénea de transferencia de carga entre los mediadores inmovilizados y el electrodo se estimó utilizando el método de Laviron, a partir del desplazamiento de los potenciales de pico anódico y catódico, en función de la velocidad de barrido (Laviron, 1979). Las medidas ciclovoltamperométricas se llevaron a cabo en el medio adecuado dependiendo del análisis.

D. Cálculo de la constante catalítica de transferencia electrónica entre el sustrato y el mediador inmovilizado

Mediante voltamperometría cíclica se estimó la constante global del proceso de transferencia electrónica entre el mediador inmovilizado y el sustrato, por medio del estudio de la variación de la intensidad de corriente electrocatalítica con la velocidad de barrido (Andrieux y Saveant, 1978).

E. Cálculo del recubrimiento de CT-ADN y sondas tioladas sobre la superficie de los electrodos de oro

La cantidad de CT-ADN adsorbido sobre la superficie del electrodo de oro se estimó a partir de la carga coulombimétrica asociada a la oxidación de las bases adsorbidas obtenida mediante un pico voltamperométrico en torno a +1.0 V en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0). En estos cálculos se utilizó el valor de 5.45 electrones/par de bases (Hinnen y cols, 1981; Pang y cols, 1995). El valor medio calculado por este método fue de $(1.8 \pm 0.5) \times 10^{-10}$ mol cm^{-2} .

El recubrimiento de la superficie de los electrodos modificados con oligonucleótidos tiolados se calculó siguiendo el método cronocoulombimétrico descrito por Tarlov y colaboradores (Steel y cols, 1998). El valor medio obtenido en los experimentos fue $(5.3 \pm 0.2) \times 10^{-12}$ mol de oligonucleótido cm^{-2} .

3.7. Medidas espectrofotométricas

A. Cálculo de la concentración de CT-ADN y oligonucleótidos tiolados

Se empleó la espectrofotometría de absorción UV-visible a 260 nm para determinar la concentración de ADN presente en las disoluciones, aplicando la ley de Lambert-Beer.

Para la determinación de la concentración de CT-ADN se utilizó el coeficiente de extinción (ϵ_{260}) de $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Doty y Rice, 1955), mientras que para la determinación de la concentración de los oligonucleótidos se utilizó la información de los coeficientes de extinción molar proporcionados por la casa comercial para cada uno de ellos.

B. Titulación UV-vis con CT-ADN y los derivados del DHsalophen. Cálculo de la constante intrínseca de unión

Las valoraciones de absorbancia se llevaron a cabo manteniendo la concentración de los ligandos constante (15 ó 20 μM) y variando la concentración de CT-ADN (0-500 μM) en 5.0 mM Tris-HCl (pH 7.4). Antes de llevar a cabo las medidas, las disoluciones se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente. Para evitar interferencias debido a la absorción del CT-ADN, los espectros se obtuvieron manteniendo la misma concentración de CT-ADN en la cubeta de referencia. La constante intrínseca de unión, K_b , para la interacción entre los ligandos y el ADN, se determinó usando la ecuación descrita por Meehan y colaboradores (Meehan y Gamper, 1982):

$$\frac{[\text{CT} - \text{ADN}]}{\varepsilon_o - \varepsilon_l} = \frac{[\text{CT} - \text{ADN}]}{\varepsilon_u - \varepsilon_l} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_u - \varepsilon_l)}$$

Donde, ε_o es el coeficiente de extinción molar obtenido a partir del cociente $A_{\text{obs}}/[\text{DHsalophen}]$ para cada concentración de CT-ADN, ε_l es el coeficiente de extinción molar del ligando libre en ausencia de CT-ADN y ε_u es el coeficiente de extinción molar del complejo formado con el CT-ADN. La representación de $[\text{CT-ADN}]/(\varepsilon_o - \varepsilon_l)$ en función de la concentración de CT-ADN es lineal, y con los valores de la pendiente y la ordenada en el origen puede calcularse la constante intrínseca de unión.

C. Cálculo del porcentaje de efecto hipocrómico

El porcentaje del desplazamiento hipocrómico del máximo de absorción en las titulaciones espectrofotométricas de los ligandos con el CT-ADN se ha calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{H\%} = \frac{\varepsilon_l - \varepsilon_u}{\varepsilon_l} \times 100$$

Donde, ε_l y ε_u han sido definidos previamente.

D. Titulación de fluorescencia con CT-ADN y los derivados del DHsalophen. Cálculo de la constante de Stern-Volmer

De igual modo que en los experimentos descritos en Espectrofotometría de Absorción Molecular, en las titulaciones de fluorescencia la concentración de los ligandos se mantuvo fija (20 ó 50 μM) mientras que la concentración de CT-ADN se varió entre 0-2000 μM . Las medidas se llevaron a cabo en 5.0 mM Tris-HCl (pH 7.4). Antes de llevar a cabo las medidas, las disoluciones se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente. Las constantes de Stern-Volmer, K_{SV} , se determinaron siguiendo la ecuación (Cramb y Beck, 2000):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[\text{CT} - \text{ADN}]$$

Donde I_0 e I representan las intensidades de fluorescencia del compuesto en ausencia y en presencia de CT-ADN, respectivamente. K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, y es el producto de la constante cinética de desactivación y del tiempo de vida natural del estado excitado. La representación de I_0/I en función de la concentración de CT-ADN es lineal; el valor de pendiente corresponde al valor de la constante de Stern-Volmer.

E. Cálculo de la temperatura de desnaturalización del CT-ADN

Para calcular la temperatura de desnaturalización del CT-ADN se midió la variación de la absorbancia a 260 nm en función de la temperatura. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro conectado a un baño termostatzado. Las medidas se llevaron a cabo en 5.0 mM Tris-HCl (pH 7.4). La temperatura en el interior de la cubeta se midió con una sonda de platino en el intervalo de 30-90°C con un gradiente de temperatura de 1°C min⁻¹. La temperatura de desnaturalización se obtiene en el punto de máxima pendiente de la curva, es decir, en el punto de inflexión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

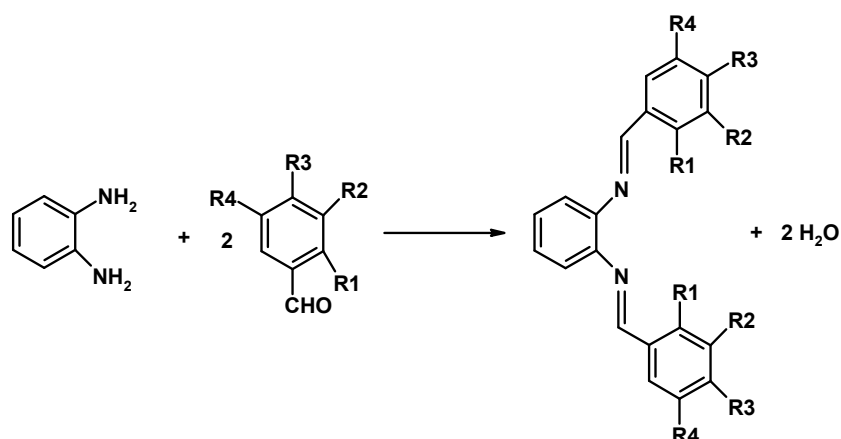
CAPÍTULO I

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LIGANDOS DERIVADOS DEL DHsalophen

1. Síntesis de los ligandos

Uno de los métodos utilizados habitualmente para sintetizar ligandos tetradentados de base de Schiff consiste en hacer reaccionar derivados del salicilaldehído o del 2-piridilaldehído con las correspondientes diaminas en una proporción estequiométrica de 2:1 (mol:mol) (Bailes y Calvin, 1947). Esta reacción de condensación es de gran interés en química orgánica debido al gran número de moléculas que pueden ser generadas y por la capacidad de éstos de formar complejos estables con diferentes cationes metálicos (Hobday y Smith, 1972). En general, estas síntesis se llevan a cabo en metanol o etanol a reflujo durante varias horas, obteniéndose rendimientos del 75-85 %. Recientemente, Bolourtchian y colaboradores (Mirza-Aghayan y cols, 2003) han descrito la preparación sencilla de ligandos de base de Schiff tetradentados en ausencia de disolventes usando radiación de microondas.

Para preparar los ligandos de base de Schiff objeto del presente estudio se han hecho reaccionar diferentes isómeros del dihidroxibenzaldehído (Tabla 3) con la *o*-fenilendiamina, siendo la relación estequiométrica de dos moles de aldehído por cada mol de amina. En la Tabla 3 se muestra la reacción genérica de síntesis, así como las estructuras de los distintos isómeros del dihidroxibenzaldehído utilizados. Los detalles particulares de la síntesis de cada compuesto en disolución y en estado sólido se encuentran en la sección experimental.




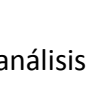
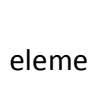
Compuesto	R1	R2	R3	R4
N,N'-Bis(2,3-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (2,3-DHsalophen)	OH	OH	H	H
N,N'-Bis(2,5-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (2,5-DHsalophen)	OH	H	H	OH
N,N'-Bis(3,4-dihidroxi-benciliden)-1,2-diaminobenceno (3,4-DHsalophen)	H	OH	OH	H

Tabla 3: Reacción genérica de síntesis.

Aunque la síntesis del 2,5-DHsalophen ha sido descrita con anterioridad en disolución (Charles y cols, 1999); la preparación de los otros dos ligandos (2,3-DHsalophen y 3,4-DHsalophen) se describe por primera vez en este trabajo. Asimismo, es la primera vez que se describe la preparación de estos compuestos utilizando procedimientos de química limpia; es decir, reacción en estado sólido en ausencia de disolventes. Este último método presenta ventajas frente a los procedimientos tradicionales de síntesis, como son la reducción en el tiempo de reacción, la disminución en el gasto de disolventes y en la generación de residuos, y el aumento de los rendimientos de las reacciones (Tanaka y Toda, 2000). A título de comparación, los rendimientos obtenidos mediante la síntesis en estado sólido son mayores (aproximadamente 90%) que los obtenidos en las síntesis en disolución (aproximadamente 70%). Algunos autores ya han descrito estas diferencias en los rendimientos obtenidos en la síntesis de bases de Schiff por métodos tradicionales o mediante el uso de radiación microondas en ausencia de disolventes (Gangani y Parsania, 2007).

Los compuestos obtenidos a partir de la síntesis en estado sólido mostraron una moderada solubilidad en diversos disolventes como la dimetilformamida, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido, etanol y metanol. En medio acuoso la solubilidad de los tres ligandos sintetizados es mucho menor, siendo ésta, en el mejor de los casos, inferior a 500 μM a pH 7.0.

Los resultados experimentales de análisis elemental de estos compuestos se muestran en la Tabla 4 y presentan una buena correspondencia con los datos calculados para la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, en el caso del 2,3-DHsalophen y 3,4-DHsalophen, y para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en el caso del 2,5-DHsalophen.

COMPUESTO	Sínt. Disolución	Sínt. Sólida	% Calc. (Encontrado)		
	Rendimiento (%)	Rendimiento (%)	C	H	N
2,3-DHsalophen 	63	91	68.9 ^a (68.5)	4.6 ^a (4.6)	8.1 ^a (8.1)
2,5-DHsalophen 	71	94	65.6 ^b (64.7)	4.9 ^b (5.0)	7.7 ^b (7.6)
3,4-DHsalophen 	65	87	68.9 ^c (67.8)	4.6 ^c (4.6)	8.1 ^c (7.9)

^{a,c} Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$

^b Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Tabla 4: Rendimientos y análisis elemental de los compuestos sintetizados.

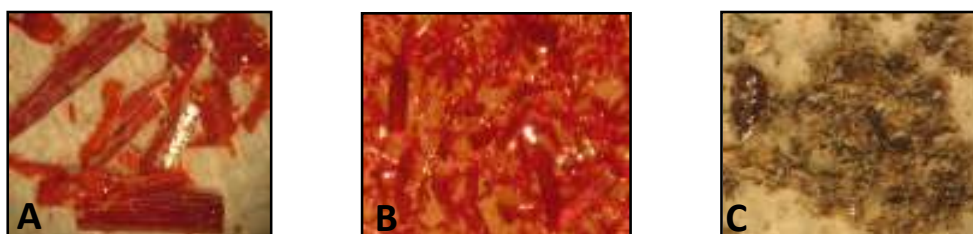


Imagen 1: Micrografías obtenidas para (A) 2,3-DHsalophen, (B) 2,5-DHsalophen y (C) 3,4-DHsalophen sintetizados en ausencia de disolventes y recristalizados en metanol.

2. Caracterización espectroscópica de los ligandos sintetizados

Dada la poca solubilidad en agua de los ligandos, sus espectros de UV-visible se llevaron a cabo en disoluciones de concentración 10^{-4} mol l⁻¹ en metanol. En los tres casos aparece una banda de absorción intensa entre 270 y 290 cm⁻¹, dependiendo del compuesto (Tabla 5), que puede asociarse a transiciones electrónicas del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ entre los electrones π conjugados presentes en los anillos aromáticos de las moléculas.

COMPUESTO	UV-vis (metanol) λ (nm)	¹ H-RMN ((CD ₃) ₂ SO, ppm)		IR (KBr, cm ⁻¹)			
		CH=N	Ar-OH	$\nu_{C=N}$	ν_{Ar-O-H}	$\nu_{C=C}$	$\nu_{C=O}$
2,3-DHsalophen	283	8.88 (s, 2H)	12.90 (s, 2H ²) 9.22 (s, 2H ³)	1612	1276	1481	----
2,5-DHsalophen	241, 274, 352	8.80 (s, 2H)	12.10 (s, 2H ²) 9.06 (s, 2H ⁵)	1617	1280	1467	----
3,4-DHsalophen	293	8.86 (s, 2H)	9.41 (s, 2H ³) 9.23 (s, 2H ⁴)	1614	1294	1484	----
Salophen				1604	1280	1450	----
2,3-dihidroxibenzaldehído		----	10.05 (s, 2H ²) 9.82 (s, 2H ³)	----	1250*	1480*	1670*
2,5-dihidroxibenzaldehído		----	10.01 (s, 2H ²) 9.16 (s, 2H ⁵)	----	1280*	1490*	1690*
3,4-dihidroxibenzaldehído		----	9.70 (s, 2H ³) 9.51 (s, 2H ⁴)	----	1290*	1450*	1675*

* AIST: Integrated Spectral Database System of Organic Compounds

Tabla 5: Datos de la caracterización espectroscópica de los compuestos obtenidos mediante síntesis en sólido, del ligando comercial salophen y de los dihidroxibenzaldehídos usados como reactivos en la síntesis.

Además, la caracterización estructural de los ligandos se llevó a cabo mediante espectroscopia IR y de RMN de ¹H. Para interpretar los datos obtenidos mediante espectroscopia IR, se han comparado los espectros de IR de los ligandos de base de Schiff

sintetizados y purificados con los espectros de IR de los reactivos de partida (Tabla 5) y el espectro del ligando N,N'-Bis(saliciliden)-1,2-fenilendiamina (salophen) comercial (Figura 4). En primer lugar, se puede observar la desaparición de la banda de absorción característica de los distintos isómeros dihidroxibenzaldehídos debida a la tensión del grupo C=O ($1670-1690\text{ cm}^{-1}$) en los espectros de los productos. Además, en todos los casos, aparece la banda característica de este tipo de ligandos en el intervalo entre $1605-1630\text{ cm}^{-1}$. Esta banda se puede atribuir a la vibración de tensión del grupo azometino (C=N) (Popovic y cols, 2001). La presencia de esta banda junto con la ausencia de la banda de absorción de la tensión del grupo C=O presente en los reactivos de partida (Tabla 5), nos permite afirmar que los productos obtenidos en la síntesis son los que se buscaban y no hay productos intermedios o contaminación con los reactivos (Pretsch, 1998). En la Tabla 5 se incluyen otras bandas de absorción significativas.

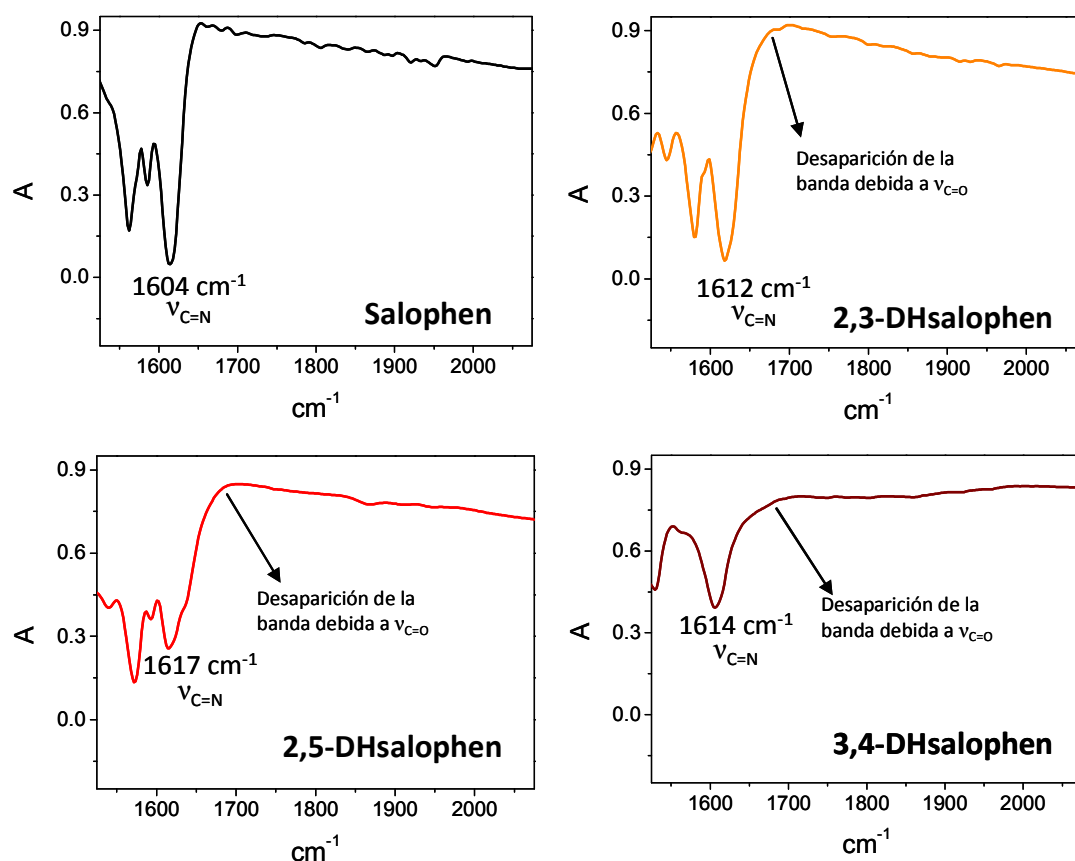


Figura 4: Espectros IR (KBr, cm^{-1}) del ligando salophen comercial y de los isómeros del DHsalophen sintetizados

Los espectros de RMN de ^1H en dimetilsulfóxido deuterado mostraron concordancia con la estructura molecular de los compuestos y se han podido asignar las señales correspondientes a los protones más característicos. A modo de ejemplo, en la Figura 5 se muestra el espectro de RMN para el 2,3-DHsalophen. Como se puede observar, las señales para los protones de los grupos hidroxilo aparecen en forma de singlete en el intervalo entre 9-12 ppm. En el caso del 2,3-DHsalophen y 2,5-DHsalophen estos valores están desplazados a campo bajo, en comparación con los valores de los correspondientes dihidroxibenzaldehídos precursores, como consecuencia de la formación del enlace de hidrógeno intramolecular ($\text{O-H}\cdots\text{N}$) entre el hidroxilo en posición α , respecto al grupo azometino, y el N (Popovic y cols, 2001). Sin embargo, para el isómero con el grupo hidroxilo en posición β (3,4-DHsalophen) este desplazamiento es menor, puesto que el aumento en la distancia entre los grupos funcionales impide la formación del enlace de hidrógeno intramolecular. Además, se observa una señal singlete atribuible al protón del grupo azometino, cuyo desplazamiento para cada isómero se recoge en la Tabla 5 (Charles y cols, 1999).

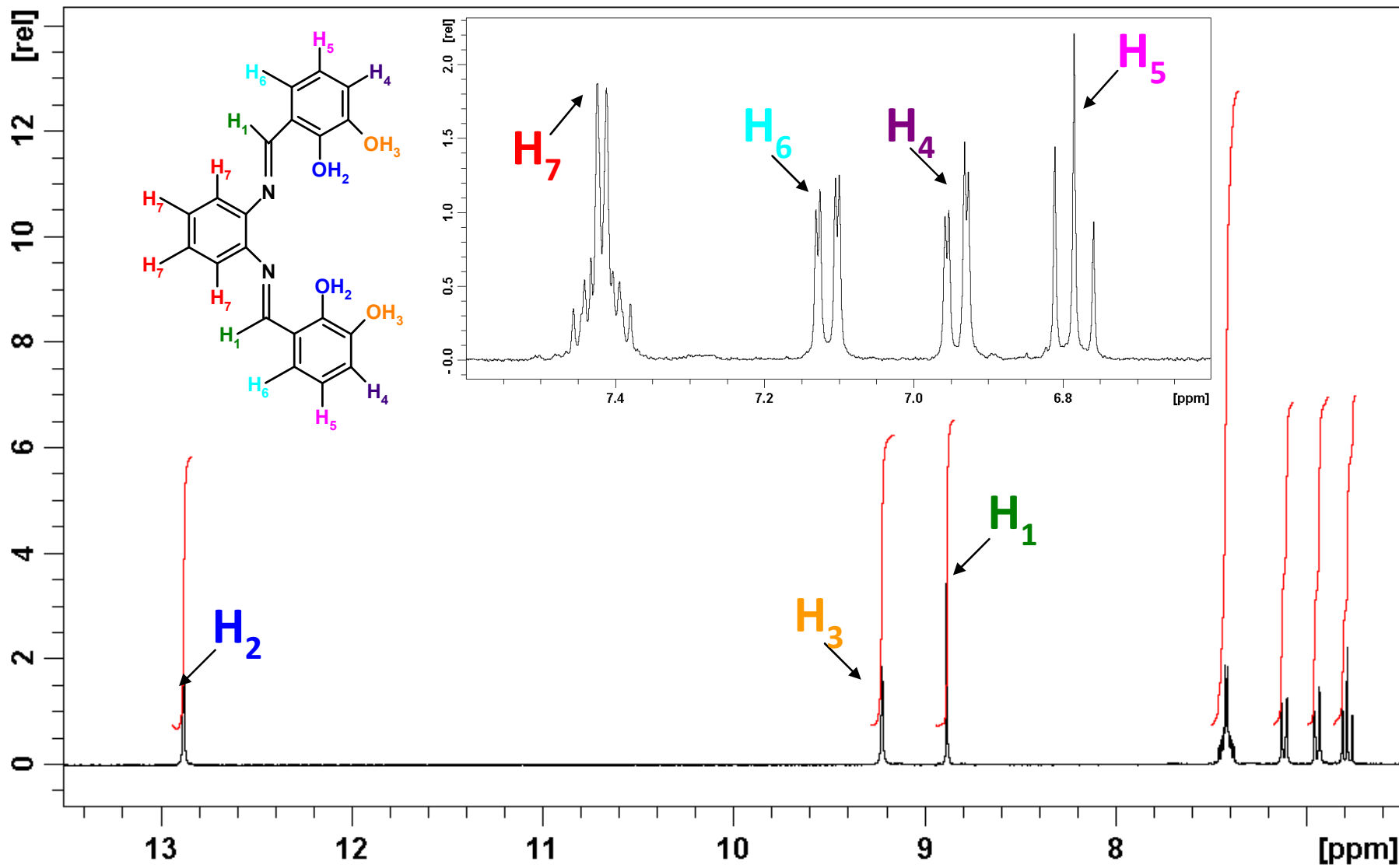


Figura 5: Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂SO, ppm) del compuesto 2,3-DHsalophen.

3. Caracterización electroquímica en medio no acuoso

El estudio de la actividad redox de estos ligandos sintetizados es importante puesto que uno de los objetivos de esta tesis es utilizar estas moléculas como mediadores redox en el desarrollo de sensores y biosensores con detección electroquímica. Nuevamente, debido a su baja solubilidad en medio acuoso, la caracterización electroquímica de los ligandos se llevó a cabo en un disolvente aprótico como es la dimetilformamida (DMF), utilizando perclorato de tetrabutilamonio (TBAP) 0.1 M como electrolito. Se prepararon disoluciones 1.0 mM de los diferentes ligandos y la voltamperometría cíclica se llevó a cabo dando primero un barrido anódico hasta +1.0 V ó +1.5 V (dependiendo del isómero) y un posterior barrido catódico de vuelta hasta -2.0 V, a 100 mV s^{-1} en un electrodo de carbón vítreo recién pulido y sin activación previa. Los resultados para los diferentes isómeros se muestran en la Figura 6.

En términos generales, la respuesta voltamperométrica de estos isómeros es muy parecida, aunque la presencia de los grupos hidroxilo en posiciones diferentes conlleva algunas diferencias significativas, sobre todo en los barridos catódicos.

En el caso del 2,3-DHsalophen, el primer barrido anódico muestra un proceso redox caracterizado por una onda de oxidación con un pico de potencial (P1) bien definido a +0.776 V. En el barrido de vuelta se puede observar la correspondiente onda de reducción asociada con un pico de potencial (P2), también con buena definición, a +0.390 V.

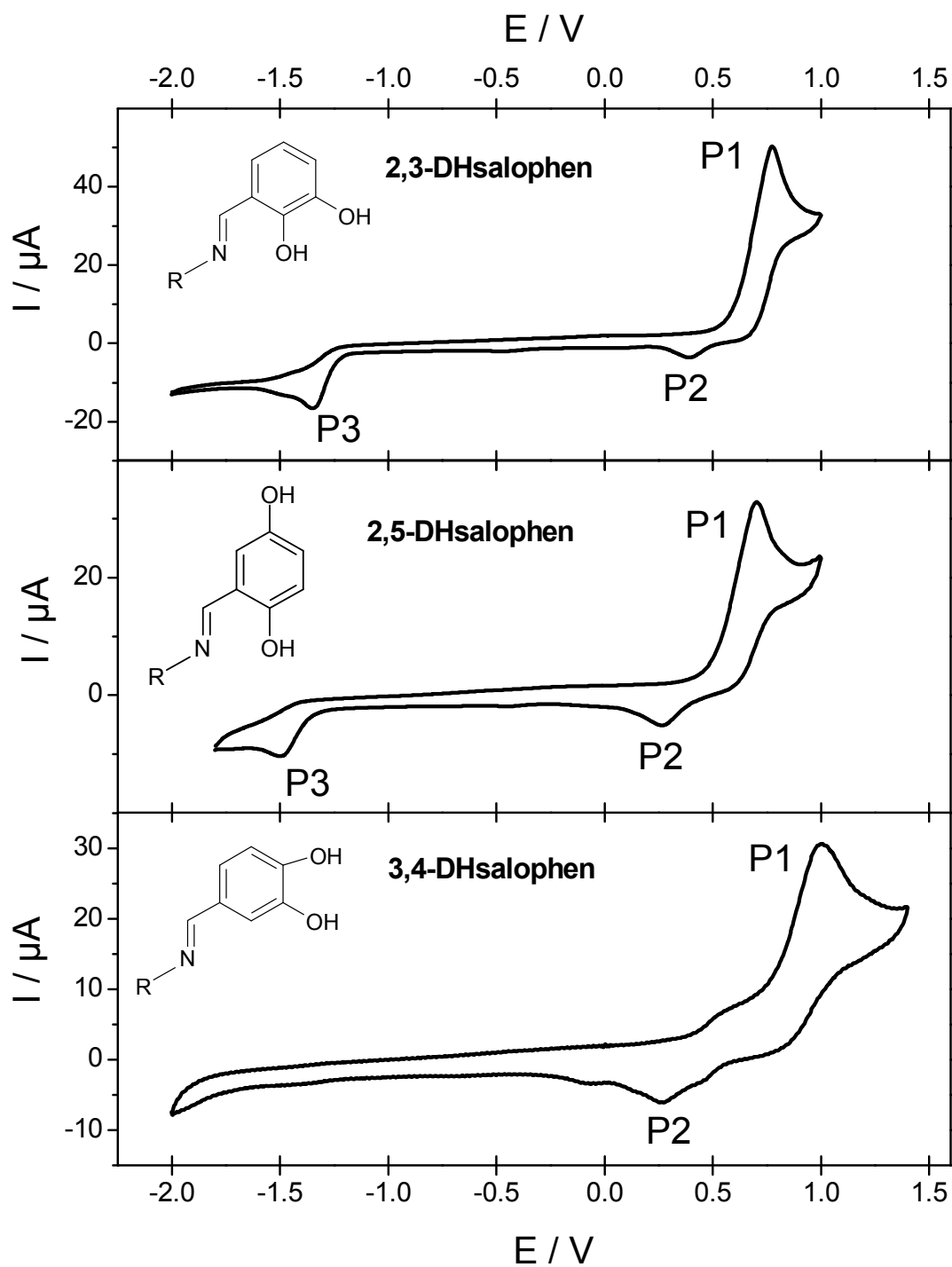
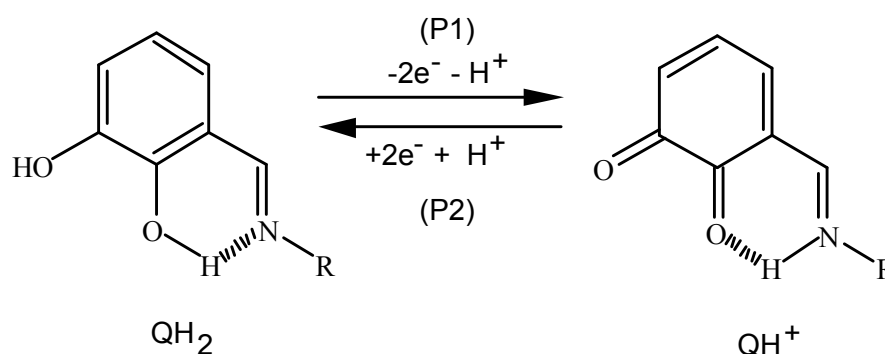


Figura 6: Voltamperogramas cíclicos de los isómeros del DHsalophen (1.0 mM) en DMF/0.1 M TBAP a 100 mV s^{-1} .

El voltamperograma cíclico del 2,5-DHsalophen se llevó a cabo en las mismas condiciones y se obtuvieron resultados muy similares a los descritos para el 2,3-DHsalophen, con algunas variaciones en los valores de los potenciales de pico. De acuerdo con el comportamiento de las *orto*- y *para*-quinonas en medios no acuosos (Eggins, 1969) los picos P1 y P2 se pueden asociar al proceso de oxidación/reducción del grupo funcional quinona/hidroquinona, de acuerdo con el siguiente esquema:



Esquema 2: Proceso de oxidación-reducción del grupo funcional quinona/hidroquinona

El mecanismo asociado al proceso anterior supone la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno del grupo imina y el hidrógeno del grupo hidroxilo adyacente. Este mecanismo ha sido descrito con anterioridad para el 2,5-DHsalophen (Charles y cols, 1999).

Los altos valores de la diferencia de potenciales de pico, ΔE_p , ($\Delta E_p \gg 60$ mV) y del cociente i_{P1}/i_{P2} ($i_{P1}/i_{P2} \gg 1$) sugieren que para estas moléculas, la oxidación del par hidroquinona/quinona presenta complicaciones cinéticas asociadas a la transferencia de carga y a posibles procesos químicos que pueden afectar a la estabilidad de las formas oxidada y reducida. En definitiva, el proceso redox asociado a las ondas P1 y P2 presenta gran irreversibilidad electroquímica y química.

A potenciales muy negativos, los ligandos 2,3-DHsalophen y 2,5-DHsalophen muestran una segunda onda de reducción (P3) irreversible con un potencial de pico de -1.350 V y -1.501 V, respectivamente. Esta onda está asociada al proceso de reducción del grupo azometino de los ligandos donde están involucrados dos electrones. Este

proceso ha sido descrito para otros ligandos de base de Schiff como el salen y el salophen en acetonitrilo y supone una reacción de auto-protonación como consecuencia de la transferencia protónica desde la especie oxidada inicial a los intermedios de reducción (Isse y cols, 1997a; Isse y cols, 1997b).

En el caso del 3,4-DHsalophen, el proceso de oxidación debido al grupo funcional hidroquinona (P1) tiene lugar a potenciales más positivos que los observados para los otros dos compuestos (Tabla 6). Además, a diferencia de los isómeros 2,3-DHsalophen y 2,5-DHsalophen, la voltamperometría cíclica del 3,4-DHsalophen no muestra ningún proceso de reducción del grupo azometino (P3) en el intervalo de potenciales en el que se ha trabajado. Probablemente tenga lugar a potenciales más negativos. Estas diferencias entre la electroquímica del ligando 3,4-DHsalophen y la de los otros dos ligandos pueden explicarse teniendo en cuenta la distancia que existe entre el nitrógeno del grupo azometino y el grupo hidroxilo más cercano. Este hecho impide la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares y, como consecuencia, las limitaciones cinéticas son mayores para los procesos de oxidación (P1) y reducción (P3).

Finalmente, la presencia del grupo azometino en las proximidades del grupo hidroquinona/quinona puede condicionar las propiedades redox de estos compuestos, favoreciendo la generación de formas oxidadas reactivas susceptibles de combinarse químicamente con la superficie del electrodo de carbón vítreo, generándose películas electroactivas sobre la superficie. Este proceso podría ser equivalente al que se observa en la oxidación de los isómeros del dihidroxibenzaldehído, moléculas precursoras de estos ligandos (Pariente y cols, 1996).

COMPUESTO	E_{P1} (V)	E_{P2} (V)	ΔE_P (V)	I_{P1}/I_{P2}	E_{P3} (V)
2,3-DHsalophen	+ 0.776	+ 0.391	+ 0.385	8.9	-1.350
2,5-DHsalophen	+ 0.703	+ 0.265	+ 0.438	5.5	-1.501
3,4-DHsalophen	+ 1.003	+ 0.254	+ 0.749	3.2	----

Tabla 6: Potenciales de los distintos procesos redox de los ligandos sintetizados.

CAPÍTULO II

MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO CON ISÓMEROS DEL DHsalophen

El hecho de que los diferentes isómeros del DHsalophen presenten propiedades redox abre la posibilidad de que estas moléculas puedan ser electrodepositadas sobre superficies de carbón vítreo con diferente grado de activación, generando películas electroactivas útiles para ser aplicadas en el diseño de sensores o biosensores. Además, el marcado carácter planar de sus estructuras sugiere, también, la posibilidad de generar estas superficies electroactivas por adsorción directa de estos ligandos sobre la superficie del electrodo. Estas posibilidades son las que se van a estudiar en el presente capítulo.

Antes de proceder a la modificación de la superficie de los electrodos de carbón vítreo se llevó a cabo un tratamiento de activación previo, con el objetivo de obtener un sustrato con la superficie libre de impurezas indeseables y dotada de una estructura química reproducible. Junto con el pulido mecánico de la superficie electródica, la activación electroquímica es uno de los pretratamientos más usados. Los electrodos de carbón vítreo activados electroquímicamente suelen tener una superficie más reproducible, a la vez que se mejora la transferencia electrónica y algunas adsorciones específicas. La activación electroquímica puede llevarse a cabo tanto en medio ácido (H_2SO_4) como en medio básico (NaOH , HCO_3^-). En ambos casos, la oxidación del electrodo genera sobre la superficie grupos funcionales oxigenados como hidroxilos, carboxilos y carbonilos que, en muchos casos, favorecen la interacción de las moléculas utilizadas como modificadores con la superficie del electrodo. En función del porcentaje que exista de estos grupos sobre la superficie electródica, esta será más o menos activa. De hecho, cuando la activación se realiza en medio básico el porcentaje de estos grupos funcionales oxidados es ligeramente inferior respecto a cuando la activación se lleva a cabo en medio ácido. Esto supone una ventaja frente a la activación en medio ácido puesto que las superficies activas generadas no presentan grandes incrementos de la corriente capacitativa (Anjo y cols, 1989; Dekanski y cols, 2001; McCreery, 1990).

Los grupos funcionales generados sobre la superficie del electrodo como consecuencia de la activación, además de favorecer la transferencia de carga, son capaces de actuar como mediadores redox en procesos electrocatalíticos (Engstrom, 1982). Sin embargo, las superficies de carbón vítreo sólo activadas no muestran respuestas electrocatalíticas estables y reproducibles, por lo que después de la activación es necesario inmovilizar sobre la superficie del electrodo un mediador redox de forma estable y que mejore sensiblemente la reproducibilidad. Con estos antecedentes, se decidió limpiar y regenerar la superficie de los electrodos de carbón vítreo mediante un proceso mixto que implica un paso previo de pulido mecánico de la superficie y una activación electroquímica en medio ligeramente básico.

Una vez activado el electrodo, este se acondicionó mediante el barrido continuo de potencial en el electrolito soporte hasta que los voltamperogramas cíclicos obtenidos fueron estables. El voltamperograma final obtenido se comparó con el del electrodo pulido sin activar, en electrolito soporte. En ambos casos, las imágenes obtenidas mostraban una total ausencia de procesos faradaicos. Además, se calculó la capacitancia para ambos electrodos, según el método descrito en la parte experimental (Anjo y cols, 1989). Como cabe esperar, la capacitancia observada tras la activación ($70 \mu\text{F cm}^{-2}$) es mayor que la obtenida con los electrodos no activados ($59 \mu\text{F cm}^{-2}$), aunque se mantiene en unos límites bajos, compatibles con respuestas electrónicas altas sobre corrientes de fondo razonablemente bajas. Por tanto, los voltamperogramas obtenidos tras el proceso de activación se utilizaron como diagnóstico del estado de los electrodos y de su viabilidad para ser empleados en los procesos de modificación posteriores.

La modificación de los electrodos de carbón vítreo, previamente pulidos y activados, se llevó a cabo mediante dos estrategias distintas: electrodeposición y adsorción directa.

1. Electrodeposición de los derivados del DHsalophen sobre electrodos de carbón vítreo en medio acuoso

En este primer método, los ligandos sintetizados se electrodepositaron sobre la superficie de los electrodos activados, mediante la aplicación de barridos de potencial entre -0.2 V y +0.5 V en una disolución que contenía el correspondiente isómero a pH 7.0. Debido a la baja solubilidad de los compuestos en medio acuoso a pH neutro, la concentración de los compuestos estudiados no pudo ser superior a 0.4 mM. En el caso del 2,5-DHsalophen, el potencial se cicló entre -0.2 V y + 0.35 V y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7A. Desde el primer barrido, hacia potenciales positivos, se observa un par redox bastante bien definido con un potencial formal de +0.13 V. Al continuar ciclando el potencial, se observa como las corrientes de pico, tanto anódica como catódica, decrecen hasta que después de cinco minutos se estabilizan. Pasado este tiempo, se extrajo el electrodo de la disolución con 2,5-DHsalophen, se lavó y se introdujo en una disolución tampón de fosfato a pH 7.0. Al realizar la voltamperometría cíclica entre -0.1 V y +0.3 V, se observa la imagen bien definida del proceso redox con un potencial formal de +0.14 V, una relación de intensidades de pico anódico/catódico igual a la unidad y una separación de potenciales de pico de 10 mV (Figura 7B).

Para los isómeros 2,3-DHsalophen y 3,4-DHsalophen, cuyos grupos hidroxilo están en posición *orto*, el proceso de electrodeposición seguido fue muy similar, obteniéndose electrodos modificados con películas electroactivas cuya respuesta en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) fue muy parecida a la de los electrodos modificados con películas derivadas del 2,5-DHsalophen con ligeras variaciones en los potenciales formales.

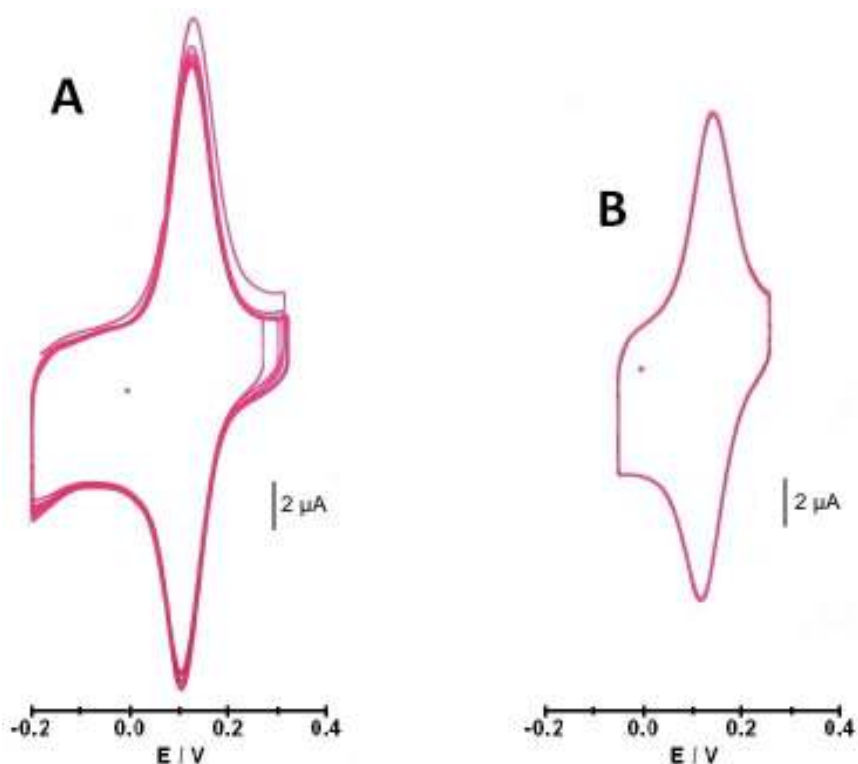


Figura 7: (A) Voltamperogramas cíclicos de una disolución 0.3 mM de 2,5-DHsalophen en tampón fosfato 0.1M (pH 7.0) en un electrodo de carbón vítreo activado. (B) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con una película electroactiva derivada del 2,5-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0). Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .

Los resultados obtenidos en los experimentos de barrido de potencial sugieren que las películas electroactivas generadas sobre la superficie del electrodo no pueden adscribirse totalmente a un proceso de electrodeposición similar al descrito para los dihidroxibenzaldehídos, que son las moléculas precursoras de estos ligandos (Pariante y cols, 1994; Pariante y cols, 1996). Este razonamiento se fundamenta en que las corrientes de pico anódico y catódico no crecen con los barridos cíclicos sucesivos. Como se observa en la Figura 7, tras el primer barrido cíclico la corriente de pico disminuye y tras cinco o seis barridos se estabiliza. Este resultado parece indicar que el material electroactivo se adsorbe o precipita sobre la superficie del electrodo al aplicar los barridos de potencial.

La hipótesis de la adsorción directa como mecanismo de modificación predominante se fundamenta en dos circunstancias. En primer lugar, la presencia en la estructura de la molécula de anillos bencénicos unidos mediante grupos azometino, implica una cierta planaridad para estos ligandos. En segundo lugar, las disoluciones acuosas de estas moléculas no son muy estables incluso a concentraciones menores de 0.4 mM. En un buen número de experimentos se aprecia la aparición de una ligera turbidez en la disolución durante el tiempo de duración del experimento de barrido de potencial. Todas estas circunstancias indican que la modificación de los electrodos por simple adsorción directa puede ser una alternativa eficaz para llevar a cabo el proceso de modificación de la superficie del electrodo de carbón vítreo con películas electroactivas derivadas de los isómeros del DHsalophen.

2. Modificación de electrodos de carbón vítreo con películas de los derivados DHsalophen directamente adsorbidas

Una ventaja adicional de la modificación mediante adsorción directa estriba en que al ser mayor la solubilidad de estos compuestos en etanol, metanol o acetona, se pueden utilizar disoluciones más concentradas para promover el proceso de modificación.

Para llevar a cabo la adsorción directa, una pequeña alícuota (20 μ l) de una disolución 1.0 mM del correspondiente isómero en etanol, se depositó con cuidado sobre la superficie pulida y activada del electrodo y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Posteriormente, la superficie del electrodo se aclaró cuidadosamente con agua y acetona. La respuesta electroquímica de los electrodos modificados se estudió mediante voltamperometría cíclica en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) en ausencia de compuesto. El potencial se barrió entre -0.2 V y +0.4 V a una velocidad de 100 mV s⁻¹, observándose, en todos los casos, que los electrodos modificados muestran una actividad redox próxima a la que se esperaría para un sistema reversible inmovilizado sobre la superficie del electrodo (Figura 8).

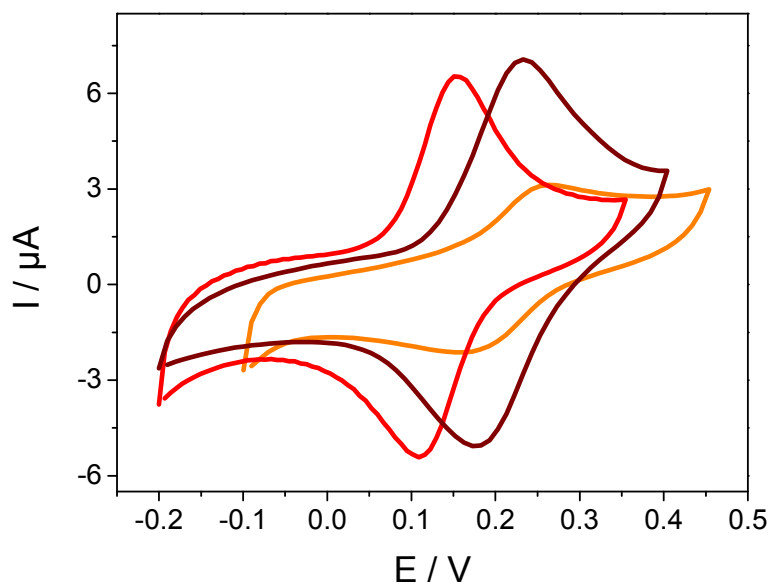


Figura 8: Voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados por adsorción directa con películas derivadas del 2,3-DHsalophen (—), 2,5-DHsalophen (—) y 3,4-DHsalophen (—) en tampón fosfato 0.1M (pH 7.0) a 100 mV s^{-1} .

Este comportamiento electroquímico se puede asignar a la presencia de grupos funcionales quinona/hidroquinona presentes en la estructura de las moléculas adsorbidas. En la Tabla 7 se recogen los potenciales de pico anódico y catódico, los potenciales formales, las diferencias de potenciales de pico y las relaciones de intensidades de corriente de pico anódica y catódica, obtenidos para los electrodos modificados con películas derivadas de los isómeros del DHsalophen.

