

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental



Cucurbit[n]uriles: interacciones en disolución y en superficie para el desarrollo de sensores electroquímicos. Aplicaciones analíticas.

María del Pozo Vázquez

Tesis Doctoral con Mención Internacional

Madrid, 2013

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental



Cucurbit[n]uriles: interacciones en disolución y en superficie para el desarrollo de sensores electroquímicos. Aplicaciones analíticas.

Memoria para optar al grado de Doctor con mención internacional
presentada por la Licenciada en Química:

María del Pozo Vázquez

Directora de la Tesis:

Dra. M^a del Carmen Quintana Mani

Profesor Titular de Universidad

Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental

Tesis Doctoral con Mención Internacional

Madrid, 2013



Dña. M^a CARMEN QUINTANA MANI, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo descrito en la memoria que se presenta, titulado “*Cucurbit[n]uriles: interacciones en disolución y en superficie para el desarrollo de sensores electroquímicos. Aplicaciones analíticas*” ha sido realizado por Dña. María del Pozo Vázquez en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo mi dirección y constituye su Tesis Doctoral. 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 directora y tutora del trabajo de investigación, autoriza su presentación para que se defienda como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firmo el presente escrito en Madrid a 2 de Septiembre de dos mil trece.

V.B. Departamento

Fdo: J. A. Pérez López
Director del Dpto de Química y A. I.

Fdo: M^a Carmen Quintana Mani

Agradecimientos/Acknowledgement

Cuando llega este momento, nunca te imaginas que estas líneas puedan ser más complicadas de escribir que el resto de páginas que vienen a continuación, pero así es. En ellas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral. Resulta complicado plasmar con palabras un millar de sentimientos y momentos inolvidables, pero intentaré hacerlo con el mayor cariño y cuidado para no dejarme a nadie fuera.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Dña. M^a del Carmen Quintana Mani, que gracias a su paciencia (más que infinita), entusiasmo, esfuerzo y dedicación, ha sido posible realizar esta tesis. Gracias por tus consejos tanto dentro como fuera del laboratorio, por hacer que me ilusione con esta carrera profesional, por ser la mejor mentora, pero sobre todo, por tu amistad.

Me gustaría recordar al Profesor Lucas Hernández, quién me permitió comenzar esta tesis años atrás y que me encantaría que estuviera aquí para ver lo que hemos conseguido.

Al Dr. D. Pedro Hernández por su disposición a resolver mis dudas, por sus enseñanzas durante la realización de este trabajo y por la revisión de esta memoria.

I would like to thank to the Prof. Dr. Alexander Kuhn to kindly accept my predoctoral stage of 5 months in his lab at the Institut des Sciences Moléculaires of Bordeaux. It was a nice professional and personal experience in that amazing city.

Quiero agradecer a todos los miembros del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid. A todos y cada uno de los profesores que lo forman por tener siempre palabras de apoyo y haberme enseñado todo lo que sé de Química Analítica. De una manera especial se lo quiero agradecer a Pilar, Elena, Mónica, María Jesús, Ana y Alberto por hacer cada día diferente con las comidas y por vuestros consejos. A Merche y Rodolfo por su ayuda en temas administrativos y de material. Y por último, no me puedo olvidar de los becarios y de todos aquellos que habéis pasado por estos laboratorios en algún momento de esta tesis; gracias por las alegrías y momentos inolvidables. A todos, muchas gracias. Me llevo un recuerdo muy bueno de esta etapa en el departamento.

No me quiero olvidar de los profesores que desde fuera de este módulo e incluso Universidad, han sabido dar respuestas a mis dudas y preguntas y, gracias a las cuales, han surgido estrechas y agradables colaboraciones durante la realización de esta tesis.

I would like to thank the NanoSystemes Analitiques group for being such good hosts and the great atmosphere created in the lab. Specially, I would like to thank Catherine for our sharing those beers and concerts, Salem for our talks at work and making me laugh every day and Suresh for showing me how to enjoy sharing my work, being so enthusiastic about it and smiling even when the experiments don't go as good

as expected. You all were my family during my time in Bordeaux making me feel at home with our movies and camping. Thank you so much my awesome friends.

En este momento no me puedo olvidar de todos aquellos que, desde fuera de mi vida profesional, me han apoyado y ayudado durante todo este tiempo. A Irene y a Yolanda, porque cada una desde su mundo químico/empresarial saben darme un punto de vista diferente. A Vanesa, Juan y Jorge por nuestras cenas de los viernes que hacen que me ría sin parar. A Rebeca por aguantar y apoyar nuestras charlas de doctorado y química sin rechistar. A mis doctoras favoritas, Alba y Patricia, porque vosotras sois siempre un ejemplo de perseverancia y grandeza. Gracias por resolver mis infinitas dudas y ser siempre un ciego apoyo.

A los no químicos Quique, Merlo, Fernando y Ricardo, porque todavía me escuchan y se interesan incluso sin saber de lo que les hablo. A Ana, porque siempre está ahí para hacerme sonreír. De una manera especial me gustaría agradecerse a Ángel, por ser el más antiguo y sincero de mis apoyos que nunca falla.

Por último y no menos importante a mis padres y hermano. Porque siempre han confiado ciegamente en mi y su cariño y apoyo son esenciales en cada faceta de mi vida.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión de la beca dentro del programa de Formación de Personal Investigador y a la Comunidad de Madrid por el contrato asociado al proyecto AVANSENS.

A todos aquellos que de alguna forma han puesto su granito de arena en esta tesis,
a mis padres y mi hermano.

*“Si el plan “A” no funciona,
recuerda que el abecedario tiene 26 letras más”*

Autor desconocido.

“Si, tú puedes, si te convences a ti mismo de que puedes hacerlo”

Katharina Landfester.

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad
y la energía atómica: la voluntad”.*

Albert Einstein

Índice/Index

Resumen/Abstract	VII
Capítulo 1 / Chapter 1	- 1 -
Introducción general / General introduction	- 1 -
1.1. Sensores químicos: sensores electroquímicos.....	- 2 -
1.2. Química supramolecular.	- 6 -
1.2.1. Interacciones intermoleculares.....	- 7 -
1.2.1.1. Interacciones entre iones o dipolos.	- 8 -
1.2.1.2. Enlace de hidrógeno.	- 10 -
1.2.1.3. Interacciones “ π ”.....	- 11 -
1.2.1.4. Interacciones de transferencia de carga.....	- 12 -
1.2.1.5. Interacciones de Van der Waals y dispersión de London.....	- 12 -
1.2.1.6. Efecto solvofóbico.....	- 13 -
1.2.2. Reconocimiento molecular.	- 14 -
1.3. Cucurbit[n]uriles.	- 17 -
1.4. Bibliografía.	- 37 -
Capítulo 2 / Chapter 2	- 47 -
Objetivo general / General objective	- 47 -
Capítulo 3 / Chapter 3	- 49 -
Materiales y métodos / Materials and methods	- 49 -
3.1. Reactivos.....	- 50 -
3.2. Instrumentación.....	- 51 -
3.3. Procedimientos.....	- 53 -
Capítulo 4 / Chapter 4	- 55 -
Estudio y caracterización de la interacción entre cucurbit[n]uriles (n = 6 y 7) y el fungicida carbendazim. Desarrollo de métodos analíticos basados en esta interacción y su aplicación en muestras reales.	- 55 -
Study and characterization of the interaction between cucurbit[n]urils (n = 6 y 7) and carbendazim. Analytical methods development based on this interaction and their application in real samples.	- 55 -
4.1. Introducción.	- 56 -
4.2. Objetivos parciales.	- 59 -
4.3. Procedimientos.....	- 60 -
4.3.1. Preparación de las disoluciones de trabajo.	- 60 -
4.3.2. Preparación del electrodo de trabajo.	- 60 -

4.3.3. Medidas electroquímicas.	60 -
4.3.4. Medidas de fluorescencia.....	60 -
4.3.5. Medidas de espectrometría de masas.....	61 -
4.3.6. Preparación de la muestra.	61 -
4.4. Resultados y discusión.	62 -
4.4.1. Estudio de formación del complejo CB[n] (n = 6, 7)-CBZ.	62 -
4.4.2. Estudio de la influencia de la concentración de iones en disolución. ...	69 -
4.4.3. Cálculo de la constante de formación y de la estequiometría para el complejo CB[7]-CBZ.	71 -
4.4.4. Estudio del comportamiento electroquímico del complejo.	75 -
4.4.5. Optimización de las variables instrumentales para el desarrollo del método analítico.	83 -
4.4.6. Influencia de la concentración en la señal de CBZ. Parámetros analíticos.	86 -
4.4.7. Estudio de interferencias.....	89 -
4.4.8. Aplicación analítica de los métodos desarrollados.....	97 -
4.4.8.1. Análisis en piel de naranja de CBZ mediante fluorescencia.	100 -
4.4.8.2. Análisis en piel de manzana de CBZ mediante DPV.....	102 -
4.5. Conclusiones.	105 -
4.6. Bibliografía.	106 -
Capítulo 5 / Chapter 5.....	109 -
Diseño de sensores electroquímicos basados en cucurbit[8]uril. Estudio de distintas estrategias de inmovilización y su influencia en la capacidad de selección molecular en función de la carga del analito.	109 -
Desing of electrochemical sensors based on cucurbit[8]uril. Study of different immobilization strategies and their influence in the molecular selection ability depending on the analyte charge.....	109 -
5.1. Introducción.	110 -
5.2. Objetivos parciales.	118 -
5.3. Procedimientos.	119 -
5.3.1. Preparación de las suspensiones modificadoras.....	119 -
5.3.2. Preparación de los electrodos.....	119 -
5.3.3. Medidas electroquímicas.	119 -
5.3.4. Medidas de ¹ H-RMN.....	120 -
5.4. Resultados y discusión.	121 -
5.4.1. MV ²⁺ como huésped del CB[8].....	121 -
5.4.1.1. PVC como soporte.	125 -
5.4.1.2. Nafion como soporte.	126 -
5.4.1.3. Membrana de diálisis como soporte.....	127 -

5.4.1.4. Caracterización de las superficies mediante EIS.	128 -
5.4.2. FcOH como huésped de CB[8].	132 -
5.4.2.1. PVC como soporte.	135 -
5.4.2.2. Nafion como soporte.	137 -
5.4.2.3. Membrana de diálisis como soporte.	139 -
5.4.3. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ como huésped de CB[8].	141 -
5.4.3.1. Nafion como soporte.	142 -
5.4.3.2. PVC y membrana de diálisis como soportes.	143 -
5.4.4. Caracterización de las superficies modificadas.	148 -
5.4.5. Evaluación de la eliminación de interferencias negativas.	151 -
5.5. Conclusiones.	155 -
5.6. Bibliografía.	156 -
Capítulo 6 / Chapter 6.	159 -
Aplicaciones analíticas de sensores electroquímicos basados en CB[8] en la determinación de triptófano y dopamina.	159 -
Analytical applications of electrochemical sensors based on CB[8] for tryptophan and dopamine determination.	159 -
6.1. Introducción.	160 -
6.2. Objetivos parciales.	163 -
6.3. Procedimientos.	164 -
6.3.1. Preparación de las disoluciones de trabajo.	164 -
6.3.2. Preparación del electrodo de trabajo.	164 -
6.3.3. Determinación de TRP.	164 -
6.3.4. Medidas de fluorescencia.	164 -
6.3.5. Medidas de EIS.	164 -
6.3.6. Determinación de DOP en flujo.	165 -
6.3.7. Medidas de ^1H -RMN y MS.	165 -
6.3.8. Preparación de las muestras de sangre.	165 -
6.4. Resultados y discusión.	166 -
6.4.1. Desarrollo del sensor de triptófano.	166 -
6.4.1.1. Estudio de la interacción entre CB[n]s y TRP.	166 -
6.4.1.2. Estudio del comportamiento de TRP en los electrodos modificados.	167 -
6.4.1.3. Optimización de la modificación.	170 -
6.4.1.4. Optimización de los parámetros químicos. pH y concentración de electrolito.	173 -
6.4.1.5. Optimización de las variables instrumentales de la técnica de medida.	180 -

6.4.1.6.	Caracterización electroquímica del sensor empleando CV y EIS.	184 -
6.4.1.7.	Influencia de la concentración en la señal de TRP. Parámetros analíticos.	189 -
6.4.1.8.	Evaluación de la selectividad del sensor. Estudio de interferencias.	191 -
6.4.1.9.	Determinación de TRP en muestras de suero.	197 -
6.4.2.	Evaluación de la modificación del electrodo con CB[8] para la determinación de DOP empleando análisis por inyección en flujo (FIA).	199 -
6.4.2.1.	Estudio de la interacción de CB[8]-DOP en disolución.	199 -
6.4.2.2.	Respuesta electroquímica de DOP con los electrodos modificados con CB[8]. Medidas en régimen estático.	202 -
6.4.2.3.	Sistema hidrodinámico. Optimización de las variables en FIA. .	205 -
6.4.2.4.	Influencia de la concentración en la señal de DOP. Parámetros analíticos.	216 -
6.4.2.5.	Evaluación de la estabilidad de la respuesta.	218 -
6.4.2.6.	Evaluación de la selectividad. Estudio de interferencias.	222 -
6.4.2.7.	Aplicación en muestra real.	225 -
6.5.	Conclusiones.	228 -
6.6.	Bibliografía.	229 -
Capítulo 7 / Chapter 7	233 -
Grafeno y electrodos macroporosos modificados con CB[n]: nuevas perspectivas en el desarrollo de sensores.	233 -
Graphene and macroporous electrodes modified with CB[n]: new trends in sensor development.	233 -
7.1.	Introducción.	234 -
7.2.	Objetivos parciales.	240 -
7.3.	Procedimientos.	241 -
7.3.1.	Electrodo modificado con grafeno y CB[n].	241 -
7.3.1.1.	Preparación de grafeno (G) y grafeno-CB[n] (G-CB[n]).	241 -
7.3.1.2.	Modificación del electrodo.	242 -
7.3.1.3.	Medidas electroquímicas.	242 -
7.3.1.4.	Preparación de las muestras para el análisis de TRP con el sensor de G-CB[8].	243 -
7.3.2.	Electrodos macroporosos.	243 -
7.3.2.1.	Preparación de las placas de oro.	243 -
7.3.2.2.	Empleo de la técnica Langmuir-Blodgett.	243 -
7.3.2.3.	Electrodeposición de oro.	244 -

7.3.2.4. Modificación de los electrodos con FcS.....	- 244 -
7.3.2.5. Medidas electroquímicas.	- 244 -
7.4. Resultados y discusión.....	- 245 -
7.4.1. Sensor de Grafeno/CB[n].....	- 245 -
7.4.1.1. Caracterización de los materiales sintetizados G y G-CB[n] (n = 7 y 8).....	- 245 -
7.4.1.2. Caracterización electroquímica de los electrodos GCE/G y GCE/G-CB[n].	- 247 -
7.4.1.3. Desarrollo del método analítico para la determinación de TRP. Optimización de variables.	- 253 -
7.4.1.4. Influencia de la concentración de TRP. Parámetros analíticos...-	- 255 -
7.4.1.5. Estudio de interferencias.	- 258 -
7.4.1.6. Determinación de TRP en muestras reales con el sensor GCE/G-CB[8].	- 260 -
7.4.2. Desarrollo y modificación de electrodos macroporosos de oro.	- 265 -
7.4.2.1. Preparación de electrodos macroporosos. Técnica de Langmuir-Blodgett.....	- 265 -
7.4.2.2. Caracterización electroquímica de los electrodos porosos.	- 271 -
7.4.2.3. Modificación de los electrodos macroporosos.....	- 273 -
7.4.2.4. Estudios preliminares con electrodo de oro plano.	- 275 -
7.4.2.5. Modificación de electrodos porosos.....	- 281 -
7.4.2.6. Perspectivas del trabajo.	- 284 -
7.5. Conclusiones.	- 285 -
7.6. Bibliografía	- 287 -
Capítulo 8 / Chapter 8.....	- 291 -
Conclusiones generales / General conclusions	- 291 -
Acrónimos y símbolos/Acronyms and symbols	- 296 -
Lista de publicaciones /List of publications	- 299 -

Resumen/Abstract

El desarrollo de sensores electroquímicos es un campo ampliamente estudiado en química analítica para la determinación de analitos de interés en distintos campos de forma más sensible y más selectiva, permitiendo minimizar o incluso eliminar procesos de preparación de muestra. El empleo de receptores macrocíclicos como modificadores en el desarrollo de sensores, abre interesantes posibilidades en el desarrollo de métodos analíticos gracias a las propiedades de reconocimiento molecular que presentan.

El presente trabajo de doctorado se ha centrado en el estudio de las propiedades de formación de complejos de una nueva familia de receptores macrocíclicos, los cucurbit[n]urilos (CB[n]s), y en el desarrollo de sensores electroquímicos mediante la inmovilización de los mismos en la superficie de un electrodo convencional.

La memoria que se presenta está estructurada en un total de 8 capítulos siendo, los tres primeros, de carácter general. Los capítulos del 4 al 7 incluyen los resultados experimentales y discusión de las distintas partes del trabajo y a su vez se encuentran estructurados con una pequeña introducción y objetivos parciales, la exposición de resultados, finalizando con la bibliografía y las conclusiones particulares obtenidas.

La primera parte de la memoria (capítulo 1) es una introducción general que recoge un resumen de los aspectos más relevantes del desarrollo de sensores electroquímicos y de las características generales de la química supramolecular. Además, se presenta una extensa revisión de las propiedades más relevantes de los CB[n]s desde el punto de vista de la química analítica y del desarrollo de sensores.

A continuación, en el capítulo 2, se exponen los objetivos generales de la tesis y el plan de trabajo a seguir en base a los antecedentes expuestos en la introducción general. El capítulo 3 presenta los materiales y métodos comunes a toda la experimentación realizada durante esta tesis.

El inicio de este trabajo de investigación se centró en el estudio de la interacción en disolución de los CB[n]s con analitos de interés ambiental (carbendazim) (capítulo 4). Estos estudios se realizaron empleando técnicas tanto espectrofluorimétricas como electroquímicas, que permitieron monitorizar y caracterizar los complejos formados. A continuación, se presenta el desarrollo de dos métodos analíticos que resultaron satisfactoriamente aplicados al análisis del fungicida en muestras reales de frutas.

Una vez conocidas las interacciones en disolución y sus aspectos más relevantes, se comenzaron a estudiar diferentes estrategias de inmovilización de CB[n] en la superficie de un electrodo. En el capítulo 5 se presenta el desarrollo de tres vías de inmovilización diferentes, empleando los polímeros Nafion y PVC o una membrana de diálisis, y la respuesta electroquímica de tres sondas electroquímicas que, a su vez, presentan diferente carga: metil viológeno, hidroximetil ferroceno y ferri/ferrocianuro potásico. Las diferentes modificaciones se estudiaron empleando voltamperometría cíclica y espectroscopia de impedancia electroquímica. Estos estudios permitieron corroborar la presencia del receptor en la superficie del electrodo y su capacidad de selección frente a compuestos cargados negativamente.

El capítulo 6 presenta aplicaciones analíticas de los sensores desarrollados en la determinación de analitos de interés biológico en muestras reales. En primer lugar se presenta el estudio de la respuesta electroquímica del analito triptófano en el sensor Nafion/CB[8] desarrollado y su posterior aplicación en la determinación en una muestra de suero humano. En segundo lugar, se presenta el estudio de la viabilidad de utilización de los diferentes electrodos modificados en un sistema en dinámico, comprobando la estabilidad de las modificaciones en un sistema en continuo. En este caso, se utilizó el analito dopamina para la evaluación de las metodologías analíticas y su posterior determinación en muestra real.

En el capítulo 7 se expone el desarrollo de nuevas superficies sensoras con los CB[n]s que permitan compensar la posible pérdida de sensibilidad en metodologías electroanalíticas, fruto de la formación de un complejo de inclusión con el receptor macrocíclico. Por un lado, se presenta el desarrollo y caracterización de un nuevo material de grafeno/CB[n] y su aplicación analítica en la determinación del aminoácido triptófano. A continuación, se presenta el desarrollo y caracterización de electrodos macroporosos de oro y su modificación con CB[7] a través de la formación del complejo del CB[7] con ferroceno (hexanotiol ferroceno) previamente adsorbido al electrodo. Utilizando esta estrategia de inmovilización del receptor en la superficie del electrodo, se espera que futuros experimentos permitan realizar determinaciones indirectas de analitos no electroactivos.

Por último, en el capítulo 8 se resumen las conclusiones generales del trabajo desarrollado durante esta tesis doctoral.

The development of electrochemical sensors to get more sensitive and selective analytical determinations is a widely studied field in analytical chemistry. These selective methods would allow to minimize or even to eliminate, sample preparation processes in an analytical determination. The use of macrocyclic receptors as surface modifiers offers interesting possibilities in the development of new analytical methods due to their molecular recognition properties.

The present PhD work focuses on the study of complex formation properties of a new macrocyclic receptor family, the cucurbit[n]urils (CB[n]s), and in the electrochemical sensors development through CB[n] immobilization onto electrode surfaces.

This PhD book has been organised into 8 chapters, being the three first chapters a general view of the thesis. The chapters 4 to 7 include the experimental results and discussions of the different sections of this work. In addition these 4 chapters are organised as follows: a little introduction, the specific objective, results and discussions, conclusions and finally, the bibliography.

The first section of this PhD book (chapter 1) is a general introduction that collects the most relevant aspects of electrochemical sensors development and the general description of supramolecular chemistry. In addition, it presents a summary of the most important properties of the CB[n]s from an analytical chemistry and sensors development point of view.

Based on the antecedents previously presented in the introduction section, the second chapter summarizes the main objectives of this work and the work plan to follow. Chapter 3 describes the materials and methods common to all the experiments carried out during this thesis.

The beginning of this PhD work focuses on the study of the interactions in solution between CB[n]s and analytes of environmental interest (carbendazim) (chapter 4). These studies were carried out employing fluorescence spectroscopy and electrochemical techniques which allow to study and characterize the complex formation. In addition, the development of two analytical methodologies that were satisfactory applied to the analysis of carbendazim in fruit samples, are also included.

Once the interactions in solution and the most relevant properties of CB[n]s complex formation were investigated, the study of different strategies for CB[n]s immobilization onto commercial electrode surfaces were dealt with. Chapter 5 shows three different means, employing Nafion and PVC polymers or a dialysis membrane, and the electrochemical response of three different probes with different formal charge, methylviologen, hydroxymethyl ferrocene and ferri/ferrocyanide potassium. The different modifications have been studied employing cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. These studies corroborate the presence of CB[8] on the electrode surface and their ability of molecular selection in relation to the charge of the analytes.

Chapter 6 presents analytical applications of the developed sensors in the determination of biological analytes. Firstly, the electrochemical response of the amino acid tryptophan in a Nafion/CB[8] sensor and the subsequent application in human serum, is presented. Secondly, the study of the viability of the use of these different modified electrodes in a dynamic system is also presented. This study confirms the stability of the modifications in flow systems. In this case, the analyte dopamine was employed for the evaluation of analytical methodologies and the subsequent application in a real sample.

Chapter 7 describes the development of new sensing platforms development with CB[n]s that allow to compensate the sensitivity decrease produced with electrochemical techniques as a consequence of the inclusion complex formation with a macrocyclic receptor. Firstly, it is presented the synthesis and characterization of a new graphene/CB[8] material and its application in the analytical determination of the amino acid tryptophan in two different samples. Next, the gold macroporous electrodes preparation, characterization and their modification with CB[7] through the complex formation between CB[7] and a ferrocene group that is previously adsorbed on the electrode surface, is described. Through this receptor immobilization strategy is thought to be possible the indirect analytical determinations of non electroactives analytes.

Finally, chapter 8 summarises the main conclusions of the whole work carried out during this PhD work.

Capítulo 1 / Chapter 1

Introducción general / General introduction

El desarrollo de sensores químicos es un claro ejemplo de como, desde la química analítica, se da respuesta a una sociedad que exige información química de calidad en un intento de adecuar un diseño instrumental particular para la resolución de un problema analítico concreto. En particular, dentro de la química electroanalítica, el desarrollo de sensores electroquímicos es un área ampliamente estudiada para la determinación de analitos de interés en distintos campos como el medioambiental, el clínico o el agroalimentario.

1.1. Sensores químicos: sensores electroquímicos.

Idealmente, un sensor químico está formado por dos partes bien diferenciadas. Por una parte presenta un elemento de reconocimiento molecular o iónico (receptor) que interacciona selectivamente, o incluso de forma específica, con un determinado componente de la muestra (analito), y por otra, un elemento instrumental (transductor) que traduce la interacción en una señal procesable (figura 1.1) [1]. Ambas partes han de estar conectadas ya que la señal primaria generada en la reacción de reconocimiento (de tipo electroquímico, óptico, térmico o másico) será convertida por el transductor en una señal eléctrica. La conexión entre el elemento receptor y el transductor se realiza mediante procesos de inmovilización.

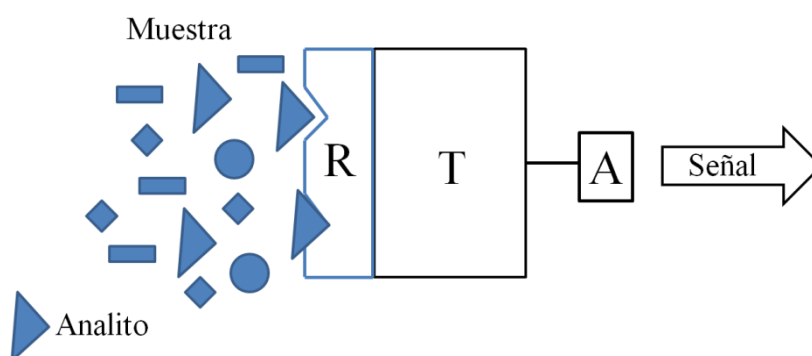


Figura 1.1. Esquema del funcionamiento de un sensor químico. R: receptor, T: transductor y A: señal amplificada, procesada y presentada en forma de dato. Adaptada de [1].

Cuando el receptor está en contacto con un transductor de tipo electroquímico se denomina sensor electroquímico. En concreto, los sensores electroquímicos transforman

el efecto de la interacción electroquímica entre el analito y el electrodo en una señal eléctrica útil. Se agrupan en tres tipos específicos de sensores: sensores potenciométricos, especialmente los electrodos selectivos de iones; los transistores de efecto de campo sensibles a iones y los sensores amperométricos. Las principales ventajas que presentan los sensores electroquímicos son su elevada sensibilidad y su amplio intervalo de respuesta a partir del empleo de una instrumentación de bajo coste. Son dispositivos simples, que no necesitan equipos de medida sofisticados y de fácil miniaturización, lo que permite realizar medidas de pequeños volúmenes de muestra. Por último, otra ventaja que presentan es la disponibilidad de diferentes tipos de transductores, electrodos, lo que permite obtener un gran número de sensores diferentes para una amplia variedad de aplicaciones.

Hasta hace poco más de 40 años, el desarrollo del análisis voltamperométrico estaba limitado por la disponibilidad de materiales electródicos como el electrodo de gotas de mercurio, el electrodo de platino o el de carbono. Aunque estos electrodos permitían realizar determinaciones con elevada sensibilidad, la selectividad que proporcionaban era escasa, siendo necesario procesos de preparación de muestra para la eliminación de los interferentes. Como alternativa, se comenzó a realizar la modificación de las superficies electródicas con materiales apropiados, con el fin de controlar sus características electroquímicas y obtener la respuesta analítica deseada, ya sea por ejemplo, la aceleración de las reacciones redox que son lentas e incluso imposibles con un electrodo sin modificar, o la acumulación o permeación selectiva, si no específica, de los analitos. En definitiva, una elección adecuada del material modificador puede producir una mejora en la sensibilidad y selectividad de los dispositivos, además de mejorar su estabilidad. La gama de especies modificadoras utilizadas es muy amplia, variando desde depósitos metálicos o capas de óxidos metálicos hasta el uso de materiales orgánicos, enzimas o polímeros.

La capa modificadora debe permitir la comunicación electroquímica entre el material del electrodo y la disolución que contiene el analito, lo que se suele asegurar con la presencia de especies electroactivas en la capa o con el uso de polímeros conductores.

A la hora de llevar a cabo el desarrollo de estos electrodos hay que tener en cuenta ciertas consideraciones como puede ser que el electrodo modificado resultante presente

capacidad de adaptarse a variaciones sintéticas, la estabilidad del recubrimiento generado, la capacidad del centro redox para ser sometido a ciclos repetidos y la reproducibilidad de la modificación [2].

A continuación se presentan, brevemente, los métodos más importantes utilizados para la preparación de electrodos químicamente modificados [2].

- Fijación covalente.

Se emplean determinados grupos del reactivo modificador para unir una o varias monocapas de un modificador químico sobre el electrodo. El enlace covalente se puede establecer de forma directa sobre la superficie del electrodo o generando, previamente, los grupos funcionales en el mismo.

La primera estrategia utilizada para modificar electrodos fue la formación de grupos hidroxilo u óxidos superficiales que reaccionan con trialcóxido o tricloro silanos para formar de uno a tres enlaces con el material electródico subyacente. Estos procedimientos se han realizado en un amplio intervalo de materiales como carbón vítreo, platino, oro, óxidos metálicos o semiconductores [3]. Otros enfoques son la generación de grupos carboxilo en la superficie de electrodos de carbono [4], vía grupos óxido superficiales formados por técnicas de oxidación o utilizando óxidos de metales como SnO_2 , TiO_2 , RuO_2 que ya los presentan [5], o por enlace directo a la superficie electródica mediante exposición del material subyacente de carbono o platino empleando bien, abrasión metálica o bien, pirólisis en vacío [6].

- Adsorción.

Ésta se consigue mediante interacciones físicas (fisisorción) o químicas (quimisorción). Existen diferentes estrategias para conseguir la modificación de los electrodos por adsorción, entre ellas, mediante la aplicación de un potencial, por inmersión en disolución de modificador o simplemente depositando el modificador disuelto en la superficie del electrodo y dejando evaporar el disolvente.

La modificación de electrodos por fisisorción presenta problemas de estabilidad, mientras que la unión en el proceso de quimisorción es más estable ya que permite obtener superficies modificadas altamente ordenadas y compactas. Esta modificación

provoca recubrimientos que pueden conducir a la formación de una monocapa compacta como es el caso de las monocapas autoensambladas de tioles sobre oro.

- Recubrimientos poliméricos.

El desarrollo de técnicas que posibiliten el recubrimiento reproducible de un sustrato electródico con un polímero que tengan unas propiedades químicas y/o electroquímicas predeterminadas, se ha convertido en una herramienta fundamental para el diseño de sensores químicos. Así, se ha demostrado que el empleo de recubrimientos poliméricos para producir superficies modificadas, conlleva varias ventajas importantes desde el punto de vista del análisis: su simplicidad de preparación, estabilidad química y física, una mayor densidad de centros activos y un aumento significativo de la sensibilidad fruto de una zona de reacción tridimensional. Se trata de un proceso que consiste en recubrir la superficie del electrodo mediante películas poliméricas. La película de polímeros puede ser orgánica, organometálica o inorgánica. Sobre la superficie polimérica pueden llevarse a cabo una amplia gama de procesos químicos, incluyendo intercambio iónico, formación de complejos, precipitación e incluso reacciones enzimáticas. Además, la cantidad de grupos funcionales presentes sobre la superficie polimérica, son una base excelente para una derivatización química posterior.

Los polímeros más comúnmente empleados para la modificación de electrodos son los polímeros redox, ionómeros cargados y polímeros conductores electrónicamente, pudiendo utilizarse como métodos de modificación, la adsorción de polímeros previamente formados y la electropolimerización.

- Electrodo compósito.

Se trata de un material que consiste de, al menos, una fase conductora en conjunción con, al menos, una fase aislante. Resulta una ventaja para su empleo en electroanálisis, el que normalmente presentan una alta relación señal/ruido, lo que permite obtener bajos límites de detección.

La primera clasificación de este tipo de electrodos modificados está basada en si la disposición del conductor y del aislante está altamente ordenada (un array) o es aleatoria (un conjunto). Estos últimos pueden clasificarse según se encuentren las partículas de conductor distribuidas en el aislante: compósitos dispersos y compósitos consolidados.

Los compósitos dispersos pueden fabricarse introduciendo el modificador en una dispersión homogénea de partículas de grafito en matrices líquidas de tipo parafinas, aceites minerales o siliconas, mientras que los compósitos consolidados utilizan matrices sólidas de tipo epoxi, teflón o ceras.

Este método presenta varias ventajas como su bajo coste y facilidad de preparación dando lugar a películas rígidas que ofrecen una rápida respuesta. Los electrodos así preparados poseen una superficie renovable por pulido y, sobre todo, permiten su modificación casi con cualquier tipo de compuesto útil para el diseño de sensores: desde mediadores redox [7], reactivos complejantes [8], cambiadores iónicos [9], materiales biológicos [10] o nanomateriales [11]. Svancara y col. presentaron, en 2009, una extensa revisión sobre electrodos de pasta de carbono y sus aplicaciones en electroanálisis [12].

De entre las numerosas posibilidades de modificadores a utilizar, el empleo de receptores macrocíclicos en el desarrollo de métodos analíticos, abre interesantes posibilidades en el desarrollo de sensores gracias a las propiedades de reconocimiento molecular que presentan. El mecanismo de reconocimiento molecular basado en interacciones supramoleculares conduce, en la mayoría de las ocasiones, a la formación de complejos de inclusión pudiendo entonces actuar como selectores moleculares y aportar un aumento de selectividad en la determinación analítica.

1.2. Química supramolecular.

La química supramolecular se presenta como una rama de la química que nace en los años 60. Se define como “La química más allá de la molécula” o, de forma más completa, como el estudio de sistemas que involucran la unión de moléculas o iones mediante interacciones no covalentes, tales como interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno o interacciones por formación de dipolos [13]. Los comienzos de este campo de trabajo se basaron en los enlaces selectivos entre distintos cationes con compuestos macrocíclicos y macropolicíclicos tanto naturales [14-16], como sintéticos: éteres corona [17-19] y criptandos [20]. Este comportamiento con los cationes, puso de manifiesto la capacidad de estos compuestos para el reconocimiento molecular como un

nuevo dominio de la química que se ha expandido a muchas otras áreas del conocimiento como la biología. La química del reconocimiento molecular, es conocida habitualmente como “host-guest chemistry” o de interacción anfitrión-huésped. El término “química supramolecular” fue introducido en 1978 por Jean-Marie Lehn, al definir por un lado, el campo de la química molecular como la basada en la formación de enlaces covalentes y, por otro, el campo de la química supramolecular como el ensamblaje de las moléculas y de las interacciones moleculares. Este autor, junto con Donald J. Cram y Charles J. Pedersen, recibieron el premio Nobel de Química en el año 1987 por sus estudios en el desarrollo del reconocimiento molecular.

La química supramolecular se puede dividir en dos grandes categorías parcialmente solapadas: reconocimiento molecular y ensamblaje molecular. Las diferencias entre ambas categorías se establecen, básicamente, por el tamaño y la forma de las moléculas que interaccionan. Así, por ejemplo, si una molécula es mucho más grande y puede “envolver” a la otra, actuará como anfitrión e incluirá al huésped como resultado de interacciones intermoleculares no covalentes. Por el contrario, el ensamblaje molecular resulta de la asociación espontánea de un número no definido de componentes que tienen una organización microscópica definida y unas características macroscópicas que dependen de su naturaleza. Algunos ejemplos de estos sistemas son las monocapas autoensambladas, las micelas, las membranas bicapa o los cristales líquidos [21-23].

1.2.1. Interacciones intermoleculares.

Las unidades constituyentes de una interacción supramolecular, se mantienen unidas reversiblemente por fuerzas intermoleculares no covalentes bajo control termodinámico. Además, estas interacciones no son sólo el fundamento principal de los complejos supramoleculares, sino que son la base del reconocimiento, reacción, transporte y regulación altamente selectiva, de procesos biológicos como son la unión de un sustrato a una proteína receptora, las reacciones enzimáticas, asociaciones inmunológicas, transcripción y traducción del código genético, etc. [24-33]. Por esta razón, es muy interesante el estudio de los diferentes tipos de estas interacciones con el fin de comprender, interpretar y predecir multitud de procesos en campos desde la biología hasta el análisis químico, sin olvidar la ciencia de los materiales.

Algunas de estas interacciones no covalentes como son los puentes de hidrógeno o las interacciones entre iones, son bien conocidas. Por el contrario, otras están menos definidas como es el caso de las interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, fuerzas de dispersión de London, apilamiento π - π , transferencia de carga y efectos hidrofóbicos o solvofóbicos, en general.

Las interacciones no covalentes presentan valores de energía entre 2 y 300 kJ/mol siendo, generalmente, más débiles que las de un enlace covalente (150 – 450 kJ/mol). Sin embargo, la combinación de distintas interacciones intermoleculares puede formar un complejo supramolecular con gran estabilidad.

La tabla 1.1 muestra los diferentes intervalos de energía para cada una de las interacciones no covalentes mencionadas.

Interacción	Fuerza de enlace (kJ/mol)
Ión - ión	200 - 300
Ión - dipolo	50 - 200
Dipolo - dipolo	5 - 50
Enlace de hidrógeno	4 - 120
Catión - π	5 - 80
π - π	0 – 50
Van der Waals	< 5

Tabla 1.1. Energías para cada una de las interacciones supramoleculares [13].

A continuación se presenta una pequeña descriptiva de las interacciones moleculares que están involucradas en la formación de complejos supramoleculares [13]:

1.2.1.1. Interacciones entre iones o dipolos.

Estas interacciones se dividen en tres grupos diferentes: interacciones ión-ión, interacciones ión-dipolo e interacciones dipolo-dipolo (figura 1.2).

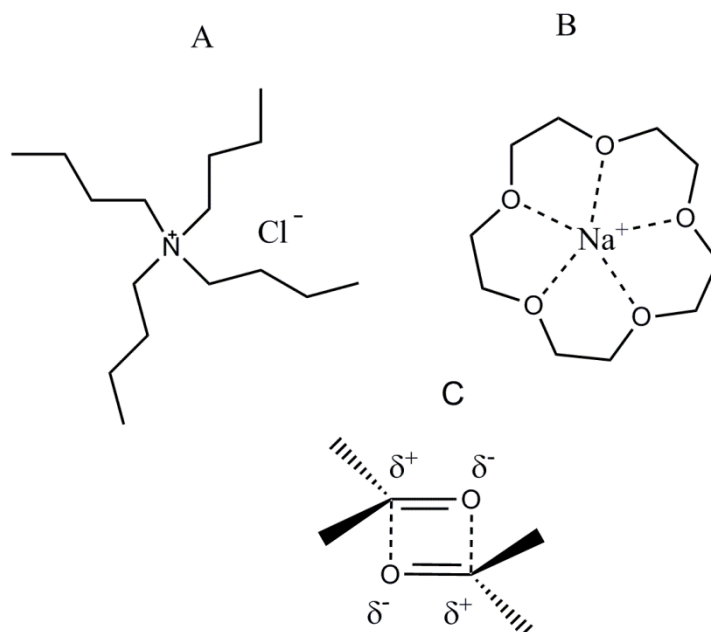


Figura 1.2. Ejemplos de interacciones entre iones o dipolos. A) Interacción ión-ión: cloruro de tetrabutilamonio, B) interacción ión-dipolo: complejo formado entre 15-corona-5 y sodio, C) interacción dipolo-dipolo entre moléculas de acetona.

Todas ellas están basadas en la atracción electrostática entre cargas opuestas o entre una carga y un dipolo. La interacción ión-ión es la más fuerte de todas. Presenta una energía de enlace comparable con el enlace covalente y se puede dar en cualquier dirección, lo que le permite estabilizar un mayor número de pares moleculares. Por el contrario, las interacciones ión-dipolo y dipolo-dipolo son interacciones direccionales y la fortaleza de la interacción depende de las especies involucradas. Además, la interacción ión-dipolo es más fuerte que la interacción dipolo-dipolo ya que el ión tiene una mayor densidad de carga frente al dipolo. La rigidez que presentan las interacciones direccionales hace que sólo las moléculas complementarias entre sí puedan agregarse.

Las interacciones electrostáticas juegan un papel importante para comprender los factores que tienen influencia en los enlaces de gran afinidad, especialmente en sistemas biológicos, los cuales presentan un gran número de procesos de reconocimiento que involucran interacciones entre moléculas cargadas, como por ejemplo en las interacciones enzima-sustrato.

1.2.1.2. Enlace de hidrógeno.

El enlace de hidrógeno es una interacción no covalente muy importante debido a su fortaleza de enlace y a que presenta un alto grado de direccionalidad. Representa un tipo especial de la interacción dipolo-dipolo entre un donador (D) y un aceptor de protones (A). El grupo donador de protones presenta un átomo de hidrógeno enlazado covalentemente a un átomo muy electronegativo, como nitrógeno u oxígeno, provocando la formación de un dipolo y dejando una pequeña carga positiva sobre el átomo de hidrógeno. El grupo aceptor de protones es un dipolo formado por un átomo electronegativo que atrae electrones, como por ejemplo un grupo carbonilo, y que puede interaccionar con la carga positiva del hidrógeno del grupo dador. Aumentando el momento dipolar del grupo dador se produce un incremento en la fuerza del enlace. En la figura 1.3 se puede ver un esquema y un ejemplo de la interacción por enlace de hidrógeno.

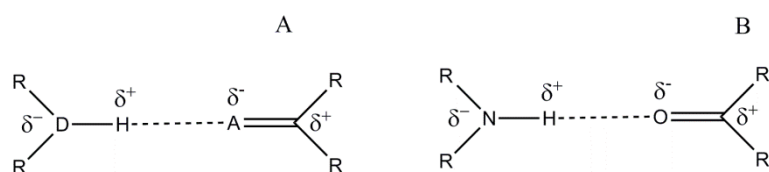


Figura 1.3. Representación de un esquema A) y un ejemplo real B) de la interacción por enlace de hidrógeno.

La fortaleza de la interacción dependerá del tipo de átomo electronegativo que se encuentra enlazado al átomo de hidrógeno y de la geometría que adopta el enlace de hidrógeno en la estructura. Se puede distinguir entre enlaces de hidrógeno fuertes, con energías de entre 60 y 120 kJ/mol y distancias heteroatómicas entre 2.2 y 2.5 Å, enlaces de hidrógeno moderados (15 - 60 kJ/mol y 2.5 - 3.2 Å) y enlaces de hidrógeno débiles, con energías de enlace por debajo de los 15 kJ/mol y distancias entre donador y aceptor por encima de los 4 Å. Esta clasificación corresponde al hecho de que los enlaces de hidrógeno fuertes tienen una contribución covalente mayor, mientras que los moderados y débiles son, principalmente, de carácter electrostático. La geometría del enlace también va a definir la fortaleza del mismo, produciéndose enlaces fuertes para ángulos entre 175 y 180°, de forma que presentan un excelente control espacial. Los enlaces moderados se formarán con ángulos entre 130 y 180° y los débiles entre 90 y 150°, siendo éstos los más flexibles.

Esta interacción presenta una gran importancia en la naturaleza. Gracias a ella se mantiene la estructura de doble hélice del ADN, dirige el plegamiento de las proteínas y la selectividad de las enzimas.

1.2.1.3. Interacciones “ π ”.

Hay dos tipos de interacciones “ π ” que se pueden encontrar en la química supramolecular: interacciones “catión - π ” e interacciones “ $\pi - \pi$ ”.

La interacción “catión - π ” es el enlace que se produce entre una olefina y un metal de transición. Se trata de una interacción bien conocida en la química organometálica dando lugar a compuestos como el ferroceno. Aunque la interacción en el ferroceno entre el átomo de hierro y la olefina está considerada covalente, si el metal involucrado perteneciera al grupo de los alcalinos o alcalinotérreos, las energías de enlace tendrían unos valores de entre 5 y 80 kJ/mol, siendo menores que las energías correspondientes a interacciones covalentes.

La interacción “ $\pi - \pi$ ” ocurre entre anillos aromáticos. Surge de la atracción entre la carga negativa deslocalizada de un anillo aromático y una densidad de carga positiva localizada en otro anillo. La figura 1.4 muestra dos ejemplos de interacción.

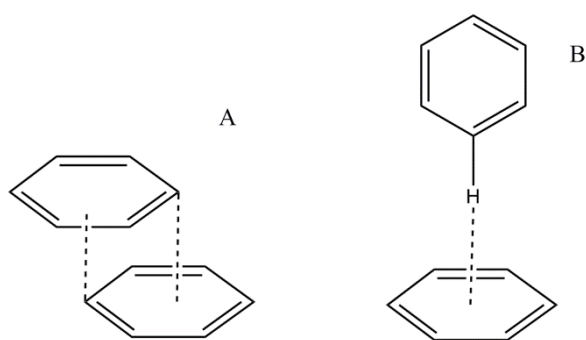


Figura 1.4. Tipos de interacciones $\pi - \pi$. A) Interacción paralela o “face-to-face” y B) interacción perpendicular “edge-to-face”.

La interacción se puede establecer entre anillos aromáticos en paralelo que se encuentren a una distancia aproximada de 3.5 Å, llevándose a cabo la interacción entre el centro de un anillo y un extremo del otro (figura 4A). Por otro lado, también se

produce esta interacción entre un átomo de hidrógeno de un anillo aromático que se encuentra en posición perpendicular con el centro de otro anillo aromático (figura 4B).

Este tipo de interacciones se producen en la estructura de grafito, donde las láminas del material se encuentran unidas por una interacción débil en dirección paralela, siendo por lo tanto fácil de exfoliar. Además, también se pueden encontrar en la naturaleza en el apilamiento de las bases nitrogenadas en la doble hélice de ADN.

1.2.1.4. Interacciones de transferencia de carga

Este tipo de interacción es un tema de controversia dentro de la comunidad científica al ser una de las interacciones más fáciles de detectar pero donde su contribución energética sigue siendo estudiada y debatida. Derivan de la suma de factores electrostáticos, dipolos inducidos y contribuciones dispersivas implicando, además, grupos funcionales. El modelo de transferencia de carga fue inducido por Mulliken [34-36] como resultado de la interacción resultante entre una molécula rica en electrones (dador) y otra deficiente en electrones, que atrae con gran fuerza (aceptor), por lo que también se conocen como complejos dador-aceptor de electrones. De esta forma, se producirá la interacción entre una molécula aromática con un sustituyente dador, que produce un aumento en la densidad electrónica asociada al anillo y una molécula con un sustituyente aceptor de electrones, que producirá, sobre el anillo aromático, el efecto contrario al anterior.

1.2.1.5. Interacciones de Van der Waals y dispersión de London.

Estas interacciones derivan de la interacción de una nube electrónica polarizada por núcleos adyacentes. Se basan en una superposición de interacciones de dispersión atractiva y repulsiva. Las fuerzas de dispersión de London resultan de la atracción entre dipolos fluctuantes transitorios que también tienen lugar en los enlaces no polares. Estas interacciones intermoleculares tienen un valor similar en agua y en disolventes orgánicos.

Las interacciones de Van der Waals son importantes en la formación de complejos de inclusión ya que los huéspedes de cavidades semiesféricas sufren fuerzas dispersivas

de unión 4 veces superiores a las de una superficie plana, aumentando este factor a 6, para superficies cilíndricas, y a 8 para superficies esféricas.

1.2.1.6. Efecto solvofóbico.

Por último, el efecto solvofóbico surge del desplazamiento de las moléculas de disolvente que se encuentran en el interior de la cavidad de un hospedador al formarse el complejo de inclusión con el huésped. Este efecto recibe el nombre de hidrofóbico cuando se trabaja en medio acuoso y puede ser dividido en dos componentes energéticos: efecto hidrofóbico entálpico y efecto hidrofóbico entrópico.

El efecto hidrofóbico entálpico ocurre cuando el huésped reemplaza las moléculas de agua que se encuentran dentro de la cavidad. Este proceso se produce de inmediato en sistemas en los que el agua no interacciona fuertemente con la cavidad hidrofóbica del hospedador siendo, por lo tanto, la energía del sistema alta. Una vez que las moléculas de agua son reemplazadas por el huésped, la energía disminuye por la interacción que se produce entre las moléculas de agua desplazadas y las que se encuentran fuera de la cavidad. Hay una componente entrópica en este sistema debido a que las moléculas de agua que se encontraban previamente ordenadas en el interior de la cavidad, dejan de estarlo al salir de la misma. Un aumento de la entropía hace que el proceso de formación del complejo de inclusión sea favorable.

Por otro lado, el efecto hidrofóbico entrópico aparece con el hecho de que dos moléculas (normalmente orgánicas) en la disolución, como por ejemplo anfitrión y huésped, crean dos huecos en la estructura del medio acuoso. La interacción entre anfitrión y huésped para formar el complejo resulta una disminución en el número de huecos lo que se traduce en una menor ruptura de la estructura del medio. Este hecho hace que la entropía aumente y por lo tanto que la energía libre del sistema disminuya. La figura 1.5 presenta un esquema del proceso.

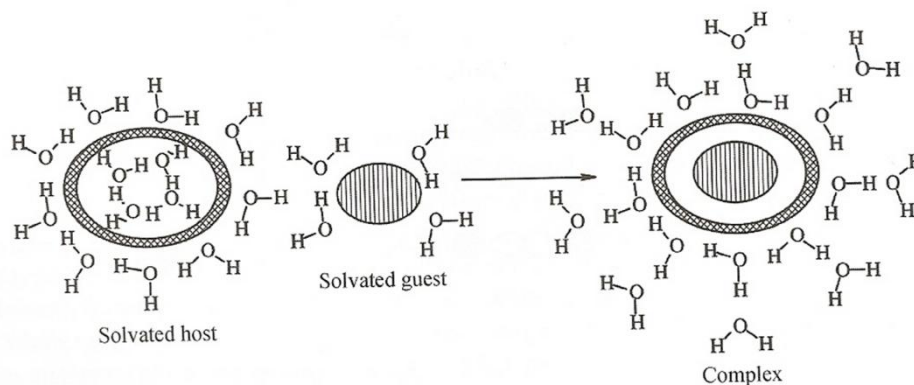


Figura 1.5. Efecto hidrofóbico entrópico entre anfitrión y huésped en agua [37].

1.2.2. Reconocimiento molecular.

Se puede definir el reconocimiento molecular como un proceso que incluye tanto la unión como la selección de sustratos por una molécula receptora para realizar una función específica [13, 38]. Se produce una unión selectiva como combinación del ajuste estérico entre el huésped y la cavidad del hospedador y una distribución espacial apropiada de los sitios de unión entre ambas moléculas, maximizando las interacciones atractivas y minimizando las repulsivas.

La alta selección por parte de un receptor, consiste en una gran diferencia en la energía del sistema fruto de la formación del complejo con una molécula frente a otras presentes. Sin embargo, hay que tener en consideración otro factor muy importante como es la complementariedad. Para que se establezca un fuerte reconocimiento molecular es necesaria una complementariedad estérica, es decir, en relación al tamaño y forma del huésped respecto al hospedador. Esto se traduce en la presencia de un mayor número de sitios de enlace con disposición correcta, para conseguir la complementariedad en la distribución tanto electrónica como nuclear. Como ejemplo, una buena distribución de las cargas electrostáticas, la adecuada disposición de los dipolos involucrados o la posición del donador y aceptor en la formación de un enlace de hidrógeno, producirán energías de enlace mayores. Además, aunque una alta estabilidad no siempre implica una alta selectividad, normalmente una viene acompañada de la otra. En definitiva, para lograr un reconocimiento molecular eficaz, alta estabilidad y selectividad, se requiere una interacción entre hospedador y huésped fuerte.

Además de la complementariedad molecular, una organización previa del hospedador provocará un mejor reconocimiento puesto que, cuanto más organizados para la unión se encuentren el anfitrión y el huésped, se requieren menos cambios conformacionales para la formación del enlace y más estable será el complejo. Como ejemplo, en sistemas hospedadores que forman una estructura cíclica, para llevar a cabo la formación del complejo con el huésped no han de producirse necesariamente cambios en su estructura que resulten energéticamente desfavorables. Esta ventaja la presentan estructuras macrocíclicas como las ciclodextrinas, los calixarenos y los éteres corona, entre otros ejemplos.

En definitiva, la química supramolecular es un campo multidisciplinar que cubre los aspectos químicos, físicos y biológicos de agrupaciones químicas con mayor complejidad que las propias moléculas y que se mantienen unidas y organizadas mediante fuerzas intermoleculares no covalentes. Los estudios tienen lugar desde áreas como la química orgánica y la inorgánica, para la síntesis de los precursores de las supermoléculas, como en áreas como la química física para el estudio de las interacciones de sistemas supramoleculares o la química computacional, involucrada en comprender el comportamiento del complejo formado. También desde la bioquímica en relación a procesos biológicos que empiezan con el reconocimiento y unión de diferentes sustratos como las enzimas o la asociación entre antígeno y anticuerpo, hasta incluso en ciencia de materiales para el estudio de propiedades de las estructuras sintetizadas así como el desarrollo de sistemas nanotecnológicos. Pero además, dentro de la química analítica se encuentra una de las importantes aplicaciones de estos sistemas supramoleculares como es el desarrollo de metodologías analíticas basadas en el reconocimiento molecular que presentan este tipo de sistemas.

En este sentido, uno de los receptores macrocíclicos más utilizados en el desarrollo de metodologías analíticas han sido las ciclodextrinas (CDs) debido a las propiedades que presentan y su solubilidad en medio acuoso.

Las CDs son compuestos macrocíclicos productos de la degradación enzimática del almidón. Están formados por 6, 7 u 8 unidades de glucopiranosas dando lugar a las α -, β - o γ - ciclodextrinas, respectivamente (figura 1.6). Presentan una estructura toroidal con los grupos hidroxilos primarios de las unidades de glucosa orientados hacia el exterior en su portal más estrecho. La presencia de los grupos hidroxilo externos hace que sean

compuestos solubles en agua. Sin embargo, su cavidad interna es apolar lo que las convierte en unos buenos receptores moleculares capaces de incluir moléculas en su interior formando complejos de inclusión mediante interacciones anfitrión - huésped. De los tres tipos de CDs posibles, el tamaño de la β -CD resulta el más apropiado para albergar una gran variedad de sustancias, lo que hace que sea la más ampliamente utilizada y estudiada [39].

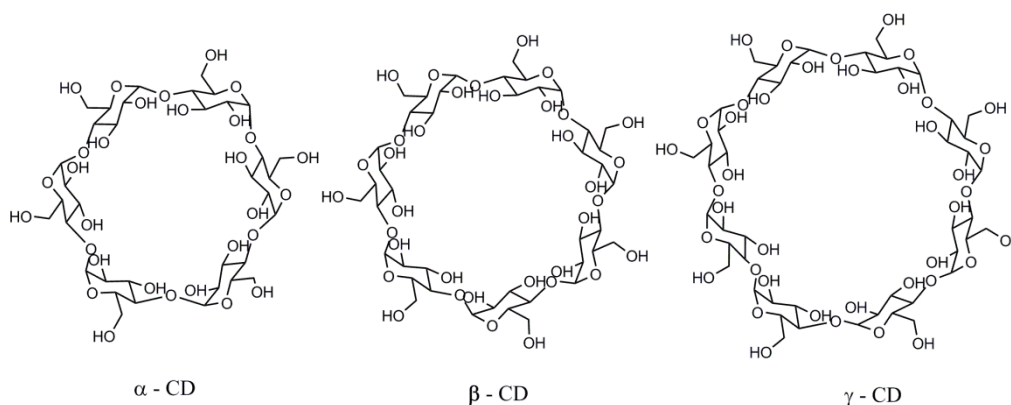


Figura 1.6. Estructura de la α -, β -, γ -CD.

Además de su capacidad para formar complejos de inclusión con una gran variedad de compuestos, tanto no polares como poco polares, las CDs son compuestos quirales que han demostrado su capacidad para actuar como selectores enantioméricos, siendo numerosos los trabajos de investigación y aplicación de las mismas para este fin que se pueden encontrar en la bibliografía [40-42].

Estos compuestos macrocíclicos presentan una gran cantidad de aplicaciones desde disciplinas como la tecnología de los alimentos, para la eliminación de malos olores o sabor de algunos aditivos, hasta la farmacología [43-45].

La aplicación de estos compuestos en el desarrollo de métodos analíticos se ha llevado a cabo tanto en disolución, como en el desarrollo de sensores mediante la modificación de superficies electrónicas. Algunas de las estrategias seguidas por los autores de estos estudios, se basan en la inmovilización de las CDs mediante el uso de polímeros como el Nafion, o mediante su combinación con materiales como los nanotubos de carbono, nanopartículas de plata o grafeno [46-50]. Además, la sustitución de los grupos hidroxilo primarios de estos receptores por grupos azufre y, aprovechando

la gran afinidad S-Au, es posible la fácil adsorción de estas CDs tioladas sobre superficies metálicas con el objetivo de desarrollar sensores químicos basados en monocapas autoensambladas [51-54].

Las importantes ventajas, en cuanto a selectividad se refiere, que se pueden obtener con el desarrollo de metodologías analíticas que involucren las propiedades de reconocimiento molecular, hacen que el empleo de compuestos macrocíclicos pueda resultar muy beneficioso para este fin. Por esa razón, y dado que en los últimos años una nueva familia de receptores macromoleculares, los cucurbit[n]uriles (CB[n]s), está siendo ampliamente estudiada debido las interesantes propiedades que presentan [55, 56], se planteó el empleo de estos receptores para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que incorporen la capacidad de selección molecular de estos hospedadores.

1.3. Cucurbit[n]uriles.

Los cucurbit[n]uriles (CB[n]s), son una familia de compuestos macrocíclicos constituidos por diferentes unidades de glicoluril ($n = 5 - 8, 10$) unidas por grupos metileno, cuya síntesis fue descrita por Behrend y col. a principios del siglo pasado [57]. Esta síntesis está basada en la reacción de condensación del glicoluril con ácido fórmico en medio ácido sulfúrico como se muestra en la figura 1.7.

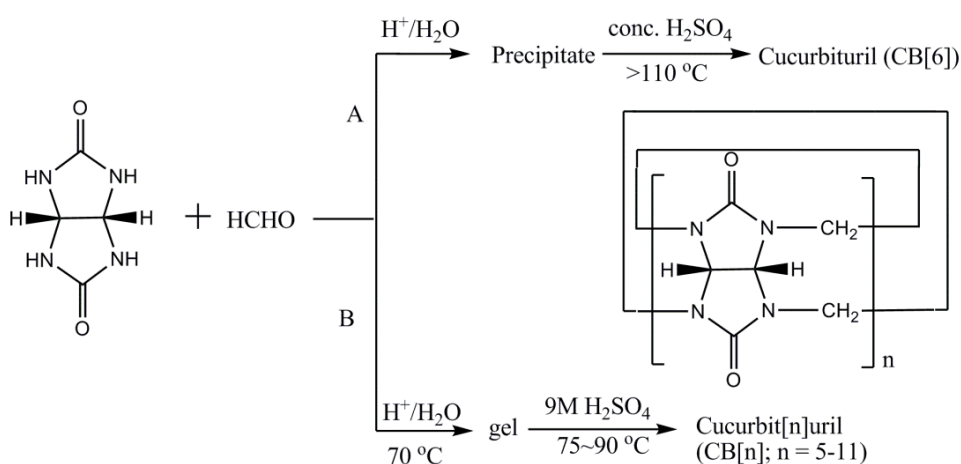


Figura 1.7. Esquema de síntesis de los CB[n]s. Adaptada de [59].

Behrend y col. obtuvieron como producto mayoritario el homólogo de 6 unidades, CB[6], sin embargo, su estructura y naturaleza química no fue descrita hasta casi 80 años después por Freeman y col. [58], mediante el uso de distintas técnicas espectroscópicas. Estos autores comprobaron que se trataba del CB[6] y le dieron el nombre de cucurbituril debido, por una parte, a que su estructura se asemeja a la de una calabaza (familia de las cucurbitáceas) y por otra, a la unidad monomérica que lo constituye, el glicoluril.

En el año 2000, Kim y col. [60] cambiaron las condiciones iniciales de reacción y obtuvieron mezclas de compuestos con distinto número de unidades de glicoluril, consiguiendo aislar hasta tres homólogos nuevos de CB[n]: CB[5], CB[7] y CB[8]. Un año más tarde, Day y col. [61], fijando las condiciones de reacción que se presentan en la rama B del esquema de la figura 1.7, detectaron mediante resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) señales correspondientes al homólogo de nueve unidades, CB[9], aunque este homólogo no ha sido aislado debido a su inestabilidad térmica. Mediante ^{13}C -RMN fue posible también la detección de homólogos de hasta 16 unidades de glicoluril. Años después, en 2005, estos mismos autores obtuvieron señales que correspondían al CB[10], consiguiendo cristalizarlo con un CB[5] en el interior de su cavidad (CB[10]-CB[5]). Finalmente, el homólogo CB[10] fue aislado de forma independiente ese mismo año por Liu y col. [62].

Los CB[n]s presentan una estructura simétrica con una cavidad hidrófoba accesible desde el exterior a través de dos entradas, habitualmente llamadas portales, constituidas por grupos carbonilo (figura 1.8) [63].

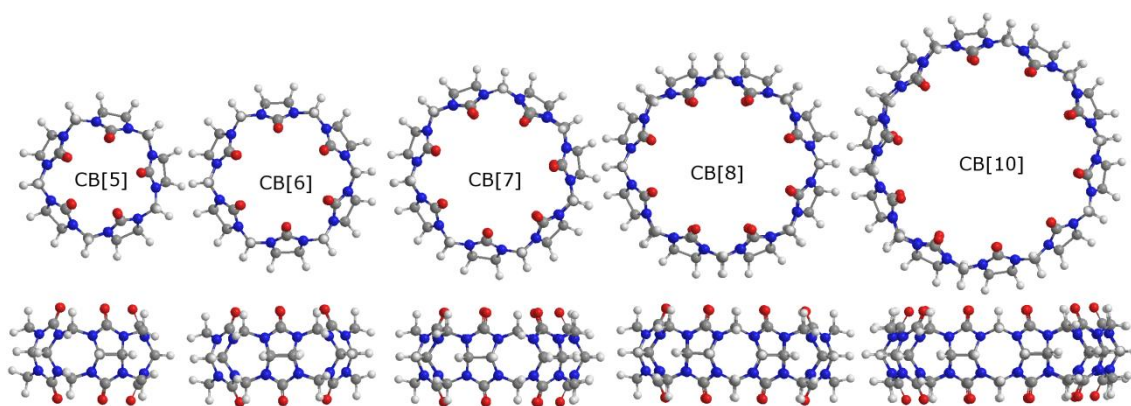


Figura 1.8. Visión frontal y lateral de las estructuras de los CB[n]s.

Gracias a su estructura pueden actuar como anfitriones de diferentes tipos de compuestos no polares o relativamente polares. Además de sus propiedades como hospedadores, la densidad de carga negativa localizada en los grupos carbonilo de los portales, les permite estabilizar los complejos de inclusión formados con huéspedes cargados positivamente mediante interacciones ión-dipolo y/o enlaces de hidrógeno [64, 65]. Por otra parte, esta densidad de carga negativa también permite la interacción con metales, iones positivos o la formación de aductos [66-69]. Además, debido a que la estructura es relativamente rígida, presentan una alta selectividad en la formación de complejos de inclusión determinada por el tamaño de la molécula huésped [70-72].

Las principales diferencias entre los homólogos de CB[n] son el tamaño y la solubilidad. La mayoría de ellos son prácticamente insolubles en disolventes orgánicos y poco solubles en agua. Por esta razón, se necesitaron casi 80 años para conocer la estructura del CB[6] y casi 100 años, respecto a la síntesis del primer homólogo realizada en 1905, para la obtención del resto de CB[n]s.

La tabla 1.2 muestra los valores de la solubilidad en agua y dimensiones de cada uno de los homólogos de CB[n]s. También se muestran los correspondientes a las CDs a efectos de comparación. Se observa que el CB[6] y el CB[8] son prácticamente insolubles, mientras que el CB[5] y el CB[7] resultan moderadamente solubles, si bien, en general todos son bastante menos solubles que las CDs. La solubilidad de todos los CB[n]s aumenta notablemente en disoluciones ácidas y en presencia de altas concentraciones de metales alcalinos [73, 74].

	Mm	Diámetro de portales (Å)	Altura (Å)	Volumen de cavidad (Å³)	Solubilidad en agua (mM)	Estabilidad térmica (°C)
CB[5]	830	2.4	9.1	82	20-30	>420
CB[6]	996	3.9	9.1	164	0.018	425
CB[7]	1163	5.4	9.1	279	20-30	370
CB[8]	1329	6.9	9.1	479	< 0.01	>420
CB[10]	1661	9.0-11.0	9.1	870	-	-
α-CD	972	4.7-5.2	7.9	174	149	297
β-CD	1135	6.0-6.4	7.9	262	16	314
γ-CD	1297	7.5-8.3	7.9	427	178	293

Tabla 1.2. Dimensiones y propiedades de CB[n]s y CDs [63].

Las claras similitudes de tamaño entre los CB[n]s y las CDs, especialmente entre CB[6-8] y las α -, β -, γ - CDs, hace que la comparación entre ambas familias de receptores macrocíclicos sea frecuente. No obstante, dicha similitud no se debe extrapolar a las propiedades enlazantes de cada una de las familias. Las CDs son compuestos naturales con propiedades quirales, sin embargo, los CB[n]s son compuestos aquirales producto de la síntesis previamente descrita. Además, estos últimos presentan una simetría ecuatorial plana donde ambas aberturas o portales de la cavidad son idénticas, mientras que las CDs presentan una estructura de cono truncado con diferente tamaño de abertura, con grupos hidroxilo primarios en el lado más estrecho y los secundarios alrededor del mayor [75]. Por último, hay que señalar que la mayor variedad de tamaños posibles en la familia de los CB[n]s, les confiere mayor capacidad para actuar como selectores de moléculas en relación a este aspecto.

Como se ha indicado anteriormente, igual que las CDs, los CB[n]s presentan una cavidad interior hidrófoba convirtiéndolos así, en potenciales receptores de moléculas no polares o relativamente polares. No obstante, se diferencian de las CDs en que los CB[n]s presentan una alta densidad de carga negativa en ambos portales debido a los grupos carbonilo. Esta diferencia estructural entre las CDs y los CB[n]s explica sus diferentes propiedades para incluir huéspedes en su estructura. Así, las características principales en la formación y estabilización de los complejos de inclusión con CDs son

las interacciones de carácter hidrófobo y el tamaño del huésped, sin que los grupos hidroxilo que presentan en los portales impidan o provoquen interacciones fuertes con los compuestos incluidos en la cavidad. Sin embargo, la formación de complejos con la familia de los CB[n]s dependerá del tamaño y de dos tipos de fuerzas no covalentes distintas: interacciones hidrofóbicas entre el huésped y la superficie interna de la cavidad del receptor y/o interacciones de tipo electrostático entre las moléculas o cargas positivas de los huéspedes y los oxígenos de los grupos carbonilo de los portales de los CB[n]s. De esta forma, también pueden dar lugar a reacciones de formación de complejos con cationes orgánicos e inorgánicos que no se encuentren incluidos en la cavidad. Este hecho explica el que únicamente los CB[n]s puedan estabilizar sus complejos de inclusión mediante interacciones no covalentes. Como consecuencia, las constantes de formación de los complejos de inclusión con los CB[n]s suelen ser mayores que con las CDs [76-78] demostrándose con ello y a diferencia de éstas, una preferencia de los CB[n]s por moléculas cargadas positivamente [79, 80].