COMPUESTO	E_{pa}/V	E_{pc}/V	E°/V	$\Delta E_p/V$	I_{pa}/I_{pc}
2,3-DHsalophen	+0.263	+0.152	+0.208	+0.111	0.9
2,5-DHsalophen	+0.151	+0.109	+0.130	+0.042	1.1
3,4-DHsalophen	+0.233	+0.173	+0.203	+0.060	1

Tabla 7: Valores de los potenciales de pico anódico y catódico, potencial formal, diferencia de potenciales de pico y relación de intensidades de corriente de pico anódica y catódica, obtenidos en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) a 100 mV s^{-1} para los electrodos modificados con películas derivadas de los isómeros DHsalophen.

A la vista de los potenciales formales correspondientes al sistema redox para cada uno de los isómeros estudiados, se puede afirmar que la posición de los grupos hidroxilo en la molécula tiene una cierta influencia en el valor del potencial de pico. De manera que, el isómero con los grupos hidroxilo en posición *para* (2,5-DHsalophen) es más fácil de oxidar que los isómeros con los grupos hidroxilo en *orto* (2,3-DHsalophen y 3,4-DHsalophen). La diferencia entre los potenciales de pico, ΔE_p , no es muy grande aunque no llega a ser cero, como predice la teoría que explica el comportamiento voltamperométrico de especies adsorbidas a la superficie del electrodo (Bard, 2001). La diferencia observada entre los potenciales de pico anódico y catódico sugiere que en todos los sistemas hay ciertas limitaciones para la transferencia de carga. Estas limitaciones son más evidentes en los electrodos modificados con películas adsorbidas de 2,3-DHsalophen, en las que ΔE_p es casi el doble que en los otros dos casos.

Los voltamperogramas cíclicos, recogidos utilizando electrodos modificados con los distintos isómeros a diferentes velocidades de barrido (entre 10 y 400 mV s^{-1}), mostraron que la corriente de pico era proporcional a la misma en todo el intervalo de velocidades estudiado, lo que es característico de materiales electroactivos confinados sobre la superficie del electrodo. Sin embargo, a velocidades mayores de 0.500 V s^{-1} , la relación entre la corriente de pico y la velocidad de barrido deja de ser lineal, lo que sugiere la existencia de limitaciones cinéticas asociadas con el proceso de transferencia de electrones entre los materiales electrodepositados y la superficie del electrodo de carbón vítreo.

Por otra parte, en todos los casos el cociente entre las intensidades de pico anódico y catódico es próximo a la unidad, lo que sugiere que el sistema es químicamente reversible; es decir, las formas oxidada y reducida son igualmente estables en el medio de reacción y en el tiempo de duración del experimento.

Después de la caracterización de la respuesta voltamperométrica de los mismos, se procedió a estudiar la estabilidad de dicha respuesta en función del tiempo en condiciones de barrido continuos de potencial. Como magnitud marcadora de la cantidad de material electroactivo adsorbido sobre la superficie se empleó el recubrimiento superficial

obtenido mediante integración de las ondas anódicas del correspondiente voltamperograma cíclico, tal y como se explica en la parte experimental. Con el objeto de comparar los resultados obtenidos con los tres isómeros, se utilizaron los recubrimientos relativos (Γ/Γ^0), donde Γ^0 es el recubrimiento observado durante el primer barrido y Γ es el recubrimiento obtenido para cada barrido subsiguiente. En la Figura 9, se muestra el decaimiento del recubrimiento relativo en función del tiempo, en condiciones de barrido continuo entre -0.20 V y $+0.45$ V a 100 mV s^{-1} en disolución tampón de fosfato 0.1 M a pH 7.0 . La estabilidad de las películas adsorbidas es significativamente dependiente de la posición de los grupos hidroxilos en la molécula. Para los isómeros 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen se observa una caída significativa durante los primeros minutos, aunque la velocidad de caída disminuye gradualmente con el tiempo. La pérdida de electroactividad es del 40% tras 10 minutos de barridos continuos. Tras esta pérdida inicial de material electroactivo, se puede observar que después de cuatro horas de barrido continuo, la pérdida es inferior al 5%.

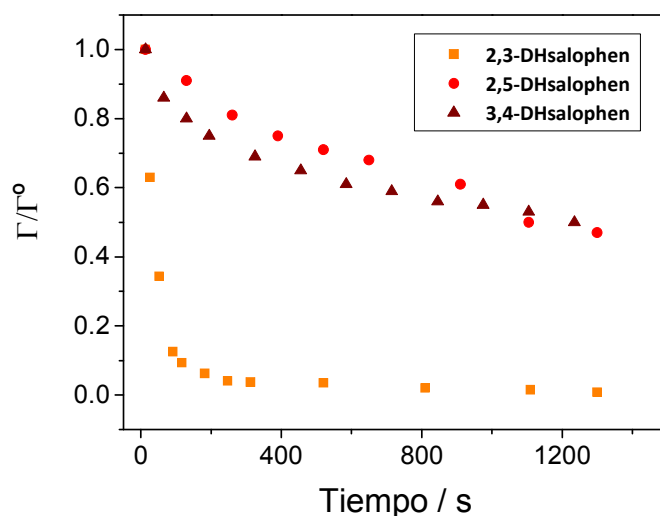


Figura 9: Variación del recubrimiento relativo (Γ/Γ^0) de la superficie de un electrodo de carbón vítreo modificado con 2,3-DHsalophen, 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen en función del tiempo en el que se han aplicado barridos continuos de potencial, en una disolución tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0). La velocidad de barrido fue 100 mV s^{-1} .

Estos resultados sugieren que la caída inicial puede deberse al material que está adsorbido de manera más débil sobre la superficie del electrodo y, por tanto, es más fácil su pérdida. A efectos de comparación, se ha hecho una estimación del área de los ligandos DHsalophen de 1.7 nm^2 , mediante un modelo molecular, considerando que la molécula es esencialmente plana. De acuerdo con esto, el recubrimiento teórico correspondiente a una monocapa se estima que es $1.2 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Considerando que son cuatro los electrones involucrados en la transferencia de carga por cada molécula, se ha calculado un recubrimiento para los electrodos modificados con el 3,4-DHsalophen a partir de la integración del pico anódico del primer voltamperograma de $2.1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2} (\Gamma^0)$. Tras 10 minutos de barridos de potencial continuo, el recubrimiento experimental es de $1.4 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$; valor que se aproxima bastante al valor teórico del recubrimiento de una monocapa. A la vista de estos resultados, se puede considerar que la primera monocapa está fuertemente adsorbida a la superficie del electrodo y, como consecuencia, es muy estable frente al ciclado continuo de potencial. Las siguientes monocapas están adsorbidas más débilmente y por lo tanto, pueden perderse con mayor facilidad. Resultados similares se han obtenido para el 2,5-DHsalophen.

Para el caso del 2,3-DHsalophen, el decaimiento del recubrimiento relativo durante los primeros 5 minutos de barrido continuo es superior al 90%. Esta baja estabilidad de la película formada en el caso de la modificación con 2,3-DHsalophen sugiere que los electrodos modificados con películas adsorbidas de este isómero no son adecuados para ser usados con fines analíticos. Por este motivo, los siguientes estudios de caracterización de los electrodos modificados mediante adsorción directa van a centrarse en el caso de los ligandos 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen.

2.1. Influencia de la velocidad de barrido. Cálculo de la constante heterogénea de transferencia de carga

Como se ha mencionado con anterioridad, la respuesta voltamperométrica de los electrodos modificados con películas adsorbidas de 3,4-DHsalophen muestra el comportamiento característico de materiales con actividad redox confinados en la superficie de un electrodo. Por tanto, las corrientes de pico anódicas y catódicas, son proporcionales a la velocidad de barrido, para velocidades de barrido inferiores a 0.400 V s^{-1} (inserto Figura 10).

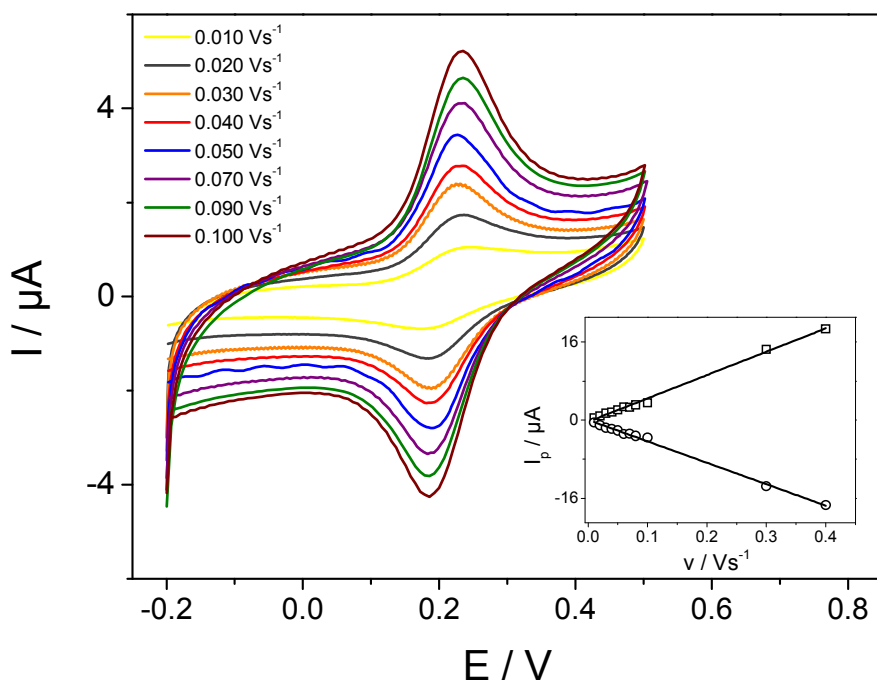


Figura 10: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) a diferentes velocidades de barrido. Insertado, la variación de la intensidad de corriente de pico anódico (□) y catódicos (○) con la velocidad de barrido.

Además, el potencial formal ($E^{0'}$) no varía con la velocidad de barrido, indicando que el coeficiente de transferencia de carga (α) debe tener un valor cercano a 0.5. Por otra parte, los valores de ΔE_p observados a velocidades de barrido hasta 1 V s^{-1} sugieren que el

material adsorbido tiene un comportamiento próximo a la reversibilidad electroquímica. Sin embargo, para velocidades de barrido superiores a 1 V s^{-1} , los valores de ΔE_p aumentan significativamente (Figura 11A); lo que sugiere la existencia de algunas limitaciones de tipo cinético en la transferencia de carga. Desde el punto de vista cualitativo el 2,5-DHsalophen muestra un comportamiento similar con la velocidad de barrido aunque como se verá a continuación la diferente posición de los hidroxilos implica una respuesta cuantitativamente diferente.

Utilizando el método de Laviron (Laviron, 1979), se ha determinado la constante de velocidad de transferencia de carga (k_s), así como el coeficiente de transferencia (α) midiendo la variación de los potenciales de pico anódico y catódico obtenidos a diferentes velocidades de barrido. La representación de estos potenciales en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el electrodo modificado con 3,4-DHsalophen, se muestra en la Figura 11B. Puede observarse que, para velocidades de barrido superiores a 5 V s^{-1} los valores de los potenciales de pico son proporcionales al logaritmo de la velocidad de barrido (Figura 11C). El análisis de estos resultados ha permitido calcular unos valores de k_s y α de 270 s^{-1} y 0.45, respectivamente, para este isómero. En los cálculos se ha considerado que cada molécula individual intercambia cuatro electrones, dos por cada grupo funcional quinona/hidroquinona. En el caso de los electrodos modificados con 2,5-DHsalophen, los resultados de k_s y α fueron 470 s^{-1} y 0.55, respectivamente. Comparando los valores de k_s obtenidos, se puede afirmar que la oxidación del isómero 2,5-DHsalophen está más favorecida que la del 3,4-DHsalophen, hecho que se había manifestado al observarse un potencial formal más negativo en el sistema del 2,5-DHsalophen.

Los resultados indican que los electrodos modificados con películas adsorbidas de 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen muestran una actividad redox que puede considerarse muy cercana a un comportamiento reversible desde el punto de vista químico y electroquímico. La constante heterogénea de transferencia de carga estimada para estos compuestos es sensiblemente mayor que la observada por otros autores en electrodos de carbón vítreo modificados con películas adsorbidas o electrodepositadas de compuestos que contienen el grupo funcional quinona/hidroquinona (Jaegfeldt y cols, 1983; Tse y

Kuwana, 1978; Zare y Golabi, 1999), lo que sugiere que la presencia de dos grupos electroactivos por molécula, puede ser la causa de este notable incremento en la velocidad de transferencia de carga. Por tanto, estas propiedades hacen que estos electrodos modificados sean buenos candidatos para ser utilizados como mediadores redox en procesos de oxidación catalítica de moléculas que presenten una sobretensión alta en electrodos desnudos.

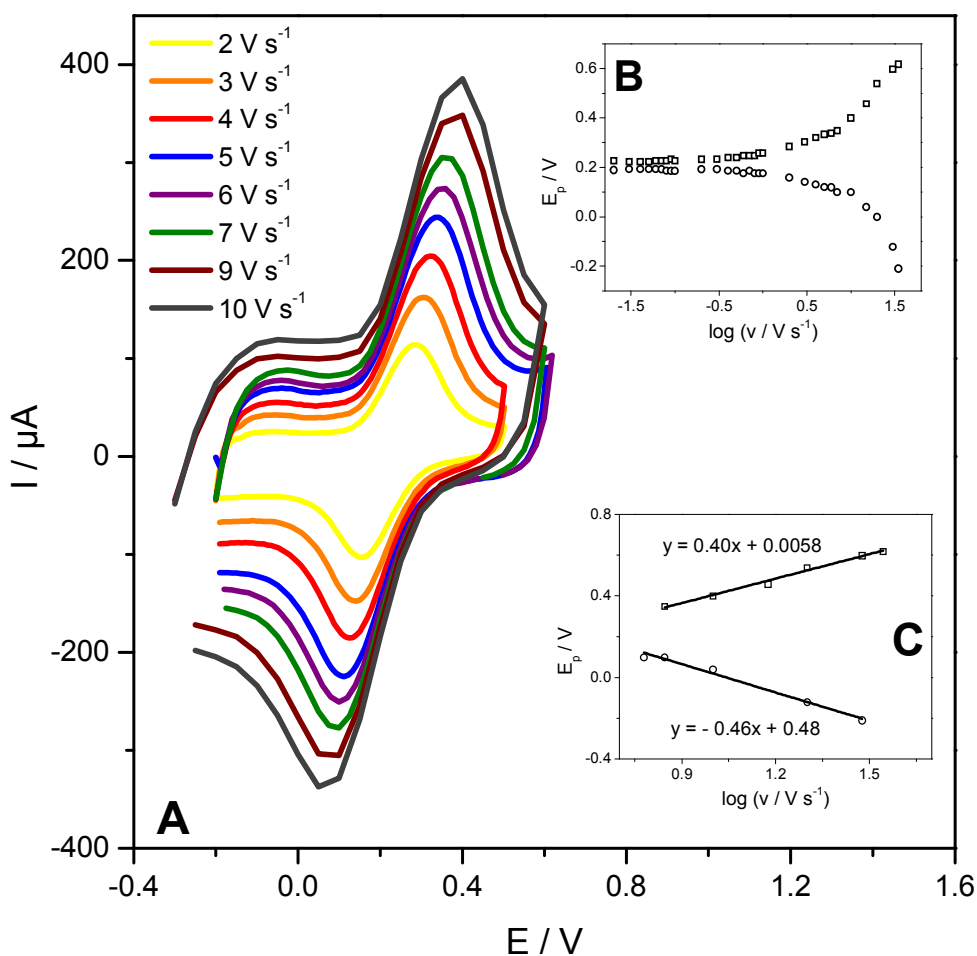


Figura 11: (A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) a velocidades de barrido altas. (B) Variación del potencial de pico anódico (\square) y catódico (\circ) con el logaritmo de la velocidad de barrido para un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0). (C) Ampliación de la gráfica anterior para velocidades de barrido superiores a 10 V s^{-1} .

2.2. Influencia del pH en la respuesta de los electrodos modificados

Debido a que la respuesta redox de los electrodos modificados se debe al grupo funcional quinona/hidroquinona, se puede anticipar que la respuesta de los mismos va a ser dependiente del pH. Para comprobarlo, se han recogido los ciclovoltamperogramas de los electrodos modificados con películas derivadas del 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen en disoluciones de electrolito a diferente pH en el intervalo comprendido entre 2.0 y 10.0. Para realizar los experimentos, los electrodos de carbón vítreo se modificaron con los ligandos, se aclararon con agua y se introdujeron en disoluciones tampón de pH adecuado. Se realizaron barridos de potencial en el intervalo de -0.30 V y $+0.70$ V (dependiendo del pH) durante 10-15 minutos a 100 mV s^{-1} hasta obtener una respuesta estable y, a continuación, se recogió el voltamperograma correspondiente. Los resultados obtenidos para un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen se muestran en la Figura 12A, donde claramente se aprecia que los potenciales de pico anódico y catódico sufren un desplazamiento a valores más negativos a medida que aumenta el pH de la disolución.

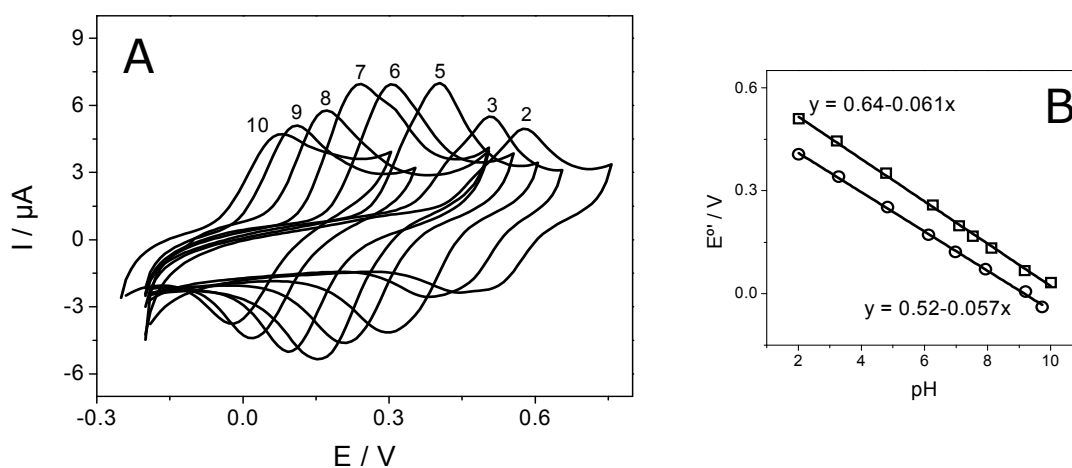
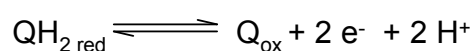
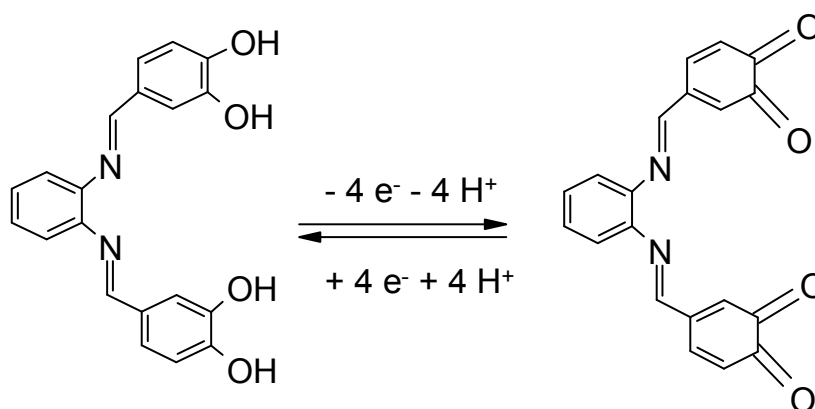


Figura 12: (A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en el intervalo de pH entre 2.0 y 10.0. (B) Dependencia lineal del pH y el potencial formal para un electrodo modificado con 2,5-DHsalophen (O) y con 3,4-DHsalophen (□).

La relación entre el potencial formal $((E_{pa}+E_{pc})/2)$ del par redox y el pH es lineal en ambos electrodos, con una pendiente muy cercana al valor Nernstiano de 59 mV/unidad pH previsto para sistemas que intercambian el mismo número de protones que de electrones (Figura 12B). Como se muestra en la figura para el 3,4-DHsalophen y el 2,5-DHsalophen, en ningún caso existe cambio de pendiente en todo el intervalo de pH estudiado. Esto sugiere que los grupos fenólicos tienen un carácter ácido muy débil y no se encuentran desprotonados. De acuerdo con estos resultados, el proceso redox que involucra a cada grupo quinona/hidroquinona individual puede representarse como:



Dado que los derivados DHsalophen presentan en la molécula dos grupos funcionales $QH_{2\text{red}}/Q_{\text{ox}}$, el proceso global por molécula implicaría 4 electrones y 4 protones, si se asume que no hay interacción entre grupos ni efectos cooperativos. Para el caso particular del 3,4-DHsalophen, el proceso sería:



Esquema 3: Proceso de oxidación-reducción de los grupos quinona/hidroquinona del 3,4-DHsalophen

Puesto que la respuesta electroquímica de los electrodos modificados es dependiente del pH, es conveniente comprobar cómo varía el recubrimiento de estos electrodos en función del pH. A partir de los voltamperogramas obtenidos para el 3,4-DHsalophen (Figura 12A) y para el 2,5-DHsalophen (Figura no mostrada), se calculó el

recubrimiento obtenido en cada caso. Como puede verse en la Figura 13, los mayores recubrimientos observados se obtienen para el intervalo de pH entre 6.0 y 7.0, para ambos ligandos. Teniendo en cuenta estos resultados se ha elegido el tampón fosfato de pH 7.0 para realizar los siguientes estudios.

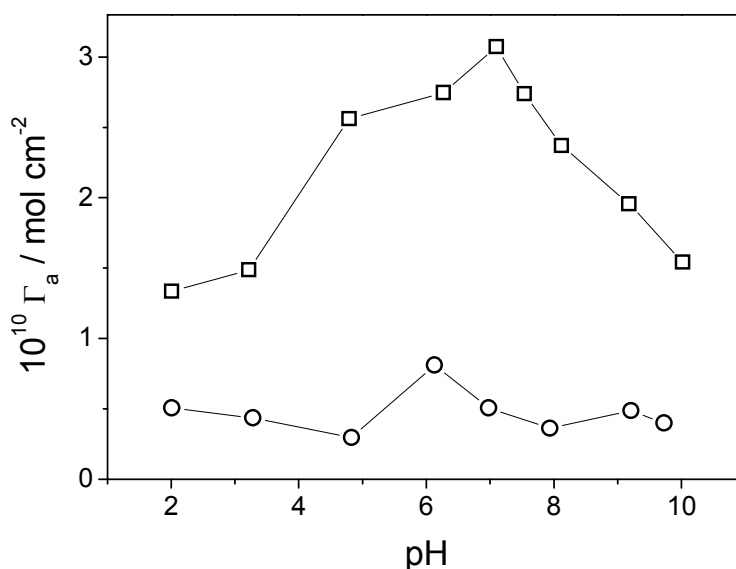


Figura 13: Variación del recubrimiento anódico de la superficie de un electrodo modificado con 2,5-DHsalophen (O) y con 3,4-DHsalophen (□), en función del pH.

2.3. Propiedades electrocatalíticas de los electrodos modificados con películas adsorbidas de DHsalophen

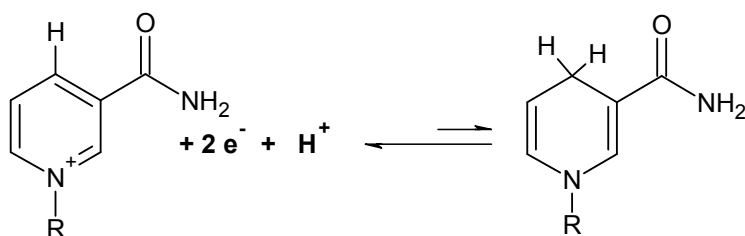
Las sustancias químicas que contienen en su estructura el grupo funcional quinona/hidroquinona se han descrito como potentes y eficientes electrocatalizadores, especialmente cuando son depositados o polimerizados sobre electrodos sólidos. Los electrodos modificados con este tipo de compuestos presentan una persistente actividad electrocatalítica para la electrooxidación de NADH (Gorton y cols, 1984; Pariente y cols, 1994), de ácido ascórbico (Moreno y cols, 2000) y de hidracina (Golabi y Zare, 1999a, b; Pamidi y Wang, 1996). Esta capacidad catalítica puede estar fuertemente influenciada por la posición de los hidroxilos en el anillo aromático. Por este motivo, se han estudiado las

propiedades electrocatalíticas de los electrodos modificados con películas derivadas del 2,5-DHsalophen (*para*-quinona) y del 3,4-DHsalophen (*orto*-quinona) en la electrooxidación de NADH y de hidracina mediante el empleo de técnicas voltamperométricas.

A. Oxidación electrocatalítica de NADH

La oxidación del NADH sobre electrodos sólidos es un proceso de gran interés en el desarrollo de biosensores. La obtención de un sistema eficaz para llevar a cabo este proceso permitiría disponer de un método *cuasi* universal para desarrollar biosensores basados en deshidrogenasas y, por tanto, para la determinación de una gran cantidad y variedad de sustratos.

La reacción de oxidación de este cofactor implica la transferencia de un ión hidruro desde el anillo de la nicotina hasta el sustrato y la semirreacción de reducción del sistema NAD^+/NADH puede representar como:



A pH 7.0 el potencial termodinámico para esta reacción es -0.56 V frente al electrodo de calomelanos. Sin embargo, la oxidación de NADH a pH 7.0 sobre un electrodo de platino tiene lugar a potenciales cercanos a +0.55 V, o superiores. En electrodos de carbón vítreo sin activar, la oxidación de NADH en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0 da lugar a una onda de oxidación con un potencial de pico a +0.56 V (Figura 14, **—**). En el barrido catódico no se observa ningún proceso faradaico acoplado correspondiente a la reducción del NAD^+ generado, lo que indica el carácter irreversible del proceso. Sin embargo, cuando el electrodo sin modificar se activa electroquímicamente en una disolución de bicarbonato (Figura 14, **—**), el potencial de oxidación se desplaza hacia potenciales más negativos

(+0.39 V), con una reducción de 170 mV de la sobretensión. Esta disminución del potencial es debida a que, durante el proceso de activación, se generan grupos funcionales en la superficie del electrodo, que facilitan la transferencia de carga con el electrodo (McCreery, 1991, 1996). Sin embargo, esta respuesta es poco reproducible y la disminución de la sobretensión varía con el tiempo.

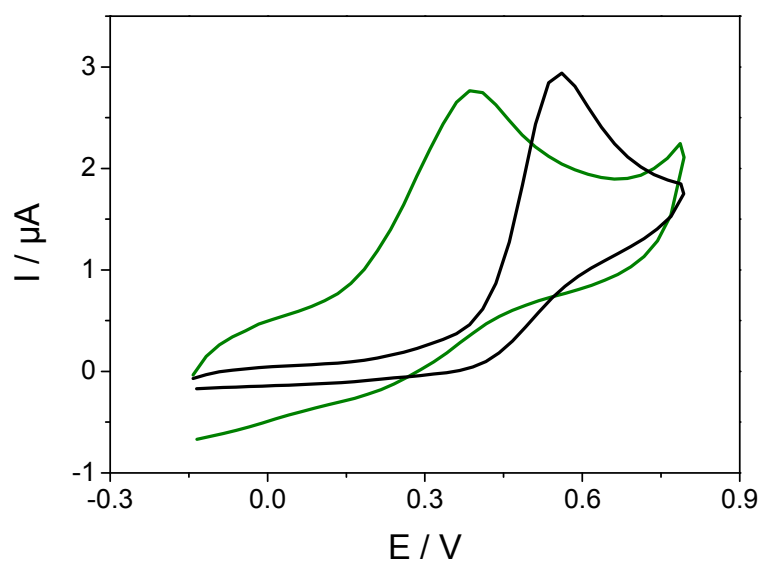


Figura 14: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo sin modificar activado en bicarbonato (—) o sin activar (—) en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) en presencia de NADH 0.5mM. Velocidad de barrido 10 mV s^{-1} .

Electrodos de carbón vítreo activados en disoluciones de bicarbonato y modificados posteriormente con películas adsorbidas de 3,4-DHsalophen muestran una respuesta voltamperométrica bien definida y estable característica del sistema quinona/hidroquinona (Figura 15A, —). En presencia de NADH, estos electrodos muestran un potente y persistente efecto electrocatalítico caracterizado por un aumento de la intensidad de corriente anódica, a la vez que la corriente de pico catódico disminuye (Figura 15A, —). Además, el sobrepotencial de oxidación del NADH disminuye 140 mV respecto al electrodo activado y 310 mV respecto al electrodo sin activar. Este

comportamiento voltamperométrico no es general para todos los electrodos modificados con películas derivadas de DHsalophen. Sólo se observa electrocatálisis para la oxidación de NADH en electrodos modificados con películas adsorbidas de isómeros de DHsalophen con los hidroxilos en posición *orto*. Dentro de estos sistemas la electrocatálisis más potente se observa cuando se modifica con 3,4-DHsalophen. Cuando los hidroxilos se encuentran en posición *para*, electrodos modificados con 2,5-DHsalophen, el efecto electrocatalítico es prácticamente inexistente. En este caso, la respuesta del electrodo modificado es bastante reversible, con un potencial formal más negativo que en el caso de los electrodos modificados con 3,4-DHsalophen, pero estas películas no son efectivas para electrocatalizar la oxidación de NADH (Figura 15B). Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos donde se describe la mayor efectividad de las *orto*-quinonas en la oxidación electrocatalítica de analitos, como el NADH o el ácido ascórbico, mientras que las *para*-quinonas no presentan esta actividad, o si la presentan es muy escasa (Pariente y cols, 1996).

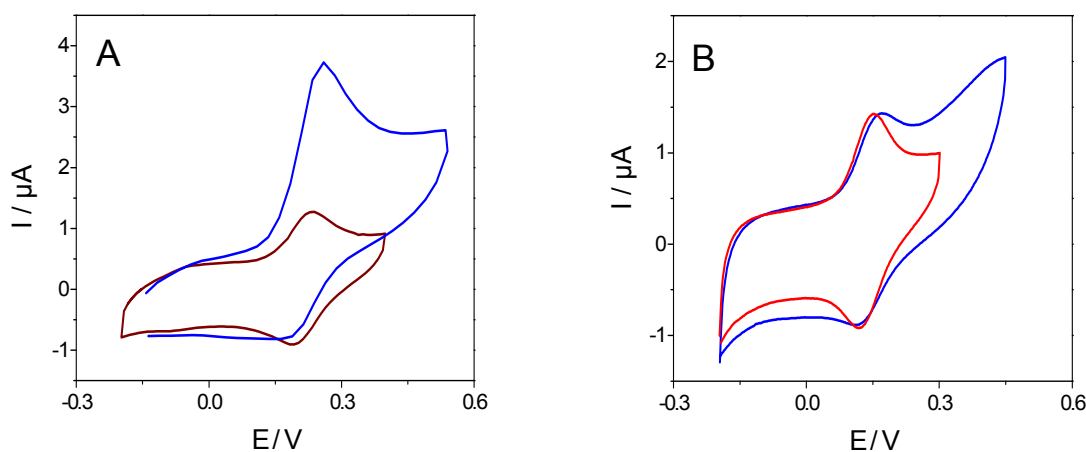
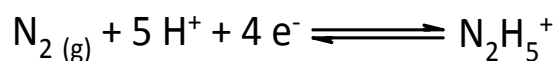


Figura 15: (A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) en ausencia (—) y en presencia (—) de NADH 0.5 mM. (B) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 2,5-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) en ausencia (—) y en presencia (—) de NADH 0.5 mM. Velocidad de barrido 10 mV s^{-1} .

B. Oxidación electrocatalítica de hidracina

La oxidación de hidracina sobre electrodos metálicos presenta importantes limitaciones cinéticas que implican una gran sobretensión. Este hecho se hace más patente si cabe, cuando se emplean electrodos de carbono, en los que es necesaria la aplicación de un potencial muy positivo para oxidar la hidracina. Estas limitaciones cinéticas suponen un impedimento serio para el uso de estos procesos con fines analíticos. Debido a estos problemas, la activación y/o la modificación de la superficie del electrodo, como paso previo a la determinación electroanalítica, se muestra como una buena solución para rebajar la sobretensión en la oxidación de hidracina a unos valores de potencial aceptables para llevar a cabo estas determinaciones.

La reacción de oxidación de hidracina implica la transferencia de cuatro electrones generándose, como producto, nitrógeno. A pH por debajo del pK_a de la hidracina (8.1), la forma predominante será $N_2H_5^+$. En estas condiciones, el potencial termodinámico para la semirreacción de la hidracina es -0.21 V frente al electrodo normal de hidrógeno (Bard, 1985). El proceso se puede representar como:



En tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0, la hidracina (1.0 mM) sobre electrodos de carbón vítreo pulidos sin ningún tipo de activación ni modificación, muestra una respuesta ciclovoltamperométrica caracterizada por un incremento de la corriente anódica a partir de +0.6 V y la total ausencia de pico de oxidación en el intervalo de potenciales estudiado (desde 0.0 V a +1.0 V) (Figura 16, —). Cuando el electrodo se activa electroquímicamente en una disolución de bicarbonato 0.1 M (Figura 16, —), la hidracina inicia su proceso de oxidación a +0.2 V y muestra un pico anódico claramente definido con un potencial de pico a +0.56 V. La respuesta voltamperométrica obtenida muestra claramente que el proceso de oxidación está lejos de tener comportamiento Nernstiano. Además, la ausencia de proceso catódico de vuelta sugiere un proceso de oxidación catalítico. Por otra parte, con los barridos sucesivos la onda catalítica muestra cada vez menos pendiente

y el pico anódico se desplaza a valores cada vez más positivos. Estos resultados indican que la activación de la superficie del electrodo de carbón vítreo en disoluciones de bicarbonato genera grupos funcionales necesarios para la electrooxidación catalítica de la hidracina, pero estos resultados no son suficientes para obtener una respuesta Nernstiana y reproducible que pueda ser utilizada con fines analíticos.

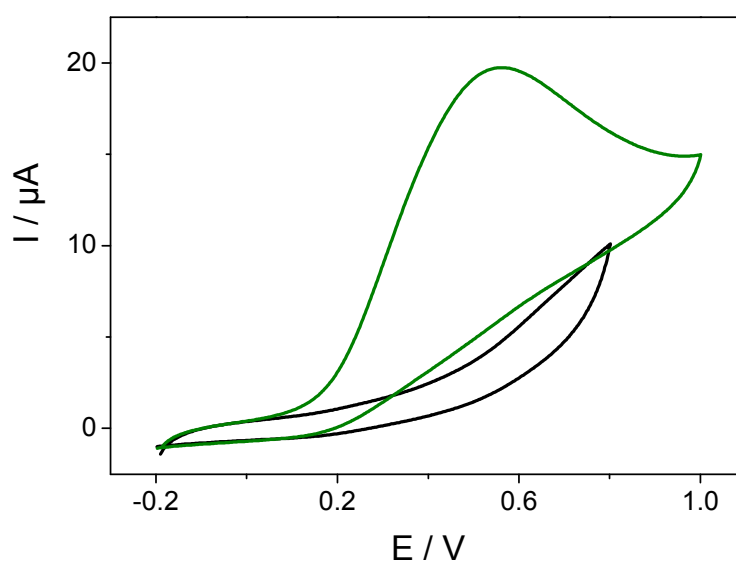


Figura 16: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo sin modificar activado en bicarbonato (—) o sin activar (—) en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) en presencia de hidracina 1.0 mM. Velocidad de barrido 25 mV s⁻¹.

Teniendo en cuenta estos resultados, se estudiaron las respuestas de los electrodos modificados con 2,5-DHsalophen y con 3,4-DHsalophen. La Figura 17A muestra los voltamperogramas cíclicos, obtenidos a 25 mV s⁻¹ en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.5), del electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en presencia y en ausencia de hidracina. En ausencia de hidracina, la respuesta observada corresponde al electrodo modificado con el 3,4-DHsalophen (Figura 17A, —). Sin embargo, cuando se adiciona hidracina (1.0 mM) hay un gran incremento en la corriente de pico anódica, mientras que no se observa corriente de pico catódica (Figura 17A, —). El potencial del pico de oxidación de la hidracina coincidió con el potencial de pico de oxidación del mediador inmovilizado, lo que indica

que el proceso es cinéticamente rápido. Además, el sobrepotencial de oxidación de la hidracina disminuye 290 mV, respecto al electrodo activado. Resultados cualitativamente similares se pueden observar para los electrodos modificados con 2,5-DHsalophen en la Figura 17B. Sin embargo, en este caso la oxidación electrocatalítica de hidracina es más lenta. A pesar de que el potencial formal del mediador inmovilizado (2,5-DHsalophen) es menos positivo que en el caso del 3,4-DHsalophen, la disminución del sobrepotencial de oxidación de hidracina es de 200 mV respecto del electrodo activado. Es decir, el potencial de oxidación de hidracina está desplazado 210 mV hacia potenciales más positivos respecto al pico de oxidación del mediador inmovilizado. Además, la intensidad de corriente catalítica es menor que en el caso del 3,4-DHsalophen. Con estos datos, se puede concluir que, aunque se observa actividad electrocatalítica para los electrodos modificados con ambos compuestos, la eficiencia de los electrodos modificados con 3,4-DHsalophen es bastante mayor que la de los modificados con 2,5-DHsalophen.

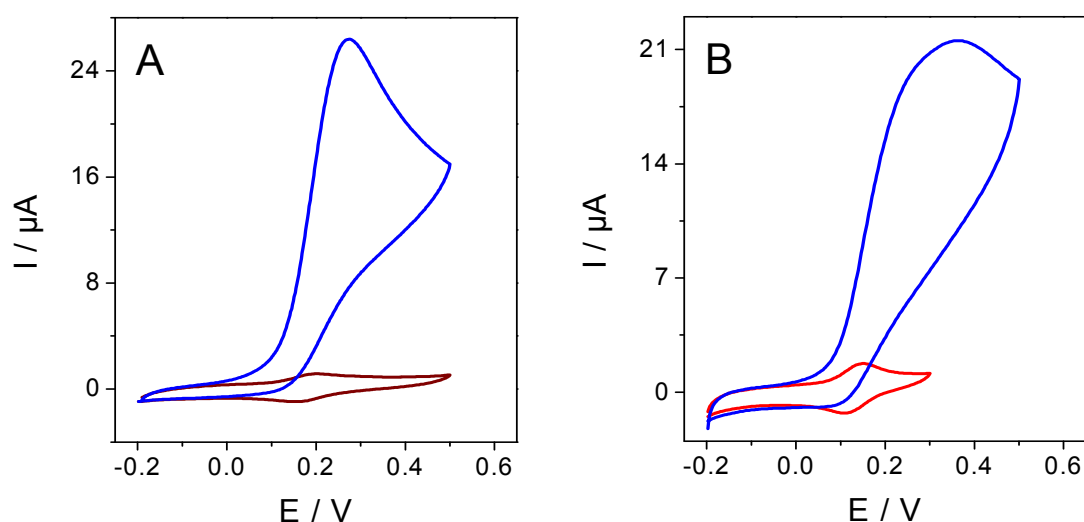


Figura 17: (A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) en ausencia (—) y en presencia (—) de hidracina 1.0 mM. (B) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 2,5-DHsalophen en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0) en ausencia (—) y en presencia (—) de hidracina 1.0 mM. Velocidad de barrido 25 mV s⁻¹.

Por otra parte, comparando la oxidación electrocatalítica de hidracina y de NADH en electrodos modificados con los isómeros 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen se pueden observar dos diferencias muy notables. En primer lugar, mientras que la electrooxidación de NADH es catalizada, únicamente, por los electrodos modificados con 3,4-DHsalophen; la electrooxidación de hidracina es catalizada por los electrodos modificados tanto por el isómero *orto* como por el *para*. Además, en el caso de la electrocatálisis de hidracina las corrientes de pico catalíticas obtenidas son significativamente mayores que en el caso de la oxidación del NADH. Por todo ello, se eligió la hidracina como analito para el desarrollo de un sensor amperométrico basado en la modificación de electrodos de carbón vítreo con el isómero 3,4-DHsalophen como mediador redox.

CAPÍTULO III

DESARROLLO DE UN SENSOR DE HIDRACINA BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADO CON PELÍCULAS ADSORBIDAS DE 3,4-DHsalophen

La hidracina es una sustancia altamente corrosiva, irritante y tóxica que se usa como catalizador, como inhibidor de la corrosión y como emulsionante en algunos procesos industriales (Amlathe y Gupta, 1988; Vernot y cols, 1985). Se ha utilizado como antioxidante, como agente reductor o como revelador de fotos. Se emplea también, como propulsor de cohetes, en la fabricación de productos químicos para la agricultura (insecticidas), en farmacología, en la fabricación de explosivos y para producir la hinchazón del caucho y las materias plásticas. Por todo ello, la determinación de hidracina es muy importante en análisis biológicos y medio ambientales.

Tanto la Unión Europea como la Agencia de Protección de Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA), han clasificado la hidracina como un carcinógeno de categoría 2, es decir, es probablemente un carcinógeno para los humanos. Un gran número de estudios muestran la incidencia de tumores en animales tras haber sido expuestos a la hidracina por diferentes vías: inhalación, ingestión o inyección. También se han estudiado sus propiedades como presunto agente mutagenético y hepatotóxico (<http://www.epa.gov>; OMS, 1974).

El interés por la determinación de hidracina es tal, que se han desarrollado numerosos métodos para su determinación. Así, se han descrito métodos cromatográficos (Gilbert y cols, 1984; Kirchherr, 1993), espectrofotométricos (Amlathe y Gupta, 1988; Safavi y Ensafi, 1995), potenciométricos (Lupea y Oprescu, 1994), coulombimétricos (Pastor y cols, 1983), titulométricos (Budkuley, 1992), etc., que permiten la determinación de hidracina presente en un gran número de matrices, pero siguiendo protocolos muy extensos y tediosos, en los que la preparación de la muestra, previa al análisis, requiere un gran gasto de material y, sobre todo, de tiempo. Actualmente, esta demanda se manifiesta en la necesidad de métodos cada vez más sensibles y que proporcionen límites de detección más bajos.

Como alternativa a los métodos anteriores, los sensores electroquímicos pueden ser muy adecuados para la determinación de hidracina debido a su alta selectividad, sensibilidad y rapidez. Además, pueden usarse de forma directa o como detectores acoplados a otras técnicas, como la cromatografía líquida. En general, la determinación de hidracina y sus derivados basada en sus propiedades electroquímicas se fundamenta en la electrooxidación de la misma sobre la superficie del electrodo. El mecanismo y cinética de oxidación de la hidracina se ha estudiado en varios tipos de electrodos metálicos (Fleischm.M y cols, 1972; Harrison y Khan, 1970; Korinek y cols, 1969; Petek y Bruckens.S, 1973) y en electrodos de carbón vítreo previamente activados (Engstrom, 1982).

Para la determinación de hidracina se ha estudiado el uso de distintos tipos de electrodos de carbón vítreo modificados. Algunos compuestos químicos utilizados como mediadores redox en el desarrollo de este tipo de dispositivos son el ácido cafeico (Golabi y Zare, 1999b), el 3,4-dihidroxibenzaldehído (Pamidi y Wang, 1996), el ácido clorogénico (Golabi y Zare, 1999a) o el pirocatecol violeta (Golabi y cols, 2001). En todos estos modificadores, el grupo funcional electroquímicamente activo es el grupo quinona/hidroquinona. Además, se han encontrado referencias bibliográficas sobre el desarrollo de biosensores para la determinación de hidracina basados en el uso de enzimas o tejidos (Vieira y cols, 2002; Wang y Chen, 1995). Algunos de los sensores descritos en la literatura se han utilizado en la determinación de hidracina en muestras reales como son aguas de consumo (Wang y Chen, 1995), aguas naturales (Wang y Chen, 1995; Wang y cols, 1996), aguas de alimentación de calderas (Vieira y cols, 2002) o en tabaco (Yang y cols, 2005).

Los electrodos modificados con películas derivadas del 3,4-DHsalophen tienen la capacidad de catalizar la electrooxidación de hidracina. Con la finalidad de poder utilizar estos electrodos modificados como sensores de hidracina, se ha estudiado la dependencia de la electrocatálisis con la activación del electrodo, el pH, la velocidad de barrido y la concentración de sustrato.

1. Efectos de la activación del electrodo en la oxidación electrocatalítica de hidracina

Según lo descrito en el capítulo anterior, la activación del electrodo de carbón vítreo hace disminuir el sobrepotencial de oxidación de la hidracina, aunque dando lugar a corrientes catalíticas que son poco reproducibles. Con objeto de optimizar la respuesta del sensor, se estudió cómo afectaba la variación del número de barridos de activación en la oxidación electroquímica de la hidracina, tanto en electrodos sin modificar como en electrodos modificados con 3,4-DHsalophen. Para ello, se eligieron dos electrodos pulidos de carbón vítreo de igual área geométrica. Ambos electrodos se introdujeron en una disolución de bicarbonato sódico 0.1 M y se les aplicaron un cierto número de barridos continuos de potencial, entre -1.10 V y $+1.60$ V a 100 mV s^{-1} , según el experimento. Posteriormente, solamente uno de los electrodos se modificó por adsorción directa con 3,4-DHsalophen. Tanto el electrodo no modificado como el modificado se sumergieron en una disolución de tampón fosfato 0.1 M (pH 7.5), que contenía 1.0 mM de hidracina y se estudió la respuesta voltamperométrica a 25 mV s^{-1} .

En la Figura 18A, se muestra la variación del potencial de pico catalítico en función del número de barridos aplicados en la etapa de activación tanto en el electrodo modificado con el mediador redox como sin modificar. Se observa que, para el mismo número de barridos de activación, el potencial de oxidación de la hidracina es mayor cuando el electrodo no está modificado. Esta disminución del potencial de oxidación de la hidracina, promovida por las películas adsorbidas de 3,4-DHsalophen, es importante a la hora de minimizar las interferencias debidas a posibles sustancias redox presentes en la matriz de medida. Además, las señales en los electrodos no modificados son muy poco reproducibles. Por otro lado, el potencial de oxidación de la hidracina en los electrodos modificados con 3,4-DHsalophen se mantiene constante a partir del tercer barrido de oxidación. Por otro lado, en la Figura 18B se muestra la variación de la corriente electrocatalítica de un electrodo sin modificar y otro modificado con 3,4-DHsalophen, en función del número de barridos de activación aplicados. Los resultados muestran como las corrientes electrocatalíticas son menores cuando el electrodo no está modificado. En el

caso del electrodo modificado, se observa cómo la intensidad del pico de la señal analítica incrementa su valor a medida que aumenta el número de barridos, manteniéndose estable a partir del noveno barrido. Sin embargo, a partir del quinto barrido la diferencia entre las señales del electrodo modificado y sin modificar es constante.

A la vista de los resultados, se eligió como protocolo de activación la aplicación de cinco barridos continuos de potencial entre -1.10 V y $+1.60$ V a 100 mV s^{-1} en una disolución de bicarbonato sódico 0.1 M. Los electrodos activados, siguiendo este protocolo, y modificados posteriormente con películas de 3,4-DHsalophen muestran el potencial de oxidación de hidracina más bajo y más estable, al tiempo que corrientes catalíticas más altas.

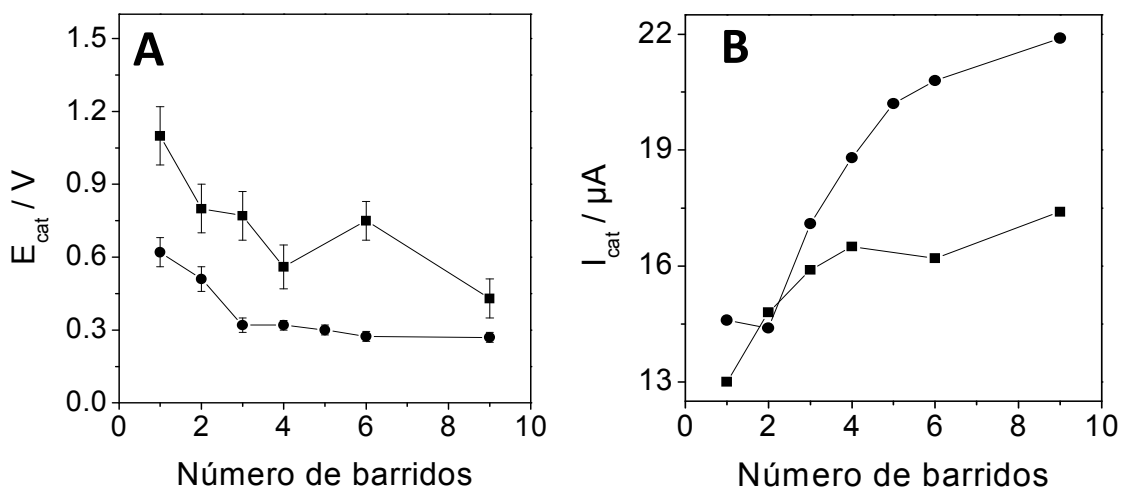


Figura 18: Variación del potencial de pico catalítico (A) y de la corriente electrocatalítica (B) de un electrodo sin modificar (■) y otro modificado con 3,4-DHsalophen (●), en función del número de barridos de activación aplicados.

Una vez optimizado el proceso de activación de los electrodos, se procedió a estudiar como afectaban el resto de variables a la corriente catalítica.

2. Influencia de velocidad de barrido en la corriente catalítica. Cálculo de la constante cinética del proceso de oxidación electrocatalítica de hidracina

Con la finalidad de justificar el tipo de limitaciones existentes en la reacción entre el mediador redox y la hidracina, se ha estudiado la variación de la corriente de pico catalítica con la velocidad de barrido. Los voltamperogramas obtenidos de una disolución de hidracina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.5) a diferentes velocidades de barrido, se muestra en la Figura 19. Puede observarse que, a medida que aumenta la velocidad de barrido, el potencial de pico anódico se desplaza hacia potenciales más positivos. Esto hace pensar que existe una limitación cinética en la reacción entre la hidracina y el electrodo modificado.

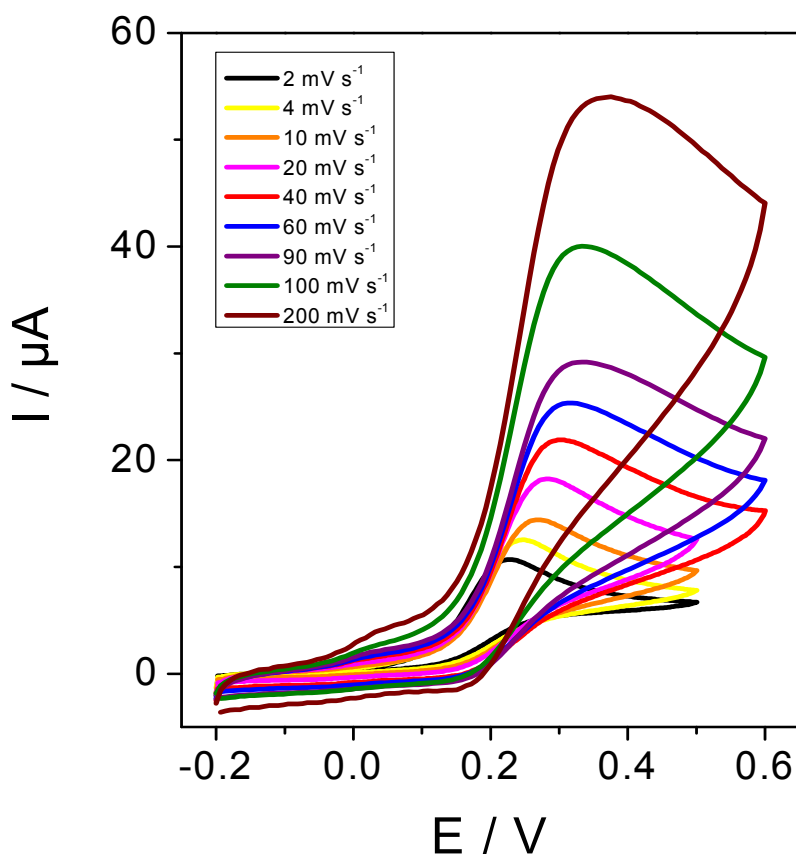


Figura 19: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en una disolución de hidracina 1.0 mM en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.5) a diferentes velocidades de barrido.

Por otra parte, la representación de la corriente de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 20) muestra que existe una relación lineal, lo que sugiere que la corriente catalítica está controlada por la difusión de la hidracina hacia la superficie del electrodo. Estos resultados concuerdan con el modelo cinético establecido por Saveant y Andrieux (Andrieux y Saveant, 1978) para procesos catalíticos mediados por especies confinadas en la superficie de electrodos.

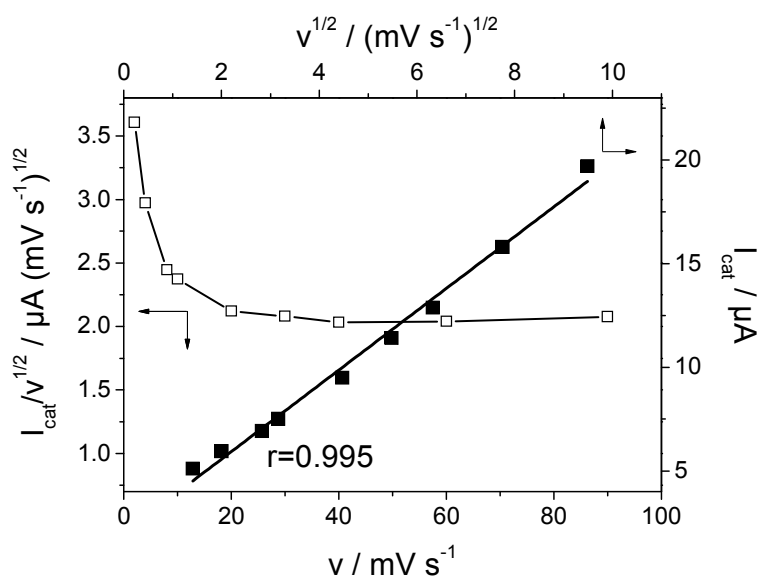
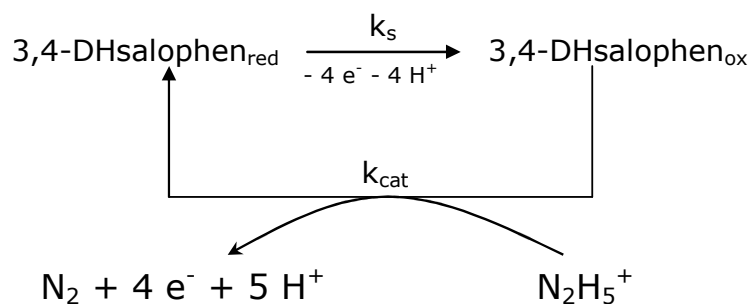


Figura 20: Variación de la corriente electrocatalítica con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (■) y variación de la corriente normalizada con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($I_{\text{p}}/v^{1/2}$) en función de la velocidad de barrido (□).

Además, se ha representado la variación de la intensidad de pico normalizada ($I_{\text{cat}}/v^{1/2}$) en función de la velocidad de barrido (Figura 20). La curva obtenida es la típica de procesos EC catalíticos (EC_{cat}). De acuerdo con estos procesos, la oxidación de hidracina mediada a través de las películas adsorbidas de 3,4-DHsalophen se produce de acuerdo con el siguiente mecanismo que muestra el ciclo catalítico:



De acuerdo con este esquema, se parte de un potencial en el que todo el 3,4-DHsalophen está reducido. A medida que el potencial se hace positivo, las hidroquinonas del mediador se oxidan sobre la superficie del electrodo, proceso rápido y gobernado por la constante k_s , constante de transferencia de carga entre el mediador inmovilizado y el electrodo, que fue calculada en el capítulo anterior. En presencia de hidracina el 3,4-DHsalophen_{ox} se reduce en un proceso gobernado por la constante de transferencia de carga, k_{cat} , generándose de nuevo 3,4-DHsalophen_{red} que, por efecto del potencial, volverá a oxidarse iniciándose de nuevo el proceso catalítico. Este ciclo catalítico justifica el drástico incremento en la corriente de pico anódico, ya que constantemente la hidracina bombea electrones al electrodo a través del mediador y justifica también la ausencia de corriente catódica de vuelta, ya que la forma oxidada del mediador rápidamente se reduce en presencia de hidracina.

Se ha calculado la constante de transferencia de carga entre la hidracina y el mediador inmovilizado, k_{cat} , analizando los voltamperogramas obtenidos a diferentes velocidades de barrido, según el método descrito por Andrieux y Saveant (Andrieux y Saveant, 1978). A partir del valor de intensidad de corriente catalítica estimada a partir de los voltamperogramas cíclicos registrados, se puede calcular el valor de k_{cat} para la concentración de hidracina empleada (el valor de k_{cat} es dependiente de la concentración de sustrato), que ha de ser independiente de la velocidad de barrido. El valor obtenido fue $3.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor es un orden de magnitud menor que el obtenido por otros autores; si bien, esos valores están obtenidos mediante medidas cronoamperométricas. (Golabi y Zare, 1999b; Razmi-Nerbin y Pournaghi-Azar, 2002; Salimi y cols, 2008a).

3. Efecto del pH en la oxidación electrocatalítica de hidracina

Como en las reacciones electrónicas de oxidación de hidracina y del mediador hay protones implicados, es de sumo interés optimizar la influencia del pH en la respuesta del sensor. Con este objetivo, se prepararon disoluciones de hidracina a diferentes pH en el intervalo entre 5.0 y 10.0. En todos los casos la concentración de sustrato fue 1.0 mM. Los resultados se muestran en la Figura 21, donde se representa la respuesta normalizada del sensor (I_{cat}/Γ) en función del pH. Las mayores intensidades se obtienen a los pH donde el recubrimiento del electrodo modificado con el 3,4-DHsalophen es mayor.

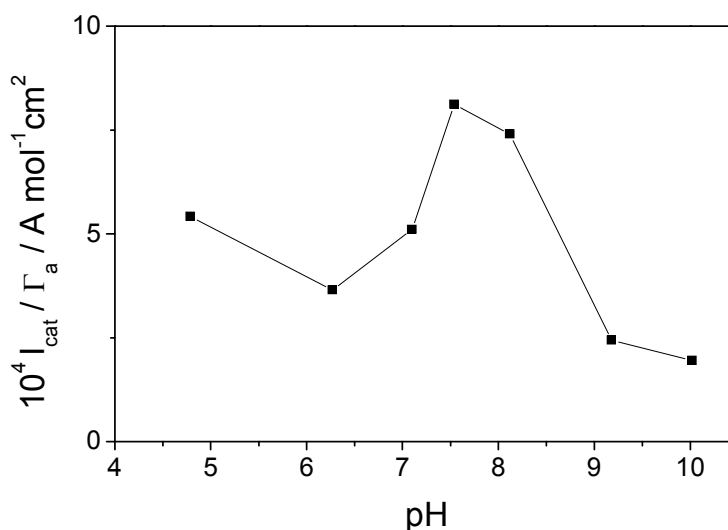


Figura 21: Variación de la corriente electrocatalítica normalizada con el recubrimiento anódico en función del pH de una disolución de hidracina 1.0 mM.

Al aumentar el pH por encima de 8.0 la corriente catalítica disminuye. Esto es consecuente con la baja estabilidad del film de 3,4-DHsalophen en disoluciones con valores de pH altos. Estos resultados sugieren que la interacción de la hidracina y los grupos *o*-quinonas de la película adsorbida de 3,4-DHsalophen es más efectiva a pH poco básicos o neutros que a pH ácidos. Por esta razón, el pH elegido para realizar los siguientes experimentos será 7.5, que es en el que se obtiene el máximo de intensidad de pico.

4. Influencia de la concentración de hidracina en la intensidad de pico

Una vez que se comprobó que los electrodos de carbón vítreo modificados con 3,4-DHsalophen catalizaban hidracina, se procedió a estudiar la linealidad de la respuesta voltamperométrica en función de la concentración de hidracina en disolución.

Para ello, se prepararon una serie de disoluciones de hidracina en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.5) de distintas concentraciones y se registraron los voltamperogramas a 25 mV s^{-1} (Figura 22). Como se puede observar, a medida que aumenta la concentración de hidracina, la intensidad de pico también aumenta. A concentraciones moderadamente bajas (10-400 μM), el aumento de la corriente de pico catalítico no viene acompañado de un incremento significativo en el potencial de pico, lo que es característico de un sistema donde la constante catalítica es alta.

La Figura 23 muestra la recta de calibrado. Se representa la intensidad de corriente normalizada con el recubrimiento superficial del electrodo ($I_{\text{cat}} / \Gamma, \text{ A cm}^2 \text{ mol}^{-1}$), con el fin de obtener curvas de calibrado universales. Cada punto corresponde al valor medio de cinco medidas. Se observan dos tramos lineales con diferentes pendientes correspondientes a dos intervalos diferentes de concentración de sustrato. Este cambio de pendiente ha sido ya descrito por otros autores (Scharf y Grabner, 1996), que lo han justificado con un cambio en el medio de reacción debido a la formación de burbujas de nitrógeno en la superficie del electrodo modificado cuya presencia puede inhibir parcialmente la transferencia de carga a través de la interfase. Así, cuando la concentración del sustrato es baja (menor de 0.4 mM), el gas que se forma es inapreciable y la difusión de la hidracina hacia la superficie del electrodo no se ve afectada. Mientras que, cuando la concentración de hidracina es mayor, también aumenta la formación de gas. En este caso, sí se ve afectada la difusión de sustrato hacia la superficie del electrodo, y esto se refleja en la disminución de la sensibilidad cuando aumenta la concentración de sustrato. Además, este cambio en el medio justificaría el desplazamiento en el potencial de pico que se observa a concentraciones altas del sustrato.

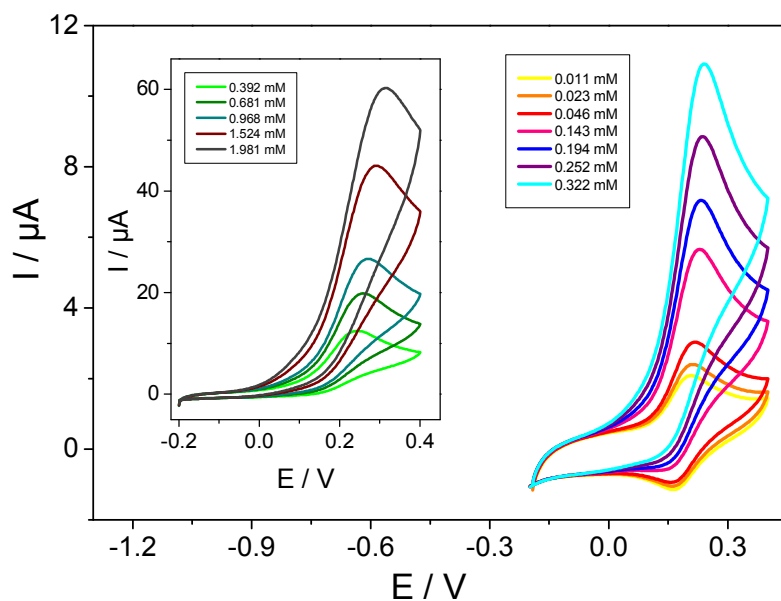


Figura 22: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en diferentes disoluciones de hidracina de distinta concentración, en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.5) a 25 mV s^{-1} .

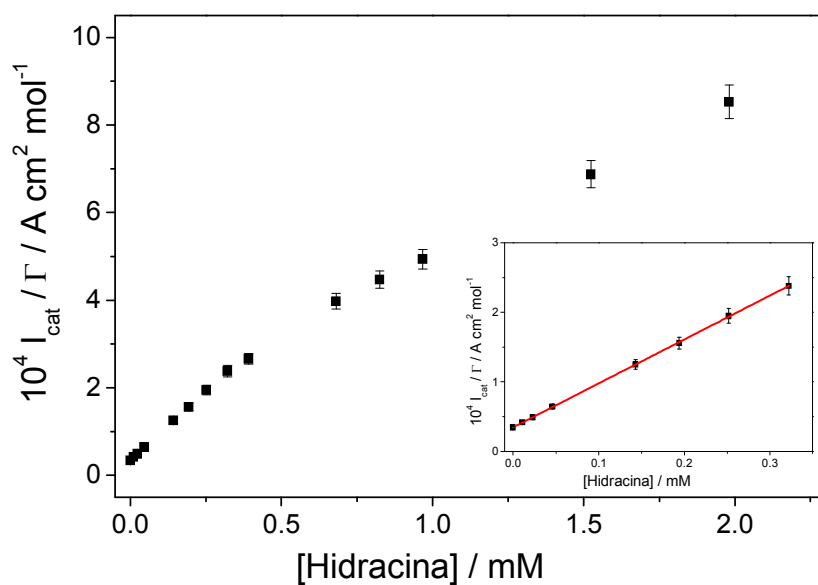


Figura 23: Curva de calibrado obtenida por medidas de voltamperometría cíclica para un electrodo modificado con 3,4-DHsalophen en presencia de cantidades crecientes de hidracina, en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.5) a 25 mV s^{-1} . En el recuadro se muestra el intervalo lineal para concentraciones bajas.

5. Determinación de las propiedades analíticas del sensor

Las propiedades analíticas del sensor, tales como el intervalo lineal de concentración, la sensibilidad y los límites de detección y determinación, se obtuvieron del primer tramo lineal de la curva de calibrado (recuadro Figura 23) y se resumen en la Tabla 8. La sensibilidad obtenida a partir de la pendiente del primer tramo lineal de la curva fue de $(6.3 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ A mM}^{-1}$. Los límites de detección y determinación se calcularon como las concentraciones que dan una señal igual a 3 y 10 veces, respectivamente, la desviación estándar de las señales ($n=5$) correspondientes al blanco. El límite de detección fue de $1.6 \mu\text{M}$ y el de determinación $7.3 \mu\text{M}$.

La repetibilidad se evaluó a partir de la desviación estándar relativa de las cinco señales obtenidas para cada concentración de hidracina. A concentraciones bajas (hasta 0.3 mM) se obtuvieron valores no superiores al 6%, mientras que para concentraciones mayores los valores fueron inferiores al 4.7%.

La reproducibilidad se evaluó comparando las señales analíticas obtenidas usando 3 sensores diferentes, preparados del mismo modo, para distintas concentraciones de hidracina. En estas condiciones, se obtuvo una desviación estándar relativa del 6% o inferior.

Por otro lado, se estudió la respuesta del sensor frente a concentraciones crecientes de hidracina mediante medidas cronoamperométricas. Para ello se introdujo el electrodo de carbón vítreo modificado en una disolución de tampón fosfato 0.1 M ($\text{pH } 7.5$) sobre la que se añadieron cantidades crecientes de hidracina y se aplicó un potencial de $+0.42 \text{ V}$ durante 60 segundos, tiempo necesario para que la corriente del transitorio obtenido alcanzara el estado estacionario. Se observó como la intensidad de corriente aumentaba con la concentración de sustrato. Con la recta de calibrado obtenida se calcularon los distintos parámetros analíticos. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron no mejoraron los obtenidos con la voltamperometría cíclica.

Técnica	Ecuación ($10^4 I_{cat}/\Gamma$ vs[Hidracina])	Respuesta lineal (mM)	Límite de detección (M)	Límite de determinación (M)	D.E.R. (%)
Voltamperometría Cíclica	$y=3.5 \times 10^3 + 6.3 \times 10^4 x$ $r=0.999$	Hasta 0.40	1.6×10^{-6}	7.3×10^{-6}	6.0
Cronoamperometría	$y= 7.8 \times 10^2 + 5.1 \times 10^4 x$ $r=0.998$	Hasta 0.46	5.8×10^{-6}	2.2×10^{-5}	8.4

Tabla 8: Propiedades analíticas del sensor de hidracina según la técnica de análisis empleada.

Cuando las características analíticas (Tabla 8) se comparan con las de otros dispositivos previamente desarrollados y reportados en la bibliografía, se aprecia que los límites de detección alcanzados son similares o incluso mejores, con la ventaja añadida de la sencillez en el método de modificación del electrodo y el bajo potencial al que se lleva a cabo la medida (Golabi y cols, 2001; Ozoemena y Nyokong, 2005; Wang y cols, 2000; Zhao y cols, 2002). A la vista de estos resultados, se puede concluir que el sensor desarrollado reúne las propiedades analíticas necesarias como para ser utilizado en la determinación de hidracina.

CAPÍTULO IV

MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO CON EL COMPLEJO [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺

Los isómeros del DHsalophen sintetizados en este trabajo, cuyas propiedades como mediadores redox se han estudiado en capítulos anteriores, poseen en su estructura grupos azometino e hidroxilo que les confieren propiedades como potenciales ligandos tetradentados de base de Schiff, pudiendo formar complejos estables con diferentes cationes metálicos. Con este objetivo, se eligió el isómero que poseía un grupos hidroxilo en posición α respecto del grupo azometino y el otro hidroxilo en posición *para* respecto al primer hidroxilo, para minimizar el impedimento estérico en la formación del complejo. Teniendo en cuenta estas condiciones, el isómero elegido como ligando para la formación de complejos fue el 2,5-DHsalophen. A la hora de estudiar las propiedades catalíticas de los posibles complejos metálicos del 2,5-DHsalophen, se eligió el complejo con níquel (II) ([Ni-2,5-DHsalophen]²⁺) dado que varios autores han descrito las propiedades de algunos complejos de níquel como agentes modificadores debido a que en medio alcalino son capaces de formar películas poliméricas conductoras sobre la superficie de electrodos de carbón vítreo, y los electrodos modificados resultantes presentan características catalíticas interesantes frente a la electrooxidación de metanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta.

1. Preparación y caracterización del complejo [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺

Para preparar el complejo metálico objeto del presente estudio (inserto Figura 21) se ha hecho reaccionar el isómero 2,5-DHsalophen con nitrato de níquel (II), siendo la relación estequiométrica de un mol de ligando por cada mol de metal. Esta relación estequiométrica ha sido descrita para otros complejos metálicos con ligandos similares al 2,5-DHsalophen (Gholivand y cols, 2005). De este modo se ha llevado a cabo la preparación del complejo “in situ”, tal y como se describe en la parte experimental.

Para evitar problemas debidos a la escasa solubilidad del 2,5-DHsalophen en agua y la formación de óxidos e hidróxidos de níquel en medio acuoso, se estudió la formación del complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en acetona. Se recogieron los espectros de absorción de disoluciones que contenían por separado el ligando 2,5-DHsalophen ($50 \mu\text{M}$), $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (2 mM) y la disolución del complejo una vez formado a una concentración final de $50 \mu\text{M}$ (Figura 24). Como se puede observar, tras la adición del metal a la disolución de ligando, se observa un cambio de color del amarillo a rojo (insertos Figura 24). El espectro del ligando presenta una banda de absorción a 380 nm correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ de los electrones presentes en los grupos azometino (Estiu y cols, 1996). Cuando se forma el complejo, esta transición electrónica sufre un desplazamiento del máximo de absorción hacia el rojo desde 360 nm a 380 nm . Además, aparece una nueva banda de absorción en la región del visible (520 nm) atribuible a transiciones de transferencia de carga metal-ligando ($d \rightarrow \pi$).

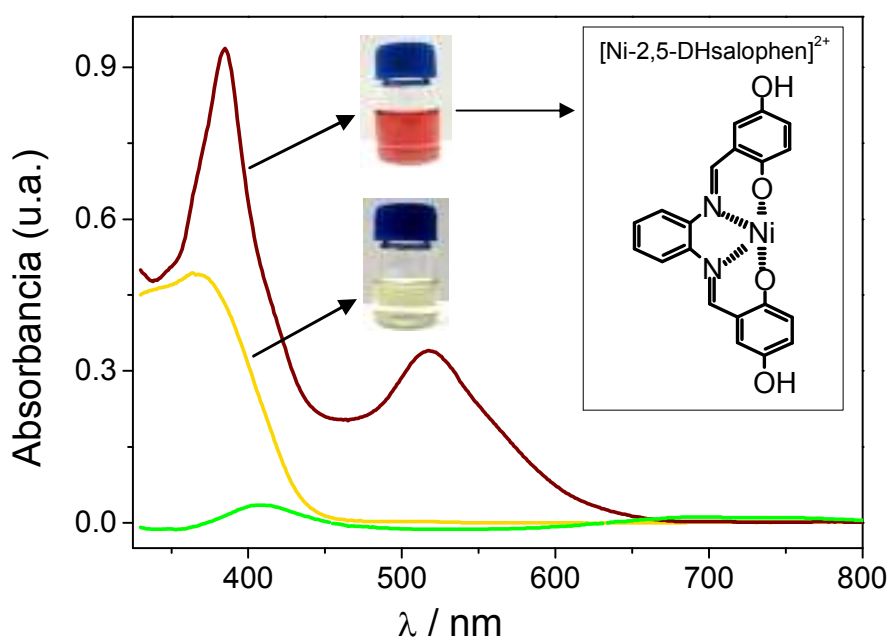


Figura 24: Espectros de absorción UV-visible de $50 \mu\text{M}$ de 2,5-DHsalophen (—), 2.0 mM de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (—), $50 \mu\text{M}$ de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ (—) en acetona. En el inserto se muestra la estructura del complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$.

Con la finalidad de obtener más información acerca de la estequiometría del complejo formado, se determinó la composición del complejo en disolución mediante espectrofotometría de absorción utilizando el método de la fracción molar. Para ello, se prepararon disoluciones en acetona que contenían una concentración constante de ligando ($15 \mu\text{M}$) y una concentración de metal variable entre 0 y $55 \mu\text{M}$, de manera que la relación de concentraciones ($[\text{Ni}^{2+}]/[\text{2,5-DHsalophen}]$) se encontraba entre 0 y 3.5. Se obtuvieron los espectros de absorción correspondientes a cada disolución y se representó la absorbancia del complejo (520 nm) frente a la relación de concentraciones. Como se muestra en la Figura 25, se han obtenido dos líneas rectas de diferente pendiente, produciéndose la intersección cuando la relación metal/ligando es uno, que corresponde a la estequiometría del complejo.

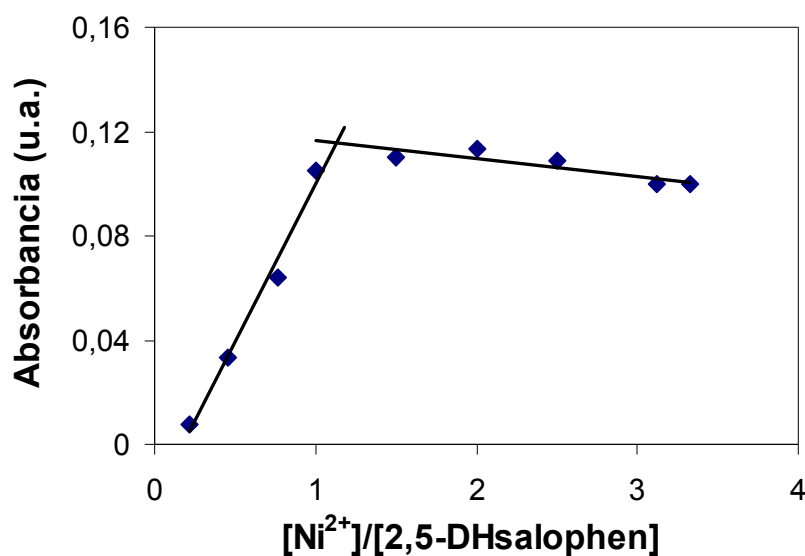


Figura 25: Relación entre la absorbancia del complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ ($\lambda_{\text{max}}=520 \text{ nm}$) y la relación de concentraciones $[\text{Ni}^{2+}]/[\text{2,5-DHsalophen}]$.

El comportamiento electroquímico del ligando 2,5-DHsalophen así como del complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ se estudió en disolución alcalina (NaOH 0.1 M) utilizando como electrodo de trabajo electrodos de carbón vítreo recién pulidos y sin activar. En ambos casos, el potencial se cicló entre 0.0 V y +1.0 V a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} . El ligando solo, en este medio tan alcalino, muestra una respuesta electroquímica caracterizada por voltamperogramas planos sin picos visibles tanto en el barrido anódico inicial como en el correspondiente barrido catódico. Este comportamiento ya ha sido descrito para otros compuestos con estructuras similares que contienen grupos funcionales hidroquinona/quinona, tales como curcumina (Ciszewski, 1995), vanillina (Vermillion y Pearl, 1964) y guaiacol (Vasileva y cols, 1993), y se atribuye a la formación de películas poliméricas sobre la superficie del electrodo con poca o ninguna conductividad. Estas películas de material electrodepositado inhiben la respuesta del electrodo impidiendo la transferencia de carga.

El complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ muestra un comportamiento muy similar durante el primer barrido cíclico (Figura 26). Sin embargo, a partir del segundo barrido se pone de manifiesto la existencia de un proceso redox con un potencial formal de +0.40 V correspondiente al sistema $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$.

Con los barridos sucesivos de potencial se observa como la intensidad de corriente aumenta progresivamente con el número de ciclos. Este hecho sugiere que, durante el ciclado del potencial, el complejo se está depositando sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo formando una película electroactiva. El crecimiento de la película se pone de manifiesto con el aumento de las corrientes de pico anódico y catódico a +0.45 V y +0.35 V, respectivamente. Para comprobar la estabilidad y la adherencia de estas películas electrodepositadas, se sacó el electrodo de la disolución alcalina de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$, se lavó con agua y se colocó en una disolución 0.1 M de NaOH. Al realizar la voltamperometría cíclica entre 0.0 V y +0.7 V, se observa la respuesta electroquímica del sistema redox $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ poniéndose de manifiesto que la película polimérica obtenida muestra una gran adherencia a la superficie del electrodo de carbón vítreo.

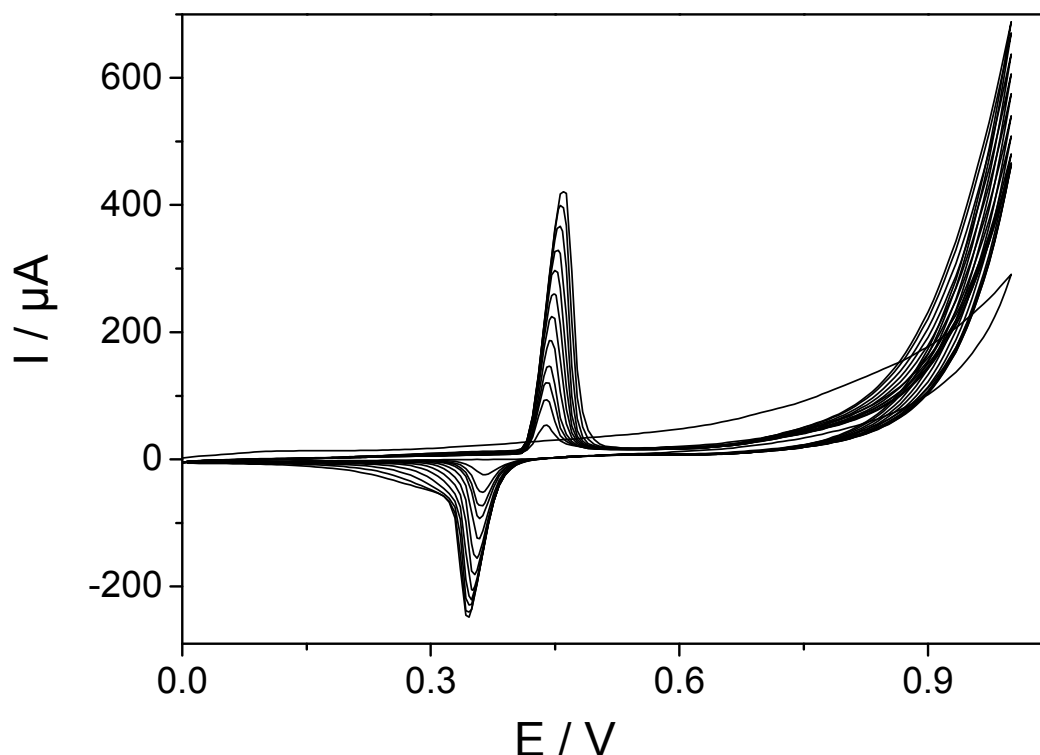


Figura 26: Voltamperogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} de una disolución 0.1 mM de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en $\text{NaOH } 0.1\text{M}$ con un electrodo de carbón vítreo.

Antes de caracterizar y optimizar el proceso de electrodeposición de las películas de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$, se comprobó que la oxidación de Ni^{2+} a Ni^{3+} ocurre sólo en las películas poliméricas de complejo. Para ello, se estudió la respuesta ciclovoltamperométrica de una disolución de metal con un electrodo de carbón vítreo y apenas se observó el proceso de oxidación. Algunos autores han descrito la dificultad que conlleva la oxidación de Ni^{2+} a Ni^{3+} en medio acuoso, fuertemente alcalino, debido a la fuerte hidratación de los iones níquel. Por esto, cuando el níquel se encuentra coordinado parcialmente con la película polimérica e hidrofóbica de 2,5-DHsalophen, las condiciones de oxidación del níquel varían sustancialmente (Ciszewski, 1995; Malinski y cols, 1991).

La formación de la película es probablemente similar al caso del ligando libre. La presencia de níquel en la estructura hace que la película se vuelva conductora y permita el crecimiento de un sistema multicapa. Además, estudios por espectroscopia de Raman

llevados a cabo en películas electropolimerizadas de complejos tetraazamacrocíclicos de níquel sobre superficies de electrodos de oro demuestran la presencia de enlaces O-Ni-O en la película formada (Bukowska y cols, 1996). Teniendo esto en cuenta, puede preverse que el complejo planar $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ primero se une a la superficie del electrodo vía puentes oxo y las siguientes capas se construyen a través de los enlaces O-Ni-O. Esta organización de la película multicapa podría explicar la fuerte adherencia del $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ a la superficie del electrodo y la gran estabilidad observada en los electrodos modificados, como se discutirá más adelante.

2. Estudios de optimización del proceso de modificación

Como se ha descrito en el apartado anterior, cuando un electrodo de carbón vítreo se sumerge en una disolución de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en NaOH 0.1 M y se aplican barridos sucesivos de potencial entre 0.0 V y +1.0 V, se observa un par redox correspondiente a la oxidación-reducción de los centros $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ presentes en la película que se está electrodepositando. El crecimiento de la masa depositada se pone de manifiesto a través de incrementos sucesivos de las corrientes de pico catódico y anódico. Como se observa en la Figura 27 (\square), existe un incremento lineal de la corriente de pico anódica con el ciclado continuo de potencial durante los 100 primeros barridos. A partir de entonces, el crecimiento de la intensidad de corriente es menor y, después de 150 barridos de potencial, la intensidad permanece prácticamente constante. La corriente de pico catódica muestra un crecimiento lineal solamente en los primeros 40 barridos (Figura 27, \circ) y a partir de entonces la intensidad es constante. El comportamiento observado durante la electropolimerización sugiere que existen limitaciones de transferencia tanto de masa como de carga asociadas a la reducción de Ni^{3+} a Ni^{2+} en la película conductora. A la vista de los resultados, se consideraron condiciones óptimas para la electrodeposición del $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ la aplicación de 100 barridos de potencial continuos, utilizando una disolución 0.1 mM del compuesto en NaOH 0.1 M.

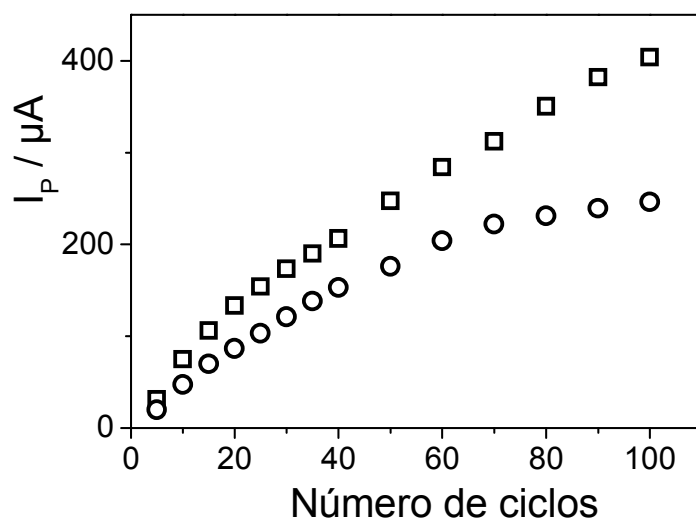


Figura 27: Dependencia de la corriente de pico anódica (□) y catódica (○) con el número de barridos en la etapa de electrodeposición. Electrodo de carbón vítreo en una disolución 0.1 mM de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en NaOH 0.1M.

El hecho de que el $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ se pueda electrodepositar en la superficie del electrodo de forma homogénea mediante la aplicación de barridos continuos de potencial sobre el electrodo no es la única condición necesaria para la preparación de electrodos modificados que puedan ser utilizados con fines analíticos. Se necesita también que las películas electrogeneradas sobre el electrodo sean estables.

Para estudiar la estabilidad de los electrodos modificados con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$, se modificaron electrodos de carbón vítreo con el complejo, siguiendo el procedimiento descrito, y se estudió la evolución de la respuesta del electrodo tras la aplicación continua de barridos cíclicos de potencial entre 0.0 V y +0.7 V en NaOH 0.1 M, sin complejo en disolución. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 28 y 29. Como puede observarse en la Figura 28, tanto los potenciales de pico como el potencial formal del sistema $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ sufren un ligero desplazamiento a valores menos positivos durante los primeros barridos en NaOH 0.1 M, para después permanecer estables durante al menos 50 barridos. Este resultado indica que las condiciones de

transferencia de carga se mantienen constantes una vez estabilizados los respectivos potenciales de pico.

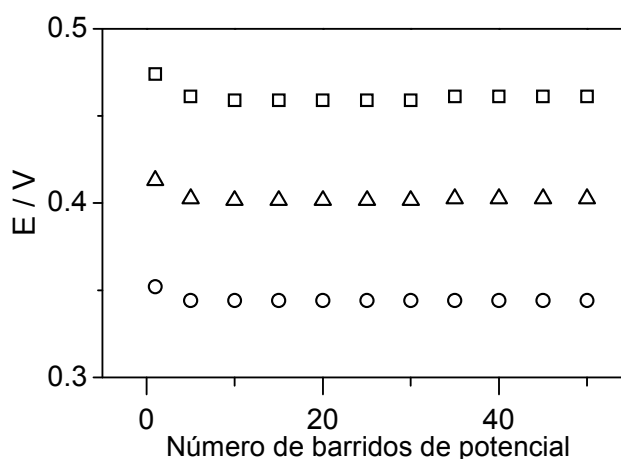


Figura 28: Dependencia del potencial anódico (□), catódico (○) y formal (△) de la superficie de un electrodo de carbón vítreo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ con el número de barridos de potencial aplicados en la etapa de acondicionamiento.

En la Figura 29 se representa la disminución del recubrimiento del electrodo para la onda anódica y catódica, con el número de barridos de potencial aplicados. La pérdida de material electrodepositado fue mayor durante los primeros barridos de potencial, disminuyendo posteriormente. De hecho, después de 50 barridos la pérdida de material electroactivo es del orden del 10%. Este material correspondería a las moléculas más débilmente adsorbidas al electrodo. Tras esa pérdida inicial de material, el recubrimiento disminuye más lentamente manteniéndose bastante estable tras los siguientes 300 barridos. Por otra parte, la disminución paulatina en la transferencia de carga puede deberse a problemas de difusión de especies oxigenadas (iones OH^-) a través de la película y no a pérdidas reales de material polimérico depositado sobre el electrodo. La influencia de los iones hidroxilo sobre las películas electrodepositadas se estudiará con más detalle en el siguiente apartado.

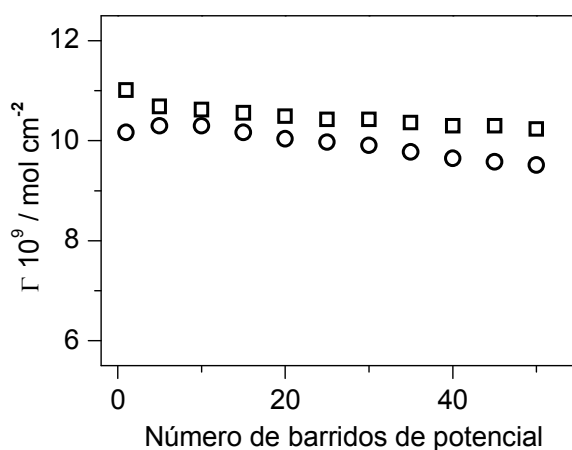


Figura 29: Variación del recubrimiento anódico (□) y catódico (○) de la superficie de un electrodo de carbón vítreo modificado con [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ en función del número de ciclos de potencial aplicados en la etapa de acondicionamiento en NaOH 0.1 M.

Después de 50 barridos de acondicionamiento en NaOH 0.1 M, los electrodos modificados con películas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ presentan unos potenciales de pico para el sistema redox Ni²⁺/Ni³⁺ de +0.46 V y +0.34 V para el proceso anódico y catódico, respectivamente, y el potencial formal (E^{0'}) a 100 mV s⁻¹ es +0.40 V (Figura 30). Aunque la relación de transferencia de carga entre los procesos anódico y catódico es aproximadamente la unidad (Q_a/Q_c = 1.08), es de resaltar que la relación entre corrientes de pico es muy diferente de la unidad (I_{pa}/I_{pc} = 1.8). Además, en los electrodos modificados y acondicionados la diferencia entre los potenciales de pico es de +0.120 V. Estos resultados indican que la transferencia de carga en estos electrodos muestra ciertas limitaciones cinéticas que probablemente se deban a la necesidad de que se formen especies oxigenadas intermedias en la matriz polimérica (óxidos e hidróxidos de níquel) que son importantes, sobre todo, en el proceso de reducción de Ni³⁺ a Ni²⁺.

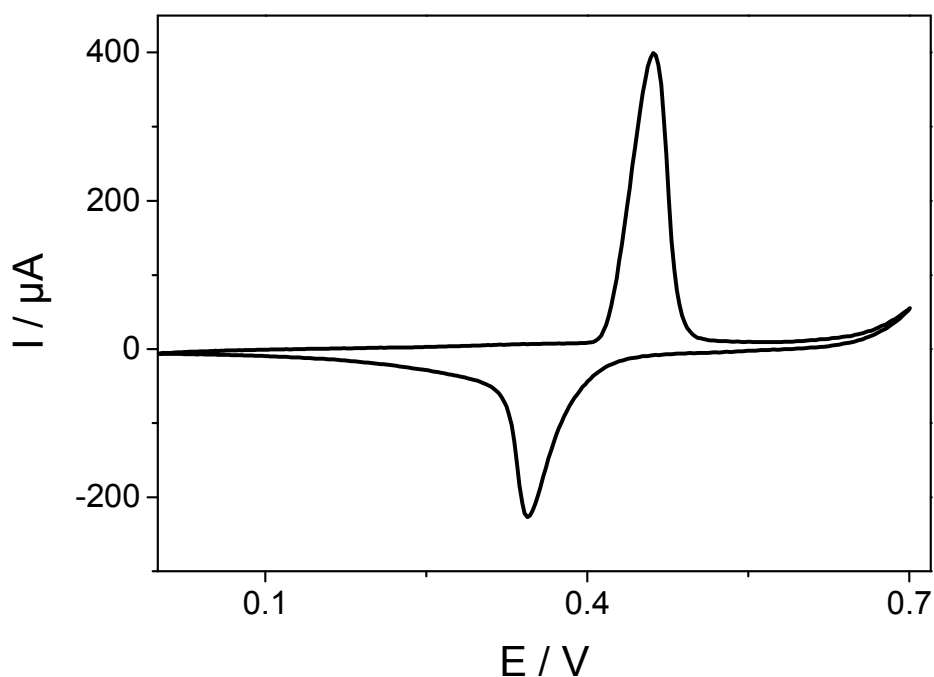


Figura 30: Voltamperograma cíclico de un electrodo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ según el procedimiento de electropolimerización y acondicionamiento descrito en la parte experimental, en NaOH 0.1 M a 100 mV s^{-1} .

De acuerdo con los experimentos de electropolimerización y acondicionamiento realizados, la modificación de los electrodos de carbón vítreo se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa de electropolimerización, el electrodo de carbón vítreo se sumerge en una disolución de NaOH 0.1 M que contiene el complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ y se le aplican 100 barridos continuos de potencial. En la segunda etapa, o etapa de acondicionamiento, los electrodos modificados obtenidos en la etapa anterior se sumergen en una disolución de NaOH 0.1 M que no contiene el complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ y se aplican 50 barridos continuos de potencial entre 0.0 y +0.7 V a 100 mV s^{-1} .