En términos de constantes de formación, los complejos de inclusión formados con CDs presentan valores de entre 10^3 - 10^5 M^{-1} , con pocos ejemplos que excedan estos valores. Sin embargo, la estabilización de los complejos de inclusión por parte de los CB[n]s, hace que puedan presentar valores de constantes tan altas como 10^{15} M^{-1} , valor equivalente a la interacción anfitrión-huésped para el par avidina-biotina [65, 80].

Esta diferencia estructural entre CB[n]s y CDs también explica que la concentración de sales influya significativamente en la formación de complejos con CB[n]s por el efecto competidor que, por los portales cargados, presentan los contraiones de la disolución [77]. Así son muchos los estudios centrados en ilustrar tanto la afinidad de los CB[n]s por moléculas cargadas positivamente, como la influencia del pH y la concentración de sales en las disoluciones en estos equilibrios de formación de complejos. Un gran número de estudios publicados demuestran una disminución del valor de la constante de formación cuando aumenta la fuerza iónica en disolución. Este efecto resulta más acusado al estar presentes en la disolución iones divalentes que cuando se trata de monovalentes [81-84].

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento con los CB[n]s, se centran en las propiedades de formación de complejos de esta familia de receptores

con distintos compuestos. Dependiendo del tamaño del homólogo se observa una gran diferencia en los huéspedes elegidos para la interacción.

Con respecto al CB[6], éste comenzó siendo el homólogo más estudiado al tratarse del producto mayoritario de la síntesis inicial y el más fácil de obtener. Diferentes autores han estudiado las propiedades de interacción de este receptor con metales, observando por ejemplo, el cambio en la constante de asociación con el Ba^{2+} al cambiar la acidez del medio, debido a una competencia entre los iones metálicos y la interacción de los protones en disolución [63].

Por otro lado, el estudio de complejos de inclusión de CB[6] con moléculas orgánicas cargadas, se remonta hasta 1988 cuando Mock y col. presentaron la interacción y constantes de formación de CB[6] con un gran número de aminas alifáticas cargadas positivamente en medio ácido [85]. Estos autores demostraron, mediante el cálculo de las constantes de asociación, que el CB[6] presenta una selectividad en función de la longitud de la cadena tanto de aminas como de diaminas alifáticas [86-90]. De sus estudios concluyeron que, en el caso de las aminas alifáticas, el CB[6] presenta una preferencia por la butilamina frente a la propilamina y pentilamina. Por otra parte, para las diaminas alifáticas, la preferencia es por la pentanodiamina y hexanodiamina respecto a butanodiamina y heptanodiamina. Esta preferencia en la formación del complejo en función de la cadena se atribuye a la estabilización de los complejos debida a la interacción de los grupos carbonilo con los grupos amino cargados positivamente. La tabla 1.3 que se muestra a continuación, recoge los valores de las constantes de formación obtenidas en este estudio, como base de las conclusiones expuestas.

Huésped	K_f (M^{-1})
$CH_3(CH_2)_2NH_3^+$	1.2×10^4
$CH_3(CH_2)_3NH_3^+$	1.0×10^5
$CH_3(CH_2)_4NH_3^+$	2.4×10^4
$CH_3(CH_2)_5NH_3^+$	2.3×10^3
$NH_3^+(CH_2)_4NH_3^+$	1.5×10^5
$NH_3^+(CH_2)_5NH_3^+$	2.5×10^6
$NH_3^+(CH_2)_6NH_3^+$	2.8×10^6
$NH_3^+(CH_2)_7NH_3^+$	4.4×10^4

Tabla 1.3. Constante de formación del complejo con CB[6] para cada amina o diamina como huésped [86-89].

La formación de complejos con compuestos orgánicos permitió el estudio de la capacidad de selección que, en base a la relativa rigidez que presenta su estructura, presenta el CB[6] en función del tamaño del huésped. Jansen y col. [72] estudiaron la formación de complejos de CB[6] con derivados alifáticos, cicloalifáticos y aromáticos de diaminas observando como el impedimento estérico de ciertos grupos, impedía la inclusión del huésped. Conclusiones similares se obtienen de los estudios realizados en 2003 por Lee y col. [59]. Estos autores demuestran que el CB[6] forma el complejo de inclusión con la p-metilbenzilamina pero no con los isómeros meta- u orto- del mismo compuesto. También Mock y col. habían obtenido resultados similares anteriormente [86]. Más tarde, Márquez y col. [71] estudiaron el mecanismo de la formación de complejos de diferentes aminas cíclicas con el objeto de encontrar el huésped de mayor tamaño capaz de formar el complejo de inclusión con el CB[6]. Con ello demostraron, de nuevo, la capacidad de selección por parte de este homólogo en función del tamaño del huésped. Estos autores corroboraron, mediante el uso de 1H -RMN y cálculos teóricos, la inclusión de ciclohexilmetilamonio y 2,3-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-eno en la cavidad del CB[6]. También estudiaron la formación del complejo en presencia de iones metálicos explicando así el mecanismo de la inclusión de compuestos, tanto neutros como cargados positivamente.

Las propiedades de formación de complejos que presenta el CB[6] se podrían extrapolar al resto de la familia de los CB[n]s. Sin embargo, la variación de tamaño de

su cavidad y portales, les confiere propiedades significativamente diferentes de las encontradas para el CB[6] [63].

Por su parte, los complejos de inclusión con CB[5] están limitados por el pequeño tamaño de los portales que permiten la entrada a la cavidad. Como consecuencia de este pequeño tamaño, muchas de las interacciones supramoleculares con CB[5] se realizan con huéspedes pequeños, como protones, metales y grupos amonio que se puedan encontrar en disolución [91-93]. La característica más remarcable del CB[5] es su capacidad para formar complejos de inclusión con gases como N₂, O₂, N₂O, NO, CO, CO₂ o CH₄ y gases nobles como Kr, Ar y Xe, así como con disolventes como CH₃OH y CH₃CN [94-96].

El mayor tamaño de la cavidad del CB[7] y su alta solubilidad en agua respecto al resto de los homólogos, le convierte en el homólogo más utilizado para el estudio de las interacciones de estos receptores con una gran variedad de compuestos orgánicos y metálicos, normalmente cargados positivamente. En la figura 1.9 se presentan algunos ejemplos de compuestos estudiados hasta el momento que son incluidos en la cavidad del CB[7]: derivados de naftaleno (1), estibileno (2), adamantina (3), viológeno (4), ferroceno (5) o cobaltoceno (6) [59, 60, 63, 81, 97-103].

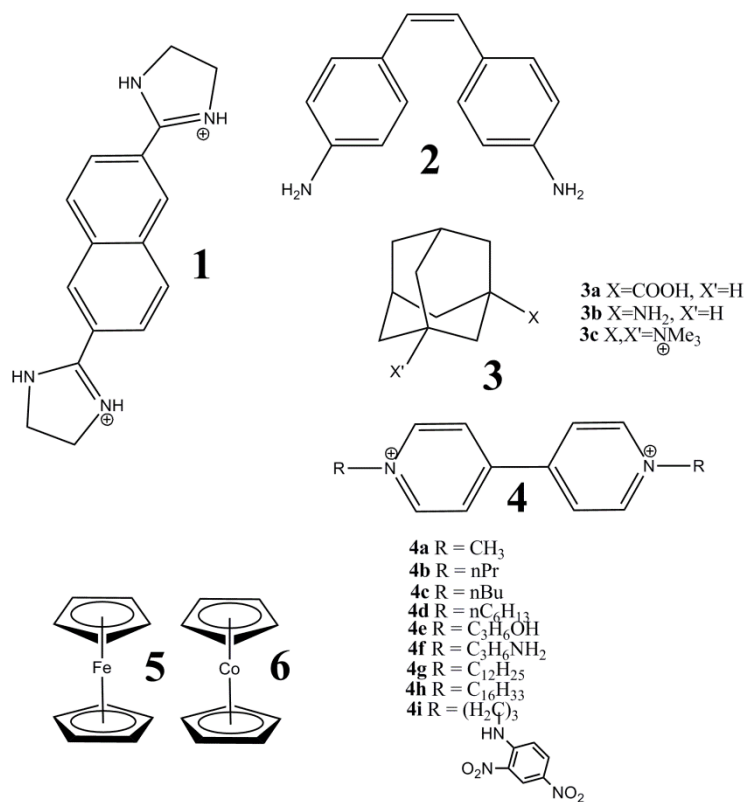


Figura 1.9. Ejemplos de compuestos que se incluyen en la cavidad del CB[7] [90].

El estudio de la formación de complejos con CB[7] se realiza gracias al empleo de distintas técnicas como la espectroscopia de absorción molecular, la espectrofluorimetría, la resonancia magnética nuclear, la espectrometría de masas, la calorimetría o distintas técnicas electroquímicas. Los valores de las constantes de formación de los complejos de inclusión más altos registrados para la familia de los CB[n]s, se han obtenido con CB[7] como hospedador. Uno de los complejos de CB[7] más estudiados en la bibliografía, es el formado con metil viológeno (MV²⁺) como huésped, en este caso, empleando técnicas electroquímicas debido a las propiedades de transferencia electrónica que presenta el huésped. Muchos de los trabajos relativos al estudio de los complejos de CB[7]-MV²⁺ y CB[7] con derivados del viológeno (V²⁺), han sido realizados por el grupo del Prof. Kaifer [104]. La estabilidad que presenta este complejo podría deberse a que la distancia entre los átomos de nitrógeno de los anillos es la misma que para el 1,5-diaminopentano (figura 1.10A) y, como se explicó previamente para el CB[6], los grupos amino quedan situados en los portales del CB[7] pudiendo interaccionar con los grupos carbonilo y, por lo tanto, estabilizar el complejo formado (figura 1.10B).

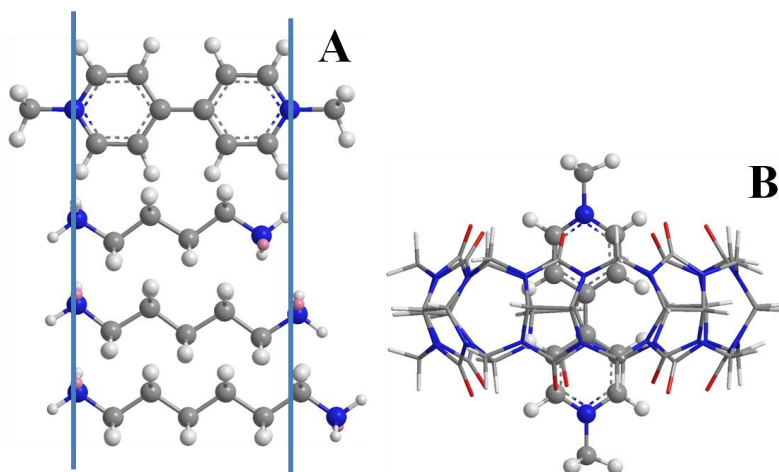


Figura 1.10. A) Comparación entre la distancia de N-N del MV²⁺ y las dialquilaminas. B) Estructura del complejo CB[7]-MV²⁺.

Estos mismos autores también han comprobado la alta estabilidad de distintos complejos formados por la inclusión de derivados de ferroceno en el CB[7] [76, 104, 105]. En concreto, y en colaboración con el grupo del Prof. Kim, obtuvieron las constantes de asociación más altas para esta familia de receptores con la formación del complejo de CB[7] con el derivado de ferroceno 1,1'-bis(trimetilamonio)ferroceno, calculando una constante de formación de $3.0 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ [65].

Estudios realizados con derivados del V²⁺ con cadenas alifáticas de diferente número de carbonos en los extremos, confirman la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la formación del complejo de inclusión. Así, para derivados con cadenas alifáticas de más de tres carbonos, el CB[7] se encuentra situado en la cadena alifática y no en la estructura aromática del V²⁺ como se esquematiza en la figura 1.11.

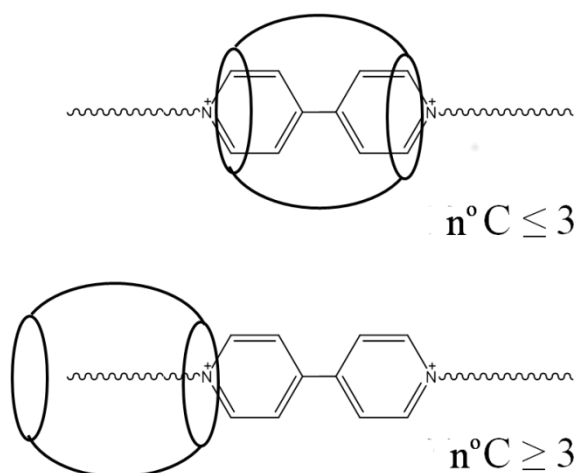


Figura 1.11. Modos de interacción entre CB[7] y derivados del viológeno. Adaptada de [102].

Una disminución de la hidrofobicidad de la cadena alifática mediante la sustitución de un grupo metilo por un grupo dinitrobenzenu provoca el posicionamiento del CB[7] en el V^{2+} [102]. Por otra parte, Sindelar y col., en 2006, estudiaron la formación del complejo de CB[7] con el derivado de V^{2+} con cadenas alifáticas terminadas en grupos carboxilo. Cuando el grupo terminal de la cadena alifática es un grupo carboxilo, se puede apreciar la influencia que el pH del medio tiene en el proceso de complejación. Así, si los grupos terminales se encuentran protonados, el CB[7] se sitúa en el extremo de la cadena alifática mientras que, a valores de pH altos en los que los grupos carboxilo se encuentran desprotonados, el receptor se encuentra situado en la parte aromática del huésped estabilizándose la interacción supramolecular. El control de este parámetro sobre la reversibilidad del proceso permite, por lo tanto, el control del proceso de interacción [106].

Debido a esta combinación de interacciones no covalentes, compuestos como la amantadina (figura 1.9, molécula 3b) presentan constantes de formación muy altas, del orden de $10^{12} M^{-1}$ gracias a las interacciones hidrofóbicas de la estructura cíclica de la molécula y la interacción electrostática entre los grupos carbonilo y el grupo amino protonado que tiene como sustituyente [107].

Debido al tamaño de la cavidad del CB[7], la mayoría de los complejos formados presentan una estequiometría 1:1. Sin embargo, el tamaño de la cavidad del CB[8] permite la formación de complejos 1:2 anfitrión-huésped o incluso complejos ternarios 1:1:1, existiendo la posibilidad, siempre y cuando un huésped sea electrodeficiente y el

otro rico en electrones, de que se produzca una interacción de transferencia de carga entre las moléculas incluidas [108-113]. La figura 1.12 muestra un ejemplo de complejo ternario con transferencia de carga entre las moléculas huésped.

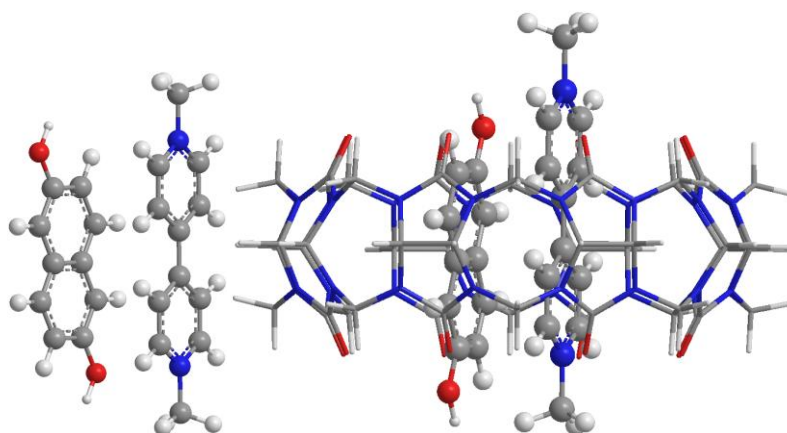


Figura 1.12. Ejemplo de complejo ternario de CB[8] con transferencia de carga entre los huéspedes MV^{2+} y 2,6-dihidroxinaftaleno.

La posibilidad de que se formen complejos ternarios ha sido empleada para la formación de agregados, la formación de redes poliméricas y la inmovilización de nanopartículas en superficies con CB[8] como mediador [114]. Debido a que el CB[8] es el homólogo más insoluble de la familia de los CB[n]s, en ocasiones se ha aprovechado el aumento de la solubilidad que se produce fruto de la inclusión de un determinado huésped, para el estudio de la formación de complejos con un segundo huésped. Habitualmente, el huésped utilizado para aumentar la solubilidad es el MV^{2+} como, por ejemplo, para la inclusión de amino ácidos [109, 115, 116]. En muchas ocasiones, la diferencia de formación de complejos entre CB[7] y CB[8] se encuentra fundamentalmente en la diferente estequiometría obtenida en función del anfitrión utilizado (1:1 ó 1:2), como es el caso de derivados de fenilpirilo o de colorantes tricíclicos [117, 118].

Los CB[n]s son relativamente difíciles de funcionalizar así, con objeto de ampliar sus campos de aplicación, además de la síntesis de los distintos homólogos y del estudio de la formación de complejos, muchos autores han centrado sus trabajos en la síntesis de derivados de CB[n]s mediante la unión de grupos funcionales al receptor macrocíclico.

En 1992, Flinn y col. [119] intentaron sintetizar el derivado de CB[6] con grupos metilo en la posición ecuatorial. Para ello, como muestra la figura 1.13A, realizaron la misma reacción que para la síntesis del CB[6], pero cambiando la molécula de glicoluril por un derivado de la misma con grupos metilo en dicha posición. De esta manera, los autores obtuvieron el compuesto decametilcucurbit[5]uril, es decir, con 5 unidades del monómero únicamente.

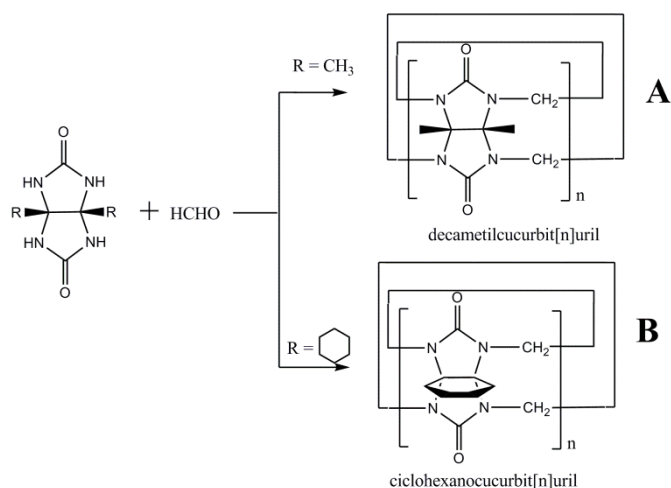


Figura 1.13. Estrategias de síntesis derivados de CB[n]s.

Esta estrategia de síntesis la siguieron otros autores para la obtención de derivados de CB[5] y CB[6] con un anillo como sustituyente en el plano ecuatorial (figura 1.13B) [120, 121]. Continuando por esta línea, Isobe y col. [122] presentaron, en 2002, el primer derivado no simétrico mediante la síntesis de difenilCB[6]. La síntesis se llevó a cabo haciendo reaccionar una mezcla de difenilglicoluril:glicoluril, en proporción 1:5, con formaldehído. En la bibliografía se pueden encontrar otros ejemplos de esta estrategia de síntesis [123].

En 2003, Jon y col. [124] presentaron una nueva vía de modificación de los homólogos de CB[n] llevando a cabo la reacción directa de CB[6] con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en agua a $85\text{ }^\circ\text{C}$. De esta forma consiguieron intercambiar los átomos de hidrógeno del plano ecuatorial, por grupos hidroxilo (figura 1.14). Así, y a través de reacciones sucesivas con los grupos OH, se logró la funcionalización con grupos azufre dentro de una cadena carbonada, abriendo la posibilidad de aplicación de estos compuestos derivados, por ejemplo, en la modificación de superficies de sílice.

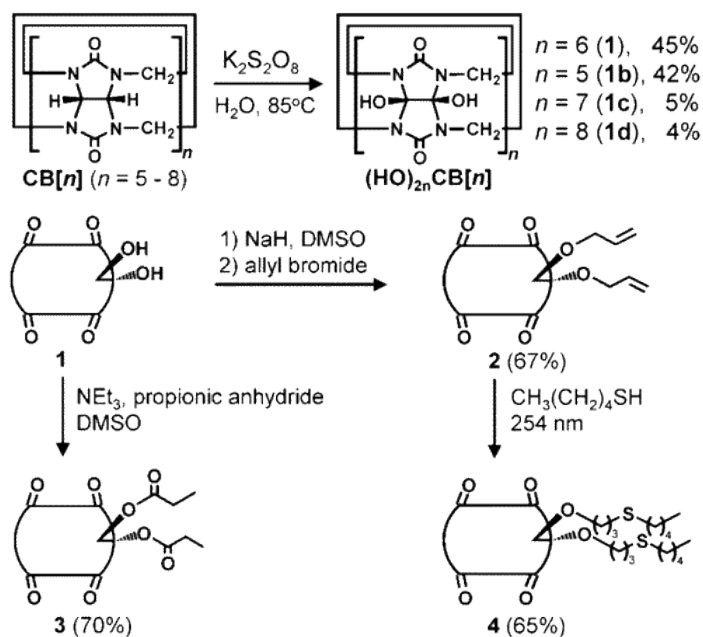


Figura 1.14. Esquema de síntesis del derivado de CB[6] con grupos hidroxilo y reacciones sucesivas [125].

El grupo de investigación dirigido por el Prof. Isaacs, centró su línea de trabajo en comprender el mecanismo de la reacción de síntesis de los CB[n]s, con el objetivo de controlar la reacción de formación de esta familia de receptores y llevar a cabo la síntesis de nuevos receptores que puedan presentar nuevas propiedades de reconocimiento molecular [126]. De esta manera, han conseguido obtener moléculas de CB[n] con alguna unidad de glicoluril con la cara correspondiente a la cavidad interna expuesta al exterior (“inverted cucurbit[n]uril”) [127].

Finalmente, la obtención de un derivado monosustituido de CB[6] con un grupo metilo, fue descrita por Ahmed y col. en el año 2011 [128]. Sin embargo, uno de los derivados de CB[n] sintetizados hasta el momento que puede resultar más interesante, es el resultante de la monofuncionalización en el plano ecuatorial de la molécula por parte de un grupo hidroxilo. Este compuesto fue obtenido en 2012 por Zhao y col. [129] mediante la reacción del complejo de inclusión CB[6]-imidazol con $(NH_4)_2S_2O_8$ obteniendo mezclas de CB[6] con uno o dos grupos hidroxilos. A continuación, y haciendo reaccionar el grupo hidroxilo incorporado, se pueden obtener multitud de derivados de CB[6] distintos.

El principal interés de la derivatización de estos compuestos, radica en ampliar el campo de sus aplicaciones [130-134]. Entre ellas, la posibilidad de anclarlos en diferentes superficies con fines diversos, resultaría de gran interés para el desarrollo de sensores químicos. El derivado perallyloxycucurbit[6]uril sintetizado por Jon y col. en 2003 [124] fue anclado sobre una superficie de vidrio previamente funcionalizada con grupos azufre, dejando la cavidad del receptor libre para el reconocimiento, mediante microscopía de fluorescencia, de pequeñas moléculas como la espermina. Este mismo derivado de CB[6] fue posteriormente utilizado para la modificación de superficies de sílice en el desarrollo de una fase estacionaria de cromatografía aplicada en la separación de alcaloides [135] o alquilbencenos [136]. Además, Nagarajan y col. desarrollaron el mismo sistema de anclaje de CB[6] derivatizado sobre sílice derivatizada también y comprobando la disponibilidad de cavidades de CB[6] mediante el cambio de la señal de fluorescencia de espermina como huésped [137]. No sólo se han inmovilizado derivados de CB[n]s sobre soportes de sílice. Hwang y col. [138] describieron, en 2007, la modificación de superficies de oro previamente modificadas con monocapas autoensambladas de alcanotioles, con un derivado de CB[7] para la posterior inmovilización no covalente de proteínas modificadas con derivados de ferroceno, gracias a su fuerte interacción con el CB[7] (figura 1.15).

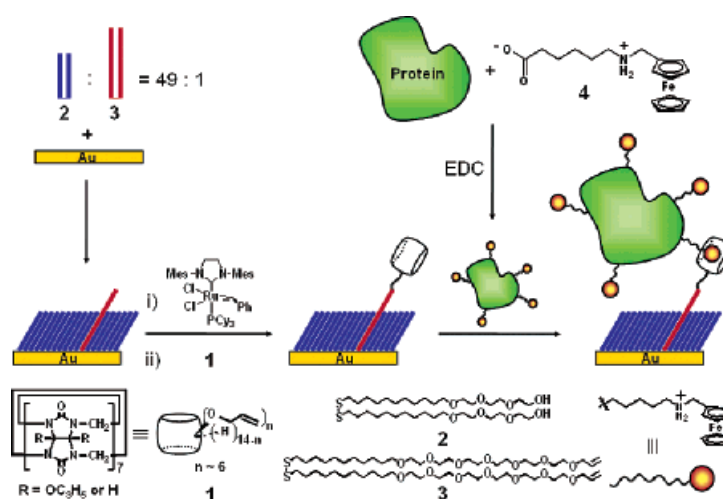


Figura 1.15. Inmovilización no covalente de proteínas sobre oro mediante interacción con CB[n]s [138].

Recientemente, Huang y col. han presentado la formación de un polímero mediante la unión de derivados de CB[6] que puede ser utilizado en diferentes aplicaciones como en el seguimiento de moléculas diana [139].

Otra estrategia seguida por diferentes autores para la modificación de superficies con CB[n], se basa en la capacidad que estos compuestos presentan para la formación de rotaxanos o pseudorotaxanos. Uno de los primeros ejemplos en la bibliografía es la incorporación de CB[6] a superficies de oro modificadas mediante quimisorción de alquilaminas con un grupo tiol en su extremo [140]. Estos autores mostraron que la inmovilización del CB[6] resultaba reversible dependiendo del pH del medio. Por otro lado, los mismos autores desarrollaron un polímero supramolecular que anclaron sobre una superficie de oro aprovechando las interacciones por transferencia de carga entre moléculas aceptoras y dadoras que ocurren en el complejo formado en CB[8] (figura 1.16) [141].

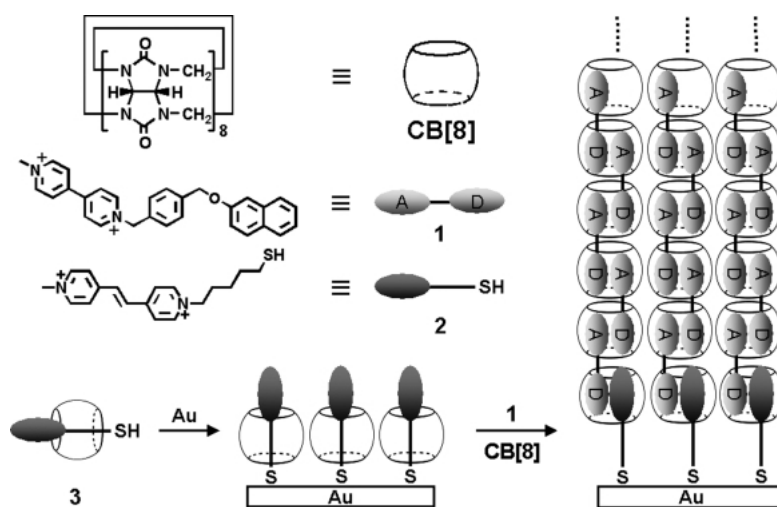


Figura 1.16. Esquema de inmovilización de CB[8] mediante la formación de complejos estabilizados por transferencia de carga [141].

La estrategia de inmovilizar receptores de CB[n] en superficies electrónicas mediante la formación de un complejo con una molécula previamente anclada, ha sido utilizada por otros autores estudiando la respuesta electroquímica [142] o de fluorescencia [143] de los complejos formados. Siguiendo esta metodología, Tian y col inmovilizaron nanopartículas de oro, previamente funcionalizadas con un grupo

electrodeficiente, a través de la formación de un complejo ternario en la cavidad del CB[8], que había sido anclado mediante la formación del complejo de inclusión con un derivado tiolado de V^{2+} previamente adsorbido a la superficie de oro (figura 1.17) [144].

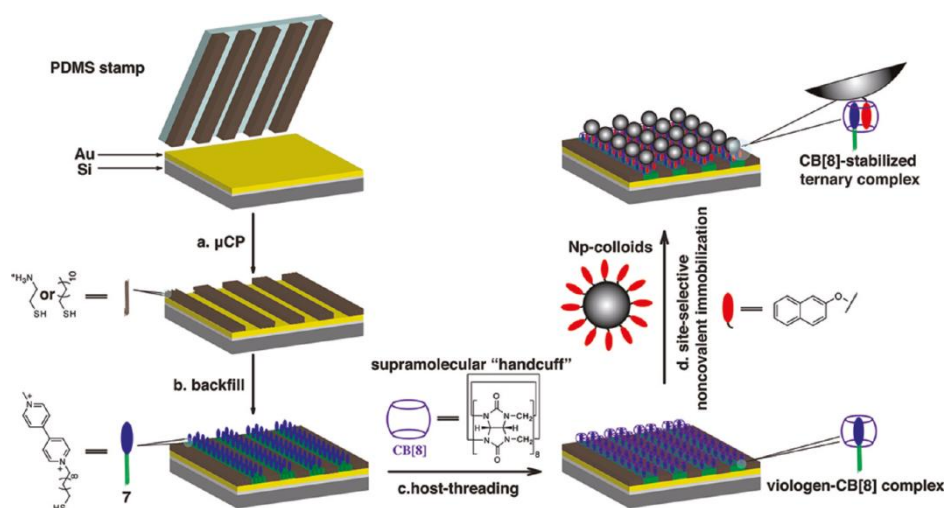


Figura 1.17. Inmovilización de nanopartículas sobre oro a través de la formación del complejo ternario en la cavidad del CB[8] [144].

Por otro lado, destaca la inmovilización de CB[n]s mediante adsorción directa. En 2008, An y col. [145] propusieron la formación de monocapas de CB[n]s, en concreto de CB[6], sobre superficies de oro por medio de la interacción entre los grupos carbonilo de los portales y el oro. Se trata de un procedimiento sencillo de modificación por inmersión de láminas de oro en disoluciones saturadas de CB[n] durante 24 h (figura 1.18).

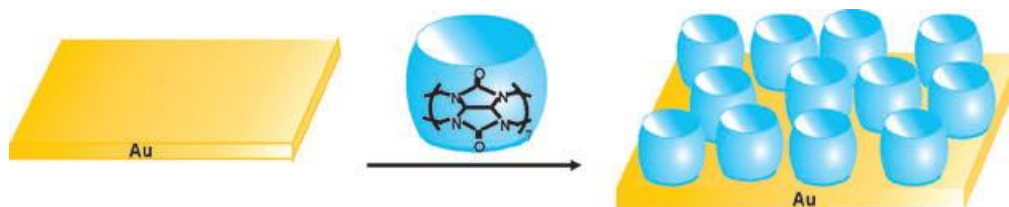


Figura 1.18. Modificación de superficies de oro con CB[n]s por adsorción [145].

Posteriormente y aprovechando esta estrategia de adsorción directa, Young y col. [146] inmovilizaron proteínas derivatizadas con grupos ferroceno a través del complejo de inclusión del grupo ferroceno en la cavidad de CB[7] previamente adsorbido en el oro (figura 1.19). Recientemente, otros autores han seguido esta misma estrategia para la inmovilización, tanto de proteínas como de células [147, 148].

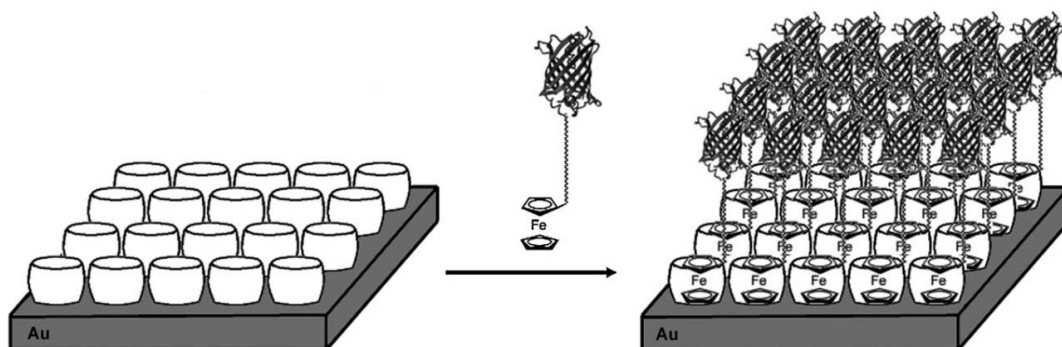


Figura 1.19. Inmovilización de proteínas sobre oro a través de CB[n]s [146].

En los últimos años, la microscopía de fuerza atómica (AFM), ha servido para estudiar la adsorción de CB[n]s sobre superficies de oro [149, 150]. En 2013, Blanco y col. estudiaron la adsorción directa de CB[6] y CB[7] sobre superficies de oro mediante AFM, concluyendo de sus estudios, que la adsorción espontánea de CB[n] en oro resulta más rápida para el CB[7] que para el CB[6].

Además de soportes de sílice y oro, también se han empleado láminas de TiO_2 o electrodos de óxido de estaño dopados con flúor (FTO) como soportes para inmovilizar los CB[n]s en un intento de desarrollar sensores electroquímicos [151-153]. En este último caso, destacan los trabajos de Demets y col. con la inmovilización de CB[6] sobre electrodos de FTO por inmersión en disoluciones saturadas de éste en NH_4OH , presentando, posteriormente, la preparación de membranas de PVC/CB[6] sobre este mismo tipo de electrodos. En ambos ejemplos, utilizaron la respuesta redox del ferroceno como sonda electroquímica, incluyendo un estudio de la influencia de ciertos cationes y aniones en el electrolito sobre la respuesta redox.

Todos estos trabajos de modificación de superficies con CB[n]s abren, sin duda, un atractivo campo de posibilidades desde el punto de vista de las aplicaciones analíticas de estos compuestos, que pueden abarcar desde procesos de separación, preparación de muestra o desarrollo de sensores.

Algunas de las aplicaciones implicando el uso de CB[n]s desarrolladas hasta el momento, han sido el diseño de máquinas moleculares [154-157], el desarrollo de electrodos selectivos de iones gracias a la fuerte interacción de CB[n]s con los iones metálicos [120], el uso de estos receptores como transportadores de medicamentos antitumorales [158-164] o la formación de canales iónicos [165] o vesículas [166]. El tamaño de las cavidades de estos compuestos macrocíclicos les permite catalizar reacciones químicas o incluso de provocarlas en el interior de su cavidad [167-177]. Además, se ha estudiado la interacción de CB[n] ($n = 6$ y 7) con ADN [122, 178] y la generación de materiales porosos para adsorber acetileno [179], como otras aplicaciones a destacar.

Como se puede ver, en los últimos años se han desarrollado muchas aplicaciones diferentes, sin embargo, en el desarrollo de metodologías analíticas son escasos los ejemplos frente al resto de trabajos realizados. Casi todos las aplicaciones analíticas desarrolladas hasta el momento, se han realizado empleando técnicas espectroscópicas. El grupo del Prof. García ha presentado diferentes estudios de sensores colorimétricos para aminas alifáticas y aromáticas tanto desde primarias a cuaternarias, así como ácido gamma-hidroxi-butírico (GHB) [180-183]. Estos sensores se basan en la variación de señal fluorescente o de absorción de un complejo de CB[n] con un tinte tricíclico, que se produce como consecuencia de la interacción del analito con el complejo CB[n]-tinte previamente formado.

En 2009 Zhou y col. [184] presentaron un método espectrofluorimétrico para la determinación de nicotina monitorizando la inhibición de la señal de fluorescencia del complejo CB[7]-azul de metileno que, fruto de la competencia por la cavidad del CB[7], se produce con concentraciones crecientes de analito. Los autores realizaron la aplicación en cigarrillos. Esta estrategia resulta muy interesante para la determinación de compuestos no fluorescentes, por esa razón recientemente se ha propuesto la determinación de analitos como ranitidina, nizatidina, cimetidina, cartap y astermizol siguiendo el cambio de la señal del complejo CB[7]-palmatina [185-187]. En esta línea,

fue posible la determinación de amantadina y rimantadina monitorizando el cambio de la señal del complejo CB[7]-copsina [188] y la determinación de paraquat utilizando CB[7]-naranja de acriditina [189].

También se han descrito métodos espectrofluorimétricos basados en el aumento de la intensidad de señal de fluorescencia que se produce fruto de la formación del complejo con CB[n]. Como ejemplos, se pueden destacar la determinación de analitos como coptisina, sanguinarina, melanina, berberina, pireno y tiabendazol [190-195].

Todos estos antecedentes muestran las posibilidades que ofrecen estos receptores en el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de compuestos de forma más sensible y selectiva.

1.4. Bibliografía.

- [1] S. Alegret, M. Del Valle, A. Merkoci, *Sensores electroquímicos*, Universitat Autònoma de Barcelona, Servei de Publicacions, Bellaterra, España, **2004**.
- [2] J.M. Pingarrón, P. Sánchez, *Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones*, 1 Ed., Síntesis, Madrid, **2003**.
- [3] V. Srinivasan, W. Lamb, Sheet resistivity measurements of chemically modified electrodes by 4-point probe method, *Analytical Chemistry*. **49**, **1977**, 1639-1640.
- [4] A. Bettelheim, R. Chan, T. Kuwana, Electroanalysis of oxygen reduction .3. selective reduction to hydrogen-peroxide or water using polymeric attachment of metalloporphyrins, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **110**, **1980**, 93-102.
- [5] C. Chidsey, R. Murray, Electroactive polymers and macromolecular electronics, *Science*. **231**, **1986**, 25-31.
- [6] M. Sharp, M. Petersson, K. Edstrom, Preliminary determinations of electron-transfer kinetics involving ferrocene covalently attached to a platinum surface, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **95**, **1979**, 123-130.
- [7] S. Shahrokhian, J. Yazdani, Electrocatalytic oxidation of thioglycolic acid at carbon paste electrode modified with cobalt phthalocyanine: application as a potentiometric sensor, *Electrochimica Acta*. **48**, **2003**, 4143-4148.
- [8] T. Molina Holgado, J. Pinilla Macias, L. Hernández Hernández, Voltammetric determination of lead with a chemically-modified carbon-paste electrode with diphenylthiocarbazone, *Analytica Chimica Acta*. **309**, **1995**, 117-122.
- [9] M. Won, D. Moon, Y. Shim, Determination of mercury and silver at a modified carbon paste electrode containing glyoxal bis(2-hydroxyanil), *Electroanalysis*. **7**, **1995**, 1171-1176.
- [10] S. Razola, E. Aktas, J. Vire, J. Kauffmann, Reagentless enzyme electrode based on phenothiazine mediation of horseradish peroxidase for subnanomolar hydrogen peroxide determination, *Analyst*. **125**, **2000**, 79-85.
- [11] J. Manso, M.L. Mena, P. Yañez-Sedeño, J. Pingarrón, Electrochemical biosensors based on colloidal gold-carbon nanotubes composite electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **603**, **2007**, 1-7.
- [12] I. Svancara, K. Vytras, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, 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**, **2009**, 7-28.
- [13] J.W. Steed, D.R. Turner, K.J. Wallace, *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*, John Wiley And Sons, West Sussex, England, **2007**.
- [14] B. Pressman, Biological applications of ionophores, *Annual Review of Biochemistry*. **45**, **1976**, 501-530.
- [15] M. Shemyakin, N. Aldanova, E. Vinogradova, M. Feigina, The structure and total synthesis of valinomycin, *Tetrahedron Letters*, **1963**, 1921-1925.
- [16] B. Pressman, Induced active transport of ions in mitochondria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **53**, **1965**, 1076-1083.
- [17] C. Pedersen, Cyclic polyethers and their complexes with metal salts, *Journal of the American Chemical Society*. **89**, **1967**, 2495-2496.
- [18] C. Pedersen, Cyclic polyethers and their complexes with metal salts, *Journal of the American Chemical Society*. **89**, **1967**, 7017-7036.
- [19] C. Pedersen, The discovery of crown ethers (noble lecture), *Angewandte Chemie-International Edition in English*. **27**, **1988**, 1021-1027.
- [20] J. Lehn, Supramolecular chemistry - receptors, catalysts, and carriers, *Science*. **227**, **1985**, 849-856.
- [21] D. Amabilino, J. Stoddart, Self-assembly and macromolecular design, *Pure and Applied Chemistry*. **65**, **1993**, 2351-2359.
- [22] S. Langford, L. Perezgarcia, J. Stoddart, Self-assembly in chemical synthesis, *Supramolecular Chemistry*. **6**, **1995**, 11-27.

- [23] D. Philp, J. Stoddart, Self-assembly in natural and unnatural systems, *Angewandte Chemie-International Edition*. 35, **1996**, 1155-1196.
- [24] D. Braga, F. Grepioni, Intermolecular interactions in nonorganic crystal engineering, *Accounts of Chemical Research*. 33, **2000**, 601-608.
- [25] Buckingham, B. Utting, Intermolecular forces, *Annual Review of Physical Chemistry*. 21, **1970**, 287-316.
- [26] G. Ewing, Intermolecular interactions - van der waals molecules, *Angewandte Chemie-International Edition*. 11, **1972**, 486-&.
- [27] P. Hobza, R. Zahradnik, Intermolecular interactions between medium-sized systems - nonempirical and empirical calculations of interaction energies - successes and failures, *Chemical Reviews*. 88, **1988**, 871-897.
- [28] W. Klemperer, Intermolecular interactions, *Science*. 257, **1992**, 887-888.
- [29] A. Krushelnitsky, Intermolecular electrostatic interactions and brownian tumbling in protein solutions, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 8, **2006**, 2117-2128.
- [30] N. Nandi, D. Vollhardt, Molecular interactions in amphiphilic assemblies: theoretical perspective, *Accounts of Chemical Research*. 40, **2007**, 351-360.
- [31] A. Reed, L. Curtiss, F. Weinhold, Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint, *Chemical Reviews*. 88, **1988**, 899-926.
- [32] K. Szalewicz, K. Patkowski, B. Jeziorski, Intermolecular interactions via perturbation theory: from diatoms to biomolecules, In: D. Wales (Ed.), *Intermolecular forces and clusters II*, Springer-Verlag Berlin, Germany, **2005**, 43-117.
- [33] M. Wojcik, Intermolecular interactions in water, *Journal of Molecular Structure*. 189, **1988**, 89-103.
- [34] R. Mulliken, Structures of complexes formed by halogen molecules with aromatic and with oxygenated solvents, *Journal of the American Chemical Society*. 72, **1950**, 600-608.
- [35] R. Mulliken, Molecular compounds and their spectra 2., *Journal of the American Chemical Society*. 74, **1952**, 811-824.
- [36] R. Mulliken, Molecular compounds and their spectra .3. The interaction of electron donors and acceptors, *Journal of Physical Chemistry*. 56, **1952**, 801-822.
- [37] J.W. Steed, J.L. Atwood, *Supramolecular chemistry*, John Wiley And Sons, Uk, **2009**.
- [38] J. Lehn, *Supramolecular chemistry*, Vch Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, **1995**.
- [39] M. Rojas, R. Koniger, J. Stoddart, A. Kaifer, Supported monolayers containing preformed binding-sites - synthesis and interfacial binding-properties of a thiolated beta-cyclodextrin derivative, *Journal of the American Chemical Society*. 117, **1995**, 336-343.
- [40] Y. Xiao, S. Ng, T.T.Y. Tan, Y. Wang, Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1269, **2012**, 52-68.
- [41] C. Danel, N. Azaroual, C. Chavaria, P. Odou, B. Martel, C. Vaccher, Comparative study of the complex forming ability and enantioselectivity of cyclodextrin polymers by CE and H-1 NMR, *Carbohydrate Polymers*. 92, **2013**, 2282-2292.
- [42] S. Ghosh, T.H. Fang, M.S. Uddin, K. Hidajat, Enantioselective separation of chiral aromatic amino acids with surface functionalized magnetic nanoparticles, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 105, **2013**, 267-277.
- [43] H.M. Cabral Marques, A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *Flavour and Fragrance Journal*. 25, **2010**, 313-326.
- [44] M.D. Moya-Ortega, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, T. Loftsson, Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications, *International Journal of Pharmaceutics*. 428, **2012**, 152-163.
- [45] T. Loftsson, M.E. Brewster, Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 101, **2012**, 3019-3032.
- [46] M. Chen, X. Wei, H. Qian, G. Diao, Fabrication of GNPS/CdSH-Fc/Nafion Modified electrode for the detection of dopamine in the presence of ascorbic acid, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 31, **2011**, 1271-1277.

- [47] V. Rahemi, J.J. Vandamme, J.M.P.J. Garrido, F. Borges, C.M.A. Brett, E.M.P.J. Garrido, Enhanced host-guest electrochemical recognition of herbicide MCPA using a beta-cyclodextrin carbon nanotube sensor, *Talanta*. 99, **2012**, 288-293.
- [48] S. Manivannan, R. Ramaraj, Silver nanoparticles embedded in cyclodextrin-silicate composite and their applications in Hg(II) ion and nitrobenzene sensing, *Analyst*. 138, **2013**, 1733-1739.
- [49] Y. Guo, S. Guo, J. Li, E. Wang, S. Dong, Cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets as enhanced sensing platform for ultrasensitive determination of carbendazim, *Talanta*. 84, **2011**, 60-64.
- [50] Q. Han, Y. Wang, Y. Huang, L. Guo, Y. Fu, Electrochemical recognition for carboxylic acids based on multilayer architectures of beta-cyclodextrin and methylene blue/reduce-graphene interface on glassy carbon electrodes, *Analyst*. 138, **2013**, 2051-2056.
- [51] I. Carrillo, C. Quintana, A.M. Esteva, L. Hernandez, P. Hernandez, Self-assembled submonolayer of ss-cyclodextrins on gold electrode for the selective determination of 4-aminobiphenyl, *Electroanalysis*. 23, **2011**, 2862-2869.
- [52] J. Huang, Z. Feng, L. Yang, Y. Qian, Q. Zhang, F. Li, A sensitive and selective non-enzyme cholesterol amperometric biosensor based on host-guest effect of beta-cyclodextrin for cholesterol, *Analytical Methods*. 4, **2012**, 4264-4268.
- [53] C. Quintana, S. Suarez, L. Hernandez, Nanostructures on gold electrodes for the development of an L-tyrosine electrochemical sensor based on host-guest supramolecular interactions, *Sensors and Actuators B-Chemical*. 149, **2010**, 129-135.
- [54] G. Zhu, P. Gai, Y. Yang, X. Zhang, J. Chen, Electrochemical sensor for naphthols based on gold nanoparticles/hollow nitrogen-doped carbon microsphere hybrids functionalized with SH-beta-cyclodextrin, *Analytica Chimica Acta*. 723, **2012**, 33-38.
- [55] E. Masson, X. Ling, R. Joseph, L. Kyeremeh-Mensah, X. Lu, Cucurbituril chemistry: a tale of supramolecular success, *Rsc Advances*. 2, **2012**, 1213-1247.
- [56] G. Parvari, O. Reany, E. Keinan, Applicable properties of cucurbiturils, *Israel Journal of Chemistry*. 51, **2011**, 646-663.
- [57] R. Behrend, E. Meyer, F. Rusche, Condensates of glycoluril and formaldehyde, *Justus Liebigs Annalen Der Chemie*. 339, **1905**, 1-37.
- [58] W. Freeman, W. Mock, N. Shih, Cucurbituril, *Journal of the American Chemical Society*. 103, **1981**, 7367-7368.
- [59] J.W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.J. Kim, K. Kim, Cucurbituril homologues and derivatives: new opportunities in supramolecular chemistry, *Accounts of Chemical Research*. 36, **2003**, 621-630.
- [60] J. Kim, I. Jung, S. Kim, E. Lee, J. Kang, S. Sakamoto, New cucurbituril homologues: syntheses, isolation, characterization, *Journal of the American Chemical Society*. 122, **2000**, 540.
- [61] A. Day, A.P. Arnold, R.J. Blanch, B. Snushall, Controlling factors in the synthesis of cucurbituril and its homologues, *Journal of Organic Chemistry*. 66, **2001**, 8094-8100.
- [62] S. Liu, P. Zavalij, L. Isaacs, Cucurbit[10]uril, *Journal of The American Chemical Society*. 127, **2005**, 16798-16799.
- [63] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, The cucurbit[n]uril family, *Angewandte Chemie-International Edition*. 44, **2005**, 4844-4870.
- [64] M.V. Rekharsky, Y.H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue, Complexation thermodynamics of cucurbit[6]uril with aliphatic alcohols, amines, and diamines, *Supramolecular Chemistry*. 19, **2007**, 39-46.
- [65] M.V. Rekharsky, T. Mori, C. Yang, Y.H. Ko, N. Selvapalam, H. Kim, D. Sobransingh, A.E. Kaifer, S. Liu, L. Isaacs, W. Chen, S. Moghaddam, M.K. Gilson, K. Kim, Y. Inoue, A synthetic host-guest system achieves avidin-biotin affinity by overcoming enthalpy-entropy compensation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, **2007**, 20737-20742.
- [66] W.J. Chen, D.H. Yu, X. Xiao, Y.Q. Zhang, Q.J. Zhu, S.F. Xue, Z. Tao, G. Wei, Difference of coordination between alkali- and alkaline-earth-metal ions to a symmetrical alpha, alpha', delta, delta'-tetramethylcucurbit[6]uril, *Inorganic Chemistry*. 50, **2011**, 6956-6964.
- [67] E. Blanco, C. Quintana, P. Hernández, L. Hernández, A voltammetric study of the interaction between cucurbit[6]uril and divalent metal ions, *Electroanalysis*. 22, **2010**, 2123-2130.

- [68] P.A. Abramov, A.L. Gushchin, M.N. Sokolov, V.P. Fedin, New supramolecular adducts of chloroaquacomplexes [M-3(Mu(3)-S)S3-X, *Journal of Structural Chemistry*. 51, **2010**, 378-381.
- [69] D. Samsonenko, O. Geras'ko, T. Mit'kina, J.A.V. Lipkowski Av, D. Fenske, V. Fedin, Synthesis and crystal structure of supramolecular adducts of macrocyclic cavitand cucurbituril with chromium(III) and Nickel(II) aqua complexes, *Russian Journal of Coordination Chemistry*. 29, **2003**, 166-174.
- [70] H. Buschmann, E. Schollmeyer, L. Mutihac, The formation of amino acid and dipeptide complexes with alpha-cyclodextrin and cucurbit[6]uril in aqueous solutions studied by titration calorimetry, *Thermochimica Acta*. 399, **2003**, 203-208.
- [71] C. Marquez, R.R. Hudgins, W.M. Nau, Mechanism of host-guest complexation by cucurbituril, *Journal of the American Chemical Society*. 126, **2004**, 5806-5816.
- [72] K. Jansen, H. Buschmann, E. Zliobaite, E. Schollmeyer, Steric factors influencing the complex formation with cucurbit[6]uril, *Thermochimica Acta*. 385, **2002**, 177-184.
- [73] H.J. Buschmann, E. Cleve, L. Mutihac, E. Schollmeyer, The formation of alkali and alkaline earth cation complexes with cucurbit[6]uril in aqueous solution: a critical survey of old and new results, *Journal of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry*. 65, **2009**, 293-297.
- [74] H. Buschmann, K. Jansen, E. Schollmeyer, The formation of cucurbituril complexes with amino acids and amino alcohols in aqueous formic acid studied by calorimetric titrations, *Thermochimica Acta*. 317, **1998**, 95-98.
- [75] K. Connors, The stability of cyclodextrin complexes in solution, *Chemical Reviews*. 97, **1997**, 1325-1357.
- [76] W.S. Jeon, K. Moon, S.H. Park, H. Chun, Y.H. Ko, J.Y. Lee, E.S. Lee, S. Samal, N.A.R. Selvapalam M.V., V. Sindelar, D. Sobransingh, Y. Inoue, A.E. Kaifer, K. Kim, Complexation of ferrocene derivatives by the cucurbit[7]uril host: a comparative study of the cucurbituril and cyclodextrin host families, *Journal of the American Chemical Society*. 127, **2005**, 12984-12989.
- [77] Y. Liu, C. Li, D. Guo, Z. Pan, Z. Li, A comparative study of complexation of beta-cyclodextrin, calix[4]arenesulfonate and cucurbit[7]uril with dye guests: fluorescence behavior and binding ability, *Supramolecular Chemistry*. 19, **2007**, 517-523.
- [78] W. Wang, A.E. Kaifer, Cucurbituril and cyclodextrin complexes of dendrimers, *Inclusion Polymers*, Springer-Verlag Berlin, Germany, **2009**, 205-226.
- [79] T. Matsue, D. Evans, T. Osa, N. Kobayashi, Electron-transfer reactions associated with host guest complexation - oxidation of ferrocenecarboxylic acid in the presence of beta-cyclodextrin, *Journal of the American Chemical Society*. 107, **1985**, 3411-3417.
- [80] A.E. Kaifer, Molecular encapsulation of redox-active guests., In: P. Ceroni, A. Credi, M. Venturi (Eds.), *Electrochemistry of functional supramolecular systems*, John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey, **2010**, 59-86.
- [81] W. Ong, A.E. Kaifer, Salt effects on the apparent stability of the cucurbit[7]uril-methyl viologen inclusion complex, *Journal of Organic Chemistry*. 69, **2004**, 1383-1385.
- [82] L. Cui, S. Gadde, W. Li, A.E. Kaifer, Electrochemistry of the inclusion complexes formed between the cucurbit [7]uril host and several cationic and neutral ferrocene derivatives, *Langmuir*. 25, **2009**, 13763-13769.
- [83] H.J. Buschmann, L. Mutihac, E. Schollmeyer, Complex formation of cucurbit[6]uril with amines in the presence of different salts, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 61, **2008**, 343-346.
- [84] L. Isaacs, Cucurbit[n]urils: from mechanism to structure and function, *Chemical Communications*, **2009**, 619-629.
- [85] W. Mock, N. Shih, Organic ligand receptor interactions between cucurbituril and alkylammonium ions, *Journal of the American Chemical Society*. 110, **1988**, 4706-4710.
- [86] W. Mock, N. Shih, Host guest binding-capacity of cucurbituril, *Journal of Organic Chemistry*. 48, **1983**, 3618-3619.
- [87] W. Mock, N. Shih, Structure and selectivity in host guest complexes of cucurbituril, *Journal of Organic Chemistry*. 51, **1986**, 4440-4446.
- [88] W. Mock, N. Shih, Organic ligand receptor interactions between cucurbituril and alkylammonium ions, *Journal of the American Chemical Society*. 110, **1988**, 4706-4710.

- [89] W. Mock, N. Shih, Dynamics of molecular recognition involving cucurbituril, *Journal of the American Chemical Society*. 111, **1989**, 2697-2699.
- [90] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, The cucurbit[n]uril family, *Angewandte Chemie-International Edition*. 44, **2005**, 4844-4870.
- [91] K. Jansen, H. Buschmann, A. Wego, D. Dopp, C.A.D. Mayer Hj, H. Holdt, E. Schollmeyer, Cucurbit[5]uril, decamethylcucurbit[5]uril and cucurbit[6]uril. synthesis, solubility and amine complex formation, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 39, **2001**, 357-363.
- [92] H. Buschmann, E. Cleve, K. Jansen, E. Schollmeyer, Determination of complex stabilities with nearly insoluble host molecules: cucurbit[5]uril, decamethylcucurbit[5]uril and cucurbit[6]uril as ligands for the complexation of some multicharged cations in aqueous solution, *Analytica Chimica Acta*. 437, **2001**, 157-163.
- [93] G. Zhang, Z. Xu, S. Xue, Q. Zhu, Z. Tao, A new family of cage compounds - cucurbit[n]urils: (II) influence of acidity, alkaline and alkaline-earth metal ions on solubility, *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*. 19, **2003**, 655-659.
- [94] Y. Shen, S. Xue, Y. Zhao, Q. Zhu, Z. Tao, NMR Study on self-assembled cage complex of hexamethylenetetramine and cucurbit[n]urils, *Chinese Science Bulletin*. 48, **2003**, 2694-2697.
- [95] D. Rudkevich, Emerging supramolecular chemistry of gases, *Angewandte Chemie-International Edition*. 43, **2004**, 558-571.
- [96] Y. Miyahara, K. Abe, T. Inazu, "Molecular" molecular sieves: lid-free decamethylcucurbit[5]uril absorbs and desorbs gases selectively, *Angewandte Chemie-International Edition*. 41, **2002**, 3020-3023.
- [97] Y. Shen, S. Xue, Y. Zhao, Q. Zhu, Z. Tao, NMR Study on self-assembled cage complex of hexamethylenetetramine and cucurbit[n]urils, *Chinese Science Bulletin*. 48, **2003**, 2694-2697.
- [98] B.D. Wagner, N. Stojanovic, A.I. Day, R.J. Blanch, Host properties of cucurbit[7]uril: fluorescence enhancement of anilino-naphthalene sulfonates, *Journal of Physical Chemistry B*. 107, **2003**, 10741-10746.
- [99] H.J. Kim, W.S. Jeon, Y.H. Ko, K. Kim, Inclusion of methylviologen in cucurbit[7]uril, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, **2002**, 5007-5011.
- [100] W. Ong, M. Gomez-Kaifer, A.E. Kaifer, Cucurbit[7]uril: a very effective host for viologens and their cation radicals, *Organic Letters*. 4, **2002**, 1791-1794.
- [101] W. Ong, A.E. Kaifer, Molecular encapsulation by cucurbit[7]uril of the apical 4,4'-bipyridinium residue in newkome-type dendrimers, *Angewandte Chemie-International Edition*. 42, **2003**, 2164-2167.
- [102] K. Moon, A. Kaifer, Modes of binding interaction between viologen guests and the cucurbit[7]uril host, *Organic Letters*. 6, **2004**, 185-188.
- [103] W. Ong, A.E. Kaifer, Unusual electrochemical properties of the inclusion complexes of ferrocenium and cobaltocenium with cucurbit[7]uril, *Organometallics*. 22, **2003**, 4181-4183.
- [104] A.E. Kaifer, W. Li, S. Yi, Cucurbiturils as versatile receptors for redox active substrates, *Israel Journal of Chemistry*. 51, **2011**, 496-505.
- [105] S. Gadde, A.E. Kaifer, Cucurbituril complexes of redox active guests, *Current Organic Chemistry*. 15, **2011**, 27-38.
- [106] V. Sindelar, S. Silvi, A.E. Kaifer, Switching a molecular shuttle on and off: simple, pH-controlled pseudorotaxanes based on cucurbit[7]uril, *Chemical Communications*, **2006**, 2185-2187.
- [107] S. Liu, C. Ruspic, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, P. Zavalij, L. Isaacs, The cucurbit[n]uril family: prime components for self-sorting systems, *Journal of the American Chemical Society*. 127, **2005**, 15959-15967.
- [108] H. Kim, J. Heo, W. Jeon, E. Lee, J. Kim, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, Selective inclusion of a hetero-guest pair in a molecular host: formation of stable charge-transfer complexes in cucurbit[8]uril, *Angewandte Chemie-International Edition*. 40, **2001**, 1526-1529.
- [109] M. Bush, N. Bouley, A. Urbach, Charge-mediated recognition of N-terminal tryptophan in aqueous solution by a synthetic host, *Journal of the American Chemical Society*. 127, **2005**, 14511-14517.

- [110] Y.H. Ko, E. Kim, I. Hwang, K. Kim, Supramolecular assemblies built with host-stabilized charge-transfer interactions, *Chemical Communications*, **2007**, 1305-1315.
- [111] Y.H. Ko, K. Kim, E. Kim, K. Kim, Exclusive formation of 1 : 1 and 2 : 2 complexes between cucurbit[8]uril and electron donor-acceptor molecules induced by host-stabilized charge-transfer interactions, *Supramolecular Chemistry*. **19**, **2007**, 287-293.
- [112] F. Biedermann, O.A. Scherman, Cucurbit[8]uril mediated donor-acceptor ternary complexes: a model system for studying charge-transfer interactions, *Journal of Physical Chemistry B*. **116**, **2012**, 2842-2849.
- [113] S. Jiang, X. Yang, C. Yang, M.A.Z. Tong Dapeng, Y. Wu, Guest-Size Determining the selective binding modes of cucurbit[8]uril, electron-rich guests and N-alkyl-N'-methyl-4,4'-bipyridinium, *Tetrahedron Letters*. **54**, **2013**, 1638-1644.
- [114] D. Das, O.A. Scherman, Cucurbituril: at the interface of small molecule host-guest chemistry and dynamic aggregates, *Israel Journal Of Chemistry*. **51**, **2011**, 537-550.
- [115] P. Rajgariah, A.R. Urbach, Scope of amino acid recognition by cucurbit[8]uril, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. **62**, **2008**, 251-254.
- [116] V. Ramalingam, A.R. Urbach, Cucurbit[8]uril rotaxanes, *Organic Letters*. **13**, **2011**, 4898-4901.
- [117] A. Thangavel, C. Sotiriou-Leventis, R.A.L. Dawes Nicholas, Orientation of pyrylium guests in cucurbituril hosts, *Journal of Organic Chemistry*. **77**, **2012**, 2263-2271.
- [118] P. Montes-Navajas, A. Corma, H. Garcia, Complexation and fluorescence of tricyclic basic dyes encapsulated in cucurbiturils, *Chemphyschem*. **9**, **2008**, 713-720.
- [119] A. Flinn, G. Hough, J. Stoddart, D. Williams, Decamethylcucurbit[5]uril, *Angewandte Chemie-International Edition In English*. **31**, **1992**, 1475-1477.
- [120] J.Z. Zhao, H.J. Kim, J. Oh, S.Y. Kim, J.W. Lee, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, Cucurbit[n]uril derivatives soluble in water and organic solvents, *Angewandte Chemie-International Edition*. **40**, **2001**, 4233-4235.
- [121] J.W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.J. Kim, K. Kim, Cucurbituril homologues and derivatives: new opportunities in supramolecular chemistry, *Accounts of Chemical Research*. **36**, **2003**, 621-630.
- [122] H. Isobe, N. Tomita, J. Lee, H. Kim, K. Kim, E. Nakamura, Ternary complexes between DNA, polyamine, and cucurbituril: a modular approach to dna-binding molecules, *Angewandte Chemie-International Edition*. **39**, **2000**, 4257.
- [123] J. Lagona, J. Fettingner, L. Isaacs, Cucurbit[n]uril analogues, *Organic Letters*. **5**, **2003**, 3745-3747.
- [124] S. Jon, N. Selvapalam, D. Oh, J. Kang, S. Kim, Y. Jeon, J. Lee, K. Kim, Facile synthesis of cucurbit[n]uril derivatives via direct functionalization: expanding utilization of cucurbit[n]uril, *Journal of the American Chemical Society*. **125**, **2003**, 10186-10187.
- [125] S. Jon, N. Selvapalam, D. Oh, J. Kang, S. Kim, Y. Jeon, J. Lee, K. Kim, Facile synthesis of cucurbit[n]uril derivatives via direct functionalization: expanding utilization of cucurbit[n]uril, *Journal of the American Chemical Society*. **125**, **2003**, 10186-10187.
- [126] L. Isaacs, The mechanism of cucurbituril formation, *Israel Journal of Chemistry*. **51**, **2011**, 578-591.
- [127] S. Liu, K. Kim, L. Isaacs, Mechanism of the conversion of inverted CB[6] To CB[6], *Journal of Organic Chemistry*. **72**, **2007**, 6840-6847.
- [128] M.M. Ahmed, K. Koga, M. Fukudome, H. Sasaki, D.Q. Yuan, Synthesis and binding behaviors of monomethyl cucurbit[6]uril, *Tetrahedron Letters*. **52**, **2011**, 4646-4649.
- [129] N. Zhao, G.O. Lloyd, O.A. Scherman, Monofunctionalised cucurbit[6]uril synthesis using imidazolium host-guest complexation, *Chemical Communications*. **48**, **2012**, 3070-3072.
- [130] K. Kim, N. Selvapalam, Y.H. Ko, K.M. Park, D. Kim, J. Kim, Functionalized cucurbiturils and their applications, *Chemical Society Reviews*. **36**, **2007**, 267-279.
- [131] H. Zhang, Y. Huang, S. Xue, Z. Tao, Q. Zhu, Host-guest interactions of 6-benzyladenine with normal and modified cucurbituril: H-1 NMR, UV absorption spectroscopy and phase solubility methods, *Supramolecular Chemistry*. **23**, **2011**, 527-532.
- [132] P.H. Dixit, R.V. Pinjari, S.P. Gejji, Electronic structure and H-1 NMR chemical shifts in host-guest complexes of cucurbit[6]uril and sym-tetramethyl cucurbit[6]uril with imidazole derivatives, *Journal of Physical Chemistry A*. **114**, **2010**, 10906-10916.

- [133] Y. Hu, K. Chen, J. Liu, R. Lin, W. Sun, S. Xue, Q. Zhu, Z. Tao, Complexation of decamethylcucurbit[5]uril with alkali metal ions, *Polyhedron*. 31, **2012**, 632-637.
- [134] J.B. Wittenberg, P.Y. Zavalij, L. Isaacs, Supramolecular ladders from dimeric cucurbit[6]uril, *Angewandte Chemie-International Edition*. 52, **2013**, 3690-3694.
- [135] S.M. Liu, L. Xu, C.T. Wu, Y.Q. Feng, Preparation and characterization of perhydroxyl-cucurbit[6]uril bonded silica stationary phase for hydrophilic-interaction chromatography, *Talanta*. 64, **2004**, 929-934.
- [136] W.J. Cheong, J.H. Go, Y.S. Baik, S.S. Kim, E.R. Nagarajan, N. Selvapalam, Y.H. Ko, K. Kim, Preparation of cucurbituril anchored silica gel by cross polymerization and its chromatographic applications, *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 29, **2008**, 1941-1945.
- [137] E. Nagarajan, D. Oh, N. Selvapalam, Y. Ko, K.A.K. Park K., Cucurbituril anchored silica gel, *Tetrahedron Letters*. 47, **2006**, 2073-2075.
- [138] I. Hwang, K. Baek, M. Jung, Y. Kim, K.M. Park, D.W. Lee, N. Selvapalam, K. Kim, Noncovalent immobilization of proteins on a solid surface by cucurbit[7]uril-ferrocenemethylammonium pair, a potential replacement of biotin-avidin pair, *Journal of the American Chemical Society*. 129, **2007**, 4170-4171.
- [139] X. Huang, F. Hu, H. Su, Facile syntheses of cucurbit[6]uril-anchored polymers and their noncovalent modification, *Macromolecules*. 46, **2013**, 1274-1282.
- [140] K. Kim, W. Jeon, J. Kang, J. Lee, S. Jon, T. Kim, K. Kim, A pseudorotaxane on gold: formation of self-assembled monolayers, reversible dethreading and rethreading of the ring, and ion-gating behavior, *Angewandte Chemie-International Edition*. 42, **2003**, 2293-2296.
- [141] K. Kim, D. Kim, J.W. Lee, Y.H. Ko, K. Kim, Growth of poly(pseudorotaxane) on gold using host-stabilized charge-transfer interaction, *Chemical Communications*, **2004**, 848-849.
- [142] J. Kang, I. Hwang, Y.H. Ko, Jeon, Woo Sung And Kim, Hee-Joon, K. Kim, Electrochemically controllable reversible formation of cucurbit[8]uril-stabilized charge-transfer complex on surface, *Supramolecular Chemistry*. 20, **2008**, 149-155.
- [143] K. Hoffmann, R. Mix, J.F. Friedrich, H. Buschmann, U. Resch-Genger, Anchoring of fluorophores to plasma-chemically modified polymer surfaces and the effect of cucurbit[6]uril on dye emission, *Journal of Fluorescence*. 19, **2009**, 229-237.
- [144] F. Tian, N. Cheng, N. Nouvel, J. Geng, O.A. Scherman, Site-selective immobilization of colloids on Au substrates via a noncovalent supramolecular handcuff, *Langmuir*. 26, **2010**, 5323-5328.
- [145] Q. An, G.T. Li, C.G. Tao, Y. Li, Y.G. Wu, W.X. Zhang, A general and efficient method to form self-assembled cucurbit[n]uril monolayers on gold surface, *Chemical Communications*, **2008**, 1989-1991.
- [146] J.F. Young, H.D. Nguyen, L. Yang, J. Huskens, P. Jonkheijm, L. Brunsveld, Strong and reversible monovalent supramolecular protein immobilization, *ChemBiochem*. 11, **2010**, 180-183.
- [147] P. Neiryneck, J. Brinkmann, Q. An, D.W.J. Van Der Schaft, L. Milroy, P. Jonkheijm, L. Brunsveld, Supramolecular control of cell adhesion via ferrocene-cucurbit[7]uril host-guest binding on gold surfaces, *Chemical Communications*. 49, **2013**, 3679-3681.
- [148] D. Wasserberg, D.A. Uhlenheuer, P.A.C. Neiryneck Jordi, J.H. Schenkel, B.J. Ravoo, Q. An, J. Huskens, L. Milroy, L. Brunsveld, P. Jonkheijm, Immobilization of ferrocene-modified snap-fusion proteins, *International Journal of Molecular Sciences*. 14, **2013**, 4066-4080.
- [149] A. Gomez-Casado, P. Jonkheijm, J. Huskens, Recognition properties of cucurbit[7]uril self-assembled monolayers studied with force spectroscopy, *Langmuir*. 27, **2011**, 11508-11513.
- [150] E. Blanco, C. Quintana, L. Hernandez, P. Hernandez, Atomic force microscopy study of new sensing platforms: cucurbit[n]uril, *Electroanalysis*. 25, **2013**, 263-268.
- [151] M. Freitag, E. Galoppini, Cucurbituril complexes of viologens bound to TiO₂ films, *Langmuir*. 26, **2010**, 8262-8269.
- [152] G.J.F. Demets, B.V.S. Schneider, H.D. Correia, R.R. Goncalves, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, A technique to produce thin cucurbit[6]uril films, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 8, **2008**, 432-435.

- [153] H.D. Correia, G.J. Demets, Cucurbit[6]uril/pvc-based semipermeable membranes as electrode modifiers for electrochemical investigation of insoluble substrates, *Electrochemistry Communications*. 11, **2009**, 1928-1931.
- [154] K. Kim, W. Jeon, J. Kang, J. Lee, S. Jon, T. Kim, K. Kim, A pseudorotaxane on gold: formation of self-assembled monolayers, reversible dethreading and rethreading of the ring, and ion-gating behavior, *Angewandte Chemie-International Edition*. 42, **2003**, 2293-2296.
- [155] S. Angelos, Y. Yang, K. Patel, J.F. Stoddart, J.I. Zink, Ph-responsive supramolecular nanovalves based on cucurbit[6]uril pseudorotaxanes, *Angewandte Chemie-International Edition*. 47, **2008**, 2222-2226.
- [156] Y. Klichko, N.M. Khashab, Y.W. Yang, S. Angelos, J.F. Stoddart, J.I. Zink, Improving pore exposure in mesoporous silica films for mechanized control of the pores, *Microporous and Mesoporous Materials*. 132, **2010**, 435-441.
- [157] J. Croissant, J.I. Zink, Nanovalve-controlled cargo release activated by plasmonic heating, *Journal of the American Chemical Society*. 134, **2012**, 7628-7631.
- [158] Y.J. Jeon, S.Y. Kim, Y.H. Ko, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, Novel molecular drug carrier: encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug, *Organic & Biomolecular Chemistry*. 3, **2005**, 2122-2125.
- [159] K.M. Park, K. Suh, H. Jung, D.W. Lee, Y. Ahn, J. Kim, K. Baek, K. Kim, Cucurbituril-based nanoparticles: a new efficient vehicle for targeted intracellular delivery of hydrophobic drugs, *Chemical Communications*, **2009**, 71-73.
- [160] G. Hettiarachchi, D. Nguyen, J. Wu, D. Lucas, D. Ma, L. Isaacs, V. Briken, Toxicology And Drug Delivery By Cucurbit[N]uril Type Molecular Containers, *Plos One*. 5, **2010**, E10514.
- [161] K.M. Park, D.W. Lee, B. Sarkar, H. Jung, J.A.K. Kim Y.H., K.E. Lee, H. Jeon, K. Kim, Reduction-sensitive, robust vesicles with a non-covalently modifiable surface as a multifunctional drug-delivery platform, *Small*. 6, **2010**, 1430-1441.
- [162] Y. Sun, B. Yang, S.X. Zhang, Y. Yang, Cucurbit[7]uril pseudorotaxane-based photoresponsive supramolecular nanovalve, *Chemistry-A European Journal*. 18, **2012**, 9212-9216.
- [163] D.H. Macartney, Encapsulation of drug molecules by cucurbiturils: effects on their chemical properties in aqueous solution, *Israel Journal of Chemistry*. 51, **2011**, 600-615.
- [164] S. Walker, R. Oun, F.J. McInnes, N.J. Wheate, The potential of cucurbit[n]urils in drug delivery, *Israel Journal of Chemistry*. 51, **2011**, 616-624.
- [165] Y. Jeon, H. Kim, S. Jon, N. Selvapalam, D. Oh, I. Seo, C. Park, S. Jung, D. Koh, K. Kim, Artificial ion channel formed by cucurbit[n]uril derivatives with a carbonyl group fringed portal reminiscent of the selectivity filter of K⁺ channels, *Journal of the American Chemical Society*. 126, **2004**, 15944-15945.
- [166] H. Lee, K. Park, Y. Jeon, D. Kim, D. Oh, H. Kim, C. Park, K. Kim, Vesicle formed by amphiphilic cucurbit[6]uril: versatile, noncovalent modification of the vesicle surface, and multivalent binding of sugar-decorated vesicles to lectin, *Journal of the American Chemical Society*. 127, **2005**, 5006-5007.
- [167] D. Tuncel, H.B. Tiftik, B. Salih, Ph-responsive polypseudorotaxane synthesized through cucurbit[6]uril catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition, *Journal of Materials Chemistry*. 16, **2006**, 3291-3296.
- [168] R.B. Wang, L.N. Yuan, D.H. Macartney, Cucurbit[7]uril mediates the stereoselective [4+4] photodimerization of 2-aminopyridine hydrochloride in aqueous solution, *Journal of Organic Chemistry*. 71, **2006**, 1237-1239.
- [169] C. Gomes Silva, M. De Miguel, B. Ferrer, M. Alvaro, H. Garcia, Enhanced efficiency of the visible-light photocatalytic hydrogen generation by the ruthenium tris(2,2'-bipyridyl)-methyl viologen system in the presence of cucurbit[n]urils, *Photochemical & Photobiological Sciences*. 8, **2009**, 1650-1654.
- [170] V.V. Bakovets, V.A. Nadolinniy, S.B. Erenburg, A.M. Kuznetsov, I.P. Dolgovesova, Hydrogen reduction of the Cu(Acac)(2) complex sorbed by cucurbit[8]uril, *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 55, **2010**, 1897-1902.

- [171] B.C. Pemberton, N. Barooah, D.K. Srivatsava, J. Sivaguru, Supramolecular photocatalysis by confinement-photodimerization of coumarins within cucurbit[8]urils, *Chemical Communications*. 46, **2010**, 225-227.
- [172] B. Chen, S.F. Cheng, G.H. Liao, X.W. Li, L.P. Zhang, C.H. Tung, L.Z. Wu, Efficient and selective photodimerization of 2-naphthalenecarbonitrile mediated by cucurbit[8]uril in an aqueous solution, *Photochemical & Photobiological Sciences*. 10, **2011**, 1441-1444.
- [173] C. Hang, Z. Fang-Fang, Z. Jian-Xin, Z. Xi, T. Zhu, X. Sai-Feng, Z. Qian-Jiang, Rapid transformation of benzylic alcohols to aldehyde in the presence of cucurbit[8]uril, *Catalysis Communications*. 11, **2009**, 167-170.
- [174] M.N. Cao, J.X. Lin, H.X. Yang, R. Cao, Facile synthesis of palladium nanoparticles with high chemical activity using cucurbit[6]uril as protecting agent, *Chemical Communications*. 46, **2010**, 5088-5090.
- [175] S.M. De Lima, J.A. Gomez, V.P. Barros, G.D.S. Vertuan, M.D.D. Assis, C.F. De Oliveira Graeff, G.J. Demets, A new oxovanadium(IV)-cucurbit[6]uril complex: properties and potential for confined heterogeneous catalytic oxidation reactions, *Polyhedron*. 29, **2010**, 3008-3013.
- [176] M. Cao, J. Lin, J. Lue, Y. You, T. Liu, R. Cao, Development of a polyoxometallate-based photocatalyst assembled with cucurbit[6]uril via hydrogen bonds for azo dyes degradation, *Journal of Hazardous Materials*. 186, **2011**, 948-951.
- [177] M.V.S.N. Maddipatla, M. Pattabiraman, A. Natarajan, K. Srivastav, J.T. Mague, V. Ramamurthy, Regioselective photodimerization of pyridyl-butadienes within cucurbit[8]uril cavities, *Organic & Biomolecular Chemistry*. 10, **2012**, 9219-9222.
- [178] Y. Huang, S. Xue, Z. Tao, Q. Zhu, Y. Ma, S. Zhong, Voltammetric studies of the interaction of 6-mercaptopurine with cucurbit[7]uril and DNA, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 69, **2011**, 131-137.
- [179] S. Lim, H. Kim, N. Selvapalam, Kim, Kyung-Jin And Cho, Sung June, G. Seo, K. Kim, Cucurbit[6]uril: organic molecular porous material with permanent porosity, exceptional stability, and acetylene sorption properties, *Angewandte Chemie-International Edition*. 47, **2008**, 3352-3355.
- [180] L.A. Baumes, M.B. Sogo, P.A.C. Montes-Navajas Avelino, H. Garcia, First colorimetric sensor array for the identification of quaternary ammonium salts, *Tetrahedron Letters*. 50, **2009**, 7001-7004.
- [181] L.A. Baumes, M. Buaki, P. Montes-Navajas, A.A.G. Corma H., A general purpose sensor array for the identification of organic compounds in aqueous media, *Sensor Letters*. 8, **2010**, 698-708.
- [182] L.A. Baumes, M.B. Sogo, P. Montes-Navajas, A.A.G. Corma H., A colorimetric sensor array for the detection of the date-rape drug gamma-hydroxybutyric acid (GHB): a supramolecular approach, *Chemistry-A European Journal*. 16, **2010**, 4489-4495.
- [183] P. Montes-Navajas, L.A. Baumes, A. Corma, H. Garcia, Dual-response colorimetric sensor array for the identification of amines in water based on supramolecular host-guest complexation, *Tetrahedron Letters*. 50, **2009**, 2301-2304.
- [184] Y.Y. Zhou, H.P. Yu, L. Zhang, H.W. Xu, L.A. Wu, J.Y. Sun, L. Wang, A new spectrofluorometric method for the determination of nicotine base on the inclusion interaction of methylene blue and cucurbit[7]uril, *Microchimica Acta*. 164, **2009**, 63-68.
- [185] Y.X. Chang, Y.Q. Qiu, L.M. Du, C.F. Li, M. Guo, Determination of ranitidine, nizatidine, and cimetidine by a sensitive fluorescent probe, *Analyst*. 136, **2011**, 4168-4173.
- [186] J. Xu, D. Li-Ming, W. Hao, W. Wen-Ying, C. Yin-Xia, Determination of pesticide residue cartap using a sensitive fluorescent probe, *Journal of Integrative Agriculture*. 11, **2012**, 1861-1870.
- [187] G. Wang, L. Du, Y. Guo, Y.A.W. Qin Jun-Wen, H. Wu, Study on the supramolecular interaction of astemizole with cucurbit[7]uril and its analytical application, *Analytical Methods*. 5, **2013**, 173-179.
- [188] G. Wang, Y. Qin, L. Du, J.A.J. Li Xu, Y. Chang, H. Wu, Determination of amantadine and rimantadine using a sensitive fluorescent probe, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 98, **2012**, 275-281.
- [189] X. Xing, Y. Zhou, J. Sun, D.A.L. Tang Tao, K. Wu, Determination of paraquat by cucurbit[7]uril sensitized fluorescence quenching method, *Analytical Letters*. 46, **2013**, 694-705.

- [190] C. Li, L. Du, W. Wu, A. Sheng, Supramolecular interaction of cucurbit[n]urils and coptisine by spectrofluorimetry and its analytical application, *Talanta*. 80, **2010**, 1939-1944.
- [191] C. Li, L. Du, H. Zhang, Study on the inclusion interaction of cucurbit[n]urils with sanguinarine by spectrofluorimetry and its analytical application, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 75, **2010**, 912-917.
- [192] Y. Zhou, J. Yang, M. Liu, S. Wang, Q. Lu, A novel fluorometric determination of melamine using cucurbit[7]uril, *Journal of Luminescence*. 130, **2010**, 817-820.
- [193] N. Dong, L.N. Cheng, X.L. Wang, Q. Li, C.Y. Dai, Z. Tao, Significant fluorescence enhancement by supramolecular complex formation, *Talanta*. 84, **2011**, 684-689.
- [194] V.N.S. Occello, A.V. Veglia, Cucurbit[6]uril nanocavity as an enhanced spectrofluorimetric method for the determination of pyrene, *Analytica Chimica Acta*. 689, **2011**, 97-102.
- [195] Y. Huang, J. Wang, S. Xue, Z. Tao, Q. Zhu, Q. Tang, Determination of thiabendazole in aqueous solutions using a cucurbituril-enhanced fluorescence method, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 72, **2012**, 397-404.

Capítulo 2 / Chapter 2

Objetivo general / General objective

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de sensores electroquímicos basados en el empleo de las propiedades de reconocimiento molecular que presentan la familia de receptores macrocíclicos conocidos como Cucurbit[n]uriles, compuestos que serán empleados como modificadores de superficies electródicas convencionales.

Para conseguir dicho objetivo se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Estudio de las interacciones supramoleculares en disolución entre CB[n]s ($n = 6$ y 7) y distintos compuestos de interés analítico mediante técnicas espectroscópicas y electroquímicas. Desarrollo y aplicación de metodologías analíticas basadas en esas interacciones.
2. Estudio de diferentes estrategias de inmovilización de CB[n] sobre electrodos de carbón vítreo. Se estudiará el comportamiento de cada una de las modificaciones en función de la carga que presente el analito, con el fin de seleccionar el sensor más adecuado para cada problema analítico.
3. Aplicación de los sensores desarrollados en el análisis de compuestos de interés biológico. Estudio de la viabilidad de utilización de estos sensores como detectores en sistemas de análisis en continuo.
4. Mejora de la sensibilidad de las metodologías propuestas. Por último, se llevará a cabo el desarrollo de nuevas plataformas sensoras mediante el empleo de superficies electródicas que permitan compensar la disminución de señal producida como consecuencia de la reacción de formación de complejos en la que se basen los sensores desarrollados.

Capítulo 3 / Chapter 3

Materiales y métodos / Materials and methods

3.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados durante el desarrollo de esta tesis se indican a continuación:

Cucurbit[6]uril (97%), cucurbit[7]uril (99%), cucurbit[8]uril, carbendazim (99%), tiabendazol (99.8%), diuron (99.5%), tiametoxam (99.7%), benomilo (99.4%), polvo de grafito, aceite de parafina, L- triptófano (99%), dopamina, ácido ascórbico, ácido úrico (99%), L- tirosina (>99%), L-cisteína (99%), D-fenilalanina (98%), arginina (>99%), lisina (>98%), acetilcolina (>99%), ferroceno dimetanol, 6-hexanotiol ferroceno y 5-pentanotiol, todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich Chemical Co (Saint Louis, USA).

Los polímeros cloruro de polivinilo y Nafion (Nafion perflorado, disolución al 5% en peso en alcoholes alifáticos de cadena corta y agua), que fueron utilizados para inmovilizar el CB[8] en la superficie electródica, se obtuvieron de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). La membrana de diálisis (10K MWCO) utilizada para el mismo propósito que los polímeros mencionados anteriormente, fue suministrada por Cultek (Madrid, España).

Para el pulido de los electrodos de carbón vítreo se utilizó polvo de alúmina de 0.3 μm adquirida a Buheler (USA).

Hidroximetil ferroceno, ferrocianuro potásico, ferricianuro potásico y metil viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina), obtenidos de Sigma Aldrich Co. (St Louis, USA), se utilizaron como sondas para el estudio de la inmovilización de CB[8] en las medidas realizadas en voltamperometría cíclica y espectroscopia de impedancia electroquímica.

Para la preparación de muestras mediante dispersión de matriz en fase sólida, se empleó C18 (55-105 μm) de Waters (Milford, USA); arena de mar (0.25 – 0.30 mm) suministrada por Panreac (Barcelona, España) y nitrógeno (99.9992%) de Carburos Metálicos (Madrid, España).

El baño de oro (ECF-60) utilizado para la electrodeposición de los electrodos macroporosos fue suministrado por Metalor. La cisteamina utilizada en la modificación de las placas de oro fue suministrada por Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA).

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad analítica obtenidos de Scharlau (Barcelona, España). El agua desionizada ultrapura fue obtenida con el sistema Siemens Ultraclear TWF EDi UV Reverse Osmosis systems.

3.2. Instrumentación.

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en un potenciostato/galvanostato μ -Autolab (Type III y Gpes software) (Metrohm, España) empleando un electrodo de Ag/AgCl/KCl (3M) como electrodo de referencia, un contraelectrodo de platino y el electrodo de trabajo correspondiente en cada caso.

Para las medidas de espectroscopia de impedancia electroquímica se utilizó un analizador de respuesta en frecuencia (Fra II) de Eco-Chemie acoplado a un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 302N de Eco-Chemie (Utrecht, The Netherlands).

En el caso de las medidas electroquímicas en flujo, se empleó una célula comercial de tipo wall-jet, con un electrodo auxiliar de Au incorporado, un electrodo de trabajo de carbón vítreo modificado con CB[8] y un electrodo de referencia de Ag/AgCl KCl (3M).

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro HITACHI F-7000 (Genesys Instrumentation, S.L., Madrid, España).

Para la preparación de las muestras se empleó un triturador (Moulinex 1,2,3) y un sistema de extracción a vacío (Micron Analítica, Madrid, España) así como un concentrador de extractos Techne DRIBLOCK DB 20 equipado con control de temperatura y flujo de nitrógeno (Genesys Instrumentation, S.L., Madrid, España). Los cartuchos de extracción utilizados fueron de 4 ml de capacidad (0.8 cm x 6.5 cm) y suministrados por Varian, España.

En la preparación de disoluciones y/o suspensiones se utilizó un baño de ultrasonidos Transonic 570/ H Elma y un pH-metro METROHM modelo 827 provisto de electrodo combinado de vidrio y Ag/AgCl/KCl (3M) y termopar de la misma marca.

Se utilizó el programa ChemBio3D (versión 11.0.1) para realizar la modelización de los complejos formados mediante cálculos de mínima energía.

Todos los estudios de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas fueron realizados por el sistema interdepartamental de investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados con un equipo BRUKER AMX-500 y los espectros de masas fueron realizados mediante ensayos en MALDI en el equipo ULTRAFLEX III (MALDI-TOF/TOF) de Bruker (Bruker BioSciences Española S.A., Madrid, España).

Los experimentos de análisis elemental fueron realizados en un analizador FISIONS EA 1108 CHNO-S y los espectros Raman se registraron en un espectrofotómetro Renishaw Invia Raman Microscopy system, utilizando para la excitación de las muestras la línea 514.5 nm de un láser de diodo refrigerado por aire Renishaw (HPNIR) con un detector CCD refrigerado por Peltier. La potencia del láser sobre las muestras fue de 15 o 30 mW.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión fueron adquiridas empleando un microscopio Philips CM300 FEG, trabajando a un voltaje de 100 kV. Los experimentos de espectroscopia Raman, análisis elemental y microscopía electrónica de transmisión se realizaron en el Instituto de Tecnología Química de Valencia.

Las imágenes de microscopía de fuerza atómica, realizadas dentro del grupo de investigación, se adquirieron con un microscopio “Dulcinea” de Nanotec Electrónica S.L., (España) trabajando en modo dinámico. Las imágenes obtenidas fueron procesadas empleando el programa WSxM de la misma compañía. Las superficies utilizadas fueron de carbón pirolítico altamente ordenado obtenidas de NT-MDT (Moscú, Rusia).

La preparación de los electrodos macroporosos se realizó en el Instituto de Ciencias Moleculares de la Universidad de Burdeos 1 (Burdeos, Francia) durante la estancia realizada en el grupo Nanosystèmes Analytiques. Para ello se utilizó un equipo Nima de Langmuir-Blodgett controlado por el programa Nima TR 7.8.

3.3. Procedimientos.

Para la preparación de la superficie de los electrodos de carbón vítreo se realiza el siguiente procedimiento: se pule la superficie con una suspensión de polvo de alúmina de 0.3 μm durante un minuto. Posteriormente, la superficie del electrodo se lava con abundante agua desionizada para eliminar cualquier resto de alúmina y a continuación, se somete a ultrasonidos alternativamente en etanol (30 s) y agua desionizada (30 s) durante 3 minutos. Por último, se seca la superficie del electrodo con una corriente de N_2 (g).

El resto de procedimientos particulares seguidos serán especificados en cada capítulo.

Capítulo 4 / Chapter 4

Estudio y caracterización de la interacción entre cucurbit[n]uriles (n = 6 y 7) y el fungicida carbendazim. Desarrollo de métodos analíticos basados en esta interacción y su aplicación en muestras reales.

Study and characterization of the interaction between cucurbit[n]urils (n = 6 y 7) and carbendazim. Analytical methods development based on this interaction and their application in real samples.

4.1. Introducción.

Durante los últimos años, la capacidad de formación de complejos de inclusión de los CB[n]s con diferentes tipos de huéspedes, junto con la síntesis de sus diferentes homólogos y la derivatización de éstos, han sido los campos de estudio más explorados con respecto a estos compuestos macrocíclicos.

El uso de técnicas espectroscópicas ha permitido elucidar las diferentes interacciones que intervienen en la formación de los complejos de inclusión [1, 2]. Igualmente, utilizando técnicas como la espectroscopia de fluorescencia y la voltamperometría cíclica (CV) se ha estudiado la respuesta de distintos huéspedes con la formación del complejo, o la influencia que diferentes iones presentes en el medio de trabajo, pueden tener en la formación del mismo. Sin embargo, el desarrollo de métodos analíticos basados en interacciones supramoleculares con esta familia de receptores macrocíclicos ha estado, y sigue estando, poco explorado respecto al resto de estudios realizados siendo, alrededor del año 2009, cuando comienzan a aparecer algunos ejemplos de métodos analíticos basados en el empleo de CB[n]s [3-5].

Por otro lado, a pesar de las ventajas que se derivan del uso de las técnicas electroquímicas como pueden ser la alta sensibilidad, la posible miniaturización y el bajo coste, este tipo de técnicas han sido fundamentalmente utilizadas para el estudio del comportamiento de los complejos formados entre compuestos electroactivos y los CB[n]s. Así, se ha monitorizado la formación de los complejos mediante los cambios producidos en el potencial e intensidad de las señales, calculándose los coeficientes de difusión y constantes de transferencia de carga de estos sistemas [2].

Partiendo de esta situación, se planteó, como inicio de esta tesis, el estudio de la formación de los complejos de dos homólogos de CB[n]s, CB[6] y CB[7], con el fungicida carbendazim (CBZ) utilizando técnicas espectroscópicas y electroquímicas para monitorizar, tanto la formación del complejo, como el comportamiento de éste en disolución.

El CBZ es un fungicida de la familia de los benzimidazoles, compuestos ampliamente utilizados en la agricultura para el control de una gran variedad de especies de insectos que pueden afectar a frutas y vegetales. El CBZ es de acción rápida y puede ser utilizado bien sobre las plantas, o bien en tratamiento sobre el suelo y

semillas, así como para la desinfección de esquejes y bulbos. Es usado como agente protector, de forma anterior a la cosecha, para prevenir algunas enfermedades tales como la *Botrytis Cinerea* en frutas y vegetales, la *Pseudocercospora* en cereales, la *Septoria* en tomate o el *Gleosporium* en plátano y té. También es utilizado tras la cosecha para evitar la putrefacción de frutas y verduras durante su almacenamiento [6, 7].

Es un fungicida químicamente estable que empezó a comercializarse en la década de los 70. Es absorbido por la planta, a través de sus raíces, semillas u hojas, siendo transferido al resto de la misma protegiéndola de un ataque por hongos patógenos o limitando una infección [8].

Su mecanismo de acción en el interior de las plantas se basa en su capacidad de interferir en la fase de mitosis de los hongos, inhibiendo la formación de los microtúbulos y produciendo pérdida en la locomoción dirigida de las células y en su división. Concentraciones bajas de estos fungicidas inhiben la elongación del micelo y las altas actúan sobre la germinación de esporas [9, 10].

Debido a la escasa solubilidad en agua del CBZ, junto con él son utilizados otros fungicidas cuyas características hacen que sean más fácilmente absorbidos por las plantas y cuya descomposición en el interior de las mismas da lugar a CBZ. Como ejemplo, se ha comprobado que el benomilo es fácilmente transformado en disolución acuosa en CBZ y el metiltiofanato se degrada sufriendo una ciclación que genera CBZ como producto.

El CBZ es una sustancia tóxica que puede permanecer en el suelo durante un periodo residual largo debido a que el anillo benzimidazólico es difícil de romper y su degradación bacteriana es lenta. El mayor inconveniente de su actividad fungicida es que resulta nocivo para el ser humano pudiendo producir malformaciones en el aparato reproductor y una disminución de la fertilidad. Por esta razón, su uso ha sido regulado por la Unión Europea estableciendo un límite máximo para diferentes tipos de productos como frutas, hortalizas, legumbres, semillas o cereales [11]. Por tanto, es necesario el desarrollo de métodos analíticos rápidos, simples, sensibles y selectivos para el análisis de CBZ.

La determinación de benzimidazoles se ha llevado a cabo empleando técnicas muy diversas. Principalmente se han utilizado espectrofluorimetría [12], cromatografía de líquidos de alta precisión con detectores de absorción UV-vis, fluorescencia o espectrometría de masas [13-18], si bien también se pueden encontrar métodos mediante electroforesis capilar con distintos detectores [19, 20]. A mediados de los años 90, se proponen métodos de determinación de CBZ empleando técnicas electroquímicas [21, 22]. Más recientemente, se han desarrollado sensores electroquímicos mediante la modificación de superficies de electrodos con diferentes compuestos como los nanotubos de carbono [23, 24], que permiten la determinación de CBZ en muestras de distinta naturaleza de forma más sensible debido al aumento en la superficie activa del electrodo.

La bibliografía presenta el estudio de la formación de complejos de CBZ con diferentes hospedadores como las ciclodextrinas y calixarenos, encontrando incluso métodos de espectroscopia raman de superficie mejorada (SERS) de nanobarras de oro modificadas con β -CD, llevándose a cabo la determinación de CBZ mediante la formación del complejo β -CD-CBZ [25].

Recientemente, Guo y col. publicaron la determinación de CBZ en un electrodo modificado con grafeno y β -CD a través del complejo β -CD-CBZ, obteniendo un sensor altamente sensible gracias a la excelente conductividad y la gran superficie que aporta el grafeno [26].

En base a estos antecedentes y debido a la necesidad de control de la concentración de CBZ en muestras para consumo humano, en este capítulo se aborda el estudio de la interacción del CBZ con los Cucurbit[n]uriles ($n = 6$ y 7), para su posterior aplicación analítica en muestras de fruta.

4.2. Objetivos parciales.

El objetivo principal de este capítulo consiste en el empleo de CB[n]s como selectores moleculares para su uso en el desarrollo de metodologías analíticas selectivas que resulten aplicables al análisis de compuestos de interés medioambiental como son los fungicidas, en este caso, el CBZ.

Como técnicas analíticas para tal fin, se emplearán, tanto técnicas espectroscópicas (espectroscopia de fluorescencia) como electroquímicas (voltamperometría diferencial de impulsos).

De acuerdo con el objetivo planteado, se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Estudio de las interacciones anfitrión-huésped que tienen lugar en disolución, entre distintos homólogos del cucurbit[n]uril (CB[6] o CB[7]) y CBZ. Elección del homólogo apropiado para la formación del complejo de inclusión CB[n]-CBZ.
2. Caracterización del complejo formado. Estudio de su estequiometría, constante de asociación y estudio electroquímico del complejo.
3. Desarrollo de métodos analíticos basados en la interacción supramolecular CB[n]-CBZ.
4. Aplicación de los métodos desarrollados al análisis de CBZ en muestras reales.

4.3. Procedimientos.

4.3.1. Preparación de las disoluciones de trabajo.

Se prepararon disoluciones de CBZ en concentración 2.59×10^{-4} M en dimetilformamida. A partir de ellas y, diariamente, se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución en el medio adecuado. Para la disolución tanto de CB[6] como de CB[7] en concentración 6.00×10^{-4} M, se utilizó NaCl en concentración 0.2 M. Las disoluciones patrón se conservaron bajo refrigeración.

4.3.2. Preparación del electrodo de trabajo.

Se utilizó un electrodo de pasta de carbono preparado mezclando, en un mortero, 0.50 g de polvo de grafito con aceite de parafina hasta conseguir una pasta homogénea. Tras empaquetarla en una jeringa de 1 ml, se introdujo un hilo de cobre para realizar el contacto eléctrico. Después de cada medida electroquímica, la superficie del electrodo se renovó puliendo el electrodo sobre un papel fino. La activación se llevó a cabo mediante la aplicación de barridos cíclicos de potencial entre 0.0 y 1.3 V en electrolito soporte, hasta la obtención de una señal reproducible.

4.3.3. Medidas electroquímicas.

La técnica electroquímica de medida elegida fue la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) registrándose los correspondientes voltamperogramas entre 0.2 y 1.2 V, con una amplitud de impulso (a) de 80 mV y una velocidad de barrido (V_b) de 10 mV/s, consecuencia de aplicar un escalón de potencial (ΔE_s) de 5 mV durante un tiempo de aplicación (t_s) de 0.5 s, en tampón $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0.05 M a pH = 4.0.

La caracterización electroquímica del complejo formado se llevó a cabo mediante CV y cronoculombimetría.

4.3.4. Medidas de fluorescencia.

Las medidas de emisión de fluorescencia fueron realizadas en una cubeta de cuarzo de 1 cm^2 de paso óptico a una longitud de onda de excitación de 280 nm. Para la determinación de CBZ se registró el espectro de emisión correspondiente al complejo CB[7]-CBZ en tampón $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, 10^{-4} M a pH 4.0 y a temperatura

ambiente. Se monitorizó la intensidad de fluorescencia de CB[7]-CBZ a una longitud de onda de 295 nm.

4.3.5. Medidas de espectrometría de masas.

Se realizaron las medidas de espectrometría de masas (MALDI-TOF) a disoluciones de CBZ de concentración 1.00×10^{-4} M en agua y disoluciones de CBZ con exceso de CB[6] y CB[7] en agua. Para ayudar en la disolución de los CB[n]s, se añadieron unas gotas de NaCl 3M hasta su completa solubilización.

4.3.6. Preparación de la muestra.

Los métodos desarrollados se aplicaron al análisis de CBZ en piel de manzanas y naranjas adquiridas en un mercado local. Como método de preparación de la muestra, se llevó a cabo un proceso de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) como se describe a continuación: una cantidad de aproximadamente 0.5 g de piel exactamente pesada, suplementada con concentraciones crecientes de CBZ, previamente triturada y homogeneizada (en el caso de piel de naranja también se seca previamente a 100 °C), se añade a un mortero de porcelana junto con 0.50 g de C18 como adsorbente y 0.20 g de arena como dispersante. La mezcla se homogeniza provocando la ruptura y dispersión de la muestra matriz y la extracción de los analitos en el adsorbente. A continuación, la mezcla se empaqueta en los cartuchos de extracción, llevando a cabo la elución con 10 ml de diclorometano mediante la aplicación de vacío. El extracto obtenido se concentra hasta sequedad bajo flujo de nitrógeno, se redisuelve en 200 μ l de metanol y tras ser filtrado a través de un filtro de jeringa de 0.45 μ m, se diluye al volumen correspondiente para cada método. La muestra de manzana se diluyó a 10.00 ml con electrolito soporte (tampón CH₃COOH/ CH₃COONa 0.05 M) previa adición de un exceso de cinco veces de CB[7] respecto a CBZ y para la muestra de naranja se diluyó a 5.00 ml con tampón CH₃COOH/ CH₃COONa 10^{-4} M tras la adición del exceso de 10 veces de CB[7]. Las muestras fueron analizadas por triplicado y el proceso se realizó trabajando en vitrina extractora para evitar cualquier contaminación.

4.4. Resultados y discusión.

4.4.1. Estudio de formación del complejo CB[n] (n = 6, 7)-CBZ.

La formación de complejos de inclusión de CBZ con diferentes hospedadores macrocíclicos, como las α - o β - CDs y el p-sulfonatocalix[6]areno, queda recogida en distintos estudios en los que se demuestra que puede ser incluido en cavidades hidrófobas de tamaño similar al CB[6] y CB[7] [27, 28].

En 2006, Saleh y col. [29] describieron, por primera vez, la interacción CB[6]-CBZ mediante medidas espectrofluorimétricas. Estos autores observaron que la formación del complejo no sólo producía un aumento en la intensidad de fluorescencia registrada con respecto a la de CBZ, sino que ese aumento era mayor al resultante mediante la formación del complejo con las CDs. Por otra parte y mediante el cálculo de los parámetros termodinámicos correspondientes, establecieron que la inclusión de CBZ en el CB[6] resulta más favorable que en la α -CD y/o en la β -CD, calculando una constante de asociación de 271 M^{-1} en Na_2SO_4 (pH = 7.61) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para el complejo CB[6]-CBZ frente a los valores de $K_f = 14.2 \text{ M}^{-1}$ y 22.7 M^{-1} obtenidos para los complejos α -CD-CBZ y β -CD-CBZ, respectivamente (tampón fosfato pH = 7.0) [27]. Estos resultados concuerdan con otros estudios comparativos entre los complejos de CB[n]s y CDs y que los autores explican debido a la estabilización que, mediante interacciones no covalentes como enlace de hidrógeno o ión-dipolo, se pueden producir entre el grupo amida-éster del CBZ y los grupos carbonilo presentes en los portales del CB[6] (figura 4.1).

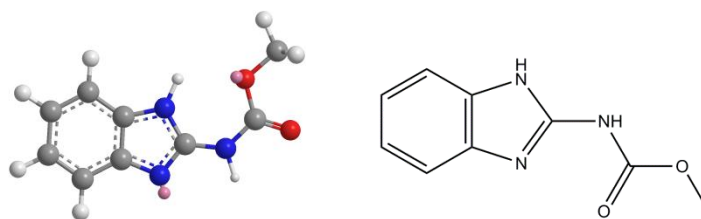


Figura 4.1. Estructura química de CBZ.

Estos experimentos llevados a cabo por Saleh y col. abren la posibilidad de utilizar las interacciones CB[n]-CBZ para el desarrollo de un método analítico altamente sensible y selectivo mediante espectroscopia de fluorescencia. Por otra parte, la mayor

solubilidad en agua del homólogo de siete unidades de glicoluril y su mayor tamaño de cavidad (semejante a β -CD), hacen pensar que pudiera ser un receptor más adecuado desde el punto de vista analítico.

Por ese motivo se decidió estudiar las interacciones de CB[6] y CB[7] con CBZ. El estudio de la interacción en disolución del CBZ con ambos homólogos se realizó tanto, mediante medidas de emisión de fluorescencia, como monitorizando la respuesta electroquímica del CBZ mediante DPV, con el objetivo posterior de utilizar este receptor para el desarrollo de sensores electroquímicos.

La confirmación de la formación del complejo del CBZ tanto con el CB[6] como con el CB[7] se obtuvo además de con las técnicas anteriormente indicadas, mediante espectrometría de masas. En los dos primeros casos, se produce una variación en la intensidad de la señal analítica, bien con un aumento de la intensidad de fluorescencia (I_f), o bien mediante una disminución de la intensidad de pico (I_p), como se muestra en la figura 4.2 para el homólogo CB[7].

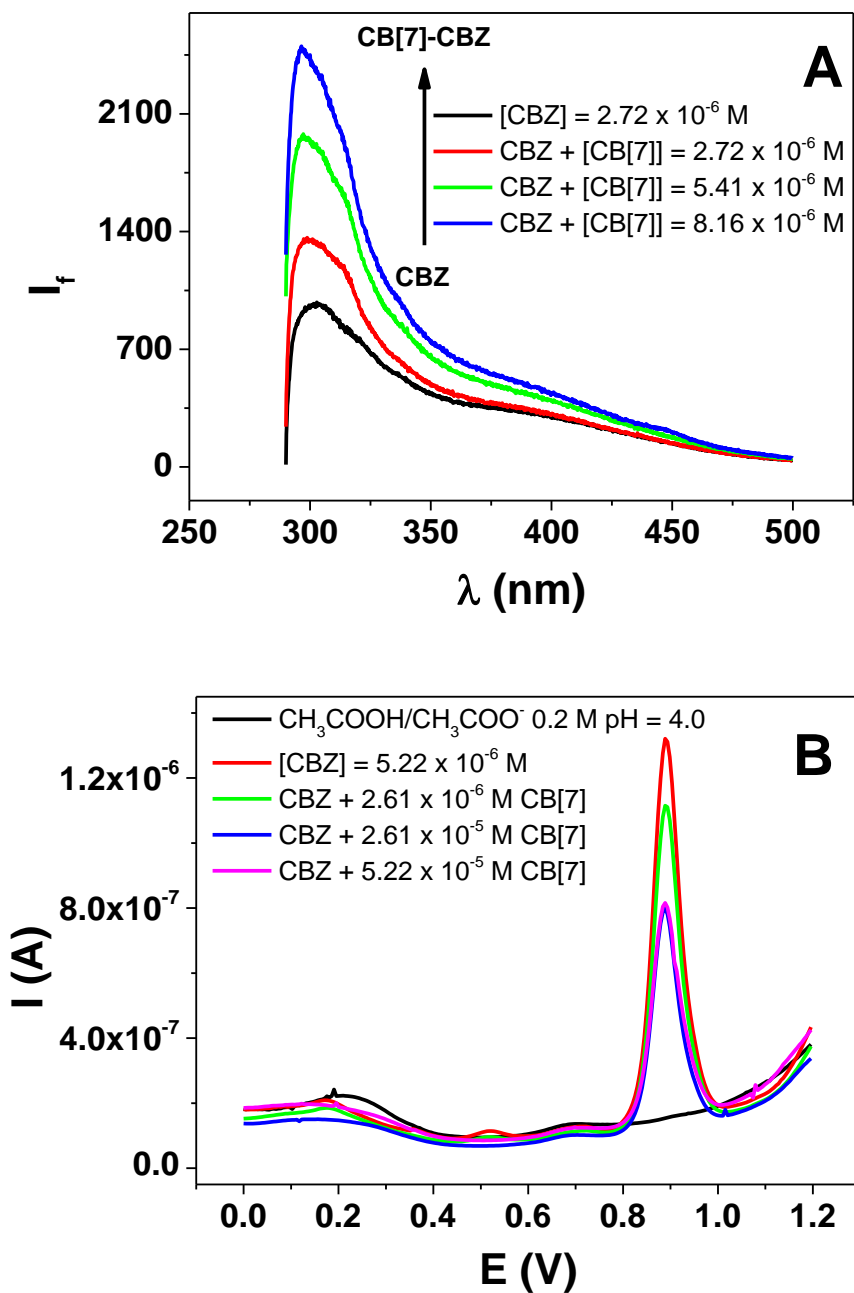


Figura 4.2. Variación de la señal analítica de CBZ con concentraciones crecientes de CB[7] A) fluorescencia B) DPV.

El registro de los espectros de masas correspondientes a disoluciones tanto de CB[6]-CBZ como de CB[7]-CBZ, permitieron confirmar la interacción de ambos CB[n]s con el analito objeto de estudio, registrándose señales de $m/z = 1188.4$ y $m/z = 1354$ correspondientes a CB[6]-CBZ^+ y CB[7]-CBZ^+ , respectivamente.

Una vez confirmada la formación de ambos complejos, se procedió a la elección del más adecuado para el desarrollo de sendos métodos de análisis. Para ello se estudiaron las variaciones de señal, tanto de intensidad de fluorescencia como de la corriente, producidas por dichas interacciones.

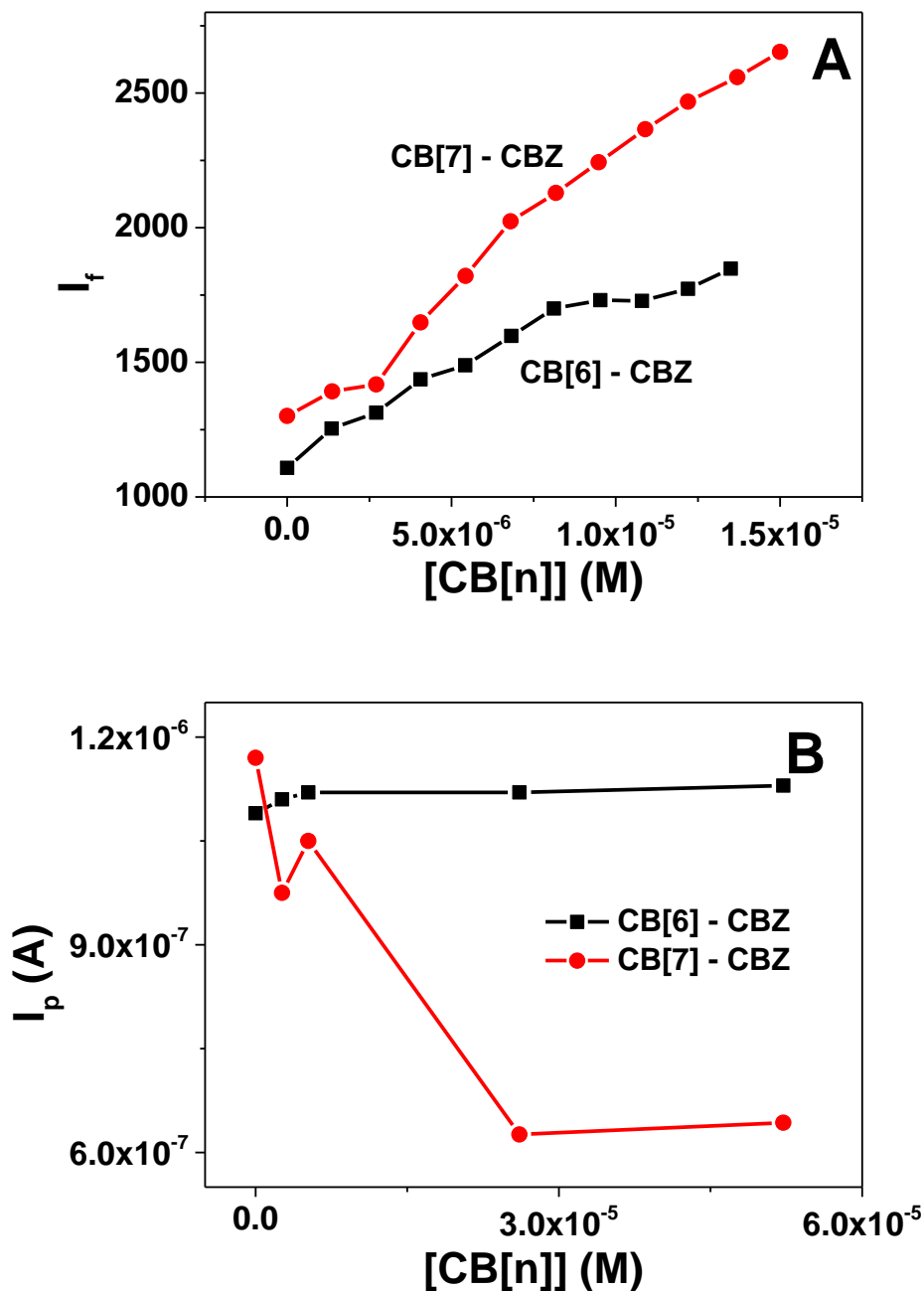


Figura 4.3. Comparativa de la variación de las señales analíticas del CBZ con adiciones crecientes de CB[n]. A) Medidas registradas en fluorescencia, $[CBZ] = 2.7 \times 10^{-6}$ M y B) Medidas mediante DPV. $[CBZ] = 5.2 \times 10^{-6}$ M; CH_3COOH/CH_3COO^- 0.2 M, pH = 4.0.

La figura 4.3A muestra que, tanto con CB[6] como con CB[7], se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de hospedador con respecto al CBZ solo, si bien, resulta notablemente mayor en el caso de la formación del complejo con CB[7]. Igualmente, cuando se analiza la respuesta electroquímica de la interacción de CBZ con diferentes concentraciones de cada receptor (figura 4.3B), se observa que el cambio en la intensidad de oxidación con la formación del complejo, es mucho más acusado cuando el hospedador es el CB[7]. Por esta razón, en ambos casos se eligió CB[7] como el homólogo más adecuado, utilizando un exceso de 5 veces respecto a la concentración de CBZ para medidas en electroquímica, puesto que se comprobó experimentalmente que a partir de ese exceso, la corriente permanecía prácticamente constante. En el caso de medidas en fluorescencia, se fijó un exceso de 10 veces respecto a la concentración de CBZ, ya que se comprobó que la señal prácticamente no varía a partir de este exceso (figura 4.4).

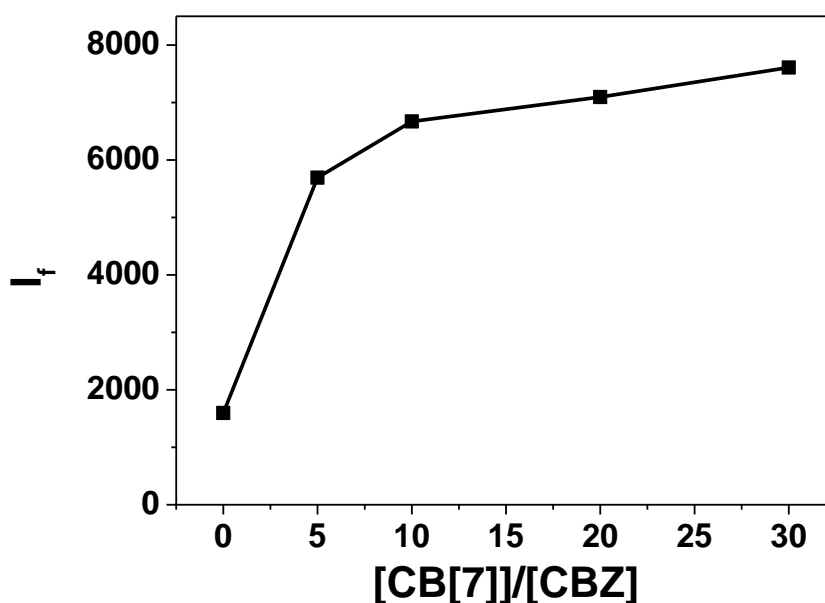


Figura 4.4. Respuesta de la intensidad de fluorescencia con la concentración de CB[7] para diferentes concentraciones de CBZ. [CBZ] = 2.17×10^{-6} M.

Como se ha indicado en la introducción general, los grupos carbonilo de los portales de los CB[n]s pueden estabilizar la formación de complejos en función de las cargas que presente la molécula. Por tanto, el pH del medio presenta una gran influencia

en la formación y estabilización de complejos con huéspedes que presenten equilibrios ácido/base dando lugar a especies cargadas, como es el caso del CBZ (figura 4.5) [30].

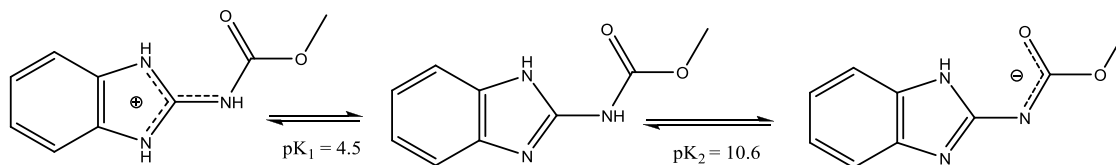


Figura 4.5. Especies del CBZ en función del pH.

A la vista de las especies de CBZ, cabría esperar que el complejo se formara preferentemente cuando el pH es menor o igual a su pK₁, es decir, cuando se encuentra cargado positivamente. En la figura 4.6 que se muestra a continuación, se puede observar que el cambio en la respuesta con concentraciones crecientes de CB[7], tanto en la intensidad de fluorescencia como en el pico de oxidación del CBZ, es más acusado cuando el grupo guanidina se encuentra protonado. Por el contrario, para valores de pH > pK₁ y pK₂, en ningún caso se observan cambios significativos atribuibles a la formación del complejo.

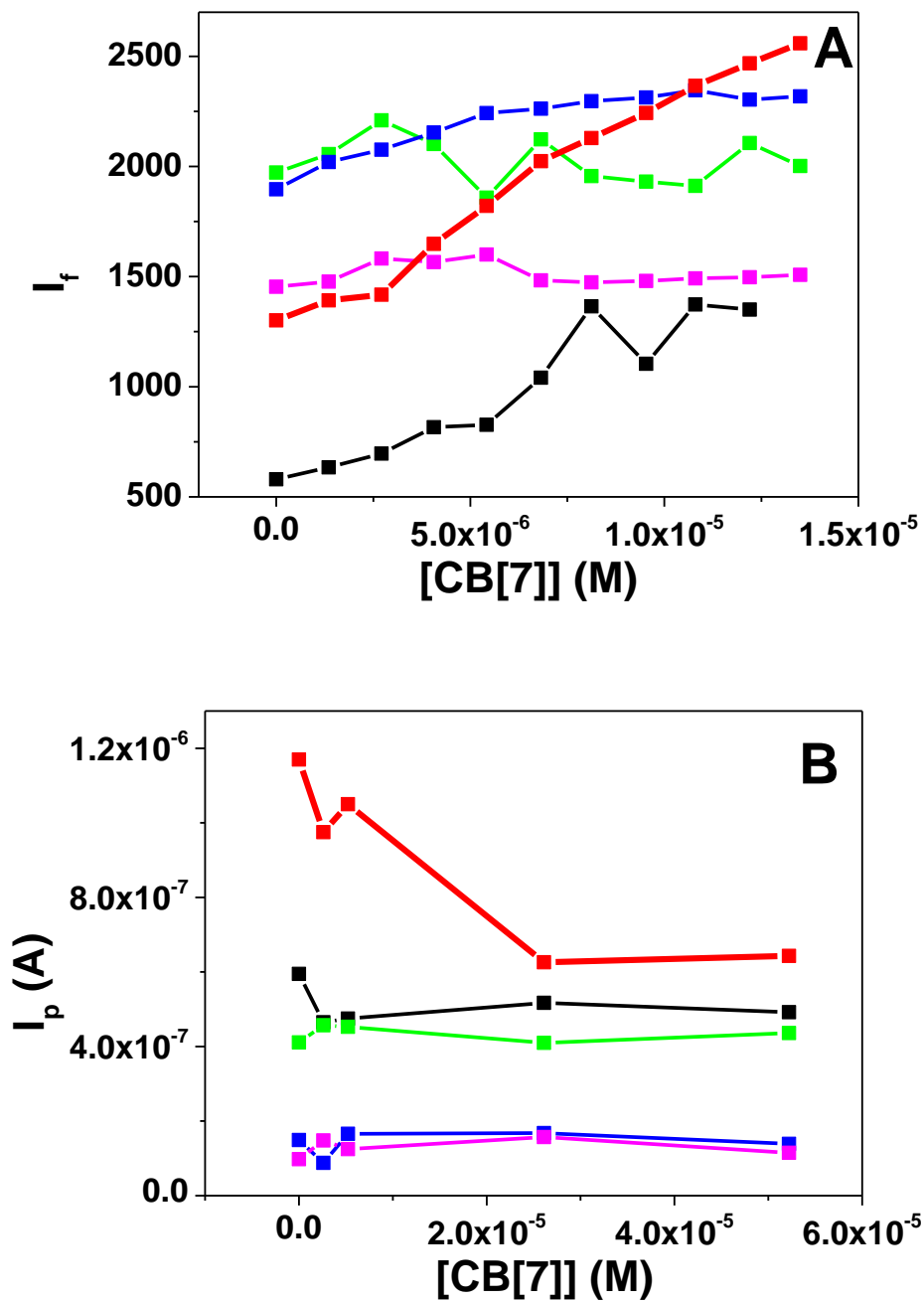


Figura 4.6. Influencia del pH en la formación del complejo CB[7]-CBZ. A) Medidas de fluorescencia [CBZ] = 2.72×10^{-6} M. B) Medidas en DPV [CBZ] = 5.20×10^{-6} M.
 - pH = 2, - pH = 4, - pH = 7, - pH = 10, - pH = 12.

Además, los resultados que se recogen en la figura 4.6, muestran que el mayor cambio en la respuesta del CBZ debido a la formación del complejo con CB[7] y la mayor intensidad de señal, se produce para un valor de pH de 4.0. Por esta razón se llevaron a cabo el resto de estudios en medio tampón $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pH = 4.0.

4.4.2. Estudio de la influencia de la concentración de iones en disolución.

El estudio de la concentración de iones en disolución resulta de especial interés por la influencia que puede tener en la formación del complejo de inclusión. Este hecho es fácilmente explicable por la competencia que los cationes de las sales en disolución presentan con el CBZ por los portales del CB[7] mediante interacciones ión-dipolo. Distintos estudios publicados muestran que el valor de la constante de formación de un determinado complejo, disminuye cuando aumenta la fuerza iónica en disolución, siendo este efecto mayor en el caso de que se trate de iones divalentes frente a iones monovalentes [31]. Además, este efecto influye en mayor medida en la formación de complejos de inclusión con CB[n]s frente a la formación con CDs [32].

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del estudio sobre la influencia que, la concentración del tampón $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ empleado como medio de medida, tiene en la formación del complejo y por tanto en la señal analítica en cada caso.

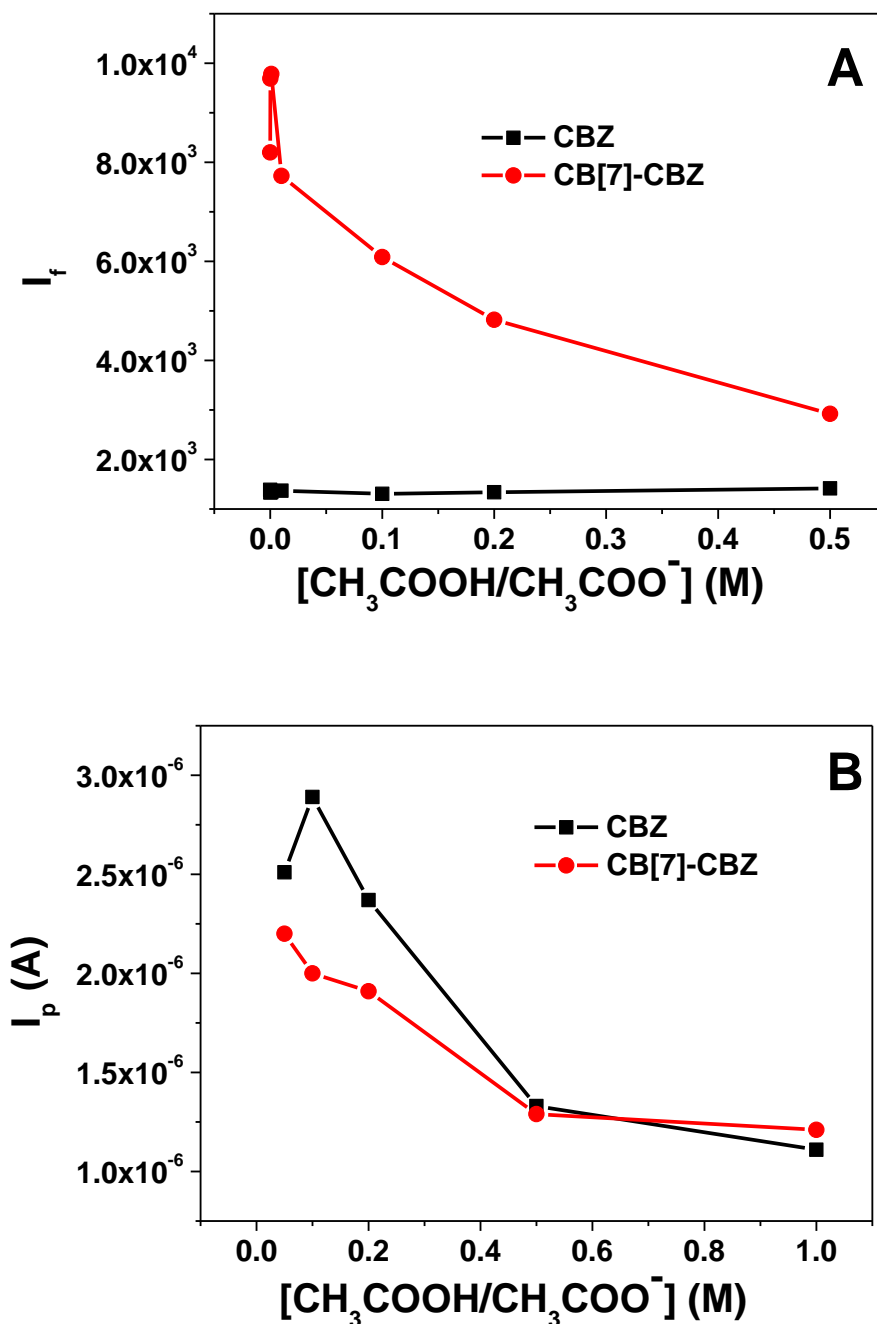


Figura 4.7. Influencia de la concentración de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pH = 4.0 en la señal de CBZ y CB[7]-CBZ en A) medidas de fluorescencia y B) medidas de DPV.

Como se puede ver en la figura 4.7, al aumentar la concentración de acetato se produce una disminución de la señal analítica del complejo, tanto en la intensidad de fluorescencia como en la intensidad de oxidación. Es interesante destacar que, en el caso de la señal de oxidación en DPV, a partir de 0.5 M de concentración de electrolito,

se obtiene la misma señal tanto para el CBZ como para el complejo, lo que induciría a pensar que se produce la inhibición en la formación del mismo. Por otra parte, al no verse alterada la señal del analito libre en las medidas obtenidas mediante fluorimetría, se puede comprobar cómo, la formación del complejo se ve impedida.

A la vista de los resultados obtenidos, se concluye que una alta concentración de iones en disolución puede impedir la formación del complejo al competir con el CBZ por los portales del CB[7]. Para el resto de estudios se fijó una concentración 10^{-4} M de tampón para fluorescencia y 5×10^{-2} M como electrolito soporte para las medidas en DPV ya que a estos valores se registra la máxima intensidad de señal en ambos casos.

4.4.3. Cálculo de la constante de formación y de la estequiometría para el complejo CB[7]-CBZ.

El cálculo de la estequiometría y de la constante de formación del complejo CB[7]-CBZ, se llevó a cabo mediante el método de Benesi-Hildebrand [33, 34]. Este método está basado en la variación de la intensidad de fluorescencia de un determinado analito, en este caso CBZ actuando como huésped, a medida que aumenta la concentración del hospedador, CB[7].

La manera clásica de evaluar los datos experimentales obtenidos se corresponde con la representación de las inversas de la variación de señal, con el aumento de la concentración de receptor según:

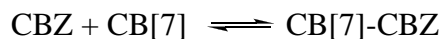
$$\frac{1}{I_f - I_{f0}} = \frac{1}{K_f(I_{f1} - I_{f0})} \frac{1}{[CB[7]]_0} + \frac{1}{I_{f1} - I_{f0}}$$

Ecuación 4.1.

Donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia en ausencia (I_{f0}) y en presencia (I_f) de una determinada concentración de CB[7], e I_{f1} se corresponde con la intensidad de señal del complejo totalmente formado según estequiometría.

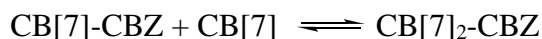
En el caso de un complejo de estequiometría 1:1, el gráfico de $1/(I_f - I_{f0})$ frente $1/[CB[7]]$ debería corresponder a una línea recta de cuya pendiente es posible calcular la K_f de equilibrio de complejación correspondiente [35].

En el caso bajo estudio:



$$K_f = \frac{[\text{CB}[7] - \text{CBZ}]}{[\text{CBZ}][\text{CB}[7]]}$$

Al representar los datos obtenidos al aumentar la concentración de CB[7] manteniendo constante la concentración de CBZ (figura 4.8), se observan dos tramos rectos que corresponderían a dos equilibrios; uno a bajas concentraciones de CB[7] correspondiente a la formación del complejo de estequiometría 1:1 y un segundo tramo, a altas concentraciones de CB[7], correspondiente a la formación del complejo de estequiometría 2:1 según:



$$K_f = \frac{[\text{CB}[7]_2 - \text{CBZ}]}{[\text{CB}[7] - \text{CBZ}][\text{CB}[7]]}$$

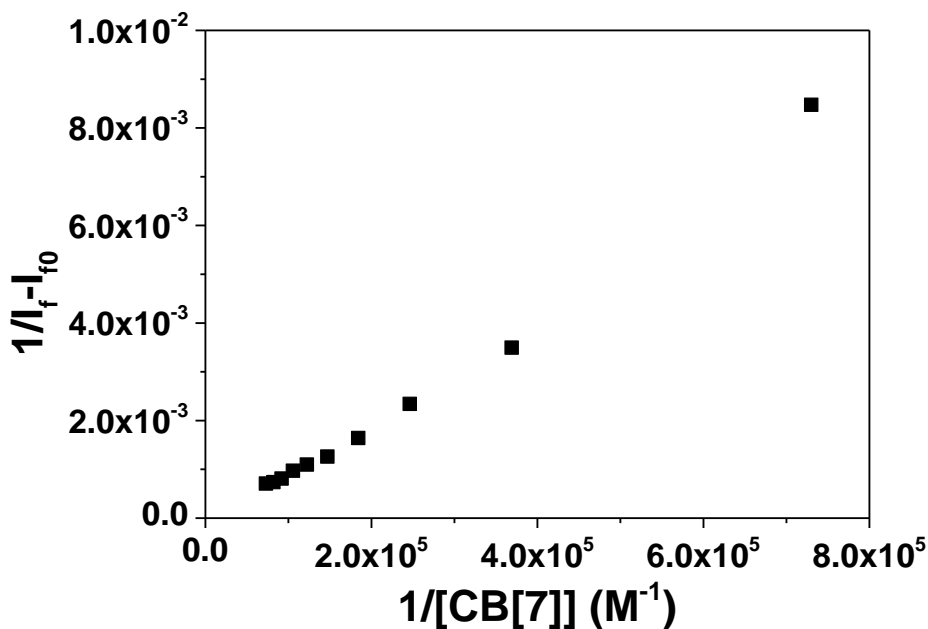


Figura 4.8. Representación gráfica de las inversas de intensidad de señal con la concentración de CB[n].

En este caso, el valor de la constante de cada equilibrio debería ser evaluado a partir de cada una de las pendientes de cada tramo lineal [35].

Distintos autores proponen, como alternativa al método gráfico, la evaluación de los datos experimentales mediante análisis por regresión no lineal [33-36]. En este caso, la obtención de relaciones lineales en la representación de $1/(I_f/I_{f0}-1)$ frente $1/CB[7]$ [7] indicarían la formación de complejos de estequiometría 1:1. Sin embargo, desviaciones de esta linealidad serían indicativas de estequiometrías múltiples.

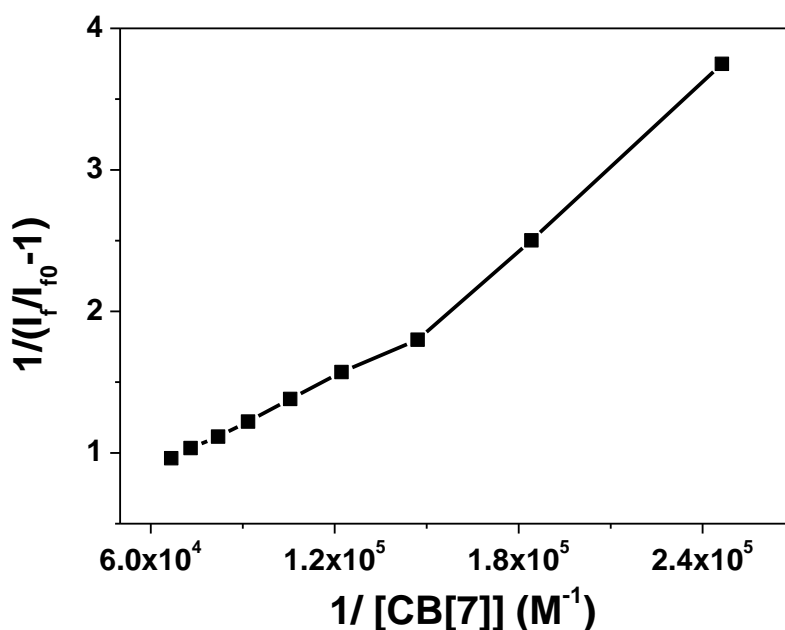


Figura 4.9. Representación gráfica de las inversas de intensidad de señal con la concentración de CB[n].