3. Cinética de transferencia electrónica para películas electrodepositadas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺

La teoría predice que el comportamiento voltamperométrico de un electrodo modificado con una monocapa de un sistema reversible tanto química como electroquímicamente se caracteriza por presentar picos anódicos y catódicos simétricos, con una ΔE_p cercana a cero y corrientes de pico proporcionales a la velocidad de barrido. Los electrodos modificados con películas electroactivas gruesas o espesas, como las derivadas del [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺, pueden llegar a desviarse del comportamiento anteriormente descrito para monocapas, indicando la presencia de limitaciones de transporte de masa a través de la película. La Figura 31A muestra los voltamperogramas cíclicos de un electrodo de carbón vítreo modificado con [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ en una disolución de NaOH 0.1 M a diferentes velocidades de barrido en el intervalo entre 0.02 y 1.0 V s⁻¹. Como puede observarse, el potencial de pico anódico se desplaza considerablemente hacia potenciales más positivos al aumentar la velocidad de barrido, mientras que el potencial de pico catódico muestra sólo un leve desplazamiento hacia potenciales más negativos. Además, la separación entre picos en todos los voltamperogramas cíclicos es mayor de 60 mV, incluso a velocidades de barrido bajas (Figura 31A). Estos resultados corroboran que los electrodos modificados con películas espesas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ presentan transiciones redox lentas entre el electrodo y los centros redox del níquel. Por otro lado, las corrientes de pico presentan una dependencia lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 31B). Esta dependencia lineal de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido puede justificarse si se considera que la transferencia de carga está limitada por la difusión de los iones OH⁻ a través de la película.

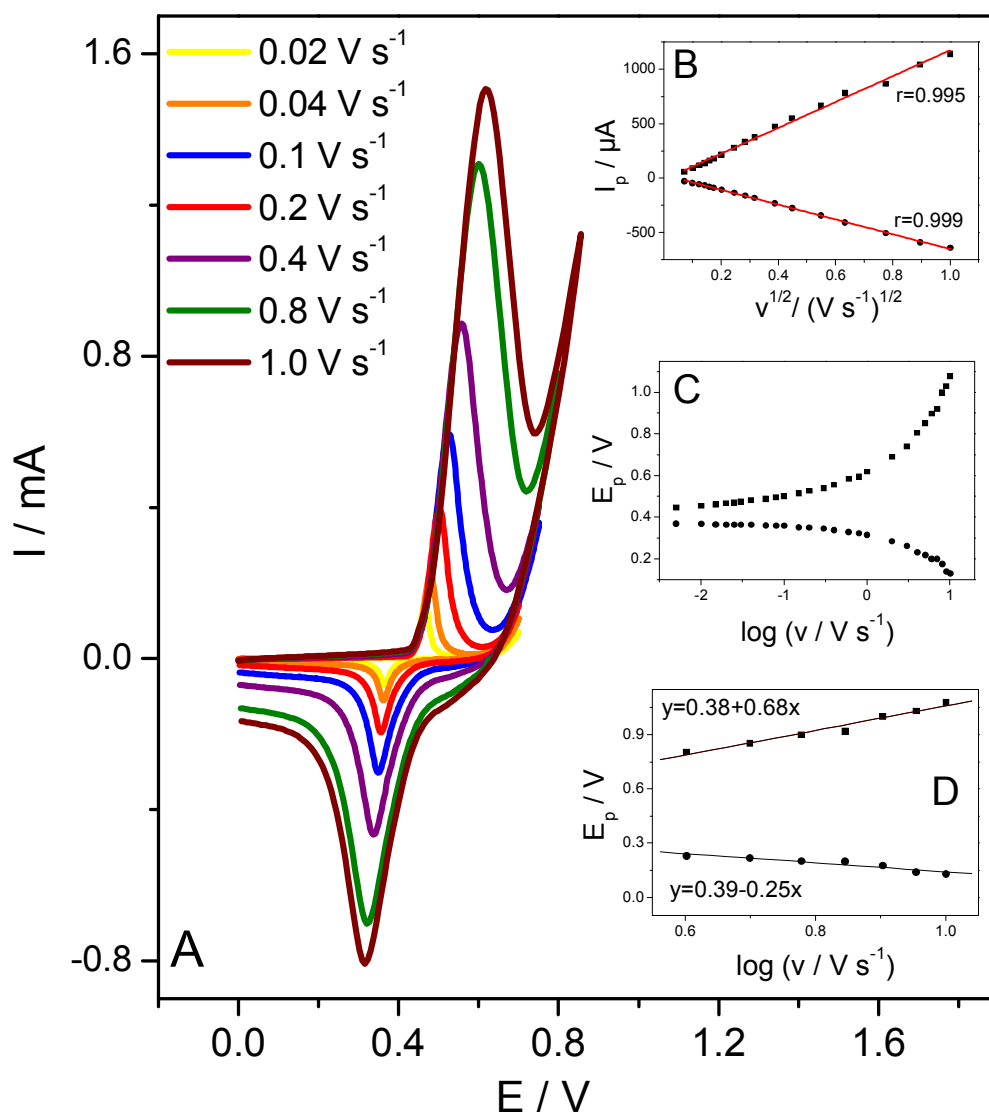


Figura 31: (A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ M}$ a diferentes velocidades de barrido. (B) Relación lineal de la intensidad de pico anódica y catódica del electrodo modificado y la raíz cuadrada de la velocidad. (C) Variación del potencial de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido. (D) Ampliación de la gráfica anterior para velocidades de barrido altas.

Por otra parte, los valores de anchura de pico medio anódico ($\Delta E_{pa\ 1/2}$) en el intervalo de velocidades de barrido entre 5 y 200 mV s^{-1} son menores de lo esperado para sistemas confinados en la superficie de un electrodo, es decir, 90.6 mV para un proceso en el que se intercambia un solo electrón. Este resultado sugiere la existencia de interacciones de atracción fuertes entre los sitios redox y la película (Andrieux y Saveant, 1980).

Para velocidades de barrido superiores a $1.0\ \text{V s}^{-1}$, el valor ΔE_p aumenta significativamente. Al igual que en el caso de los ligandos, se ha determinado la constante de velocidad de transferencia de carga (k_s); así como el coeficiente de transferencia (α) para el complejo [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺, depositado sobre electrodos de carbón vítreo, mediante el método de Laviron (Laviron, 1979). En la Figura 31C se muestra la variación de los potenciales de pico anódico y catódico con el logaritmo de la velocidad, observándose una relación lineal a partir de velocidades de barrido superiores a $4.0\ \text{V s}^{-1}$ (Figura 31D). El análisis de estos resultados siguiendo el método de Laviron (ya descrito en capítulos anteriores) ha permitido calcular unos valores de k_s y α de $18\ \text{s}^{-1}$ y 0.6, respectivamente, suponiendo el intercambio de un electrón. El valor de k_s obtenido es muy inferior al reportado por Majdi y colaboradores para un electrodo de carbón vítreo modificado con un complejo de Ni-curcumina (Majdi y cols, 2007).

4. Influencia del pH en la respuesta de los electrodos modificados

Algunos autores han intentado explicar tanto el mecanismo de electropolimerización como el comportamiento electroquímico de complejos planares de níquel en medio básico (Roslonek y Taraszewska, 1992; Trevin y cols, 1997). De acuerdo con estos autores, la unión de los complejos de níquel a la superficie de los electrodos y el comportamiento electroquímico de las películas obtenidas en medio básico están estrechamente relacionadas con la oxidación de los aniones OH^- . Por lo tanto, se puede esperar un comportamiento bastante similar para los electrodos modificados con películas derivadas del $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$.

Para el estudio de la influencia de la concentración de los iones OH^- en el proceso de polimerización, se analizó la respuesta electroquímica de electrodos modificados con películas derivadas de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en disoluciones de diferente concentración de NaOH cuyos pH se encontraban en el intervalo entre 11.0 y 14.7 (Figura 32). Cuando la concentración de NaOH es menor de 0.1 M, el perfil de los voltamperogramas cíclicos presenta picos anchos y una separación entre picos (ΔE_p) grande, lo que sugiere que existen limitaciones cinéticas en la transferencia de carga. Al aumentar la concentración de iones hidróxido, ΔE_p disminuye hasta alcanzar un valor constante de 80 mV a pH 14.0. Además, el potencial formal, E^0 , del sistema redox $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ muestra una dependencia lineal con el pH con un valor de pendiente cercano a 0.084 V/pH (inserto Figura 32).

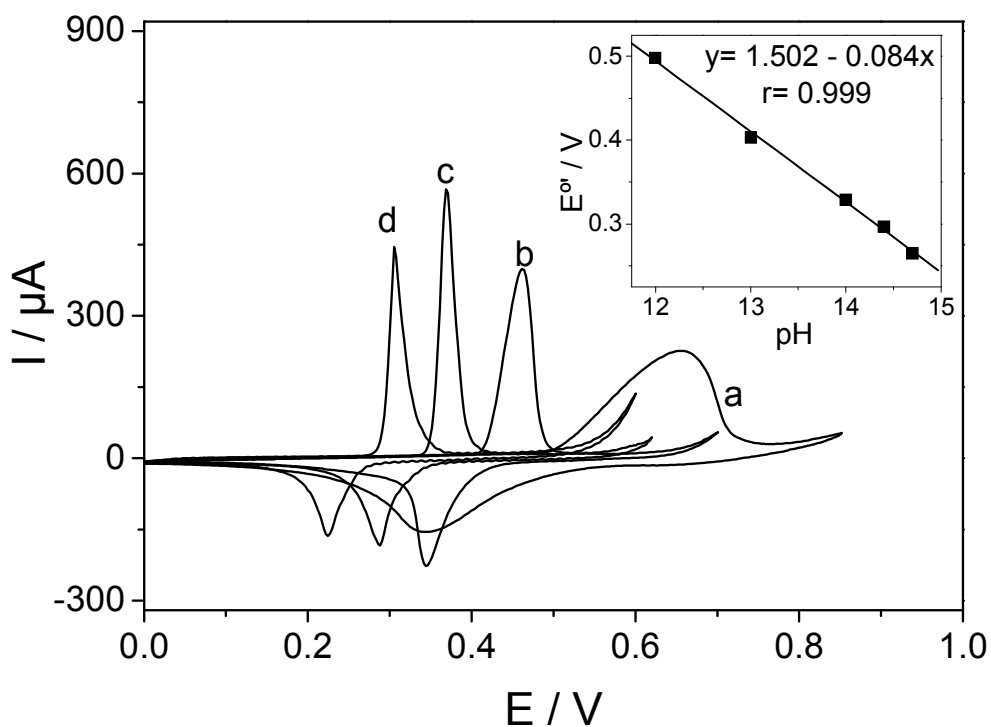


Figura 32: Voltamperograma cíclico de un electrodo modificado con [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ acondicionado en diferentes disoluciones de NaOH a (a) pH 12.0; (b) pH 13.0; (c) pH 14.0; (d) pH 14.7. La velocidad de barrido en todos los casos es 100 mV s⁻¹. Inserto: Dependencia de E^{0r} vs pH para los voltamperogramas cíclicos de la Figura.

De acuerdo con estos resultados, es importante señalar que el comportamiento electroquímico mostrado por los electrodos modificados con películas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ es bastante similar a los comportamientos observados anteriormente por otros autores para películas derivadas del hidróxido de níquel. Además, otras películas derivadas de compuestos de níquel muestran una dependencia con el pH similar en medio básico (Cataldi y cols, 1995; Pasquini y Tissot, 1996).

5. Electrooxidación de alcoholes sobre electrodos de carbón vítreo modificados con [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺

Existe en la literatura científica gran cantidad de información sobre la capacidad de algunos complejos planares de Ni²⁺ para actuar como catalizadores en la oxidación de alcoholes alifáticos de cadena corta en medios alcalinos (Malinski y cols, 1991). Por tanto, el estudio de la capacidad de los electrodos de carbón vítreo modificados con películas electroactivas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ para electrooxidar alcoholes de cadena corta, puede ser el paso previo para diseñar un sensor más o menos específico de este tipo de analitos que son de gran interés, especialmente metanol y etanol.

Para iniciar el estudio se eligió como modelo experimental la electrooxidación de metanol, que es el compuesto más sencillo de la serie. La reacción de oxidación del metanol es un proceso complejo que puede llegar a implicar la transferencia de hasta seis electrones, si el producto final es CO₂. En estas condiciones, el potencial termodinámico de la reacción es +0.02 V frente al electrodo normal de hidrógeno (Iwasita, 2002). En este proceso pueden aparecer formaldehído, ácido fórmico y CO, como intermedios estables de reacción.

La oxidación directa de metanol sobre electrodos de carbón vítreo pulidos y sin activar, en NaOH 0.1 M se muestra en la Figura 33A, donde se observa cómo la oxidación de metanol no es posible llevarla a cabo antes de la oxidación del propio electrolito soporte. El resultado para el resto de alcoholes que se han estudiado (etanol, 1-propanol, 2-propanol y 1-butanol) es similar al descrito para el metanol.

Con el fin de estudiar la capacidad de los electrodos modificados con películas electroactivas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ para llevar a cabo la oxidación electrocatalítica de los alcoholes, se modificó un electrodo de carbón vítreo con el complejo, obteniéndose su respuesta voltamperométrica a 20 mV s⁻¹ en presencia y en ausencia de cada alcohol. Los resultados para el caso del metanol se muestran en la Figura 33B. En ausencia de metanol, se observa la respuesta redox bien definida característica del electrodo modificado con la película de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺, descrita previamente. En presencia de alcohol, el

electrodo modificado con películas electropolimerizadas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ presenta una potente actividad electrocatalítica para la oxidación de metanol. El proceso de electrooxidación tiene lugar en dos regiones distintas de potencial. La primera de ellas corresponde a la oxidación de Ni²⁺ a Ni³⁺ a un potencial de +0.45 V (a1). Este potencial es 40 mV más positivo que el encontrado para la misma transición en el electrodo modificado pero en ausencia de metanol.

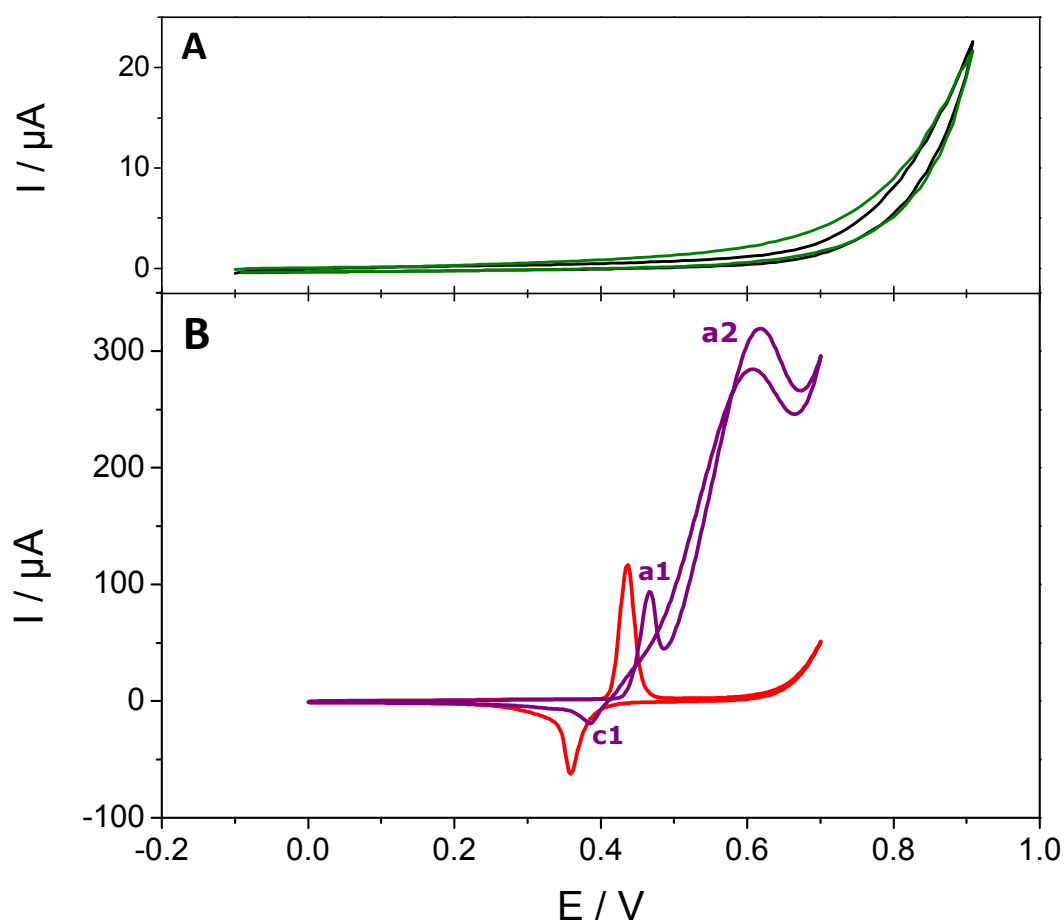



Figura 33: (A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo sin modificar en NaOH 0.1 M (—) o en presencia de metanol 0.1 M (—). (B) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ en NaOH 0.1 M en ausencia (—) y en presencia (—) de metanol 0.1 M. Velocidad de barrido 20 mV s⁻¹.

Este resultado claramente sugiere una interacción entre el metanol y los centros redox de la película que están confinados en la superficie del electrodo. En la segunda región del potencial, aparece una onda catalítica con un potencial de pico (a2) a +0.62 V y una intensidad del orden de 300 μA . En el barrido de potencial de vuelta no se observa pico de reducción. Durante este barrido catódico, el metanol sigue oxidándose y, por ello, se observa un pico de potencial en +0.60 V. Finalmente, la corriente catódica decae y se observa un pequeño pico catódico correspondiente a la reducción del Ni^{3+} a Ni^{2+} (c1).

A lo largo del capítulo se ha descrito que en disoluciones alcalinas, el ión Ni^{2+} muestra una escasa actividad redox debido a la fuerte hidratación de estos cationes y a la formación de los correspondientes hidróxidos. Sin embargo, también está descrito que el hidróxido de níquel puede electrodeponerse sobre electrodos de carbón y oro dando lugar a películas electroactivas. Con objeto de corroborar que la catálisis observada en la Figura 33 se debe fundamentalmente a la actividad de las películas electrodepositadas de $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ se realizó un experimento de control de catálisis de metanol sobre películas de hidróxido de níquel para comprobar los resultados. Por tanto, los electrodos de carbón vítreo se modificaron por electrodeposición de iones Ni^{2+} en disolución de NaOH 0.1 M. Para ello un electrodo de carbón vítreo se sumergió en una disolución de NaOH 0.1 M que contenía 0.1 mM de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ y se aplicaron 100 barridos continuos de potencial a 100 mV s^{-1} . Posteriormente se llevó a cabo la etapa de acondicionamiento, consistente en la aplicación de 50 barridos continuos de potencial en una disolución de NaOH 0.1 M. Una vez modificado el electrodo, se estudió la respuesta voltamperométrica en ausencia y en presencia del alcohol a 20 mV s^{-1} .

Como puede observarse en la Figura 34 () los electrodos modificados con estas películas electroactivas presentan una respuesta redox reversible debida al sistema $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$, que está confinado en la superficie del electrodo. En una disolución de NaOH 0.1 M que no contiene iones níquel, estos electrodos muestran 2 picos a un potencial de +0.47 V y +0.41 V para el proceso anódico y catódico, respectivamente, y una separación de los potenciales de pico, ΔE_p , de 60 mV, muy cercano al valor Nerstiano predicho para un proceso redox reversible. En presencia de metanol se observa una onda catalítica muy

poco definida a +0.58 V (Figura 34, —), con una corriente de pico que es al menos 35 veces menor que en el caso de electrodos modificados con películas derivadas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺. Estos resultados indican que la electropolimerización del [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ en electrodos de carbón vítreo da lugar a películas tridimensionales con una gran densidad de centros redox activos y por lo tanto presentan una gran eficacia catalítica frente a la electrooxidación de metanol.

Por otra parte, se llevó a cabo un experimento control modificando un electrodo de carbón vítreo con el ligando 2,5-DHsalophen para estudiar su eficacia en la electrooxidación catalítica del alcohol. Cuando los electrodos modificados se sumergieron en una disolución de NaOH 0.1 M que contenía 0.1 M de metanol, no se apreció la oxidación electrocatalítica del mismo. De esta manera se corrobora que la catálisis observada en el caso del electrodo modificado con películas conductoras de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ se debe a la presencia del complejo y no del ligando de base de Schiff.

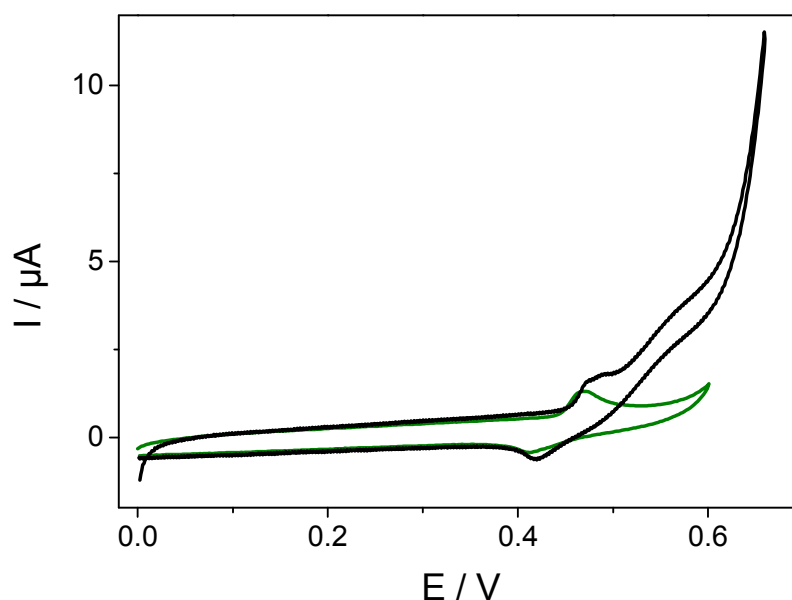


Figura 34: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de carbón vítreo modificado con Ni(NO₃)₂ en NaOH 0.1 M en ausencia (—) y en presencia (—) de metanol 0.1 M. Velocidad de barrido 20 mV s⁻¹.

Del mismo modo se ha estudiado si los electrodos de carbón vítreo modificados con películas conductoras derivadas del $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ podían actuar como catalizadores en la electrooxidación de otros alcoholes alifáticos de cadena corta. La Figura 35 muestra el barrido anódico de los voltamperogramas cíclicos obtenidos cuando el electrodo modificado se sumerge en disoluciones 0.1 M del correspondiente alcohol. Con la intención de clarificar la figura, sólo se muestra el barrido anódico.

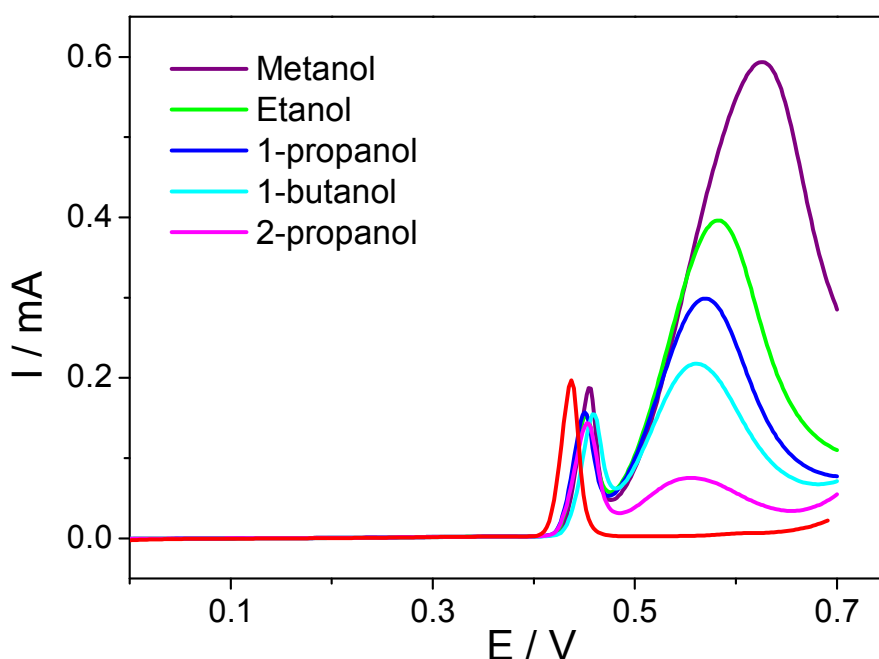


Figura 35: Voltamperograma cíclico (sólo se muestran los barridos anódicos) del electrodo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ (—) en NaOH 0.1 M, en presencia de metanol 0.1 M (—); etanol 0.1 M (—); 1-propanol 0.1 M (—); 1-butanol 0.1 M (—) y 2-propanol 0.1 M (—).

Como se puede observar, el comportamiento es muy similar al caso del metanol, ya que la oxidación de los diferentes alcoholes da lugar a dos ondas anódicas distintas. La primera de ellas a un potencial de +0.45 V, valor muy similar en todos los casos, e indica que la oxidación de Ni^{2+} a Ni^{3+} en la película conductora es independiente del alcohol presente en disolución. La segunda onda es la onda catalítica y sufre un desplazamiento

hacia potenciales más negativos en comparación con el metanol: etanol +0.59 V, 1-propanol +0.57 V, 1-butanol +0.56 V y 2-propanol +0.55 V. Además, las corrientes de pico catalíticas disminuyen al aumentar la longitud de la cadena alifática. Si se comparan las señales obtenidas para el 1-propanol y el 2-propanol se observa una disminución tanto en el potencial de pico como en la intensidad de corriente. Es decir, al aumentar la ramificación de la cadena, disminuye la corriente catalítica y el potencial de pico. En conclusión, se puede decir que un aumento del número de carbonos y de la ramificación de la cadena alifática provoca una disminución de la señal analítica.

Estos resultados permiten afirmar que, los electrodos modificados con películas electroactivas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ son efectivos como catalizadores en el proceso de oxidación de metanol y de otros alcoholes alifáticos de cadena corta y pueden ser utilizados como base para el diseño de sensores amperométricos para la determinación de estos analitos.

CAPÍTULO V

DESARROLLO DE UN SENSOR DE METANOL BASADO EN UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADO CON [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺

La determinación cuantitativa de alcoholes alifáticos de cadena corta, en especial el metanol y el etanol, tiene un gran interés para la industria alimentaria, así como para la química clínica. La determinación de alcoholes en alimentos y bebidas es interesante desde muchos puntos de vista, como son el control de calidad para la detección de posibles alteraciones, los procesos naturales que controlan su obtención o el efecto de los procesos tecnológicos en productos destinados al consumo humano (Amelio, 1996). En particular, el metanol es un ingrediente utilizado ilegalmente en la producción de bebidas alcohólicas. La ingesta de metanol supone una intoxicación grave debido a la acumulación de metabolitos tóxicos como el ácido fórmico o el formaldehído. Por ello, es necesario un control de su concentración en bebidas que puedan contenerlo (Bindler y cols, 1988).

Para la determinación de alcoholes se han desarrollado numerosos métodos de análisis. Como ejemplos pueden citarse los métodos que emplean cromatografía de gases (Lee y cols, 1999), cromatografía de líquidos de alta eficacia (Tagliaro y cols, 1991), así como métodos espectrofotométricos (Upadhyay y Gupta, 1984) o métodos electroquímicos basados en el uso de electrodos de platino y de oro o de electrodos de carbón vítreo modificados (Cai y cols, 1997).

Dentro de los numerosos métodos de análisis que existen para la determinación de alcoholes, principalmente metanol y etanol, los electroquímicos son una buena opción ya que emplean una instrumentación sencilla y proporcionan alta sensibilidad y selectividad y tiempos de respuesta cortos. Sin embargo, la cinética lenta de la oxidación de los alcoholes en la mayoría de los materiales de fabricación de electrodos es uno de los problemas aún por resolver y representa un impedimento serio en el uso de métodos electroquímicos basados en la oxidación directa de estos compuestos sobre un electrodo, con propósitos analíticos.

Por este motivo, se han llevado a cabo un gran número de investigaciones con la finalidad de disminuir el elevado sobrepotencial necesario para la oxidación directa de

metanol y de otros alcoholes alifáticos de cadena corta, sobre la mayoría de las superficies de electrodos (Fleischm.M y cols, 1971; Iwasita, 2002; Nonaka y Matsumura, 2002) o sobre electrodos modificados químicamente. Para el estudio del mecanismo y la cinética de oxidación del metanol se han usado electrodos modificados de Pt y Ni (Golikand y cols, 2006; Golikand y cols, 2005; Losada y cols, 1998; Samant y Fernandes, 1999), aleaciones Pt-Cu o Ni-Cu (Jafarian y cols, 2006; Schmidt y cols, 1999), electrodos de carbón vítreo modificados con hidróxido de níquel o cobalto (El-Shafei, 1999; Jafarian y cols, 2003). Además, se han utilizado diferentes complejos de Ni como Ni^{II}-salen (Trevin y cols, 1997), complejos Ni^{II}-tetraazamacrocíclicos (Roslonek y Taraszewska, 1992), Ni^{II}-curcumina (Ciszewski, 1995), Ni^{II}-tetrakis(3-metoxi-4-hidroxifenil)porfirina (Ciszewski y Milczarek, 1996) o Ni^{II}-hematoporfirina IX (Golabi y Nozad, 2004), como agentes modificadores debido a que en medio básico son capaces de formar películas poliméricas conductoras sobre la superficie de electrodos de carbón vítreo; y los electrodos modificados resultantes presentan características catalíticas interesantes frente a la electrooxidación de metanol y de otros alcoholes alifáticos de cadena corta.

Los electrodos modificados con películas conductoras de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ tienen la capacidad de catalizar la electrooxidación de diferentes alcoholes alifáticos. Por ello, se estudió la influencia de distintas variables en la electrocatálisis del metanol, con la finalidad de utilizar estos electrodos modificados como sensores de alcoholes. De todos los alcoholes estudiados en el capítulo anterior, se ha elegido el metanol por ser uno de los alcoholes de más interés analítico y con el que mejores respuestas se habían obtenido.

1. Influencia de la velocidad de barrido en la corriente catalítica

De acuerdo con la respuesta electrocatalítica observada en la Figura 33 del Capítulo IV (página 133), la oxidación de metanol de electrodos modificados con películas poliméricas de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ tiene lugar en dos regiones diferentes de potencial. Con el fin de analizar la cinética de transferencia electrónica se estudió el efecto de la velocidad de barrido sobre la corriente de pico catalítica. Para ello, un electrodo modificado con [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ se sumergió en una disolución 0.1 M de metanol en NaOH 0.1 M y se estudió la respuesta de voltamperometría cíclica a distintas velocidades de barrido. Con objeto de clarificar los resultados, la Figura 36 muestra solamente los barridos anódicos de los voltamperogramas cíclicos obtenidos. Puede observarse que a velocidades de barrido muy bajas (1-2 mV s⁻¹) el pico de oxidación del Ni²⁺ a Ni³⁺ en la película polimérica casi desaparece. Esta circunstancia es concomitante con la obtención de una respuesta catalítica máxima con una corriente de pico cercana a 300 μA. Este resultado, que sólo se observa a estas velocidades tan bajas, sugiere que la oxidación de todos los centros de níquel y la formación de los productos intermedios responsables de la interacción con el alcohol, presentan una cinética muy lenta. A partir de 2 mV s⁻¹, el pico de oxidación del sistema Ni²⁺/Ni³⁺ se hace visible y su corriente de pico aumenta con la velocidad de barrido; consecuentemente las corrientes de pico catalíticas posteriores decrecen al aumentar la velocidad de barrido hasta 50 mV s⁻¹. A partir de esta velocidad de barrido, la corriente catalítica de pico permanece casi constante. Estos resultados sugieren que la transformación Ni²⁺/Ni³⁺ es mucho más rápida que la oxidación de metanol en la película derivada de [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺. Aunque velocidades de barrido bajas (2 mV s⁻¹) son óptimas para obtener alta sensibilidad, son poco operativas por el aumento en el tiempo de análisis. Al aumentar la velocidad de barrido (10-20 mV s⁻¹) la diferencia entre las señales analíticas obtenidas no es tan acusada y el tiempo de análisis se reduce de manera significativa. Por tanto, a la vista de los resultados, se eligió una velocidad de barrido de 20 mV s⁻¹ para realizar el resto de estudios.

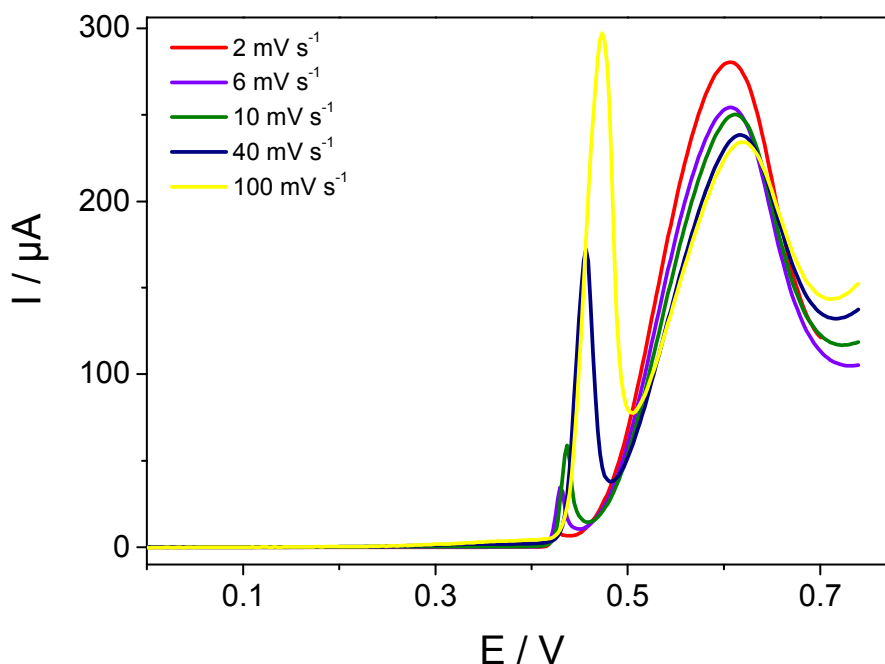


Figura 36: Barridos anódicos de los voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en una disolución de metanol 0.1 M en NaOH 0.1 M a diferentes velocidades de barrido.

2. Influencia del pH en la oxidación electrocatalítica de metanol

Partiendo de los resultados anteriores y teniendo en cuenta que diferentes autores han descrito que la electrooxidación de metanol en electrodos modificados con películas electropolimerizadas de distintos compuestos de níquel depende de la concentración de iones hidróxido (Ciszewski y Milczarek, 1996; Robertson, 1980; Taraszewska y Roslonek, 1994), se estudió la variación de la señal catalítica en función del pH. Para ello se modificaron electrodos de carbón vítreo con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ mediante electrodeposición y se acondicionaron en disoluciones con diferente concentración de NaOH. Esta concentración de NaOH en la que se acondicionaron los electrodos fue la misma en la que, a continuación, se midió la señal voltamperométrica en presencia de metanol. La Figura 37A muestra los voltamperogramas y las intensidades electrocatalíticas normalizadas con el recubrimiento superficial del electrodo en función del pH (Figura 37B)

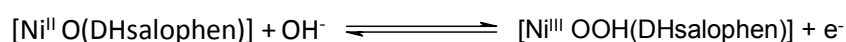
para electrodos modificados con [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ en disoluciones conteniendo distinta concentración de NaOH a las que se añadió metanol en concentración 0.1 M. Estos resultados muestran que las mejores corrientes catalíticas se obtienen a pH 13.0; es decir, la concentración óptima de NaOH es 0.1 M.

En todo el intervalo de pH estudiado, la electrooxidación de metanol tiene lugar siempre a potenciales más positivos que el proceso de oxidación Ni²⁺/Ni³⁺. En base a estos resultados y teniendo en cuenta la información publicada en la literatura (Golabi y Nozad, 2004; Kim y cols, 1997), se propone un posible mecanismo para la oxidación de metanol de acuerdo con las siguientes etapas:

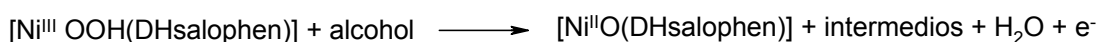
a) formación de [Ni^{II}O(DHsalophen)] en presencia de iones OH⁻;



b) oxidación del metal como consecuencia de los barridos de potencial para obtener [Ni^{III}OOH(DHsalophen)];



c) oxidación del metanol en la película para dar un producto intermedio y [Ni^{II}O(DHsalophen)];



d) reacción del producto intermedio con moléculas oxigenadas presentes en la película, tales como los iones OH⁻, para dar lugar al producto final de oxidación.

Aunque no se han obtenido resultados concluyentes, la secuencia de este mecanismo puede explicar al menos cualitativamente todos los hechos observados experimentalmente.

A pesar de que no se muestran, se han realizado estudios equivalentes usando otros alcoholes de cadena corta, obteniéndose respuestas similares a las obtenidas con el metanol.

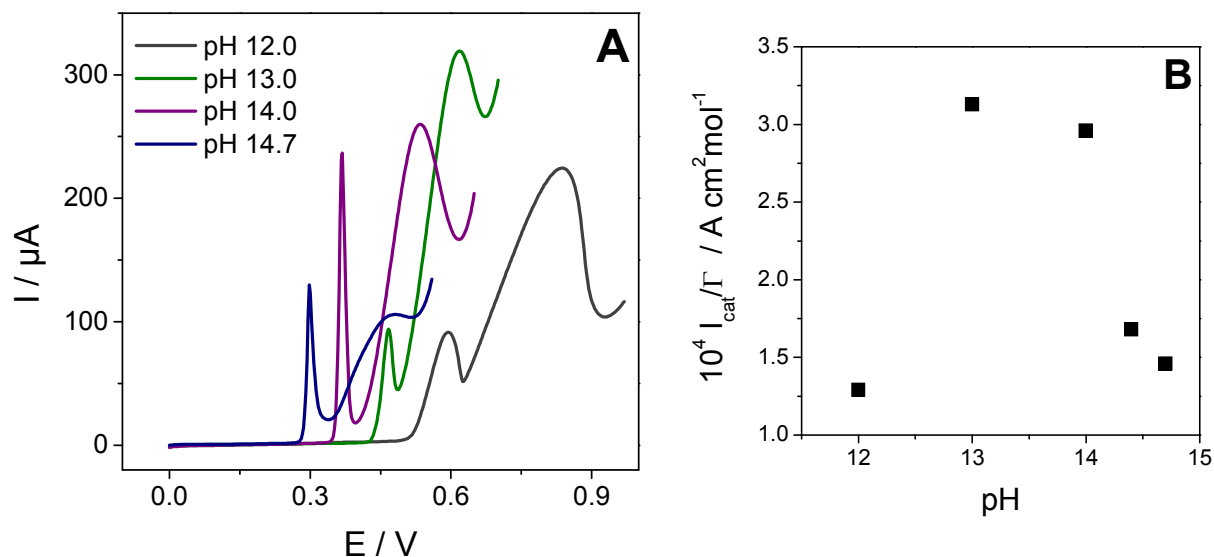


Figura 37: (A) Barridos anódicos de los voltamperogramas cíclicos de un electrodo de carbón vítreo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en disoluciones de metanol 0.1 M preparadas en NaOH a diferente pH. Velocidad de barrido 20 mV s^{-1} . (B) Dependencia de la intensidad de pico catalítica normalizada con el recubrimiento en función del pH.

3. Influencia de la concentración de alcohol en la respuesta catalítica.

Determinación de alcoholes alifáticos lineales de cadena corta

Con objeto de establecer si los electrodos modificados con el complejo $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ son útiles para llevar a cabo determinaciones de metanol y etanol, se estudió la respuesta frente a concentraciones crecientes del correspondiente alcohol. Para ello, se introdujo un electrodo modificado en una disolución 0.1 M de NaOH y se estudió por voltamperometría cíclica la respuesta en presencia de concentraciones crecientes de cada alcohol.

Como ejemplo, en la Figura 38 se muestra el resultado obtenido para el metanol. A medida que la concentración de metanol va aumentando, la primera onda anódica (a_1) muestra un desplazamiento del potencial de pico hacia valores más positivos junto con una disminución gradual en la corriente de pico, la cual desaparece prácticamente para concentraciones de metanol superiores a 1.0 M. La onda catódica (c_1) muestra un comportamiento similar al descrito para a_1 . Además, el potencial del pico catalítico (a_2) muestra un moderado desplazamiento hacia potenciales más positivos junto con un aumento en la corriente de pico. Dicho aumento es lineal con la concentración de metanol hasta 0.4 M. Este aumento lineal indica que a bajas concentraciones de metanol, el proceso catalítico está controlado por difusión.

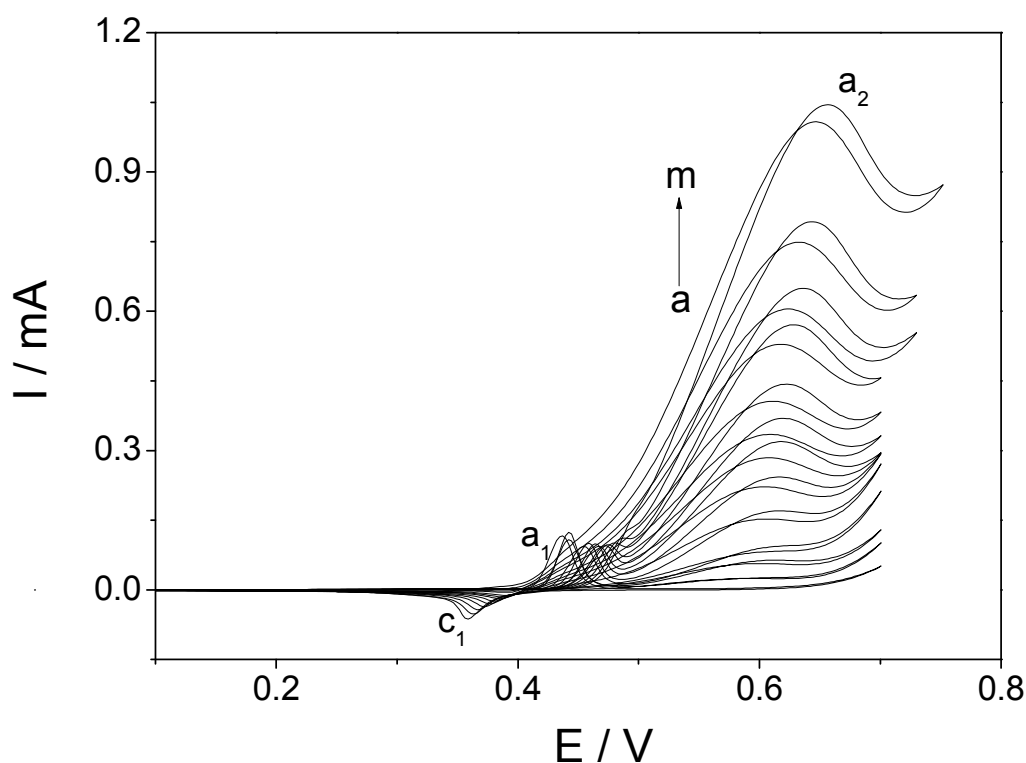


Figura 38: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de carbón vítreo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en NaOH 0.1 M en presencia de cantidades crecientes de metanol: a) 0.000 M; b) 0.005 M; c) 0.020 M; d) 0.050 M; e) 0.074 M; f) 0.099 M; g) 0.123 M; h) 0.148 M; i) 0.198 M; j) 0.241 M; k) 0.285 M; l) 0.329 M; m) 0.373 M.

Probablemente, a concentraciones altas de metanol, todos los centros catalíticos de $[\text{Ni}^{\text{III}} \text{OOH}(\text{DHsalophen})]$ presentes en la película estén interaccionando con el metanol y la etapa limitante del proceso sea la velocidad de esta interacción. Este hecho puede explicar la desaparición total de las ondas a1 y c1 a concentraciones altas de metanol indicando que la superficie del electrodo presenta una gran reserva de centros de metal capaces de oxidar grandes cantidades de alcohol. Esta propiedad puede resultar de sumo interés para la aplicación de este tipo de ánodos en el diseño de células de combustible. Resultados similares se obtuvieron en el caso del etanol.

En la Figura 39 se muestran las curvas de calibrado para metanol (A) y etanol (B) en el intervalo de concentración 5.0×10^{-3} - $8.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ y de 3.3×10^{-3} - $7.0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$, respectivamente. Se representa la intensidad de corriente normalizada con el recubrimiento superficial del electrodo (I_{cat} / Γ , $\text{A cm}^2 \text{ mol}^{-1}$), con el fin de obtener curvas de calibrado universales. Cada punto representa el valor medio de tres medidas. La repetibilidad se evaluó a partir de la desviación estándar relativa de las tres señales obtenidas para cada concentración de alcohol. En ninguno de los dos casos, en el tramo lineal de la recta de calibrado, se obtuvieron valores superiores al 6%.

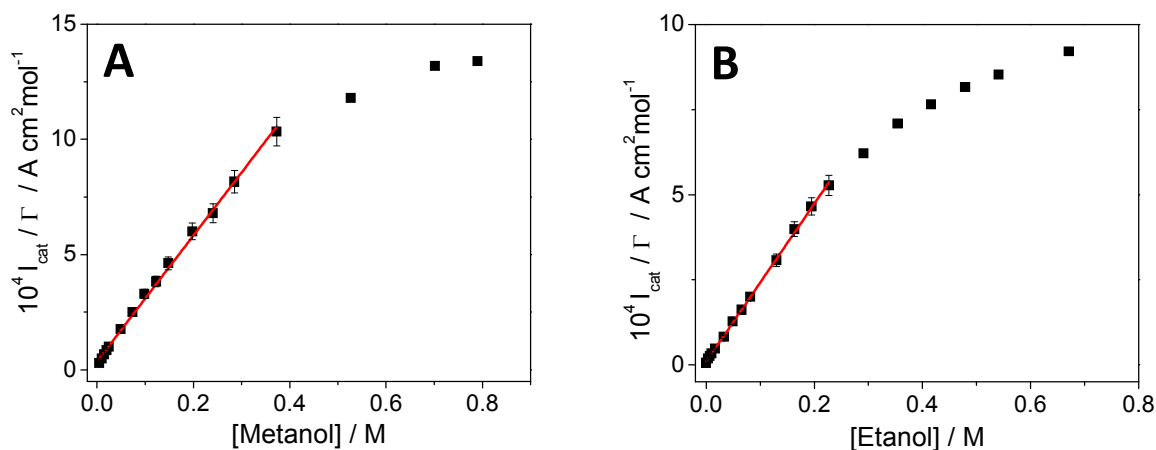


Figura 39: Curvas de calibrado universales para metanol (A) y para etanol (B) obtenidas a partir de las medidas de voltamperometría cíclica con un electrodo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ M}$.