Como se muestra en la figura 4.9, se aprecian dos tramos de linealidad lo que corroboraría la formación de estequiometrías 1:1 y 2:1 CB[7]-CBZ.

A partir de los datos obtenidos se calcularon los valores de K_{f1} y K_{f2} de $8.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-2}$, respectivamente.

Si se comparan estos valores con los obtenidos para el complejo de CBZ con otros hospedadores, como pueden ser la α - y β - CD [27], se observa que las constantes obtenidas son mucho mayores que con las CDs. De nuevo, la estabilización que existe mediante interacciones no covalentes del complejo con CB[n]s que no se produce con

las CDs, permite racionalizar estos resultados. Por otro lado, la constante de asociación CB[7]-CBZ es más alta que la calculada por Saleh y col. para CB[6]-CBZ ($K_f = 271 \text{ M}^{-1}$) [29]. Estos autores, mediante técnicas de RMN, concluyeron que se producía la inclusión parcial del CBZ en el CB[6] manteniéndose fuera de la cavidad el grupo benzimidazol. En el caso del CB[7], el grupo benzimidazol se podría encontrar incluido en la cavidad hidrófoba y el grupo guanidina interaccionaría con los carbonilos de los portales estabilizando el complejo y obteniéndose así, constantes de asociación mayores.

Se emplearon cálculos teóricos mediante simulación de los modelos moleculares, calculados para la mínima energía, para las dos estequiometrías propuestas (figura 4.10). Como se puede observar, la estequiometría 1:1 supondría la inclusión de los dos anillos en la cavidad del CB[7] quedando el grupo guanidina cerca de los portales. Estudios de ^1H -RMN realizados por Ge y col. confirmaron la entrada del grupo benzimidazol en la cavidad del CB[7], quedando la cadena alifática en el exterior de la cavidad [37]. Para que se produzca la interacción en relación 2:1 CB[7]-CBZ, el anillo que contiene el grupo guanidina del CBZ ha de desplazarse hacia el exterior dejando únicamente el anillo bencénico incluido en un CB[7] produciéndose la interacción de la cadena alifática con la segunda molécula del receptor.

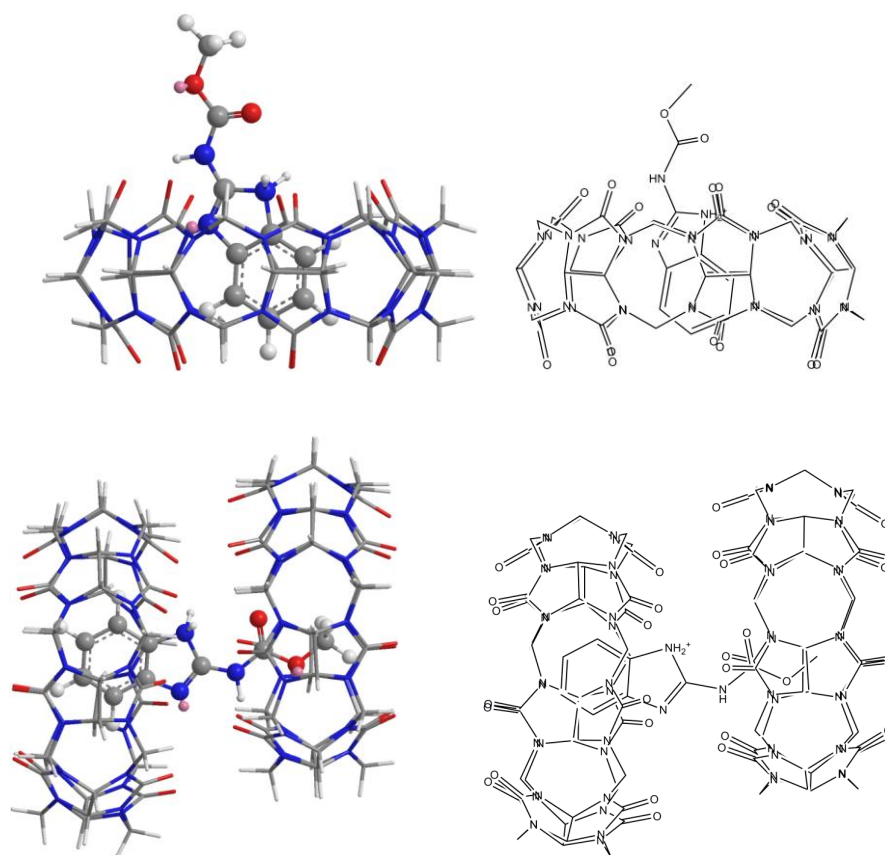


Figura 4.10. Estructura de modelos moleculares para mínima energía (MM2) de CB[7]-CBZ y CB[7]₂-CBZ.

4.4.4. Estudio del comportamiento electroquímico del complejo.

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes artículos que describen el comportamiento electroquímico del CBZ empleando electrodos de distinta naturaleza. En el trabajo de Hernández y col. [22], se concluye que el CBZ sufre un proceso de adsorción en un electrodo de grafito modificado con silicona OV-17, comportándose como un sistema redox cuasirreversible. El estudio del comportamiento del CBZ en un electrodo modificado con nanotubos de carbono, publicado en 2009 por Li y col., muestra un comportamiento irreversible del analito siendo, el proceso de oxidación, predominantemente difusivo [24].

Con el propósito de profundizar sobre los mecanismos que rigen el proceso de oxidación del complejo CB[7]-CBZ y sus posibles diferencias con el CBZ, se estudió el efecto de la variación de la velocidad de barrido (V_b) en la señal electroquímica tanto del CBZ como del complejo CB[7]-CBZ, mediante medidas de voltamperometría

cíclica. La figura 4.11 muestra como ejemplo los voltamperogramas cíclicos registrados para CBZ en función de la V_b .

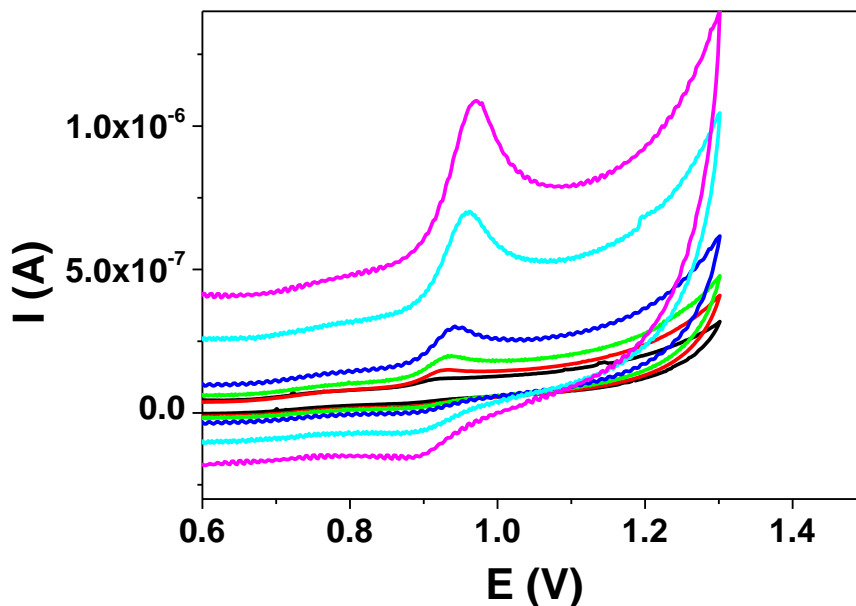


Figura 4.11. Voltamperogramas cíclicos de CBZ en función de V_b : — $V_b = 10$ mV/s, — $V_b = 30$ mV/s, — $V_b = 50$ mV/s, — $V_b = 100$ mV/s, — $V_b = 300$ mV/s, — $V_b = 500$ mV/s.

En los ciclovoltamperogramas obtenidos al variar la V_b entre 5 y 1000 mV/s, tanto para el CBZ libre como formando complejo con CB[7], se observa una onda anódica y otra catódica con una diferencia entre sus potenciales de pico de $59/n$ mV. Este hecho estaría en consonancia con un sistema reversible en ambos casos. Sin embargo, debido a que el E_{pa} aumenta al aumentar la V_b (figura 4.12A), que el cociente entre I_{pa}/I_{pc} es distinto de 1 y que el valor de ΔE_p de 59 mV no permanece constante con la V_b (figura 4.12B), se puede concluir que se trata de un sistema cuasirreversible para CBZ y CB[7]-CBZ.

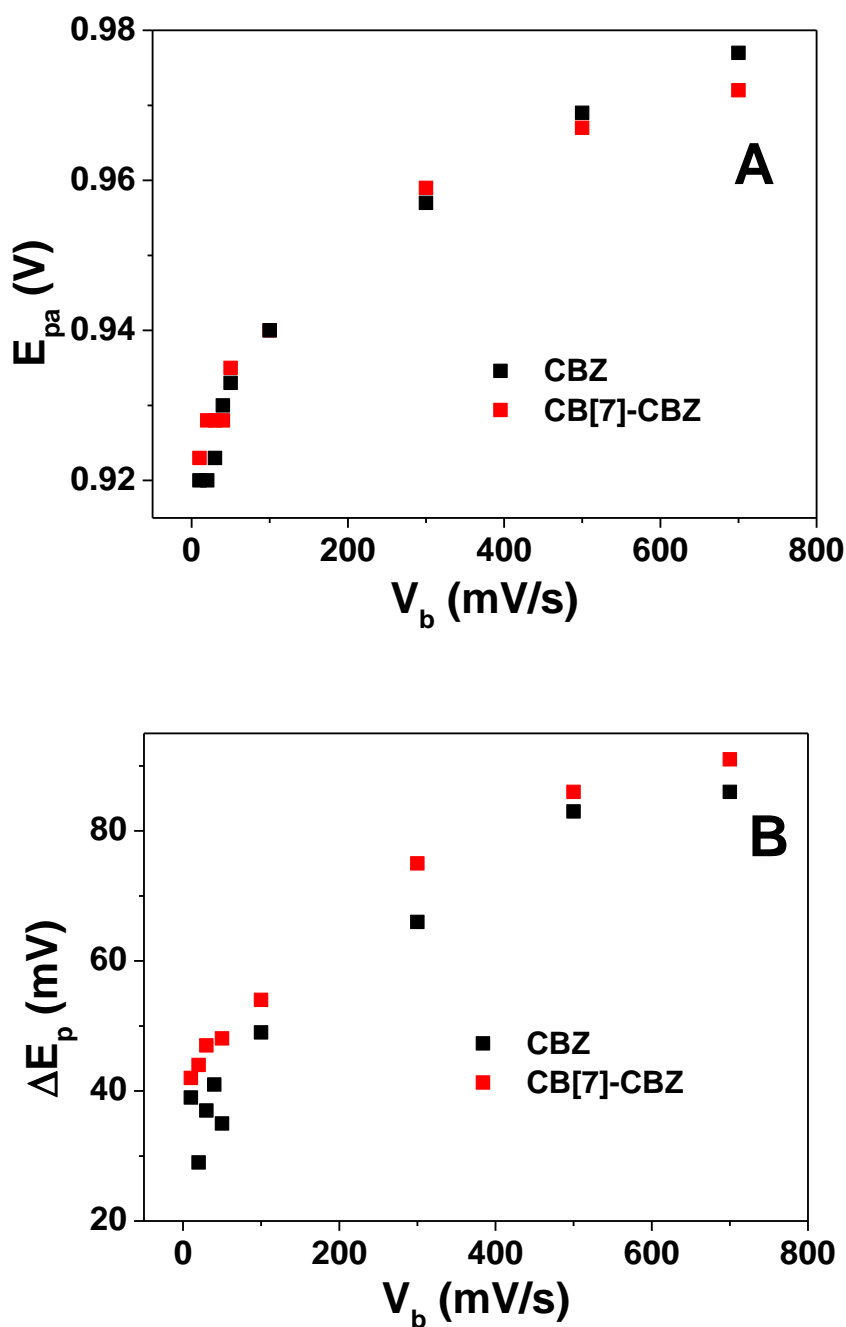


Figura 4.12. Variación de E_a (A) y ΔE (B) con V_b obtenidos para CBZ y CB[7]-CBZ. $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.05 M pH = 4.0.

Los voltamperogramas registrados a diferentes valores de pH revelaron una disminución del potencial de pico al aumentar el pH tanto para el CBZ como para el complejo, lo que demuestra que los protones participan en ambos casos en la reacción de oxidación ($E_{p \text{ CBZ}} \text{ (V)} = 1.14 - 0.062 \text{ pH}$, $r = 0.998$; $E_{p \text{ CB[7]-CBZ}} \text{ (V)} = 1.15 - 0.062 \text{ pH}$, $r = 0.998$). En ambos casos se obtiene una pendiente de -0.062 mV por unidad de

pH, valor cercano al Nernstiano correspondiente a sistemas que intercambian el mismo número de protones que de electrones.

En el trabajo anteriormente mencionado [22], se propone que el proceso de oxidación del CBZ involucra 2 electrones, conduciendo a la formación de una amida y un radical. Al realizar varios ciclos, se observa la aparición de un nuevo par redox situado aproximadamente a 0.6 V. Este nuevo par redox es atribuido a la reducción reversible al correspondiente alcohol del dímero formado fruto de la dimerización del radical generado en el primer barrido.

La figura 4.13 muestra los voltamperogramas cíclicos correspondientes al segundo barrido registrado, tanto para el CBZ como para el CB[7]-CBZ.

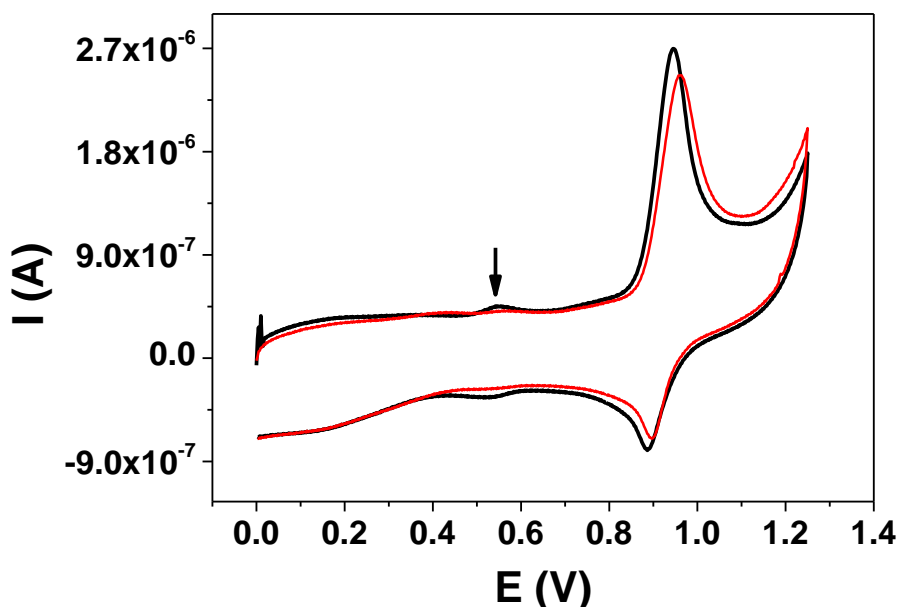


Figura 4.13. Voltamperogramas cíclicos registrados para — CBZ y — CB[7]-CBZ. [CBZ] = 1.04×10^{-5} M, $V_b = 300$ mV/s.

Aunque de pequeña intensidad, el segundo barrido cíclico del CBZ muestra la aparición de dos ondas correspondientes a un sistema reversible que coincidiría con la oxidación del dímero según lo publicado por Hernández y col. [22]. Sin embargo, en el caso del complejo no es posible observar la señal correspondiente al dímero, por lo que se puede concluir que el proceso de dimerización se inhibe debido a la formación del complejo de inclusión. Estos autores corroboraron la dimerización del CBZ mediante el

estudio del mecanismo de transferencia electrónica que presentaba el analito, obteniendo que de la representación de $I_p/V_b^{1/2}$ frente a V_b se podría confirmar un mecanismo electroquímico-químico (EC). La figura 4.14 muestra la representación de $I_p/V_b^{1/2}$ frente a V_b para la oxidación del CBZ y del CB[7]-CBZ.

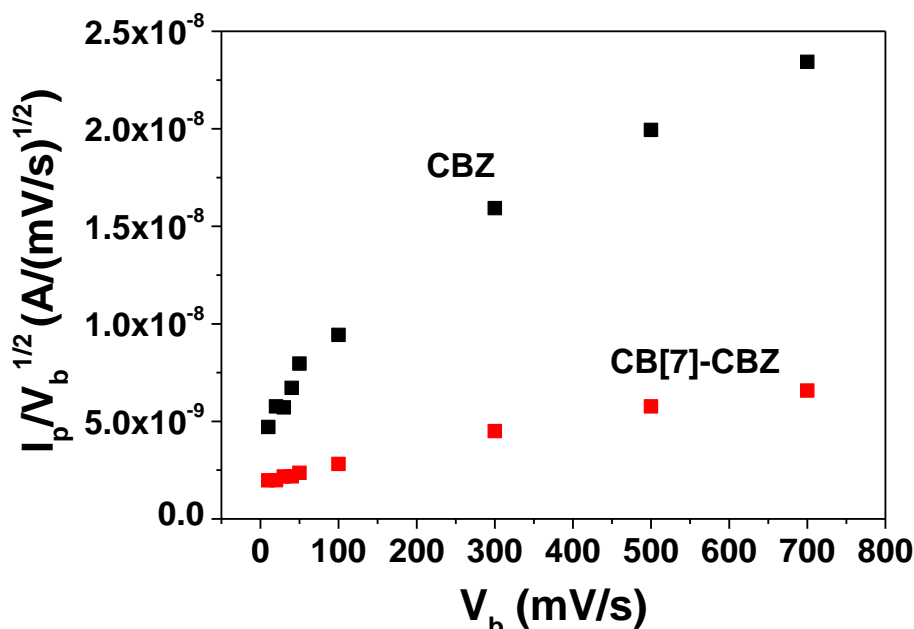


Figura 4.14. Variación de $I_p/V_b^{1/2}$ frente a V_b para disoluciones de CBZ y CB[7]-CBZ. $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.05 M pH = 4.0.

De la figura anterior, se podría confirmar que el CBZ presenta un mecanismo EC y por tanto se produce la dimerización del analito tras la oxidación del mismo de acuerdo con lo publicado. Sin embargo, en el caso del complejo CB[7]-CBZ, la representación gráfica difiere respecto a la del analito libre, lo que conduciría a pensar en la inhibición del proceso de dimerización del CBZ con la formación del complejo. Comportamientos similares de distintos complejos de inclusión con CB[n] han sido previamente descritos en la bibliografía [38].

Con el propósito de elucidar el mecanismo predominante del transporte de materia al electrodo, se evaluó el cambio en la intensidad de pico producido al variar la V_b (figura 4.15).

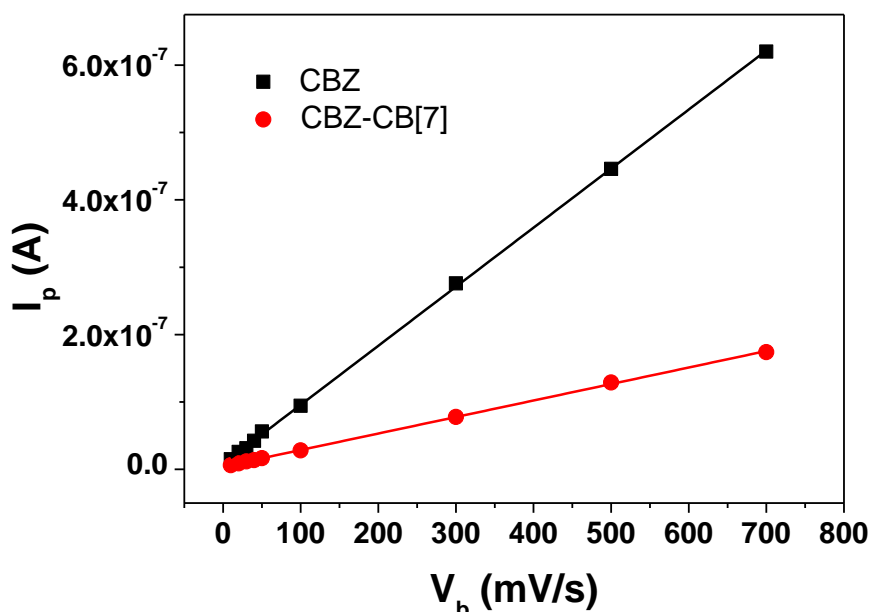


Figura 4.15. Influencia de la velocidad de barrido en la intensidad de oxidación de CBZ y CB[7]-CBZ.

Como se observa en los resultados representados en la figura 4.15, la onda de oxidación del CBZ aumenta linealmente conforme aumenta la V_b según la ecuación I_p (A) = $8.12 \times 10^{-9} + 8.77 \times 10^{-10} V_b$ (mV/s), $r = 0.99992$ lo que indicaría que se trata de un proceso predominantemente de adsorción. Por otra parte, el ajuste de la relación de $\log I_p$ frente a $\log V_b$ obtenido para estos datos, muestra una pendiente de 0.90 ($\log I_p = -8.65 + 0.90 \log V_b$, $r = 0.998$) lo que corroboraría esta afirmación.

Cuando se realiza el mismo experimento trabajando con el complejo de inclusión de CBZ en CB[7], al representar I_p frente a V_b , se obtiene una relación lineal de acuerdo con la ecuación I_p (A) = $4.22 \times 10^{-9} + 2.45 \times 10^{-10} V_b$ (mV/s), $r = 0.998$, cuya pendiente indica una menor influencia de la V_b en la intensidad de oxidación respecto a la observada para el CBZ (Figura 4.15).

Analizando los datos del complejo CB[7]-CBZ con mayor profundidad se observa que la relación existente entre $\log I_p$ del complejo y $\log V_b$, para bajas velocidades de barrido (5 – 100 mV/s), obedece a la ecuación $\log I_p = -8.89 + 0.60 \log V_b$, $r = 0.995$. Del valor de la pendiente, se observa una mayor contribución difusional en el proceso

redox. Sin embargo, a altas velocidades de barrido ($\log I_p = -942 + 0.94 \log V_b$, $r = 0.99991$) se observa que el proceso es fundamentalmente adsorptivo.

Este fenómeno no se observa al trabajar únicamente con el CBZ donde el ajuste lineal $\log I_p / \log V_b$, independientemente del intervalo de V_b , es el mismo. La mayor contribución difusiva podría explicarse por una lógica disminución del coeficiente de difusión del complejo respecto al del analito.

Para completar estos estudios se calcularon los coeficientes de difusión aparentes, tanto del analito como del complejo, mediante cronoculombimetría. Para hacer estos cálculos, es necesario conocer la superficie activa del electrodo de trabajo. Para ello se registraron barridos lineales de una disolución de $K_3Fe(CN)_6$ de concentración 1.00×10^{-3} M en KCl 0.1M ($D = 0.76 \times 10^{-5}$ cm²/s, $n = 1$ [39]). De acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 4.2):

$$I_p = 2.687 \times 10^{-5} n^{3/2} D^{1/2} A C V_b^{1/2}$$

Ecuación 4.2. Ecuación Randles-Sevcik.

Donde n es el número de electrones que se intercambian en el proceso; V_b es la velocidad de barrido; D el coeficiente de difusión de la especie; A es el área activa del electrodo y C la concentración de la sustancia. A partir de la pendiente obtenida de la representación de I_p frente a $V_b^{1/2}$, se calcula la superficie activa del electrodo en 0.032 ± 0.002 cm² ($n = 3$).

Una vez conocida el área del electrodo, los coeficientes de difusión aparentes se calcularon mediante medidas cronoculombimétricas de disoluciones de concentración 2.00×10^{-4} M de CBZ y 2.00×10^{-4} M de CBZ con un exceso de CB[7] de 5 veces respecto al CBZ (figura 4.16).

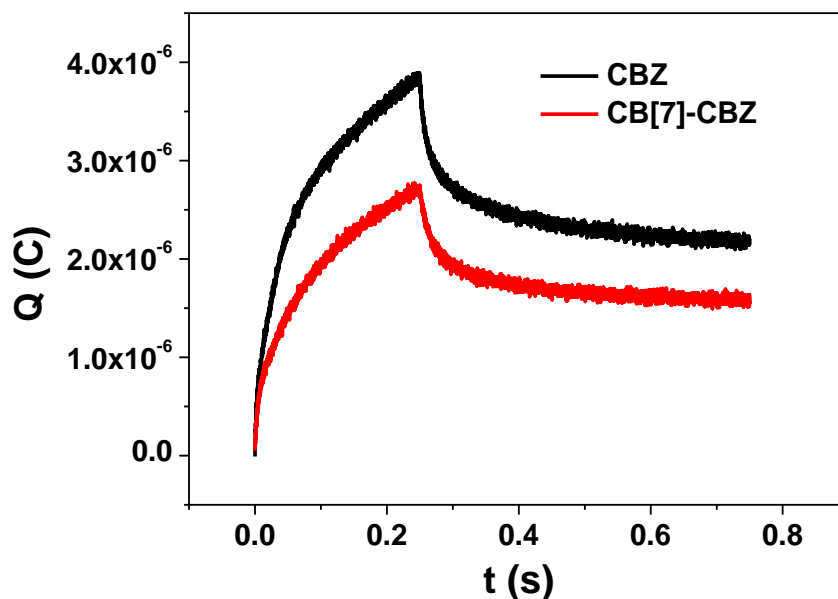


Figura 4.16. Variación de carga frente al tiempo al aplicar $E = 1.1$ V durante 0.2 s y $E = 0.5$ V durante 0.5s para disoluciones de CBZ y CB[7]-CBZ.

A partir de la ecuación integrada de Cottrell (Ecuación 4.3), y sabiendo que en ambos casos el valor de n es 2, de la pendiente de la representación de Q frente a $t^{1/2}$ se pueden calcular los coeficientes de difusión aparente.

$$Q = 2nFAD^{1/2}C\pi^{1/2}t^{1/2}$$

Ecuación 4.3. Ecuación integrada de Cottrell.

La media de las pendientes obtenidas fueron 4.26×10^{-6} y 3.42×10^{-6} para CBZ y CB[7]-CBZ. De ellas se obtuvieron valores de $(9.4 \pm 0.2) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ y $(6.0 \pm 0.4) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 3$) para CBZ y CB[7]-CBZ, respectivamente. Esta lógica disminución en el coeficiente de difusión aparente con la formación del complejo podría explicar la disminución en la intensidad de señal del CBZ por la interacción con CB[7]. Resultados similares fueron obtenidos por Cui y col. para derivados de ferroceno con CB[7] [40].

Todos estos resultados permiten concluir que la disminución del coeficiente de difusión aparente del complejo conlleva una mayor contribución difusional en el proceso electroquímico. Por otra parte, la dimerización producida durante el proceso de oxidación del CBZ, queda inhibida por la formación del complejo.

4.4.5. Optimización de las variables instrumentales para el desarrollo del método analítico.

Con el objetivo de utilizar estas interacciones supramoleculares para el desarrollo de métodos analíticos para la determinación del fungicida CBZ, junto con el pH y la concentración de electrolito, se llevó a cabo la optimización de las distintas variables que afectan a las técnicas de medida elegidas, la espectroscopia de fluorescencia y DPV.

En el caso de las medidas de fluorescencia, la cuantificación se llevó a cabo a las longitudes de onda de excitación y emisión fijadas y seleccionadas para el estudio de la influencia del pH y concentración del medio, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 295 \text{ nm}$.

Para el método electroquímico, fue necesaria la optimización de todas y cada una de las variables instrumentales que afectan a la técnica de medida.

Como condiciones iniciales se fijaron una amplitud de impulso (a) de 50 mV, un escalón de potencial (ΔE_s) de 5 mV y 0.5 s como tiempo entre impulsos (t_s), por lo que la V_b fue de 10 mV/s. Los barridos de potencial se llevaron a cabo entre 0.0 y 1.2 V.

Cada variable fue estudiada por separado fijando su valor una vez optimizado. El valor óptimo es aquel que proporcione la mayor intensidad de señal sin aumentar en exceso la anchura de la misma, lo que se traduciría en una pérdida de selectividad.

Como se ha visto, el CBZ presenta una señal de oxidación a un potencial cercano a 0.9 V (figura 4.2B). Al variar el potencial inicial (E_0) entre 0.0 y 0.7 V (figura 4.17), se observa como la mayor intensidad de señal se registra para el potencial inicial de 0.2 V, siendo este valor el elegido para el resto de estudios.

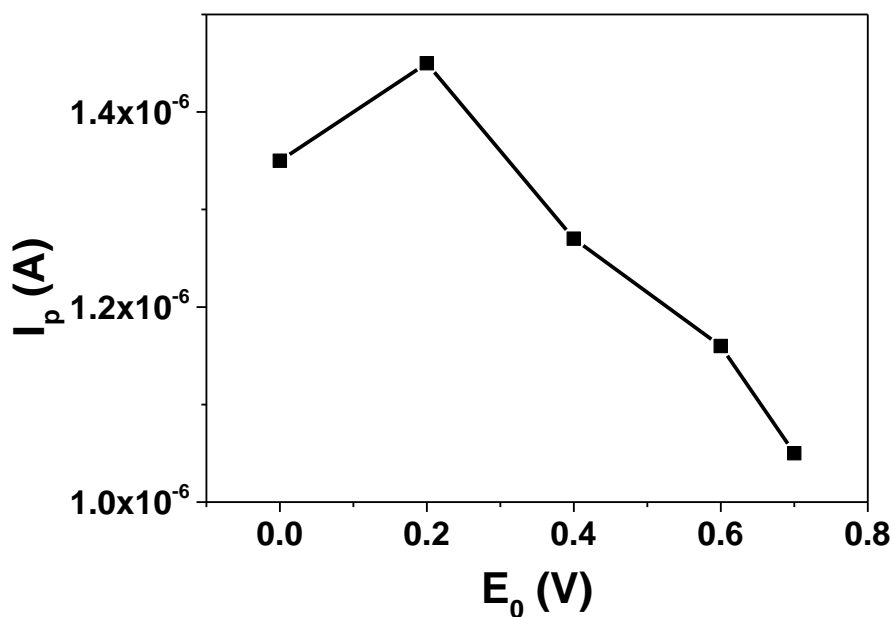


Figura 4.17. Variación de I_p del complejo CB[7]-CBZ con el E_0 .

En el caso de la optimización de la amplitud de impulso (figura 4.18), se considerará como óptima una situación de compromiso entre sensibilidad (I_p) y selectividad (anchura de semipico, $W_{1/2}$). A la vista de los resultados obtenidos, se eligió una amplitud de impulso de 80 mV, valor a partir del cual, se alcanza la máxima señal sin que se haya producido un aumento excesivo de la anchura de semipico.

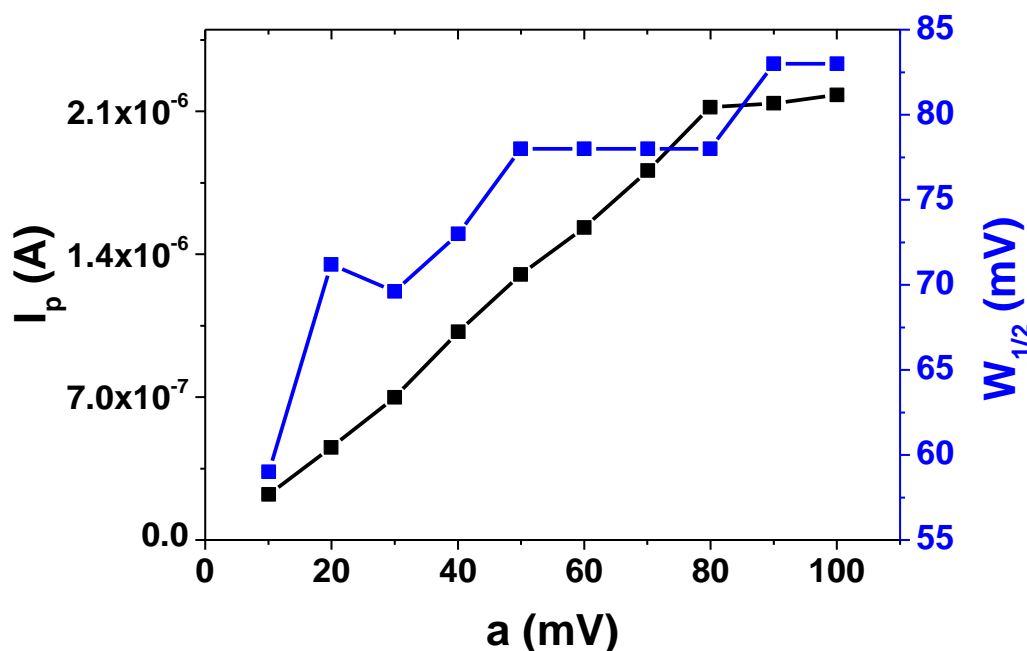


Figura 4.18. Influencia de la variación de la amplitud impulso en la señal de oxidación de CB[7]-CBZ.

Por último, la velocidad a la que se lleva a cabo el barrido de potencial resulta de la combinación del ΔE_s y t_s . Por tanto, en primer lugar se fijó el valor de t_s en 0.5 s variándose el ΔE_s entre 2.5 y 20 mV. Como se puede ver en la tabla 4.1, el mayor valor de señal se registró para 5.0 mV (que corresponde a una velocidad de 10 mV/s), por lo que se fijó ese valor modificándose a continuación, el t_s entre 0.13 y 1 s. En este caso, la mayor intensidad se registró para un valor de t_s de 0.5 s, lo que supone una V_b de 10 mV/s que se mantuvo constante para el resto de experimentos.

V_b (mV/s)	ΔE_s (mV) ($t_s = 0.5$ s)	I_p (A)	t_s (s) ($\Delta E_s = 5.0$ mV)	I_p (A)
5	2.5	1.76×10^{-6}	1.0	-
10	5.0	1.99×10^{-6}	0.5	9.41×10^{-7}
20	10.0	1.77×10^{-6}	0.26	8.46×10^{-7}
30	15.0	1.81×10^{-6}	0.17	7.56×10^{-7}
40	20.1	1.65×10^{-6}	0.13	7.37×10^{-7}

Tabla 4.1. Variación de la I_p de CB[7]-CBZ con la V_b .

4.4.6. Influencia de la concentración en la señal de CBZ. Parámetros analíticos.

En las condiciones de trabajo químicas e instrumentales optimizadas según los métodos desarrollados, se evaluó la respuesta analítica en la determinación de CBZ a través de la formación del complejo con CB[7].

Como se muestra en la figura 4.19, la intensidad de fluorescencia aumenta linealmente con la concentración de complejo en un intervalo de concentración entre 2.66×10^{-8} y 2.17×10^{-6} M de acuerdo con la ecuación $I_f = (1.1 \pm 0.6) \times 10^2 + (42.6 \pm 0.5) \times 10^8 [\text{CB}[7]\text{-CBZ}] \text{ (M)}$, $r = 0.9995$.

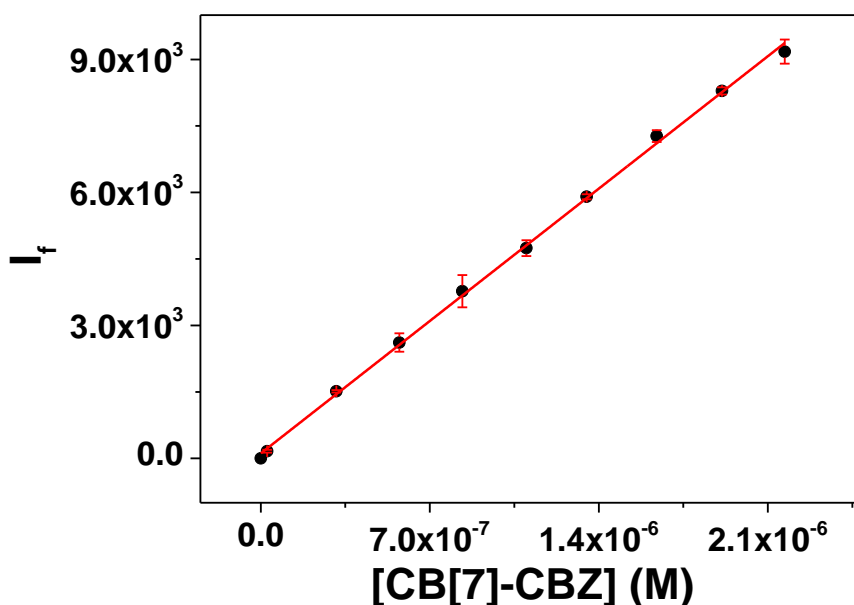


Figura 4.19. Incremento de la I_f al aumentar la concentración de CB[7]-CBZ.

A partir de estos resultados, se calcularon los límites de detección ($LD = 3\sigma/\text{pte}$) y de cuantificación ($LC = 10\sigma/\text{pte}$) obteniéndose unos valores de 1.9×10^{-8} y 5.9×10^{-8} M, respectivamente.

Los valores de la desviación estándar relativa (D.E.R. (%)) y del error relativo (Er (%)) fueron evaluados para concentraciones diferentes, según se refleja en la tabla 4.2. Er menores al 6.0% y D.E.R. en términos tanto de repetitividad como de reproducibilidad, menores del 8.7%, demuestran que el método desarrollado se puede aplicar con suficiente exactitud y precisión.

Detección por fluorescencia			
Concentración (M)	Er (%)	D.E.R. (n=5) (%) (Repetitividad)	D.E.R. (n=5) (%) (Reproducibilidad)
3.13×10^{-7}	4.8	1.9	1.7
5.74×10^{-7}	2.3	8.5	8.6
1.10×10^{-6}	3.6	1.8	3.7
1.64×10^{-6}	2.4	3.6	1.9
2.17×10^{-6}	6.0	8.7	3.2

Tabla 4.2. Exactitud y precisión del método propuesto evaluado a distintas concentraciones dentro del intervalo de respuesta lineal.

Cuando se monitoriza la respuesta electroquímica en las condiciones optimizadas, se observa un incremento lineal de la corriente con la concentración de complejo, en un intervalo comprendido entre 1.30×10^{-8} y 1.00×10^{-6} M, ajustándose a la ecuación $I_p(A) = (5.2 \pm 0.3) \times 10^{-8} + (0.77 \pm 0.03) [CB[7]-CBZ] (M)$, $r = 0.994$ (figura 4.20).

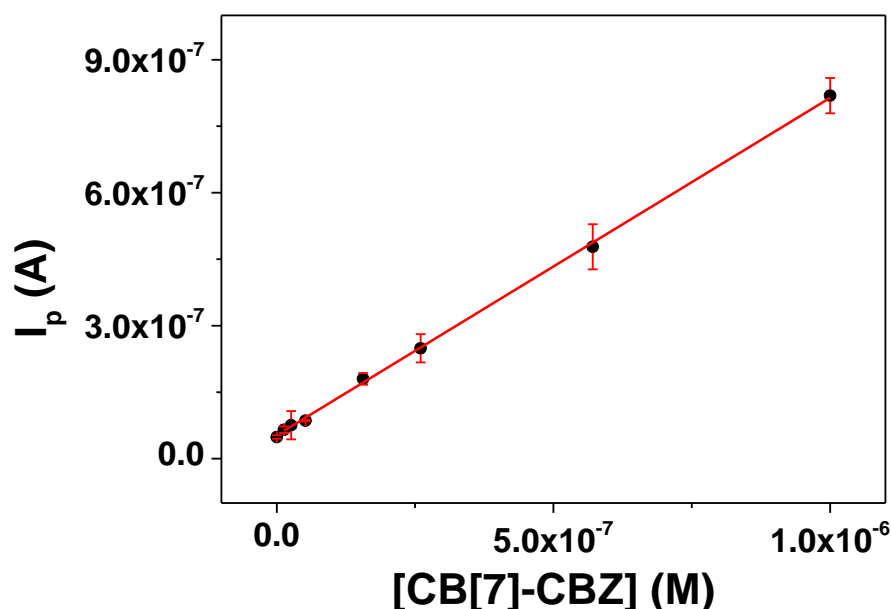


Figura 4.20. Incremento de la I_p al aumentar la concentración de CB[7]-CBZ.

Del mismo modo que en el caso anterior, se calcularon los valores de LD ($3\sigma/\text{pte}$) y LC ($10\sigma/\text{pte}$) de 1.2×10^{-8} y 3.8×10^{-8} M, respectivamente.

Respecto a la exactitud y precisión obtenidas, la tabla 4.3 muestra los valores de Er (%) y D.E.R. (%) para diferentes concentraciones, demostrando la capacidad de aplicación del método electroquímico con valores adecuados tanto en repetitividad como en reproducibilidad. Comparando los resultados con los obtenidos para fluorescencia, se observa que el método electroquímico presenta valores ligeramente superiores, pero aceptables según las características propias de la técnica dado que en un sistema óptico de fluorescencia no existe contacto físico entre el analito y el transductor.

Detección electroquímica			
Concentración (M)	Er (%)	D.E.R. (n=5) (%) (Repetitividad)	D.E.R. (n=5) (%) (Reproducibilidad)
5.19×10^{-8}	15.4	12.4	2.4
1.56×10^{-7}	6.4	2.0	7.7
2.60×10^{-7}	3.5	8.7	9.0
5.71×10^{-7}	8.0	1.8	11.0

Tabla 4.3. Exactitud y precisión del método propuesto evaluado a distintas concentraciones dentro del intervalo de respuesta lineal.

Comparando los límites de detección y cuantificación obtenidos mediante los procedimientos desarrollados en este capítulo con otros publicados anteriormente, según se puede observar en la tabla 4.4, mejoran o igualan los previamente desarrollados. En esta tabla también se recoge un método reciente con menor límite de detección que los obtenidos en este trabajo, lo cual es de esperar debido a que se trata de un electrodo modificado con un material de alta conductividad como el grafeno y además, en este caso, también con β -CD.

Los métodos aquí recogidos fueron, a su vez, aplicados a muestras reales lo que permite pensar que los procedimientos desarrollados en este capítulo presentan unas propiedades analíticas adecuadas para su posible aplicación en muestras reales.

Técnica utilizada	LD/LC	Referencia
DPV	9.1 ng/ml, 5ng/ml, 2nM	[22, 26, 41]
CV	50ng/ml	[21]
SWV	1.00×10^{-4} mg/ml, 5ng/ml, 10ng/ml	[42-44]
LSV	9.00×10^{-9} M	[24]
Fluorescencia	10 µg/ml	[45]
HPLC/fluorescencia	1.3ng/ml	[46]
CE/masas	100-1000 ng/ml	[20]
UPLC/masas	1.6 µg/L	[47]
CE/UV	11.4 µg/L	[19]
SERS/β-CD	1 µM	[25]
DPV/CB[7]	2.3 ng/ml	Presente trabajo
Fluorescencia/CB[7]	3.6 ng/ml	Presente trabajo

Tabla 4.4. Comparativa con métodos previamente publicados para el análisis de CBZ. SWV: voltamperometría de onda cuadrada, LSV: voltamperometría de barrido lineal. CE: electroforesis capilar, HPLC: cromatografía líquida de alta presión, UPLC: cromatografía líquida de ultra resolución, SERS: Espectroscopia Raman de superficie mejorada

4.4.7. Estudio de interferencias.

Antes de la aplicación de los procedimientos desarrollados, se evaluaron las posibles interferencias que, en la determinación de CBZ, pudieran producir otras sustancias que pudiesen estar presentes en la muestra junto al analito. Los interferentes elegidos fueron tiabendazol (TBZ), tiametoxam (TMX), diuron (DRN) y benomilo (BNM), todos ellos fungicidas de la misma familia que el CBZ. La figura 4.21 muestra la estructura química de los compuestos ensayados.

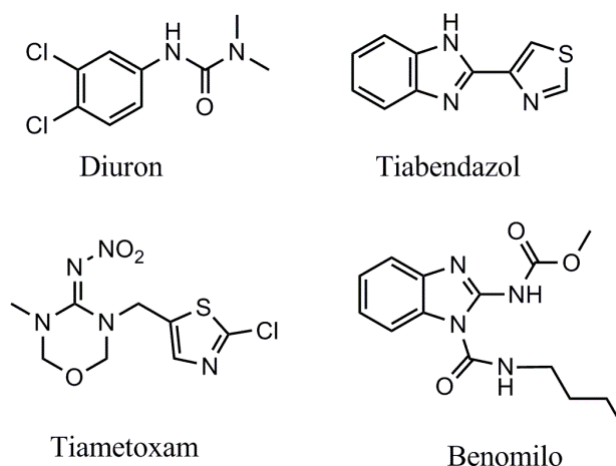


Figura 4.21. Distintos benzimidazoles estudiados como interferentes.

Los estudios se realizaron fijando una concentración de CB[7]-CBZ (5.23×10^{-7} M en fluorescencia y 5.72×10^{-7} M en DPV) y monitorizando la respuesta según se añaden concentraciones crecientes de interferente. Se consideró que una sustancia interfiere cuando al estar presente en la disolución junto con CBZ, se produce una variación en la señal de éste mayor o igual al máximo valor del error relativo en cada caso, 6.0% en fluorescencia y 15.4% en DPV. En la tabla 4.5 se resumen las concentraciones máximas permitidas según este criterio, para cada uno de los benzimidazoles ensayados.

Interferente	Concentración máxima permitida	
	Fluorescencia	DPV
TBZ	5.23×10^{-7} M	1.50×10^{-7} M
TMX	2.62×10^{-5} M	3.00×10^{-7} M
DRN	--	2.84×10^{-7} M
BNM	1.31×10^{-7} M	2.86×10^{-7} M

Tabla 4.5. Concentración máxima admisible de otros benzimidazoles para no producir interferencia en la determinación de CB[7]-CBZ.

Se observa que los valores de concentración de interferente permitida en medidas de DPV son bastante menores que al trabajar en fluorescencia, lo que aporta una mayor

selectividad al método espectroscópico. Este hecho es más notable en el caso del TMX y el DRN.

Analizando individualmente cada uno de los interferentes ensayados, se observa que el TBZ no es electroactivo en las condiciones electroquímicas de medida (líneas roja y verde en figura 4.22). Sin embargo, se observa una disminución del pico de oxidación del complejo CB[7]-CBZ con concentraciones crecientes del interferente en disolución.

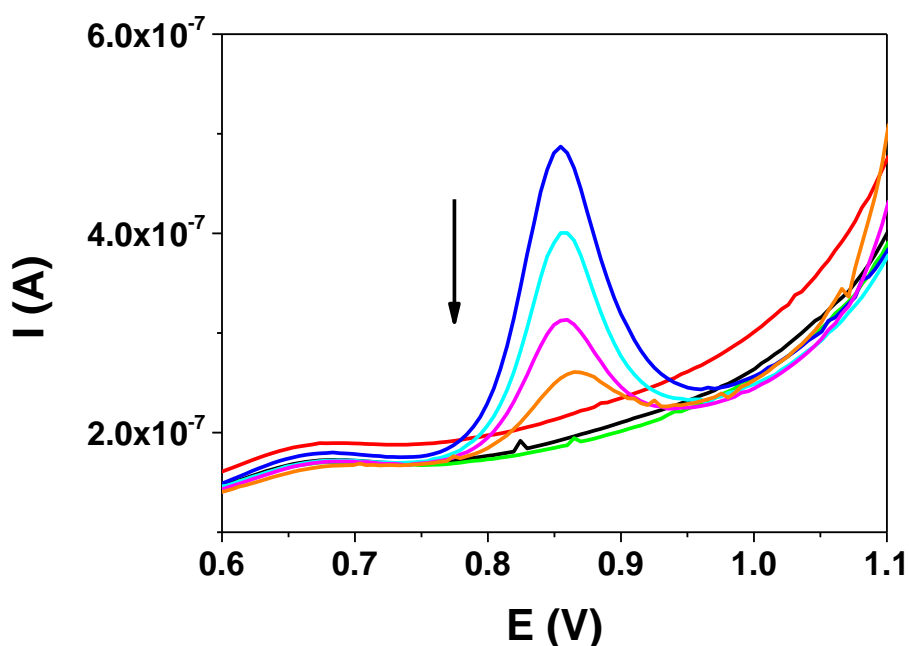


Figura 4.22. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de la influencia del TBZ como interferente en la determinación de CB[7]-CBZ: — Electrolito soporte, — [TBZ] = 5.71×10^{-7} M, — [TBZ] = 5.71×10^{-7} M + [CB[7]] = 2.86×10^{-6} M, — CB[7]-CBZ, — CB[7]-CBZ + 5.71×10^{-7} M [TBZ], — CB[7]-CBZ + 2.86×10^{-6} M [TBZ], — CB[7]-CBZ + 5.71×10^{-6} M [TBZ].

Por otro lado, las medidas de fluorescencia sí permiten detectar la formación del complejo de TBZ con el CB[7], al que correspondería una onda de emisión con un máximo a $\lambda = 345$ nm y cuya intensidad aumenta en presencia de CB[7] (líneas negra y roja en figura 4.23, inserto). Debido a esto, al hacer el estudio de CB[7]-CBZ con concentraciones crecientes de TBZ, se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia del CB[7]-CBZ y un aumento de la banda de 345 nm relacionado con la competencia por el receptor macrocíclico.

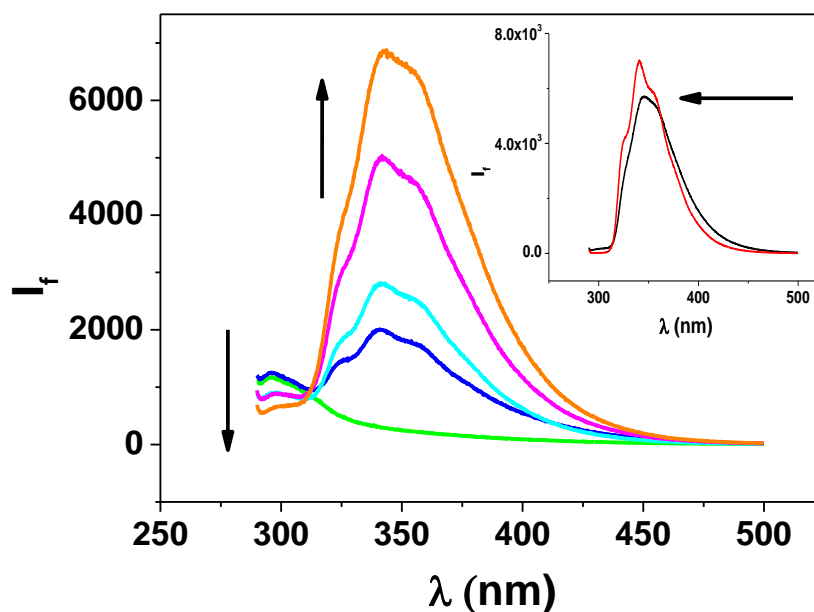


Figura 4.23. Influencia del TBZ como interferente en la determinación de CB[7]-CBZ en fluorescencia: inserto: — [TBZ] = 2.47×10^{-7} M, - [TBZ] = 2.47×10^{-7} M + [CB[7]] = 2.47×10^{-7} M. — CB[7]-CBZ, - CB[7]-CBZ + 1.31×10^{-7} M [TBZ], — CB[7]-CBZ + 2.62×10^{-7} M [TBZ], - CB[7]-CBZ + 5.23×10^{-7} M [TBZ], — CB[7]-CBZ + 1.05×10^{-6} M [TBZ].

Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por Saleh y col. en los que presentan la interacción de TBZ con el CB[7] y en los que describen el desplazamiento del pKa del analito como consecuencia de la formación del complejo [48]. La constante de asociación obtenida por los autores para el complejo de TBZ con CB[7], es del orden de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$, valor superior al obtenido en este trabajo para el CBZ. La mayor estabilidad del complejo CB[7]-TBZ en relación al CB[7]-CBZ, produce una competencia entre ambos analitos por el receptor lo que explicaría la gran interferencia que se produce en presencia de este fungicida.

El TMX no presenta señal en fluorescencia ni es electroactivo en las condiciones de trabajo. Sin embargo, como se muestra en la figura 4.24, concentraciones crecientes de este interferente producen una disminución tanto en la intensidad de oxidación, como en la de fluorescencia del CB[7]-CBZ. Como se mostró en la tabla 4.5, esta interferencia es mayor para medidas de DPV ya que, por fluorescencia, se permite una concentración de TMX en el medio casi 100 veces mayor que la de CBZ.

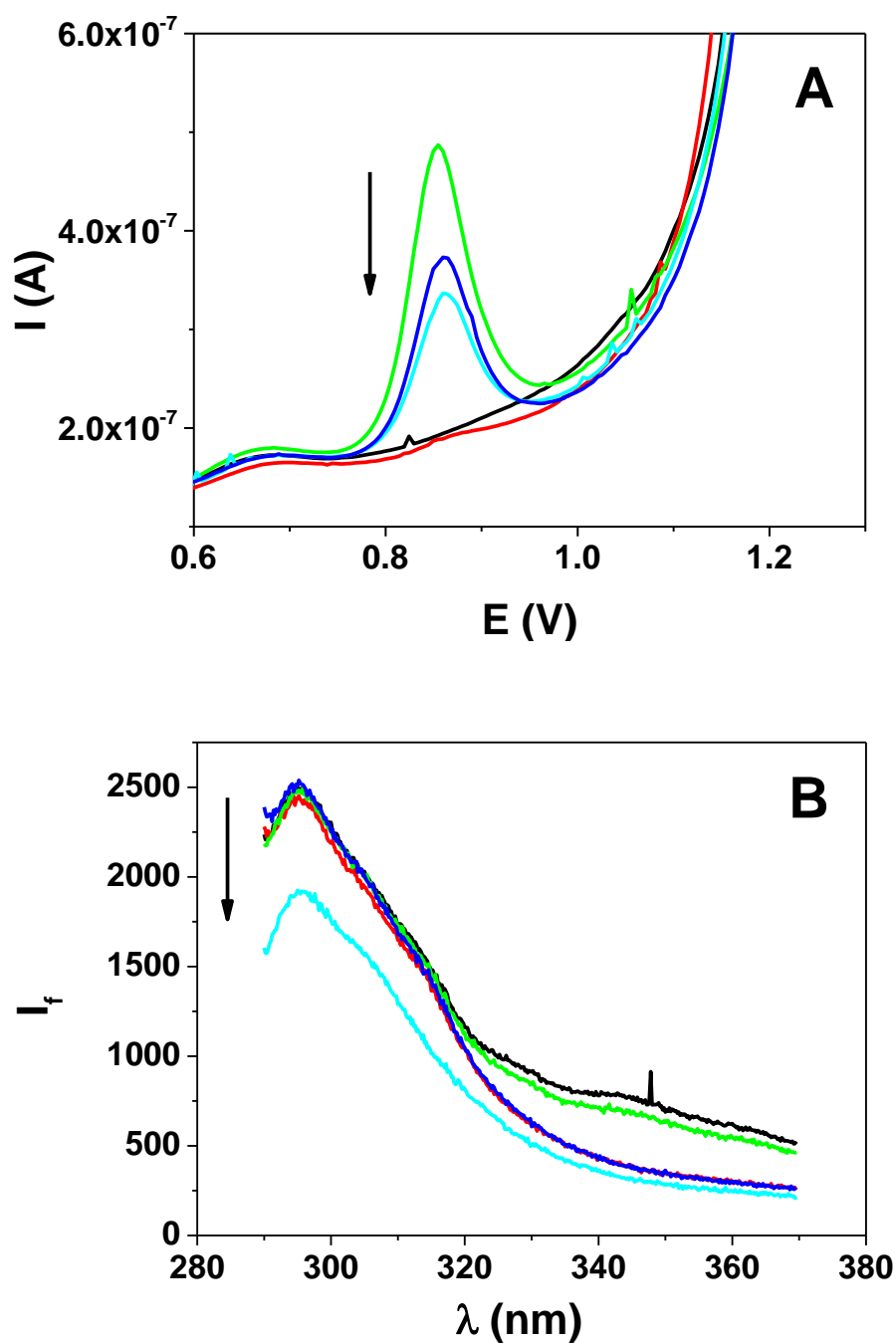


Figura 4.24. Influencia del TMX como interferente en la determinación de CB[7]-CBZ. A) Medidas de DPV – Electrolito soporte, – [TMX] = 5.71×10^{-7} M, – CB[7]-CBZ, – CB[7]-CBZ + 5.71×10^{-7} M [TMX], – CB[7]-CBZ + 2.86×10^{-6} M [TMX]. B) Medidas de fluorescencia: – CB[7]-CBZ, – CB[7]-CBZ + 1.05×10^{-6} M [TMX], – CB[7]-CBZ + 2.62×10^{-6} M [TMX], – CB[7]-CBZ + 5.23×10^{-6} M [TMX], – CB[7]-CBZ + 5.23×10^{-5} M [TMX].

Al contrario que el TBZ y el TMX, el DRN es electroactivo en las condiciones de trabajo. Como se puede observar en los voltamperogramas de la figura 4.25, presenta un

potencial de pico cercano a 1.0 V, algo superior al correspondiente al complejo CB[7]-CBZ. A la vista de la estructura química de DRN no sería, a priori, esperable una fuerte interacción con el receptor, lo que quedaría apoyado por la coincidencia de los voltamperogramas registrados tanto para disoluciones de DRN como de DRN con CB[7] (inserto figura 4.25). No obstante, la proximidad de la señales de oxidación del DRN y del CB[7]-CBZ, hace que el DRN produzca una interferencia a partir de la mitad de concentración que la del analito cuando se trabaja en DPV. Estos niveles suponen 100 veces menos de concentración admitida con respecto a los tolerados en disolución si se realizan medidas de fluorescencia.

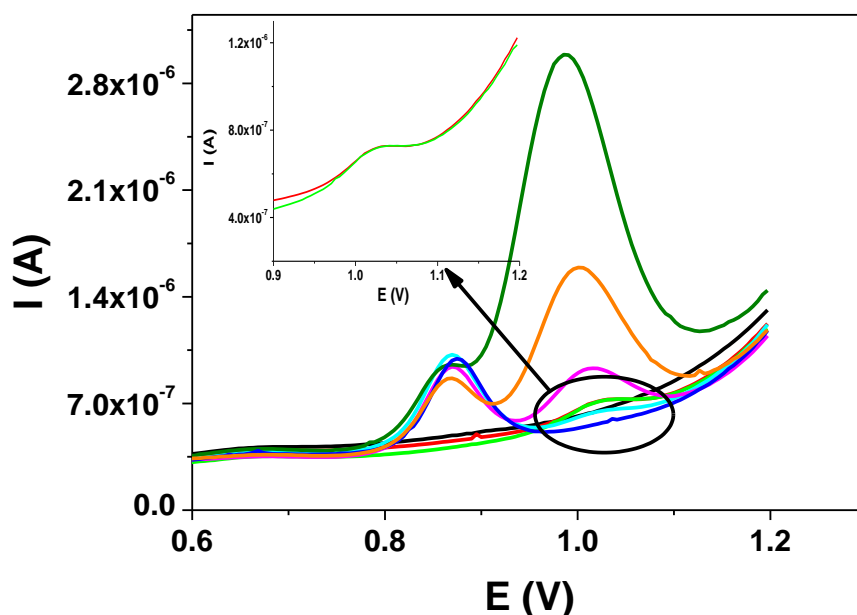


Figura 4.25. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de la influencia de la presencia de concentraciones crecientes de DRN en la determinación de CB[7]-CBZ. — Electrolyto soporte, — [DRN] = 5.72×10^{-7} M, — [DRN] = 5.72×10^{-7} M + [CB[7]] = 2.86×10^{-6} M, — CB[7]-CBZ, — CB[7]-CBZ + 5.72×10^{-7} M [DRN], — CB[7]-CBZ + 2.86×10^{-6} M [DRN], — CB[7]-CBZ + 1.14×10^{-5} M [DRN], — CB[7]-CBZ + 2.86×10^{-5} M [DRN].
Inserto: DRN y DRN + CB[7].

Respecto a los resultados obtenidos mediante espectrofluorimetría y una vez comprobado que el DRN no presenta emisión en las condiciones de medida, concentraciones crecientes de este fungicida, prácticamente no varían la intensidad de fluorescencia del complejo CB[7]-CBZ en el intervalo estudiado ($[DRN]/[CBZ] = 50$) (figura 4.26).

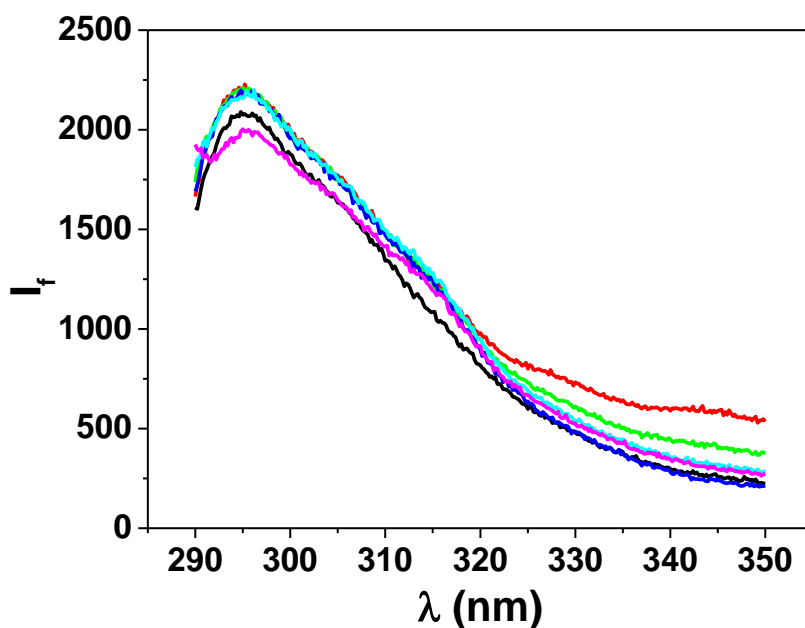


Figura 4.26. Influencia de la presencia de concentraciones crecientes de DRN en la determinación de CB[7]-CBZ. Medidas de fluorescencia: — CB[7]-CBZ, — CB[7]-CBZ + 5.23×10^{-7} M [DRN], — CB[7]-CBZ + 1.05×10^{-6} M [DRN], — CB[7]-CBZ + 1.57×10^{-6} M [DRN], — CB[7]-CBZ + 2.09×10^{-6} M [DRN], — CB[7]-CBZ + 2.62×10^{-6} M [DRN].

Por último, se estudió la influencia del BNM como interferente. Los resultados se muestran en la figura 4.27. La respuesta espectrofluorimétrica y electroquímica del BNM coincide con la del CBZ, oxidándose al mismo potencial y emitiendo a la misma longitud de onda. Además, en ambos métodos se comprobó la interacción del BNM con el CB[7] debido al aumento de la intensidad de fluorescencia (ampliación figura 4.27B) y la disminución de la intensidad de su pico de oxidación con la presencia de CB[7] (figura 4.27A, líneas roja y verde). Al solaparse las señales de CBZ y el BNM, concentraciones crecientes del interferente produce en ambas técnicas un aumento de la intensidad de señal. Este hecho no supone una gran limitación puesto que el CBZ es el producto de degradación del BNM y, normalmente, la presencia de CBZ se expresa en términos de concentración total de ambos fungicidas [49].

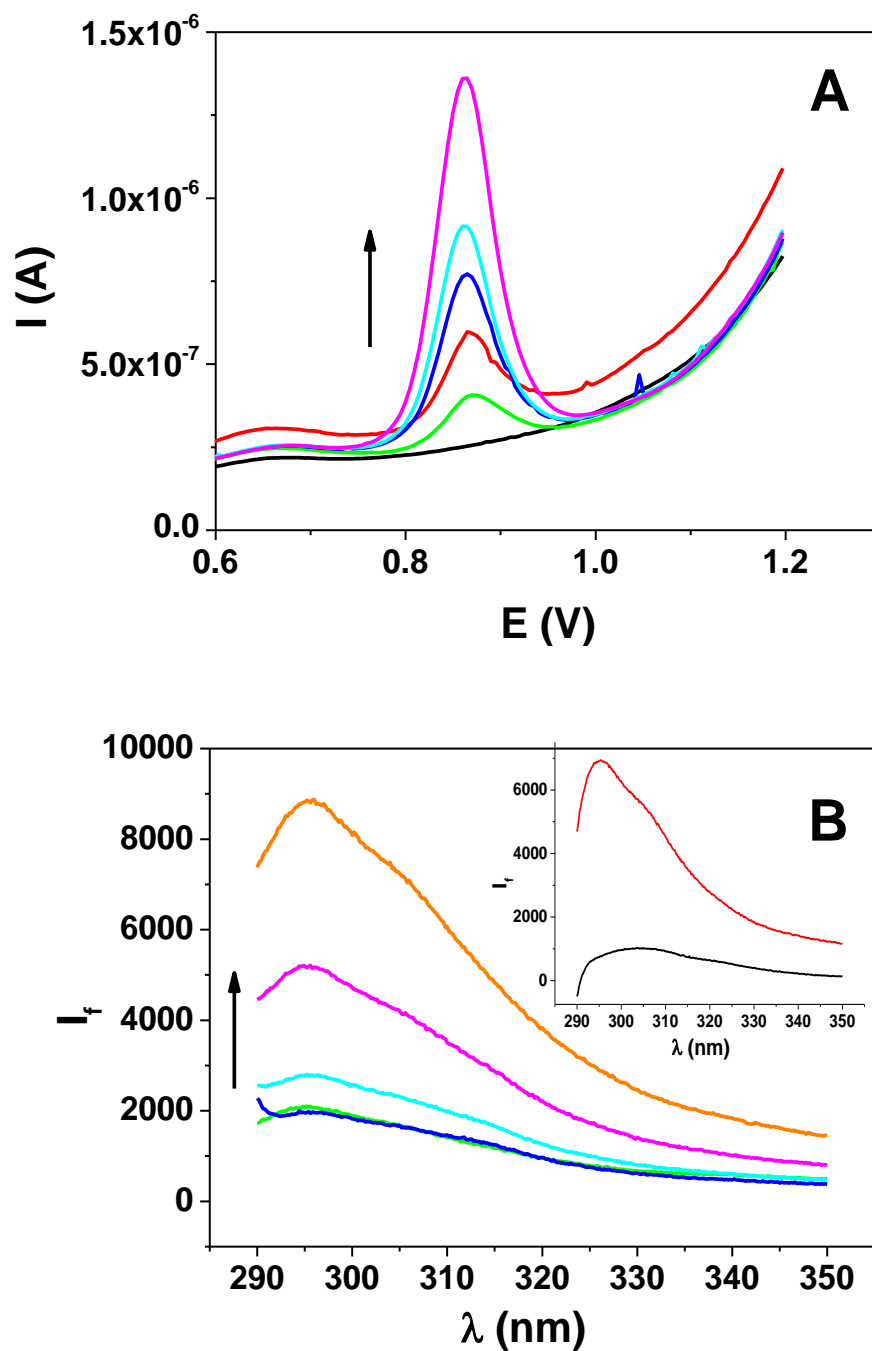


Figura 4.27. Influencia del BNM como interferente en la determinación de CB[7]-CBZ. A) Medidas de DPV: — Electrolyte soporte, — $[BNM] = 5.71 \times 10^{-7}$ M, — $[BNM] = 5.71 \times 10^{-7}$ M + $[CB[7]] = 2.86 \times 10^{-6}$ M, — CB[7]-CBZ, — CB[7]-CBZ + 5.71×10^{-7} M [BNM], — CB[7]-CBZ + 2.86×10^{-6} M [BNM]. B) Medidas de fluorescencia: — CB[7]-CBZ, — CB[7]-CBZ + 1.31×10^{-7} M [BNM], — CB[7]-CBZ + [BNM] = 2.62×10^{-7} M, — CB[7]-CBZ + 1.05×10^{-6} M [BNM], — CB[7]-CBZ + 2.62×10^{-6} M [BNM]. inset: — [BNM] = 2.58×10^{-6} M, — [BNM] = 2.58×10^{-7} M + $[CB[7]] = 2.58 \times 10^{-6}$ M.

4.4.8. Aplicación analítica de los métodos desarrollados.

Los métodos para el análisis de CBZ a través de la formación del complejo con CB[7] desarrollados en este capítulo, fueron evaluados mediante su aplicación en muestras reales, en concreto en piel de manzana (método electroquímico) y naranja (método espectrofluorimétrico). En ambos casos, se desarrolló un método de dispersión de matriz en fase sólida (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) como procedimiento de preparación de cada una de las muestras.

Desde su introducción en 1989, la utilización de la MSPD como tratamiento de preparación de muestras se ha extendido ampliamente [50]. Esta técnica consiste en la ruptura y dispersión de la muestra en un único paso, permitiendo cierta purificación de los extractos y minimizando o incluso eliminando posteriores procesos de limpieza. La MSPD se basa en la homogenización de la muestra con un adsorbente adecuado como C8, C18, sílice o alúmina y/o con un material inerte o desecante como las tierras de diatomeas, sulfato sódico o arena, utilizando un mortero hasta conseguir una mezcla seca y homogénea. Una vez se consigue la mezcla homogénea, ésta se empaqueta en una columna o cartucho de extracción que contiene una frita en la parte inferior. A continuación, se lleva a cabo la elución con el disolvente más apropiado. Puesto que la matriz se dispersa en la superficie del adsorbente, la adecuada selección de la combinación muestra-adsorbente puede permitir que algunos de los interferentes queden irreversiblemente retenidos en la superficie del adsorbente o, por el contrario, sean selectivamente eluidos de la columna antes de proceder a la extracción del analito de interés. La correcta elección del disolvente utilizado para la extracción determinará también la eficacia y selectividad del proceso. Su bajo coste y relativa sencillez, hacen que esta técnica sea una interesante alternativa a otras técnicas tradicionales de preparación de muestra [51].

Optimización del procedimiento de MSPD.

La MSPD ha sido utilizada previamente por otros autores para la determinación de CBZ en diferentes muestras como zumos de frutas [52], frutas [53] o granos de trigo [13], utilizando C8, C18 o sílice como adsorbentes.

A partir de estos antecedentes, se llevó a cabo la optimización del procedimiento de extracción mediante la selección del adsorbente más adecuado, la proporción óptima

muestra-adsorbente y la naturaleza y volumen del disolvente empleado como extractante. Para la evaluación de cada parámetro y en base a la bibliografía existente, se ensayaron:

- Tipo de adsorbente: C18 y alúmina.
- Porcentaje de muestra/adsorbente (25-100%).
- Uso de arena como dispersante.
- Tipo de eluyente: diclorometano, diclorometano/metanol (25-50% de metanol), diclorometano/hexano (25-50% de hexano).
- Volumen de eluyente (5-20 ml)

Los distintos experimentos se llevaron a cabo siguiendo el mismo esquema de procedimiento según se muestra en la figura 4.28, donde se representan los componentes de la mezcla de manera independiente.

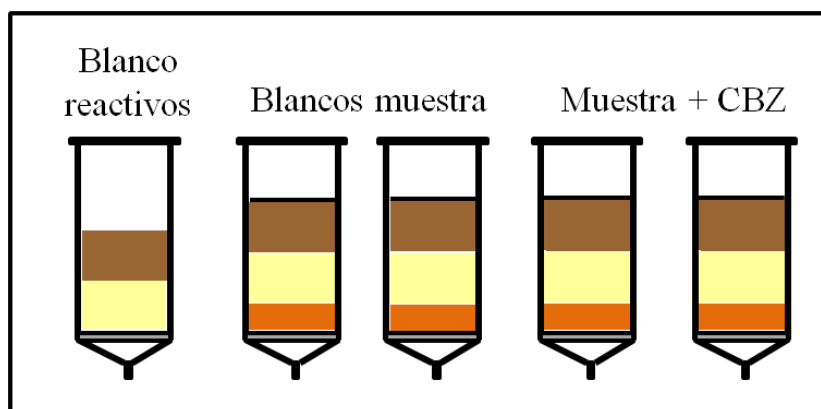


Figura 4.28. Esquema del procedimiento seguido para los ensayos de optimización de MSPD.

Los extractos obtenidos, una vez reconstituidos en el medio adecuado, fueron analizados bien mediante DPV o bien mediante fluorescencia. Los experimentos se iniciaron utilizando 5 ml de diclorometano como eluyente y reconstituyendo los extractos en 200 μ l de MeOH. Durante la optimización del adsorbente, las mejores recuperaciones se obtuvieron trabajando con C18 ya que con alúmina se producía una mayor interferencia por parte de la matriz y muy bajas recuperaciones. Una vez elegido

el C18 como adsorbente, se estudió la proporción muestra/adsorbente, obteniendo los mejores resultados para una misma relación entre ambos. De esta forma, se fijaron cantidades de 0.5 g de muestra y 0.5 g de C18, para el resto de estudios. A continuación, se evaluó la posibilidad de utilización de arena en el proceso de preparación, observándose que, además de actuar como dispersante obteniendo una mejor ruptura de la muestra, permitía un paso del disolvente más uniforme y fluido por la columna evitándose así, la formación de caminos preferentes y una compactación irregular de la columna. Por lo tanto, se incorporó una cantidad de 0.20 g de arena en la mezcla de dispersión.

En relación a los disolventes de extracción ensayados, las mezclas de hexano/diclorometano y metanol/diclorometano provocaban una mayor elución de matriz lo que interfería en gran medida en la recuperación de CBZ por ambas técnicas. Sin embargo, el uso de diclorometano como eluyente proporcionó las mayores recuperaciones, optimizándose entonces el volumen necesario para la elución del CBZ. Variando el volumen entre 5 y 20 ml se observó un aumento en el porcentaje de recuperación de 16 a 60%. También se observó que volúmenes mayores de 10 ml no mejoraban los porcentajes de recuperación de CBZ.

En la siguiente imagen se representa un esquema del procedimiento de MSPD utilizado, con los diferentes parámetros optimizados.

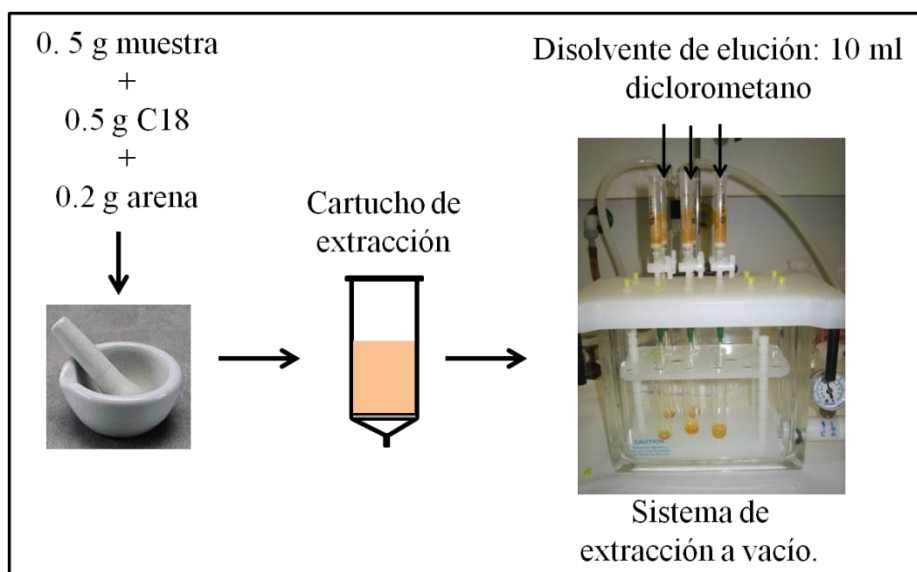


Figura 4.29. Esquema del procedimiento de preparación de muestra MSPD.

A continuación, se presenta la aplicación de los métodos de análisis desarrollados para la determinación de CBZ mediante DPV y espectroscopia de fluorescencia. Se describe el procedimiento de MSPD optimizado para cada muestra, así como los resultados obtenidos en ambos análisis.

Previamente a la aplicación de los métodos se comprobó que el exceso de CB[7] empleado era suficiente para asegurar la formación del complejo independientemente de la concentración inicial de analito que pudiera existir en la muestra. Así, la figura 4.30 muestra el incremento de la intensidad de fluorescencia de CBZ con la concentración de CB[7] para distintas concentraciones ensayadas. En todos los casos, se comprueba que a partir de un exceso de 10 veces de CB[7] respecto a la concentración de CBZ, la señal analítica permanece prácticamente constante, asegurando que el cambio de la intensidad de fluorescencia se debe a la ley de Lambert-Beer. Por esta razón se fijó un exceso de 10 veces para continuar con los experimentos de fluorescencia.

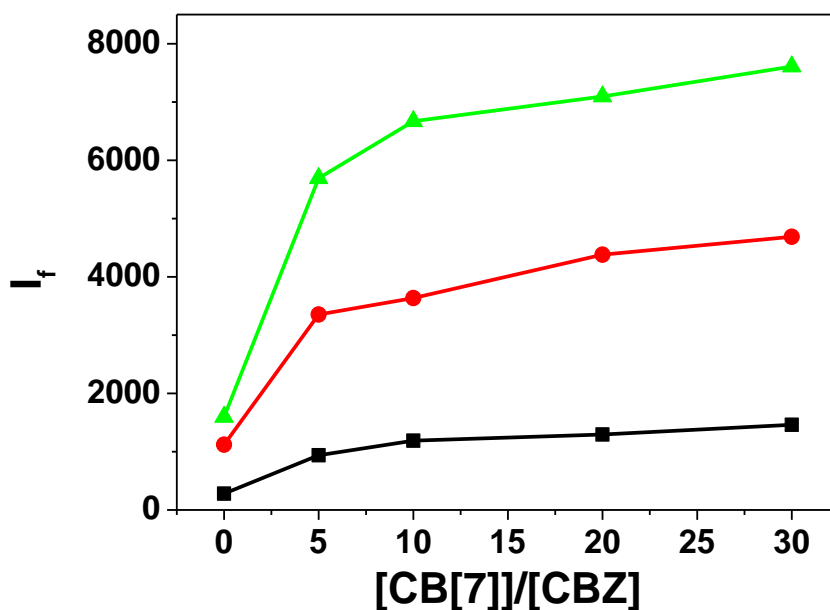


Figura 4.30. Respuesta de la intensidad de fluorescencia con la concentración de CB[7] para diferentes concentraciones de CBZ. — [CBZ] = 2.95×10^{-7} M, — [CBZ] = 1.36×10^{-6} M, — [CBZ] = 2.17×10^{-6} M.

4.4.8.1. Análisis en piel de naranja de CBZ mediante fluorescencia.

Para la aplicación del método de fluorescencia se utilizaron muestras de piel de naranja. Las muestras se trituraron, homogeneizaron y secaron a 100°C previamente al

proceso de extracción, utilizando la adición estándar como método de cuantificación. Así, diferentes alícuotas de aproximadamente 0.5 g de muestra de piel de naranja exactamente pesadas sin suplementar y suplementadas con 0.50, 1.47 y 2.97 μg de CBZ por gramo de muestra seca (0.0, 0.15, 0.45 y 0.90 $\mu\text{g/g}$ muestra sin tratar), se trataron según se expuso en la sección 4.3.6. Se utilizaron 200 μl de MeOH para redissolver el residuo de los eluatos llevados previamente a sequedad. Tras la adición de la cantidad correspondiente de CB[7], las muestras fueron filtradas a través de un filtro de jeringa de 0.45 μm y diluidas a 5.00 ml en tampón $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^- 10^{-4}$ M pH = 4.0, llevándose a cabo a continuación, la medida en el espectrofluorímetro.

La figura 4.31 muestra los resultados obtenidos. La intensidad de fluorescencia aumenta linealmente con la concentración de CBZ en un intervalo de 0.15 a 0.90 mg/Kg de muestra, ajustándose a una recta de ecuación: $I_f = (1.3 \pm 0.4) \times 10^2 + (1.21 \pm 0.08) \times 10^3 [\text{CB}[7]\text{-CBZ}] (\text{mg/Kg})$, $r = 0.995$.

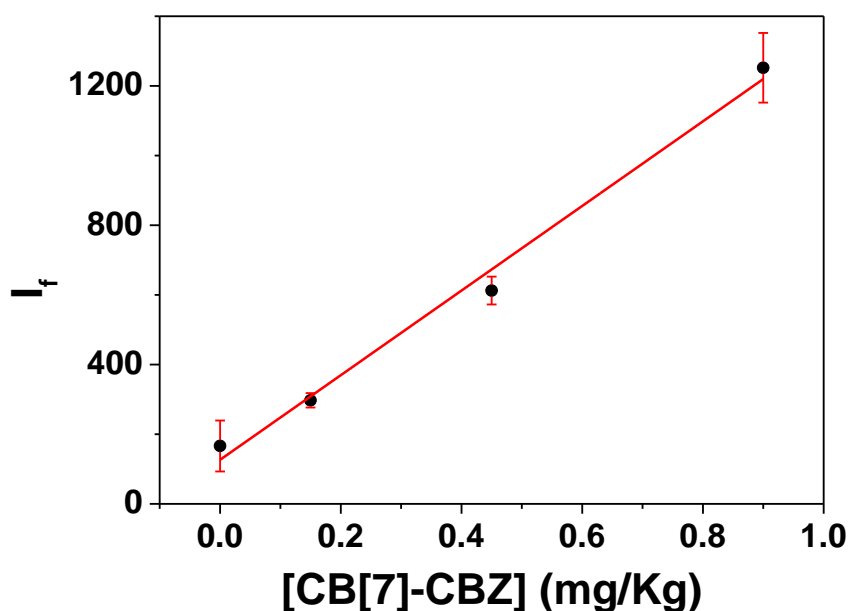


Figura 4.31. Incremento de la I_f con la concentración de CB[7]-CBZ en muestra de piel de naranja.

Los valores de LD y LC calculados en muestra fueron de 0.09 y 0.28 mg/Kg respectivamente, lo que permite la determinación de CBZ en muestras reales mediante el método espectrofluorimétrico desarrollado, dentro los límites legales permitidos en este tipo de muestras (0.50 mg/Kg) [11].

La tabla 4.6 muestra los valores de recuperación (%) y D.E.R. (%) para diferentes concentraciones de CB[7]-CBZ en la muestra de naranja.

Concentración ($\mu\text{g/g}$)	D.E.R. ($n = 5$) (%)	Recuperación (%)
0.15	7.0	55
0.45	6.5	34
0.90	8.0	46

Tabla 4.6. Valores de recuperación y reproducibilidad del método propuesto para las distintas concentraciones de CBZ ensayadas.

Las recuperaciones obtenidas no resultan demasiado satisfactorias. Sin embargo, son comparables a otras metodologías propuestas para esta misma muestra [53]. Los valores de D.E.R. ($n = 5$) (%) nos confirman que el método puede ser aplicado con una buena reproducibilidad, incluso trabajando en muestras reales.

4.4.8.2. Análisis en piel de manzana de CBZ mediante DPV.

Tras pelar la manzana, la piel se tritura y homogeniza junto con el adsorbente en un mortero para llevar a cabo el método de MSPD. En este caso también se utilizó la adición estándar como método de cuantificación. Así, diferentes alícuotas de aproximadamente 0.5 g de muestra de piel de manzana exactamente pesadas, fueron suplementadas con 0.2, 0.7, 1.5 y 2.3 μg de CBZ por gramo de muestra, previamente a la aplicación del método de MSPD desarrollado anteriormente y descrito en la sección 4.3.6. Los eluatos obtenidos se llevaron a sequedad, redisolviéndose en 200 μl de MeOH. A continuación, y previa filtración a través de un filtro de jeringa de 0.45 μm y la adición del exceso correspondiente de CB[7], fueron diluidos hasta un volumen final de 10.00 ml en electrolito soporte. El análisis del blanco de reactivos en cada ensayo permitió comprobar que no se introdujo contaminación durante el procedimiento desarrollado.

En la figura 4.32 se observa que la intensidad de pico aumenta linealmente con la concentración de CBZ añadida en un intervalo de 0.20 a 2.30 μg de CBZ / g de muestra de acuerdo con la ecuación: $I_p \text{ (A)} = (4.6 \pm 0.8) \times 10^{-8} + (1.57 \pm 0.06) \times 10^{-7} [\text{CB[7]}]$

CBZ] (mg/Kg), $r = 0.990$. Los valores de LD y LC obtenidos fueron 0.17 y 0.57 mg/Kg respectivamente. Estos valores permiten la aplicación del método desarrollado para la detección de este analito según los límites legales establecidos en la Unión Europea para este tipo de muestras (0.20 mg/Kg) [11].

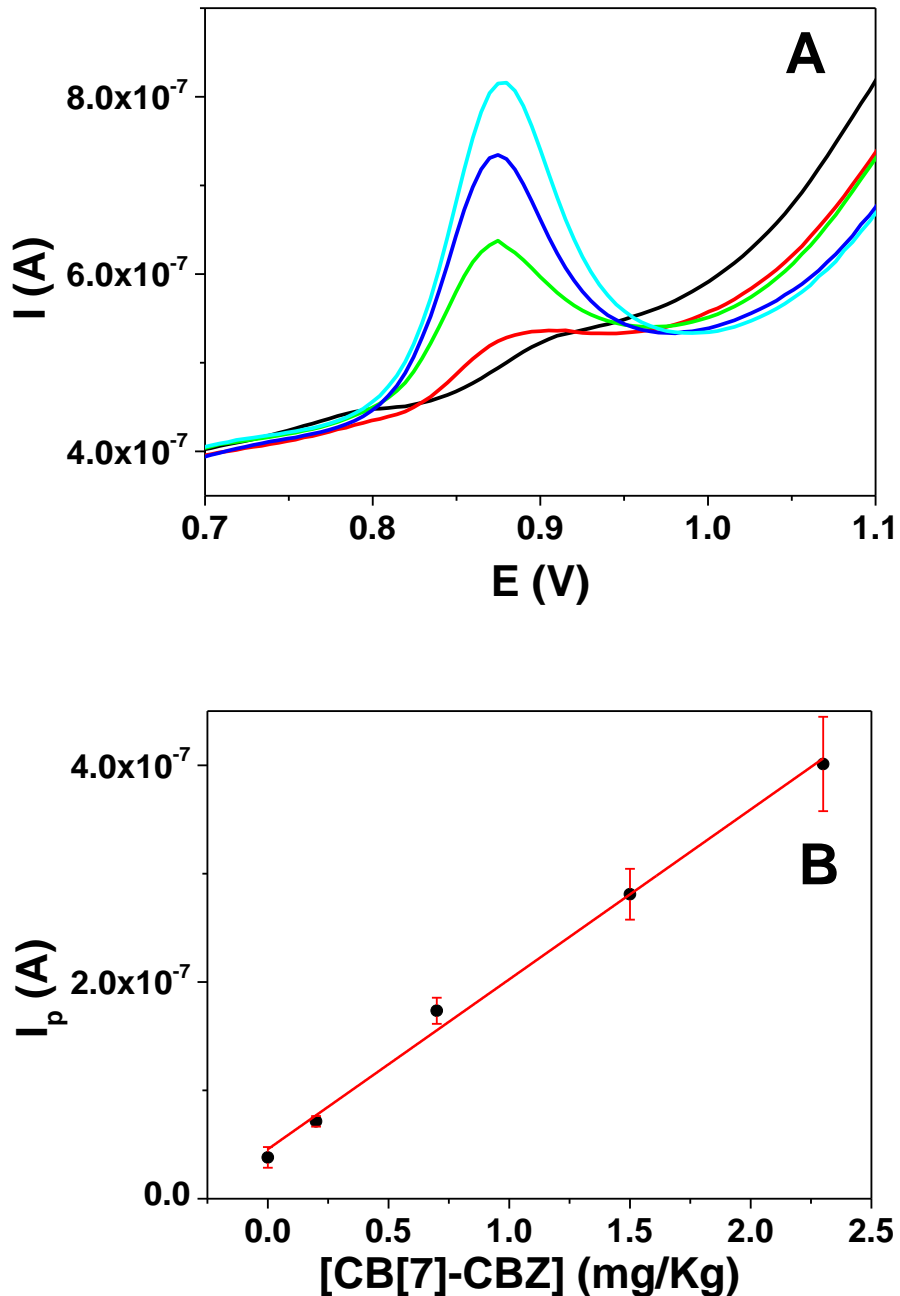


Figura 4.32. A) Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados para las diferentes alícuotas de la muestra. — Muestra (0.5 g de piel de manzana), — Muestra + 0.20 $\mu\text{g/g}$ CBZ, — Muestra + 0.70 $\mu\text{g/g}$ CBZ, — Muestra + 1.50 $\mu\text{g/g}$ CBZ, — Muestra + 2.30 $\mu\text{g/g}$ CBZ. B) Variación de la I_p con la concentración de CB[7]-CBZ en la muestra de manzana.

Los valores de recuperación (%) y D.E.R. (%) para diferentes concentraciones de CB[7]-CBZ en muestra, quedan recogidos en la tabla que se muestra a continuación (tabla 4.7):

Concentración (µg/g)	D.E.R. (n = 5) (%)	Recuperación (%)
0.20	6.8	75
0.70	7.0	114
1.50	8.3	99
2.3	10.8	98

Tabla 4.7. Valores de recuperación y reproducibilidad del método propuesto para las distintas concentraciones de CBZ ensayadas.

La recuperación del método aplicado resultó ser del 97% como media de todas las concentraciones ensayadas, lo que es comparable a otras metodologías propuestas anteriormente [17]. Una excelente reproducibilidad se refleja en valores de D.E.R. (n = 5) (%) inferiores al 10.8% en todos los casos ensayados.

4.5. Conclusiones.

A la vista de los resultados obtenidos en el presente capítulo, se puede concluir que la interacción que se produce entre el CBZ y el CB[7] en disolución es más fuerte que con el CB[6] y, además, resulta adecuada para la monitorización del fungicida mediante espectrofluorimetría y voltamperometría diferencial de impulsos.

El complejo CB[7]-CBZ puede presentar estequiometrías múltiples, 1:1 y 2:1, con altos valores de constante de asociación (10^5) como consecuencia de la estabilización del complejo formado por la interacción del grupo amida-éster cargado positivamente al pH de trabajo.

Del estudio del comportamiento de la señal electroquímica del complejo CB[7]-CBZ con la velocidad de barrido, se deduce que tanto el CBZ como el complejo se comportan como un sistema electroquímico cuasirreversible. El transporte de masa al electrodo está predominantemente limitado por difusión para el complejo, mientras que, para el analito solo, se trata de un proceso predominantemente adsorptivo. Además, se ha observado que la dimerización que sufre el CBZ con varios barridos en voltamperometría cíclica, se inhibe con la formación del complejo.

Bajo las condiciones óptimas de medida, se han obtenido unos límites de detección de 1.9×10^{-8} M y 1.2×10^{-8} M en fluorescencia y DPV respectivamente. Ambos métodos presentan buenos resultados de exactitud y precisión con valores de Er (%) y D.E.R. (%) menores del 6.0% y 8.7% para medidas de fluorescencia, y menores del 15.4% y 12.4% para medidas de DPV.

También se debe destacar el desarrollo de dos métodos de análisis que han sido aplicados a muestras reales con suficiente precisión y exactitud. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para las matrices analizadas permiten la detección de este fungicida por debajo del límite legal establecido para este tipo de muestras por la Unión Europea.

4.6. Bibliografía.

- [1] A.C. Bhasikuttan, H. Pal, J. Mohanty, Cucurbit[n]uril based supramolecular assemblies: tunable physico-chemical properties and their prospects, *Chemical Communications*. 47, **2011**, 9959-9971.
- [2] S. Gadde, A.E. Kaifer, Cucurbituril complexes of redox active guests, *Current Organic Chemistry*. 15, **2011**, 27-38.
- [3] Y.Y. Zhou, H.P. Yu, L. Zhang, H.W. Xu, L.A. Wu, J.Y. Sun, L. Wang, A new spectrofluorometric method for the determination of nicotine base on the inclusion interaction of methylene blue and cucurbit[7]uril, *Microchimica Acta*. 164, **2009**, 63-68.
- [4] L.A. Baumes, M.B. Sogo, P.a.C. Montes-Navajas Avelino, H. García, First colorimetric sensor array for the identification of quaternary ammonium salts, *Tetrahedron letters*. 50, **2009**, 7001-7004.
- [5] C. Li, L. Du, W. Wu, A. Sheng, Supramolecular interaction of cucurbit[n]urils and coptisine by spectrofluorimetry and its analytical application, *Talanta*. 80, **2010**, 1939-1944.
- [6] M.R. Siege, H.D. Sisler, *Antifungal Compounds*. 1, **1977**.
- [7] J.R. Corbett, K. Wright, A.C. Baillie, *The biochemical mode of action of pesticides*, Academic press, London, **1984**.
- [8] K.L. Hassall, *The biochemistry and uses of pesticides*, VCH, New York, **1990**.
- [9] L.C. Davidse, *Systemic Fungicides*, **1975**.
- [10] L. Davidse, W. Flach, Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of aspergillus-nidulans, *Journal of Cell Biology*. 72, **1977**, 174-193.
- [11] The European Union On-Line, Official Documents, <http://europa.eu>.
- [12] M. Galera, D. Zamora, J. Vidal, A. Frenich, A. Espinosa-Mansilla, A. de la Pena, F. Lopez, Determination of carbendazim, thiabendazole and fuberidazole using a net analyte signal-based method, *Talanta*. 59, **2003**, 1107-1116.
- [13] M. Michel, B. Buszewski, Isolation and determination of carbendazim residue from wheat grain by matrix solid-phase dispersion and HPLC, *Journal of Separation Science*. 26, **2003**, 1269-1272.
- [14] M. Michel, B. Buszewski, Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 800, **2004**, 309-314.
- [15] M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, G. Gonzalez-Hernandez, M. Angel Rodriguez-Delgado, Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of pesticides and metabolites in soils and water samples using HPLC and fluorescence detection, *Electrophoresis*. 33, **2012**, 2184-2191.
- [16] O. Zamora, E.E. Paniagua, C. Cacho, L.E. Vera-Avila, C. Perez-Conde, Determination of benzimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE-HPLC, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 393, **2009**, 1745-1753.
- [17] M. Radisic, S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*. 113, **2009**, 712-719.
- [18] M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, T.M. Borges-Miguel, M. Angel Rodriguez-Delgado, Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*. 1218, **2011**, 4808-4816.
- [19] M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, L.M. Ravelo-Perez, M. Angel Rodriguez-Delgado, Simultaneous determination of seven pesticides in waters using multi-walled carbon nanotube SPE and NACE, *Electrophoresis*. 29, **2008**, 4412-4421.
- [20] Y. Pico, R. Rodríguez, J. Manes, Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 22, **2003**, 133-151.
- [21] M. de la Huebra, P. Hernández, O. Nieto, Y. Ballesteros, L. Hernández, Determination of carbendazim in soil samples by anodic stripping voltammetry using a carbon fiber ultramicroelectrode, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 367, **2000**, 474-478.

- [22] P. Hernández, Y. Ballesteros, F. Galán, L. Hernández, Determination of carbendazim with a graphite electrode modified with silicone OV-17, *Electroanalysis*. 8, **1996**, 941.
- [23] P.L.A. Sundari, S.P. Palaniappan, P. Manisankar, Enhanced sensing of carbendazim, a fungicide on functionalized multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode and its determination in real samples, *Analytical Letters*. 43, **2010**, 1457-1470.
- [24] J. Li, Y. Chi, Determination of carbendazim with multiwalled carbon nanotubes-polymeric methyl red film modified electrode, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93, **2009**, 101-104.
- [25] A.D. Strickland, C.A. Batt, Detection of carbendazim by surface-enhanced raman scattering using cyclodextrin inclusion complexes on gold nanorods, *Analytical Chemistry*. 81, **2009**, 2895-2903.
- [26] Y. Guo, S. Guo, J. Li, E. Wang, S. Dong, Cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets as enhanced sensing platform for ultrasensitive determination of carbendazim, *Talanta*. 84, **2011**, 60-64.
- [27] M. Lezcano, W. Al-Soufi, M. Novo, E. Rodriguez-Nunez, J. Tato, Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, **2002**, 108-112.
- [28] N.L. Pacioni, V.N. Sueldo Ocello, M. Lazzarotto, A.V. Veglia, Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins, *Analytica Chimica Acta*. 624, **2008**, 133-140.
- [29] N. Saleh, N.A.F. Al-Rawashdeh, Fluorescence enhancement of carbendazim fungicide in cucurbit[6]uril, *Journal of Fluorescence*. 16, **2006**, 487-493.
- [30] N. Ni, T. Sanglivi, S. Yalkowsky, Solubilization and preformulation of carbendazim, *International Journal of pharmaceuticals*. 244, **2002**, 99-104.
- [31] W. Ong, A.E. Kaifer, Salt effects on the apparent stability of the cucurbit[7]uril-methyl viologen inclusion complex, *Journal of Organic Chemistry*. 69, **2004**, 1383-1385.
- [32] Y. Liu, X.Y. Li, H.Y. Zhang, C.J. Li, F. Ding, Cyclodextrin-driven movement of cucurbit[7]uril, *Journal of Organic Chemistry*. 72, **2007**, 3640-3645.
- [33] M.A. Rankin, B.D. Wagner, Fluorescence enhancement of curcumin upon inclusion into cucurbituril, *Supramolecular Chemistry*. 16, **2004**, 513-519.
- [34] B.D. Wagner, N. Stojanovic, A.I. Day, R.J. Blanch, Host properties of cucurbit[7]uril: fluorescence enhancement of anilinoaphthalene sulfonates, *Journal of Physical Chemistry B*. 107, **2003**, 10741-10746.
- [35] S. Nigam, G. Durocher, Spectral and photophysical studies of inclusion complexes of some neutral 3h-indoles and their cations and anions with beta-cyclodextrin, *Journal of Physical Chemistry*. 100, **1996**, 7135-7142.
- [36] A. Delapena, T. Ndou, J. Zung, I. Warner, Stoichiometry and formation-constants of pyrene inclusion complexes with beta-cyclodextrin and gamma-cyclodextrin, *Journal of Physical Chemistry*. 95, **1991**, 3330-3334.
- [37] J.Y. Ge, S.F. Xue, Q.J. Zhu, Z. Tao, J.X. Zhang, Interaction of cucurbit[n = 6-8]urils and benzimidazole derivatives, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 58, **2007**, 63-69.
- [38] J.W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.J. Kim, K. Kim, Cucurbituril Homologues and Derivatives: New Opportunities in Supramolecular Chemistry, *Accounts of Chemical Research*. 36, **2003**, 621-630.
- [39] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, 2 ed., John Wiley and Sons, USA, **2001**.
- [40] L. Cui, S. Gadde, W. Li, A.E. Kaifer, Electrochemistry of the inclusion complexes formed between the cucurbit[7]uril host and several cationic and neutral ferrocene derivatives, *Langmuir*. 25, **2009**, 13763-13769.
- [41] P. Manisankar, G. Selvanathan, C. Vedhi, Utilization of sodium montmorillonite clay-modified electrode for the determination of isoproturon and carbendazim in soil and water samples, *Applied Clay Science*. 29, **2005**, 249-257.
- [42] P. Manisankar, G. Selvanathan, S. Viswanathan, H. Prabu, Electrochemical determination of some organic pollutants using wall-jet electrode, *Electroanalysis*. 14, **2002**, 1722-1727.

- [43] P. Manisankar, G. Selvanathan, C. Vedhi, Utilisation of polypyrrole modified electrode for the determination of pesticides, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 85, **2005**, 409-422.
- [44] P. Manisankar, G. Selvanathan, C. Vedhi, Determination of pesticides using heteropolyacid montmorillonite clay-modified electrode with surfactant, *Talanta*. 68, **2006**, 686-692.
- [45] M. Galera, D. Zamora, J. Vidal, A. Frenich, A. Espinosa-Mansilla, A. de la Pena, F. Lopez, Determination of carbendazim, thiabendazole and fuberidazole using a net analyte signal-based method, *Talanta*. 59, **2003**, 1107-1116.
- [46] A.L. Monzón, D.V. Moreno, M.E.T. Padrón, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodríguez, Solid-phase microextraction of benzimidazole fungicides in environmental liquid samples and HPLC-fluorescence determination, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, **2007**, 1957-1963.
- [47] R. Romero-González, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta*. 76, **2008**, 211-225.
- [48] N. Saleh, A.L. Koner, W.M. Nau, Activation and stabilization of drugs by supramolecular pk(a) shifts: drug-delivery applications tailored for cucurbiturils, *Angewandte Chemie-international Edition*. 47, **2008**, 5398-5401.
- [49] S. Zhu, H. Wu, B. Li, A. Xia, Q. Han, Y. Zhang, Determination of pesticides in honey using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration and second-order standard addition methods, *Analytica Chimica Acta*. 619, **2008**, 165-172.
- [50] S. Barker, A. Long, C. Short, Isolation of drug residues from tissues by solid-phase dispersion, *Journal of Chromatography*. 475, **1989**, 353-361.
- [51] E. Kristenson, L. Ramos, U. Brinkman, Recent advances in matrix solid-phase dispersion, *Trends in Analytical Chemistry*. 25, **2006**, 96-111.
- [52] S. Grujic, M. Radisic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, Determination of carbendazim residues in fruit juices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food additives and contaminants*. 22, **2005**, 1132-1137.
- [53] C. Blasco, G. Font, Y. Pico, Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of chromatography A*. 970, **2002**, 201-212.

Capítulo 5 / Chapter 5

Diseño de sensores electroquímicos basados en cucurbit[8]uril. Estudio de distintas estrategias de inmovilización y su influencia en la capacidad de selección molecular en función de la carga del analito.

Desing of electrochemical sensors based on cucurbit[8]uril. Study of different immobilization strategies and their influence in the molecular selection ability depending on the analyte charge.

5.1. Introducción.

Como se ha mencionado en la introducción general de esta tesis, el desarrollo de sensores mediante la modificación de superficies con CB[n]s se encuentra poco explorado. Por esta razón, se decidió llevar a cabo el estudio de diferentes estrategias de inmovilización de CB[8] en la superficie de un electrodo de carbón vítreo.

Para el desarrollo de electrodos modificados se utilizan diferentes estrategias para inmovilizar moléculas o biomoléculas en la superficie electródica [1, 2]. En este capítulo, se presentan los resultados obtenidos al elegir, entre las distintas posibilidades existentes, los polímeros, cloruro de polivinilo y Nafion y el uso de una membrana de diálisis como soportes para la inmovilización del homólogo CB[8] sobre la superficie de un electrodo convencional.

El cloruro de polivinilo, más conocido por sus siglas en inglés, PVC, es un plástico de bajo coste, química y térmicamente estable, ampliamente estudiado y utilizado debido a su gran versatilidad. Como ejemplos de sus aplicaciones, se pueden señalar desde la fabricación de tuberías, marcos de ventanas, papel pintado o suelos, hasta su empleo como material base de tubos para medicina, bolsas de sangre o tarjetas de crédito. Por otro lado, presenta una fácil modificación química, lo que facilita su uso en la modificación de electrodos para el desarrollo de sensores [3].

El Nafion es un polímero ampliamente utilizado por su alta permeabilidad hacia cationes. Debido a esta propiedad, es utilizado con frecuencia para el desarrollo de sensores de analitos cargados positivamente. Gracias a la acumulación que se produce, se disminuyen los límites de detección y resultan más selectivos frente a interferentes cargados negativamente [4].

Por último, el empleo de una membrana de diálisis presenta múltiples ventajas para la inmovilización de moléculas o biomoléculas en la superficie de un electrodo. Entre ellas, resulta ser de gran simplicidad de uso para este fin, permite utilizar una cantidad pequeña de la sustancia que se desea inmovilizar y la sustancia atrapada entre el electrodo y la membrana adquiere una configuración de capa fina muy adecuada para las medidas con técnicas electroquímicas [5].

Entre las tres estrategias planteadas, la membrana de diálisis se utiliza, en un gran número de ocasiones, para la inmovilización de proteínas y enzimas mientras que el

Nafion y el PVC presentan un mayor campo de aplicación; desde el análisis de cationes metálicos al de aminoácidos en muestras biológicas o el desarrollo de biosensores [6-9].

Teniendo en cuenta las posibles interacciones que se dan en la formación de complejos (con la cavidad y/o los portales) con los CB[n]s, para realizar los estudios se seleccionaron tres huéspedes potenciales que, además de actuar como sondas electroquímicas, presentan diferentes características. Así, se eligieron tres compuestos con diferente carga como son el metil viológeno (MV^{2+}) como sonda con carga positiva, el sistema $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ como sonda con carga negativa y el hidroximetil ferroceno (FcOH) como sonda sin carga o neutra. Dichas sondas también presentan un tamaño y estructura adecuada para que la formación del complejo no esté limitada por impedimento estérico (figura 5.1).

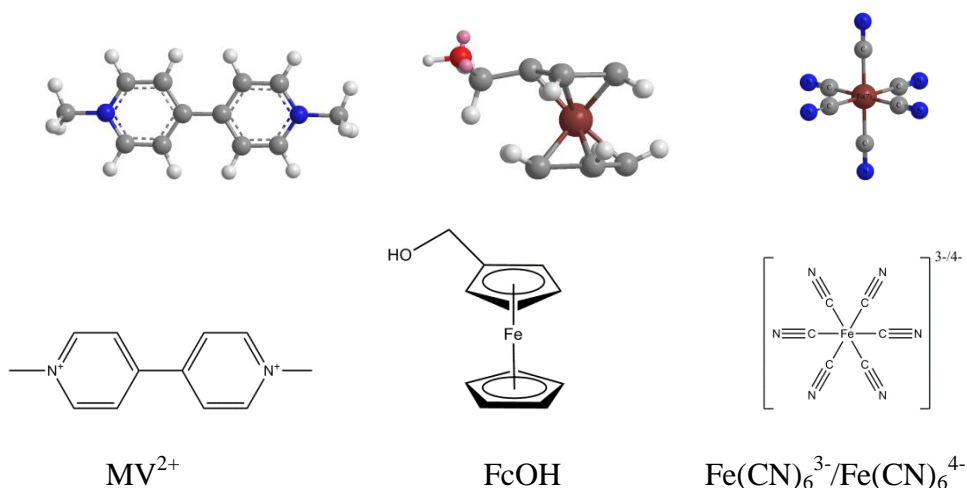


Figura 5.1. Estructura química de los compuestos estudiados.

En el estudio de las diferentes soportes empleados para la inmovilización de CB[8] con cada una de las sondas indicadas, se realizaron estudios tanto de CV como de espectroscopia de impedancia electroquímica. A continuación, se presenta una breve descripción de esta última técnica.

Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.

La espectroscopia de impedancia electroquímica (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) se comenzó a utilizar a gran escala en los años setenta, a partir de la

aparición de circuitos electrónicos suficientemente rápidos y sensibles para generar y analizar una señal de frecuencia y fase variable.

La EIS resulta ser una excelente técnica para el estudio de las propiedades eléctricas de un material sólido o líquido que se encuentra conectado a un transductor electroquímico apropiado o bien, siendo parte del mismo. Cualquier propiedad intrínseca del material o de un proceso específico que pueda afectar la conductividad de un sistema electroquímico, podría ser estudiada mediante EIS.

Dependiendo de la estructura física y de las propiedades de los materiales utilizados, de los procesos electroquímicos implicados o de la combinación de ambos, la impedancia puede variar con la frecuencia del potencial aplicado. En consecuencia, realizando medidas de impedancia en un intervalo adecuado de frecuencias y representando los resultados en la forma gráfica apropiada, es posible correlacionar la información obtenida con las propiedades físicas y químicas de los materiales y sistemas electroquímicos.

Es una técnica no invasiva que no requiere de una compleja ni cara instrumentación. De fácil utilización, resulta útil no sólo en investigación, sino también como técnica de control de las prestaciones de baterías, semiconductores, en tecnología de recubrimiento de capa fina o para monitorizar la corrosión. A este respecto, en las últimas décadas, la utilización de EIS ha permitido comprobar el comportamiento de diferentes barreras para evitar la corrosión de superficies metálicas. Las pinturas o diferentes mezclas orgánicas e inorgánicas depositadas sobre una superficie metálica se quiebran cuando se corroen, produciendo agujeros o brechas entre otros defectos. De esta forma, el agua u otros iones pueden penetrar en el polímero atacando la estructura aislante de éste. Esto produce un cambio en la impedancia característica del sistema metal/polímero, que puede ser registrado y cuantificado, mediante medidas de EIS [10].

La EIS también es una herramienta adecuada en el diseño y desarrollo de sensores permitiendo el estudio de las propiedades eléctricas que les confieren los diferentes materiales empleados en la fabricación de los mismos. Esta técnica permite un control y monitorización de las distintas etapas necesarias para la fabricación del sensor, así como su caracterización final. Por otra parte, puede ser utilizada como una herramienta analítica midiendo los cambios en las propiedades eléctricas de un sensor en presencia de concentraciones crecientes de analito, en lo que constituye un sensor impedimétrico.

Para poder realizar una mejor interpretación de los resultados obtenidos en este capítulo, se deben tener en cuenta ciertos aspectos teóricos que se resumen a continuación:

Aspectos teóricos de EIS.

La EIS es una técnica fundamentada en el empleo de corriente alterna. Se basa en la aplicación de una perturbación sinusoidal de pequeña amplitud (normalmente entre 5 y 10 mV) sobre el potencial del electrodo de trabajo a lo largo de un amplio intervalo de frecuencias ($10^{-4} - 10^6$ Hz), registrando la respuesta dentro de una celda electroquímica. Al operar en el dominio de las bajas frecuencias, todos los procesos contribuyen a la respuesta total del sistema, tanto los más rápidos como los más lentos. Sin embargo, al aumentar la frecuencia desaparece la contribución de los procesos más lentos, por lo que la obtención del diagrama de impedancias en el más amplio espectro de frecuencias constituye un examen analítico de los diversos procesos que se manifiestan e intervienen, global y simultáneamente, en el proceso electrodo. Para cada una de estas frecuencias se recoge una respuesta de corriente, también sinusoidal que, como se muestra en la siguiente figura, presenta una amplitud y una fase diferente respecto a la señal de potencial aplicado.

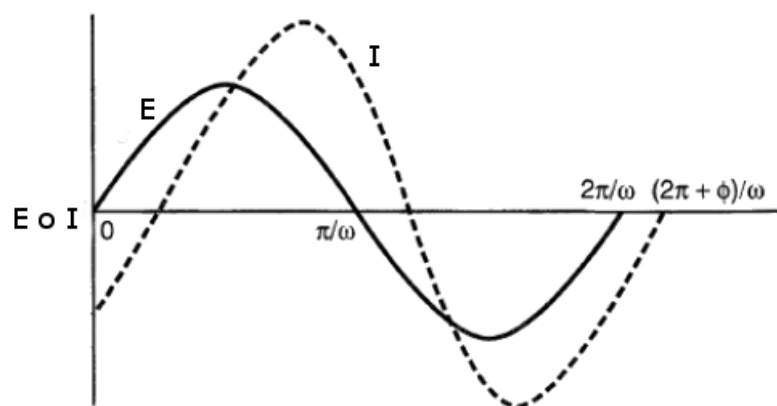


Figura 5.2. Respuesta sinusoidal de la corriente (I) y frente al potencial aplicado (E) a una frecuencia ω y una fase ϕ [11].

La impedancia (Z) se define como el cociente entre el potencial aplicado y la intensidad medida a la salida del circuito [12]. A partir de medir la diferencia de fase y

de amplitud de la respuesta, con respecto a la señal de perturbación, es posible obtener el valor de Z del material estudiado, según la siguiente ecuación:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)}$$

Ecuación 5.1.

En la ecuación anterior, E_t es el potencial a un tiempo t , I_t es la intensidad a un tiempo t , E_0 es la amplitud de potencial, I_0 es la amplitud, ω es la frecuencia y ϕ es el ángulo de fase. De este modo, la impedancia puede expresarse en función de una magnitud (módulo) Z_0 y un ángulo de fase ϕ para cada valor de ω . Para la relación vectorial resultante (figura 5.3), es conveniente representar la impedancia como un número complejo, utilizando como notación:

$$Z = Z' + jZ'' = R - j/\omega C; j = \sqrt{-1}$$

Ecuación 5.2.

Donde Z' representa la parte real atribuible a la resistencia (en fase con el potencial aplicado), y Z'' la parte imaginaria atribuible a la contribución del condensador (con una diferencia de fase con el potencial aplicado de $+\pi/2$) o del inductor (con una diferencia de fase con el potencial aplicado de $-\pi/2$). La resistencia se denota como R y la capacitancia por C .

El plano complejo que se representa en la figura 5.3, muestra la relación entre la parte imaginaria y la real de la impedancia.

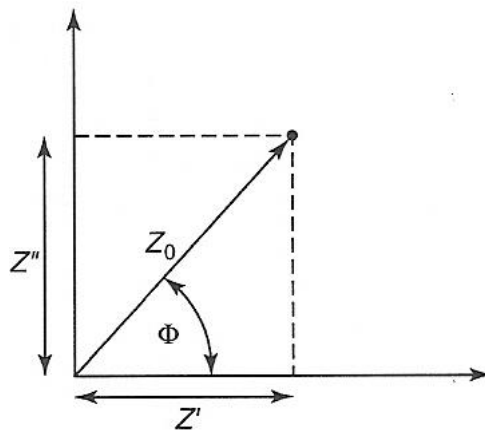


Figura 5.3. Representación del plano compuesto por Z'' y Z' .

Los resultados experimentales de las medidas de impedancia de una celda electroquímica se relacionan con la impedancia resultante de un modelo eléctrico apropiado, compuesto principalmente por resistencias y condensadores. En el caso de un sistema de celda electroquímica simple, el sistema se puede describir por el circuito equivalente de Randles representado en la figura 5.4.

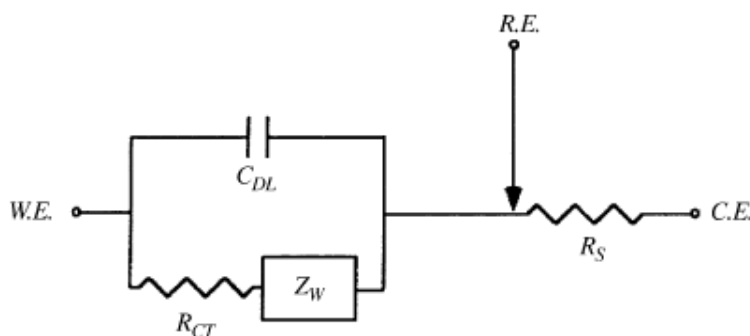


Figura 5.4. Modelo de circuito eléctrico equivalente de Randles.

En la figura 5.4 se representa el circuito equivalente compuesto mediante el paso de corriente entre el electrodo de trabajo (W.E.) y el contraelectrodo (C.E.) respecto al electrodo de referencia (R.E.), a través de los diferentes componentes que forman el circuito: R_{ct} , C_{dl} , Z_w y R_s .

- R_{ct} : resistencia a la transferencia de carga.
- C_{dl} : capacitancia de la doble capa.
- Z_w : impedancia debida a la transporte de materia de las especies redox a la superficie del electrodo descrita por Warburg.
- R_s : resistencia provocada por la disolución electrolítica, cables, electrodos, etc...

De esta forma, en un proceso electroquímico limitado por difusión, Z_w será dominante mientras que en un proceso electroquímico controlado por la transferencia de carga, R_{ct} presentará una mayor importancia.

La manera más habitual de presentar gráficamente los resultados de los experimentos de impedancia se denomina diagrama de Nyquist. En él se representa la

parte imaginaria multiplicada por -1, ($-Z''$), frente a la parte real (Z'). La información que se obtiene de este diagrama se basa en la forma que adopta (figura 5.5).

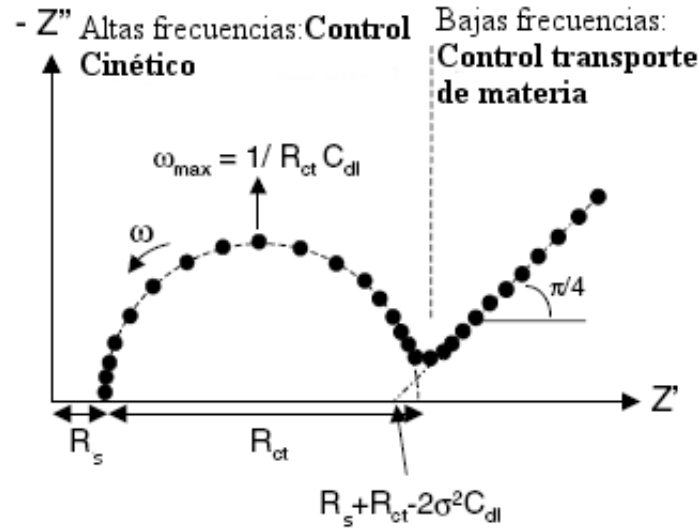


Figura 5.5. Diagrama de Nyquist. Adaptada de [13].

La representación de los resultados mediante el diagrama de Nyquist muestra dos zonas distintas correspondientes a dos procesos bien diferenciados: un semicírculo relacionado con un proceso limitado por la transferencia de carga al electrodo y una línea recta que representa el control de la transferencia de material al electrodo. De esta forma, del corte del semicírculo con el eje X se obtiene el valor de R_s y de R_{ct} , y de la extrapolación de línea correspondiente al proceso por difusión, donde predomina Z_w , se puede calcular el coeficiente de Warburg, σ , del cual se pueden estimar los coeficientes de difusión de las especies electroactivas.

La forma del diagrama variará dependiendo del sistema redox. Si la transferencia electrónica es cinéticamente lenta, se obtendrá una menor contribución difusiva de la masa obteniendo un valor de R_{ct} mayor. Sin embargo, para sistemas cinéticamente rápidos, toda la impedancia es mayoritariamente debida al transporte de materia, Z_w .

Determinadas modificaciones de la superficie electródica pueden producir una disminución de la superficie activa del electrodo y alterar así la respuesta de corriente alterna. Si el electrodo se modifica con materiales que puedan bloquear la transferencia

electrónica, la reacción electroquímica se realizará únicamente en la superficie activa a la que accede el analito por los huecos que presente el material con el que se ha modificado, lo que se observará como consecuencia en el diagrama de Nyquist, en términos del circuito de Randles presentado en la figura 5.4, será que:

- A altos valores de frecuencia donde la reacción electroquímica está cinéticamente controlada, la resistencia a la transferencia de carga R_{ct} aumentará debido a la disminución de la velocidad de la transferencia electrónica. De esta manera, se puede calcular la superficie cubierta (θ) mediante la siguiente ecuación [14]:

$$1 - \theta = \frac{R_{ct}^0}{R_{ct}}$$

Ecuación 3.

Donde R_{ct}^0 es la resistencia a la transferencia de carga para el electrodo no modificado y R_{ct} es la resistencia a la transferencia de carga en el electrodo modificado en las mismas condiciones de medida.

- A valores de frecuencia bajos, se producirá una desviación de la impedancia de Warburg de la dependencia lineal con $\omega^{1/2}$, lo cual concuerda con un comportamiento de difusión semi-infinita. Dicha desviación se manifestará en caso de que los defectos o agujeros en la capa de modificación estén lejos entre sí en comparación con la capa de difusión. Por el contrario, si los huecos se encuentran entre sí a una distancia cercana o comparable al espesor de la capa de difusión, incluso para modificaciones con un alto recubrimiento se producirá un solapamiento de la capa de difusión de cada uno de los huecos, provocando que el sistema se comporte como un electrodo no modificado en la representación de Nyquist.

5.2. Objetivos parciales.

En base a los conocimientos adquiridos durante la experimentación relativa a la interacción de CB[n]s con distintos analitos en disolución y el comportamiento electroquímico de los complejos formados (capítulo 4), se decidió emplear estos receptores macrocíclicos para el desarrollo de sensores electroquímicos sensibles y selectivos en función de los requerimientos analíticos de un determinado momento. Para este fin, se eligió el homólogo de ocho unidades de glicoluril, CB[8], por ser el más insoluble en agua ($s < 0.01 \text{ mM}$) y disponer de una cavidad de tamaño adecuado para incluir un gran número de analitos.

De acuerdo con el objetivo planteado, se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Estudio de diferentes estrategias de modificación con el fin de incorporar el receptor a la superficie de un electrodo de carbón vítreo. Se estudiaron tres estrategias distintas que incluyen el uso de PVC, Nafion o una membrana de diálisis.
2. Estudio de la respuesta electroquímica en CV y EIS empleando tres analitos con diferente carga formal. De esta manera se podrá analizar la influencia de la carga del analito en la interacción con el receptor y la influencia que pueda tener el soporte utilizado en la respuesta final registrada. Los compuestos elegidos para el estudio fueron: el MV^{2+} , como sonda cargada positivamente, el FcOH como sonda neutra y una mezcla $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ / $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ como sonda de carga negativa.
3. Caracterización de la superficie electródica mediante EIS y microscopía de fuerza atómica (AFM) con el fin de estudiar las características estructurales de las modificaciones con y sin el receptor.

5.3. Procedimientos.

5.3.1. Preparación de las suspensiones modificadoras.

Las diferentes suspensiones empleadas para la modificación del electrodo, se prepararon a partir de disoluciones de PVC y Nafion al 1% en THF y etanol respectivamente, y una suspensión al 1 % de CB[8] en etanol. A partir de éstas, se prepararon diariamente las suspensiones de mezcla correspondientes por dilución con etanol. Previamente a la modificación, se homogenizó la suspensión mediante tratamiento en ultrasonidos.

5.3.2. Preparación de los electrodos.

Antes de realizar cada modificación, el electrodo de trabajo se preparó siguiendo el procedimiento de limpieza descrito en la sección 3.3 y llevando a cabo, posteriormente, la activación de la superficie mediante barridos de CV entre 0.0 y 1.0 V.

La modificación del electrodo se realizó depositando sobre su superficie, 5 μl de una suspensión de PVC/CB[8] o Nafion/CB[8], según corresponda. En ambos casos, la proporción del polímero en la suspensión se mantuvo en 0.1 % mientras que el CB[8] se empleó en dos proporciones diferentes, 0.3 y 0.5 %. Tras dejar secar al aire, el electrodo ya está preparado para llevar a cabo las medidas. En el caso de la inmovilización de CB[8] con la membrana de diálisis, el electrodo se modificó con 5 μl de una suspensión de CB[8] de 0.3 ó 0.5 % en etanol, dejándolo secar al aire y cubriéndolo, posteriormente, con una membrana de diálisis (1.5 cm^2) fijada con una anilla de goma.

5.3.3. Medidas electroquímicas.

Para las tres modificaciones presentadas se llevaron a cabo las medidas de CV y EIS de las tres sondas indicadas anteriormente.

Las medidas ciclovoltamperométricas de disoluciones independientes 1.00×10^{-3} M de FcOH , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ y MV^{2+} se realizaron a una V_b de 100 mV/s en NaCl 0.1 M como electrolito soporte.

Los estudios de impedancia se realizaron en el potencial de equilibrio y en las mismas condiciones químicas que las utilizadas en CV, para un intervalo de frecuencias comprendido entre 0.1 Hz y 0.1 MHz con una amplitud de voltaje sinusoidal de 5 mV.

Los resultados de impedancia se presentan en forma de diagramas de Nyquist. Para todas las medidas realizadas con el MV^{2+} , la disolución se purgó mediante el paso de nitrógeno durante 5 minutos para eliminar el oxígeno disuelto.

5.3.4. Medidas de 1H -RMN.

Se registraron los espectros de 1H -RMN para disoluciones de FcOH en concentración 1.90×10^{-3} M, sin y con un exceso de CB[8] ($[CB[8]] = 4.0 \times 10^{-3}$ M) en D_2O . Las disoluciones se sometieron a ultrasonidos durante 30 minutos.

5.4. Resultados y discusión.

5.4.1. MV^{2+} como huésped del CB[8].

El comportamiento electroquímico del MV^{2+} se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía [15-17]. Su voltamperograma cíclico (figura 5.6), muestra dos ondas reversibles correspondientes a los pares redox $MV^{2+}/MV^{+\bullet}$ y $MV^{+\bullet}/MV^0$.

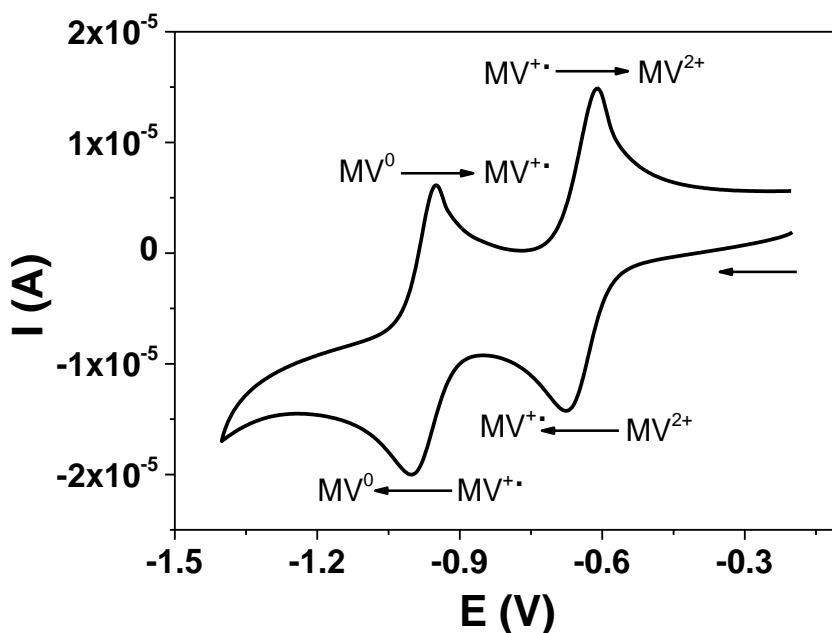
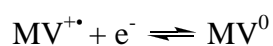
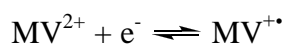
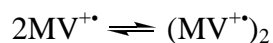


Figura 5.6. Voltamperogramas cíclicos de MV^{2+} en un electrodo de carbono vítreo. $[MV^{2+}] = 1.0 \times 10^{-3}$ M en tampón fosfato a pH = 7.

Las ondas anódicas y catódicas que aparecen en la figura anterior, corresponden a dos reacciones redox que involucran, cada una de ellas, el intercambio de un electrón según se esquematiza a continuación:



Por otra parte, estudios realizados por diferentes autores mediante técnicas espectroscópicas demuestran que se produce la dimerización del catión radical, $MV^{+\bullet}$, según el siguiente equilibrio [18]:



Al tratarse de un comportamiento bien conocido, son muchos los autores que han utilizado el MV^{2+} como huésped para estudiar su interacción supramolecular y la consecuente formación del complejo de inclusión con diferentes homólogos de CB[n]s [19-21]. En 2002, el grupo del Prof. Kim demostró que se producía la formación del complejo CB[7]- MV^{2+} , de estequiometría 1:1, mediante el uso de diversas técnicas como 1H -RMN, espectroelectroquímica y CV [19]. Esta última permite seguir la formación del complejo por el desplazamiento que, fruto de la inclusión en el CB[7], se produce en los potenciales formales de ambas ondas redox. Como consecuencia de esa inclusión, se observan desplazamientos de sus potenciales formales a valores más negativos en ambos pares redox situados a ~ -0.7 V y ~ -1.0 V, respectivamente: unos 22 mV para el primer par y unos 111 mV en el caso del segundo par redox. De esta forma el comportamiento electroquímico del sistema se vuelve cuasirreversible.

En los mismos trabajos, los autores estudiaron el mecanismo de transferencia electrónica mostrando que el proceso redox del primer par se produce, predominantemente, por transferencia directa de carga, mientras que el segundo par redox ocurre por ambas vías, transferencia directa e indirecta. Esto significa que el complejo CB[7]- MV^{2+} puede reducirse y oxidarse sin la disociación del mismo lo cual es interesante ya que, normalmente, los procesos electroquímicos de huéspedes electroactivos en presencia de hospedadores se produce únicamente para el huésped libre [22]. Finalmente, los autores demuestran, mediante medidas de espectroscopia de absorción molecular, que la dimerización del catión radical queda inhibida debido a la formación del complejo de inclusión.

Unos meses más tarde, este mismo grupo publicó el estudio de la formación del complejo de MV^{2+} con CB[8] concluyendo que, a pesar del mayor tamaño de cavidad de éste homólogo, se forma exclusivamente el complejo CB[8]- MV^{2+} de estequiometría 1:1 [16]. La formación del complejo se siguió empleando CV, observándose un cambio más acusado de los potenciales formales que en el caso de trabajar con CB[7]. En concreto, y contrariamente a lo expuesto con CB[7], la interacción del MV^{2+} con el homólogo CB[8] produce un desplazamiento de ~ 160 mV hacia potenciales más positivos en el primer par redox mientras que, con CB[7], éste desplazamiento no sólo es más pequeño si no que se produce hacia potenciales negativos, dificultando la reducción. También a diferencia de lo observado con CB[7], el mecanismo de reducción de CB[8]- MV^{2+} transcurre a través de la formación del dímero CB[8]- $(MV^+)_2$. Los

autores atribuyen el cambio hacia potenciales positivos del primer par redox a la gran estabilidad que presenta el producto de la reducción $CB[8]-(MV^{+})_2$ e incluso, demuestran que es posible el control de la estequiometría en la formación del complejo, ya que únicamente se forma el complejo con el dímero al llevarse a cabo la reducción del huésped. Los cálculos de las constantes de formación del dímero realizados por los autores, indican que es más fácil la formación del dímero de MV^{2+} en presencia del $CB[8]$, que libre. Para el segundo par redox, ambos homólogos producen un desplazamiento hacia potenciales más negativos, pero en el caso de $CB[8]$, éste es mucho más acusado (~ 280 mV) comportándose, de nuevo, de forma cuasirreversible.

En la constante comparativa entre $CB[n]$ s y CDs, se puede decir que el MV^{2+} interacciona de manera totalmente opuesta con cada familia de macromoléculas. Como ya se ha mencionado, la interacción del MV^{2+} con los $CB[n]$ s ($n = 7$ y 8) es muy fuerte. Este compuesto presenta la longitud idónea para que los grupos amino cargados positivamente interactúen con los carbonilos de los portales, estabilizándose el complejo mediante interacciones ión-dipolo [23]. Esto mismo se demuestra para el 1,5-bis(amoniopentano en una comparativa con diferentes longitudes de cadena alifática [24]. En el caso del estudio con β - o γ -CD, y como ya se mencionó en la introducción general, al no disponer de densidad de carga negativa en los portales de sus cavidades, no se estabilizan los complejos de inclusión con huéspedes cargados positivamente y forman complejos preferentemente con compuestos neutros. Este hecho explica que las CDs sólo interaccionen con la forma totalmente reducida, el MV^0 . Como consecuencia, la constante de formación del MV^{2+} con los $CB[n]$ s disminuye según se produce la reducción del huésped ($K_1 > K_2 > K_3$), puesto que se desestabiliza el complejo formado. Sin embargo, sucede totalmente lo contrario en el caso de las CDs ($K_3 \gg K_2$; $K_1 = 0$) [16, 19, 25].

A partir de estos antecedentes, se comprobó el comportamiento electroquímico ya conocido del $CB[8]-MV^{2+}$ en disolución, para después poder compararlo con el comportamiento cuando el $CB[8]$ se encuentre modificando el electrodo. La figura 5.7 muestra el cambio en los potenciales formales de los procesos redox del MV^{2+} , registrado al añadir a la disolución concentraciones crecientes de $CB[8]$.

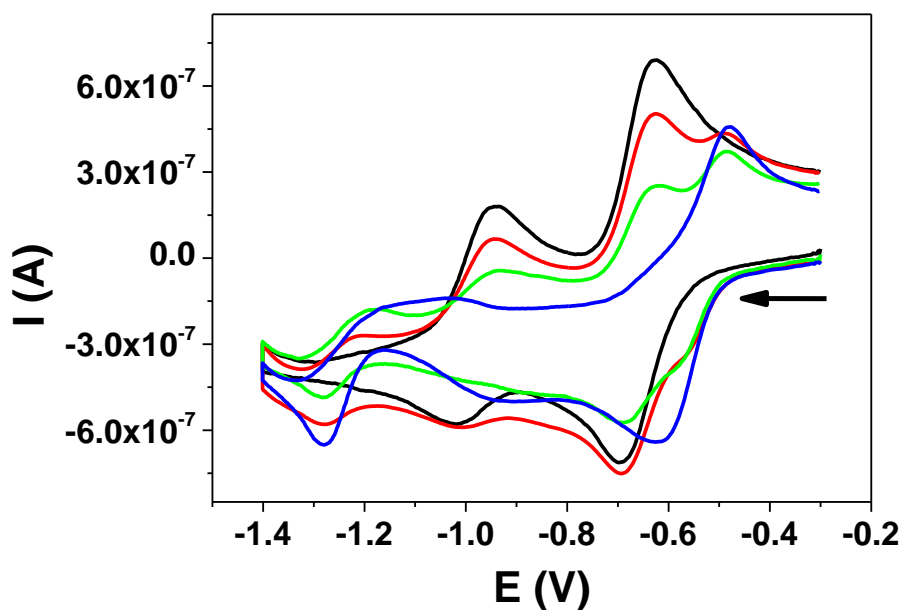


Figura 5.7. Voltamperogramas cíclicos registrados para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) con concentraciones crecientes de CB[8] en NaCl 0.1 M. — MV^{2+} , — $MV^{2+} + 2.5 \times 10^{-4}$ M CB[8], — $MV^{2+} + 5.0 \times 10^{-4}$ M CB[8], — $MV^{2+} + 1.0 \times 10^{-3}$ M CB[8].