En la Tabla 9 se recogen las características analíticas obtenidas a partir de estos calibrados. Los límites de detección y determinación se calcularon como las concentraciones que dan una señal igual a 3 y 10 veces, respectivamente, la desviación estándar de las señales (n=5) correspondientes al blanco. La reproducibilidad se evaluó midiendo la respuesta de tres electrodos distintos en las mismas condiciones experimentales y para una concentración 0.1 M de alcohol. En estas condiciones, se obtuvo una desviación estándar relativa del 5.2% en el caso del metanol y del 4.8% en el caso del etanol.

Alcohol	Ecuación ($10^4 I_{cat}/\Gamma$ vs [Alcohol])	Respuesta lineal (M)	Límite de detección (M)	Límite de determinación (M)	D.E.R. (%)
Metanol	$y=3.7 \times 10^3 + 2.7 \times 10^5 x$ $r=0.998$	Hasta 0.37	2.7×10^{-3}	9.0×10^{-3}	5.2
Etanol	$y=9.7 \times 10^2 + 2.3 \times 10^5 x$ $r=0.999$	Hasta 0.23	4.1×10^{-3}	14×10^{-3}	4.8

Tabla 9: Características analíticas para la determinación de metanol y etanol mediante medidas de voltamperometría cíclica.

Como se observa, el intervalo de respuesta lineal es más amplio en el caso del metanol. Además, la sensibilidad, obtenida a partir de la pendiente de la recta de calibrado, es mayor que en el caso del etanol. Sin embargo, el límite de detección calculado, para el metanol es un valor que está por encima de la concentración típica en la que se puede encontrar este alcohol en muestras reales, por ejemplo, en bebidas alcohólicas. Por tanto, esta metodología no sería útil para la determinación cuantitativa de este alcohol. Será necesario recurrir a otras técnicas con las que se puedan obtener límites de detección mejores.

A la vista de los resultados, el electrodo modificado con películas derivadas del [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺ podría utilizarse para la determinación de etanol en bebidas alcohólicas. Aunque, aparentemente, el metanol podría interferir en la determinación de etanol, los niveles de concentración en los que se encuentra el metanol con respecto al

contenido en etanol en bebidas alcohólicas son muy inferiores a los necesarios para llegar a producir una interferencia significativa en la respuesta del sensor.

En conclusión, las corrientes catalíticas de pico obtenidas en experimentos de voltamperometría de barrido lineal pueden ser de gran utilidad para la determinación de alcoholes a concentraciones medias y altas (dentro del intervalo 10^{-3} - 10^{-2} M). Sin embargo, para la determinación de alcoholes a concentraciones por debajo de 10^{-3} M estas corrientes catalíticas son ineficaces. Por esta razón, con la finalidad de mejorar las propiedades analíticas del sensor y permitir la determinación de alcoholes alifáticos de cadena corta en concentraciones bajas, se han llevado a cabo experimentos de cronoamperometría. Para ello se introdujo el electrodo de carbón vítreo modificado en una disolución de NaOH 0.1 M sobre la que se añadieron cantidades crecientes del correspondiente alcohol. Posteriormente, se aplicó el pulso de potencial adecuado en cada caso. La Figura 40 muestra un ejemplo de la respuesta del sensor amperométrico obtenida para dos concentraciones distintas de metanol. Como puede observarse, el estado estacionario se alcanza a los 40 segundos, lo que constituye un tiempo de respuesta moderadamente rápido.

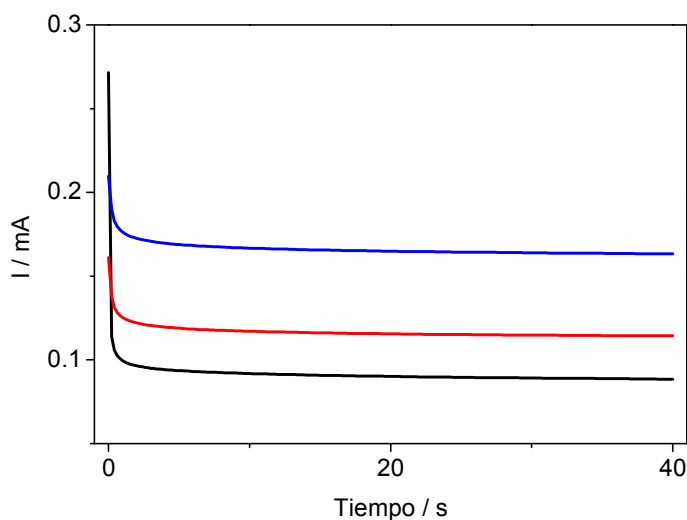


Figura 40: Respuesta cronoamperométrica ($E_i = +0.20$ V y $E_f = +0.65$ V) de un electrodo de carbón vítreo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en NaOH 0.1 M en ausencia (—) o en presencia de 50 nM (—) y 0.10 μM (—) de metanol.

En la Figura 41 se muestran las curvas de calibrado obtenidas mediante medidas cronoamperométricas para metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol. Cada punto representa el valor medio de tres medidas. La repetibilidad se evaluó a partir de la desviación estándar relativa de las tres señales obtenidas para cada concentración de alcohol, obteniéndose valores inferiores al 6.2%, 6.5%, 7.1% y 8.3% para el caso del metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol, respectivamente.

En la Tabla 10 se recogen las características analíticas obtenidas a partir de estos calibrados.

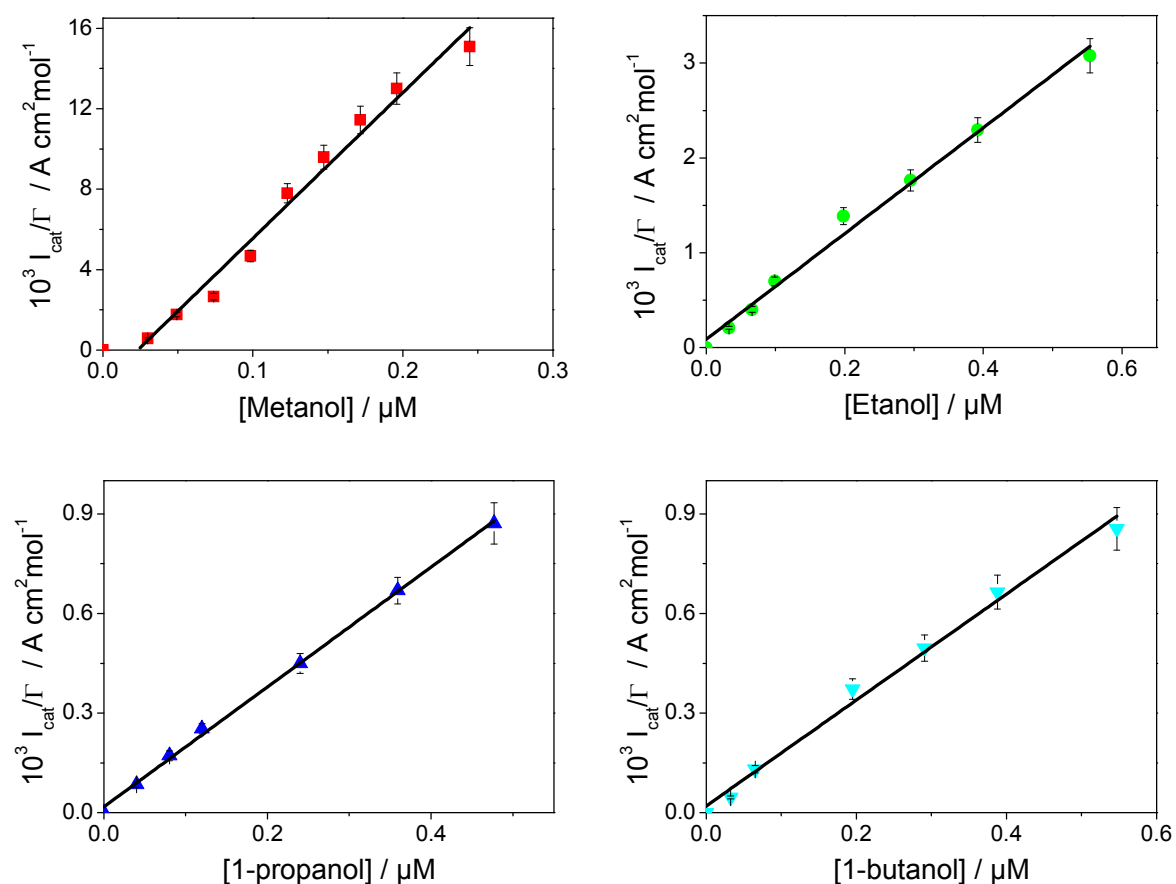


Figura 41: Curvas de calibrado universales para el correspondiente alcohol obtenidas a partir de medidas cronoamperométricas ($t=40\text{s}$) con un electrodo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ en $\text{NaOH } 0.1 \text{ M}$. Los potenciales aplicados fueron $+0.65 \text{ V}$, $+0.62 \text{ V}$, $+0.61 \text{ V}$ y $+0.61 \text{ V}$ para metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol, respectivamente.

Al igual que anteriormente, los límites de detección y determinación se calcularon como las concentraciones que dan una señal igual a 3 y 10 veces, respectivamente, la desviación estándar de las señales ($n=5$) correspondientes al blanco.

La reproducibilidad se evaluó midiendo la respuesta de tres electrodos distintos, preparados del mismo modo y para una concentración de alcohol de 74 nM. En estas condiciones se obtuvo una desviación estándar relativa del 9.3% o inferior, dependiendo del alcohol.

Alcohol	Ecuación (I_{cat}/Γ vs. [Alcohol])	Intervalo de linealidad (μM)	Límite de detección (nM)	Límite de determinación (nM)	D.E.R. (%)
Metanol	$y = -1.7 \times 10^3 + 7.4 \times 10^4 x$ $r = 0.988$	0.031 - 0.26	26	46	8.0
Etanol	$y = 8.7 \times 10^1 + 5.6 \times 10^3 x$ $r = 0.990$	Hasta 0.55	13	80	4.3
Propanol	$y = 1.8 \times 10^1 + 1.8 \times 10^3 x$ $r = 0.998$	Hasta 0.48	10	56	7.9
Butanol	$y = 2.0 \times 10^1 + 1.6 \times 10^3 x$ $r = 0.990$	Hasta 0.55	6.1	48	9.3

Tabla 10: Características analíticas para la determinación de metanol, etanol, propanol y butanol, mediante medidas cronoamperométricas.

Una vez más, se observa que la respuesta del electrodo modificado con $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ depende de la cadena alifática del alcohol correspondiente. Así, la sensibilidad es mayor para los alcoholes con una cadena alifática más corta.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que, los electrodos modificados con películas conductoras derivadas del $[\text{Ni-2,5-DHsalophen}]^{2+}$ pueden ser usados como sensores para la determinación de alcoholes alifáticos de cadena corta. En este caso, sí se podría determinar cuantitativamente metanol en bebidas alcohólicas. Aunque, el etanol interferiría en la señal puesto que, en este tipo de muestras, se

encuentra en una concentración mucho mayor. Esto hace que, para determinar metanol en bebidas alcohólicas, sea necesaria una separación previa de los alcoholes por algún método de separación como la cromatografía líquida. Por tanto, otra posible aplicación podría ser su uso como detectores electroquímicos en la determinación de alcoholes en cromatografía líquida.

CAPÍTULO VI

INTERACCIÓN ENTRE LOS ISÓMEROS DEL DHsalophen Y ADN

Desde hace varias décadas han sido muchos los autores que han estudiado los distintos modos de interacción entre el ADN y distintos tipos de moléculas pequeñas, ligandos y complejos metálicos. Como se ha indicado en la Introducción, esta interacción puede tener lugar a través de los surcos o bien por intercalación entre los pares de bases de la cadena doble de ADN. Uno de los objetivos de esta tesis es el desarrollo de un sensor electroquímico para la identificación de secuencias específicas de ADN. Para ello, es necesario disponer de un indicador de hibridación electroactivo que, al interactuar con la doble cadena de ADN origine un cambio medible, bien en su potencial de oxidación o un cambio (aumento o disminución) en la intensidad de corriente, de manera que permita seguir la hibridación y desnaturalización de los oligonucleótidos inmovilizados sobre el electrodo. Por lo tanto, es necesario el diseño de moléculas con actividad redox y potencialidad para interactuar de forma específica con fragmentos de ADN (oligonucleótidos) de cadena doble y/o de cadena simple.

Los compuestos de base de Schiff sintetizados en este trabajo presentan en su estructura varios dominios con distintos grupos funcionales, uno de los cuales será responsable de la interacción con la cadena del oligonucleótido y los restantes dominios quedarán expuestos al exterior, de forma que puedan llevarse a cabo reacciones de caracterización por diferentes técnicas instrumentales. En los isómeros del DHsalophen la ausencia de dominio cargado descarta la interacción electrostática como modo principal de interacción. Por otra parte, la presencia de varios anillos bencénicos que confieren cierto nivel de planaridad a las moléculas y su alto grado de conjugación por los dobles enlaces sugieren a priori que los mecanismos predominantes de interacción con el ADN sean bien la intercalación entre los pares de bases o a través de los surcos del ADN. Esta posibilidad de interacción se estudiará en disolución utilizando ADN de timo de ternera como material biológico y mediante el empleo de técnicas espectroscópicas (UV-vis, fluorescencia) y electroquímicas. El objetivo final de estos estudios es demostrar que los ligandos sintetizados sirven como marcador de eventos de hibridación y que, además,

pueden ser aplicados al diseño de sensores de ácidos nucleicos, para la determinación de secuencias reales correspondientes a problemas analíticos concretos.

1. Caracterización del modo de interacción entre los isómeros del DHsalophen y ADN de timo de ternera por métodos espectrofotométricos

1.1. Estudios de absorción molecular

Está bastante bien documentado que como consecuencia de la interacción entre hebras de ADN y moléculas pequeñas se producen importantes cambios en los espectros electrónicos de éstas. La naturaleza de estos cambios puede dar una idea de la fortaleza y del modo de la interacción. En general, en el caso de que la interacción sea por intercalación, se han observado cambios en el valor de la absorbancia, así como desplazamientos en los máximos de absorción de las bandas de la molécula. En concreto, la disminución en el valor de la absorbancia (efecto hipocrómico) y el desplazamiento hacia el rojo del máximo de absorción (efecto batocrómico) son efectos característicos de este tipo de interacción; y se atribuyen a la fuerte interacción que tiene lugar entre los anillos aromáticos de la estructura de las moléculas y los pares de bases del ADN (Pyle y cols, 1989).

Los ligandos de base de Schiff, sintetizados en este trabajo, presentan zonas planares susceptibles de unirse con hebras de ADN con mayor intensidad que si se tratase de una mera atracción electrostática. Este tipo de uniones, además, conlleva que las interacciones sean más fuertes con la doble hélice de ADN que con el ADN de cadena simple.

Para llevar a cabo estos estudios se han elegido los isómeros 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen dado que como se ha visto en capítulos anteriores, son los isómeros con una electroactividad mejor definida. Asimismo, se ha elegido un ADN de alta masa molecular como el ADN de timo de ternera (CT-ADN) como modelo biológico experimental. Mediante espectrofotometría de absorción molecular se estudiaron las

diferencias entre los espectros de UV-vis de los isómeros en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de CT-ADN. Para ello, en primer lugar, se obtuvieron los espectros de los ligandos en ausencia de CT-ADN en tampón Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4). Como se muestra en la Figura 42A, el espectro de absorción de una disolución 15 μM del isómero 2,5-DHsalophen muestra un pico de absorción a 332 nm con una absorptividad molar de $(1.4 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En las mismas condiciones, el espectro de una disolución 20 μM de 3,4-DHsalophen (Figura 42B) muestra un máximo de absorbancia a 295 nm con una absorptividad molar de $(1.9 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En ambos casos las bandas de absorción observadas pueden atribuirse a transiciones vibracionales $\pi\text{-}\pi^*$ y $n\text{-}\pi^*$ entre los electrones π conjugados presentes en los anillos aromáticos de ambas moléculas y el doble enlace de los grupos azometino (Gholivand y cols, 2005).

Los experimentos de titulación con ADN se llevaron a cabo en disoluciones de baja fuerza iónica (Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4)) manteniendo la concentración de ligando constante y variando la concentración de CT-ADN. Las disoluciones se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente para alcanzar el equilibrio de unión, antes de realizar la medida. En las Figuras 42A y 42B se muestran los espectros obtenidos para las titulaciones del 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen con CT-ADN de cadena doble. Los espectros se obtuvieron poniendo en la cubeta de referencia la misma concentración de CT-ADN que en la cubeta de muestra.

Los espectros de absorción obtenidos para el 2,5-DHsalophen (15 μM) en presencia de concentraciones crecientes de CT-ADN de cadena doble (0-315 μM), muestran un efecto hipocrómico significativo en su banda de absorción a 332 nm (Figura 42A). Este efecto se debe, probablemente, a la interacción entre los orbitales π del ligando y los orbitales π de los pares de bases, puesto que los orbitales π del ligando se llenan parcialmente de electrones y esto provoca una disminución en las probabilidades de transición (Pyle y cols, 1989). Por otro lado, se observa un leve efecto batocrómico de 8 nm debido a que el aumento de la deslocalización de los electrones π del ligando, al interactuar con el CT-ADN, provoca que las transiciones electrónicas tengan lugar a energías menores (Dasgupta y cols, 1987). Asimismo, aparecen dos puntos isobésticos,

en 315 y 350 nm, y una nueva banda de absorción, en forma de hombro, a 375 nm, en presencia de CT-ADN. La intensidad de la nueva banda aumenta al aumentar la cantidad de CT-ADN adicionada a la disolución. La presencia de un punto isobéptico a 350 nm pone de manifiesto la existencia de dos especies absorbentes: el ligando y el complejo formado ligando-CT-ADN. Además, la presencia de esta última especie es la responsable de la aparición de la nueva banda de absorción a 375 nm.

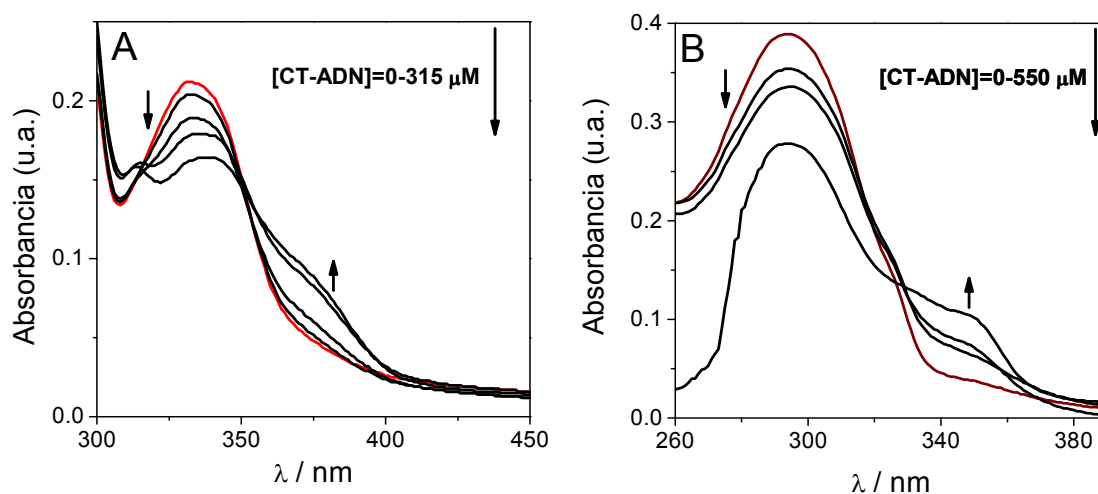


Figura 42: (A) Espectros UV-visible de una disolución 15 μM de 2,5-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) en ausencia (—) y en presencia de concentraciones crecientes de CT-ADN. (B) Espectros UV-visible de una disolución 20 μM de 3,4-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) en ausencia (—) y en presencia de concentraciones crecientes de CT-ADN.

Resultados comparables se obtuvieron con el isómero 3,4-DHsalophen, aunque existen algunas diferencias notables. Los espectros del 3,4-DHsalophen (20 μM) en presencia de concentraciones crecientes de CT-ADN (0-550 μM en pares de bases) muestran claramente un efecto hipocrómico a una longitud de onda de 295 nm (Figura 42B). Sin embargo, en presencia de CT-ADN no se observa ningún desplazamiento de la longitud de onda hacia el rojo. Al igual que en el caso del 2,5-DHsalophen al aumentar la concentración de CT-ADN en la disolución, aparece una nueva banda a 345 nm; y es

evidente la aparición de un punto isobéptico a 325 nm, debido en ambos casos a la existencia en disolución de una nueva especie absorbente ligando-CT-ADN.

Como se ha comentado con anterioridad, la aparición de efectos hipocrómicos y batocrómicos tras la adición de CT-ADN, puede atribuirse al modo de unión que supone una cierta interacción entre los dominios aromáticos de los ligandos y los pares de bases del CT-ADN. Los resultados espectroscópicos obtenidos tras los experimentos de titulación con CT-ADN de los isómeros 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen se resumen en la Tabla 11.

LIGANDO	ABSORCIÓN λ_{max} , nm				ϵ , $M^{-1} cm^{-1}$		K_b , M^{-1}
	Libre	Unido	$\Delta\lambda$	% H*	Libre	Unido	
3,4-DHsalophen	295	295	—	29	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^4$	$(5.0 \pm 0.4) \times 10^2$	$(9.0 \pm 0.3) \times 10^3$
2,5-DHsalophen	332	340	8	23	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^4$	$(3.9 \pm 0.2) \times 10^2$	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^3$

* Porcentaje de efecto hipocrómico

Tabla 11: Parámetros espectrofotométricos y constantes de unión obtenidos de los experimentos de titulación.

De acuerdo con estos resultados, el efecto batocrómico es mayor, 8 nm, en el 2,5-DHsalophen que en el 3,4-DHsalophen; por lo que, en principio, la unión con las bases del CT-ADN podría ser más fuerte para el ligando 2,5-DHsalophen. La magnitud del efecto hipocrómico (Tabla 11) en presencia de CT-ADN está relacionada con la fortaleza del enlace entre la molécula y el material biológico (Pyle y cols, 1989) y puede ser calculada a partir de los valores de absorbancia del ligando libre y del ligando unido al CT-ADN, tal y como se describe en la sección experimental. Por tanto, la disminución de absorbancia observada sugiere que existe una interacción fuerte entre los estados electrónicos de los grupos aromáticos de los derivados del DHsalophen y las bases del CT-ADN. Puesto que la fuerza de las interacciones electrónicas disminuye con el cuadrado de la distancia, un elevado efecto hipocrómico sugiere que los grupos aromáticos del ligando y las bases del CT-ADN están próximas. Como puede observarse en la Tabla 11, el efecto hipocrómico observado es del 23% para el 2,5-DHsalophen y del 29% para el 3,4-DHsalophen. Estos

resultados sugieren que el ligando que contiene los grupos hidroxilo localizados en las posiciones *orto* parecen unirse con mayor fuerza al CT-ADN que los ligandos en los cuales los grupos hidroxilo están en las posiciones *para*. Los datos del efecto hipocrómico obtenidos para los derivados del DHsalophen son similares a los reportados en la literatura para algunos compuestos descritos como intercaladores. Por ejemplo, se ha descrito una disminución del 25% en el caso de algunos derivados de pirimidoselequinolinas (Gopal y Veeranna, 2005), o disminuciones del 20% para complejos como el $[\text{Cr}(\text{naphen})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ (Vaidyanathan y cols, 2002). Asimismo, se han encontrado valores ligeramente superiores a los descritos en este trabajo. Por ejemplo, en el caso del complejo de PIND- $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^+$, la disminución calculada es del 35 % (Tansil y cols, 2005). Sin embargo, en todos los casos el desplazamiento batocrómico descrito es comparable al calculado en el caso del 2,5-DHsalophen.

Con la finalidad de estimar de manera más cuantitativa la fuerza de unión entre los ligandos y el CT-ADN, se ha calculado la constante intrínseca de unión, K_b , a partir de los resultados de las titulaciones espectrofotométricas, usando el método descrito por Meehan y cols (Meehan y Gamper, 1982) y que se encuentra explicado con detalle en la parte experimental. Los datos obtenidos para K_b en el caso del 3,4-DHsalophen y del 2,5-DHsalophen son $(9.0 \pm 0.3) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $(3.3 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (Tabla 11). Como se puede observar K_b es mayor en el caso del 3,4-DHsalophen, lo que sugiere una unión más fuerte al CT-ADN que en el caso del 2,5-DHsalophen.

Los valores de esta constante descritos en la literatura para moléculas intercaladoras son al menos dos órdenes de magnitud mayores que en el caso de los ligandos estudiados (Li y cols, 2005; Tansil y cols, 2005). Aunque, hay autores que han descrito las propiedades intercalativas de algunos compuestos con constantes de unión del mismo orden de magnitud que las obtenidas en este trabajo (Breslin y cols, 1997; Gopal y Veeranna, 2005; Vaidyanathan y cols, 2002), en principio, cabría esperar que el modo de interacción más probable sea un modo mixto de interacción con los surcos y posterior intercalación, como se discutirá más adelante.

Por último, como experimento control se estudió cómo influía la presencia de CT-ADN de cadena sencilla (ssCT-ADN) en las propiedades electrónicas de los compuestos. La desnaturalización del CT-ADN de cadena doble se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. Se prepararon disoluciones de cada isómero en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), en ausencia y en presencia de 320 μ M ssCT-ADN. Las disoluciones se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente antes de obtener los espectros de absorción molecular. El resultado obtenido en el caso del 3,4-DHsalophen se muestra en la Figura 43. Como puede observarse, para una concentración 320 μ M de ssCT-ADN existe un leve efecto hipocrómico que, en exceso de ssCT-ADN, alcanza un valor máximo del 5 %. Este efecto hipocrómico puede deberse a una interacción residual del ligando con pequeñas zonas de dsCT-ADN renaturalizadas durante el tiempo de espera del experimento.

De este experimento de control se deduce que el modo de interacción entre los compuestos y el CT-ADN presenta cierta especificidad por la cadena doble y escasa interacción con el ssCT-ADN.

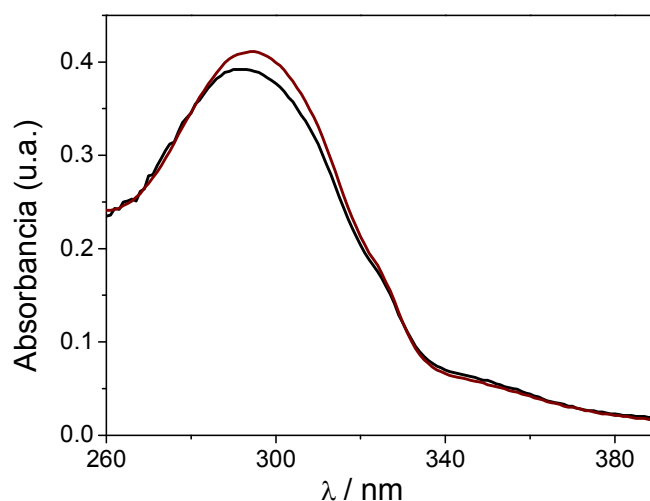


Figura 43: Espectros de UV-vis de una disolución 20 μ M de 3,4-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) en ausencia (—) y en presencia de 320 μ M de ssCT-ADN (—).

1.2. Estudios de fluorescencia molecular

Teniendo en cuenta que en disoluciones acuosas los ligandos 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen son fluorescentes, la variación de estas propiedades derivadas de la interacción con CT-ADN puede ser útil para ampliar y corroborar los resultados obtenidos por absorción molecular. En primer lugar, se estudiaron las propiedades fluorescentes de los ligandos. Para ello se prepararon disoluciones de cada compuesto en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) y se obtuvieron sus correspondientes espectros de excitación. En la Figura 44A se muestra el espectro de excitación de una disolución 50 μ M de 2,5-DHsalophen, mientras que en la Figura 44B se muestra el correspondiente espectro de excitación de una disolución 20 μ M de 3,4-DHsalophen. Las longitudes de onda de excitación se fijaron en 330 nm, en el caso del 2,5-DHsalophen; y 313 nm, en el caso del 3,4-DHsalophen. Los espectros de emisión obtenidos en estas condiciones se muestran en la Figura 44A y 44B para el 2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen, respectivamente. El espectro de emisión obtenido para una disolución 50 μ M de 2,5-DHsalophen muestra una banda de emisión ancha con un máximo de intensidad entre 405 y 480 nm. Mientras que en el caso del 3,4-DHsalophen se obtiene un máximo de intensidad a 360 nm.

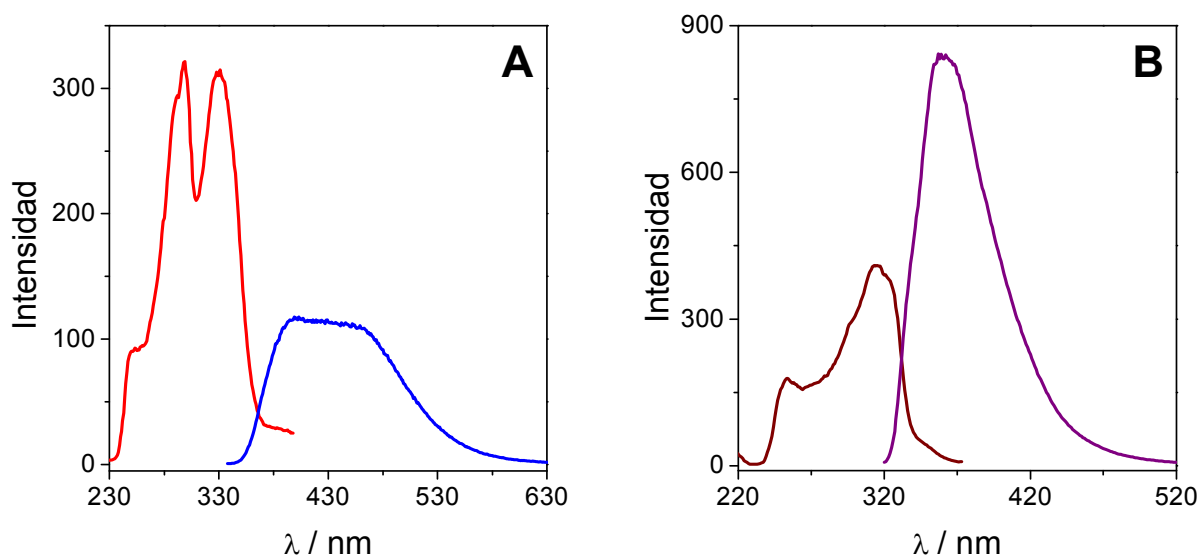


Figura 44: (A) Espectros de excitación (—) y de emisión (—) de una disolución 50 μ M de 2,5-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) (B) Espectros de excitación (—) y de emisión (—) de una disolución 20 μ M de 3,4-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4).

Está descrito en la literatura cómo la interacción entre moléculas con dominios planares en su estructura y el ADN da como resultado cambios en los estados de excitación y de emisión de las mismas, cuando estas se encuentran en presencia del material biológico. En general, cuando en presencia de ADN se observa un aumento en la intensidad de emisión de la molécula, se puede afirmar que el modo de interacción es fundamentalmente por intercalación, puesto que al apilarse entre las bases, la rigidez de las moléculas aumenta y como consecuencia, aumenta su intensidad de fluorescencia (Jenkins y cols, 1992). Sin embargo, estos resultados no son aplicables a todos los sistemas. Algunos autores han descrito un efecto de desactivación en la intensidad de emisión para moléculas intercaladoras en presencia ADN (Chaires y cols, 1982; Wu y cols, 2002).

Con la finalidad de confirmar el modo de interacción entre los derivados del DHsalophen y el CT-ADN, se han llevado a cabo experimentos de titulación con CT-ADN. Para ello, se han preparado una serie de disoluciones de concentración fija de 3,4-DHsalophen (20 μ M) en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), en presencia de distintas concentraciones de CT-ADN (0-600 μ M en pares de bases). Tras mantenerlas durante una hora a temperatura ambiente para favorecer la interacción, se obtuvieron los espectros de excitación y de emisión (Figura 45A y 45B). Tras la adición de CT-ADN, las intensidades de excitación disminuyen de manera notable sin que se aprecie desplazamiento en el máximo de excitación (313 nm), aún cuando el CT-ADN está en exceso. Como en el caso de los espectros de excitación, al aumentar la concentración de CT-ADN en la disolución de 3,4-DHsalophen, las intensidades de emisión presentan un decaimiento gradual, sin observarse desplazamiento alguno en el máximo de emisión (360 nm). El ligando 2,5-DHsalophen presenta un comportamiento cualitativamente similar al del 3,4-DHsalophen.

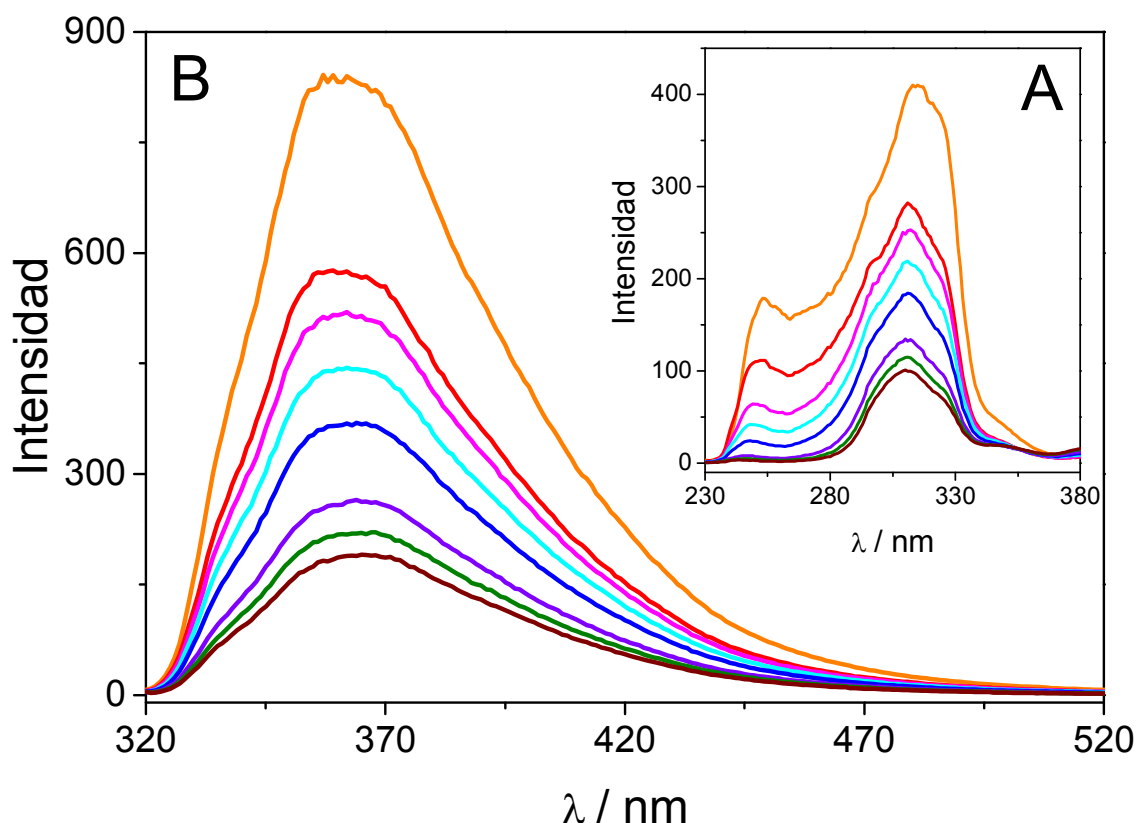


Figura 45: Espectros de excitación (A) y de emisión (B) de una disolución 20 μM de 3,4-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), en ausencia (—) y en presencia de distintas concentraciones de CT-ADN: 25 μM (—); 75 μM (—); 125 μM (—); 200 μM (—); 400 μM (—); 500 μM (—); 600 μM (—).

La magnitud de la interacción entre los ligandos y el CT-ADN de cadena doble puede cuantificarse a partir de los resultados obtenidos en la titulación, mediante el cálculo de la constante de desactivación de Stern-Volmer (K_{SV}), tal y como se detalla en la sección experimental (Cramb y Beck, 2000). En la Tabla 12 se muestran los valores obtenidos. Las constantes de desactivación son de $(5.3 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y $(1.2 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para el 3,4-DHsalophen y el 2,5-DHsalophen, respectivamente. Comparadas con las constantes de desactivación de otras moléculas intercaladoras, las constantes obtenidas son al menos un orden de magnitud menor (Kumar y cols, 2000; Wu y cols, 2002). Esto hace suponer que la interacción con los surcos de la hélice de CT-ADN es el principal modo de interacción entre

los derivados del DHsalophen y el CT-ADN; aunque no se descarta un porcentaje de interacción debido al apilamiento entre las bases. Por otra parte, los experimentos de fluorescencia confirman que la interacción con el isómero 3,4-DHsalophen es más fuerte que con el 2,5-DHsalophen.

LIGANDO	EMISIÓN λ_{\max} , nm			K_{SV} , M^{-1}
	Libre	Unido	$\Delta\lambda$	
3,4-DHsalophen	360	360	—	$(5.3 \pm 0.2) \times 10^3$
2,5-DHsalophen	405	405	—	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^3$

Tabla 12: Parámetros espectrofotométricos y constantes de Stern-Volmer obtenidos de los experimentos de titulación.

A partir de los datos obtenidos en las titulaciones se ha calculado el número de bases de CT-ADN que se unen por cada molécula de ligando, ya que el tamaño de los sitios de unión permite distinguir entre moléculas que se intercalan y aquellas que se unen a los surcos del CT-ADN. Para ello, se ha representado la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión en función de la relación de concentraciones de CT-ADN y el derivado DHsalophen correspondiente ($[CT-ADN]/[DHsalophen]$). Como se observa en la Figura 46A y 46B, en ambos casos se obtienen dos tramos lineales independientes.

De la intersección de los tramos lineales se puede estimar la estequiometría de la formación del complejo DHsalophen-ADN. El valor obtenido tanto para el 3,4-DHsalophen como para el 2,5-DHsalophen, es de 12; indicando que cada molécula de DHsalophen se une, aproximadamente, a 12 bases del CT-ADN. El valor obtenido refleja que la interacción no es de carácter estrictamente intercalativo, ya que las moléculas que se intercalan entre los pares de bases presentan una relación menor en número de bases por sitio de unión y, como consecuencia, requieren mayores concentraciones para saturar todos los sitios de unión. Se han encontrado referencias bibliográficas en las que se describe la interacción de complejos metálicos con ligandos de base de Schiff, de estructura similar a la de los

compuestos que se estudian en esta Tesis, con el CT-ADN a través de los surcos, y con un número de sitios de unión similar a los encontrados en este trabajo (Kashanian y cols, 2007; Vijayalakshmi y cols, 2000).

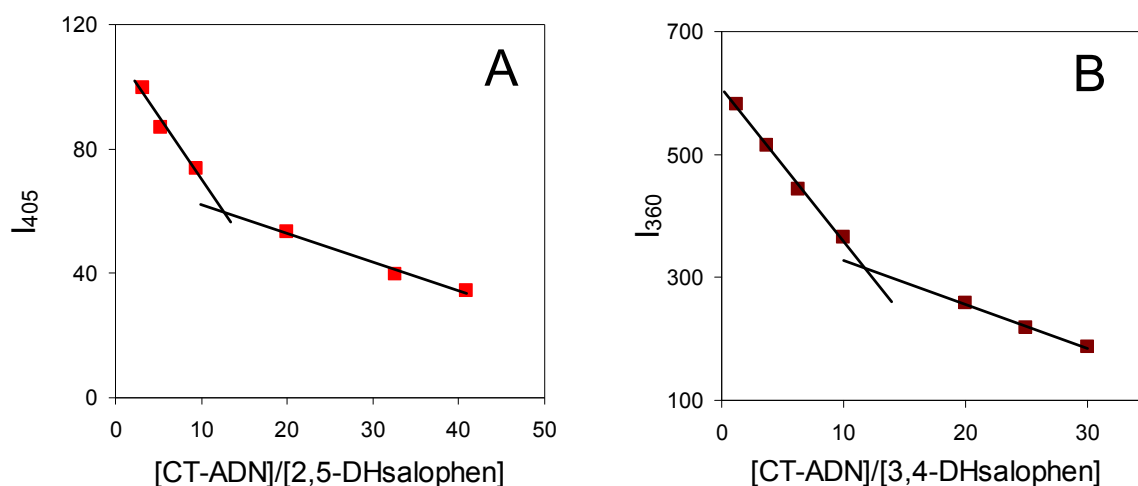


Figura 46: Variación de la intensidad del máximo de emisión con la relación de concentraciones de CT-ADN y (A) 2,5-DHsalophen (λ_{exc} 330 nm) o (B) 3,4-DHsalophen (λ_{exc} 313 nm).

Para comprobar que la interacción con el CT-ADN es específica de la doble hélice, se hicieron experimentos de control con ssCT-ADN. Se prepararon disoluciones de cada isómero en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), en ausencia y en presencia de 320 μ M ssCT-ADN. Las disoluciones se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente y se obtuvieron los espectros de emisión. En la Figura 47 se observa como en ambos casos, la presencia de ssCT-ADN no amortigua la fluorescencia de los compuestos, al contrario de lo que ocurre cuando el CT-ADN es de cadena doble. Por tanto, se puede concluir que la interacción de los isómeros del DHsalophen con el ssCT-ADN es prácticamente inexistente.

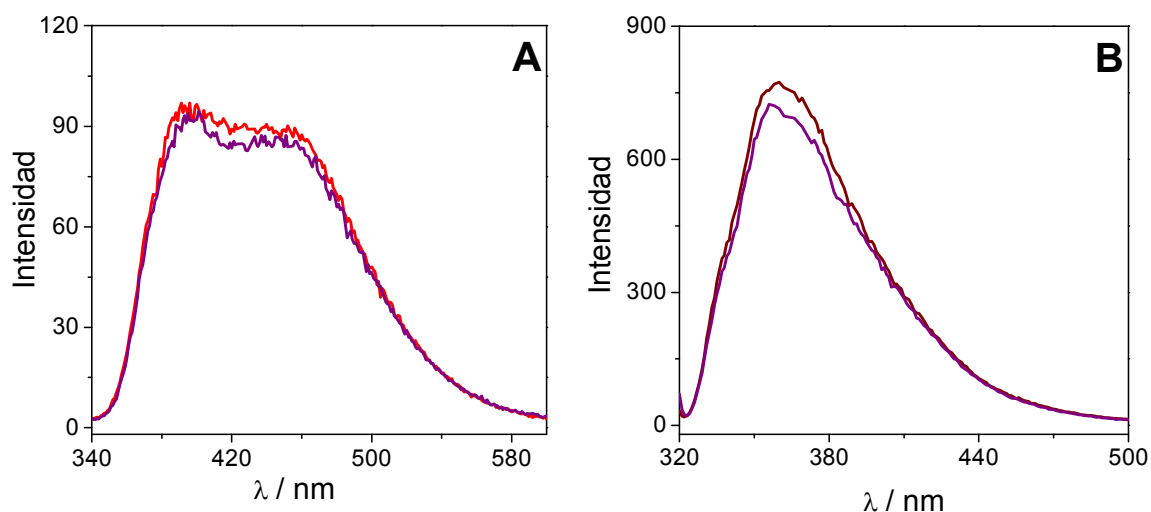


Figura 47: (A) Espectros de emisión de una disolución 50 μM de 2,5-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) en ausencia (—) y en presencia de 320 μM de ssCT-ADN (—). (B) Espectros de emisión de una disolución 20 μM de 3,4-DHsalophen en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) en ausencia (—) y en presencia de 320 μM de ssCT-ADN (—).

1.3. Efecto de la temperatura en las propiedades fluorescentes

Por otra parte, se ha estudiado la variación de la intensidad del máximo de emisión de los complejos formados por los derivados DHsalophen y el CT-ADN con la temperatura. En el caso del 3,4-DHsalophen, se preparó una disolución, en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), que contenía CT-ADN (400 μM en pares de bases) y 3,4-DHsalophen (10 μM), y se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se colocó la muestra en la cubeta del espectrofluorímetro, equipado con un módulo Peltier de control de temperatura en el interior de la cubeta, y se registró la variación de la intensidad de emisión a 360 nm (λ_{exc} 313 nm) con la temperatura. Además, como controles se prepararon una disolución 10 μM de 3,4-DHsalophen y otra disolución 400 μM de CT-ADN en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4); y se llevó a cabo el mismo estudio y en las mismas condiciones, que las descritas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 48A.