Los resultados obtenidos concuerdan con los publicados previamente por Jeon y col. [16]. Es posible observar que, con únicamente una proporción CB[8]/ MV^{2+} de 0.25 (línea roja), aparece un nuevo sistema redox cuyas ondas se registran a potenciales más positivos para el primer par redox y más negativos para el segundo par redox, respecto a las correspondientes al MV^{2+} libre. Según se va incrementando la concentración de CB[8], disminuye la corriente del MV^{2+} libre y aumenta la correspondiente al complejo CB[8]- MV^{2+} .

A partir de estos resultados y antecedentes, se puede pensar que la elección de CB[8] como homólogo para la modificación del electrodo presentaría grandes ventajas para la detección de este compuesto, ya que además de su baja solubilidad, se requieren potenciales menos negativos para llevar a cabo la reducción del complejo con CB[8]. Por lo tanto, a continuación se realizó el estudio de la formación del complejo CB[8]- MV^{2+} en la superficie del electrodo utilizando PVC, Nafion o una membrana de diálisis como soporte. Se fijó una concentración de MV^{2+} de 1.0×10^{-3} M y se ensayaron dos proporciones diferentes de CB[8], 0.3 y 0.5%.

5.4.1.1. PVC como soporte.

Comenzando con la modificación realizada con PVC como soporte (figura 5.8), cuando se modifica el electrodo únicamente con PVC se observa una disminución brusca de la intensidad de señal debido a la presencia del polímero en la superficie electródica, así como un aumento en la diferencia de potencial entre el pico anódico y el catódico ($\Delta E = 66$ a 93 mV), lo que se traduce en un comportamiento más irreversible (figura 5.8, línea roja. Se muestra el primer par redox del MV^{2+} para más claridad). Sin embargo, con la presencia de CB[8] en la superficie electródica, tanto la corriente como la diferencia entre los potenciales del analito libre, se recuperan ligeramente, siendo necesaria una proporción de 0.5% de CB[8] para detectar la onda del complejo formado a un potencial formal menos negativo (-0.486 V) que el correspondiente al huésped libre (-0.664 V).

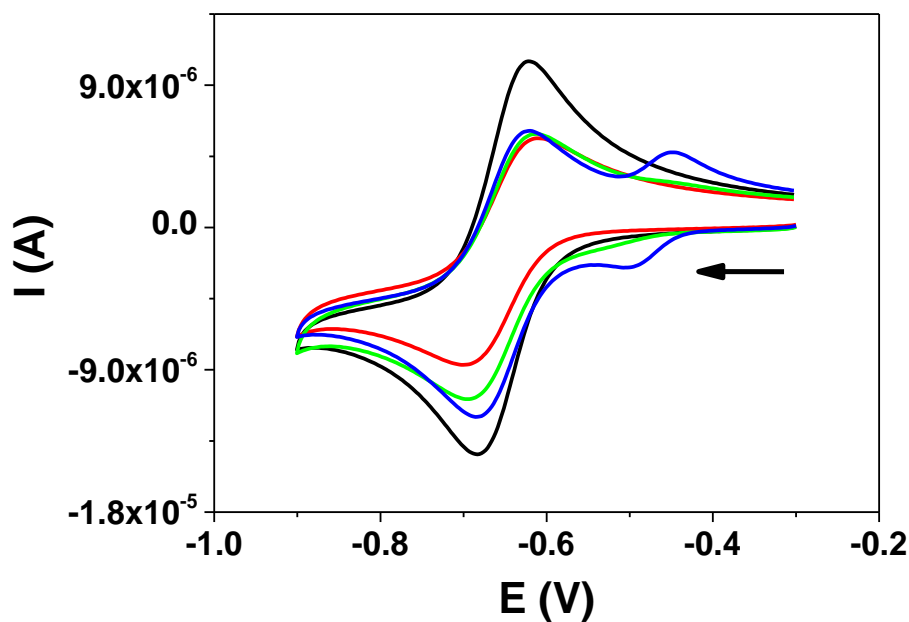


Figura 5.8. Voltamperogramas cíclicos registrados para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M: — GCE, — GCE/PVC, — GCE/PVC + 0.3% CB[8] y — GCE/PVC + 0.5% CB[8].

5.4.1.2. Nafion como soporte.

Como se puede observar en la figura 5.9, los resultados obtenidos en el caso de utilizar Nafion para la inmovilización de CB[8] en el electrodo, fueron diferentes de los que se acaban de mostrar con PVC.

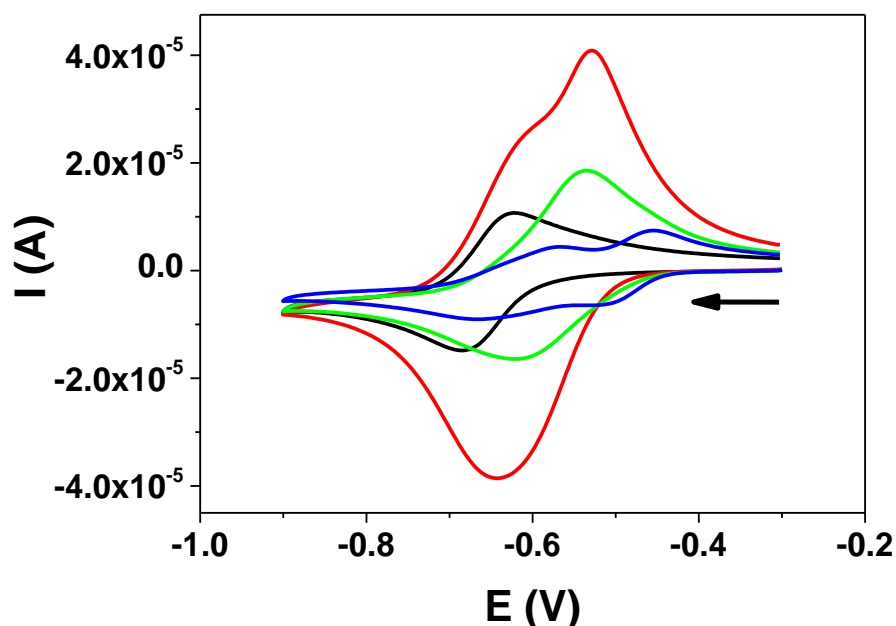


Figura 5.9. Voltamperogramas cíclicos registrados para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M: — GCE, — GCE/Nafion, — GCE/Nafion + 0.3 % CB[8] y — GCE/Nafion + 0.5 % CB[8].

Debido a la alta permeabilidad a cationes de este polímero, cuando el electrodo se encuentra modificado únicamente con Nafion, se observa una alteración en la respuesta electroquímica del MV^{2+} consistente en un incremento en las intensidades de corriente anódica y catódica, así como una pérdida de la reversibilidad en la transferencia electrónica ($\Delta E = 113$ mV). En este caso, un porcentaje de 0.3 % de CB[8] en la superficie del electrodo, es suficiente para intuir la formación del complejo; sin embargo, con 0.5 % de CB[8] se observan dos pares redox correspondientes a la respuesta electroquímica del MV^{2+} libre y a la del complejo formado con CB[8], obteniéndose valores de potencial formal de -0.619 y -0.483 V, respectivamente.

5.4.1.3. Membrana de diálisis como soporte.

El tercer método para inmovilizar el CB[8] en la superficie del electrodo fue mediante una membrana de diálisis (figura 5.10).

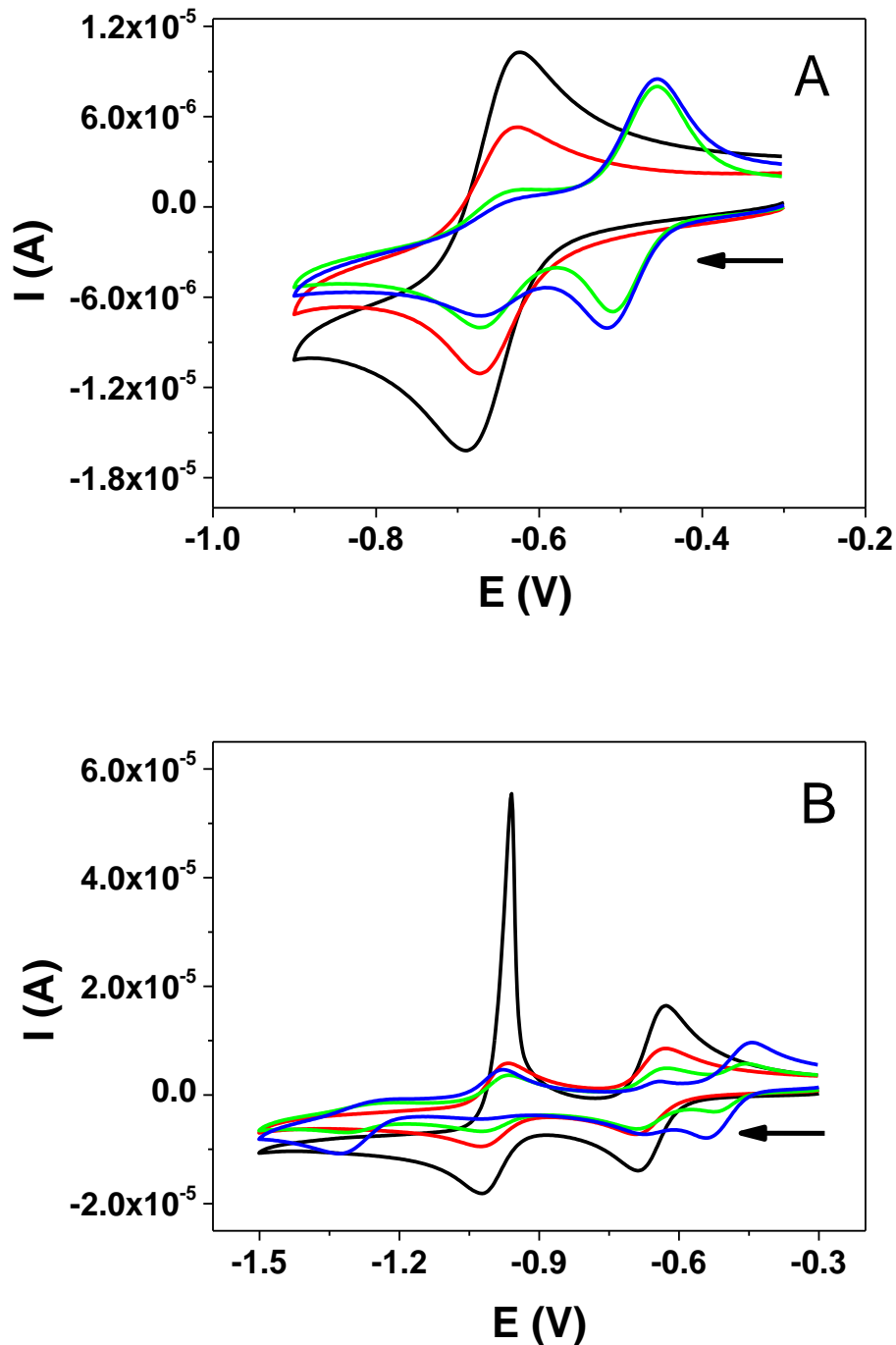


Figura 5.10. Voltamperogramas cíclicos registrados para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M: A) Primer par redox y B) Barrido completo. — GCE, — GCE/membrana de diálisis, — GCE/membrana de diálisis + 0.3 % CB[8] y — GCE/membrana de diálisis + 0.5 % CB[8].

El comportamiento del MV^{2+} observado en este caso, es similar al comportamiento ofrecido en disolución, lo que permite seguir fácilmente la formación del complejo. Al modificar el electrodo con la membrana, la corriente disminuye como ocurría con el PVC. Sin embargo, en este caso, se mantiene el comportamiento reversible propio del MV^{2+} (figura 5.10, líneas rojas). Al incorporar el CB[8] en la superficie del electrodo, el par redox correspondiente al MV^{2+} (-0.656 V) disminuye rápidamente conforme aumenta la concentración de CB[8], apareciendo un nuevo par redox correspondiente a la formación del complejo a un potencial de -0.485 V, lo que significa un desplazamiento del potencial formal de 163 mV respecto al huésped libre. El par redox correspondiente al complejo formado, mantiene la reversibilidad con un valor de $\Delta E = 63$ mV y una relación $I_{red} / I_{ox} = 1.01$.

En la figura 5.10B se representa el barrido completo de la respuesta electroquímica del MV^{2+} con la membrana de diálisis como soporte. Cuando la proporción de CB[8] en el electrodo es 0.5 % (línea azul), se observa que el segundo par redox se vuelve más irreversible con una diferencia de potenciales entre el pico de reducción y oxidación de 354 mV. Además, a las concentraciones de MV^{2+} del ensayo y trabajando con el electrodo sin modificar, se puede observar un pico de adsorción en el barrido de vuelta, que podría explicarse debido a la disminución de la solubilidad del MV^0 generado. Esta onda de adsorción desaparece con el CB[8], debido a que la formación del complejo conduce a una mayor solubilización, concordando con resultados obtenidos anteriormente con otro tipo de hospedadores [25].

Comparando las tres estrategias ensayadas, se puede concluir que la formación del complejo con MV^{2+} como huésped, se observa más claramente cuando se utiliza como soporte la membrana de diálisis, permitiendo una formación del complejo más cuantitativa que cuando se tienen los polímeros PVC o Nafion como soportes.

5.4.1.4. Caracterización de las superficies mediante EIS.

Se realizaron experimentos de EIS empleando tanto el electrodo sin modificar, como el electrodo modificado con los diferentes soportes y cada electrodo modificado con CB[8] y soporte. Las condiciones experimentales de tales ensayos se encuentran

descritas en el apartado 5.3.3 del presente capítulo y los resultados se muestran en los correspondientes diagramas de Nyquist.

Como se observa en la figura 5.11, el diagrama de Nyquist registrado para el electrodo sin modificar refleja un proceso electroquímico rápido con una resistencia a la transferencia de carga muy pequeña. Se obtiene una línea recta, de pendiente aproximadamente igual a 1, atribuible a que el transporte de masa al electrodo se encuentra regulado por un proceso de difusión lineal semi-infinita.

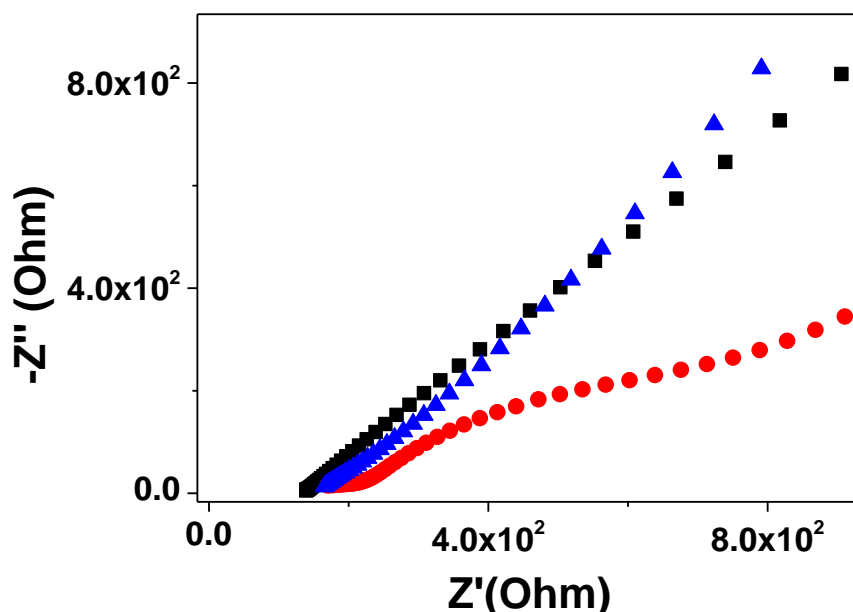


Figura 5.11. Diagrama de Nyquist registrado para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M.
 — GCE, — GCE/Nafion, y — GCE/Nafion + 0.5% CB[8].

Como se indicó en la introducción de este capítulo, la modificación de la superficie electródica con materiales más o menos aislantes, puede alterar la respuesta en las medidas de corriente alterna, a altas y bajas frecuencias, en términos de la transferencia de carga y de masa.

Cuando el electrodo se encuentra modificado sólo con Nafion (puntos rojos, figura 5.11), se observa un aumento en el valor R_{ct} de $5.3 \times 10^2 \Omega$, correspondiente a un impedimento a la transferencia de carga debido a la modificación de la superficie. A bajas frecuencias, se observa un comportamiento lineal con un valor de pendiente distinto de 1, lo que sugiere un proceso de difusión lineal a través de poros o defectos

que se encuentran distribuidos más lejos entre sí que el valor de la capa de difusión. En este caso, el valor de la pendiente es 0.3 que concuerda con el valor $\pi/8$ que corresponde, teóricamente, con un proceso de difusión en poros de relativamente gran tamaño [26].

Cuando el electrodo se modifica con Nafion/CB[8], aumenta de nuevo la velocidad de transferencia de carga desapareciendo el semicírculo correspondiente a la resistencia de la misma.

Resultados similares se obtuvieron cuando el electrodo es modificado con PVC y PVC/CB[8] como se muestra en la figura 5.12.

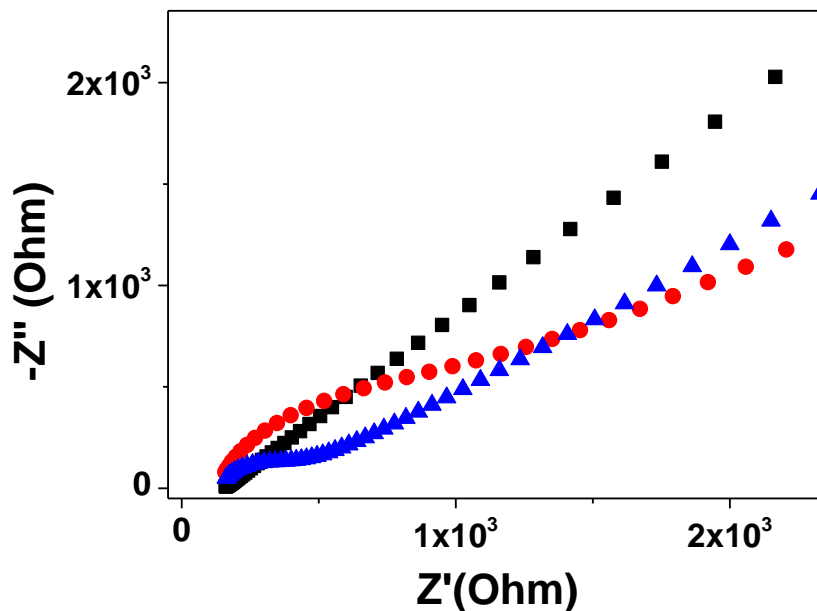


Figura 5.12. Diagrama de Nyquist registrado para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M.

— GCE, — GCE/PVC, y — GCE/PVC + 0.5% CB[8].

En el diagrama de impedancia correspondiente al PVC como soporte (figura 5.12, puntos rojos), se observa un aumento en la resistencia de transferencia de carga hasta un valor de $R_{ct} = 1.1 \times 10^3 \Omega$, fruto del impedimento a este proceso. Este resultado concuerda con el comportamiento en CV mostrado en la figura 5.8 (línea roja). A bajas frecuencias presenta una desviación del valor de la pendiente ($pte = 0.5$), que se puede atribuir a un proceso de transporte por difusión a través de una capa porosa, con un tamaño de poro menor que en el caso del Nafion.

Por el contrario, cuando el CB[8] se encuentra en el electrodo, se produce un aumento en la velocidad de transferencia de carga, lo que se traduce en una disminución del valor de R_{ct} hasta $3.5 \times 10^2 \Omega$, de acuerdo, nuevamente, con el aumento en la corriente con la presencia del receptor mostrado en los voltamperogramas cíclicos de la figura 5.8.

Al contrario que en los casos anteriores, cuando se modifica el electrodo con la membrana de diálisis (figura 5.13), no se observa un incremento en la resistencia a la transferencia de carga a altas frecuencias, pero sí se observa un incremento en la pendiente a bajas frecuencias lo que se corresponde con un proceso de adsorción con acumulación de las especies electroactivas dentro de poros de gran tamaño [27].

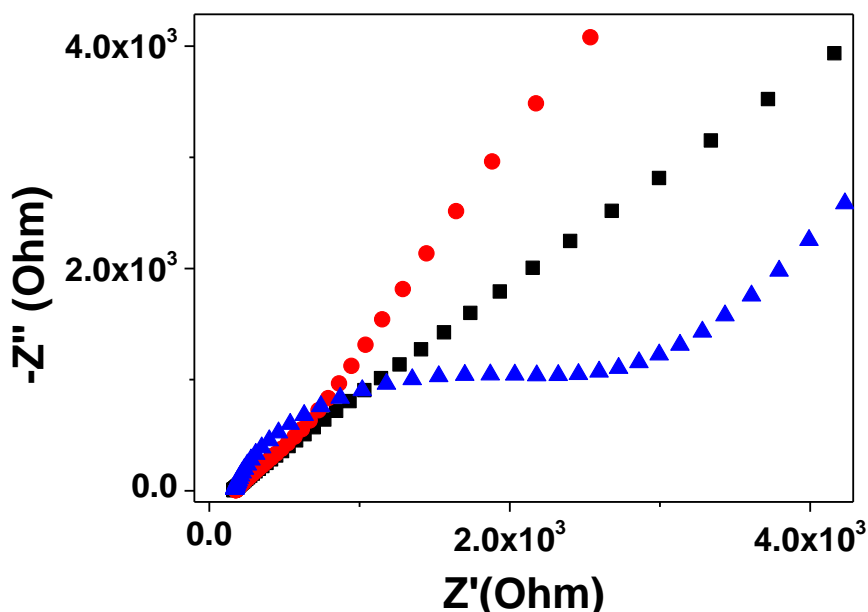


Figura 5.13. Diagrama de Nyquist registrado para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M.
 — GCE, — GCE/membrana de diálisis, y — GCE/ membrana de diálisis + 0.5% CB[8].

En la figura 5.13 también se observa que, cuando el CB[8] se encuentra en la superficie del electrodo, aparece un semicírculo en la zona de altas frecuencias que corresponde al segundo par redox obtenido en voltamperometría cíclica con la formación del complejo CB[8]- MV^{2+} (figura 5.10A, líneas verde y azul). En la zona de bajas frecuencias se obtiene una línea con pendiente 1 atribuible al proceso de transporte de masa limitado por difusión.

5.4.2. FcOH como huésped de CB[8].

El FcOH es un derivado neutro del ferroceno utilizado como sonda electroquímica debido a que es más soluble en disolución acuosa que este último. En la última década, muchos autores han utilizado derivados de ferroceno para el estudio mediante técnicas electroquímicas de la formación de complejos entre estos compuestos y la familia de los CB[n]s, la estabilidad de los mismos y su comportamiento redox.

En 2003, Ong y col. estudiaron la interacción del CB[7] con el ión de ferroceno cargado positivamente (Fc^+), concluyendo que el complejo de inclusión formado presenta una estequiometría 1:1 [28]. La reducción del Fc^+ produce un fenómeno de adsorción sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo, debido a la baja solubilidad de la forma reducida (Fc) en disolución acuosa. Sin embargo, este proceso desaparece con la formación del complejo con CB[7]. Además, al igual que se comentó para el MV^{2+} , el mecanismo de transferencia electrónica se produce para el complejo directamente, sin necesitar la etapa de disociación como ocurre con otros compuestos macrocíclicos [22, 29, 30] e incluso, el proceso redox continúa siendo rápido con la formación del complejo.

En los años posteriores, se publican distintos estudios en los que se describen, con mayor profundidad, las interacciones del CB[7] con diferentes derivados del ferroceno que, además, presentan diferente carga [31-33]. Mediante estudios de ^1H -RMN se confirma que es el grupo ferroceno el que queda incluido en la cavidad del CB[7], pudiendo quedar los sustituyentes en los portales del receptor. Para todos los derivados estudiados, se calcularon las constantes de asociación, obteniendo en algún caso, valores que superan a los de la interacción antígeno-anticuerpo. En concreto, para el ferroceno con dos grupos aminos cargados positivamente, se obtiene una constante tan fuerte como la interacción avidina-biotina, ($\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Para derivados con un único grupo cargado positivamente se obtienen valores del orden de 10^{12} M^{-1} , y de $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ para derivados del ferroceno neutros como el FcOH. Por otra parte, estas constantes son considerablemente mayores que las calculadas para los mismos compuestos con la β -CD ($\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$) como se ha mencionado en otras ocasiones a lo largo de esta memoria, debido a la interacción ión-dipolo que se establece entre el huésped y los portales de los CB[n]s.

El empleo de técnicas voltamperométricas ha contribuido al estudio del comportamiento electroquímico de cada uno de estos derivados. Los voltamperogramas cíclicos de complejos de CB[7] con derivados cargados positivamente, muestran un desplazamiento en el potencial formal de ~ 110 mV, hacia potenciales más positivos respecto al derivado libre. Por el contrario, en el caso de derivados neutros, el desplazamiento de potencial es mucho menor, unos 30 mV hacia potenciales más positivos para el caso más significativo. La diferencia en el valor absoluto del desplazamiento de potencial, indica que el complejo formado es mucho más estable para derivados cargados positivamente que para derivados neutros. El desplazamiento de potencial registrado para el FcOH por su inclusión en el CB[7] es de ~ 10 mV.

Del estudio del comportamiento electroquímico de los derivados neutros, se concluye que la constante cinética de transferencia de carga es mucho menor (de entre 25 a 100 veces) que para el derivado libre. Estos valores corresponden a un comportamiento cuasirreversible mientras que, para el derivado libre, es totalmente reversible. Los voltamperogramas cíclicos, muestran una disminución de la corriente con la formación del complejo atribuible a la disminución de los coeficientes de difusión aparentes [32]. Resultados similares se observaron también con los derivados de ferroceno cargados positivamente.

Por último, hay que señalar que cuando se aborda el estudio de la interacción del CB[7] con derivados del ferroceno cargados negativamente, como es el caso de un ferroceno con un carboxilato, no se detecta cambio en las señales de ^1H -RMN ni tampoco se observan cambios en los voltamperogramas cíclicos en presencia del receptor. Estos resultados sugieren que no se forma el complejo, probablemente, debido a la repulsión entre la carga negativa del grupo carboxilato y los portales del CB[7] [31].

No se han encontrado antecedentes del estudio de la formación de complejos de ferroceno, o de sus derivados, con CB[8]. Por consiguiente, se comenzó estudiando la interacción en disolución del FcOH con este homólogo. La figura 5.14 muestra los voltamperogramas cíclicos registrados para FcOH con concentraciones crecientes de CB[8], en un electrodo de carbón vítreo sin modificar.

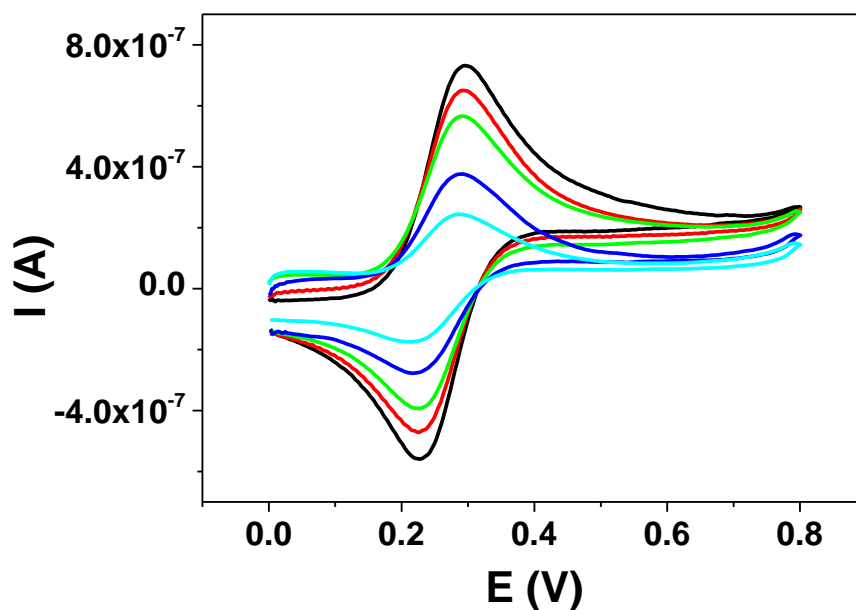


Figura 5.14. Voltamperogramas cíclicos registrados para FcOH con concentraciones crecientes de CB[8] en NaCl 0.1 M. — [FcOH] = 5.00×10^{-5} M, — FcOH + [CB[8]] = 1.25×10^{-5} M, — FcOH + [CB[8]] = 2.50×10^{-5} M, — FcOH + [CB[8]] = 3.75×10^{-5} M y — FcOH + [CB[8]] = 5.00×10^{-5} M.

De manera similar a lo comentado anteriormente para la formación del complejo con CB[7], al aumentar la concentración de CB[8], las intensidades de corriente anódica y catódica disminuyen, sin que se registre un cambio considerable en el potencial formal. De estos resultados se podría concluir que el FcOH interacciona con el CB[8] pudiendo formar el complejo de inclusión correspondiente. Para comprobar la formación del complejo CB[8]-FcOH, se registraron los espectros de ^1H -RMN en D_2O (figura 5.15).

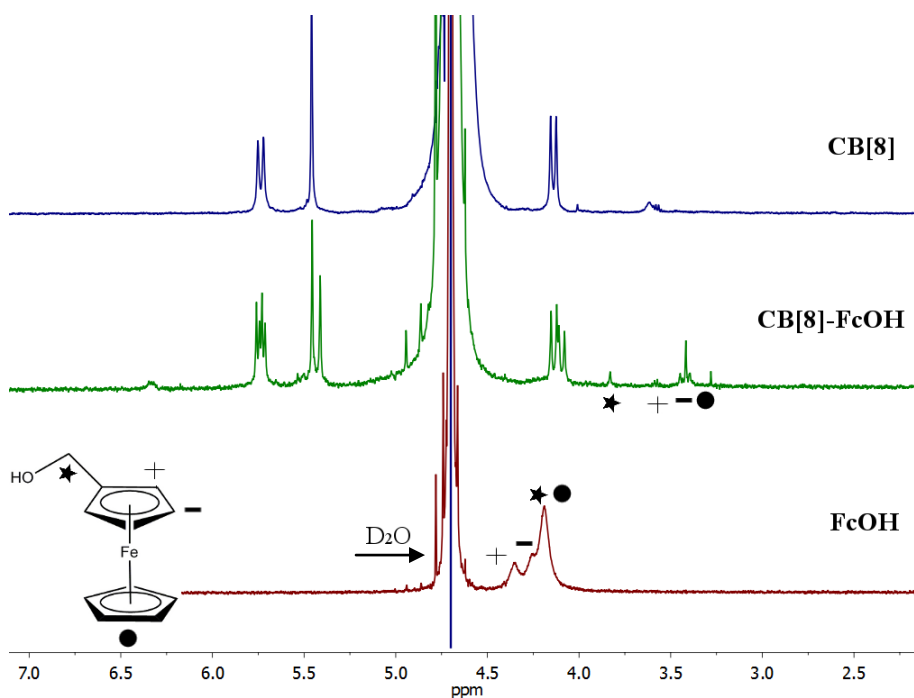


Figura 5.15. Espectros de ^1H -RMN registrados para FcOH, CB[8] y CB[8]-FcOH en D_2O .

Los protones correspondientes al huésped (4.3 ppm) se desplazan a campo alto (3.5 ppm) cuando se forma el complejo CB[8]-FcOH. Estos mismos desplazamientos han sido publicados para el complejo CB[7]-FcOH [32]. Respecto a las señales correspondientes al receptor (4.2, 5.5 y 5.7 ppm), en el espectro de la mezcla se observa la aparición de un nuevo grupo de similares a las del CB[8] solo, ligeramente desplazadas con respecto a éstas. Estos resultados tienen concordancia con una mezcla de CB[8] libre y de CB[8] que se encuentra formando complejo, lo que confirmaría la inclusión del FcOH en la cavidad del receptor.

Tras el estudio de la interacción de FcOH con CB[8] en disolución, se procedió a estudiar la interacción con las diferentes modificaciones.

5.4.2.1. PVC como soporte.

La figura 5.16 muestra los voltamperogramas cíclicos (A) así como los diagramas de Nyquist (B) obtenidos al utilizar PVC como soporte para inmovilizar CB[8] al emplear FcOH como huésped.

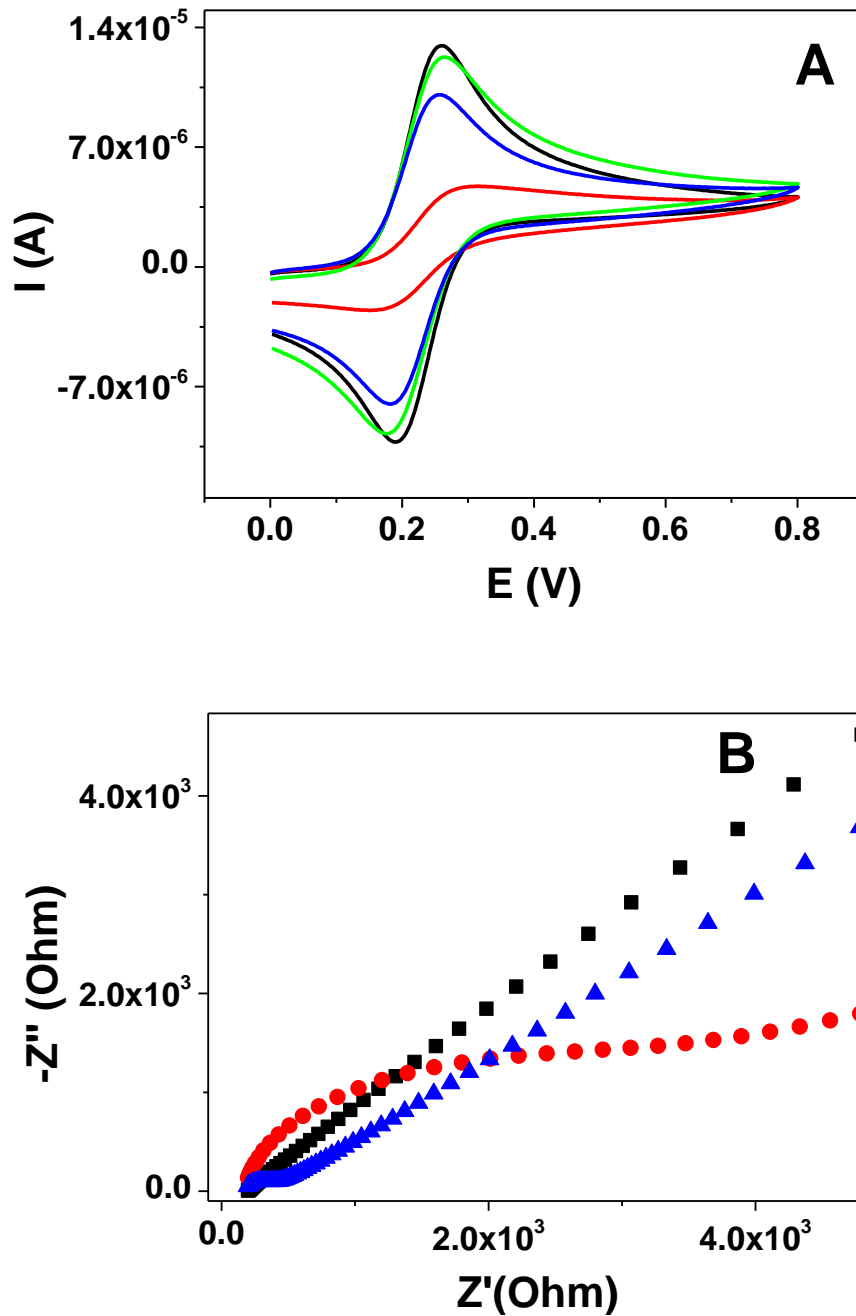


Figura 5.16. Voltamperogramas cíclicos A) y diagramas de Nyquist B) registrados para FcOH (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M: — GCE, — GCE/PVC, — GCE/PVC + 0.3 % CB[8] y — GCE/PVC + 0.5 % CB[8].

El FcOH presenta un comportamiento reversible en un electrodo de carbón vítreo (línea negra). El diagrama de impedancia correspondiente a esta situación, es una línea recta de pendiente 1 atribuible a un proceso de difusión semi-infinita ya que la reacción electroquímica se encuentra limitada por el transporte de masa al electrodo.

Como se observa en la figura 5.16A (línea roja), la modificación de la superficie electrodo con PVC produce un gran impedimento a la transferencia de carga, que se traduce en una disminución de la intensidad de señal y un aumento en la diferencia de potencial. Este hecho se traduce en la aparición de un semicírculo en la zona de altas frecuencias del diagrama de Nyquist, debido al aumento del valor de R_{ct} ($R_{ct} = 3.5 \times 10^3 \Omega$).

Por el contrario, la modificación del electrodo con PVC/CB[8] ayuda a que el FcOH alcance la superficie mediante la formación del complejo. En el voltamperograma cíclico se registra una recuperación de la corriente por la presencia de CB[8] en la superficie, observándose una disminución de la intensidad respecto al electrodo no modificado. En el diagrama de impedancia (figura 5.16B), se registra una disminución del diámetro del semicírculo a altas frecuencias, indicando un menor valor de R_{ct} ($R_{ct} = 230 \Omega$) respecto al modificado sólo con PVC ($R_{ct} = 3.5 \times 10^3 \Omega$), lo que concuerda con los resultados de CV. También se observa una desviación de la pendiente en la zona de bajas frecuencias ($pte = 0.83$), que se puede atribuir a un proceso de difusión a través de una capa porosa como se comentó en el caso del MV^{2+} .

Resultados similares se encontraron para el Nafion y la membrana como soportes como se expondrá a continuación.

5.4.2.2. *Nafion como soporte.*

Al modificar el electrodo únicamente con Nafion, se observa un incremento de intensidad en la onda catódica debido, probablemente, a la acumulación del ión ferricinio generado en el barrido de oxidación (figura 5.17A, línea roja).

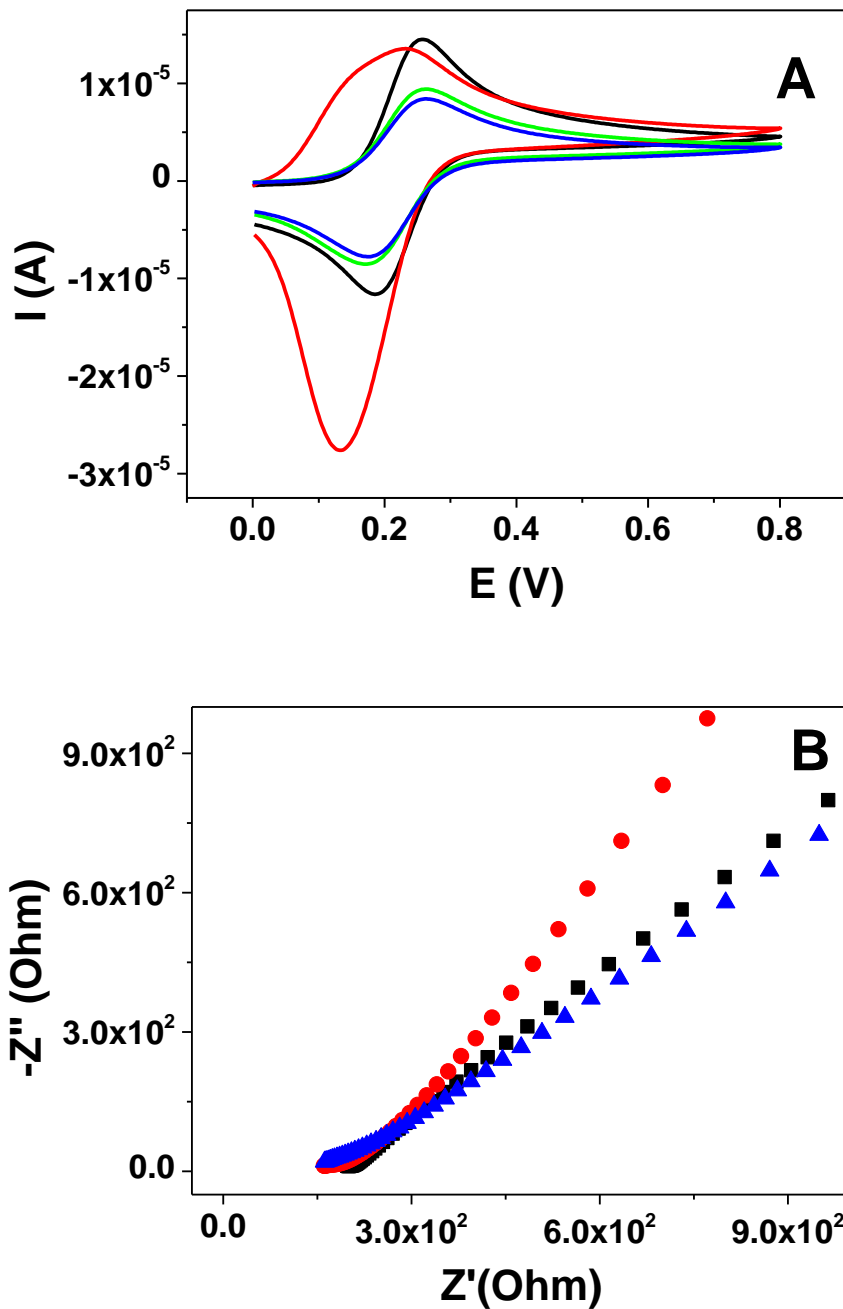


Figura 5.17. Voltamperogramas cíclicos A) y diagramas de Nyquist B) registrados para FcOH (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M: — GCE, — GCE/Nafion, — GCE/Nafion + 0.3 % CB[8] y — GCE/Nafion + 0.5 % CB[8].

Este comportamiento concuerda con las medidas de impedancia realizadas (figura 5.17B, puntos rojos) que muestran un aumento de la pendiente en la zona de bajas frecuencias, relacionado con un proceso de adsorción.

El voltamperograma registrado al trabajar con el electrodo modificado con Nafion/CB[8] permite comprobar la formación del complejo, en mayor medida, que con el PVC como soporte. La presencia de CB[8] en el electrodo conduce a una cierta recuperación de la forma original de la respuesta electroquímica, si bien, con una lógica disminución en la intensidad de pico respecto al electrodo sin modificar. También se aprecia un pequeño aumento en la diferencia de potencial anódico y catódico (de 73 a 90 mV). Resultados acordes a los obtenidos en CV se obtienen también en las medidas realizadas en EIS. Este comportamiento se podría atribuir a que los huecos de la capa modificadora se encuentran a una distancia entre sí cercana a la de la capa de difusión.

5.4.2.3. Membrana de diálisis como soporte.

La modificación de la superficie con la membrana de diálisis apenas altera la respuesta electroquímica del analito (figura 5.18A). Sólo cuando el CB[8] se encuentra en la superficie, se produce una disminución de la intensidad de señal dependiente de la proporción de CB[8]. Este comportamiento, al igual que ocurría con MV^{2+} , coincide con el observado para el complejo formado en disolución.

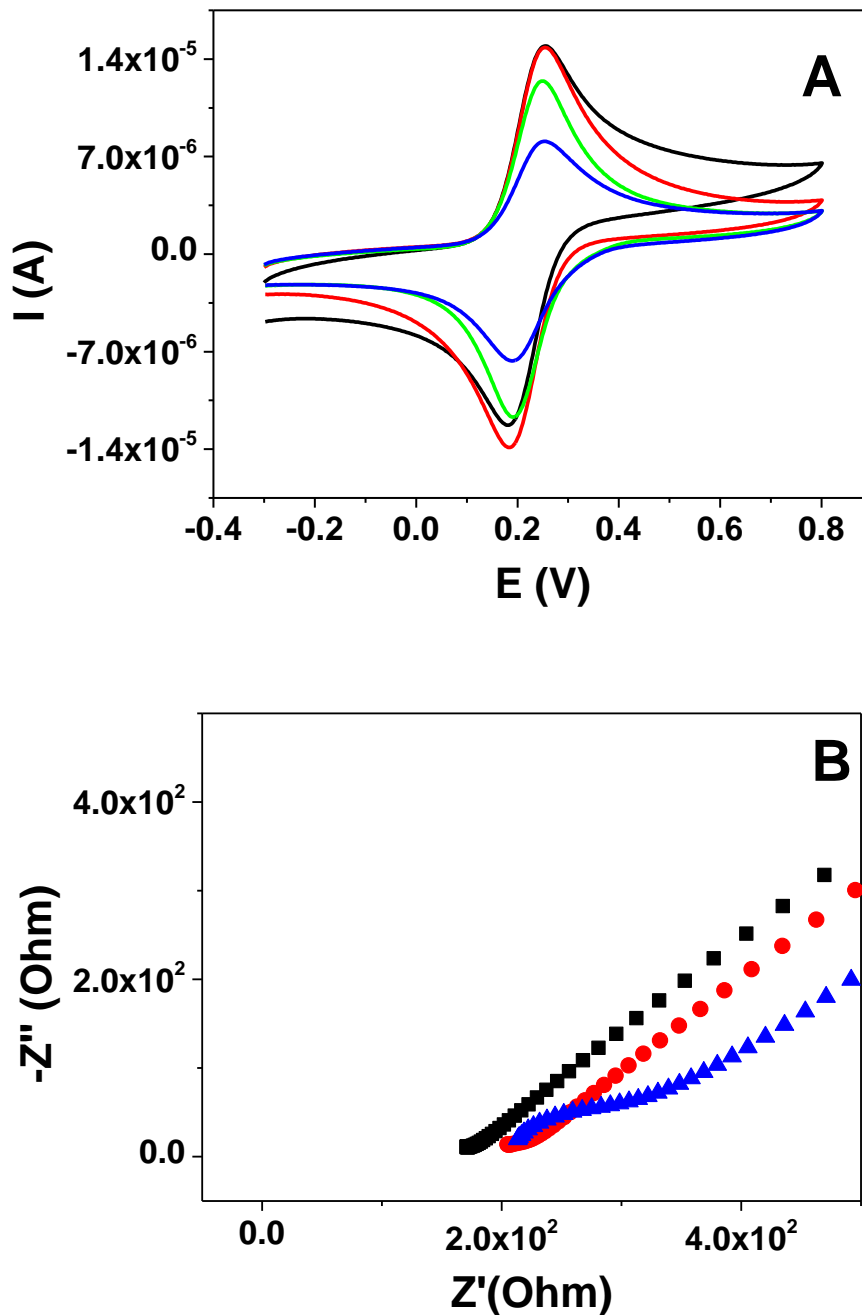


Figura 5.18. Voltamperogramas cíclicos A) y diagramas de Nyquist B) registrados para FcOH (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M: — GCE, — GCE/membrana de diálisis, — GCE/membrana de diálisis + 0.3 % CB[8] y — GCE/ membrana de diálisis + 0.5 % CB[8].

En concordancia con los voltamperogramas cíclicos, en este caso, únicamente el diagrama de Nyquist registrado con el electrodo modificado con la membrana y 0.5% de CB[8], muestra el semicírculo a altas frecuencias reflejo del aumento de la resistencia a la transferencia de carga hasta un valor de R_{ct} de 116Ω consecuencia de la formación

del complejo y un comportamiento de difusión en una superficie porosa, a bajas frecuencias, con un valor de pendiente de 0.7.

5.4.3. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ como huésped de CB[8].

El estudio de la interacción de los CB[n]s con compuestos cargados negativamente no es muy habitual puesto que la presencia de la densidad de carga negativa en los portales de los CB[n]s, podría impedir la interacción con este tipo de huéspedes. Sin embargo, la inclusión de este tipo de analitos en el presente estudio estaría justificada, desde el punto de vista analítico, para comprobar la capacidad de estos compuestos en la eliminación de potenciales interferencias negativas. Con este fin, se utilizó como posible huésped negativo, una mezcla equimolar de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ para el estudio de las diferentes modificaciones.

La figura 5.19 muestra que la presencia de concentraciones crecientes de CB[8] en una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, no produce variaciones significativas de su señal, lo que induciría a pensar que no se producen interacciones supramoleculares entre ambos.

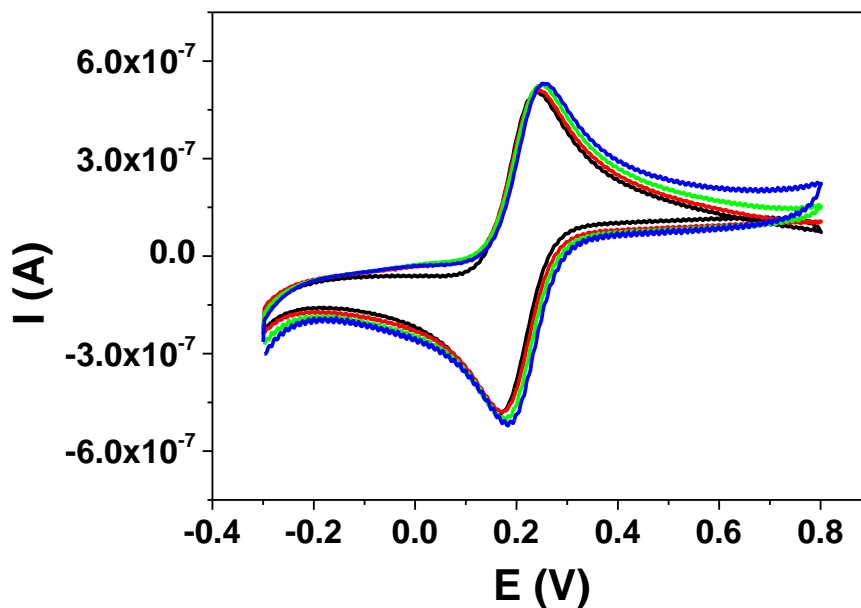


Figura 5.19. Voltamperogramas cíclicos registrados para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ con concentraciones crecientes de CB[8] en NaCl 0.1 M. — $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}] = 4.00 \times 10^{-5}$ M, — $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}] + [\text{CB}[8]] = 1.00 \times 10^{-5}$ M, — $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}] + [\text{CB}[8]] = 2.00 \times 10^{-5}$ M y — $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}] + [\text{CB}[8]] = 4.00 \times 10^{-5}$ M.

Igual que se procedió en los casos anteriores, se llevó a cabo el estudio de la respuesta electroquímica de la mezcla $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ con las distintas estrategias de inmovilización de CB[8]: PVC, Nafion y la membrana de diálisis, para comprobar que el comportamiento se mantiene si ha de actuar como sensor.

5.4.3.1. Nafion como soporte.

Como se podía esperar, el Nafion no es la mejor opción para detectar analitos cargados negativamente. Por esta razón, en la figura 5.20 no se observa señal para ninguna de las modificaciones registradas con este polímero como soporte. Incluso sin CB[8] ya no es posible su detección. Esta propiedad del soporte, eclipsa la actuación del receptor.

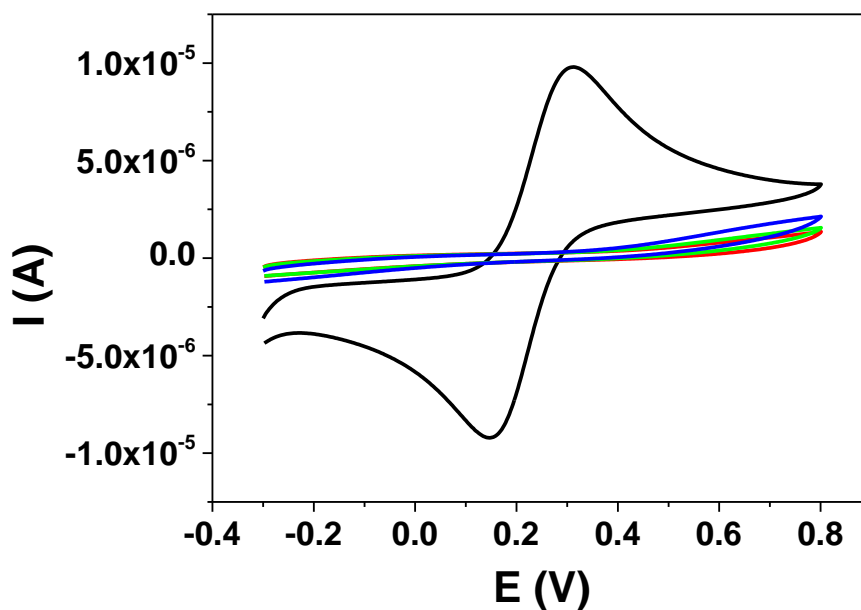


Figura 5.20. Voltamperogramas cíclicos registrados para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M: — GCE, — GCE/Nafion, — GCE/Nafion + 0.3 % CB[8] y — GCE/Nafion + 0.5 % CB[8].

5.4.3.2. PVC y membrana de diálisis como soportes.

Como se muestra en los voltamperogramas cíclicos de la figura 5.21, el comportamiento de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ observado cuando se utilizan tanto PVC como la membrana de diálisis, resultó muy parecido entre sí. En ambos casos, la presencia del soporte conlleva una disminución significativa en la corriente, claramente más acusada en el caso de PVC. Esta disminución indica el impedimento que produce la modificación a que el analito alcance la superficie electródica, como en ocasiones ya estudiadas.

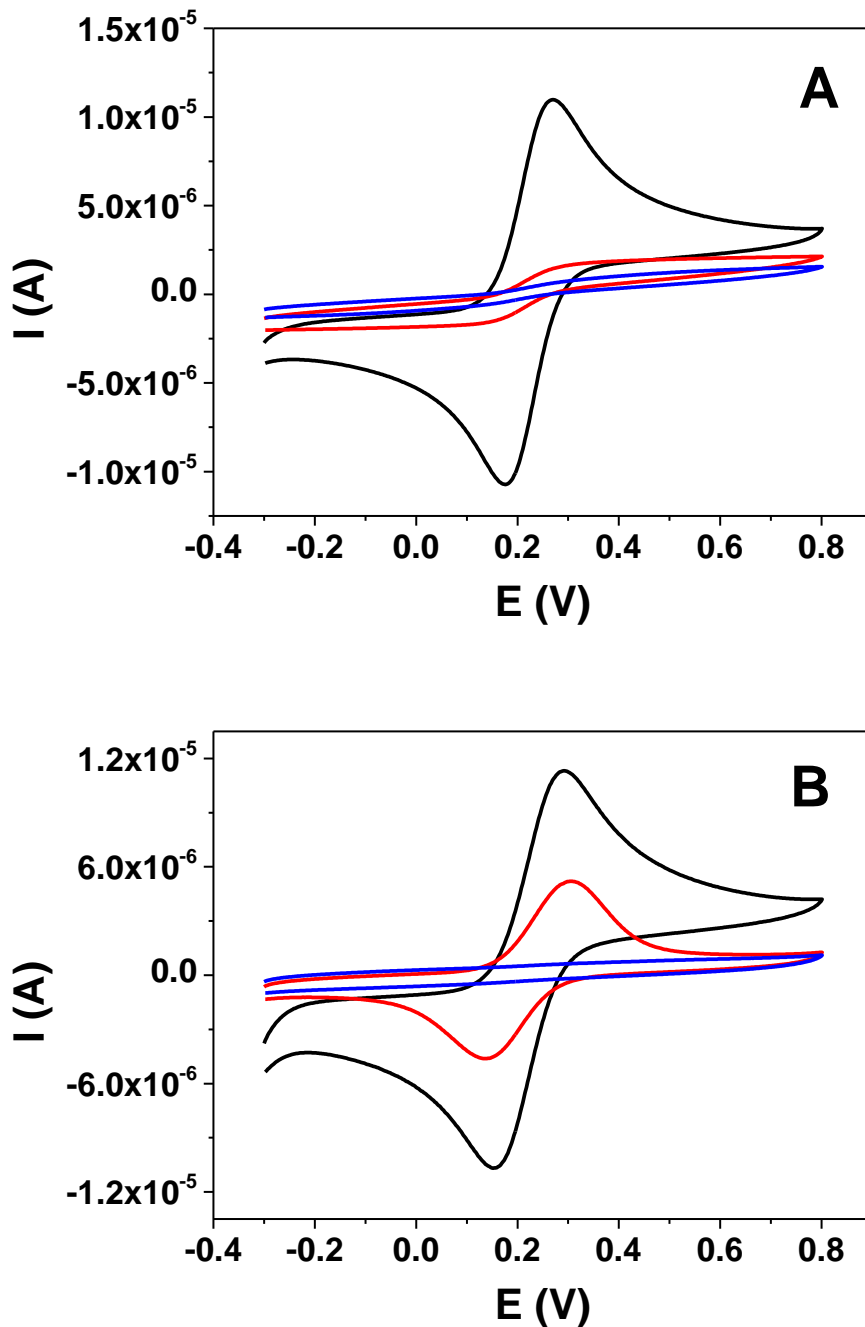


Figura 5.21. Voltamperogramas cíclicos registrados para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M con A) PVC y B) membrana de diálisis como soportes: — GCE, — GCE/Soporte y — GCE/Soporte + 0.5 % CB[8].

Lo que difiere en este caso respecto a situaciones anteriores, especialmente con el MV^{2+} , es que el impedimento a que el analito alcance el electrodo es, cuando no total, más pronunciado cuando el CB[8] está presente en la superficie. En la figura anterior, se muestra como, la presencia de CB[8] en el electrodo, produce que desaparezca de

manera prácticamente total, la señal redox del $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, lo que confirma que la particular estructura de estos receptores, con sus portales con densidad de carga negativa, puede ser de gran utilidad a la hora de eliminar ciertas interferencias. Estos resultados no difieren de los publicados anteriormente obtenidos en el caso de ferroceno derivatizado con carboxilato, como ya se mencionó [31].

Los resultados de los experimentos de EIS realizados con esta sonda (figura 5.22), concuerdan con los voltamperogramas cíclicos mostrados en la figura 5.21. En primer lugar, los diagramas de Nyquist reflejan un aumento del diámetro del semicírculo a bajas frecuencias, fruto del aumento de la R_{ct} cuando el electrodo está modificado bien con PVC o con la membrana de diálisis respecto a la respuesta obtenida con el electrodo no modificado (figura 5.22A y B, puntos rojos). La R_{ct} continua aumentando cuando el CB[8] está presente en la superficie de los respectivos electrodos, efecto que se ve muy claramente al utilizar la membrana de diálisis (figura 5.22A y B, puntos azules).

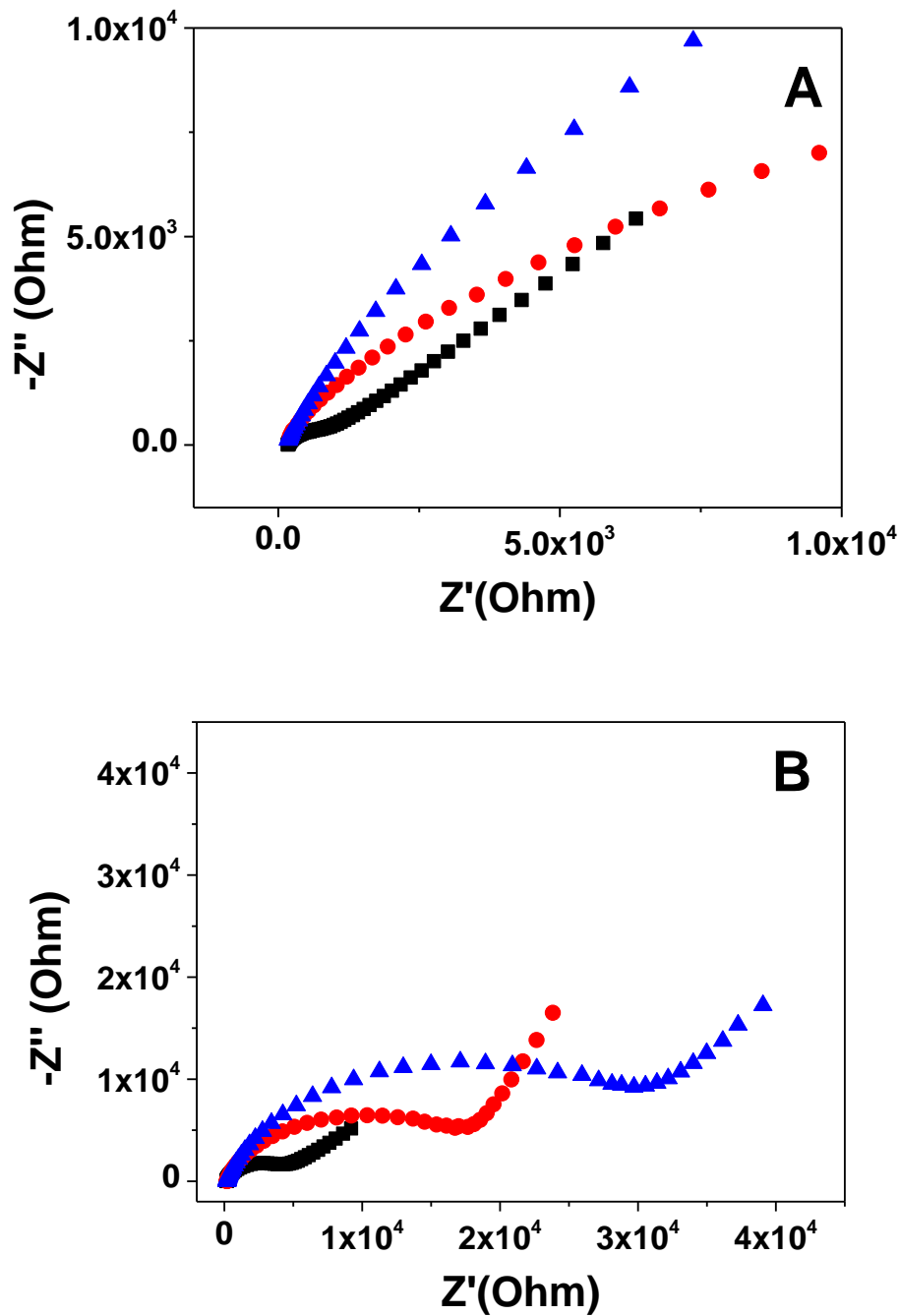


Figura 5.22. Diagramas de Nyquist registrados $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (1.0×10^{-3} M) en NaCl 0.1 M con A) PVC y B) Membrana de Diálisis como soporte: — GCE, — GCE/Soporte y — GCE/Soporte + 0.5 % CB[8].

Por último, comparando el comportamiento que presentan las tres sondas en las diferentes superficies desarrolladas, se observan interesantes aspectos. En la figura 5.23, se muestra la respuesta de cada una de las sondas con cada electrodo modificado con cada soporte y 0.5% de CB[8].

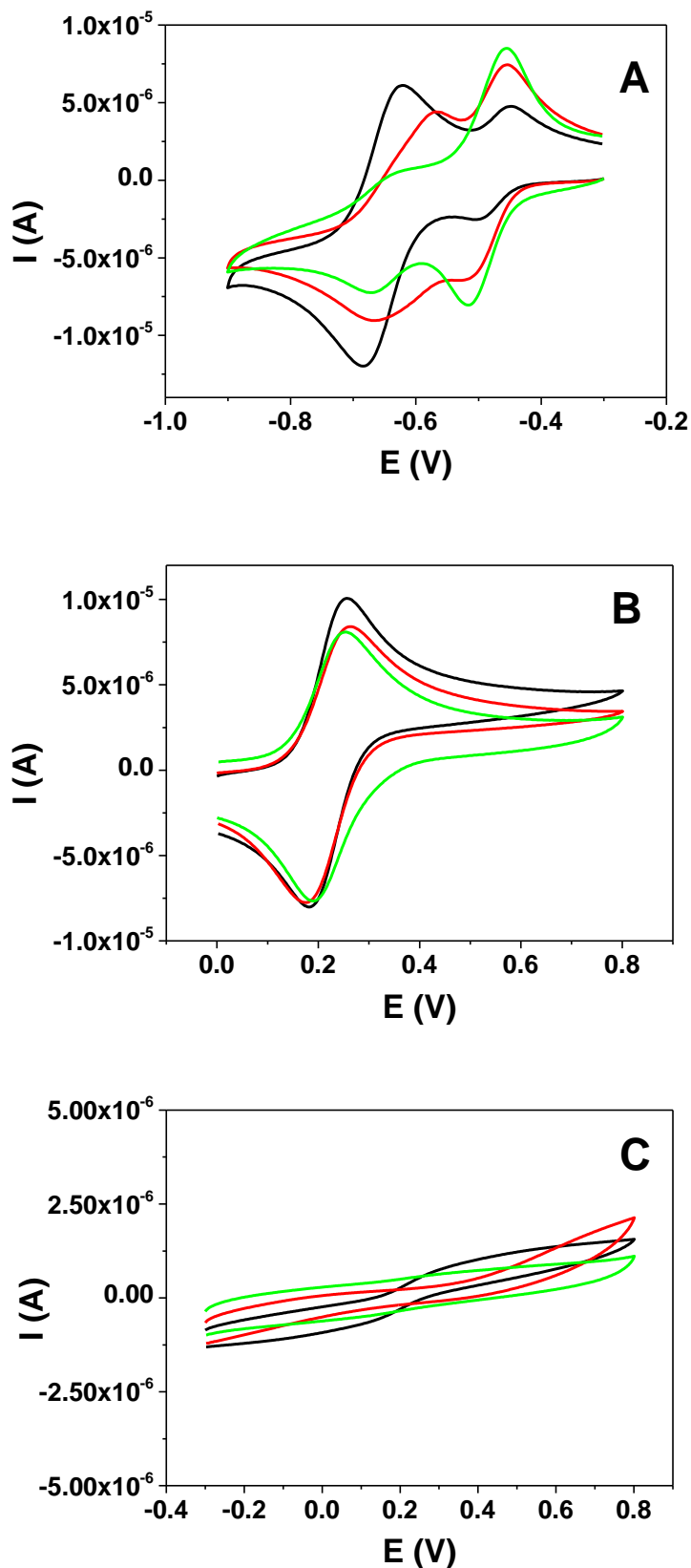


Figura 5.23. Voltamperogramas cíclicos registrados para disoluciones de 1.0×10^{-3} M de A) MV^{2+} , B) FcOH y C) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ en NaCl 0.1M: — GCE/PVC + 0.5% CB[8], — GCE/Nafion + 0.5% CB[8] y — GCE/membrana de diálisis + 0.5% CB[8].

Se aprecia que la respuesta del MV^{2+} es la más influenciada por el soporte utilizado siendo, de entre los tres, la membrana la que permite una mejor monitorización del complejo. Con respecto al $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$, se observa una menor influencia del soporte en la respuesta del huésped negativo. El papel del CB[8] en la eliminación de la señal del huésped, se puede apreciar claramente al emplear PVC o la membrana de diálisis no así, al emplear Nafion. Por último, como se observa en la figura 5.23B, donde menor influencia tiene el soporte utilizado es en el caso del huésped neutro para el cual se obtienen respuestas muy similares independientemente de la estrategia de modificación elegida.

5.4.4. Caracterización de las superficies modificadas.

En todos los casos estudiados, los resultados de EIS han reflejado que las superficies presentan una estructura porosa. Experimentos realizados empleando AFM, permitieron llevar a cabo la caracterización estructural de las superficies desarrolladas. Los experimentos se realizaron empleando HOPG como sustrato para el estudio de las modificaciones de PVC y Nafion, o un electrodo de carbón vítreo en el caso de la membrana de diálisis. Las imágenes topográficas obtenidas para cada una de las superficies estudiadas permiten apreciar la porosidad de las mismas (figura 5.24).

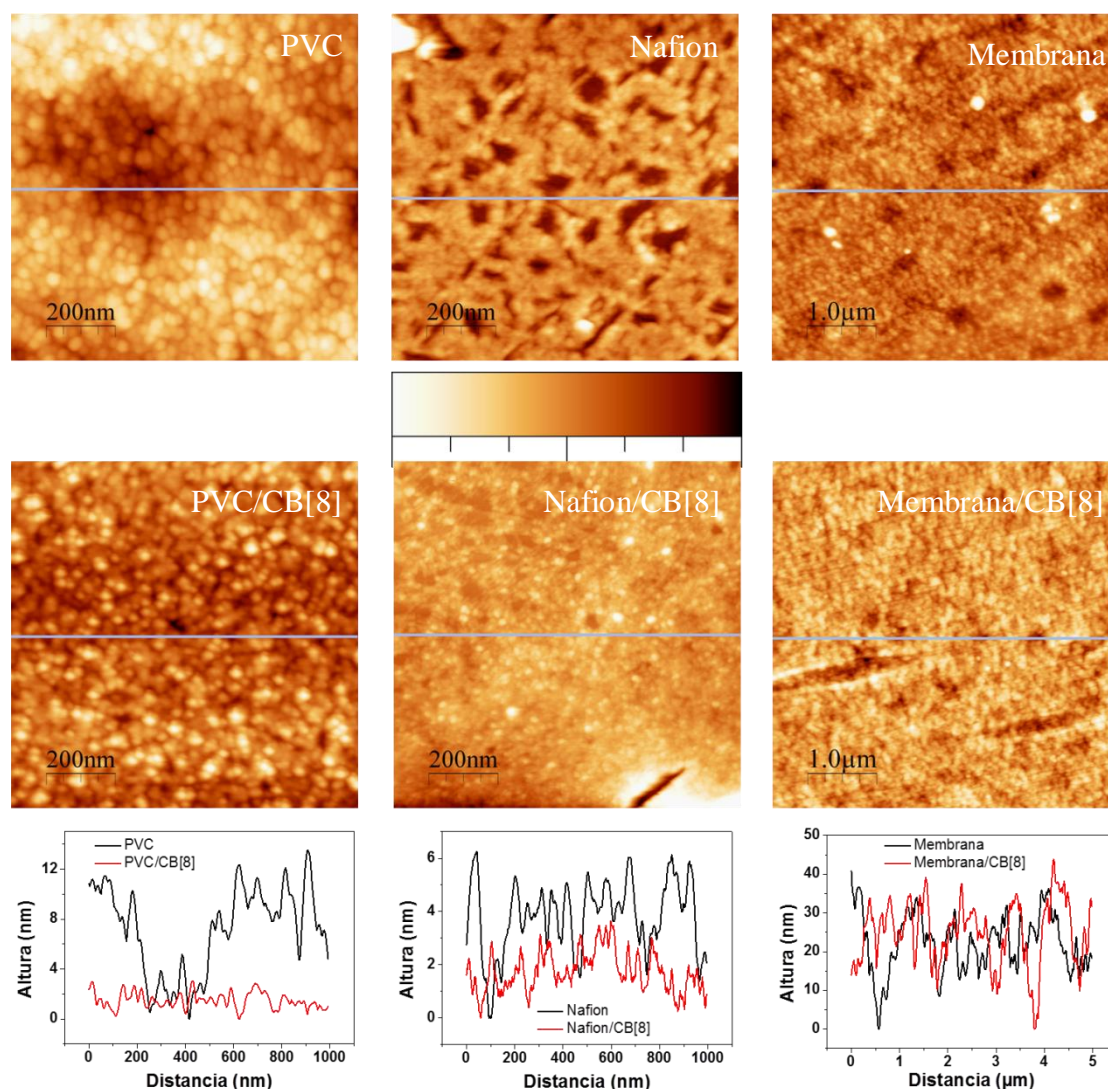


Figura 5.24. Imágenes de AFM y perfiles de altura realizados para las diferentes superficies estudiadas. Las imágenes de PVC y Nafion corresponden a un área escaneada de $1 \times 1 \mu\text{m}$ y para la membrana de diálisis de $5 \times 5 \mu\text{m}$. La escala de colores representa 23 nm para PVC, 9 nm para PVC/CB[8], 11 nm para ambas imágenes de Nafion y 60 nm para las imágenes de la membrana diálisis.

Se observa que el PVC está formado por agregados de partículas mientras que el Nafion presenta una estructura porosa, pero sin esa apariencia granular del PVC. Además, como se podría esperar, la membrana de diálisis presenta una estructura formada por poros de gran tamaño ($\sim 200 \text{ nm}$ de diámetro). Por otra parte, respecto al tamaño de los poros que presentaba la modificación de Nafion son más pequeños cuando está presente el receptor.

El efecto del receptor cuando se encuentra en cualquiera de las mezclas modificadoras, se manifiesta sobre dos aspectos diferentes respecto a los soportes: homogeneidad y espesor.

Con respecto a la homogeneidad, en base a los perfiles de la figura 5.24, se observa que la presencia del receptor en la modificación provoca que las superficies sean más homogéneas respecto a la del soporte sólo. Este comportamiento es más acusado en el caso de la modificación con PVC que con el Nafion. Por otro lado, estos resultados no se observaron en el caso de trabajar con la membrana de diálisis obteniendo perfiles superpuestos para la membrana sola o la membrana con CB[8].

Mediante experimentos de nanolitografía se calculó el espesor de las diferentes superficies modificadas obteniendo valores de 9.4, 5.9, 7.8 y 3.6 nm para PVC, PVC/CB[8], Nafion y Nafion/CB[8], respectivamente. En base a estos valores se puede concluir que la presencia del receptor en la modificación no sólo produce superficies más homogéneas sino que éstas presentan un espesor menor. A la vista de los resultados, se podría pensar que la presencia del CB[8] en la superficie provoca que la estructura que presentan el PVC y el Nafion se vea suavizada por la interacción con el receptor, obteniendo capas más homogéneas y con un espesor menor.

Tanto con las imágenes obtenidas por AFM como a partir de los diagramas de Nyquist, es posible calcular el porcentaje de superficie recubierta. Asumiendo que la respuesta electroquímica registrada para el $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ se produce a través de los poros o huecos que se encuentran en la modificación, se puede calcular el recubrimiento según [14]:

$$1 - \theta = \frac{R_{ct}^0}{R_{ct}}$$

Donde R_{ct}^0 y R_{ct} son los valores de la resistencia a la transferencia de carga para el electrodo sin modificar y el electrodo modificado respectivamente.

Se midieron los valores de la resistencia de carga para el electrodo no modificado, modificado con la membrana de diálisis y modificado con la membrana de diálisis con 0.5 % de CB[8] (figura 5.22B), obteniendo valores de R_{ct} de 0.34, 2.14 y $3.15 \times 10^4 \Omega$, respectivamente. Los valores de superficie sin recubrir calculados fueron un 16 % para la membrana de diálisis y un 9 % cuando el CB[8] se encuentra en la superficie

electrónica. Estos valores de superficie disponible, están en consonancia razonable con los que se pudieron estimar a partir de las imágenes de AFM obtenidos para un electrodo modificado con la membrana con y sin CB[8]. Los valores obtenidos de superficie sin recubrir empleando microscopía fueron 13 y 6 % para la modificación de la membrana sin y con CB[8], respectivamente.

5.4.5. Evaluación de la eliminación de interferencias negativas.

A la vista de los resultados obtenidos con cada analito en particular y cada soporte, se decidió evaluar la capacidad de selección molecular del CB[8] frente a mezclas de analitos. En caso satisfactorio, el empleo de CB[8] contribuiría a la eliminación de potenciales interferentes en una determinación analítica.

Así, se registraron los voltamperogramas cíclicos de mezclas de FeOH y $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ tanto con el electrodo sin modificar, modificado con PVC y/o con la membrana de diálisis y modificado tanto con PVC/CB[8] como membrana de diálisis/CB[8]. El porcentaje de CB[8] empleado fue del 0.5%. Para este ensayo se descartó el uso de Nafion ya que, por sí solo, permite eliminar potenciales interferencias de analitos cargados negativamente.

La figura 5.25A, muestra los voltamperogramas cíclicos de disoluciones independientes de FeOH ($1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$), $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ($1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) y la mezcla de ambos en concentración $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ de cada uno. En ellos es posible comprobar la contribución de cada analito a la intensidad total de corriente registrada cuando se trabaja con el electrodo sin modificar.

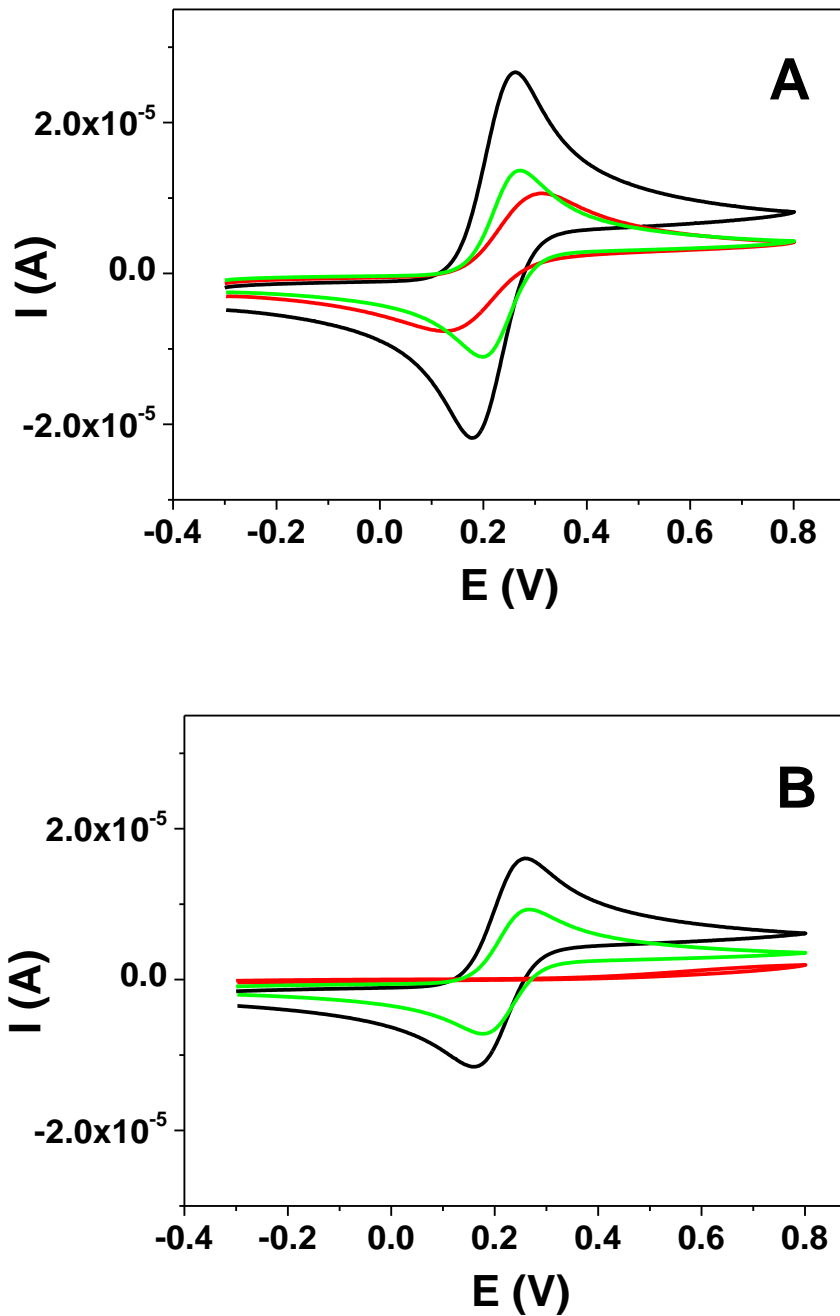


Figura 5.25. Voltamperogramas cíclicos registrados de mezclas de huéspedes. A) GCE: - FcOH/Fe(CN)₆⁴⁻, - Fe(CN)₆⁴⁻ y - FcOH. B) GCE/PVC + 0.5% CB[8]: - FcOH/Fe(CN)₆⁴⁻, - Fe(CN)₆⁴⁻ y - FcOH.

Por el contrario, cuando se trabaja con el electrodo modificado con PVC/CB[8] (figura 5.25B) se observa que, mientras es posible la detección y cuantificación del FcOH, la señal del Fe(CN)₆⁴⁻ ha desaparecido prácticamente, lo que permite suponer que la corriente cuando se analiza la mezcla de ambos (línea negra) es debida al FcOH.

La presencia de CB[8] produce una eliminación parcial del interferente cargado negativamente en la mezcla, ofreciendo una respuesta más selectiva para el analito neutro.

En el caso de modificar el electrodo con la membrana y CB[8] (figura 5.26), de nuevo se observa que la presencia del receptor la superficie del electrodo, produce la desaparición de la señal electroquímica de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ siendo posible la detección y cuantificación del FcOH, como en el caso anterior. Además, empleando la membrana de diálisis como soporte, el voltamperograma cíclico correspondiente a la mezcla coincide al registrado para el FcOH, por lo que se podría concluir, que este sensor es capaz de eliminar interferencias cargadas negativamente frente a analitos neutros en una muestra.

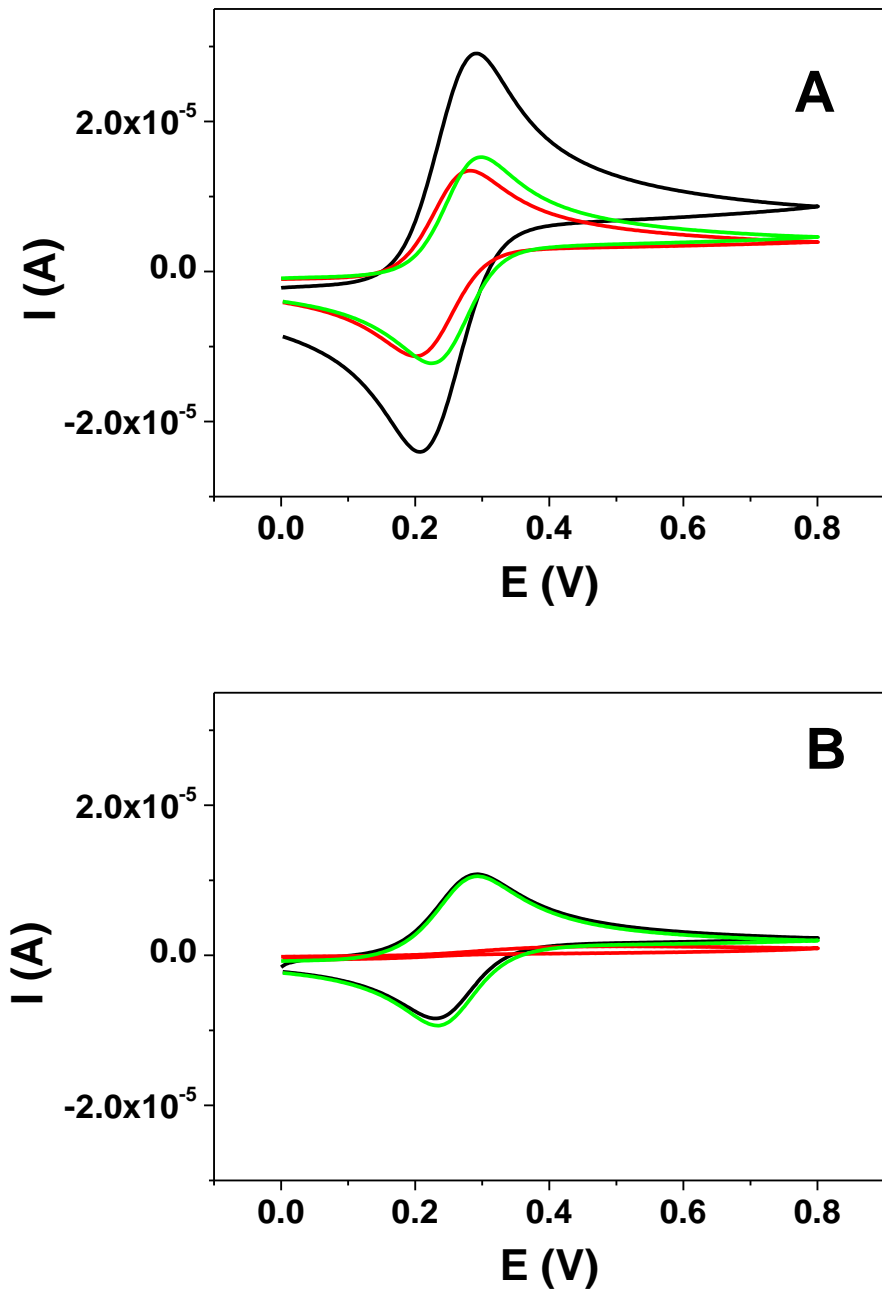


Figura 5.26. Voltamperogramas cíclicos registrados de mezclas de huéspedes. A) GCE: - FcOH/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ y - FcOH. B) GCE/Membrana de diálisis + 0.5% CB[8]: - FcOH/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ y - FcOH.

5.5. Conclusiones.

En este capítulo se presentan diferentes estrategias de inmovilización de CB[8] en la superficie de un electrodo de carbón vítreo con el objetivo de desarrollar de sensores electroquímicos y analizar la influencia de la carga del analito en la interacción con el receptor y la influencia que pueda tener el soporte utilizado en la respuesta final.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que las tres modificaciones utilizadas, tanto empleando Nafion, como PVC o una membrana de diálisis, resultan aptas para la inmovilización de CB[8] sobre la superficie del electrodo, manteniendo las características de selector molecular del receptor.

De la caracterización electroquímica por CV y EIS, se ha demostrado la influencia de la densidad de carga negativa de los portales del CB[8] en la interacción con el analito. Este hecho no sólo permite la estabilización de los complejos con huéspedes cargados positivamente, sino que puede contribuir de manera eficiente a la eliminación de posibles interferentes cargados negativamente. Además, dependiendo de la carga del analito, la elección del soporte adecuado puede influenciar la respuesta electroquímica del mismo.

Se calculó el recubrimiento de la superficie porosa con CB[8] utilizando la membrana de diálisis como soporte, obteniendo valores de superficie sin recubrir del 9 % cuando el receptor se encuentra en la superficie, frente a un 16 % cuando sólo se utiliza la membrana de diálisis. Estos valores fueron confirmados mediante las estimaciones realizadas a partir de medidas en AFM, observando además, que el tamaño de los poros es menor cuando el CB[8] está presente. Por último, se ha observado mediante medidas de AFM que la presencia del receptor en la modificación hace que ésta sea más fina y homogénea.

En conclusión, estos estudios pueden facilitar la elección de la modificación más adecuada en el desarrollo de sensores, considerando el problema analítico a abordar.

5.6. Bibliografía.

- [1] J.M. Pingarrón, P. Sánchez, Química Electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones, 1 ed., Sintesis, Madrid, **2003**.
- [2] J. Wang, Analytical electrochemistry, 3 ed., Wiley-VCH, New Jersey, **2006**.
- [3] S. Moulay, Chemical modification of poly(vinyl chloride)-still on the Run, *Progress in Polymer Science*. 35, **2010**, 303-331.
- [4] S. Yang, R. Yang, G. Li, L. Qu, J.a.Y. Li Lanlan, Nafion/multi-wall carbon nanotubes composite film coated glassy carbon electrode for sensitive determination of caffeine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 639, **2010**, 77-82.
- [5] E. Lojou, P. Bianco, Membrane electrodes for protein and enzyme electrochemistry, *Electroanalysis*. 16, **2004**, 1113-1121.
- [6] K.-. Frith, J.L. Limson, pH Tuning of Nafion (R) for selective detection of tryptophan, *Electrochimica Acta*. 54, **2009**, 3600-3605.
- [7] B. Pérez-López, J. Sola, S. Alegret, A. Merkoci, A carbon nanotube pvc based matrix modified with glutaraldehyde suitable for biosensor applications, *Electroanalysis*. 20, **2008**, 603-610.
- [8] L. Jiang, Y. Wang, J. Ding, T. Lou, W. Qin, An ionophore-nafion modified bismuth electrode for the analysis of cadmium(II), *Electrochemistry Communications*. 12, **2010**, 202-205.
- [9] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, M.A. Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, **2010**, 7141-7148.
- [10] J.R. Macdonald, W.B. Johnson, Impedance spectroscopy. Theory, experiments and applications, John Wiley and Sons, New Jersey, **2005**.
- [11] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical methods. Fundamentals and applications, 2 ed., John Wiley and Sons, USA, **2001**.
- [12] E. Barsoukov, J.R. Macdonald, Impedance spectroscopy. Theory, experiments and applications., 2 ed., John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, **2005**.
- [13] C. Fernández-Sánchez, C. McNeil, K. Rawson, Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 24, **2005**, 37-48.
- [14] R. Janek, W. Fawcett, A. Ulman, Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on Au(111): sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes, *Langmuir*. 14, **1998**, 3011-3018.
- [15] C. Bird, A. Kuhn, Electrochemistry of the viologens, *Chemical Society Reviews*. 10, **1981**, 49-82.
- [16] W.S. Jeon, H.J. Kim, C. Lee, K. Kim, Control of the stoichiometry in host-guest complexation by redox chemistry of guests: inclusion of methylviologen in cucurbit[8]uril, *Chemical Communications*, **2002**, 1828-1829.
- [17] L. Xiao, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, Investigating the voltammetric reduction of methylviologen at gold and carbon based electrode materials. evidence for a surface bound adsorption mechanism leading to electrode 'protection' using multi-walled carbon nanotubes, *New Journal of Chemistry*. 32, **2008**, 1628-1633.
- [18] E. Kosower, J. Cotter, Stable free radicals .2. reduction of 1-methyl-4-cyanopyridinium ion to methylviologen cation radical, *Journal of the American Chemical Society*. 86, **1964**, 5524-5527.
- [19] H.J. Kim, W.S. Jeon, Y.H. Ko, K. Kim, Inclusion of methylviologen in cucurbit[7]uril, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, **2002**, 5007-5011.
- [20] H. Kim, J. Heo, W. Jeon, E. Lee, J. Kim, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, Selective inclusion of a hetero-guest pair in a molecular host: formation of stable charge-transfer complexes in cucurbit[8]uril, *Angewandte Chemie-International Edition*. 40, **2001**, 1526-1529.
- [21] W. Ong, M. Gomez-Kaifer, A.E. Kaifer, Cucurbit[7]uril: a very effective host for viologens and their cation radicals, *Organic letters*. 4, **2002**, 1791-1794.

- [22] A. Mirzoian, A.E. Kaifer, Reactive pseudorotaxanes: inclusion complexation of reduced viologens by the hosts -cyclodextrin and heptakis(2,6-di-o-methyl)- -cyclodextrin, *Chemistry A European Journal*. 3, **1997**, 1052-1058.
- [23] A.E. Kaifer, W. Li, S. Yi, Cucurbiturils as versatile receptors for redox active substrates, *Israel Journal of Chemistry*. 51, **2011**, 496-505.
- [24] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, The cucurbit[n]uril family, *Angewandte Chemie-international Edition*. 44, **2005**, 4844-4870.
- [25] T. Matsue, T. Kato, U. Akiba, T. Osa, Inclusion, solubilization, and stabilization of 2-electron reduced species of methyl viologen by cyclodextrins, *Chemistry Letters*, **1985**, 1825-1828.
- [26] R. Armstrong, K. Edmondson, J. Lee, Impedance of sintered plate cadmium electrodes in alkaline-solution, *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. 63, **1975**, 287-302.
- [27] E. Fataslahoz, M. Sluytersrehabach, J. Sluyters, The investigation of the adsorptive behavior of electroactive species by means of admittance analysis .2. anion-induced adsorption of cadmium(ii) from bromide and iodide solutions at the dropping mercury-electrode, *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. 136, **1982**, 59-81.
- [28] W. Ong, A.E. Kaifer, Unusual Electrochemical Properties of the Inclusion Complexes of Ferrocenium and Cobaltocenium with Cucurbit[7]Urul, *Organometallics*. 22, **2003**, 4181-4183.
- [29] T. Matsue, D. Evans, T. Osa, N. Kobayashi, Electron-transfer reactions associated with host guest complexation - oxidation of ferrocenecarboxylic acid in the presence of beta-cyclodextrin, *Journal of the American Chemical Society*. 107, **1985**, 3411-3417.
- [30] R. Isnin, C. Salam, A. Kaifer, Bimodal cyclodextrin complexation of ferrocene derivatives containing n-alkyl chains of varying length, *Journal of Organic Chemistry*. 56, **1991**, 35-41.
- [31] W.S. Jeon, K. Moon, S.H. Park, H. Chun, Y.H. Ko, J.Y. Lee, E.S. Lee, S. Samal, N.a.R. Selvapalam M.V., V. Sindelar, D. Sobransingh, Y. Inoue, A.E. Kaifer, K. Kim, Complexation of ferrocene derivatives by the cucurbit[7]uril host: a comparative study of the cucurbituril and cyclodextrin host families, *Journal of the American Chemical Society*. 127, **2005**, 12984-12989.
- [32] L. Cui, S. Gadde, W. Li, A.E. Kaifer, Electrochemistry of the inclusion complexes formed between the cucurbit[7]uril host and several cationic and neutral ferrocene derivatives, *Langmuir*. 25, **2009**, 13763-13769.
- [33] M.V. Rekharsky, Y.H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue, Complexation thermodynamics of cucurbit[6]uril with aliphatic alcohols, amines, and diamines, *Supramolecular Chemistry*. 19, **2007**, 39-46.

Capítulo 6 / Chapter 6

**Aplicaciones analíticas
de sensores electroquímicos basados en CB[8] en la
determinación de triptófano y dopamina.**

**Analytical applications
of electrochemical sensors based on CB[8] for
tryptophan and dopamine determination.**

6.1. Introducción.

En el capítulo anterior se mostraron diferentes propuestas para la inmovilización de CB[8] en la superficie de un electrodo. A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la aplicación de estos nuevos sensores a la determinación de analitos de interés biológico como son el triptófano (TRP) y la dopamina (DOP).

El TRP es un aminoácido esencial para los seres humanos, indispensable para estabilizar y mantener el equilibrio positivo de nitrógeno. Es el precursor de importantes biomoléculas como la serotonina que, al ser precursora de la melatonina, favorece la relajación, regulando el sueño y el placer entre otras funciones corporales. Por lo tanto, puede servir como tratamiento para problemas relacionados con la ansiedad, el insomnio, la agresividad y el estrés. Por otra parte, su incorrecta metabolización se ha demostrado como una posible causa de esquizofrenia. Aunque algunos alimentos como los huevos, la leche, los garbanzos, la calabaza, los plátanos o el chocolate entre otros, presentan altos niveles de TRP, la ausencia de éstos en la dieta puede producir deficiencia de TRP, necesitando enriquecerse la misma con productos farmacológicos.

Dada la importancia de este aminoácido, su análisis es fundamental en campos como la bioquímica, la dietética y la farmacología [1]. Por esa razón, en los últimos años se han desarrollado diferentes metodologías para su análisis en un gran número de muestras. Entre las distintas técnicas empleadas se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución con detectores ópticos tanto de absorción ultravioleta como de fluorescencia [2-4]. También existen propuestas basadas en cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas [5] y un gran número de métodos electroquímicos que hacen uso de distintos electrodos modificados [6-14].

Distintos autores han estudiado la interacción de los CB[n]s con el TRP en disolución. En el año 2003, Lee y col. [15] presentaron la formación del complejo ternario establecido entre el complejo CB[8]-MV²⁺ y el TRP, habiendo que esperar hasta el año 2005, para que el grupo de Bush y col. calcularan un valor de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para la constante de asociación de dicha interacción [16]. Posteriormente, Buschmann y col. [17] estudiaron la interacción entre el CB[6] y diferentes péptidos constituidos por dos aminoácidos distintos, concluyendo que se produce una interacción ión-dipolo entre los grupos amino cargados positivamente de los péptidos y los carbonilos de los portales del CB[6]. Esta interacción conduce, finalmente, a la formación de un complejo de

exclusión. Estos resultados se corroboraron en 2012 mediante el estudio de la estructura cristalina que presenta el complejo de exclusión de CB[6]-TRP [18].

La mayoría de los estudios que se encuentran en la bibliografía han sido realizados con CB[8] como hospedador. En 2006, Heitmann y col. [19] presentaron la interacción de péptidos compuestos por tres aminoácidos: dos glicinas y un TRP. En este estudio demostraron que la formación del complejo con CB[8] se encuentra más favorecida cuando el TRP está en posición terminal con el grupo amino cargado positivamente, frente a cuando está posicionado en el medio o cuando está en posición terminal con el grupo carboxilato cargado negativamente. El estudio de la estequiometría muestra que la cavidad del CB[8] es lo suficientemente grande para albergar 2 péptidos en su interior, mostrando una estequiometría 1:2 CB[8]-péptido.

El estudio de la formación de complejos de CB[8] con distintos aminoácidos (un total de 9) fue comenzado por Cong y col. en 2007 [20]. Posteriormente, en 2008, Rajgariah y col. [21] ampliaron el estudio al total de los 20 aminoácidos. Propusieron que, de entre ellos, únicamente el TRP, la fenilalanina (PHE) y la tirosina (TIR) interaccionan, bien directamente con CB[8] o bien con un CB[8] que ya tenga incluida una molécula de MV^{2+} como huésped. La estequiometría encontrada para CB[8] con TRP o PHE es 1:2, y demostraron, mediante el cálculo de la constante de asociación, que la afinidad de CB[8]- MV^{2+} hacia TRP es mayor que hacia PHE. Sin embargo, la constante de formación de CB[8]-(PHE)₂ es mayor que para CB[8]-(TRP)₂.

La interacción de los CB[n]s con los aminoácidos se ha utilizado para su detección mediante el uso de matrices de sensores colorimétricos. El cambio que se provoca en la intensidad de fluorescencia o de absorbancia de un colorante hospedado en la cavidad de un determinado CB[n] cuando interacciona con el analito a detectar, permite la discriminación o identificación de este analito [22, 23].

Por otro lado, así como la interacción de los CB[n]s con los aminoácidos está ampliamente estudiada, en el caso de la DOP son muy pocos los artículos que muestran su posible interacción con los CB[n]s. Al igual que para el TRP, Lee y col. presentaron en 2003 la interacción de CB[8]- MV^{2+} con DOP [15]. Dos años más tarde, Sindelar y col. mostraron la formación del complejo ternario CB[8]-2,7-dimetildiazopireno²⁺-DOP en el que se produce una cierta transferencia de carga entre los dos huéspedes incluidos, lo que conduce a un complejo altamente estable [24].

En 2012, Kim y col. investigaron la DOP como posible interferente en la determinación de acetilcolina utilizando un electrodo selectivo de iones desarrollado con un derivado de CB[6] como parte de la composición del mismo (1%) [25]. En este trabajo, concluyeron que la DOP interfiere en gran medida respecto al resto de aminos ensayadas. No obstante, hasta el momento no se ha estudiado la interacción directa de CB[8] con este neurotransmisor.

La DOP es una hormona de la familia de las catecolaminas que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central, jugando un papel importante en el sistema renal, hormonal y cardiovascular [26]. Es un compuesto de gran interés tanto médico como farmacológico ya que, una disminución en la cantidad de DOP en el organismo, es una de las principales causas de enfermedades como el Parkinson o la esquizofrenia que son producto de un desorden degenerativo crónico y lentamente progresivo a nivel cerebral.

Debido a que este neurotransmisor es fácilmente oxidable, una gran mayoría de los métodos de análisis desarrollados para su determinación se basan en técnicas electroquímicas. Sin embargo, la determinación basada en la monitorización de la oxidación del analito puede ser complicada debido a que, en la mayoría de muestras, la DOP se encuentra acompañada de posibles interferentes que se oxidan a potenciales muy parecidos, en especial el ácido ascórbico. Por esta razón, y con el fin de incrementar la selectividad en la determinación de DOP, se han desarrollado muchos métodos relacionados con la modificación de superficies electródicas empleando distintos tipos de compuestos como pueden ser los nanotubos de carbono, las nanopartículas de oro, diferentes macromoléculas o el grafeno [26-29].

6.2. Objetivos parciales.

A partir de los antecedentes resumidos anteriormente, el objetivo principal del presente capítulo es demostrar que los electrodos modificados con CB[8] desarrollados en el capítulo anterior, tienen capacidad para funcionar como sensores electroquímicos para el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos aplicables al análisis en muestras reales. Para ello, se han elegido como analitos huésped el aminoácido triptófano y el neurotransmisor dopamina.

De acuerdo con el objetivo planteado, se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Con el fin de elegir la modificación más conveniente para la determinación del analito, en primer lugar se estudiará la respuesta electroquímica del TRP en los diferentes electrodos.
2. Mediante medidas en CV y EIS se llevará a cabo el estudio del comportamiento electroquímico del analito en el electrodo modificado con CB[8] seleccionado en el paso anterior.
3. Por otro lado, se estudiará la viabilidad de utilización de los diferentes electrodos modificados en un sistema en dinámico, comprobando la estabilidad de las modificaciones para llevar a cabo análisis en flujo. En este caso se utilizará DOP como analito para comprobar si son aptos para el desarrollo de metodologías analíticas de sistemas en continuo.
4. Para ambos sistemas, se optimizarán todas las variables del método analítico correspondiente con el fin de realizar la determinación de cada uno de los analitos en una muestra real.

6.3. Procedimientos.

6.3.1. Preparación de las disoluciones de trabajo.

Las disoluciones de TRP y DOP en concentración 7.00×10^{-3} M y 1.18×10^{-4} M, respectivamente, fueron preparadas en agua ultrapura. A partir de ellas y, diariamente, se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución en el medio adecuado. Para la disolución tanto de CB[6] como de CB[7] en concentración 7.90×10^{-4} M, se utilizó NaCl 0.2 M. Para la disolución de CB[8] en concentración 5.20×10^{-4} M, se utilizó HCl 3M diluyendo, posteriormente, en agua ultrapura. Las disoluciones patrón se conservaron bajo refrigeración.

6.3.2. Preparación del electrodo de trabajo.

Tras preparar el electrodo de carbón vítreo siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3, se llevó a cabo su modificación depositando 5 μ l de una suspensión homogénea de Nafion/CB[8] o de PVC/CB[8], dejando secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La modificación del electrodo con la membrana de diálisis se realizó depositando una suspensión de CB[8] al 0.5% en etanol sobre la superficie del electrodo. A continuación, se coloca la membrana de diálisis humedecida con agua desionizada, sujetándola con una anilla de goma.

6.3.3. Determinación de TRP.

Una vez modificada la superficie del electrodo, éste fue transferido a una celda electroquímica con 10.00 ml de la disolución de medida que corresponda preparada en tampón fosfato, 0.5 M a pH = 2.2. Las medidas de DPV se realizaron barriendo el potencial entre 0.3 y 1.2 V, con una amplitud de impulso de 80 mV y una velocidad de barrido de 30 mV/s.

6.3.4. Medidas de fluorescencia.

Se realizaron estudios de la interacción entre CB[8] y TRP, midiendo la intensidad de emisión del TRP a una λ_{em} de 347 nm, al excitar a una λ_{ex} de 280 nm.

6.3.5. Medidas de EIS.

Las medidas de impedancia de disoluciones de 1.00×10^{-3} M de TRP fueron realizadas en H₃PO₄/H₂PO₄⁻ 0.5 M a pH = 2.2, a un potencial 0.6 V superior al potencial

de circuito abierto. Se registraron las medidas en un intervalo de frecuencias de 0.1 Hz a 0.1 MHz con una amplitud sinusoidal de potencial de 5mV. Los datos se representan en forma de diagrama de Nyquist.

6.3.6. Determinación de DOP en flujo.

Una vez realizada la modificación del electrodo, se introduce en la célula de flujo aplicándose un potencial fijo para la detección de la DOP. Se conecta el sistema dejando circular la disolución empleada como portador, mientras se registra la señal hasta obtener una línea base estable para comenzar las medidas.

Como condiciones iniciales para trabajar en el sistema de flujo se fijaron un caudal de 3 ml/min, un bucle de muestra de 75 μ l y un reactor de 30 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno.

6.3.7. Medidas de ^1H -RMN y MS.

Se registraron espectros de ^1H -RMN de disoluciones tanto de DOP 1.00×10^{-3} M, como de DOP con concentraciones crecientes de CB[8] en D_2O , tras someter las muestras a ultrasonidos durante 30 min. Debido a la baja solubilidad del CB[8], no todo está disuelto a la hora de realizar las medidas. También se registraron los espectros de disoluciones de 2.80×10^{-3} M de ASC y ASC con exceso de CB[8].

Los espectros de MS se registraron para disoluciones de DOP (1.0×10^{-3} M) y DOP con exceso de CB[8] preparadas en agua ultrapura y sometidas a ultrasonidos durante 30 min antes de ser analizadas.

6.3.8. Preparación de las muestras de sangre.

La sangre fue centrifugada durante 10 minutos a 2500 rpm y 4 °C. Posteriormente, el suero fue separado mediante una jeringa, almacenándose a 4 °C hasta realizar el análisis.

6.4. Resultados y discusión.

6.4.1. Desarrollo del sensor de triptófano.

6.4.1.1. Estudio de la interacción entre CB[n]s y TRP.

El registro de los voltamperogramas diferenciales de impulsos de disoluciones de TRP con diferentes homólogos de CB[n] ($n = 6-8$), permitió comprobar la interacción entre estos receptores y el analito, en consonancia con los estudios publicados previamente y comentados en la introducción de este capítulo (figura 6.1).

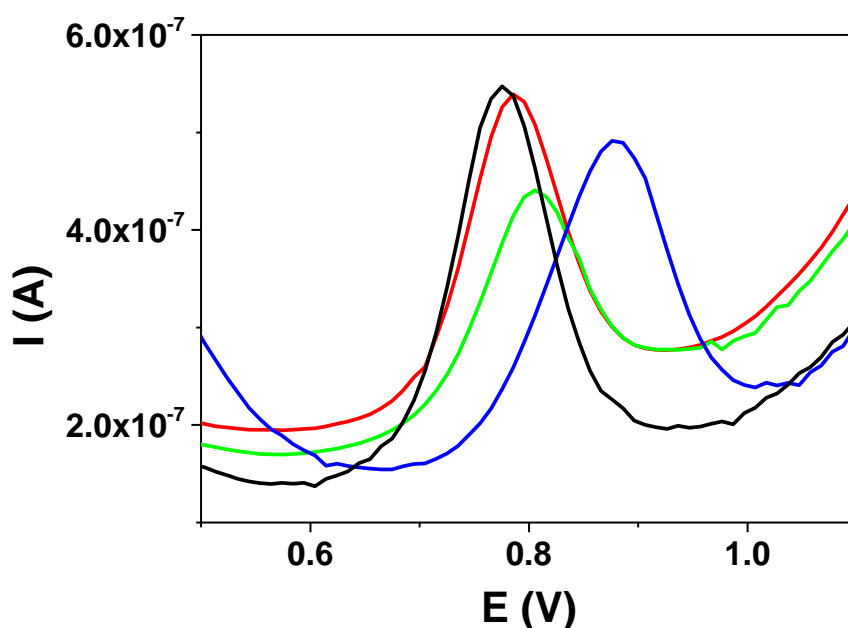


Figura 6.1. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de disoluciones de TRP (5.0×10^{-6} M) con diferentes CB[n]s en disolución ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0.05 M pH = 4.0). — TRP, — TRP + [CB[6]] = 1.5×10^{-5} M, — TRP + [CB[7]] = 1.5×10^{-5} M y — TRP + [CB[8]] = 2.5×10^{-6} M.

Analizando los voltamperogramas diferenciales de impulsos obtenidos con cada uno de los homólogos, apenas se aprecian cambios en la señal electroquímica del TRP cuando se añade CB[6] (figura 6.1, línea roja). Como cabía esperar, la cavidad del homólogo de 6 unidades de glicoluril resulta de un tamaño excesivamente pequeño para albergar en su interior al analito bajo estudio. Este resultado concuerda con lo publicado por Buschmann y col. en 2005, respecto a que el TRP forma un complejo de exclusión con el CB[6] [17]. Tanto la presencia de CB[7] como CB[8] induce a cambios en la

señal electroquímica del aminoácido, derivados de la interacción supramolecular entre ellos. Así, en la figura 6.1, se observa, en ambos casos, un desplazamiento del potencial de pico a valores más positivos junto con una disminución de la corriente. Estos cambios en la señal de oxidación de TRP se pueden atribuir a la formación del complejo de inclusión CB[n]-TRP ($n = 7$ y 8). El mayor desplazamiento del potencial de pico observado en el caso del CB[8] (figura 6.1, línea azul), de aproximadamente 100 mV hacia potenciales más positivos frente a los 30 mV cuando es con CB[7], corrobora una fuerte interacción anfitrión-huésped, mayor que en el caso del CB[7]. Esta conclusión, parece apoyada por el valor de la constante de asociación publicada para el complejo CB[8]-TRP₂ de $6.9 \times 10^7 \text{ M}^{-2}$ [21].

En base a estos resultados, podemos afirmar que el uso de CB[8] para el desarrollo del sensor supone una ventaja, no sólo porque es el homólogo menos soluble, sino porque resulta más fácil el seguimiento de la formación del complejo.

6.4.1.2. Estudio del comportamiento de TRP en los electrodos modificados.

Una vez estudiada la respuesta electroquímica del CB[n]-TRP en disolución, se estudió su comportamiento utilizando los electrodos modificados con CB[8] descritos en el capítulo 5.

La figura 6.2 muestra los voltamperogramas de TRP registrados para los electrodos modificados con PVC y membrana de diálisis como soportes.

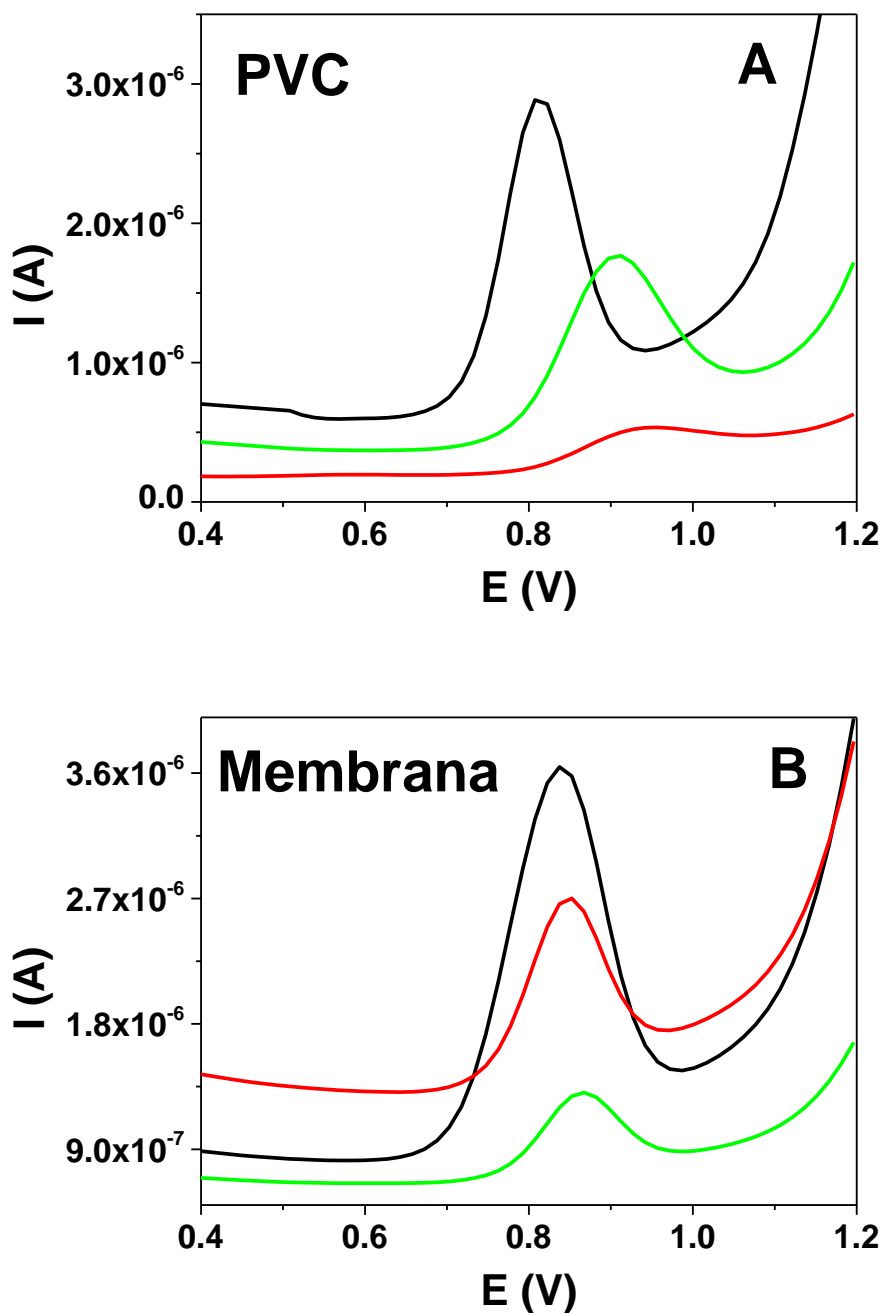


Figura 6.2. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de disoluciones de TRP (5.0×10^{-5} M) en 0.1 M de NaCl para — GCE, — GCE/Soporte, — GCE/Soporte + 0.5% CB[8].

Como se muestra en la figura, ambos soportes producen un comportamiento similar al obtenido para las distintas sondas electroquímicas estudiadas en el capítulo 5, registrándose una disminución acusada de la intensidad de señal (figura 6.2A y B, líneas rojas). Además, la modificación de la superficie con PVC conlleva un desplazamiento del potencial de pico del TRP hacia valores más positivos.

Por otro lado, cuando el receptor se encuentra inmovilizado en la superficie electródica con PVC, se muestra un aumento de la corriente, facilitando la llegada del analito a la superficie a través de la formación del complejo CB[8]-TRP (figura 6.2A, línea verde). Resultados similares a este comportamiento fueron encontrados con las distintas sondas en el capítulo anterior. En el caso de que sea la membrana de diálisis quien actúe como soporte para la inmovilización de CB[8], se registra una disminución de la intensidad atribuible a la formación del complejo CB[8]-TRP (figura 6.2B, línea verde).

En el caso de utilizar el Nafion para la inmovilización del CB[8] en la superficie electródica, se obtuvieron resultados diferentes respecto a las otras modificaciones (figura 6.3).

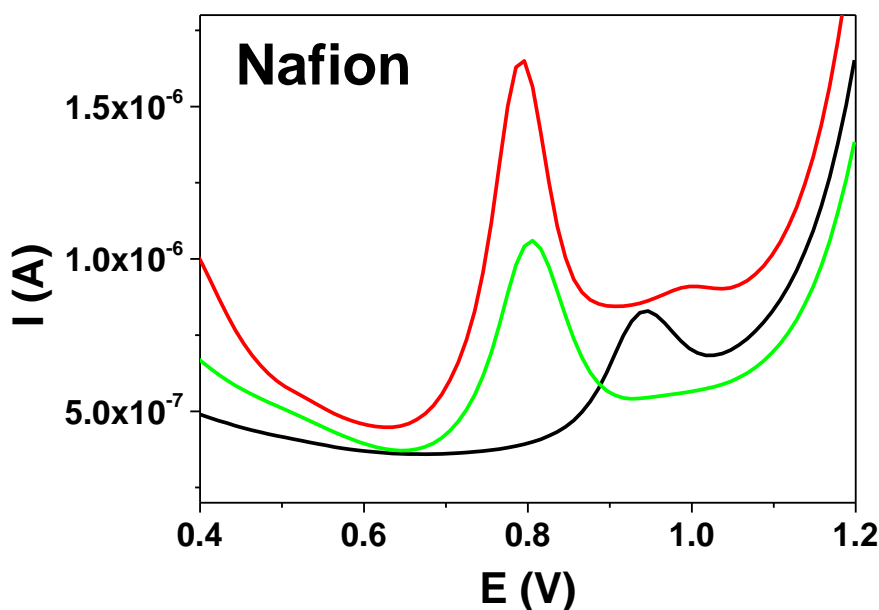


Figura 6.3. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de disoluciones de TRP (5.0×10^{-6} M) en 0.05 M de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (pH = 2.0) para: — GCE, — GCE/Nafion, — GCE/Nafion + 0.5 CB[8].

Debido a la propiedad de alta permeabilidad a cationes que presenta el polímero, la modificación de la superficie con Nafion produce un incremento de la corriente y una disminución en el potencial de pico (figura 6.3, línea roja). Por otro lado, la modificación de la superficie con Nafion/CB[8] provoca una disminución de la intensidad respecto al modificado con Nafion solo, de nuevo, atribuible a la formación

del complejo CB[8]-TRP, no obstante, se registra una intensidad de señal mayor a la del electrodo sin modificar y un valor de potencial de oxidación más pequeño.

Para todas las modificaciones, las variaciones tanto en el potencial como en la intensidad de señal del analito permiten comprobar la formación de complejo. La tabla 6.1 muestra los valores absolutos de los cambios producidos entre el electrodo modificado con soporte/CB[8] y el electrodo sin modificar.

Soporte	PVC	Membrana de diálisis	Nafion
ΔE_p (mV)	90	30	141
ΔI_p (A)	8.2×10^{-7}	2.2×10^{-6}	5.0×10^{-7}

Tabla 6.1. Resultados de ΔE_p e ΔI_p para TRP entre GCE/soporte/CB[8] y GCE.

Como se observa en las figuras anteriores, con PVC y la membrana se produce un cambio en el potencial hacia valores más positivos y una disminución de intensidad de señal respecto al electrodo no modificado. Sin embargo, con el Nafion/CB[8] se produce el efecto contrario, se registra un mayor cambio de potencial y hacia valores menos positivos además de un aumento de la corriente respecto al electrodo sin modificar. Por esta razón, y con el fin de llevar a cabo la determinación de TRP, se eligió el Nafion/CB[8] como modificador.

6.4.1.3. Optimización de la modificación.

Antes de comenzar con la optimización de las variables instrumentales que afectan a la señal electroquímica del TRP, se estudió el porcentaje óptimo tanto de Nafion como de CB[8] en la suspensión modificadora. En la figura 6.4 se muestra la variación de la corriente con el aumento del porcentaje de Nafion hasta 2.50 %.

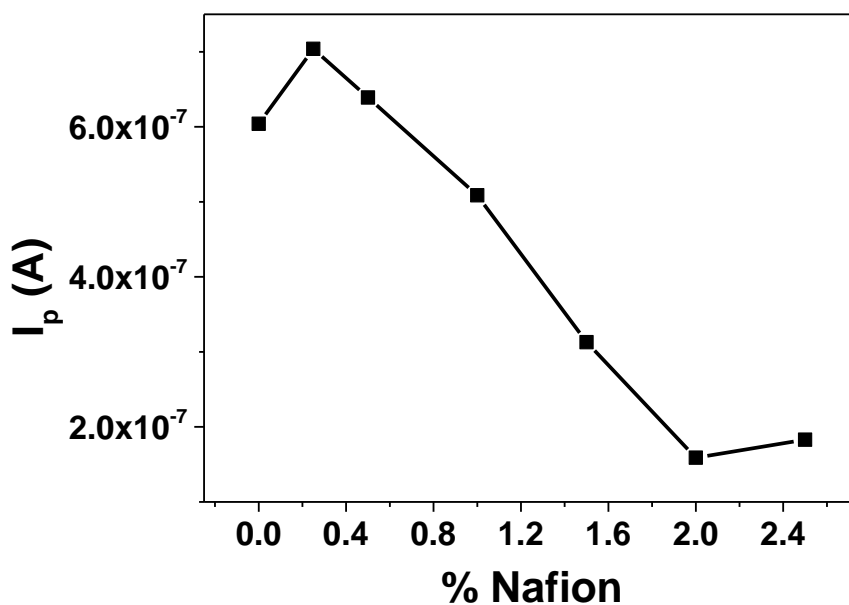


Figura 6.4. Variación de la intensidad de señal del TRP (5.0×10^{-6} M) con el porcentaje de Nafion. $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.05 M (pH = 2.0).

Se observa que al aumentar el porcentaje de modificador y, por lo tanto, aumentar el espesor de la capa, la intensidad de señal del TRP disminuye, por lo que se fijó un porcentaje de soporte de 0.25%. Resultados similares han sido recogidos por otros autores [30, 31].

A continuación, para optimizar la cantidad de CB[8] en la superficie electrodo, se ensayaron porcentajes entre 0.10 y 0.45% del receptor, manteniendo el de Nafion en 0.25%. La respuesta de la señal electroquímica de TRP con la variación de la proporción de CB[8] en el electrodo se muestra en la figura 6.5.

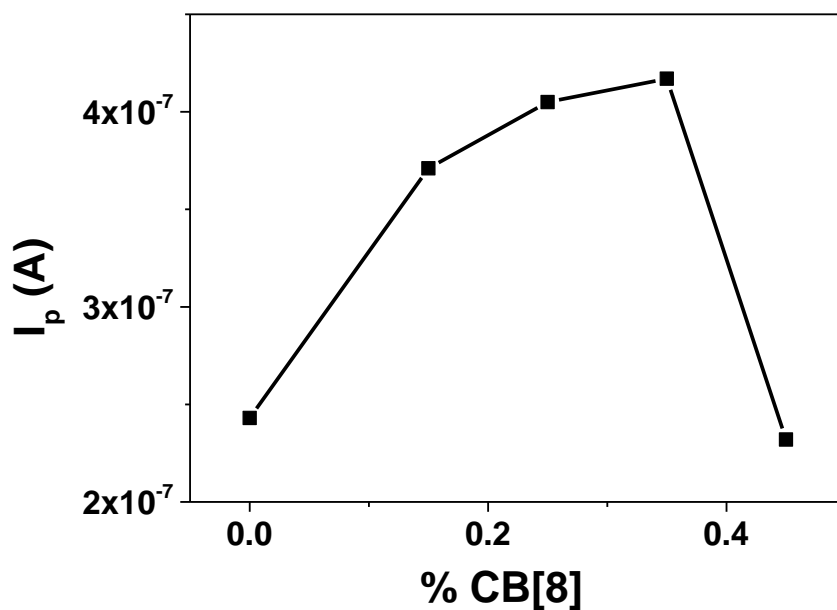


Figura 6.5. Variación de la I_p de TRP (5.0×10^{-6} M) con el porcentaje de CB[8]. $H_3PO_4/H_2PO_4^-$ 0.05 M (pH = 2.0).

Como se muestra en la figura anterior, un aumento en el porcentaje de CB[8] hasta un valor de 0.35% produce un incremento de la corriente, por lo que se eligió dicho porcentaje para el desarrollo del sensor de TRP.

Como se muestra en los voltamperogramas de la figura 6.6, la modificación optimizada permite oxidar el TRP aplicando menor valor de potencial que para el electrodo no modificado, lo que proporciona una mayor selectividad. Además, el notable incremento de la intensidad de señal se traduce en una mayor sensibilidad para la determinación de TRP.

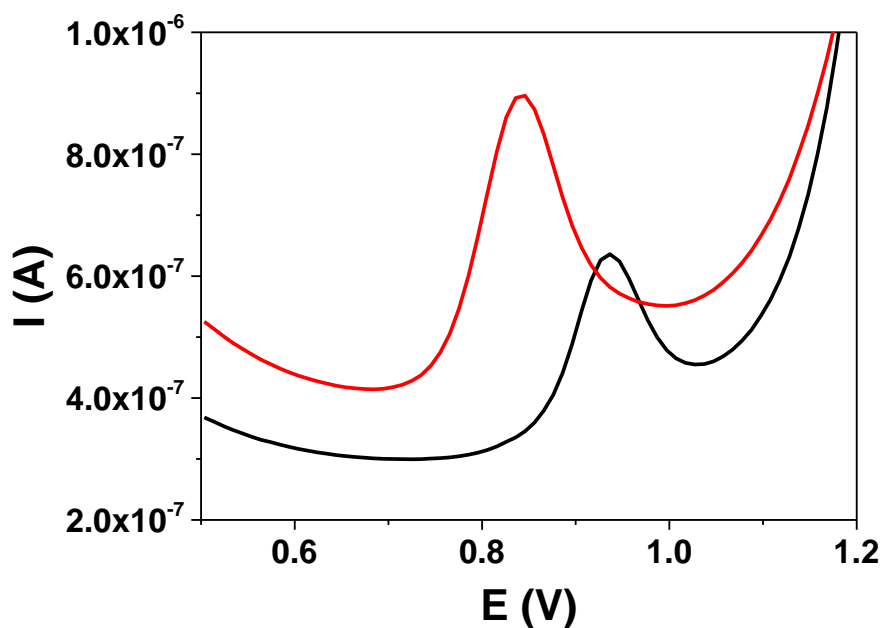


Figura 6.6. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de TRP (5.0×10^{-6} M) en $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.05 M (pH = 2.0). — GCE y — GCE/Nafion + 0.35% CB[8].

6.4.1.4. Optimización de los parámetros químicos. pH y concentración de electrolito.

Como ya se ha comentado en otras ocasiones, las cargas que pueda presentar la molécula a determinar y la concentración de sales en disolución, intervendrán en la formación del complejo con el receptor macrocíclico. En este caso, además hay que tener en cuenta la alta permeabilidad a los cationes que presenta el Nafion, por lo que el pH y la concentración de electrolito son importantes variables a estudiar.

En base a la estructura de las distintas especies de TRP según los valores de pKa del aminoácido (figura 6.7), se estudiaron tres electrolitos de tampón fosfato (0.05 M) con valores de pH, 2.0, 7.0 y 11.0. En esas condiciones, el TRP se encontrará cargado positivamente, neutro o con carga negativa.

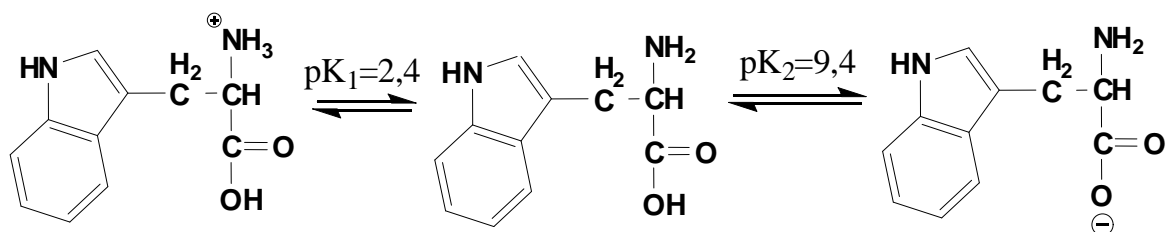


Figura 6.7. Especies de TRP en función del pH.

En la tabla 6.2 se recogen los valores de E_p e I_p medidos durante la oxidación del complejo según el pH estudiado.

	E_p (V)	I_p (A)
pH = 2.0	0.826	4.18×10^{-7}
pH = 7.0	0.634	9.87×10^{-8}
pH = 11.0	0.483	1.43×10^{-8}

Tabla 6.2. Valores de E_p e I_p según el pH del medio.

Como se podía esperar, el E_p disminuye a medida que aumenta el pH. Además, la situación experimental en la que el analito está cargado positivamente, pH = 2.0, favorece la formación del complejo y la influencia de la permeabilidad de la capa modificadora, lo que conlleva a una mayor intensidad de señal.

Puesto que determinadas observaciones experimentales indicaban que el ajuste del pH resulta una variable de gran influencia, se estudió la respuesta electroquímica del TRP para valores de pH entre 1.82 y 3.00, obteniendo, como se puede ver en la figura 6.8, un valor de intensidad más alto y una señal más definida para pH = 2.20.

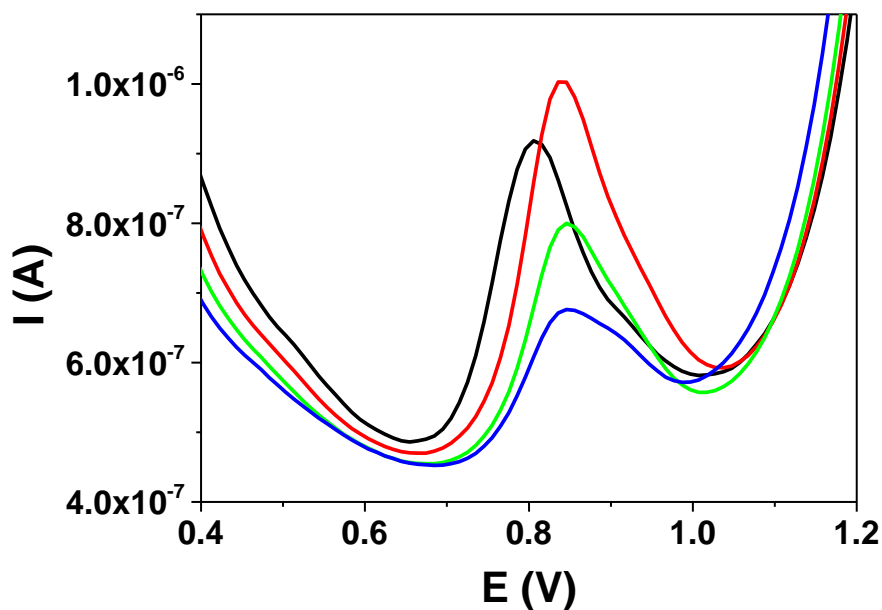


Figura 6.8. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de de TRP (5.0×10^{-6} M) a distintos valores de pH; $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.05 M. — pH = 1.82, — pH = 2.20, — pH = 2.61 y — pH = 3.00.

A partir de estos resultados, se fijó el pH del electrolito tampón fosfato en 2.20, optimizando, a continuación, la concentración del mismo.

En el capítulo 4 se demostró que la influencia de las sales puede afectar a la formación de un complejo CB[n]-analito cuando se forma en disolución. Además, varios autores han resaltado el hecho de que la presencia de cationes en la disolución, puede afectar a la constante de formación del complejo. Este es el caso del complejo CB[7]-PHE, para el que la constante de formación disminuye con la presencia de NaCl 0.1M frente a la medida en agua [32].

Cuando se varió la concentración de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4\text{Na}$ entre 0.01 y 1.00 M se observó que, según aumenta la concentración de electrolito, aumenta la intensidad de oxidación del TRP (figura 6.9). Este comportamiento es contrario a lo observado hasta el momento en todos los estudios realizados anteriormente en disolución, para los que una alta concentración de cationes en el medio, dificultaba la formación del complejo.

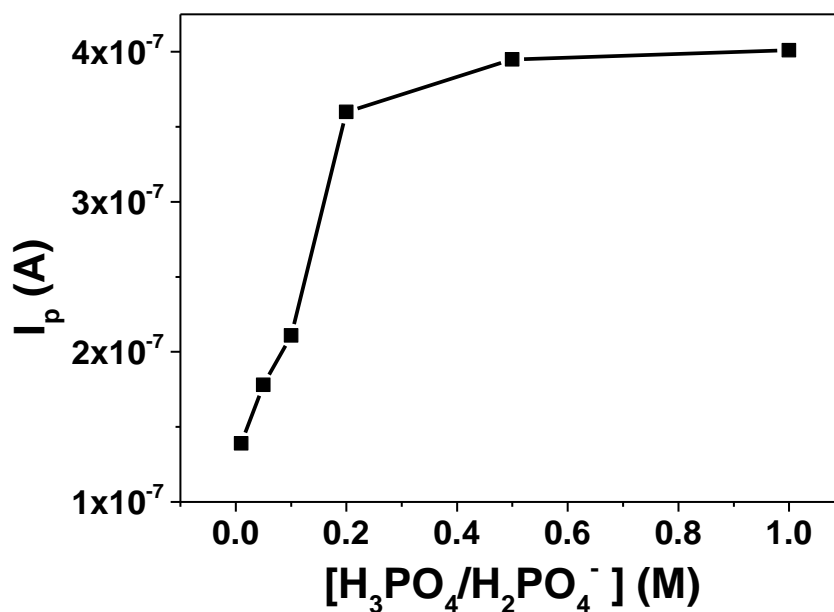


Figura 6.9. Variación de la intensidad de señal del TRP (5.0×10^{-6} M) con la concentración de electrolito para el electrodo GCE/Nafion/CB[8].

Para comprobar que la diferencia de comportamiento es debida no sólo al CB[8], sino al hecho particular de que se encuentra inmovilizado en la superficie del electrodo, se realizaron dos experimentos. El primero consistió en estudiar la respuesta del TRP tanto en un electrodo sin modificar, como en otro modificado con Nafion al variar la concentración de electrolito (figura 6.10). El segundo, se basó en monitorizar la formación del complejo en disolución a distintas concentraciones de electrolito soporte.