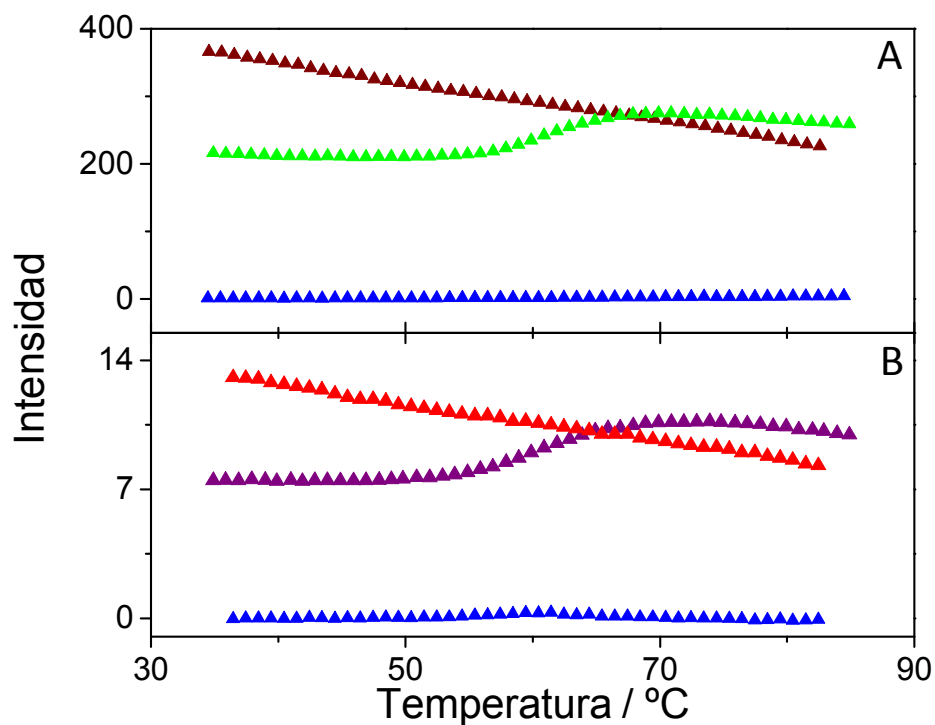


Figura 48: (A) Variación de la intensidad de emisión, (λ_{exc} 313 nm; λ_{em} 360 nm), en función de la temperatura de una disolución 10 μ M de 3,4-DHsalophen (▲) y de una disolución 400 μ M de CT-ADN en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), en ausencia (▲) y en presencia de 3,4-DHsalophen 10 μ M (▲). (B) Variación de la intensidad de emisión, (λ_{exc} 330 nm; λ_{em} 405 nm), en función de la temperatura de una disolución 10 μ M de 2,5-DHsalophen (▲) y 400 μ M de CT-ADN en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), en ausencia (▲) y en presencia de 2,5-DHsalophen 10 μ M (▲).

Como era de esperar, en ausencia de CT-ADN la emisión de la disolución de 3,4-DHsalophen disminuye gradualmente con el aumento de la temperatura. Esto es debido a que el aumento de la frecuencia de choques a temperatura elevada aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa. Además, el aumento de la temperatura hace disminuir la viscosidad del disolvente, lo cual, también aumenta la probabilidad de desactivación mediante colisiones. Por otra parte, en el caso de la disolución control de CT-ADN, la intensidad de emisión es prácticamente cero, en todo el intervalo de temperaturas estudiado. Sin embargo, cuando el 3,4-DHsalophen está unido

al CT-ADN se observa cómo a partir de 55°C, a medida que aumenta la temperatura también aumenta la intensidad de emisión. Este aumento de la intensidad de fluorescencia se debe a que al aumentar la temperatura se produce una desnaturalización del CT-ADN y por tanto el 3,4-DHsalophen unido a la doble hélice queda libre en disolución y recupera de forma gradual sus propiedades fluorescentes. La temperatura en el punto de inflexión de la curva puede ser considerada como la temperatura a la cual el 50 % del compuesto se ha desenlazado (60.4°C). A temperaturas superiores a 70°C, la fluorescencia del compuesto se mantiene constante, sugiriendo que la interacción con el CT-ADN de cadena sencilla es bastante débil. Resultados similares se obtuvieron con el isómero 2,5-DHsalophen, y se muestran en la Figura 48B.

De nuevo, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la interacción entre los derivados DHsalophen y el CT-ADN preferentemente se produce con las hebras de doble cadena y prácticamente es inexistente con las hebras de cadena simple.

1.4. Efecto de la presencia de desactivadores aniónicos de fluorescencia

Un criterio para establecer el mecanismo de interacción entre los ligandos DHsalophen y el CT-ADN es estudiar cómo afecta la presencia de un desactivador o amortiguador aniónico de la fluorescencia, como son los iones yoduro, a la intensidad de emisión de los ligandos libres y unidos al ADN. Es decir, se va a estudiar la accesibilidad de los ligandos unidos al CT-ADN a las moléculas amortiguadoras de fluorescencia.

Cuando las moléculas están intercaladas en la hélice de ADN, están protegidas de cualquier cambio que se produzca en el medio de disolución. Cuando las moléculas interaccionan a través de los surcos, en las proximidades del esqueleto azúcar-fosfato del ADN, están en cierto grado expuestas al disolvente y por tanto la presencia en disolución de moléculas amortiguadoras de la fluorescencia puede afectar a sus propiedades electrónicas. Por este motivo, la accesibilidad de los ligandos unidos al CT-ADN al yoduro potásico será menor en el caso de que estén intercaladas en la hélice de ADN. Sin embargo, aún cuando la interacción tiene lugar a través de los surcos cabe esperar que la

carga negativa de los grupos fosfato repela a los aniones yoduro (Kumar y cols, 1993).

En primer lugar se estudió cómo afectaba la presencia de iones yoduro a la emisión de los ligandos libres. Se prepararon distintas disoluciones en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) donde la concentración de ligando se mantuvo constante y se adicionaron cantidades crecientes de ión yoduro. En presencia de concentraciones crecientes de ión yoduro (0-0.016 M), la intensidad de emisión de una disolución 10 μ M de 3,4-DHsalophen (λ_{exc} 313 nm) disminuye conforme aumenta la concentración del anión (Figura 49A). Se ha calculado una constante de desactivación de Stern-Volmer de 7 M^{-1} . A continuación, se prepararon disoluciones donde se mantuvieron fijas, tanto la concentración de 3,4-DHsalophen (10 μ M) como la de CT-ADN (440 μ M), y en una proporción que aseguraba la unión de todo el ligando a la hélice de ADN. Estas disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se adicionaron distintas cantidades de yoduro potásico (0-0.016M). Como se ha comentado a lo largo del capítulo, la intensidad de emisión del 3,4-DHsalophen en presencia de CT-ADN disminuye respecto a la del ligando libre. Cabe esperar, que si el 3,4-DHsalophen está intercalado en el CT-ADN su intensidad de fluorescencia no se vea afectada por la presencia de los iones yoduro. Sin embargo, en presencia de este anión, la emisión de fluorescencia a 360 nm se intensifica (Figura 49A). Este aumento podría deberse al incremento de la fuerza iónica del medio por la presencia de los iones yoduro. Cuando una molécula está unida al ADN a través de los surcos, en condiciones de fuerza iónica alta, se favorece la salida de la molécula desde la doble hélice al medio de disolución; mientras que este fenómeno no se da con tanta facilidad en el caso de moléculas intercaladas (Kumar y cols, 1993). En resumen, el incremento de la fuerza iónica del medio provoca la salida del 3,4-DHsalophen de la doble hélice y se observa un aumento de la fluorescencia puesto que la intensidad de emisión del ligando libre es mayor que la del ligando unido al CT-ADN.

Para corroborar este resultado, se llevó a cabo el experimento descrito anteriormente, pero utilizando NaCl en vez de KI. En el caso del NaCl, el ión Cl^- no está considerado como un anión desactivante de fluorescencia. La influencia sobre el complejo DHsalophen-ADN provendrá exclusivamente del aumento de la fuerza iónica. La adición

de concentraciones crecientes de NaCl a una disolución de 3,4-DHsalophen (10 μM), en ausencia de CT-ADN, no produce apenas efecto sobre la intensidad de fluorescencia del ligando. Sin embargo, en presencia de CT-ADN (440 μM), el comportamiento es similar al observado en el caso del KI (Figura 49B). Puesto que la fluorescencia del ligando libre no se ve afectada por la presencia de NaCl, es evidente que el aumento de la intensidad de emisión en presencia de CT-ADN es debida a la salida de la molécula de los surcos de la doble hélice del ADN, a la disolución. La gran dependencia del enlace 3,4-DHsalophen-ADN con la fuerza iónica indica que la unión está controlada por interacciones electrostáticas. Este resultado es consistente con una interacción a través de los surcos y no de una unión mediante intercalación, ya que la unión a los surcos está estabilizada por enlaces de hidrógeno y por interacciones hidrofóbicas, mientras que la unión por intercalación está favorecida por interacciones con las bases adyacentes cuando las moléculas se apilan entre las mismas (Kumar y cols, 1993).

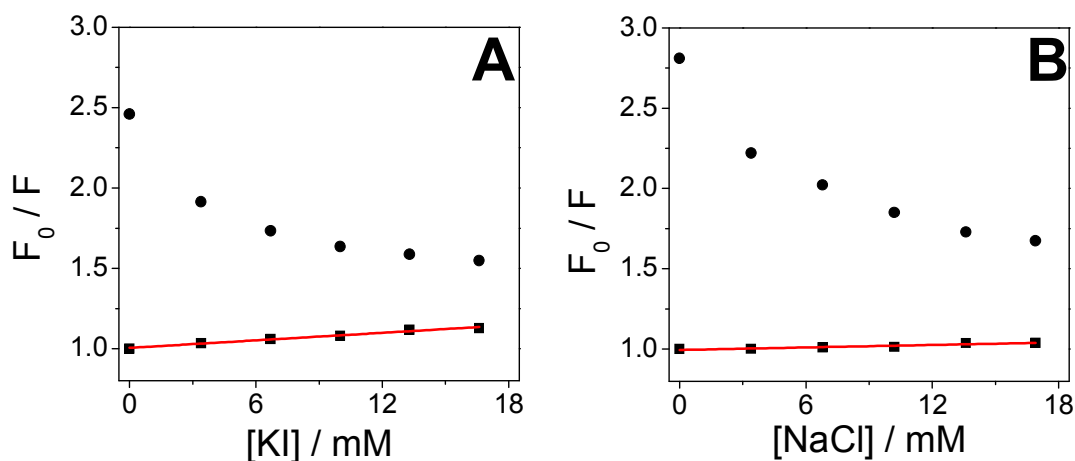


Figura 49: Variación de la relación F_0/F con la concentración de KI (A) o NaCl (B), en una disolución de 3,4-DHsalophen (10 μM) en ausencia (■) o en presencia (●) de CT-ADN (440 μM). λ_{exc} 313 nm y λ_{em} 360 nm.

1.5. Estudios de la variación de la temperatura de desnaturalización

Es de sobra conocido que la interacción de pequeñas moléculas con el ADN implica un aumento en la temperatura a la cual la doble hélice de ADN se desnaturaliza, dando como resultado cadenas sencillas de ADN. Esta temperatura es conocida como temperatura de desnaturalización o temperatura de *melting* (T_m). Por lo tanto, el estudio de la variación de este parámetro es muy útil para el análisis de los modos de interacción de moléculas con el ADN. Las variaciones en la temperatura de desnaturalización puede considerarse un reflejo de la afinidad del ADN y una molécula determinada. Es decir, cuando una molécula se une a una cadena doble de ADN mediante intercalación, la estabilidad de la doble hélice aumenta y como resultado la temperatura a la que la doble hélice se desnaturaliza aumenta entre 5 y 12 °C. Sin embargo, en los casos en los que no predomina la intercalación no se observan cambios significativos en la temperatura de desnaturalización (Saenger, 1984).

Se ha estudiado cómo afecta la interacción de los compuestos 3,4-DHsalophen y 2,5-DHsalophen con CT-ADN, a la temperatura de desnaturalización. En primer lugar, como experimento control, se registró la absorbancia a 260 nm de una disolución de CT-ADN (72 μM en pares de bases) preparada en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) en función de la temperatura (Figura 50). Para ello se utilizó un espectrofotómetro UV-visible conectado a un baño termostatzado, y la temperatura de la cubeta se midió con una sonda de platino en el intervalo de 30-90 °C a una velocidad de 1°C min⁻¹. La temperatura de melting se obtiene en el punto de máxima pendiente de la curva, es decir, en el punto de inflexión. Así, se ha encontrado un valor para la temperatura de melting de 64.4±0.5°C.

A continuación, se prepararon disoluciones de CT-ADN (72 μM) en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4) en presencia de 3,4-DHsalophen (6.6 μM) o de 2,5-DHsalophen (6.5 μM). Las disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora y a continuación, se registró la variación de la absorbancia a 260 nm en función de la temperatura manteniendo la misma concentración del ligando correspondiente en la cubeta de referencia. En la Figura 50 se muestra la variación de la absorbancia relativa en función de

la temperatura. En presencia de los derivados DHsalophen, la temperatura de desnaturalización aumenta 2.7 ± 0.2 °C y 1.5 ± 0.1 °C, para el caso del 3,4-DHsalophen y del 2,5-DHsalophen, respectivamente.

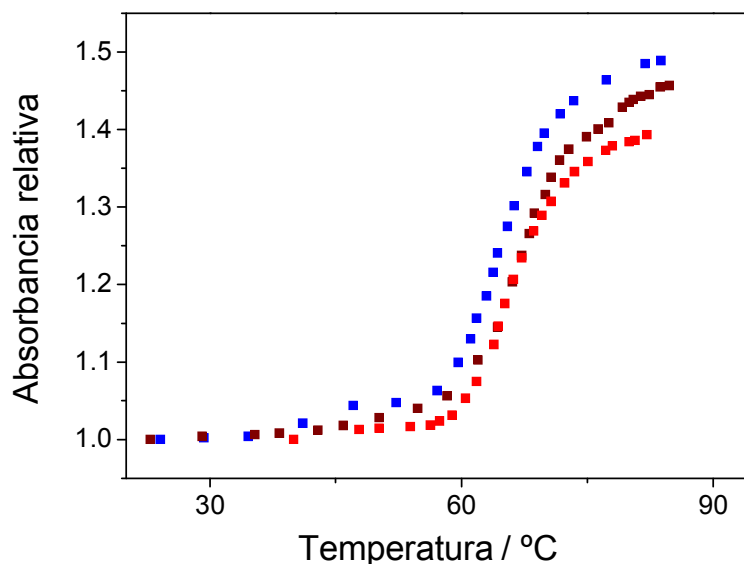


Figura 50: Variación de la absorbancia relativa, medida a 260 nm, en función de la temperatura de una disolución $72 \mu\text{M}$ de CT-ADN en Tris-HCl 5.0 mM (pH 7.4), en ausencia (■) y en presencia de 3,4-DHsalophen $6.6 \mu\text{M}$ (■) o de 2,5-DHsalophen $6.5 \mu\text{M}$ (■).

Esta pequeña variación en la temperatura de desnaturalización del CT-ADN, observada en presencia de los isómeros del DHsalophen, sugiere que la interacción de estos compuestos con el ADN no se debe exclusivamente a la intercalación entre las bases. Estos incrementos son típicos cuando las moléculas se unen al CT-ADN a través de los surcos, como en el caso de algunos complejos metálicos de base Schiff o de tintes como el ioduro de *trans*-4-[4-dimetilamino]estiril]-1-metilpiridina (Kashanian y cols, 2007; Kumar y cols, 1993; Vijayalakshmi y cols, 2000).

Como resumen de los estudios de interacción llevados a cabo en disolución utilizando técnicas espectroscópicas se puede concluir que el modo de interacción más probable entre los derivados del DHsalophen y el ADN sea la consecuencia de una interacción del ligando a través de los surcos y una posterior intercalación parcial de

alguno de los dominios aromáticos, con los pares de bases adyacentes. Esta interpretación, basada en nuestros datos experimentales, es meramente especulativa y debería corroborarse con estudios cristalográficos que quedan fuera de los objetivos de este trabajo. Además, se ha comprobado que la interacción es casi selectiva del CT-ADN de cadena doble respecto al de cadena sencilla. Esta propiedad es muy importante a la hora de elegir las moléculas que pueden ser utilizadas como indicadores redox en el desarrollo de biosensores de ADN. Por otro lado, los valores obtenidos para los distintos parámetros estudiados sugieren que el isómero 3,4-DHsalophen se une más fuertemente al CT-ADN que el isómero 2,5-DHsalophen. Por este motivo, los siguientes estudios de interacción mediante técnicas electroquímicas se centraron exclusivamente en el 3,4-DHsalophen.

2. Estudio de la interacción del 3,4-DHsalophen con CT-ADN por métodos electroquímicos

Debido a la presencia de grupos funcionales electroactivos (hidroquinona/quinona) en la estructura de los derivados del DHsalophen se ha podido estudiar la interacción de estos compuestos con el CT-ADN mediante técnicas electroquímicas. Se han llevado a cabo estudios directamente en disolución o bien en electrodos modificados con el material biológico inmovilizado, utilizando las técnicas de voltamperometría cíclica o voltamperometría diferencial de impulsos. Gracias a estos estudios se podrá determinar si el 3,4-DHsalophen va a ser útil para ser utilizado como marcador de eventos de hibridación, en el desarrollo de genosensores.

2.1. Interacción del 3,4-DHsalophen con CT-ADN en disolución

Para estudiar la interacción entre 3,4-DHsalophen y CT-ADN mediante técnicas electroquímicas, se han elegido electrodos de oro, como sustrato, para realizar los estudios. Aunque la respuesta del 3,4-DHsalophen se ha estudiado en electrodos de carbón vítreo en apartados anteriores, el cambio a electrodos de oro se debe a la intención de estudiar la interacción del mediador redox con oligonucleótidos derivatizados con grupos hexalquiltiol e inmovilizados por quimisorción sobre este metal.

En primer lugar, se ha estudiado el comportamiento electroquímico del 3,4-DHsalophen en ausencia de CT-ADN sobre un electrodo de oro pulido y activado. La caracterización electroquímica se llevó a cabo utilizando como electrolito KNO_3 5.0 mM. Se preparó una disolución 50 μM de 3,4-DHsalophen y la voltamperometría cíclica se llevó a cabo entre los potenciales -0.5 V y +0.7 V a 100 mV s^{-1} , tal y como se describe en la parte experimental. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 51 (—).

El primer barrido cíclico muestra un proceso de oxidación con un potencial de pico de +0.430 V, que puede asociarse a la oxidación de las hidroquinonas presentes en el 3,4-DHsalophen. En el barrido de vuelta se puede observar la correspondiente onda de reducción asociada con un pico de potencial de +0.270 V. El alto valor de la diferencia de potenciales de pico, ΔE_p , (0.160 V), observada para la oxidación y posterior reducción del grupo hidroquinona/quinona presente en el 3,4-DHsalophen en electrodos de oro, implica limitaciones en la cinética de transferencia de carga, y por tanto, una acusada irreversibilidad electroquímica. Además, los voltamperogramas cíclicos siguientes (no mostrados) obtenidos en electrodos de oro presentan una separación de potenciales de pico mayores y un descenso gradual en las corrientes anódica y catódica. Este comportamiento sugiere que el 3,4-DHsalophen se deposita en la superficie del electrodo de oro tras cada barrido de potencial, dando lugar a películas no electroactivas, y por lo tanto la superficie del electrodo de oro se inhibe gradualmente.

Los voltamperogramas cíclicos de una disolución 50 μM de 3,4-DHsalophen en KNO_3 5.0 mM a diferentes velocidades de barrido (entre 20 y 500 mV s^{-1}), muestran que la

corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido en todo el intervalo de velocidades estudiado, lo que es característico de un proceso de adsorción. Para llevar a cabo este estudio, el electrodo de oro se limpió y activó en H_2SO_4 0.1 M antes de obtener el ciclo voltamperograma para cada velocidad de barrido. De este modo, cada voltamperograma se registró sobre una superficie de oro limpia, regenerada y no inhibida por la deposición del 3,4-DHsalophen.

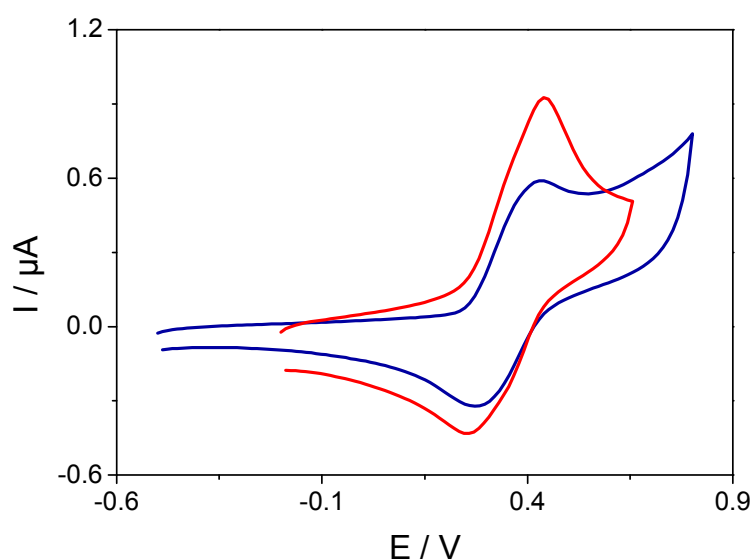


Figura 51: Voltamperogramas cíclicos de una disolución 50 μM de 3,4-DHsalophen en un electrodo de oro, en KNO_3 5.0 mM (—) o en KNO_3 5.0 mM / KCl 150 mM (—). Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .

	E_{pa}/V	E_{pc}/V	$E^{\circ'}/\text{V}$	$\Delta E_p/\text{V}$	I_{pa}/I_{pc}
3,4-DHsalophen en KNO_3 5.0 mM	+0.430	+0.270	+0.350	+0.160	0.8
3,4-DHsalophen en KNO_3 5.0 mM/KCl 150 mM	+0.440	+0.260	+0.350	+0.180	1.3

Tabla 13: Valores de los potenciales de pico anódico y catódico, potencial formal, diferencia de potenciales de pico y relación de intensidades de corriente de pico anódica y catódica, de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 51.

Para comprobar si las limitaciones cinéticas observadas se deben a efectos de resistencia derivadas de la baja fuerza iónica (KNO_3 5.0 mM), se ha estudiado el comportamiento ciclovoltamperométrico de 3,4-DHsalophen (50 μM) en un medio con fuerza iónica alta (KNO_3 5.0 mM / KCl 150 mM). Los resultados de ambos experimentos se resumen en la Tabla 13. El potencial se cicló entre -0.2 V y + 0.6 V, a 100 mV s^{-1} . Como se puede observar en la Figura 51 (—), el aumento de la fuerza iónica implica un aumento significativo de las corrientes de pico anódico y catódico, pero no rebaja sustancialmente el gran ΔE_p del sistema, que sigue siendo electroquímicamente irreversible. Además, pueden observarse dos preondas de adsorción en el proceso anódico y catódico que se superponen a la respuesta controlada por difusión. Este dato indica que el aumento de fuerza iónica mejora el comportamiento difusional de la respuesta pero no parece minimizar la adsorción. Por otra parte, como se ha comentado a lo largo del Capítulo, el aumento de la fuerza iónica desfavorece la interacción entre el CT-ADN y las moléculas que se unen a los surcos de la doble hélice. Por tanto, para los estudios electroquímicos de interacción entre 3,4-DHsalophen y CT-ADN se ha utilizado como electrolito KNO_3 5.0 mM.

Para estudiar la interacción entre el isómero 3,4-DHsalophen y el CT-ADN de cadena doble se llevaron a cabo estudios de titulación en disolución y en electrodos modificados con el material biológico. Para estos estudios se prepararon disoluciones que contenían una concentración fija de 3,4-DHsalophen (50 μM) y CT-ADN, en concentración variable, en KNO_3 5.0 mM. Estas disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora para conseguir el equilibrio de unión. Los electrodos de oro, limpios y activados, se sumergieron en la disolución justo antes de llevar a cabo la medida electroquímica y sólo se recogió el primer voltamperograma cíclico (Figura 52). Este protocolo experimental tiene como finalidad minimizar los efectos de adsorción del 3,4-DHsalophen y del CT-ADN, sobre la superficie de los electrodos. En estas condiciones, los voltamperogramas cíclicos de 3,4-DHsalophen obtenidos en presencia de concentraciones crecientes de CT-ADN presentan un desplazamiento significativo tanto en el potencial de pico catódico como anódico, hacia valores más negativos (Tabla 14). Estos resultados indican que en el

complejo formado 3,4-DHsalophen-CT-ADN es más fácil la oxidación de la hidroquinona, pero al tiempo resulta más difícil la reducción de la forma oxidada obtenida. El primer efecto se da con más intensidad que el segundo lo que implica que el potencial formal se hace más negativo al aumentar la concentración de CT-ADN. En presencia de un exceso de concentración de CT-ADN ($R=47$), el valor del potencial formal se desplaza 85 mV hacia potenciales más negativos.

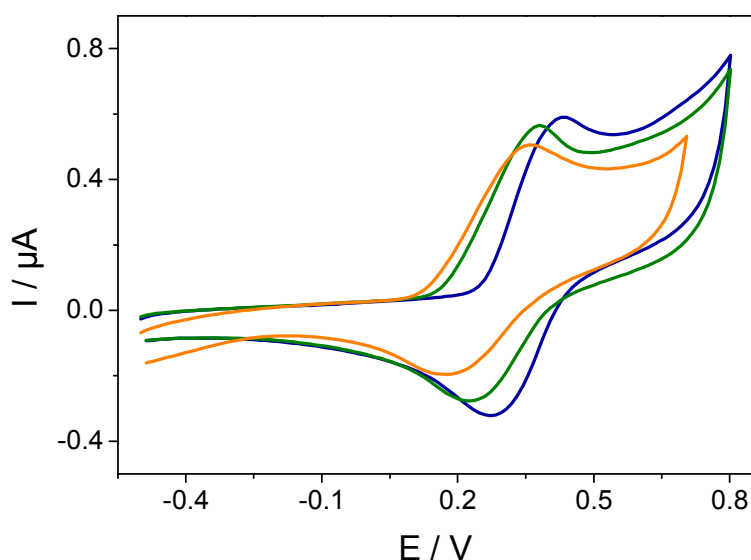


Figura 52: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de oro en una disolución 50 μM de 3,4-DHsalophen en ausencia (—) o en presencia de diferentes concentraciones de CT-ADN, 800 μM (—) ó 2.35 mM (—), en KNO_3 5.0 mM. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .

R^*	E_{pa}/V	E_{pc}/V	$E^{\circ'}/\text{V}$	$\Delta E_p/\text{V}$	$I_{pa}/\mu\text{A}$	$I_{pc}/\mu\text{A}$	I_{pa}/I_{pc}
0	+0.430	+0.270	+0.350	+0.160	0.53	0.39	1.4
16	+0.380	+0.225	+0.302	+0.155	0.50	0.31	1.6
47	+0.350	+0.180	+0.265	+0.170	0.47	0.22	2.1

* $R=[\text{CT-ADN}]/[3,4\text{-DHsalophen}]$

Tabla 14: Valores de los potenciales de pico anódico y catódico, potencial formal, diferencia de potenciales de pico e intensidades de corriente de pico anódica y catódica, de los voltamperogramas cíclicos de la Figura 52.

Aunque el sistema en disolución está alejado de mostrar un comportamiento Nernstiano se ha aplicado el modelo de interacción propuesto por Bard y Carter (Carter y cols, 1989) para estimar la relación entre las constantes del equilibrio de interacción de la forma oxidada y la reducida (K_{ox}/K_{red}) con el CT-ADN (Figura 53).

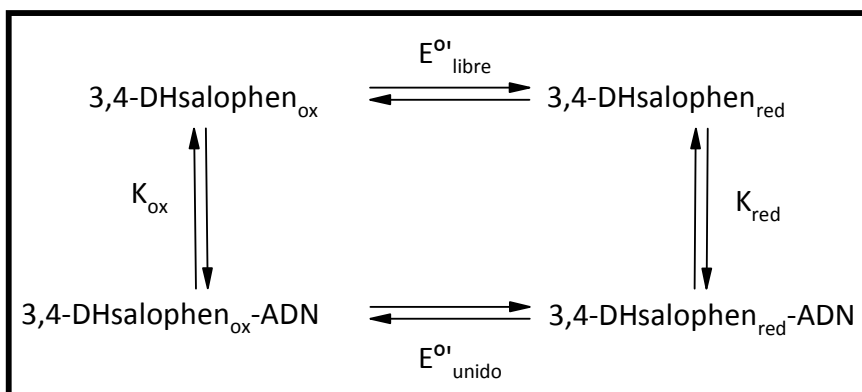


Figura 53: Procesos redox del 3,4-DHsalophen en disolución y del complejo 3,4-DHsalophen-CT-ADN en disolución.

La relación de las constantes de equilibrio de unión de las formas oxidada y reducida (K_{ox}/K_{red}) se ha determinado a partir de la siguiente ecuación:

$$E_{libre}^{0'} - E_{unido}^{0'} = \left(\frac{0.059}{n} \right) \log \frac{K_{ox}}{K_{red}}$$

Con un desplazamiento de potencial formal de 85 mV, la relación de constantes K_{ox}/K_{red} puede estimarse en 760. Resaltando nuevamente la naturaleza no Nernstiana de nuestro sistema parece claro que la forma oxidada del 3,4-DHsalophen muestra un equilibrio de asociación con el CT-ADN que, al menos cualitativamente, parece estar más favorecido que el par redox reducido.

Por otra parte, las corrientes de pico disminuyen al aumentar la concentración de CT-ADN (Tabla 14). Esta disminución de las corrientes de pico al aumentar la concentración de CT-ADN en las disoluciones, puede ser interpretada en base a una

disminución del coeficiente de difusión aparente del 3,4-DHsalophen cuando la molécula está unida al CT-ADN (Carter y cols, 1989). En presencia de un gran exceso de concentración de CT-ADN ($R \geq 47$), la disminución en las corrientes de pico permanece constante, y es aproximadamente del 15%. Desde el punto de vista analítico, la conclusión que se deriva de estos estudios es que la unión entre el CT-ADN y 3,4-DHsalophen supone una disminución en la electroactividad de la molécula. Sin embargo, se mantiene lo suficientemente electroactiva como para poder ser utilizada como indicador redox de eventos de hibridación que es el objetivo que se persigue en este trabajo.

2.2. Respuesta electroquímica del 3,4-DHsalophen en electrodos modificados con CT-ADN

Una vez estudiada la interacción en disolución, se estudió la interacción del 3,4-DHsalophen con CT-ADN inmovilizado sobre la superficie de un electrodo de oro. Como se ha indicado en la Introducción de la Memoria, el fundamento en el desarrollo de biosensores electroquímicos de ADN utilizando indicadores electroactivos reside en que la respuesta del indicador redox sea diferente cuando se une a la cadena sencilla o a la cadena doble de ADN. En una situación ideal sólo se obtiene respuesta, en forma de pico de intensidad de corriente, cuando el indicador interacciona con la doble hélice de ADN formada tras su hibridación. En base a estas premisas, se utilizó la técnica voltamperometría diferencial de impulsos para obtener una respuesta más sensible del proceso de interacción.

El método de inmovilización utilizado fue el de adsorción directa, ya que es el más sencillo y rápido, para un ADN sin derivatizar como es el CT-ADN. La inmovilización de CT-ADN de cadena doble (dsCT-ADN), así como de cadena sencilla (ssCT-ADN), se llevó a cabo según el procedimiento utilizado por Zhao y cols., con algunas modificaciones, como se describe en materiales y métodos (Zhao y cols, 1997). Para llevar a cabo la adsorción directa, una alícuota de 10 μl de una disolución 1.0 mg ml^{-1} de la forma correspondiente de CT-ADN se depositó con cuidado sobre la superficie pulida y activada de un electrodo de oro y se dejó secar a temperatura ambiente. Para eliminar el material no adsorbido, los

electrodos modificados se sumergieron en agua destilada y autoclavada durante treinta minutos.

Para comprobar que la superficie estaba modificada con el material biológico, se realizó un ensayo voltamperométrico con un electrodo modificado con dsCT-ADN en una disolución de 10.0 mM de ferricianuro potásico en 0.1 M de tampón fosfato (pH 7.0), utilizado como sonda electroactiva. El ferricianuro potásico tiene carga negativa por lo que debido al efecto de repulsión de cargas no se unirá al esqueleto fosfato-desoxirribosa cargado, también, negativamente. Por lo tanto, si el ADN está inmovilizado sobre el electrodo de oro existirá una pérdida de señal del voltamperograma resultante al compararlo con el voltamperograma obtenido para el ferricianuro potásico en un electrodo de oro limpio.

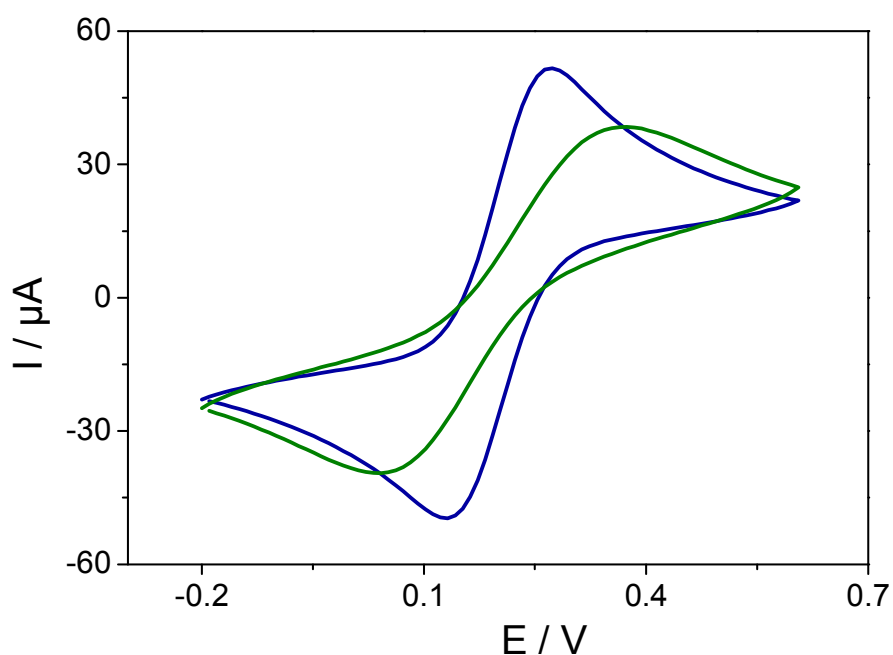


Figura 54: Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de oro limpio (—) y modificado con dsCT-ADN (—) en una disolución 10.0 mM de ferricianuro potásico en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.0). Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .

La Figura 54 muestra los ciclovoltamperogramas de ferricinauro potásico en electrodos de oro antes y después de ser modificados con ADN de cadena doble. En el electrodo limpio se obtuvo la respuesta redox típica del sistema ferro/ferri, con un potencial formal de +0.203 V y una separación entre potenciales de pico de 0.140 V. Sin embargo, cuando los electrodos de oro están modificados con CT-ADN de cadena doble, la respuesta ciclovoltamperométrica se vuelve más irreversible ($\Delta E_p = 0.332$ V) y además, se observa una severa disminución de la intensidad de corriente catódica y anódica. Estos resultados son producto de la repulsión electrostática entre el ADN de cadena doble con el ferricianuro potásico, como se había anticipado para este tipo de interacción.

Una vez que se comprobó que la superficie del electrodo se encontraba recubierta con ADN, los electrodos modificados se incubaron a circuito abierto en una disolución 50 μ M de 3,4-DHsalophen en KNO_3 5.0 mM, durante cuatro horas. Pasado ese tiempo, los electrodos se aclararon con agua destilada y autoclavada; y se transfirieron a la celda electroquímica que contenía como electrolito soporte una disolución de KNO_3 5.0 mM, sin 3,4-DHsalophen. Se recogió el primer voltamperograma diferencial de impulsos barriendo el potencial desde -0.05 V hasta +0.55 V. En la Figura 55 se observa la señal obtenida mediante voltamprometría diferencial de impulsos de un electrodo de oro modificado con dsCT-ADN o ssCT-ADN en electrolito soporte, después de haber acumulado el mediador redox, a circuito abierto, en los electrodos modificados con los ácidos nucleicos. La respuesta electroquímica de los electrodos modificados con dsCT-ADN es significativamente mayor que la obtenida en el caso de los electrodos modificados con ssCT-ADN. La relación entre las corrientes de pico ($\delta i_{dsCT-ADN} / \delta i_{ssCT-ADN}$) medida con los voltamperogramas diferenciales de impulsos de electrodos modificados con recubrimientos superficiales de CT-ADN similares, es de 5, evidenciando así una mayor respuesta de la señal para los electrodos modificados con el CT-ADN de cadena doble. Este valor es suficientemente grande como para considerar al 3,4-DHsalophen como un indicador redox para la detección de eventos de hibridación, en biosensores basados en secuencias de ADN.

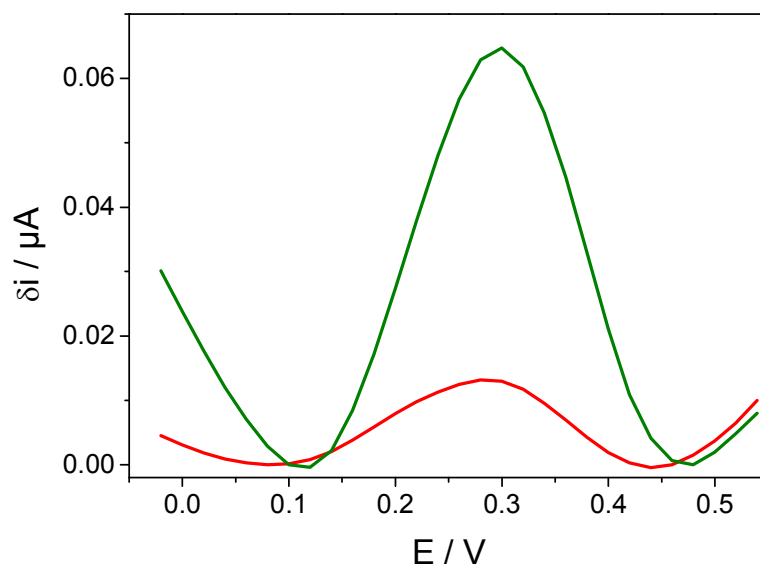


Figura 55: Voltamperogramas diferenciales de impulsos de 3,4-DHsalophen acumulado a circuito abierto en un electrodo de oro modificado con dsCT-ADN (—) o ssCT-ADN (—). Medidas realizadas en KNO_3 5.0 mM. Velocidad de barrido 10 mV s^{-1} , amplitud de pulso 50 mV y periodo de pulso 200 ms.

Se puede concluir que mediante la técnica de voltamperometría diferencial de impulsos se puede distinguir la interacción del 3,4-DHsalophen con ADN de cadena simple del de cadena doble, por la diferencia en la magnitud de la respuesta electroquímica. Por tanto, se procederá a estudiar la respuesta electroquímica con secuencias cortas de oligonucleótidos con el objetivo de desarrollar un biosensor de ADN utilizando como indicador electroquímico el compuesto 3,4-DHsalophen.

CAPÍTULO VII

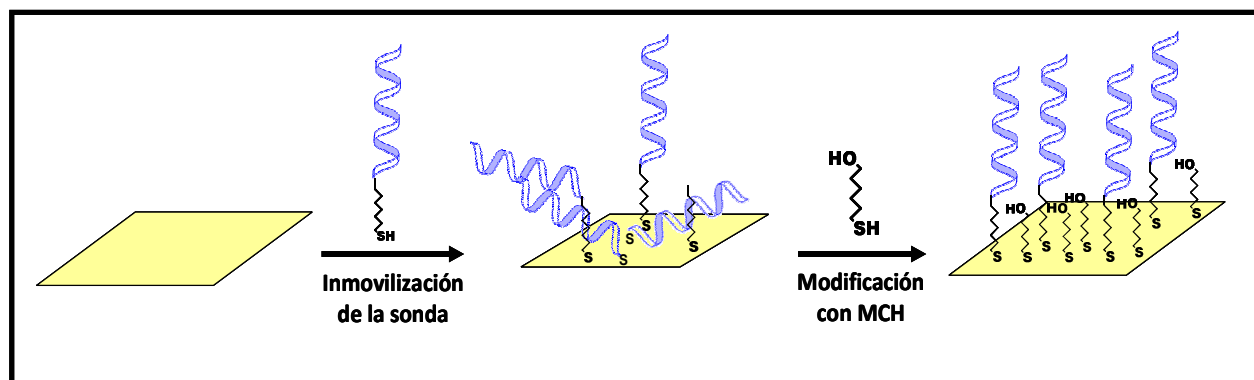
DISEÑO DE UN GENOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE UNA SECUENCIA DE *Helicobacter pylori*

La detección de secuencias específicas de ADN usando métodos electroquímicos puede permitir una rápida y no costosa detección e identificación de la presencia de microorganismos patógenos en sangre o en otros fluidos biológicos, lo que constituye un gran avance para la detección precoz de las infecciones provocadas por esos patógenos. *Helicobacter pylori* es una bacteria causante de enfermedades digestivas tales como gastritis, úlceras pépticas y posiblemente dos tipos de cáncer de estómago (Blaser, 1990). Por lo anterior es considerado el principal agente etiológico para la mayoría de los trastornos gástricos y fue declarado en 1994, por la Organización Mundial de la Salud, como agente carcinogénico de tipo I para el hombre (OMS, 1994). Los métodos convencionales de detección de esta infección como, por ejemplo, la biopsia gástrica, métodos ELISA y cultivos bacterianos, requieren un tiempo de análisis largo. Dado que este tipo de enfermedades afectan a un elevado porcentaje de la población mundial, el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico específicos, sensibles y rápidos es de gran interés sanitario. Además, aunque la bacteria puede ser erradicada con el tratamiento común de ciertos antibióticos, cada vez son más frecuentes los casos de pacientes en los que el tratamiento no es efectivo a causa de cepas bacterianas con resistencia adquirida a los antibióticos. Por tanto, es necesario el desarrollo de métodos rápidos y sencillos que detecten estas resistencias. En concreto, para el antibiótico claritromicina, más del 90 % de las resistencias observadas en *H. pylori*, son debidas a distintas mutaciones, por transición o transversión, de una base adenina en una secuencia localizada de un gen de la bacteria (Megraud, 2004). Por tanto, es de gran importancia la detección de la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido en la estirpe mutada respecto a la estirpe silvestre. En general, las técnicas más usadas para la detección de las mutaciones asociadas a las resistencias a estos antibióticos son la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) o la secuenciación del ADN (Lage y cols, 1996; Lage y cols, 1995). Sin embargo, estas

metodologías son largas y complejas, y necesitan el marcaje de los analitos. Para superar estos inconvenientes, algunos autores han desarrollado con éxito biosensores de ADN que permitan la detección de mutaciones de una sola base (Lapierre y cols, 2003; Steichen y cols, 2007).

Los resultados descritos y discutidos en el Capítulo anterior sobre la interacción de 3,4-DHsalophen con ADN han permitido abordar el desarrollo de un biosensor de ADN con transducción electroquímica. El indicador redox escogido fue el compuesto 3,4-DHsalophen ya que reunía las mejores propiedades para el objetivo deseado, tal como se ha discutido en el Capítulo anterior.

ETAPA DE INMOVILIZACIÓN EN DOS FASES



ETAPAS DE HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN

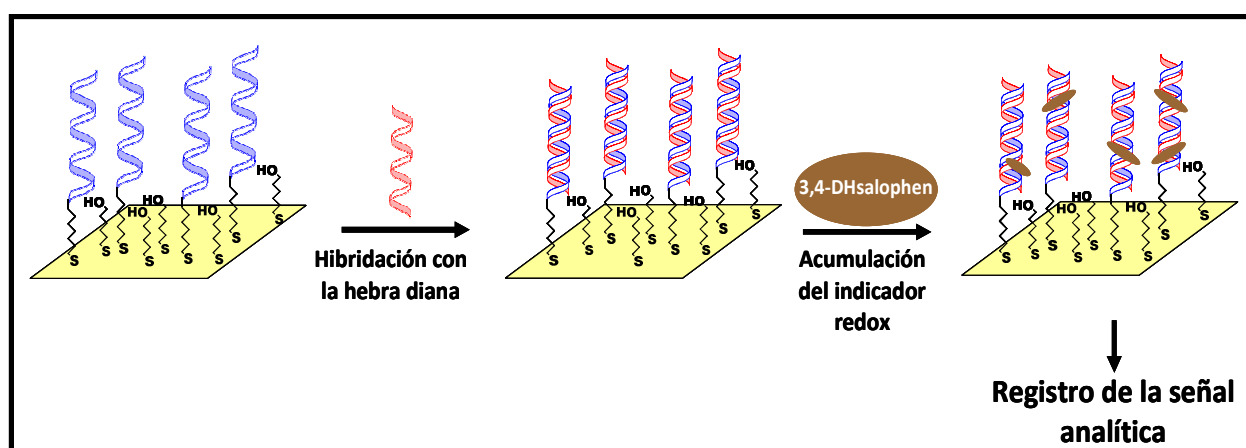


Figura 56: Representación esquemática del procedimiento analítico para el seguimiento del evento de hibridación sobre electrodos de oro.

1. Etapas en el desarrollo del biosensor

En general, la construcción de un biosensor electroquímico de ADN implica los siguientes etapas:

- inmovilización de la sonda modificada de forma adecuada
- hibridación con la secuencia complementaria o hebra diana (analito)
- detección electroquímica del evento de hibridación

En la Figura 56 se muestran las etapas necesarias para desarrollar el biosensor propuesto, que serán descritas con detalle a continuación.

1.1. Inmovilización de la sonda

Uno de los aspectos primordiales en el diseño y construcción de genosensores o biosensores de ADN es la inmovilización del elemento biológico sobre el material base, ya que del éxito de este primer paso, en parte, va a depender el resultado del proceso de hibridación con la secuencia complementaria y el consiguiente reconocimiento del mismo (Gooding, 2002).

Entre las distintas metodologías descritas para la inmovilización de secuencias de oligonucleótidos sobre las superficies transductoras, se ha elegido la inmovilización por quimisorción de sondas derivatizadas con un grupo hexalquiltiol en el fosfato del extremo 5'. El uso de este tipo de sondas presenta varias ventajas. En primer lugar, respecto a su disponibilidad cabe destacar que estas sondas modificadas las suministran varias casas comerciales, si bien es posible la obtención de productos de PCR de muestras reales, ya modificadas. Por otra parte, esta unión, además de ser bastante fuerte, es experimentalmente fácil de llevar a cabo y permite la movilidad conformacional del oligonucleótido, lo que favorecerá la reacción de hibridación (Lucarelli y cols, 2004; Sun y cols, 1998). Por estas razones se decidió utilizar un método de inmovilización basado en el descrito por Herne y colaboradores (Herne y Tarlov, 1997; Steel y cols, 1998), y que se encuentra detallado en la sección de Materiales y Métodos. Según este protocolo la

inmovilización se realiza en dos pasos: primero se modifica la superficie de oro con la sonda tiolada (ssADN-SH) y a continuación, se inmoviliza un tiol de cadena corta, como el 1-mercapto-6-hexanol (MCH). Usando este proceso se forman monocapas mixtas ssADN-SH/MCH. En el primer paso de la inmovilización, los oligonucleótidos tiolados interactúan con la superficie de oro a través del átomo de azufre del grupo tiol y a través de los nitrógenos de las bases nucleotídicas. En el segundo paso, al exponer esta superficie de oro modificada con la sonda tiolada al MCH, estas secuencias son orientadas verticalmente como resultado de la competencia entre el grupo tiolado del espaciador y las bases nucleotídicas para interactuar con la superficie de oro. La interacción S-Au es más fuerte que la de los grupos funcionales de las bases nucleotídicas con el oro, por lo tanto el MCH es el encargado de desplazar del electrodo las moléculas de sonda unidas débilmente o de forma inespecífica. Este ordenamiento de las secuencias hace que los oligonucleótidos anclados en la mayor parte de la superficie puedan ser accesibles para que se produzca una hibridación con la secuencia complementaria. Además, el uso de MCH bloquea las regiones no modificadas del electrodo del oro y minimiza la más que posible adsorción del indicador redox sobre la superficie de los electrodos, como se ha descrito en el Capítulo anterior.

La sonda de ADN utilizada en el desarrollo del biosensor consistió en una secuencia sintética de 25 bases de la bacteria *H. pylori* derivatizada en el extremo 5' con un hexaalquiltiol (Hp1-SH). La concentración de oligonucleotido sonda se eligió en función de los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación, en el desarrollo de biosensores electroquímicos de ADN (del Pozo y cols, 2005a).

Los electrodos limpios y activados se modificaron depositando 10 μ l de una disolución 40 μ M de la sonda sobre la superficie del electrodo, y se dejó una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, el electrodo modificado se sumergió durante 30 minutos en agua destilada y autoclavaza, para eliminar el material no adsorbido. A continuación, los electrodos ya modificados con la sonda tiolada se sumergieron en una disolución 1.0 mM de MCH en agua durante una hora (Herne y Tarlov, 1997). Por último, el electrodo modificado con la monocapa mixta se sumergió durante 30 minutos en agua

destilada y autoclavada.

Para comprobar la formación de la monocapa se realizó la desorción de los tioles de la superficie electródica. Para ello, se utilizaron tres electrodos modificados con HP1-SH, MCH y con la monocapa mixta, respectivamente. Se sumergieron en una disolución 0.5 M de KOH y se aplicó un único barrido cíclico de potencial entre -0.2 V y -1.3 V (Widrig y cols, 1991). En la Figura 57 se muestran los voltamperogramas cíclicos de la desorción de tioles obtenidos para cada uno de los casos.

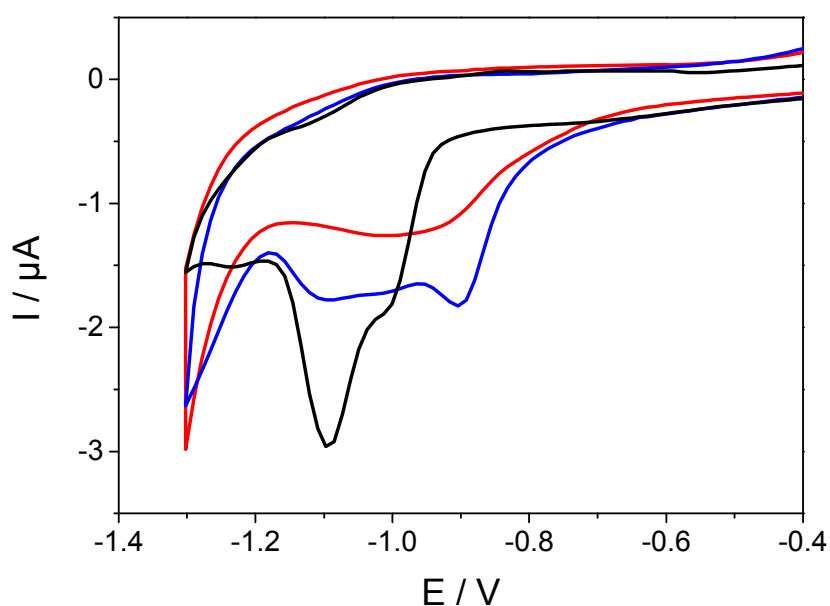


Figura 57: Voltamperogramas cíclicos de la desorción de tioles de electrodos de oro modificados con una monocapa de Hp1-SH (—), de MCH (—) o de una monocapa mixta Hp1-SH/MCH (—) en 0.5 M KOH. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .

Cuando el electrodo está modificado con la sonda Hp1-SH se obtiene un pico de desorción muy ancho que puede adscribirse a la desorción de moléculas de sonda adsorbidas en muy diversas formas, como se muestra de forma esquemáticamente en la Figura 56. Cuando el electrodo se encuentra modificado con MCH, se obtiene un pico bien definido a -1.10 V, precedido de un pico que puede ser debido a la desorción de diversos agregados micelares del tiol, inmovilizados aleatoriamente sobre el electrodo. Cuando el

electrodo se encuentra modificado con una monocapa mixta de Hp1-SH y MCH, aparecen dos picos de reducción a potenciales de -0.90 V y -1.00 V, indicando que existen dos poblaciones diferenciadas de tioles con potenciales de reducción distintos.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la unión específica de oligonucleótidos a los electrodos de oro a través de grupos de tioles es un método eficaz y reproducible de inmovilización. Sin embargo, la presencia de MCH en la superficie del electrodo no nos permite utilizar la desorción de tioles como método de cuantificación de los oligonucleótidos inmovilizados. Por este motivo, el recubrimiento de la superficie de los electrodos modificados con oligonucleótidos tiolados se calculó siguiendo el método cronocoulombimétrico descrito por Tarlov y colaboradores (Steel y cols, 1998), obteniéndose un valor medio de $(5.3 \pm 0.2) \times 10^{-12}$ mol de oligonucleótido cm^{-2} .

1.2. Hibridación con la hebra diana

La hibridación consiste en la autoasociación de hebras polinucleotídicas complementarias que no procedan del mismo dúplex. La reacción de hibridación supone el fundamento químico de la mayoría de los ensayos de ácidos nucleicos y presenta dos características que le confieren ventajas para su aplicación analítica: especificidad (unión específica entre bases) y reversibilidad (hibridación-desnaturalización). Además de la composición de bases de las cadenas, existe una serie de parámetros que afectan a la posibilidad de hibridación de dos hebras simples y que, por tanto, condicionan experimentalmente la realización de un ensayo de hibridación. Estos factores están esencialmente relacionados con la concentración de la hebra diana, la temperatura y tiempo de hibridación y las características del medio de reacción. Las condiciones de hibridación se han optimizado en trabajos anteriores del grupo de investigación y por ello se eligieron los protocolos utilizados en dichos trabajos (del Pozo y cols, 2005a).

De acuerdo con estos estudios previos, las condiciones experimentales fueron las siguientes. Los electrodos de oro modificados con la sonda tiolada y MCH, se incubaron durante una hora a 40 °C con 20 μl de una disolución de secuencia complementaria no

tiolada preparada en tampón de hibridación fosfato 10 mM / NaCl 0.4 M pH 7.0. Posteriormente, los electrodos se lavaron con agua destilada y autoclavada para eliminar posibles restos de oligonucleótidos unidos inespecíficamente. Los electrodos obtenidos después del evento de hibridación se usaron inmediatamente, para llevar a cabo el protocolo de detección.

1.3. Detección del evento de hibridación. Acumulación del indicador a circuito abierto

La detección electroquímica del dúplex formado en la reacción de hibridación se llevó a cabo mediante el uso de 3,4-DHsalophen como indicador redox. Tras la hibridación, los electrodos obtenidos se sumergieron en una disolución 50 μ M de 3,4-DHsalophen en KNO_3 5.0 mM, y se acumuló a circuito abierto durante cuatro horas. Tras un lavado en agua ultrapura, los electrodos se introdujeron en una disolución de KNO_3 5.0 mM y se realizó un barrido de potencial hasta +0.65 V, obteniéndose de este modo la señal analítica. Para obtener la señal correspondiente al blanco, se siguió el mismo procedimiento pero sin llevar a cabo la etapa de hibridación con la hebra diana. Además, se llevó a cabo un experimento control siguiendo el mismo procedimiento salvo que la hebra diana fue una secuencia que no presenta ningún grado de complementariedad con la sonda Hp1-SH (Hp2_{NC}).

En la Figura 58 se muestran los voltamperogramas diferenciales de impulsos obtenidos para un electrodo modificado sólo con la sonda Hp1-SH, un electrodo modificado con la sonda e incubado con 22.2 μ M de analito (Hp2_C) y un electrodo modificado con la sonda e incubado con 22.2 μ M de Hp2_{NC}. De manera similar a lo observado previamente para electrodos modificados con CT-ADN, se observa que la hibridación aumenta la intensidad de corriente de pico medida a +0.35 V, respecto al blanco y al experimento control cuando se incubaba el electrodo con una secuencia no complementaria. La corriente de pico observada puede asociarse con el grupo funcional hidroquinona/quinona de la molécula de 3,4-DHsalophen unida a la doble hélice, la cual aumenta su acumulación sobre el electrodo debido a su asociación preferente al ADN de

doble cadena, es decir, cuando la sonda de *H. pylori* (Hp1-SH) hibrida con su secuencia complementaria (Hp2_c) presente en la disolución problema. Este resultado sugiere que el reconocimiento de una secuencia complementaria mediante hibridación con una secuencia sonda inmovilizada en la superficie de un electrodo puede ser detectada si se utiliza el 3,4-DHsalophen como indicador electroquímico.

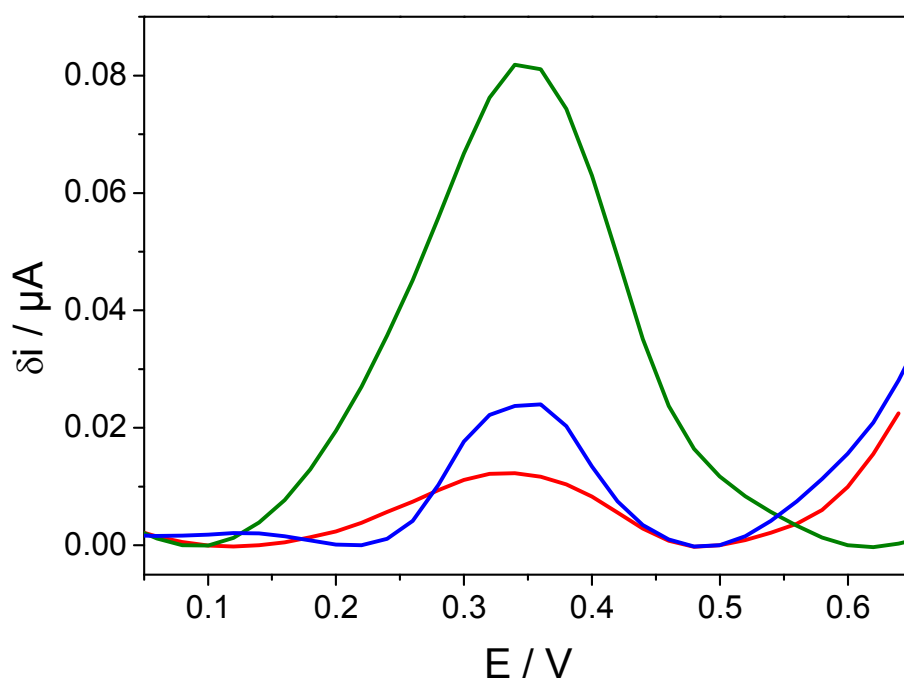


Figura 58: Voltamperogramas diferenciales de impulsos de 3,4-DHsalophen acumulado a circuito abierto en un electrodo modificado con la sonda Hp1-SH (—), un electrodo modificado con la sonda e incubado con 22.2 μM de Hp2_c (—) y un electrodo modificado con la sonda e incubado con 22.2 μM de Hp2_{NC} (—). Medidas realizadas en 5.0 mM KNO₃. Velocidad de barrido 10 mV s⁻¹, amplitud de pulso 50 mV y período de pulso 200 ms.

Una variable a optimizar es el estudio del tiempo óptimo de acumulación del 3,4-DHsalophen para obtener las mejores señales analíticas. En la Figura 59 se muestra el efecto del tiempo de acumulación a circuito abierto del 3,4-DHsalophen en un electrodo modificado, tal y como se ha descrito hasta el momento. Se observa cómo la intensidad del pico de la señal analítica, normalizada con el recubrimiento de sonda, incrementa su valor a medida que aumenta el tiempo de acumulación, hasta alcanzar un máximo para un tiempo de cuatro horas. Por tanto, se eligieron cuatro horas como el tiempo óptimo de acumulación del indicador redox.

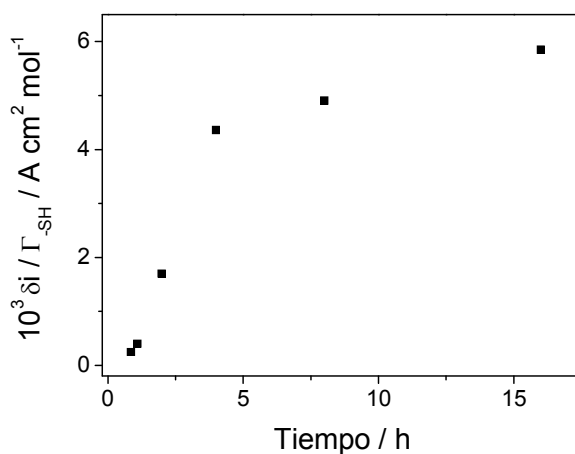


Figura 59: Efecto del tiempo de acumulación del 3,4-DHsalophen sobre la señal analítica normalizada con el recubrimiento de sonda.

2. Propiedades analíticas del biosensor

Con la finalidad de obtener las propiedades analíticas del biosensor, se estudió la variación de la respuesta por voltamperometría diferencial de impulsos a +0.35 V en función de la cantidad de analito (Hp2_C) presente en la disolución en la que se lleva cabo la hibridación. El intervalo estudiado de concentración de analito fue 0.87-22.2 μM. La variación de los valores de las corrientes para una cantidad de Hp2_C dada fue del 10%, para distintos electrodos. Este hecho se debe probablemente a pequeñas variaciones en el recubrimiento de la secuencia sonda sobre diferentes electrodos. Este efecto se corrigió

mediante la representación de $(i-i_0)/i_0$ frente a la cantidad de secuencia analito depositada sobre el electrodo, donde i_0 e i corresponden a la intensidad de corriente a +0.35 V, antes y después de la hibridación, respectivamente. La Figura 60B muestra la curva de calibración obtenida de este modo. La respuesta de la corriente normalizada medida a +0.35 V en cada uno de los voltamperogramas diferenciales de impulsos (Figura 60A) muestra un factor de correlación de 0.989 con la concentración de Hp2_C hibridada, en el intervalo de 8.90-22.2 μM . El límite de detección se determinó como la señal correspondiente al electrodo modificado con Hp1-SH ($n=4$) más 3 veces la desviación estándar, obteniéndose un valor de 8.31 μM de Hp2_C.

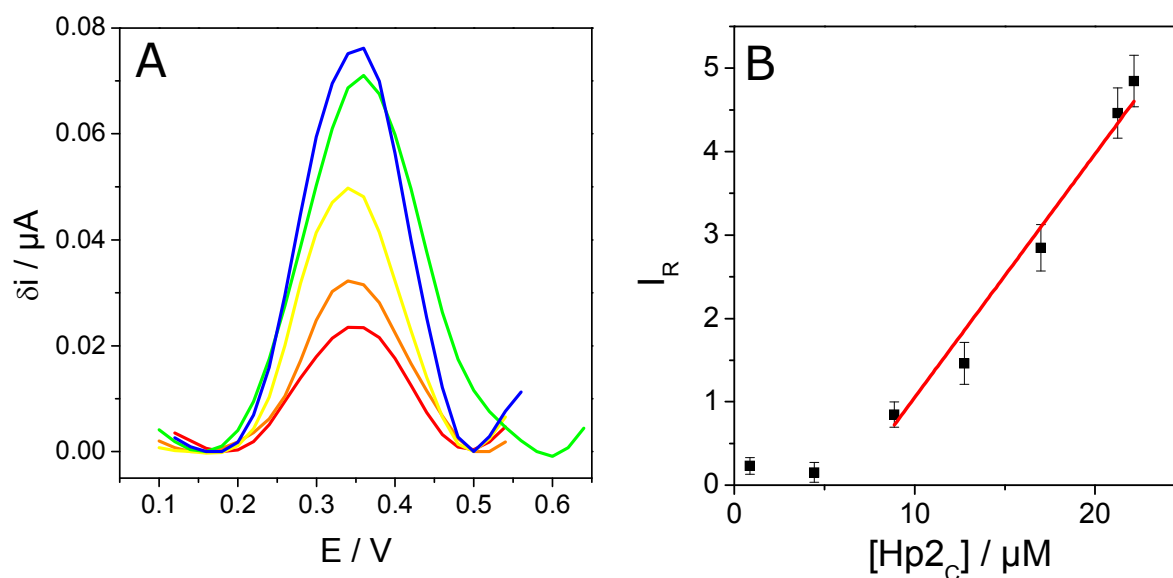


Figura 60: (A) Voltamperogramas diferenciales de impulsos de 3,4-DHsalophen acumulado a circuito abierto en un electrodo modificado con Hp1-SH después de la hibridación con distintas cantidades de Hp2_C: 8.90 μM (—); 12.7 μM (—); 17.0 μM (—); 21.2 μM (—); 22.2 μM (—). (B) Curva de calibración para la secuencia de analito, Hp2_C, donde $I_R=(i-i_0)/i_0$.

3. Detección de una secuencia con una base desapareada usando 3,4-DHsalophen como indicador electroquímico

Una vez evaluadas las características analíticas del genosensor, se procedió a estudiar la selectividad del mismo frente a hebras diana cuyas secuencias de bases no fueran totalmente complementarias a la secuencia de la sonda inmovilizada en el electrodo. Los electrodos modificados con la sonda tiolada Hp1-SH y MCH, se pusieron en contacto con una disolución de hibridación que contenía una secuencia diana con una única base no complementaria en mitad de la cadena (Hp2_{MS}) a la secuencia sonda. La doble hélice distorsionada obtenida tras esta hibridación debe interactuar de distinto modo con el 3,4-DHsalophen y, como resultado, la respuesta electroquímica del biosensor debe ser distinta que cuando el electrodo está modificado sólo con la sonda Hp1-SH o cuando ésta se hibrida con la secuencia complementaria Hp2_C. En la Figura 61 se muestran los voltamperogramas diferenciales de impulsos de un electrodo de oro modificado con la sonda Hp1-SH y MCH e hibridado con una secuencia con un desapareamiento en una base en mitad de la cadena, utilizando el 3,4-DHsalophen como indicador electroquímico. Como puede observarse existe un decaimiento importante del valor de intensidad de pico, si se compara con la señal obtenida cuando el mismo electrodo se hibrida con la secuencia complementaria Hp2_C. Sin embargo, la señal es el doble que la obtenida cuando el electrodo no se somete a ningún tipo de hibridación, y tan solo un 10 % mayor que en el caso de que la hibridación se lleve a cabo con la secuencia no complementaria Hp2_{NC}. La disminución observada puede deberse bien a la disminución en la interacción del 3,4-DHsalophen y la doble hélice de ADN que está distorsionada, o bien al aumento del impedimento de transferencia de carga del 3,4-DHsalophen unido a la doble hélice con la mutación.

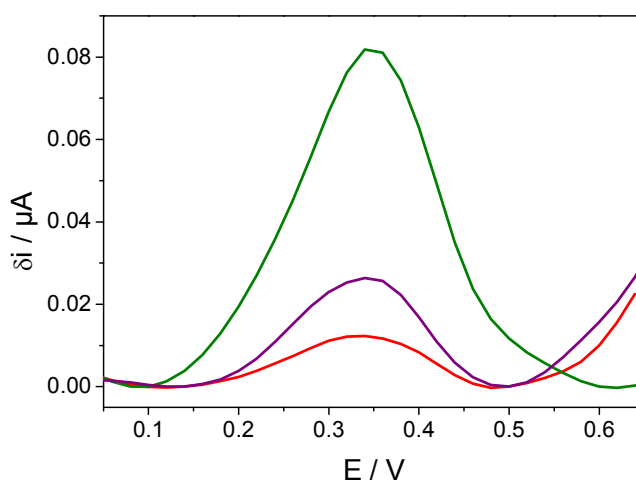


Figura 61: Voltamperogramas diferenciales de impulsos de 3,4-DHsalophen acumulado a circuito abierto en un electrodo modificado con la sonda Hp1-SH (—), un electrodo modificado con la sonda e incubado con 22.2 μM de Hp2_c (—) y un electrodo modificado con la sonda e incubado con 22.2 μM Hp2_{MS} (—). Medidas realizadas en 5.0 mM KNO_3 . Velocidad de barrido 10 mV s^{-1} , amplitud de pulso 50 mV y período de pulso 200 ms.

En vista de los resultados obtenidos se puede considerar que se ha desarrollado un biosensor eficaz para la detección electroquímica de una secuencia específica de ADN de *H. pylori* usando como indicador redox uno de los ligandos derivados del DHsalophen estudiados en este trabajo. Además, el ligando 3,4-DHsalophen es un indicador electroquímico que permite detectar no sólo el evento de hibridación, sino también una única mutación en mitad de una secuencia sin necesidad de usar supresores de hibridación, como la formamida (de la Escosura-Muniz y cols, 2007).

Finalmente, es importante señalar que aunque en la bibliografía hay descritos varios biosensores de *H. pylori* con detección óptica (generación de onda evanescente) capaces de detectar mutaciones puntuales (Momynaliev y cols, 2003; Pilevar y cols, 1998), son escasos los biosensores descritos con detección electroquímica. Lapiere y colaboradores han descrito la detección electrocatalítica con $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ de la secuencia de *H. pylori*, así como la detección de una mutación de una sola base, alcanzando un límite de

detección de 10 nM (Lapierre y cols, 2003). Por otra parte, Steichen ha desarrollado un método electroquímico de detección de hibridación usando como sonda PNA (ácido nucleico peptídico) y basándose en la señal directamente obtenida del $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ adsorbido al ADN. En este caso también se detecta la mutación de una base y su límite de detección es 80 pM (Steichen y cols, 2007). En ambos casos, la molécula que interacciona con las secuencias de oligonucleótidos ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$) lo hace a través de fuerzas electrostáticas. Como es sabido, este modo de interacción es el menos específico y esto se ve reflejado en que la diferencia de las señales entre experimentos con hibridación total y experimentos sin evento de hibridación es pequeña. Si se comparan con estos biosensores, el dispositivo desarrollado en este trabajo presenta la ventaja de que la detección se lleva a cabo mediante el uso de un indicador redox sin necesidad de amplificar la señal electroquímica con un proceso electrocatalítico. Además, la interacción a través de los surcos, que es el modo principal de interacción del 3,4-DHsalophen, proporciona una mayor especificidad al método.

Por último, es importante resaltar que el diseño del biosensor propuesto en este trabajo permitiría el uso de muestras reales amplificadas mediante PCR, debido a la posibilidad de obtenerlas directamente tioladas y en concentración suficiente para realizar los ensayos pertinentes. Por tanto, la aplicación de estos dispositivos está encaminada a servir como técnica de apoyo a los métodos tradicionales de secuenciación, siendo útil como método de cribado cuando el número de muestras a analizar es numeroso. En este sentido, los próximos trabajos estarán enfocados a la detección de polimorfismos de un solo nucleótido en diferentes posiciones de la secuencia de muestras reales amplificadas por PCR.

CONCLUSIONES

A lo largo de la Memoria se han ido exponiendo las conclusiones más relevantes obtenidas en las investigaciones realizadas en este trabajo, quedando patente la versatilidad que presentan los ligandos sintetizados. A continuación, se recopilan las más importantes.

- Se han sintetizado tres ligandos tetradentados de base de Schiff (dos de ellos por primera vez) por combinación de la *o*-fenilendiamina y distintos isómeros del dihidroxibenzaldehído en ausencia de disolventes.
- Los compuestos sintetizados se han caracterizado mediante diferentes técnicas (FTIR, Análisis Elemental, UV-vis, RMN, voltamperometría cíclica). Los datos obtenidos confirman la estructura esperada para cada molécula. Los rendimientos obtenidos en la síntesis en ausencia de disolventes (aproximadamente del 90 %) fueron superiores a los obtenidos por los métodos tradicionales de síntesis en disolución.
- Los isómeros 3,4-DHsalophen y 2,5-DHsalophen directamente adsorbidos sobre la superficie de electrodos de carbón vítreo dan lugar a películas estables y electroactivas cuyas propiedades redox dependen de la posición de los hidroxilos en el ligando.
- Los electrodos modificados con películas derivadas del 3,4-DHsalophen presentan una potente y persistente capacidad para inducir la electrooxidación catalítica de NADH e hidracina.
- La propiedad catalítica para la electrooxidación de hidracina sobre electrodos de carbón vítreo modificados con 3,4-DHsalophen se ha utilizado para el diseño de sensores de hidracina. El sensor desarrollado permite realizar determinaciones de hidracina hasta concentraciones 0.4 mM, con un límite de detección de 1.6 μ M.
- Se ha preparado "in situ" el complejo metálico [Ni-2,5-DHsalophen]²⁺. Este complejo se ha electrodepositado con éxito sobre la superficie de electrodos de carbón vítreo en medio básico, obteniéndose electrodos modificados capaces de catalizar la electrooxidación de distintos alcoholes alifáticos de cadena corta.

- Se ha desarrollado un sensor que permite realizar determinaciones de metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol en tiempos no superiores a 40 segundos, con límites de detección inferiores a 30 nM.
- Se ha establecido que los ligandos de base de Schiff (2,5-DHsalophen y 3,4-DHsalophen) interaccionan con el ADN, siendo el modo principal de interacción a través de los surcos de la hélice de ADN.
- El cálculo de la constante intrínseca de unión ha permitido establecer que el compuesto 3,4-DHsalophen es el isómero que interacciona de manera más fuerte con el ADN de cadena doble.
- En presencia de ADN de doble cadena, la electroactividad del 3,4-DHsalophen disminuye. Sin embargo, se mantiene lo suficientemente activo como para utilizarlo como indicador redox de eventos de hibridación.
- Se ha desarrollado un biosensor electroquímico para la detección de una secuencia específica de una bacteria patógena, como es *Helicobacter pylori*, utilizando como indicador redox el 3,4-DHsalophen. El límite de detección del biosensor fue 8.31 μ M.
- La eficiencia del proceso de marcaje con el mediador redox es tal que permite la discriminación de hebras de ADN que presentan un único desapareamiento, en ausencia de supresores de hibridación.

BIBLIOGRAFÍA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.epa.gov>

<http://goldbook.iupac.org/>.

Abashkin, Y., Burt, S., 2004. *(Salen)Mn(III) compound as a nonpeptidyl mimic of catalase: DFT study of the metal oxidation by a peroxide molecule*. **Journal of Physical Chemistry B** 108, 2708-2711.

Alegret, S., Valle, M., Merkoçi, A., 2004. *Sensores electroquímicos*. Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Amelio, M., 1996. *"Alcohol in Food and Beverages" Handbook of food analysis*.

Amini, M., Khorasani, J., Khaloo, S., Tangestaninejad, S., 2003. *Cobalt(II) salophen-modified carbon-paste electrode for potentiometric and voltammetric determination of cysteine*. **Analytical Biochemistry** 320, 32-38.

Amlathe, S., Gupta, V., 1988. *Spectrophotometric determination of trace amounts of hydrazine in polluted water*. **Analyst** 113(9), 1481-1483.

Andrieux, C., Saveant, J., 1978. *Heterogeneous (chemically modified electrodes, polymer electrodes) vs homogeneous catalysis of electrochemical reactions*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 93(2), 163-168.

Andrieux, C., Saveant, J., 1980. *Electron-transfer through redox polymer-films*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 111(2-3), 377-381.

Anjo, D., Kahr, M., Khodabakhsh, M., Nowinski, S., Wanger, M., 1989. *Electrochemical activation of carbon electrodes in base - minimization of dopamine adsorption and electrode capacitance*. **Analytical Chemistry** 61(23), 2603-2608.

Aranha, P.E., dos Santos, M.P., Romera, S., Dockal, E.R., 2007. *Synthesis, characterization, and spectroscopic studies of tetradentate Schiff base chromium(III) complexes*. **Polyhedron** 26, 1373-1382.

Armistead, P., Thorp, H., 2000. *Modification of indium tin oxide electrodes with nucleic acids: Detection of attomole quantities of immobilized DNA by electrocatalysis*. **Analytical Chemistry** 72(16), 3764-3770.

Armistead, P., Thorp, H., 2001. *Oxidation kinetics of guanine in DNA molecules adsorbed onto indium tin oxide electrodes*. **Analytical Chemistry** 73(3), 558-564.

Aslanoglu, M., Isaac, C., Houlton, A., Horrocks, B., 2000. *Voltammetric measurements of the interaction of metal complexes with nucleic acids*. **Analyst** 125(10), 1791-1798.

Badr, I., 2006. *Potentiometric anion selectivity of polymer-membrane electrodes based on cobalt, chromium, and aluminum salens*. **Analytica Chimica Acta** 570, 176-185.

Bailes, R., Calvin, M., 1947. *The oxygen-carrying synthetic chelate compounds .7. Preparation*. **Journal of the American Chemical Society** 69(8), 1886-1893.

Bakac, A., Espenson, J., 1986. *Kinetics and mechanism of the alkylnickel formation in one-electron reductions of alkyl-halides and hydroperoxides by a macrocyclic nickel(I) complex*. **Journal of the American Chemical Society** 108(4), 713-719.

Bakker, E., 2004. *Electrochemical sensors*. **Analytical Chemistry** 76, 3285-3298.

Bakker, E., Telting-Diaz, M., 2002. *Electrochemical sensors*. **Analytical Chemistry** 74, 2781-2800.

Baldwin, R., Christensen, J., Kryger, L., 1986. *Voltammetric determination of traces of nickel(II) at a chemically modified electrode based on dimethylglyoxime-containing carbon paste*. **Analytical Chemistry** 58, 1790-1798.

- Baldwin, R., Thomsen, K., 1991. *Chemically modified electrodes in liquid-chromatography detection - A review*. **Talanta** 38, 1-16.
- Bard, A.J., Faulkner, L. R. , 2001. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. John Wiley and Sons.
- Bard, A.J., Parsons, R. , Jodan, J., 1985. *Standard Potentials in Aqueous Solution*. Dekker.
- Bedioui, F., Labbe, E., Gutierrez-Granados, S., Devynck, J., 1991. *Electrooxidative polymerization of cobalt, nickel and manganese salen complexes in acetonitrile solution*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 301, 267-274.
- Bergamini, M., Teixeira, M., Dockal, E., Bocchi, N., Cavalheiro, E., 2006. *Evaluation of different voltammetric techniques in the determination of amoxicillin using a carbon paste electrode modified with N,N'-ethylenebis(salicylideneaminato) oxovanadium(IV)*. **Journal of the Electrochemical Society** 153, E94-E98.
- Bharathi, S., Nogami, M., 2001. *A glucose biosensor based on electrodeposited biocomposites of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme*. **Analyst** 126, 1919-1922.
- Bindler, F., Voges, E., Laugel, P., 1988. *The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits*. **Food Additives and Contaminants** 5(3), 343-351.
- Blaser, M., 1990. *Helicobacter-pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation*. **Journal of Infectious Diseases** 161(4), 626-633.
- Bourdillon, C., Bourgeois, J., Thomas, D., 1980. *Covalent linkage of glucose-oxidase on modified glassy-carbon electrodes - kinetic phenomena*. **Journal of the American Chemical Society** 102, 4231-4235.
- Breslin, D., Yu, C., Ly, D., Schuster, G., 1997. *Structural modification changes the DNA binding mode of cation-substituted anthraquinone photoreases: Association by intercalation or minor groove binding determines the DNA cleavage efficiency*. **Biochemistry** 36(34), 10463-10473.
- Budkuley, J., 1992. *Determination of hydrazine and sulfite in the presence of one another*. **Mikrochimica Acta** 108(1-2), 103-105.
- Bukowska, J., Roslonek, G., Taraszewska, J., 1996. *In-situ surface-enhanced Raman spectroscopic study of gold electrodes modified with nickel tetraazamacrocyclic complexes*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 403(1-2), 47-52.
- Cai, C., Xue, K., Zhou, Y., Yang, H., 1997. *Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode*. **Talanta** 44(3), 339-347.
- Cai, H., Lee, T., Hsing, I., 2006. *Label-free protein recognition using an aptamer-based impedance measurement assay*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 114, 433-437.
- Cai, H., Xu, Y., He, P., Fang, Y., 2003. *Indicator free DNA hybridization detection by impedance measurement based on the DNA-doped conducting polymer film formed on the carbon nanotube modified electrode*. **Electroanalysis** 15, 1864-1870.
- Canali, L., Sherrington, D., 1999. *Utilisation of homogeneous and supported chiral metal(salen) complexes in asymmetric catalysis*. **Chemical Society Reviews** 28(2), 85-93.
- Carter, M., Rodriguez, M., Bard, A., 1989. *Voltammetric studies of the interaction of metal-chelates with DNA .2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine*. **Journal of the American Chemical Society** 111(24), 8901-8911.
- Castaneda, M.T., Alegret, S., Merkoci, A., 2007. *Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles*. **Electroanalysis** 19, 743-753.

- Cataldi, T., Centonze, D., Ricciardi, G., 1995. *Electrode modification with a poly (Ni-II-tetramethyldibenzo-tetraaza[14]annulene) film - Electrochemical-behavior and redox catalysis in alkaline-solutions .1. Electroanalysis* 7(4), 312-318.
- Ciszewski, A., 1995. *Catalytic oxidation of methanol on a glassy carbon electrode electrochemically modified by a conductive Ni-II-curcumin film. Electroanalysis* 7(12), 1132-1135.
- Ciszewski, A., Milczarek, G., 1996. *Electrocatalytic oxidation of alcohols on glassy carbon electrodes electrochemically modified by conductive polymeric nickel(II) tetrakis(3-methoxy-4-hydroxyphenyl) porphyrin film. Journal of Electroanalytical Chemistry* 413(1-2), 137-142.
- Cox, J., Jaworski, R., Kulesza, P., 1991. *Electroanalysis with electrodes modified by inorganic films. Electroanalysis* 3, 869-877.
- Cramb, D., Beck, S., 2000. *Fluorescence quenching mechanisms in micelles: the effect of high quencher concentration. Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* 134(1-2), 87-95.
- Cha, J., Han, J., Choi, Y., Yoon, D., Oh, K., Lim, G., 2003. *DNA hybridization electrochemical sensor using conducting polymer. Biosensors & Bioelectronics* 18, 1241-1247.
- Chaires, J., Dattagupta, N., Crothers, D., 1982. *Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic-acid - Equilibrium binding-studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic-acid. Biochemistry* 21(17), 3933-3940.
- Charles, E., Chia, L., Rothery, J., Watson, E., McInnes, E., Farley, R., Bridgeman, A., Mabbs, F., Rowlands, C., Halcrow, M., 1999. *Electronic structures of copper(II) complexes of tetradentate hydroquinone-containing Schiff bases. Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*(12), 2087-2095.
- Chen, D., Martell, A., Sun, Y., 1989. *New synthetic cobalt schiff-base complexes as oxygen carriers. Inorganic Chemistry* 28(13), 2647-2652.
- Chu, X., Shen, G., Jiang, J., Kang, T., Xiong, B., Yu, R., 1998. *Voltammetric studies of the interaction of daunomycin anticancer drug with DNA and analytical applications. Analytica Chimica Acta* 373(1), 29-38.
- Dahm, C., Peters, D., 1994. *Catalytic reduction of iodoethane and 2-iodopropane at carbon electrodes coated with anodically polymerized films of nickel(II) salen. Analytical Chemistry* 66, 3117-3123.
- Dahm, C., Peters, D., 1996. *Catalytic reduction of alpha,omega-dihaloalkanes with nickel(I) salen as a homogeneous-phase and polymer-bound mediator. Journal of Electroanalytical Chemistry* 406, 119-129.
- Darder, M., Takada, K., Pariente, F., Lorenzo, E., Abruna, H., 1999. *Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrodes surfaces and its application in a H₂O₂ biosensor. Analytical Chemistry* 71, 5530-5537.
- Dasgupta, D., Goldberg, L., 1985. *Mode of reversible binding of neocarzinostatin chromophore to DNA - evidence for binding via the minor groove. Biochemistry* 24(24), 6913-6920.
- Dasgupta, D., Parrack, P., Sasisekharan, V., 1987. *Interaction of synthetic analogs of distamycin with poly(dA-dT) - Role of the conjugated n-methylpyrrole system. Biochemistry* 26(20), 6381-6386.
- de Azevedo Marques, A.P., Dockal, E.R., Skrobot, F.C., Viana Rosa, I.L., 2007. *Synthesis, characterization and catalytic study of [N,N`-bis(3-ethoxysalicylidene)-m-xylylenediamine]oxovanadium(IV) complex. Inorganic Chemistry Communications* 10(3), 255-261.
- de la Escosura-Muniz, A., Gonzalez-Garcia, M.B., Costa-Garcia, A., 2007. *DNA hybridization sensor based on aurothiornalate electroactive label on glassy carbon electrodes. Biosensors & Bioelectronics* 22(6), 1048-1054.
- de Los-Santos-Alvarez, P., Lobo-Castanon, M., Miranda-Ordieres, A., Tunon-Blanco, P., 2002. *Voltammetric determination of underivatized oligonucleotides on graphite electrodes based on their oxidation products. Analytical Chemistry* 74, 3342-3347.

- de Tacconi, N., Rajeshwar, K., Lezna, R., 2003. *Metal hexacyanoferrates: Electrosynthesis, in situ characterization, and applications*. **Chemistry of Materials** 15, 3046-3062.
- Dekanski, A., Stevanovic, J., Stevanovic, R., Nikolic, B., Jovanovic, V., 2001. *Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation*. **Carbon** 39(8), 1195-1205.
- del Pozo, M., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E., 2005a. *DNA biosensor for detection of Helicobacter pylori using phen-dione as the electrochemically active ligand in osmium complexes*. **Analytical Chemistry** 77(8), 2550-2557.
- Del Pozo, M., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E., 2005b. *Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators*. **Biosensors & Bioelectronics** 20(8), 1549-1558.
- Delamar, M., Hitmi, R., Pinson, J., Saveant, J., 1992. *Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts*. **Journal of the American Chemical Society** 114, 5883-5884.
- Dong, S., Liu, B., Liu, J., Tabard, A., Guillard, R., 1995. *Kinetic-study of electrocatalytic reduction of hydrogen-peroxide at iron(III) porphyrin modified glassy-carbon electrode in alkaline-medium using the rotation-scan method*. **Electroanalysis** 7, 537-541.
- Doty, P., Rice, S., 1955. *The denaturation of desoxypentose nucleic acid*. **Biochimica et Biophysica Acta** 16(3), 446-448.
- Downs, M., Warner, P., Turner, A., Fothergill, J., 1988. *Optical and electrochemical detection of DNA*. **Biomaterials** 9(1), 66-70.
- Duprilot, J., Bedioui, F., Devynck, J., Folest, J., Biedcharreton, C., 1985. *Electrochemical study on complexes derived from ethylene bis(salicylideneiminato)cobalt - Application to the electrocatalyzed reduction of organic halides*. **Journal of Organometallic Chemistry** 286, 77-90.
- Eggs, B., 1969. *Interpretation of electrochemical reduction and oxidation waves of quinone-hydroquinone system in acetonitrile*. **Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications**(21), 1267.
- Eichhorn, E., Rieker, A., Speiser, B., Stahl, H., 1997. *Electrochemistry of oxygenation catalysts .3. Thermodynamic characterization of electron transfer and solvent exchange reactions of Co(salen)/[Co(salen)](+) in DMF, pyridine, and their mixtures*. **Inorganic Chemistry** 36(15), 3307-3317.
- El-Shafei, A., 1999. *Electrocatalytic oxidation of methanol at a nickel hydroxide/glassy carbon modified electrode in alkaline medium*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 471(2), 89-95.
- Emr, S.A., Yacynych, A.M., 1995. *Use of polymer-films in amperometric biosensors*. **Electroanalysis** 7(10), 913-923.
- Engstrom, R., 1982. *Electrochemical pretreatment of glassy-carbon electrodes*. **Analytical Chemistry** 54(13), 2310-2314.
- Ensafi, A.A., Meghdadi, S., Fooladgar, E., 2008. *Development of a New Selective Optical Sensor for Cd(II) Ions Based on 4-Hydroxy Salophen*. **IEEE Sensors Journal** 8, 1794-1800.
- Erdem, A., Meric, B., Kerman, K., Dalbasti, T., Ozsoz, M., 1999. *Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor*. **Electroanalysis** 11(18), 1372-1376.
- Erdem, A., Ozsoz, M., 2001. *Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA*. **Analytica Chimica Acta** 437(1), 107-114.
- Estiu, G., Jubert, A., Costamagna, J., Vargas, J., 1996. *Quantum chemical calculations of the structures and electronic properties of N,N'-bis(3,5-dibromosalicylidene)-1,2-diaminobenzene and its cobalt(II) complex. Origin of the redox activity of the cobalt complex*. **Inorganic Chemistry** 35(1), 263-266.
- Fajkus, M., Hianik, T., 2002. *Peculiarities of the DNA hybridization on the surface of bilayer lipid membranes*. **Talanta** 56, 895-903.

- Fakhari, A., Raji, T., Naeimi, H., 2005. *Copper-selective PVC membrane electrodes based on salens as carriers. Sensors and Actuators B-Chemical* 104, 317-323.
- Fatibello-Filho, O., Dockal, E.R., Marcolino-Junior, L.H., 2007. *Electrochemical modified electrodes based on metal-salen complexes. Analytical Letters* 40, 1825-1852.
- Ferapontova, E., Dominguez, E., 2003. *Direct electrochemical oxidation of DNA on polycrystalline gold electrodes. Electroanalysis* 15(7), 629-634.
- Fleischm.M, Korinek, K., Pletcher, D., 1971. *Oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution. Journal of Electroanalytical Chemistry* 31(1), 39.
- Fleischm.M, Pletcher, D., Korinek, K., 1972. *Oxidation of hydrazine at a nickel anode in alkaline solution. Journal of Electroanalytical Chemistry* 34(2), 499.
- Floriani, C., Solari, E., Franceschi, F., Scopelliti, R., Belanzoni, P., Rosi, M., 2001. *Metal-metal and carbon-carbon bonds as potential components of molecular batteries. Chemistry-A European Journal* 7, 3052-3061.
- Fojta, M., Brazdilova, P., Cahova, K., Pecinka, P., 2006. *A single-surface electrochemical biosensor for the detection of DNA triplet repeat expansion. Electroanalysis* 18, 141-151.
- Franceschi, F., Solari, E., Floriani, C., Rosi, M., Chiesi-Villa, A., Rizzoli, C., 1999. *Molecular batteries based on carbon-carbon bond formation and cleavage in titanium and vanadium Schiff base complexes. Chemistry-A European Journal* 5, 708-721.
- Franceschi, F., Solari, E., Scopelliti, R., Floriani, C., 2000. *Metal-mediated transfer of electrons between two different C-C single bonds that function as electron-donor and electron-acceptor units. Angewandte Chemie-International Edition* 39, 1685.
- Gangani, B.J., Parsania, P.H., 2007. *Microwave-irradiated and classical syntheses of symmetric double Schiff bases of 1,1'-bis(4-aminophenyl)cyclohexane and their physicochemical characterization. Spectroscopy Letters* 40(1), 97-112.
- Ganjali, M., Poursaberi, T., Basiripour, F., Salavati-Niasari, M., Yousefi, M., Shamsipur, M., 2001. *Highly selective thiocyanate poly(vinyl chloride) membrane electrode based on a cadmium-Schiff's base complex. Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 370, 1091-1095.
- Ganjali, M., Rezapour, M., Pourjavid, M., Salavati-Niasari, M., 2003. *Highly selective PVC-membrane electrodes based on Co(II)-Salen for determination of nitrite ion. Analytical Sciences* 19, 1127-1131.
- Ganjali, M.R., Norouzi, P., Hatambeygi, N., Salavati-Niasari, M., 2006. *Anion recognition: Fabrication of a highly selective and sensitive HPO₄ 2-PVC sensor based on a oxo-molybdenum methyl-salen. Journal of the Brazilian Chemical Society* 17, 859-865.
- Garcia, T., Casero, E., Lorenzo, E., Pariente, F., 2005. *Electrochemical sensor for sulfite determination based on iron hexacyanoferrate film modified electrodes. Sensors And Actuators B-Chemical* 106, 803-809.
- Garcia, T., Casero, E., Revenga-Parra, M., Martin-Benito, J., Pariente, F., Vazquez, L., Lorenzo, E., 2008a. *Architectures based on the use of gold nanoparticles and ruthenium complexes as a new route to improve genosensor sensitivity. Biosensors & Bioelectronics* 24, 184-190.
- Garcia, T., Casero, E., Revenga-Parra, M., Pariente, F., Lorenzo, E., 2008b. *Dual-Stage DNA Sensing: Recognition and Detection. Analytical Chemistry* 80, 9443-9449.
- Gholivand, M., Niroomandi, P., Yari, A., Joshagani, M., 2005. *Characterization of an optical copper sensor based on N,N`-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine. Analytica Chimica Acta* 538(1-2), 225-231.
- Gilbert, R., Rioux, R., Saheb, S., 1984. *Ion chromatographic determination of morpholine and cyclohexylamine in aqueous-solutions containing ammonia and hydrazine. Analytical Chemistry* 56(1), 106-109.

- Golabi, S., Nozad, A., 2004. *Electrocatalytic oxidation of methanol on a nickel-porphyrin IX complex modified glassy carbon electrode in alkaline medium*. **Electroanalysis** 16(3), 199-209.
- Golabi, S., Zare, H., 1999a. *Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a chlorogenic acid (CGA) modified glassy carbon electrode*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 465(2), 168-176.
- Golabi, S., Zare, H., 1999b. *Electrocatalytic oxidation of hydrazine at glassy carbon electrode modified with electrodeposited film derived from caffeic acid*. **Electroanalysis** 11(17), 1293-1300.
- Golabi, S., Zare, H., Hamzehloo, M., 2001. *Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a pyrocatechol violet (PCV) chemically modified electrode*. **Microchemical Journal** 69(2), 111-121.
- Goldsby, K., 1988. *Symmetric and unsymmetric nickel(II) Schiff-base complexes - Metal-localized versus ligand-localized oxidation*. **Journal of coordination chemistry** 19, 83-90.
- Golikand, A., Asgari, M., Maragheh, M., Shahrokhian, S., 2006. *Methanol electrooxidation on a nickel electrode modified by nickel-dimethylglyoxime complex formed by electrochemical synthesis*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 588(1), 155-160.
- Golikand, A., Shahrokhian, S., Asgari, M., Maragheh, M., Irannejad, L., Khanchi, A., 2005. *Electrocatalytic oxidation of methanol on a nickel electrode modified by nickel dimethylglyoxime complex in alkaline medium*. **Journal of Power Sources** 144(1), 21-27.
- Golikand, A.N., Raoof, J., Baghayeri, M., Asgari, M., Irannejad, L., 2009. *Nickel electrode modified by N,N-bis(salicylidene)phenylenediamine (Salophen) as a catalyst for methanol oxidation in alkaline medium*. **Russian Journal of Electrochemistry** 45, 192-198.
- Gooding, J., 2002. *Electrochemical DNA hybridization biosensors*. **Electroanalysis** 14(17), 1149-1156.
- Gopal, M., Veeranna, S., 2005. *4-Anilinopyrimido[4',5' : 4,5]selenolo(2,3-b)quinoline and 4-piperazino pyrimido[4',5' : 4,5]selenolo(2,3-b)quinoline: New DNA intercalating chromophores with antiproliferative activity*. **Journal Of Photochemistry and Photobiology B-Biology** 81(3), 181-189.
- Gorton, L., 1995. *Carbon-paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells*. **Electroanalysis** 7, 23-45.
- Gorton, L., Torstensson, A., Jaegfeldt, H., Johansson, G., 1984. *Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes by graphite-electrodes modified with an adsorbed phenoxazinium salt, meldola blue*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 161, 103-120.
- Gosden, C., Kerr, J., Pletcher, D., Rosas, R., 1981. *The electrochemistry of square-planar macrocyclic nickel-complexes and the reaction of Ni(I) with alkyl bromides - Tetradentate Schiff-base complexes*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 117, 101-107.
- Harrison, J., Khan, Z., 1970. *Oxidation of hydrazine in alkaline solution at Platinum and Mercury*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 26(1), 1.
- Heras, J.Y., Giacobone, A.F.F., Battaglini, F., 2007. *Ascorbate amperometric determination using conducting copolymers from aniline and N-(3-propane sulfonic acid)aniline*. **Talanta** 71, 1684-1689.
- Hernandez-Santos, D., Diaz-Gonzalez, M., Gonzalez-Garcia, M., Costa-Garcia, A., 2004. *Enzymatic genosensor on streptavidin-modified screen-printed carbon electrodes*. **Analytical Chemistry** 76, 6887-6893.
- Hernandez-Santos, D., Gonzalez-Garcia, M., Costa-Garcia, A., 2005. *Genosensor based on a Platinum(II) complex as electrocatalytic label*. **Analytical Chemistry** 77, 2868-2874.
- Hernandez-Santos, D., Gonzalez-Garcia, M., Garcia, A., 2002. *Metal-nanoparticles based electroanalysis*. **Electroanalysis** 14, 1225-1235.
- Herne, T., Tarlov, M., 1997. *Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces*. **Journal of the American Chemical Society** 119(38), 8916-8920.

- Hinnen, C., Rousseau, A., Parsons, R., Reynaud, J., 1981. *Comparison between the behavior of native and denatured DNA at mercury and gold electrodes by capacity measurements and cyclic voltammetry*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 125(1), 193-203.
- Ho, K., Yeh, W., Tung, T., Liao, J., 2005. *Amperometric detection of morphine based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) immobilized molecularly imprinted polymer particles prepared by precipitation polymerization*. **Analytica Chimica Acta** 542, 90-96.
- Hobday, M., Smith, T., 1972. *Reaction of indium(III) and gallium(III) halides with transition-metal ion Schiff-base complexes*. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**(20), 2287.
- Horwitz, C., Murray, R., 1988. *Oxidative electropolymerization of metal schiff-base complexes*. **Molecular Crystals and Liquid Crystals** 160, 389-404.
- Huang, T., Liu, M., Knight, L., Grody, W., Miller, J., Ho, C., 2002. *An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes*. **Nucleic Acids Research** 30.
- Imisides, M., John, R., Riley, P., Wallace, G., 1991. *The use of electropolymerization to produce new sensing surfaces - a review emphasizing electrodeposition of heteroaromatic-compounds*. **Electroanalysis** 3, 879-889.
- Isse, A., Abdurahman, A., Vianello, E., 1997a. *Role of proton transfer in the electrochemical reduction mechanism of salicylideneaniline*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 431(2), 249-255.
- Isse, A., Gennaro, A., Vianello, E., 1997b. *Electrochemical reduction of Schiff base ligands H_2 salen and H_2 salophen*. **Electrochimica Acta** 42(13-14), 2065-2071.
- Isse, A., Gennaro, A., Vianello, E., 1998. *Mechanism of the electrochemical reduction of benzyl chlorides catalysed by Co(salen)*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 444(2), 241-245.
- IUPAC, 1998. *Pure & Applied Chemistry*.
- Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E., Stricker, S., 2000. *Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria*. **Electroanalysis** 12, 317-325.
- Iwasita, T., 2002. *Electrocatalysis of methanol oxidation*. **Electrochimica Acta** 47(22-23), 3663-3674.
- Jaegfeldt, H., Kuwana, T., Johansson, G., 1983. *Electrochemical stability of catechols with a pyrene side-chain strongly adsorbed on graphite-electrodes for catalytic-oxidation of dihydronicotinamide adenine-dinucleotide*. **Journal of the American Chemical Society** 105(7), 1805-1814.
- Jafarian, M., Mahjani, M., Heli, H., Gobal, F., Khajehsharifi, H., Hamed, M., 2003. *A study of the electro-catalytic oxidation of methanol on a cobalt hydroxide modified glassy carbon electrode*. **Electrochimica Acta** 48(23), 3423-3429.
- Jafarian, M., Moghaddam, R.B., Mahjani, M.G., Gobal, F., 2006. *Electro-catalytic oxidation of methanol on a Ni-Cu alloy in alkaline medium*. **Journal of Applied Electrochemistry** 36(8), 913-918.
- Jain, A., Gupta, V., Ganeshpure, P., Raison, J., 2005. *Ni(II)-selective ion sensors of salen type Schiff base chelates*. **Analytica Chimica Acta** 553, 177-184.
- Jelen, F., Erdem, A., Palecek, E., 2002. *Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode*. **Bioelectrochemistry** 55(1-2), 165-167.
- Jenkins, Y., Friedman, A., Turro, N., Barton, J., 1992. *Characterization of dipyrrophenazine complexes of ruthenium(II) - The light switch effect as a function of nucleic-acid sequence and conformation*. **Biochemistry** 31(44), 10809-10816.
- Johnston, D., Glasgow, K., Thorp, H., 1995. *Electrochemical measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron-transfer between DNA and metal-complexes*. **Journal of the American Chemical Society** 117(35), 8933-8938.

- Johnston, D., Thorp, H., 1996. *Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics*. **Journal of Physical Chemistry** 100(32), 13837-13843.
- Kamyabi, M.A., Aghajanloo, F., 2008. *Electrocatalytic oxidation and determination of nitrite on carbon paste electrode modified with oxovanadium(IV)-4-methyl salophen*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 614, 157-165.
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P., Ozsoz, M., 2002a. *Label-free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes*. **Electroanalysis** 14, 1685-1690.
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M., 2002b. *Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA*. **Electrochemistry Communications** 4(9), 705-709.
- Karvembu, R., Hemalatha, S., Prabhakaran, R., Natarajan, K., 2003. *Synthesis, characterization and catalytic activities of ruthenium complexes containing triphenylphosphine/triphenylarsine and tetradentate Schiff bases*. **Inorganic Chemistry Communications** 6, 486-490.
- Kashanian, S., Gholivand, M.B., Ahmadi, F., Taravati, A., Colagar, A.H., 2007. *DNA interaction with Al-N,N'-bis(salicylidene) 2,2'-phenylenediamine complex*. **Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 67(2), 472-478.
- Kelley, A., Angolia, B., Marawi, I., 2006. *Electrocatalytic activity of poly(3-methylthiophene) electrodes*. **Journal of Solid State Electrochemistry** 10, 397-404.
- Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Tamiya, E., 2005. *Escherichia coli single-strand binding protein-DNA interactions on carbon nanotube-modified electrodes from a label-free electrochemical hybridization sensor*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 381, 1114-1121.
- Kim, E., Kim, K., Yang, H., Kim, Y., Kwak, J., 2003. *Enzyme-amplified electrochemical detection of DNA using electrocatalysis of ferrocenyl-tethered dendrimer*. **Analytical Chemistry** 75, 5665-5672.
- Kim, J., Cho, J., Cha, G., Lee, C., Kim, H., Paek, S., 2000. *Conductimetric membrane strip immunosensor with polyaniline-bound gold colloids as signal generator*. **Biosensors & Bioelectronics** 14, 907-915.
- Kim, M., Hwang, T., Kim, K., 1997. *A study of the electrochemical redox behavior of electrochemically precipitated nickel hydroxides using electrochemical quartz crystal microbalance*. **Journal of the Electrochemical Society** 144(5), 1537-1543.
- Kirchherr, H., 1993. *Determination of hydrazine in human plasma by high-performance liquid-chromatography*. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications** 617(1), 157-162.
- Komarova, E., Aldissi, M., Bogomolova, A., 2005. *Direct electrochemical sensor for fast reagent-free DNA detection*. **Biosensors & Bioelectronics** 21, 182-189.
- Koncki, R., Owczarek, A., Dzwolak, W., Glab, S., 1998. *Immunoenzymatic sensitisation of membrane ion-selective electrodes*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 47, 246-250.
- Korinek, K., Koryta, J., Musilova, M., 1969. *Electro-oxidation of hydrazine on mercury silver and gold electrodes in alkaline solutions*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 21(2), 319-328.
- Kumar, C., Punzalan, E., Tan, W., 2000. *Adenine-thymine base pair recognition by an anthryl probe from the DNA minor groove*. **Tetrahedron** 56(36), 7027-7040.
- Kumar, C., Turner, R., Asuncion, E., 1993. *Groove binding of a styrylcyanine dye to the DNA double helix - The salt effect*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry** 74(2-3), 231-238.
- Kuswandi, B., Tombelli, S., Marazza, G., Mascini, M., 2005. *Recent advances in optical DNA biosensors technology*. **Chimia** 59(5), 236-242.

- Kutner, W., Wang, J., L'her, M., Buck, R., 1998. *Analytical aspects of chemically modified electrodes: Classification, critical evaluation and recommendations (IUPAC recommendations 1998)*. **Pure and Applied Chemistry** 70(6), 1302-1318.
- Kuz'min, V., Artemenko, A., Lozytska, R., Fedtchouk, A., Lozitsky, V., Muratov, E., Mescheriakov, A., 2005. *Investigation of anticancer activity of macrocyclic Schiff bases by means of 4D-QSAR based on simplex representation of molecular structure*. **SAR and QSAR In Environmental Research** 16(3), 219-230.
- Lage, A., Fauconnier, A., Burette, A., Glupczynski, Y., Bollen, A., Godfroid, E., 1996. *Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified Helicobacter pylori DNA in gastric biopsy specimens*. **Journal of Clinical Microbiology** 34(3), 530-533.
- Lage, A., Godfroid, E., Fauconnier, A., Burette, A., Butzler, J., Bollen, A., Glupczynski, Y., 1995. *Diagnosis of Helicobacter-pylori infection by PCR - comparison with other invasive techniques and detection of caga gene in gastric biopsy specimens*. **Journal of Clinical Microbiology** 33(10), 2752-2756.
- Lamour, E., Routier, S., Bernier, J., Catteau, J., Bailly, C., Vezin, H., 1999. *Oxidation of Cu-II to Cu-III, free radical production, and DNA cleavage by hydroxy-salen-copper complexes. Isomeric effects studied by ESR and electrochemistry*. **Journal of the American Chemical Society** 121, 1862-1869.
- Lane, R., Hubbard, A., 1973a. *Electrochemistry of chemisorbed molecules .1. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents*. **Journal of Physical Chemistry** 77(11), 1401-1410.
- Lane, R., Hubbard, A., 1973b. *Electrochemistry of chemisorbed molecules .2. Influence of charged chemisorbed molecules on electrode-reactions of platinum complexes*. **Journal of Physical Chemistry** 77(11), 1411-1421.
- Lange, U., Roznyatouskaya, N.V., Mirsky, V.M., 2008. *Conducting polymers in chemical sensors and arrays*. **Analytica Chimica Acta** 614, 1-26.
- Lapierre, M., O'Keefe, M., Taft, B., Kelley, S., 2003. *Electrocatalytic detection of pathogenic DNA sequences and antibiotic resistance markers*. **Analytical Chemistry** 75(22), 6327-6333.
- Laviron, E., 1979. *General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 101(1), 19-28.
- Law, N., Caudle, M., Pecoraro, V., 1999. *Manganese redox enzymes and model systems: Properties, structures, and reactivity*. *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol 46, pp. 305-440.
- Layer, R., 1963. *Chemistry of imines*. **Chemical Reviews** 63, 489.
- Lee, N., Lee, C., Jung, D., 1998. *Selective oxidation of benzylic hydrocarbons to carbonyl compounds catalyzed by Mn(III) salen complexes*. **Tetrahedron Letters** 39, 1385-1388.
- Lee, X., Kumazawa, T., Kondo, K., Sato, K., Suzuki, O., 1999. *Analysis of methanol or formic acid in body fluids by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography*. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences** 734(1), 155-162.
- Li, J., Lin, X., 2007. *Simultaneous determination of dopamine and serotonin on gold nanocluster/overoxidized-polypyrrole composite modified glassy carbon electrode*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 124, 486-493.
- Li, N., Ma, Y., Yang, C., Guo, L., Yang, X., 2005. *Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods*. **Biophysical Chemistry** 116(3), 199-205.
- Lieu, Y., Wang, C., 2000. *Peroxidase mimicking: Fe(Salen)Cl modified electrodes, fundamental properties and applications for biosensing*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 481(1), 102-109.
- Liu, G., Li, Z., Huan, S., Shen, G., Yu, R., 2000a. *Electro-catalytic oxidation of ascorbic acid at a cobalt-salen polymer modified electrode and analytical applications*. **Analytical Letters** 33, 175-192.

- Liu, G., Yang, X., Chen, Z., Shen, G., Yu, R., 2000b. *Interaction of metal complexes of bis(salicylidene)ethylenediamine with DNA*. **Analytical Sciences** 16(12), 1255-1259.
- Losada, J., del Peso, I., Beyer, L., 1998. *Redox and electrocatalytic properties of electrodes modified by films of polypyrrole nickel(II) Schiff-base complexes*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 447(1-2), 147-154
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M., 2005. *Enzyme-based impedimetric detection of PCR products using oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes*. **Biosensors & Bioelectronics** 20, 2001-2009.
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascini, M., 2002. *Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E*. **Analytica Chimica Acta** 469, 93-99.
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A., Mascini, M., 2004. *Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors*. **Biosensors & Bioelectronics** 19(6), 515-530.
- Lupea, A., Oprescu, D., 1994. *Hydrazines volumetric and potentiometric determination with p-carboxybenzenesulphonedichloroamide*. **Revista de Chimie** 45(5), 433-436.
- Lupu, S., Mucci, A., Pigani, L., Seeber, R., Zanardi, C., 2002. *Polythiophene derivative conducting polymer modified electrodes and microelectrodes for determination of ascorbic acid. Effect of possible interferents*. **Electroanalysis** 14, 519-525.
- Lupu, S., Parenti, F., Pigani, L., Seeber, R., Zanardi, C., 2003. *Differential pulse techniques on modified conventional-size and microelectrodes. Electroactivity of poly [4,4'-bis(butylsulfanyl)-2,2'-bithiophene] coating towards dopamine and ascorbic acid oxidation*. **Electroanalysis** 15, 715-725.
- Maeda, T., Takeuchi, T., Furusho, Y., Takata, T., 2004. *Design and synthesis of chiral poly(binaphthyl salen zinc complex) and application of the asymmetric field based on its helical conformation to a catalytic asymmetric reaction*. **Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry** 42, 4693-4703.
- Majdi, S., Jabbari, A., Heli, H., Moosavi-Movahedi, A.A., 2007. *Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a nickel-curcumin complex modified glassy carbon electrode*. **Electrochimica Acta** 52(14), 4622-4629.
- Malinauskas, A., Ruzgas, T., Gorton, L., 2000. *Electrocatalytic oxidation of coenzyme NADH at carbon paste electrodes, modified with zirconium phosphate and some redox mediators*. **Journal of Colloid And Interface Science** 224, 325-332.
- Malinski, T., Ciszewski, A., Bennett, J., Fish, J., Czuchajowski, L., 1991. *Characterization of conductive polymeric nickel(II) tetrakis(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)porphyrin as an anodic material for electrocatalysis*. **Journal of the Electrochemical Society** 138(7), 2008-2015.
- Maneiro, M., Bermejo, M., Fernandez, M., Gomez-Forneas, E., Gonzalez-Noya, A., Tyryshkin, A., 2003. *A new type of manganese-Schiff base complex, catalysts for the disproportionation of hydrogen peroxide as peroxidase mimics*. **New Journal of Chemistry** 27(4), 727-733.
- Manso, J., Mena, M.L., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J., 2007. *Electrochemical biosensors based on colloidal gold-carbon nanotubes composite electrodes*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 603(1), 1-7.
- Mao, L., Tian, Y., Shi, G., Liu, H., Jin, L., Yamamoto, K., Tao, S., Jin, J., 1998. *A new ultramicrosensor for nitric oxide based on electropolymerized film of nickel salen*. **Analytical Letters** 31, 1991-2007.
- Mascini, M., Palchetti, I., Marrazza, G., 2001. *DNA electrochemical biosensors*. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** 369(1), 15-22.
- Mathiyarasu, J., Senthilkumar, S., Phani, K.L.N., Yegnaraman, V., 2008. *PEDOT-Au nanocomposite film for electrochemical sensing*. **Materials Letters** 62, 571-573.
- McCreery, R., 1990. *Symposium on photoelectrochemical and electrochemical surface science - preface*. **Langmuir** 6(1), 43.

- McCreery, R.L., 1991. *Electroanalytical Chemistry*. Dekker, New York.
- McCreery, R.L., 1996. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*, 2 ed. Dekker.
- Meehan, T., Gamper, H.a.B., JF, 1982. *Characterization of reversible, physical binding of benzo[a]pyrene derivatives to DNA*. **Journal of Biological Chemistry** 257(17), 479-485.
- Megraud, F., 2004. *H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing*. **Gut** 53(9), 1374-1384.
- Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., 2002. *Indicator-free electrochemical DNA biosensor based on adenine and guanine signals*. **Electroanalysis** 14, 1245-1250.
- Merkoci, A., Aldavert, M., Marin, S., Alegret, S., 2005a. *New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling*. **Trac-Trends in Analytical Chemistry** 24, 341-349.
- Merkoci, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Valle, M., Alegret, S., 2005b. *New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes*. **Trac-Trends in Analytical Chemistry** 24, 826-838.
- Metelka, R., Vytras, K., Bobrowski, A., 2000. *Effect of the modification of mercuric oxide on the properties of mercury films at HgO-modified carbon paste electrodes*. **Journal of Solid State Electrochemistry** 4, 348-352.
- Meyerhoff, M., Badr, I., Mitchell-Koch, J., 2005. *Highly selective optical and potentiometric fluoride ion sensors based on thin polymeric films doped with aluminum(III)- porphyrins and salens as ionophores*. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society** 230, 260.
- Millan, K., Mikkelsen, S., 1993. *Sequence-selective biosensor for DNA-based on electroactive hybridization indicators*. **Analytical Chemistry** 65(17), 2317-2323.
- Mirza-Aghayan, M., Ghassemzadeh, M., Hoseini, M., Bolourtchian, M., 2003. *Microwave-assisted synthesis of the tetradentate Schiff-bases under solvent-free and catalyst-free condition*. **Synthetic Communications** 33(4), 521-525.
- Molina-Holgado, T., Pinilla-Macias, J., Hernandez-Hernandez, L., 1995. *Voltammetric determination of lead with a chemically-modified carbon-paste electrode with diphenylthiocarbazone*. **Analytica Chimica Acta** 309(1-3), 117-122.
- Momynaliev, K., Govorun, V., Gnedenko, O., Ivanov, Y., Archakov, A., 2003. *The use of the resonant mirror biosensor to detect point mutations, as demonstrated with synthetic oligonucleotides*. **Journal Of Molecular Recognition** 16(1), 1-8.
- Moreno, G., Pariente, F., Lorenzo, E., 2000. *Electrocatalytic oxidation of ascorbate at glassy carbon electrodes modified with electrodeposited films derived from dihydroxybenzaldehyde isomers*. **Analytica Chimica Acta** 420(1), 29-37.
- Moscone, D., Mascini M., 1997. *Optimized biosensors in clinical applications. Handbook of biosensors and electronic noses. Medicine, food and environment*. AEG Frankfurt, Germany.
- Mousavi, M., Rahmani, A., Golabi, S., Shamsipur, M., Sharghi, H., 2001. *Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of lead(II) with a 1,4-bis(prop-2'-enyloxy)-9,10-anthraquinone modified carbon paste electrode*. **Talanta** 55, 305-312.
- Munteanu, F., Kubota, L., Gorton, L., 2001. *Effect of pH on the catalytic electro oxidation of NADH using different two-electron mediators immobilised on zirconium phosphate*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 509, 2-10.
- Nakayama, M., Ihara, T., Nakano, K., Maeda, M., 2002. *DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate*. **Talanta** 56, 857-866.
- Nassef, H.M., Civit, L., Fragoso, A., O'Sullivan, C.K., 2008. *Amperometric sensing of ascorbic acid using a disposable screen-printed electrode modified with electrografted o-aminophenol film*. **Analyst** 133, 1736-1741.

Niederhoffer, E., Timmons, J., Martell, A., 1984. *Thermodynamics of oxygen binding in natural and synthetic dioxygen complexes*. **Chemical Reviews** 84(2), 137-203.

Nonaka, H., Matsumura, Y., 2002. *Electrochemical oxidation of carbon monoxide, methanol, formic acid, ethanol, and acetic acid on a platinum electrode under hot aqueous conditions*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 520(1-2), 101-110.

Nyokong, T., 2008. *Electrocatalytic and photosensitizing behavior of metallophthalocyanine complexes*. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** 12, 1005-1021.

Oesch, U., Janata, J., 1983. *Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide-films .1. Formation and reduction behavior of anodic oxides on gold*. **Electrochimica Acta** 28(9), 1237-1246.

OMS, 1974. *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer, Geneva.

OMS, 1994. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human*. World Health Organization.

Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J., Nielsen, P., Ozsoz, M., 2002a. *Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes*. **Electrochemistry Communications** 4(10), 796-802.

Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M., 2002b. *Allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation from polymerase chain reaction amplicons based on label-free electrochemical genosensor*. **Analytical Chemistry** 74, 5931-5936.

Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P., Ozsoz, M., 2002c. *DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label*. **Bioelectrochemistry** 58(1), 119-126.

Ozoemena, K., Nyokong, T., 2005. *Electrocatalytic oxidation and detection of hydrazine at gold electrode modified with iron phthalocyanine complex linked to mercaptopropyl self-assembled monolayer*. **Talanta** 67(1), 162-168.

Ozsoz, M., Erdem, A., Kerman, K., Ozkan, D., Tugrul, B., Topcuoglu, N., Ekren, H., Taylan, M., 2003. *Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes*. **Analytical Chemistry** 75, 2181-2187.

Palecek, E., 1960. *Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid*. **Nature** 188(4751), 656-657.

Palecek, E., 1988. *Adsorptive transfer stripping voltammetry - Determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface*. **Analytical Biochemistry** 170(2), 421-431.

Pamidi, P., Wang, J., 1996. *Electrocatalysis and measurements of hydrazine compounds at glassy carbon electrodes coated with electropolymerized 3,4-dihydroxybenzaldehyde films*. **Electroanalysis** 8(3), 244-247.

Pang, D., Abruna, H., 2000. *Interactions of benzyl viologen with surface-bound single- and double stranded DNA*. **Analytical Chemistry** 72(19), 4700-4706.

Pang, D., Qi, Y., Wang, Z., Cheng, J., Wang, J., 1995. *Electrochemical oxidation of DNA at a gold microelectrode*. **Electroanalysis** 7(8), 774-777.

Pariente, F., Lorenzo, E., Abruna, H., 1994. *Electrocatalysis of NADH oxidation with electropolymerized films of 3,4-dihydroxybenzaldehyde*. **Analytical Chemistry** 66(23), 4337-4344.

Pariente, F., Tobalina, F., Darder, M., Lorenzo, E., Abruna, H., 1996. *Electrodeposition of redox-active films of dihydroxybenzaldehydes and related analogs and their electrocatalytic activity toward NADH oxidation*. **Analytical Chemistry** 68(18), 3135-3142.

Park, S., Taton, T., Mirkin, C., 2002. *Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes*. **Science** 295, 1503-1506.

- Pasquini, F., Tissot, P., 1996. *Studies of the oxidation of ethanol on a reticulated nickel rotating cylinder electrode*. **Journal of Applied Electrochemistry** 26(2), 211-215.
- Pastor, T., Vajgand, V., Antonijevic, V., 1983. *Coulometric determination of thiols and hydrazines with electrogenerated iodine in methanol in the presence of potassium acetate*. **Mikrochimica Acta** 3(3-4), 203-211.
- Peng, H., Soeller, C., Cannell, M., Bowmaker, G., Cooney, R., Travas-Sejdic, J., 2006. *Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles*. **Biosensors & Bioelectronics** 21, 1727-1736.
- Persson, B., 1990. *A chemically modified graphite electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine-dinucleotide based on a phenothiazine derivative, 3-beta-naphthoyl-toluidine blue-o*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 287, 61-80.
- Petek, M., Bruckens, S., 1973. *Isotopic labeling investigation of mechanism of electrooxidation of hydrazine at platinum - Electrochemical mass-spectrometric study*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 47(2), 329-333.
- Pilevar, S., Davis, C., Portugal, F., 1998. *Tapered optical fiber sensor using near-infrared fluorophores to assay hybridization*. **Analytical Chemistry** 70(10), 2031-2037.
- Pingarrón, J.M., Sánchez P., 1999. *Química Electroanalítica*. Ed. Síntesis.
- Piro, B., Haccoun, J., Pham, M., Tran, L., Rubin, A., Perrot, H., Gabrielli, C., 2005. *Study of the DNA hybridization transduction behavior of a quinone-containing electroactive polymer by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 577, 155-165.
- Pividori, M., Merkoci, A., Alegret, S., 2003. *Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing*. **Biosensors & Bioelectronics** 19, 473-484.
- Polson, S., Cini, R., Pifferi, C., Marzilli, L., 1997. *Synthesis and X-ray structures of elusive imine/oxime-type organocobalt B-12 complexes. NMR study suggesting steric strain within the axially ligated benzimidazole*. **Inorganic Chemistry** 36(3), 314-322.
- Popovic, Z., Roje, V., Pavlovic, G., Matkovic-Calogovic, D., Giester, G., 2001. *The first example of coexistence of the ketoamino-enolimino forms of diamine Schiff base naphthaldimine parts: the crystal and molecular structure of N,N'-bis(1-naphthaldimine)-o-phenylenediamine chloroform (1/1) solvate at 200 K*. **Journal of Molecular Structure** 597(1-3), 39-47.
- Popovich, N., Eckhardt, A., Mikulecky, J., Napier, M., Thomas, R., 2002. *Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids*. **Talanta** 56, 821-828.
- Pretsch, C., 1998. *Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos*. Springer-Verlag Ibérica.
- Pyle, A., Rehmann, J., Meshoyrer, R., Kumar, C., Turro, N., Barton, J., 1989. *Mixed-ligand complexes of ruthenium(II) - Factors governing binding to dna*. **Journal of the American Chemical Society** 111(8), 3051-3058.
- Ramnauth, R., Al-Juaid, S., Motevalli, M., Parkin, B., Sullivan, A., 2004. *Synthesis, structure, and catalytic oxidation chemistry from the first oxo-imido Schiff base metal complexes*. **Inorganic Chemistry** 43(13), 4072-4079.
- Razmi-Nerbin, H., Pournaghi-Azar, M., 2002. *Nickel pentacyanonitrosylferrate film modified aluminum electrode for electrocatalytic oxidation of hydrazine*. **Journal of Solid State Electrochemistry** 6(2), 126-133.
- Ready, J., Jacobsen, E., 2001. *Highly active oligomeric (salen)Co catalysts for asymmetric epoxide ring-opening reactions*. **Journal of the American Chemical Society** 123, 2687-2688.
- Reinhardt, C., Krugh, T., 1978. *Comparative-study of ethidium-bromide complexes with dinucleotides and DNA - Direct evidence for intercalation and nucleic-acid sequence preferences*. **Biochemistry** 17(23), 4845-4854.

- Robertson, P., 1980. *On the oxidation of alcohols and amines at nickel-oxide electrodes - Mechanistic aspects*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 111(1), 97-104.
- Rosi, N., Mirkin, C., 2005. *Nanostructures in biodiagnostics*. **Chemical Reviews** 105, 1547-1562.
- Roslonek, G., Taraszewska, J., 1992. *Electrocatalytic oxidation of alcohols on glassy-carbon electrodes electrochemically modified with nickel tetraazamacrocyclic complexes - Mechanism of film formation*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 325(1-2), 285-300.
- Sabatani, E., Rubinstein, I., Maoz, R., Sagiv, J., 1987. *Organized self-assembling monolayers on electrodes .1. octadecyl derivatives on gold*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 219(1-2), 365-371.
- Saenger, W., 1984. *Principles of Nucleic Acid and structures*. Springer Advanced texts in Chemistry Series, Springer, New York.
- Safavi, A., Ensafi, A., 1995. *Kinetic spectrophotometric determination of hydrazine*. **Analytica Chimica Acta** 300(1-3), 307-311.
- Salimi, A., Mamkhezri, H., Mohebbi, S., 2006. *Electroless deposition of vanadium-Schiff base complex onto carbon nanotubes modified glassy carbon electrode: Application to the low potential detection of iodate, periodate, bromate and nitrite*. **Electrochemistry Communications** 8, 688-696.
- Salimi, A., Miranzadeh, L., Hallaj, R., 2008a. *Amperometric and voltammetric detection of hydrazine using glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and catechol derivatives*. **Talanta** 75(1), 147-156.
- Salimi, A., Miranzadeh, L., Hallaj, R., 2008b. *Amperometric and voltammetric detection of hydrazine using glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and catechol derivatives*. **Talanta** 75, 147-156.
- Samant, P., Fernandes, J., 1999. *Nickel-modified manganese oxide as an active electrocatalyst for oxidation of methanol in fuel cells*. **Journal of Power Sources** 79(1), 114-118.
- Samsel, E., Srinivasan, K., Kochi, J., 1985. *Mechanism of the chromium-catalyzed epoxidation of olefins - role of oxochromium(v) cations*. **Journal of the American Chemical Society** 107, 7606-7617.
- Scharf, U., Grabner, E., 1996. *Electrocatalytic oxidation of hydrazine at a Prussian Blue-modified glassy carbon electrode*. **Electrochimica Acta** 41(2), 233-239.
- Schmidt, T., Gasteiger, H., Behm, R., 1999. *Methanol electrooxidation on a colloidal PtRu-alloy fuel-cell catalyst*. **Electrochemistry Communications** 1(1), 1-4.
- Shahrokhian, S., Fotouhi, L., 2007. *Carbon paste electrode incorporating multi-walled carbon nanotube/cobalt salophen for sensitive voltammetric determination of tryptophan*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 123, 942-949.
- Shahrokhian, S., Karimi, M., Khajehsharifi, H., 2005. *Carbon-paste electrode modified with cobalt-5-nitrosalophen as a sensitive voltammetric sensor for detection of captopril*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 109, 278-284.
- Shahrokhian, S., Souri, A., Khajehsharifi, H., 2004. *Electrocatalytic oxidation of penicillamine at a carbon paste electrode modified with cobalt salophen*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 565, 95-101.
- Shahrokhian, S., Zare-Mehrjardi, H.R., 2007. *Cobalt salophen-modified carbon-paste electrode incorporating a cationic surfactant for simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid and dopamine*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 121, 530-537.
- Shaidarova, L.G., Budnikov, G.K., 2008. *Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry*. **Journal of Analytical Chemistry** 63, 922-942.
- Shamsipur, M., Sadeghi, S., Naeimi, H., Sharghi, H., 2000. *Iodide ion-selective PVC membrane electrode based on a recently synthesized salen-Mn(II) complex*. **Polish Journal of Chemistry** 74(2), 231-238.

- Shamsipur, M., Salimi, A., Haddadzadeh, H., Mousavi, M., 2001a. *Electrocatalytic activity of cobaloxime complexes adsorbed on glassy carbon electrodes toward the reduction of dioxygen*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 517, 37-44.
- Shamsipur, M., Yousefi, M., Hosseini, M., Ganjali, M., Sharghi, H., Naeimi, H., 2001b. *A Schiff base complex of Zn(II) as a neutral carrier for highly selective PVC membrane sensors for the sulfate ion*. **Analytical Chemistry** 73, 2869-2874.
- Sharp, M., Petersson, M., Edstrom, K., 1979. *Preliminary determinations of electron-transfer kinetics involving ferrocene covalently attached to a platinum surface*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 95(1), 123-130.
- Shi, G., Luo, M., Xue, J., Xu, F., Jin, L., Jin, J., 2001. *Study of an Au colloid self-assembled electrode and its application to the determination of carbon monoxide*. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** 370, 878-882.
- Sigman, D., 1986. *Nuclease activity of 1,10-phenanthroline copper-ion*. **Accounts of Chemical Research** 19(6), 180-186.
- Silvestri, A., Barone, G., Ruisi, G., Lo Giudice, M., Tumminello, S., 2004. *The interaction of native DNA with iron(III)-N,N'-ethylene-bis(salicylideneiminato)-chloride*. **Journal of Inorganic Biochemistry** 98, 589-594.
- Siontorou, C., Nikolelis, D., Piuanno, P., Krull, U., 1997. *Detection of DNA hybridization using self-assembled bilayer lipid membranes (BLMs)*. **Electroanalysis** 9, 1067-1071.
- Steel, A., Herne, T., Tarlov, M., 1998. *Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold*. **Analytical Chemistry** 70(22), 4670-4677.
- Steichen, M., Decrem, Y., Godfroid, E., Buess-Herman, C., 2007. *Electrochemical DNA hybridization detection using peptide nucleic acids and $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ on gold electrodes*. **Biosensors & Bioelectronics** 22(9-10), 2237-2243.
- Stinziano-Eveland, R., Nguyen, S., Liable-Sands, L., Rheingold, A., 2000. *Synthesis and characterization of rhodium(III) dichloro complexes with unsymmetrically bound salen-type ligands*. **Inorganic Chemistry** 39, 2452-2455.
- Sun, X., He, P., Liu, S., Ye, J., Fang, Y., 1998. *Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications*. **Talanta** 47(2), 487-495.
- Suye, S., Matsuura, T., Kimura, T., Zheng, H., Hori, T., Amano, Y., Katayama, H., 2005. *Amperometric DNA sensor using gold electrode modified with polymerized mediator by layer-by-layer adsorption*. **Microelectronic Engineering** 81, 441-447.
- Svancara, I., Vytras, K., Kalcher, K., Walcarius, A., Wang, J., 2009. *Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis*. **Electroanalysis** 21, 7-28.
- Tagliaro, F., Schiavon, G., Bontempelli, G., Carli, G., Marigo, M., 1991. *Improved high-performance liquid-chromatographic determination with amperometric detection of alpha-amanitin in human plasma based on its voltammetric study*. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications** 563(2), 299-311.
- Tanaka, K., Toda, F., 2000. *Solvent-free organic synthesis*. **Chemical Reviews** 100(3), 1025-1074.
- Tansil, N., Xie, H., Xie, F., Gao, Z., 2005. *Direct detection of DNA with an electrocatalytic threading intercalator*. **Analytical Chemistry** 77(1), 126-134.
- Taraszewska, J., Roslonek, G., 1994. *Electrocatalytic oxidation of methanol on a glassy-carbon electrode modified by nickel-hydroxide formed by ex-situ chemical precipitation*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 364(1-2), 209-213.

- Taylor, M., Jacobsen, E., 2003. *Enantioselective Michael additions to alpha,beta-unsaturated imides catalyzed by a Salen-Al complex*. **Journal of the American Chemical Society** 125, 11204-11205.
- Teixeira, M., Dockal, E., Cavalheiro, E., 2005. *Sensor for cysteine based on oxovanadium(IV) complex of Salen modified carbon paste electrode*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 106, 619-625.
- Teixeira, M., Marino, G., Dockal, E., Cavalheiro, E., 2004. *Voltammetric determination of pyridoxine (Vitamin B-6) at a carbon paste electrode modified with vanadyl(IV)-Salen complex*. **Analytica Chimica Acta** 508, 79-85.
- Thompson, L., Kowalik, J., Josowicz, M., Janata, J., 2003. *Label-free DNA hybridization probe based on a conducting polymer*. **Journal of the American Chemical Society** 125, 324-325.
- Torstensson, A., Gorton, L., 1981. *Catalytic-oxidation of NADH by surface-modified graphite-electrodes*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 130, 199-207.
- Trevin, S., Bedioui, F., Villegas, M., BiedCharreton, C., 1997. *Electropolymerized nickel macrocyclic complex-based films: Design and electrocatalytic application*. **Journal of Materials Chemistry** 7(6), 923-928.
- Tse, D., Kuwana, T., 1978. *Electrocatalysis of dihydronicotinamide adenosine-diphosphate with quinones and modified quinone electrodes*. **Analytical Chemistry** 50(9), 1315-1318.
- Ueno, T., Ohashi, M., Kono, M., Kondo, K., Suzuki, A., Yamane, T., Watanabe, Y., 2004. *Crystal structures of artificial metalloproteins: Tight binding of Fe^{III}(Schiff- base) by mutation of Ala71 to gly in apo-myoglobin*. **Inorganic Chemistry** 43, 2852-2858.
- Upadhyay, S., Gupta, V., 1984. *Reagent system for the spectrophotometric determination of methanol in environmental and biological samples*. **Analyst** 109(11), 1427-1429.
- Vaidyanathan, V., Vijayalakshmi, R., Subramanian, V., Nair, B., 2002. *Synthesis, characterization, and binding of [Cr(naphen)(H₂O)₂]⁺ with DNA: Experimental and modeling study*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan** 75(5), 1143-1149.
- Vasileva, L., Shchukin, I., Babkin, V., 1993. *Investigation of electrochemical and chemical guaiacol oxidation-products*. **Russian Electrochemistry** 29(4), 609-615.
- Vermillion, F., Pearl, I., 1964. *Anodic reactions of simple phenolic compounds*. **Journal of the Electrochemical Society** 111(12), 1392-1400.
- Vernot, E., Macewen, J., Bruner, R., Haun, C., Kinkead, E., Prentice, D., Hall, A., Schmidt, R., Eason, R., Hubbard, G., Young, J., 1985. *Long-term inhalation toxicity of hydrazine*. **Fundamental and Applied Toxicology** 5(6, Part 1), 1050-1064.
- Vieira, L., Lupetti, K., Fatibello, O., 2002. *Sweet potato (Ipomoea batatas (L.) Lam.) tissue as a biocatalyst in a paraffin/graphite biosensor for hydrazine determination in boiler feed water*. **Analytical Letters** 35(14), 2221-2231.
- Vijayalakshmi, R., Kanthimathi, M., Parthasarathi, R., Nair, B., 2006. *Interaction of chromium(III) complex of chiral binaphthyl tetradentate ligand with DNA*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 14(10), 3300-3306.
- Vijayalakshmi, R., Kanthimathi, M., Subramanian, V., Nair, B., 2000. *Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H₂O)₂]⁺ClO₄*. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects** 1475(2), 157-162.
- Wang, J., 1994. *Analytical Electrochemistry*. VCH. New York.
- Wang, J., 2002. *Electrochemical nucleic acid biosensors*. **Analytica Chimica Acta** 469(1), 63-71.
- Wang, J., Bollo, S., Paz, J., Sahlin, E., Mukherjee, B., 1999. *Ultrasensitive measurements of nucleic acids by baseline-corrected adsorptive stripping square-wave voltammetry*. **Analytical Chemistry** 71, 1910-1913.
- Wang, J., Chatrathi, M., Tian, B., Polsky, R., 2000. *Capillary electrophoresis chips with thick-film amperometric detectors: Separation and detection of hydrazine compounds*. **Electroanalysis** 12(9), 691-694.

- Wang, J., Chen, L., 1995. *Hydrazine detection using a tyrosinase-based inhibition biosensor*. **Analytical Chemistry** 67(20), 3824-3827.
- Wang, J., Chicharro, M., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Farias, P., Shiraishi, H., 1996. *DNA biosensor for the detection of hydrazines*. **Analytical Chemistry** 68(13), 2251-2254.
- Wang, J., Fernandes, J., Kubota, L., 1998a. *Polishable and renewable DNA hybridization biosensors*. **Analytical Chemistry** 70, 3699-3702.
- Wang, J., Greene, B., Morgan, C., 1984. *Carbon paste electrodes modified with cation-exchange resin in differential pulse voltammetry*. **Analytica Chimica Acta** 158, 15-22.
- Wang, J., Tian, B., Rogers, K., 1998b. *Thick film electrochemical immunosensor based on stripping potentiometric detection of a metal ion label*. **Analytical Chemistry** 70, 1682-1685.
- Wang, Q., Li, N., Wang, W., 2002. *Electrocatalytic response of dopamine at a metallothioneins self-assembled gold electrode*. **Analytical Sciences** 18, 635-639.
- Wang, S., Peng, T., Yang, C., 2003. *Investigation on the interaction of DNA and electroactive ligands using a rapid electrochemical method*. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** 55(3), 191-204.
- Wang, X., Yang, N., Wan, Q., Wang, X., 2007. *Catalytic capability of poly(malachite green) films based electrochemical sensor for oxidation of dopamine*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 128, 83-90.
- Weissenbacher, M., Kalcher, K., Greschonig, H., Ng, W., Chan, W., Voulgaropoulos, A., 1992. *Electrochemical-behavior of persulfate on carbon paste electrodes modified with Prussian blue and analogous compounds*. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** 344(3), 87-92.
- Welch, T., Thorp, H., 1996. *Distribution of metal complexes bound to DNA determined by normal pulse voltammetry*. **Journal of Physical Chemistry** 100(32), 3829-13836.
- Whittman, C., Schmid R. D., 1997. *Bioaffinity sensors for environmental monitoring. Handbook of biosensors and electronic noses. Medicine, food and the environment*. AEG Frankfurt, Germany.
- Widrig, C., Chung, C., Porter, M., 1991. *The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 310(1-2), 335-359.
- Wolfe, A., Shimer, G., Meehan, T., 1987. *Polycyclic aromatic-hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA*. **Biochemistry** 26(20), 6392-6396.
- Wu, H., Li, W., He, X., Miao, K., Liang, H., 2002. *Spectral studies of the binding of lucigenin, a bisacridinium derivative, with double-helix DNA*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 373(3), 163-168.
- Xie, H., Zhang, C., Gao, Z., 2004. *Amperometric detection of nucleic acid at femtomolar levels with a nucleic acid/electrochemical activator bilayer on gold electrode*. **Analytical Chemistry** 76, 1611-1617.
- Xu, X., Bard, A., 1995. *Immobilization and hybridization of dna on an aluminum(III) alkanebisphosphonate thin-film with electrochemiluminescent detection*. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society** 210(Part 1), 23.
- Yang, C., Kumar, A., Kuo, M., Chien, S., Zen, J., 2005. *Copper-palladium alloy nanoparticle plated electrodes for the electrocatalytic determination of hydrazine*. **Analytica Chimica Acta** 554(1-2), 66-73.
- Zagal, J.H., Griveau, S., Ozoemena, K.I., Nyokong, T., Bedioui, F., 2009. *Carbon Nanotubes, Phthalocyanines and Porphyrins: Attractive Hybrid Materials for Electrocatalysis and Electroanalysis*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 9, 2201-2214.
- Zare, H., Golabi, S., 1999. *Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 464(1), 14-23.
- Zare, H.R., Nasirizadeh, N., 2007. *Hematoxylin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for electrocatalytic oxidation of hydrazine*. **Electrochimica Acta** 52, 4153-4160.

Zen, J., Kumar, A., Tsai, D., 2003. *Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry*. **Electroanalysis** 15, 1073-1087.

Zhang, Y., Pothukuchy, A., Shin, W., Kim, Y., Heller, A., 2004. *Detection of similar to 10³ copies of DNA by an electrochemical enzyme-amplified sandwich assay with ambient O₂ as the substrate*. **Analytical Chemistry** 76, 4093-4097.

Zhao, Y., Pang, D., Wang, Z., Cheng, J., Luo, Z., Feng, C., Shen, H., Zhang, X., 1998. *Electrochemical studies of antitumor drugs I. Fundamental electrochemical characteristics of an iron(III) Schiff base complex and its interaction with DNA*. **Acta Chimica Sinica** 56, 178-183.

Zhao, Y., Pang, D., Wang, Z., Cheng, J., Qi, Y., 1997. *DNA-modified electrodes .2. Electrochemical characterization of gold electrodes modified with DNA*. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 431(2), 203-209.

Zhao, Y., Zhang, W., Chen, H., Luo, Q., 2002. *Anodic oxidation of hydrazine at carbon nanotube powder microelectrode and its detection*. **Talanta** 58(3), 529-534.

Zhu, N., Zhang, A., He, P., Fang, Y., 2003. *Cadmium sulfide nanocluster-based electrochemical stripping detection of DNA hybridization*. **Analyst** 128, 260-264.

PUBLICACIONES

Publicaciones a las que ha dado lugar la realización de esta Tesis:

Revenga-Parra, M.; Lorenzo, E. & Pariente, F., 2005. *Synthesis and electrocatalytic activity towards oxidation of hydrazine of a new family of hydroquinone salophen derivatives: Application to the construction of hydrazine sensors*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 107, 678-687.

Revenga-Parra, M.; Garcia, T.; Lorenzo, E. & Pariente, F., 2007. *Comprehensive study of interactions between DNA and new electroactive Schiff base ligands. Application to the detection of singly mismatched Helicobacter pylori sequences*. **Biosensors & Bioelectronics** 22, 2675-2681.

Revenga-Parra, M.; Garcia, T.; Lorenzo, E. & Pariente, F., 2008. *Electrocatalytic oxidation of methanol and other short chain aliphatic alcohols on glassy carbon electrodes modified with conductive films derived from Ni^{II} -(N,N'-bis(2,5-dihydroxybenzylidene)-1,2-diaminobenzene)*. **Sensors and Actuators B-Chemical** 130, 730-738.