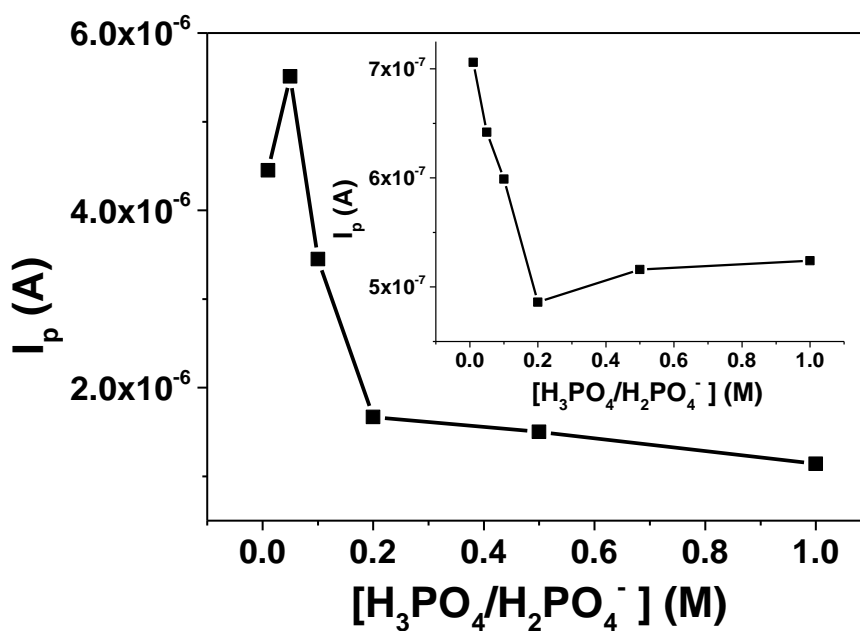


Figura 6.10. Variación de la intensidad de señal del TRP (5.0×10^{-6} M) con la concentración de electrolito en GCE/Nafion. Inserto: GCE sin modificar.

Los resultados del primer ensayo se muestran en la figura 6.10 donde se observa como, para ambos electrodos, la corriente disminuye con el aumento en la concentración de electrolito. Este hecho confirma que es la presencia de CB[8] en la superficie electródica la responsable de que un aumento en la concentración de H_3PO_4/H_2PO_4Na , produzca un aumento en la intensidad de señal del TRP.

En relación al segundo experimento, se realizó el estudio de la formación del complejo CB[8]-TRP en disolución para dos concentraciones de electrolito diferentes, 0.05 y 0.50 M (figura 6.11).

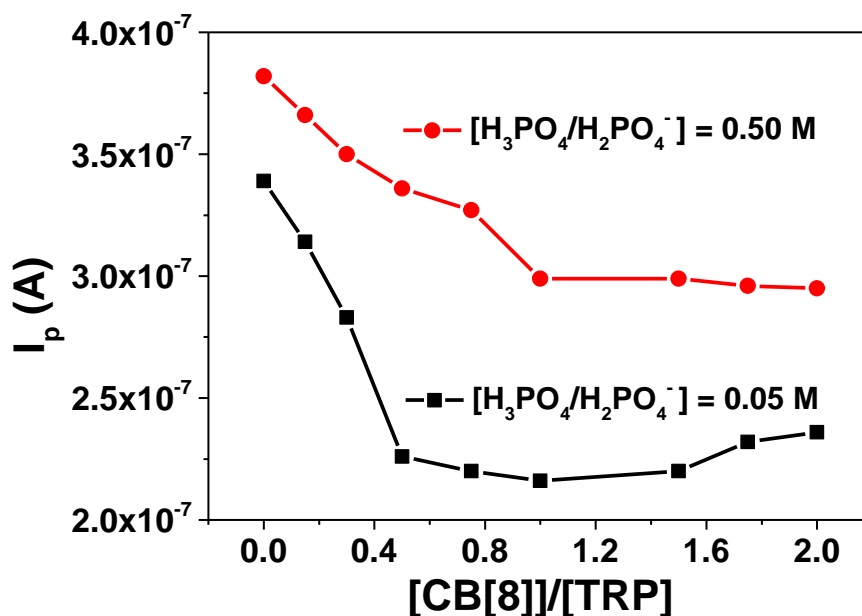


Figura 6.11. Estudio de la formación del complejo CB[8]-TRP según la concentración de electrolito en un electrodo sin modificar. $[TRP] = 5.0 \times 10^{-6}$ M.

Los resultados obtenidos conducen a distintas conclusiones. Por una parte, confirman el hecho de que en disolución, un aumento de la concentración de electrolito dificulta la formación del complejo, permitiendo constatar la influencia de la inmovilización del CB[8]. Por otro lado, los resultados mostrados en la figura 6.11, indicarían que la variación de la concentración de electrolito, puede influir en la estequiometría del complejo formado. Si bien, estudios previos realizados por otros autores confirman que la cavidad del CB[8] es lo suficientemente grande para albergar dos moléculas de aminoácido permitiendo la formación del complejo CB[8]-TRP₂ [21], los resultados obtenidos muestran que una concentración de 0.05 M conduciría a una estequiometría 1:2 anfitrión-huésped. Sin embargo, al aumentar la concentración de cationes en disolución, el CB[8] únicamente incluye una molécula de TRP en la cavidad, formando el complejo 1:1.

Para confirmar estas conclusiones, se realizó el mismo experimento pero empleando medidas de fluorescencia. Como se muestra en la figura 6.12, los resultados obtenidos parecen confirmar los experimentos comentados anteriormente.

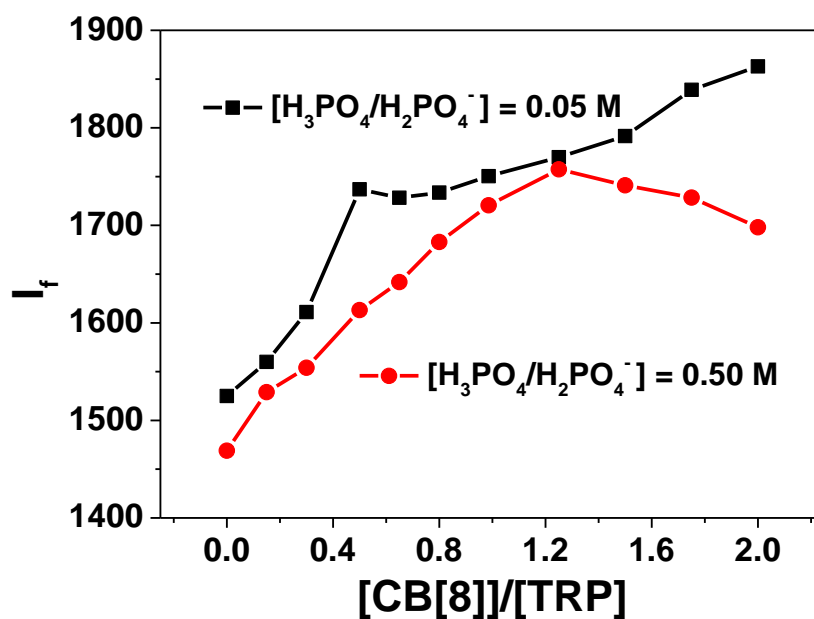


Figura 6.12. Estudio fluorimétrico de la formación del complejo CB[8]-TRP según la concentración del medio. $[\text{TRP}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Por otra parte, los modelos moleculares calculados para las dos posibles estequiometrías que se muestran en la figura 6.13, reflejan la posibilidad de la formación del complejo de estequiometría 1:2, siendo necesaria una de reorganización de la molécula de TRP con respecto al modelo correspondiente a la estequiometría 1:1, de forma que acomode su parte más apolar en el centro de la cavidad del CB[8] y el grupo amino cargado en los portales del mismo.

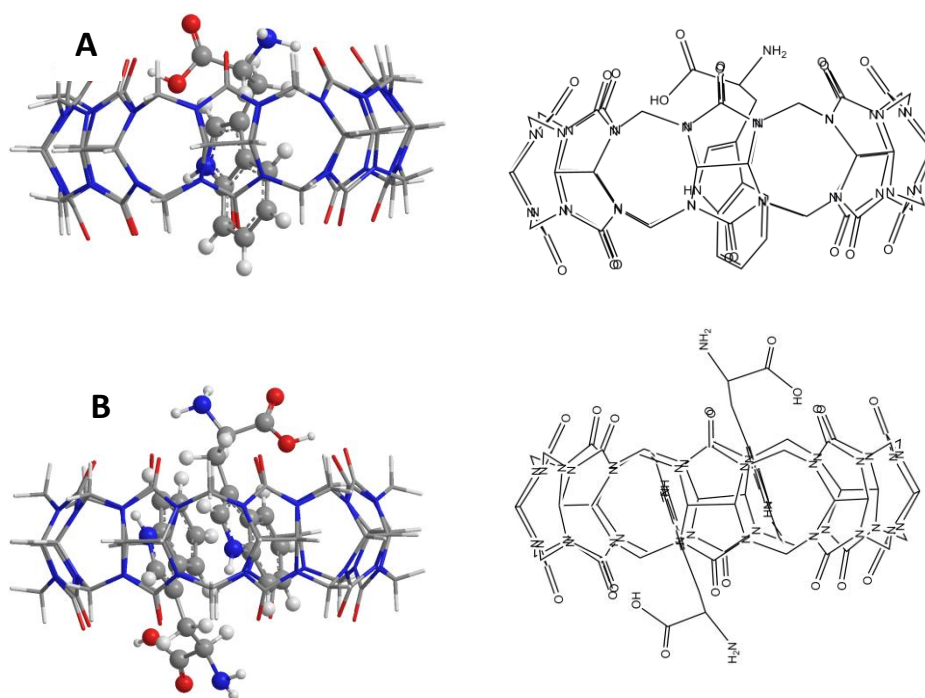


Figura 6.13. Modelos moleculares calculados para la estructura de mínima energía de los complejos CB[8]-TRP para las estequiometrías A) 1:1 y B) 1:2.

A la vista de todos los resultados anteriormente expuestos, se fijó $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 0.5 M a $\text{pH} = 2.2$, como electrolito soporte para la determinación de TRP mediante un electrodo modificado con Nafion/CB[8].

6.4.1.5. Optimización de las variables instrumentales de la técnica de medida.

Con el objetivo de utilizar este sensor en el desarrollo de un método analítico para la determinación de TRP, tras el pH y la concentración de electrolito, se llevó a cabo la optimización de las distintas variables que afectan a la técnica electroquímica de medida (DPV).

Como condiciones iniciales se fijaron una amplitud de impulso (a) de 70 mV, un escalón de potencial (ΔE_s) de 10 mV y 0.5 s como tiempo de aplicación del escalón de potencial (t_s), por lo que la V_b fue de 20 mV/s. Los barridos de potencial se realizaron entre 0.0 y 1.2 V con un tiempo de acumulación (t_{ac}) de 90s al potencial inicial.

Cada variable fue estudiada por separado fijando su valor una vez optimizado. El valor óptimo es aquel que proporcione la mayor intensidad de señal sin aumentar en

exceso la anchura de la misma ($W_{1/2}$), lo que se traduciría en una pérdida de selectividad. Se comenzó optimizando la amplitud de impulso y los resultados se muestran en la figura 6.14.

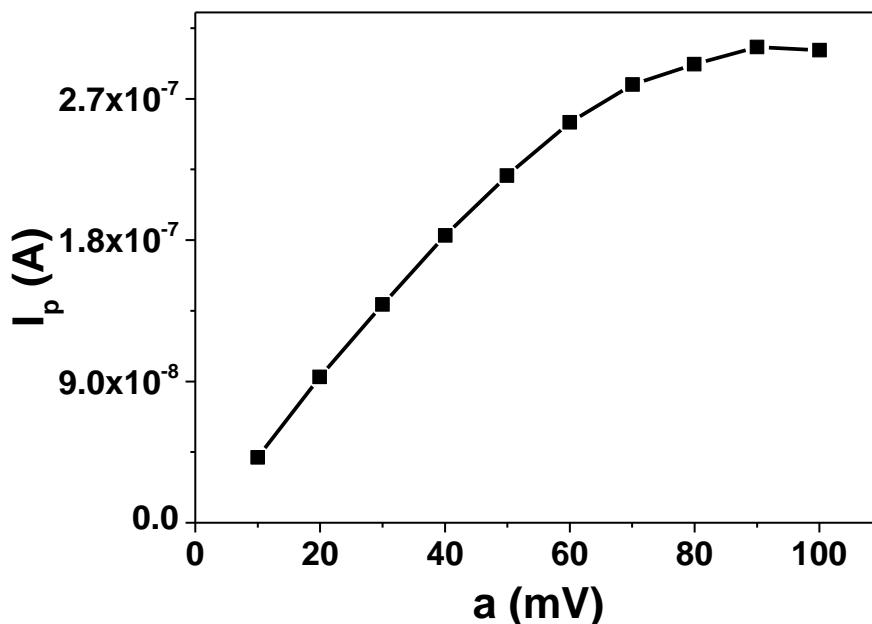


Figura 6.14. Influencia de la variación de la amplitud impulso en la señal de TRP (5.0×10^{-6} M).

La señal crece rápidamente al aumentar “a” hasta un valor de 60 mV a partir del cual lo hace más lentamente hasta estabilizarse mientras que la anchura de pico adquiere valores entre 80 y 100 mV. Se consideró un valor de amplitud de impulso óptimo de 80 mV, ya que a ese valor se registra la mayor intensidad de señal sin tener un aumento de la anchura de pico que produzca una excesiva pérdida de la selectividad ($W_{1/2} = 90$ mV).

La velocidad a la que se lleva a cabo el barrido de potencial resulta de la combinación del ΔE_s y t_s . Por tanto, en primer lugar se fijó el valor de t_s en 0.5 s variándose ΔE_s entre 2.5 y 20 mV. Como se puede ver en la tabla 6.3, el mayor valor de señal se registró para 20 mV (que corresponde a una velocidad de 40 mV/s). Sin embargo, se fijó un valor de 15 ya que, a ese valor se registra una intensidad muy parecida a la de 20 mV, y se obtiene además una señal menos ancha, minimizando así la pérdida de selectividad.

Una vez fijado el valor de ΔE_s se modificó el t_s entre 0.38 y 1.50 s. En este caso, la mayor intensidad se registró con un valor de t_s de 0.50 s, lo que supone una V_b de 30 mV/s, que se mantuvo constante para el resto de experimentos.

V_b (mV/s)	ΔE_s (mV) ($t_s = 0.5$ s)	I_p (A) / $W_{1/2}$	t_s (s) ($\Delta E_s = 15.0$ mV)	I_p (A) / $W_{1/2}$
5	2.5	$2.20 \times 10^{-7} / 91$	-	-
10	5.0	$3.49 \times 10^{-7} / 91$	1.50	$3.76 \times 10^{-7} / 90$
20	10.0	$4.00 \times 10^{-7} / 91$	0.75	$3.65 \times 10^{-7} / 90$
30	15.0	$4.80 \times 10^{-7} / 90$	0.50	$3.89 \times 10^{-7} / 90$
40	20.0	$4.92 \times 10^{-7} / 101$	0.38	$3.80 \times 10^{-7} / 90$

Tabla 6.3. Resultados obtenidos durante la optimización de la V_b .

Como ya se ha mencionado, la naturaleza de la modificación del electrodo provoca la acumulación del analito en la superficie, aumentando la intensidad de señal al registrar la señal electroquímica. Por esa razón, se llevó a cabo el estudio del tiempo de acumulación a diferentes concentraciones de analito, como se muestra en la figura 6.15.

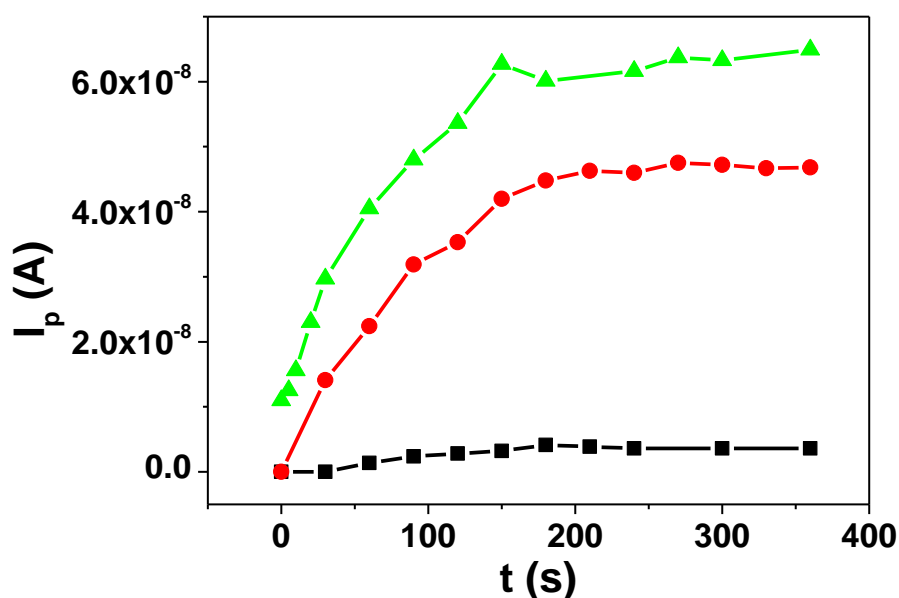


Figura 6.15. Estudio de la intensidad de señal en función del tiempo de acumulación para diferentes concentraciones de TRP: \blacktriangle [TRP] = 1.0×10^{-6} M de TRP, \bullet [TRP] = 5.0×10^{-7} M y \blacksquare [TRP] = 1.0×10^{-7} M.

Se observa que la corriente aumenta con el tiempo de acumulación para cada una de las concentraciones estudiadas hasta un valor de tiempo de acumulación al cual no se aprecia variación significativa de la intensidad. En esa situación se alcanza el equilibrio entre la concentración de analito en la superficie del electrodo y la concentración en la disolución. Este equilibrio se produce antes cuanto mayor concentración de TRP. Para continuar con el resto de experimentos y esperando bajas concentraciones de TRP en la determinación, se fijó un tiempo de acumulación de 210 s.

Por último, la variación del potencial de acumulación E_0 entre 0.0 y 0.6 V (figura 6.16), condujo a un aumento de la corriente hasta un valor de potencial de 0.3 V, a partir del cual comienza a disminuir, por tanto se fijó este potencial para el resto de experimentos.

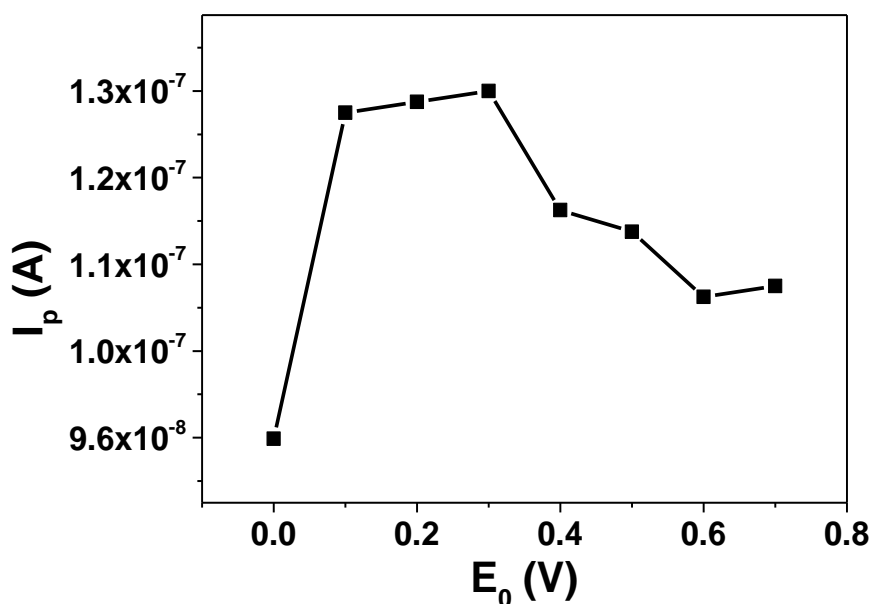


Figura 6.16. Variación de la I_p de oxidación del complejo con el E_0 .

A modo de resumen, las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de TRP a través de su complejo con CB[8] fueron: un barrido de potencial entre 0.3 y 1.2 V, con un valor de $a = 80$ mV y una V_b de 30 mV/s como combinación de un valor de ΔE_s y de t_s de 15 mV y 0.5 s respectivamente, acumulando al potencial inicial durante 210 s. Estas condiciones fueron las utilizadas para evaluar los parámetros analíticos del sensor.

6.4.1.6. Caracterización electroquímica del sensor empleando CV y EIS.

Con el objetivo de conocer el comportamiento electroquímico del TRP en el electrodo modificado con Nafion/CB[8] y su diferencia con el electrodo sin modificar, se registraron, con ambos electrodos, voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido en un intervalo comprendido entre 5 y 700 mV/s.

La figura 6.17A muestra los voltamperogramas cíclicos del TRP en el electrodo sin modificar (línea roja) y en el electrodo modificado con Nafion/CB[8] (línea verde). En ambos casos se observa únicamente una onda en el barrido correspondiente a la oxidación del TRP, lo que indicaría que el TRP presenta un comportamiento electroquímico irreversible. Este comportamiento se confirma con la variación del potencial de pico anódico con la V_b (figura 6.17B).

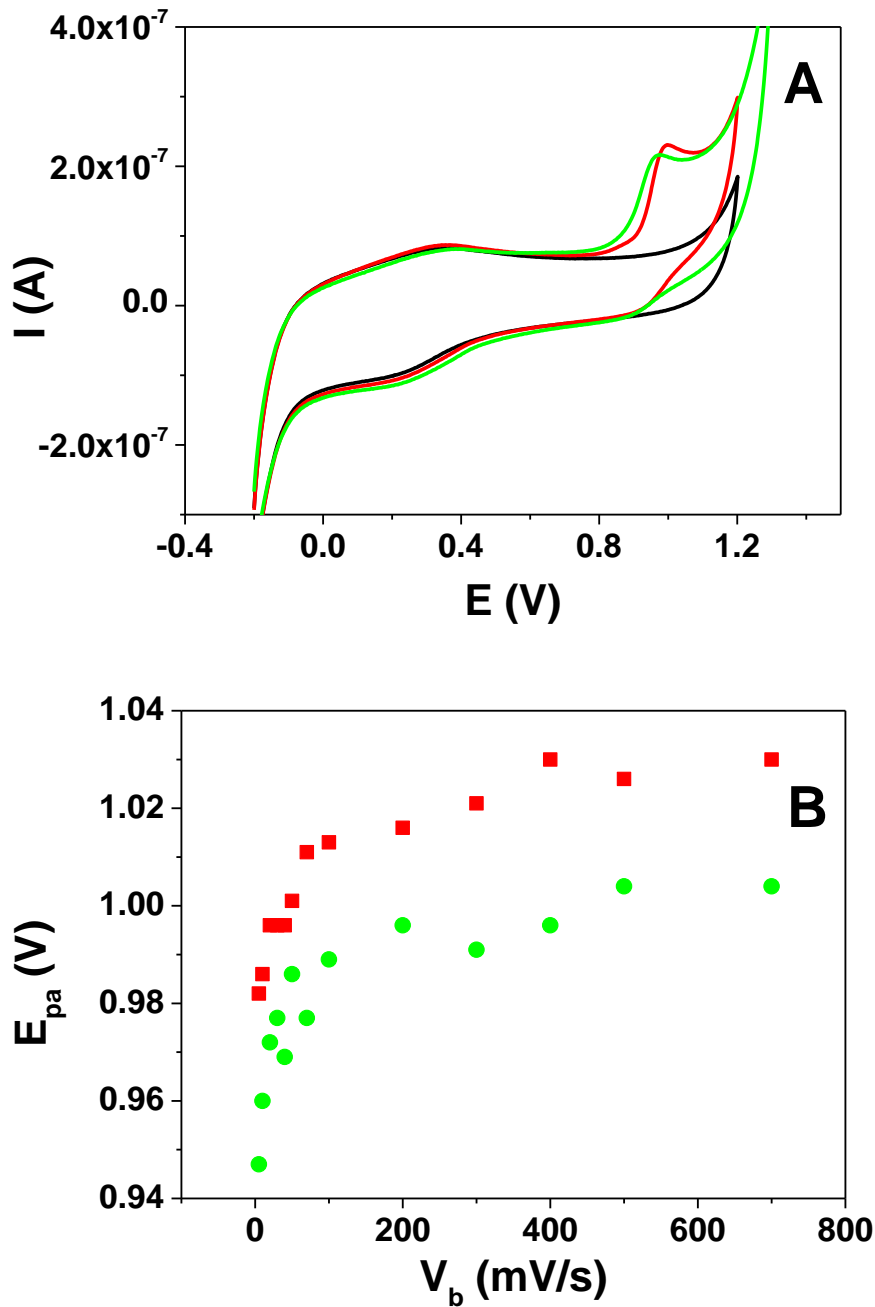


Figura 6.17. A) Voltamperogramas cíclicos del TRP ($V_b = 10$ mV/s) y B) variación del E_{pa} con la V_b en: — GCE y — GCE/Nafion/CB[8].— Electrolito soporte; $H_3PO_4/H_2PO_4^-$ 0.5 M pH = 2.2. [TRP] = 1.0×10^{-5} M.

La figura 6.18 muestra la variación en la intensidad de oxidación del TRP con la V_b en un electrodo sin modificar y su dependencia lineal con $V_b^{1/2}$.

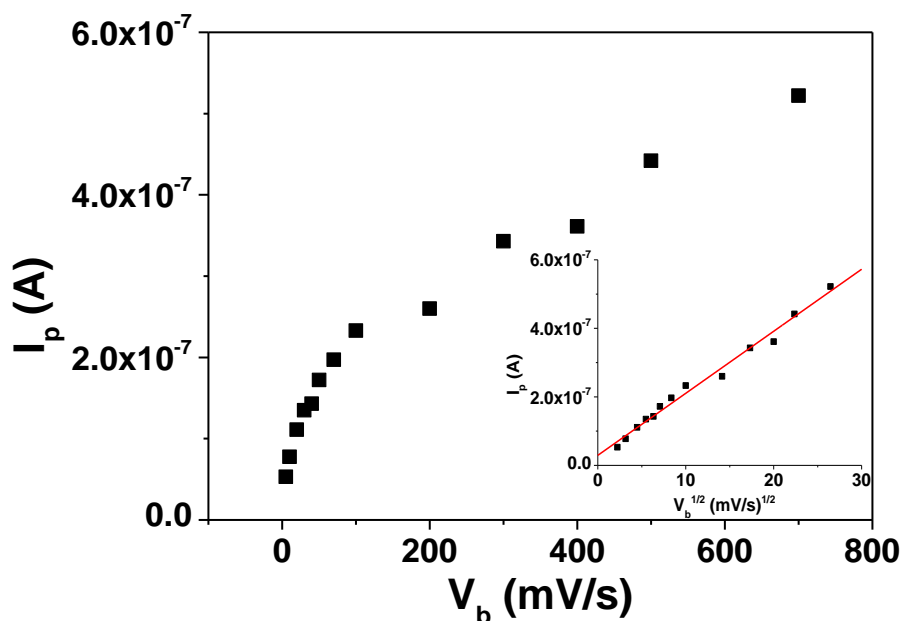


Figura 6.18. Variación de la intensidad de señal del TRP (1.0×10^{-5} M) con la V_b .
Inserto: Cambio de I_p con la $V_b^{1/2}$.

Como se observa, la corriente del TRP aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la V_b según la ecuación I_p (A) = $2.9 \times 10^{-8} + 1.81 \times 10^{-8} V_b^{1/2}$ (mV/s); $r = 0.98$ (figura 6.18). Este cambio con la V_b indica un comportamiento predominantemente difusivo para este analito en el electrodo sin modificar.

Cuando el electrodo se encuentra modificado con Nafion/CB[8] (figura 6.19), la intensidad de señal del TRP aumenta mostrando variaciones no lineales hasta 50 mV/s (inserto de la figura 6.19). A partir de este valor, la intensidad de señal aumenta a medida que lo hace la V_b .

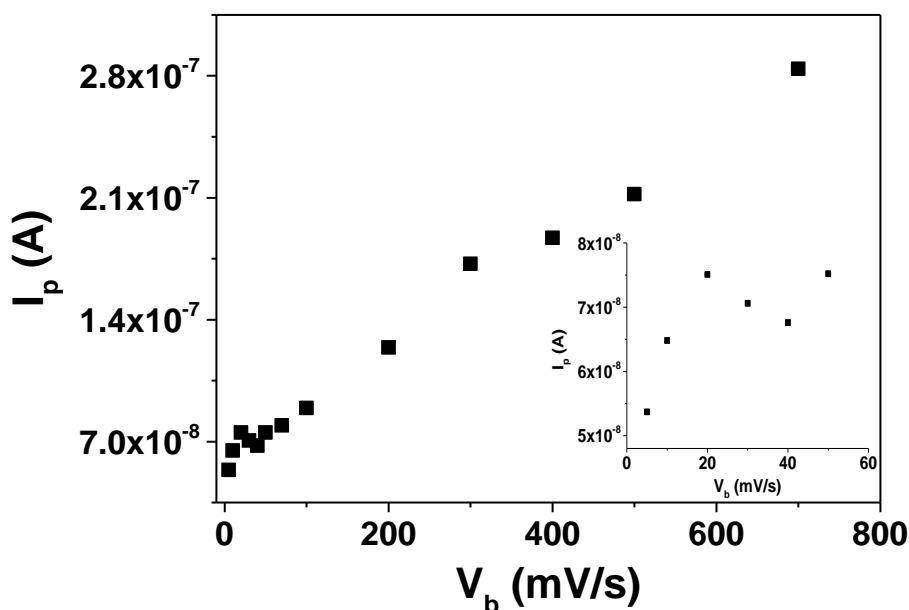


Figura 6.19. Variación de la intensidad de pico de 1.0×10^{-5} M en función de la V_b .
 Inserto: Ampliación de la variación de la intensidad de pico hasta 50 mV/s

Estos resultados se pueden explicar teniendo en cuenta la propiedad de acumular cationes que presenta el Nafion. Esta acumulación se puede observar claramente cuando se barre a valores de V_b menores de 50 mV/s. En todo el intervalo de V_b , la intensidad de pico aumenta en función a la ecuación I_p (A) = $5.9 \times 10^{-8} + 3.2 \times 10^{-10} V_b$ (mV/s); $r = 0.991$. Estos resultados concuerdan con un comportamiento electroquímico predominantemente adsorbtivo del TRP en el electrodo modificado con Nafion/CB[8]. Este comportamiento podría ser de esperar por las propiedades que tiene el polímero modificador y concuerda con los resultados obtenidos para un electrodo modificado con ciclodextrinas y nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 presentado en la bibliografía [33].

Por otra parte se realizaron medidas de EIS utilizando como sonda el propio analito para un electrodo no modificado, modificado con Nafion y modificado con Nafion/CB[8]. En la figura 6.20A se muestran los voltamperogramas diferenciales de impulsos de disoluciones de TRP en cada uno de los electrodos ensayados y los correspondientes diagramas de Nyquist de las mismas disoluciones.

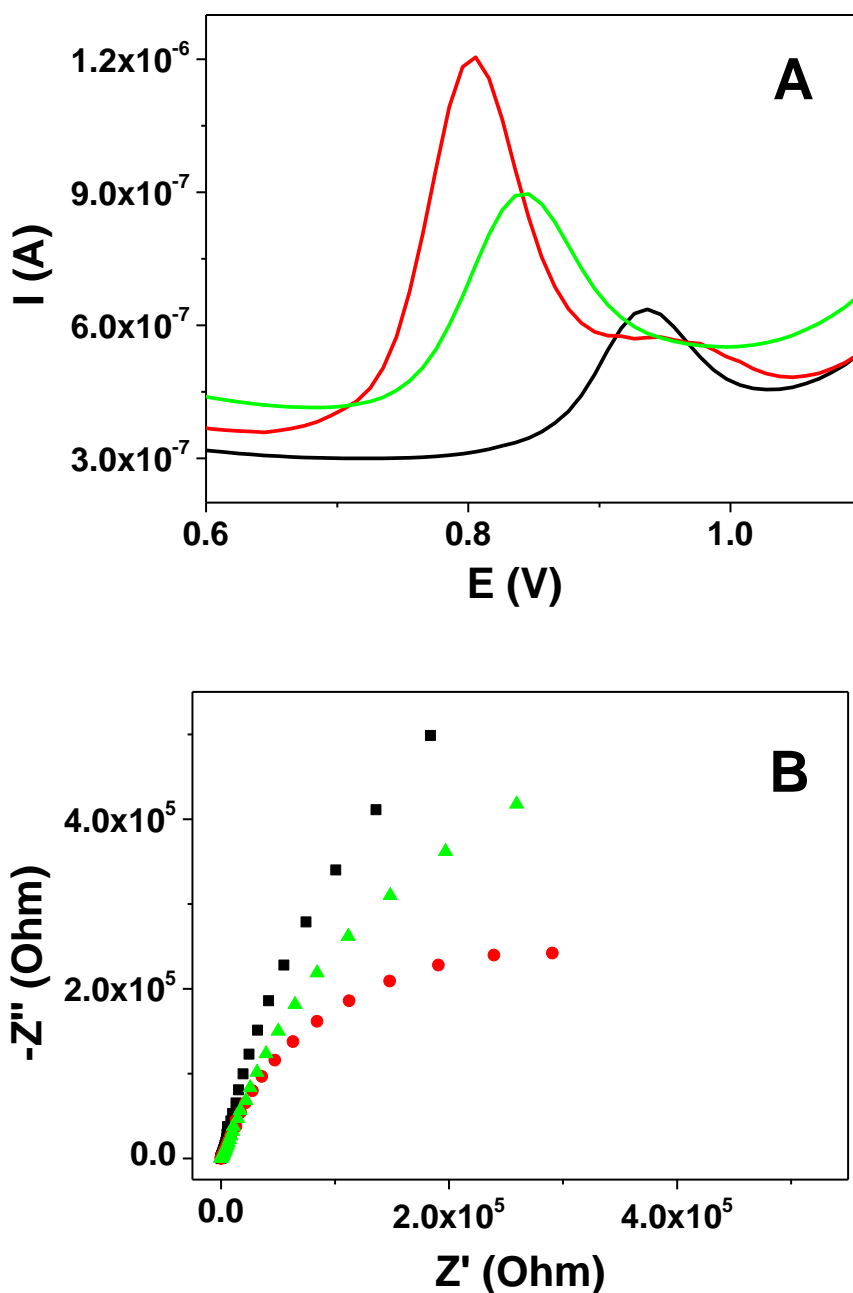


Figura 6.20. A) Voltamperogramas diferenciales de impulsos de TRP (1.0×10^{-3} M) y B) diagramas de Nyquist de TRP en — GCE, — GCE/Nafion y — GCE/Nafion/CB[8].

Como ya se mencionó en su momento, la modificación del electrodo con Nafion hace que la oxidación del TRP se produzca a un potencial menos positivo con una intensidad de señal mayor respecto al electrodo sin modificar. Por otro lado, cuando el CB[8] está presente en la superficie electródica, el potencial de oxidación se desplaza a valores más positivos respecto al modificado sólo con Nafion, disminuyendo también su

intensidad fruto de la formación del complejo. No obstante, con el receptor en la superficie se mantiene un potencial menor respecto al registrado para el electrodo no modificado y también un valor mayor de intensidad de señal.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante medidas de impedancia. El diagrama de Nyquist para un electrodo modificado únicamente con Nafion (figura 6.20B, puntos rojos), muestra un diámetro de semicírculo a altas frecuencias menor que para el electrodo sin modificar, es decir, menor resistencia a la transferencia de carga. En el caso del electrodo modificado con Nafion/CB[8] (figura 6.20B, puntos verdes), el diámetro del semicírculo en el diagrama de Nyquist refleja que el valor de la resistencia a la transferencia de carga es mayor que el correspondiente al electrodo modificado con Nafion, pero menor comparado con el registrado para el electrodo no modificado.

6.4.1.7. Influencia de la concentración en la señal de TRP. Parámetros analíticos.

Bajo las condiciones químicas e instrumentales optimizadas, se evaluó la variación de la respuesta analítica con la concentración de TRP utilizando el sensor desarrollado.

Al monitorizar la respuesta electroquímica del TRP, se observó un incremento lineal de la corriente con la concentración de complejo en un intervalo comprendido entre 2.00×10^{-7} y 4.00×10^{-6} M, ajustándose a la ecuación $I_p \text{ (A)} = (-4 \pm 2) \times 10^{-9} + (13.3 \pm 0.1) \times 10^{-2} [\text{TRP}] \text{ (M)}$, $r = 0.9992$ (figura 6.21).

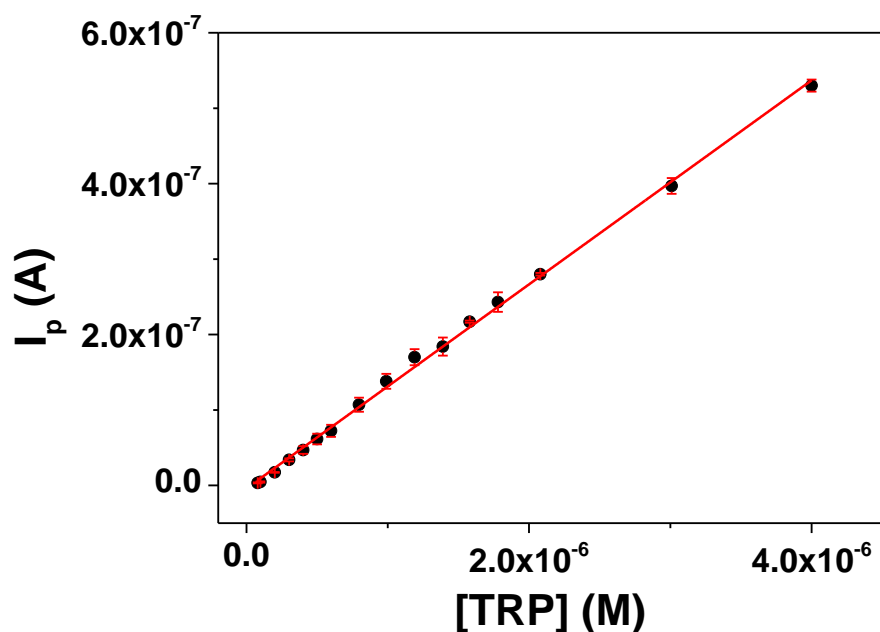


Figura 6.21. Influencia de la corriente con la concentración de TRP con el electrodo GCE/Nafion/CB[8].

A partir de las señales de blanco, se calcularon los valores de LD ($3\sigma/\text{pte}$) y LC ($10\sigma/\text{pte}$) de 1.8×10^{-7} y 6.0×10^{-7} M respectivamente. Respecto a la exactitud y precisión obtenidas, la tabla 6.4 muestra los resultados de Er (%) y D.E.R. (%) obtenidos para diferentes concentraciones, mostrando que el sensor puede ser utilizado con valores adecuados tanto en repetitividad como en reproducibilidad.

Concentración (M)	Er (%)	D.E.R. (n=5) (%) (Reproducibilidad)	Concentración (M)	D.E.R. (n=3) (%) (Repetitividad)
4.50×10^{-7}	7.9	2.7	1.49×10^{-7}	11.0
7.97×10^{-7}	2.7	9.3	6.44×10^{-7}	4.2
9.90×10^{-7}	5.6	7.6	1.14×10^{-6}	0.9
1.19×10^{-6}	5.9	5.9	2.13×10^{-6}	0.8
1.58×10^{-6}	4.2	0.7	3.61×10^{-6}	3.1

Tabla 6.4. Exactitud y precisión del método propuesto a distintas concentraciones dentro del intervalo de respuesta lineal.

En la tabla que se muestra a continuación, se presenta una comparativa de los LD alcanzados con métodos basados en distintas modificaciones y publicados con anterioridad. Comparando el valor de LD obtenido, este método iguala o incluso mejora a los propuestos anteriormente (tabla 6.5). A su vez, algunos de los sensores incluidos en la dicha tabla fueron aplicados a muestras reales, por lo que el sensor de GCE/Nafion/CB[8] presenta propiedades analíticas adecuadas para su posible aplicación en una muestra real.

Electrodo modificado	LD (μM)	Referencia
$\text{Fe}^{3+}\text{Y/ZCME}$	0.24	[6]
FCCa-TiO ₂ MCPE	0.124	[7]
4-ABA/GCE	0.20	[34]
SWCNH/GCE	0.6	[35]
CNF-CPE	0.1	[8]
AuNp/GCE	0.08	[36]
Nafion/TiO ₂ -GR/GCE	0.70	[37]
TiO ₂ -GR/4-ABSA/GCE	0.3	[10]
β -CD-MNPs/GCE	0.50	[33]
GNPs/Pimox	0.7	[12]
ERGO/GCE	0.1	[14]
CB[8]/Nafion/GCE	0.18	Presente trabajo

Tabla 6.5. Comparativa límites de detección con otros sensores distintos de la bibliografía. $\text{Fe}^{3+}\text{Y/ZCME}$: Electrodo de pasta de carbono modificado con zeolita y Fe^{3+} . FCCa-TiO₂MCPE: Ferrocenil ácido carboxílico y partículas de TiO₂ sobre un electrodo de pasta de carbono. 4-ABA: 4-aminobenzoico. SWCNH: Nanocuernos (nanohords) de carbono de capa simple, CNF: nanofibras de carbono, AuNp y GNPs: nanopartículas de oro, GR: grafeno, 4-ABSA: ácido aminobenzosulfónico, MNPs: nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄, Pimox: polimidazol sobreoxidado, ERGO: grafeno electroquímicamente reducido.

6.4.1.8. Evaluación de la selectividad del sensor. Estudio de interferencias.

La evaluación de la selectividad del sensor se realizó mediante el estudio de otros compuestos que pueden alterar la señal electroquímica de TRP, produciendo así interferencia. Los compuestos evaluados fueron los aminoácidos D-fenilalanina (PHE), L-tirosina (TIR), L-cisteína (CIS), arginina (ARG) y lisina (LYS), así como otros

posibles interferentes como acetilcolina (Acol), ácido ascórbico (ASC) y ácido úrico (URI) que pueden estar presentes junto con el TRP en muestras biológicas (figura 6.22).

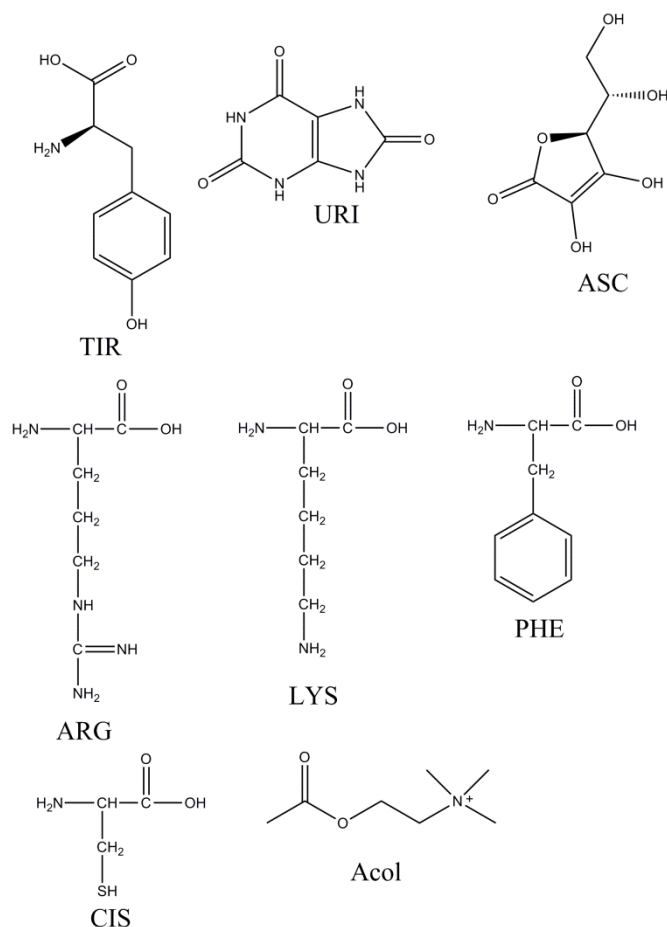


Figura 6.22. Estructura de los diferentes interferentes utilizados en el estudio de la selectividad del sensor.

El estudio se realizó fijando una concentración de TRP de 7.0×10^{-7} M y añadiendo concentraciones crecientes de interferente hasta que se produce un cambio de la señal mayor al mayor valor de E_r obtenido.

Como ya se mencionó en la introducción de este capítulo, Rajgariah y col. mostraron que de los 20 aminoácidos, únicamente tres (PHE, TIR y TRP) formaban complejo con el CB[8]. Por tanto, la evaluación de PHE y TIR como interferentes, cobra especial interés en el caso bajo estudio [21].

Comenzando con el aminoácido TIR, éste presenta una señal de oxidación a 0.9 V, muy cercana a la señal del TRP. Este hecho conlleva a que, aunque su afinidad por el CB[8] sea menor que la del TRP [21], a partir de una concentración de 3.50×10^{-6} M de

interferente en disolución, se puede apreciar un ensanchamiento en la señal que aumenta su intensidad hasta producir interferencia cuando se encuentra a un nivel de concentración de 5 veces mayor que el de TRP (figura 6.23).

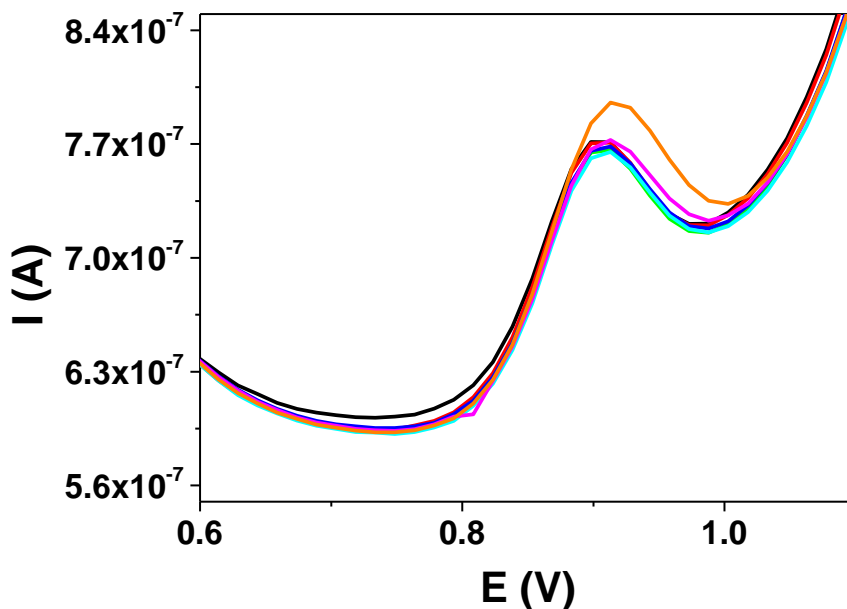


Figura 6.23. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de TRP con concentraciones crecientes de TIR. — TRP, — TRP + [TIR] = 1.75×10^{-7} M, — TRP + [TIR] = 3.50×10^{-7} M, — TRP + [TIR] = 5.25×10^{-7} M, — TRP + [TIR] = 7.00×10^{-7} M, — TRP + [TIR] = 1.40×10^{-6} M y — TRP + [TIR] = 3.50×10^{-6} M.

La PHE es un aminoácido no electroactivo en las condiciones de medida lo que no impide que, a medida que aumenta su concentración en disolución, la intensidad de oxidación de TRP disminuya ligeramente (figura 6.24). Aunque en disolución se ha demostrado que el CB[8] tiene una mayor afinidad por el PHE que por el TRP, no se produce interferencia hasta tener una concentración 10 veces mayor de PHE que de TRP.

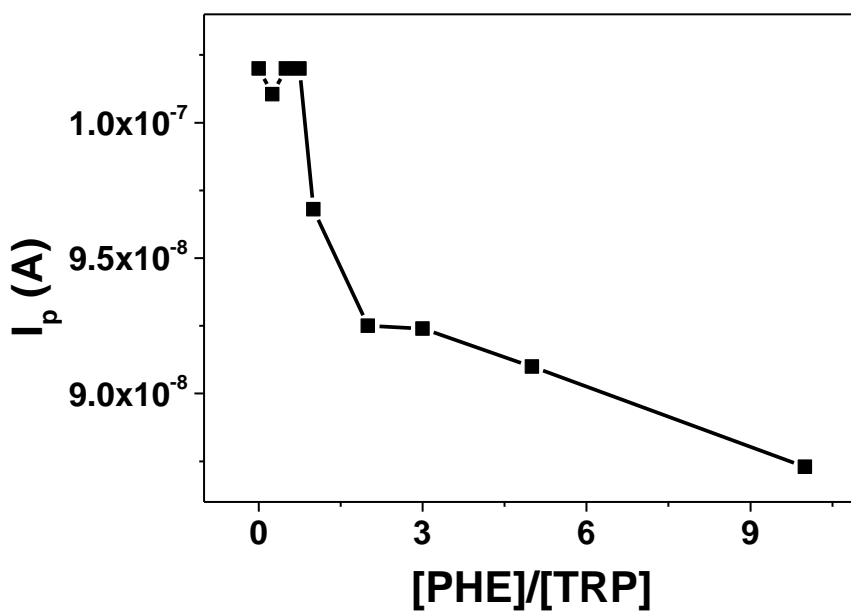


Figura 6.24. Variación de la intensidad de señal de TRP con concentraciones crecientes de PHE.

Resultados similares a éstos fueron obtenidos para el neurotransmisor Acol y los aminoácidos ARG y LYS (figura 6.25).

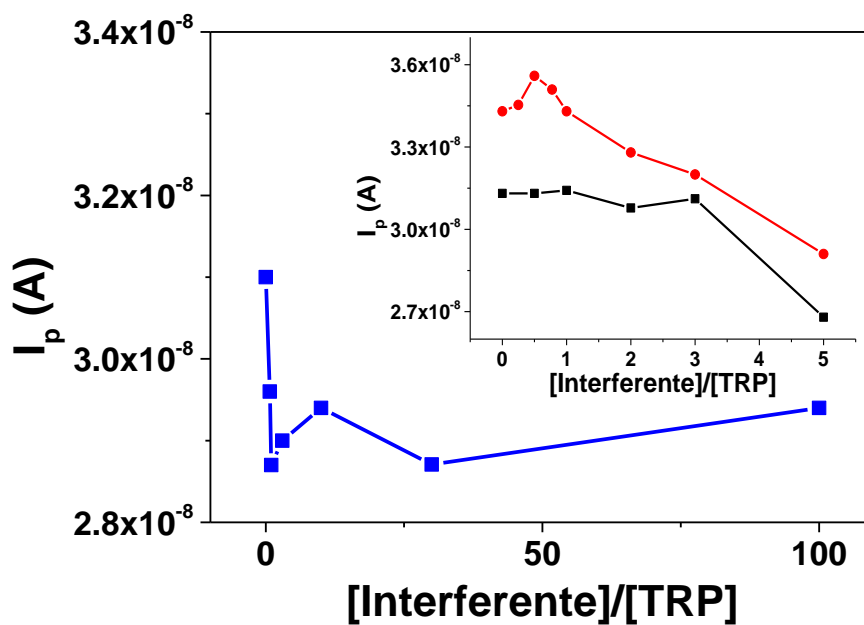


Figura 6.25. Variación de la intensidad de señal de TRP con concentraciones crecientes de interferente: — Acol, — ARG y — LYS.

La figura 6.25 muestra que se necesitan concentraciones 5 veces mayores de Acol y ARG respecto a la del TRP para producir interferencia. Por otro lado, una relación $LYS/TRP = 100$, sólo produce un cambio del 5% en la señal de TRP.

Por último, el aminoácido CIS no es electroactivo en las condiciones de medida del TRP, y produce únicamente un cambio del 0.5% de la intensidad de señal inicial del TRP cuando se encuentra a una concentración 100 veces mayor que éste.

Los resultados obtenidos para los distintos aminoácidos ensayados, concuerdan con los resultados presentados por otros autores, que demostraban la formación del complejo con CB[8] para PHE y TIR [21]. Sin embargo, para el resto de aminoácidos que no forman complejo, se han observado distintos comportamientos. Por un lado, la ARG interfiere en la determinación de TRP posiblemente por la interacción del grupo terminal voluminoso de tres átomos de nitrógeno con los grupos carbonilo de los portales. Por otro lado, los compuestos CIS y LYS no producen interferencia, ni siquiera para en concentraciones 100 veces mayores respecto a las del analito.

Por último se investigó la interferencia que tanto el URI como el ASC pueden producir en la determinación de TRP. En las condiciones experimentales, ambos compuestos son electroactivos dando lugar a ondas de oxidación a 0.55 V y 0.35 V, respectivamente (figura 6.26).

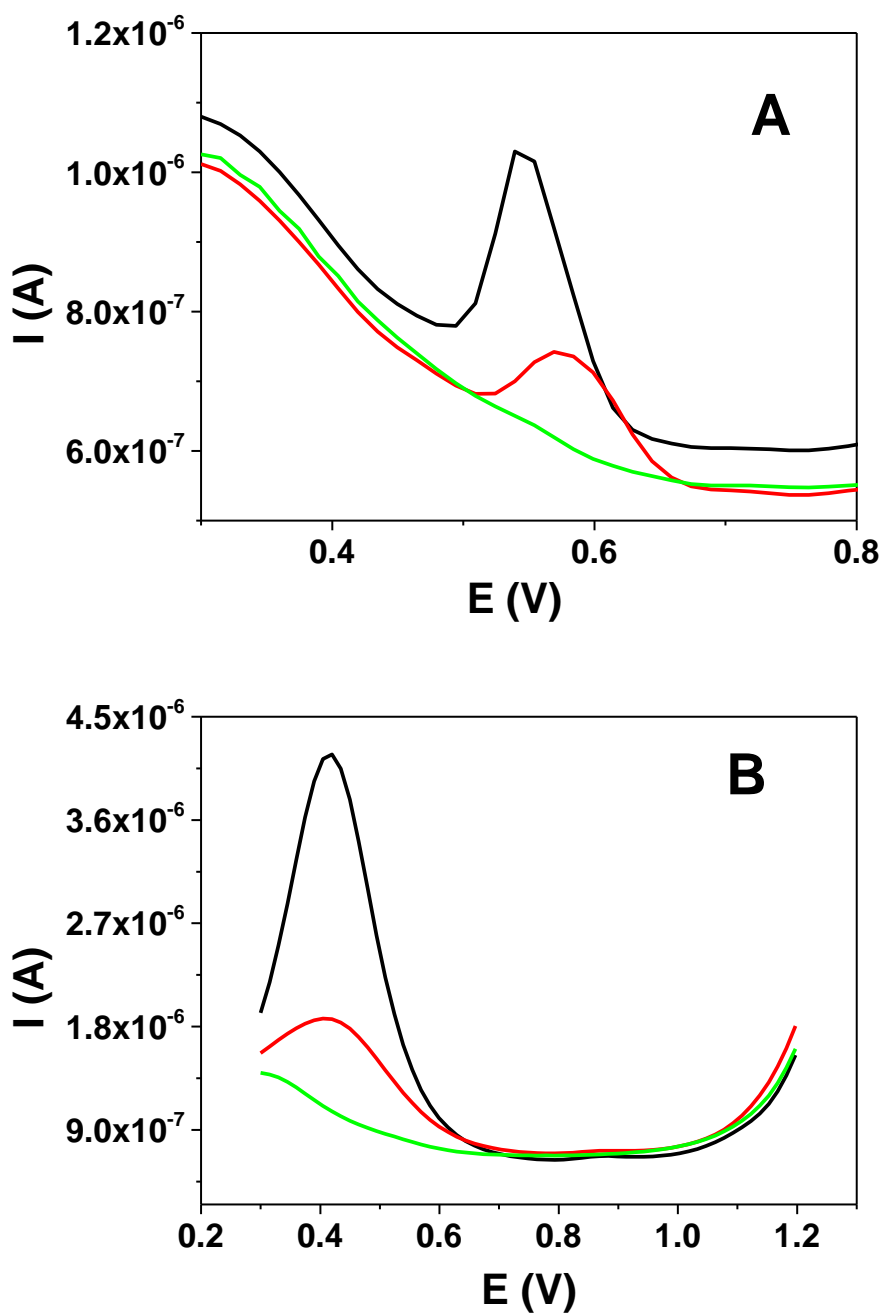


Figura 6.26. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de A) URI y B) ASC para los electrodos: — GCE, — GCE/Nafion y — GCE/Nafion/CB[8].

Como se ve en la figura 6.26, en ambos casos se observa una señal de oxidación cuando el electrodo se encuentra modificado con Nafion, sin embargo, la señal desaparece cuando el receptor se encuentra en la superficie electródica. De esta manera se confirma que la selectividad que presenta el sensor es conseguida gracias a la presencia del CB[8] en la superficie del electrodo.

6.4.1.9. Determinación de TRP en muestras de suero.

Se evaluó el uso del sensor desarrollado para la determinación de TRP en una muestra real de suero sanguíneo.

Para ello, la muestra de sangre se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 10 minutos, separando, posteriormente, el suero con una jeringa. La muestra de suero se dividió en diferentes alícuotas y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

Una alícuota de 5.00 ml de suero se diluyó a 10.00 ml con electrolito soporte y a continuación, 200 μl de la disolución anterior se llevaron a 10.00 ml con electrolito transfiriéndose a la célula de medida. Se realizó una calibración por adición estándar obteniendo una respuesta lineal en un intervalo de concentraciones comprendido entre 2.48×10^{-7} y 2.48×10^{-6} M. Como se muestra en la figura 6.27, la corriente aumenta según la ecuación $I_p \text{ (A)} = (6.1 \pm 0.4) \times 10^{-8} + (12.9 \pm 0.3) \times 10^{-2} [\text{TRP}]_{\text{añadida}} \text{ (M)}$; $r = 0.997$. La concentración de TRP encontrada en la muestra fue de $(46.8 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ M, lo que demuestra que el sensor permite obtener resultados con alta reproducibilidad.

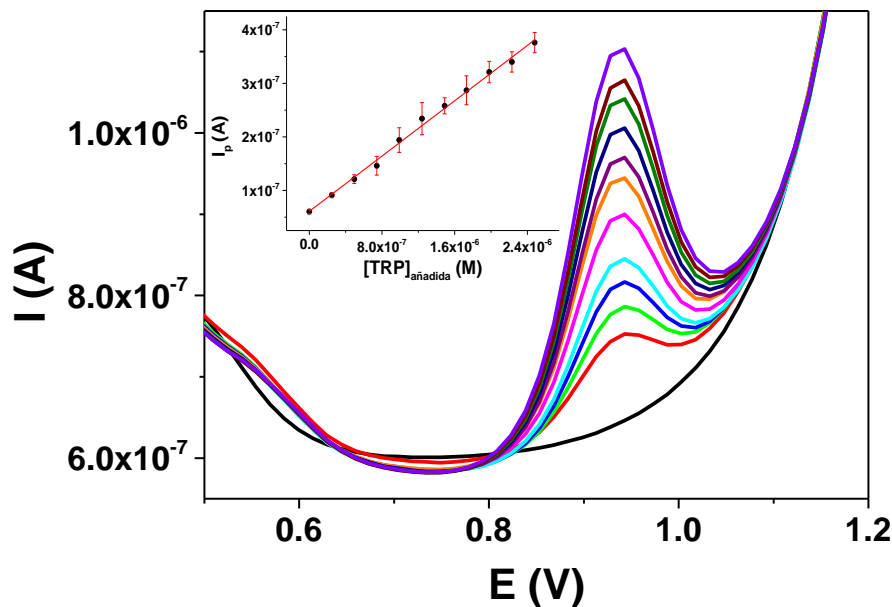


Figura 6.27. Determinación de la concentración de TRP en la muestra de suero por adición estándar. — Electrolito soporte, — Muestra, — [TRP] = 0.25 μM , — [TRP] = 0.50 μM , — [TRP] = 0.74 μM , — [TRP] = 0.99 μM , — [TRP] = 1.24 μM , — [TRP] = 1.49 μM , — [TRP] = 1.73 μM , — [TRP] = 1.98 μM , — [TRP] = 2.23 μM y — [TRP] = 2.48 μM . Inserto: Influencia de la I_p con la concentración de $[\text{TRP}]_{\text{añadida}}$.

La tabla 6.6 muestra las recuperaciones obtenidas a las distintas concentraciones de TRP ensayadas.

[TRP]_{añadida} (M)	[TRP]_{encontrada} (M)	Recuperación (%)	D.E.R. (%) (n = 3)
2.48×10^{-7}	2.34×10^{-7}	94	5.0
4.95×10^{-7}	4.67×10^{-7}	94	8.8
9.90×10^{-7}	1.03×10^{-6}	104	11.9
1.49×10^{-6}	1.53×10^{-6}	103	5.8
1.98×10^{-6}	2.02×10^{-6}	102	6.2
2.48×10^{-6}	2.44×10^{-6}	98	5.0

Tabla 6.6. Valores de recuperación y de reproducibilidad obtenidos para las distintas concentraciones de TRP.

Los valores recogidos en la tabla anterior demuestran que el sensor de TRP presenta muy buenas recuperaciones y valores de D.E.R. (%) incluso trabajando con una muestra real. Los resultados obtenidos son comparables a los recogidos para otros métodos en la bibliografía [1, 3, 4, 10, 12, 38]. Por otra parte, la concentración de TRP hallada en la muestra, concuerda con los resultados obtenidos por otros autores para muestras correspondientes a pacientes sanos [3, 4].

6.4.2. Evaluación de la modificación del electrodo con CB[8] para la determinación de DOP empleando análisis por inyección en flujo (FIA).

6.4.2.1. *Estudio de la interacción de CB[8]-DOP en disolución.*

Como se comentó en la introducción, la información existente de la interacción de CB[n]s con DOP es escasa. Por lo tanto, con el objetivo de confirmar la interacción supramolecular entre ellos se llevó a cabo el estudio de la formación del complejo CB[8]-DOP en disolución, tanto electroquímicamente como mediante modelización molecular, experimentos de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN) y espectrometría de masas.

En primer lugar se registraron los voltamperogramas diferenciales de impulsos de DOP con concentraciones crecientes de CB[8]. Como se observa en la figura 6.28, la disminución de la corriente y el desplazamiento del potencial de pico hacia valores más positivos (~ 45 mV) permiten afirmar que existe interacción entre ambos compuestos.

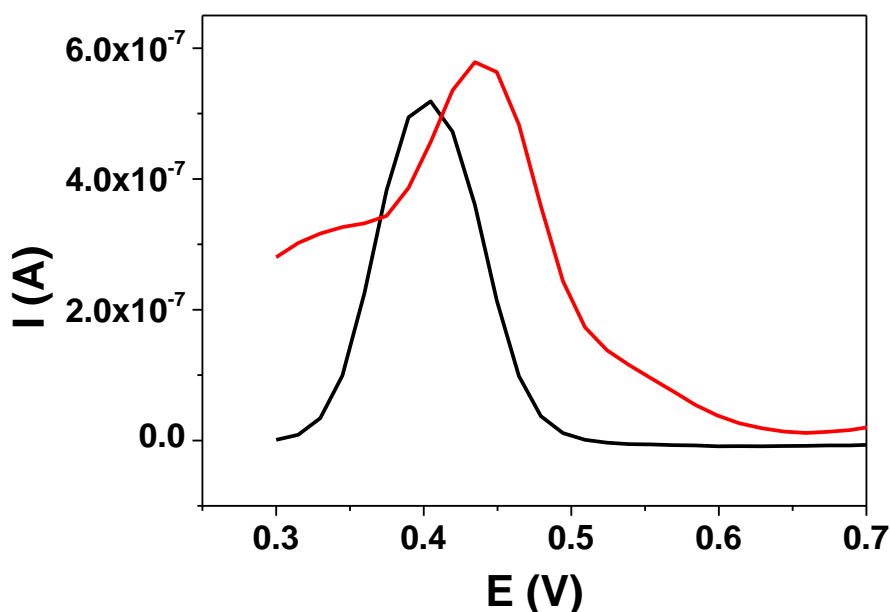


Figura 6.28. A) Voltamperogramas diferenciales de impulsos de DOP (3.0×10^{-6} M) con concentraciones crecientes de CB[8]. — DOP, — DOP + [CB[8]] = 1.5×10^{-5} M.

El estudio de los modelos moleculares de los complejos 1:1 y 1:2 CB[8]-DOP indican la posibilidad de la inclusión de dos moléculas de DOP en la cavidad de un CB[8] (figura 6.29).

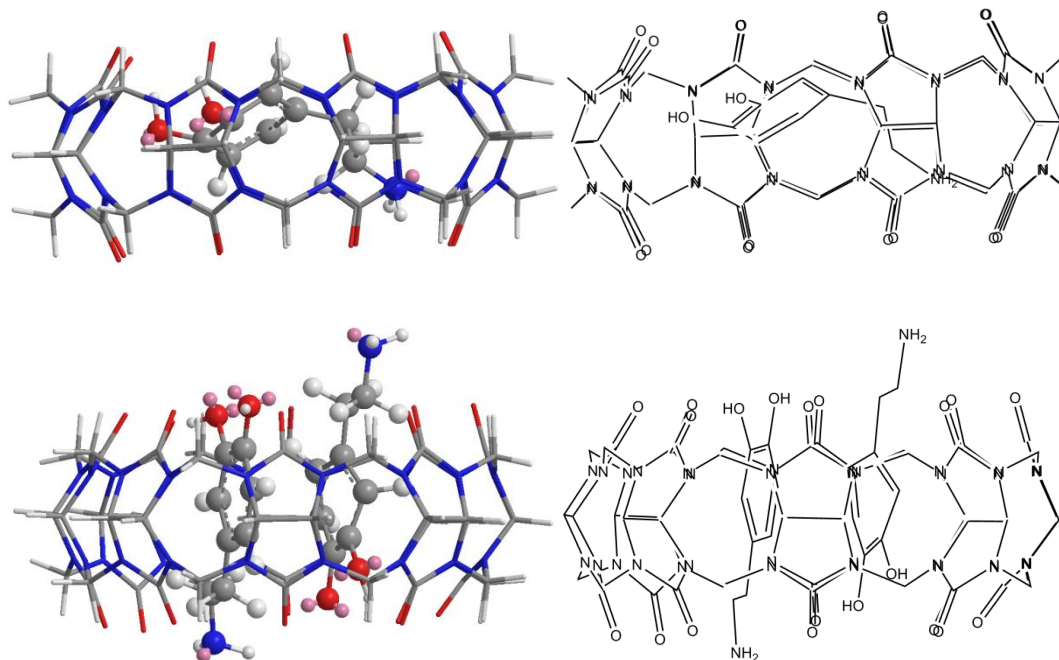


Figura 6.29. Estructura de modelos moleculares para mínima energía (MM2) de 1:1 y 1:2 de CB[8]-DOP.

En el modelo estudiado del complejo CB[8]-DOP (1:1) toda la molécula de DOP quedaría dentro del CB[8]. La inclusión de una segunda molécula de DOP requiere una reorganización molecular de manera que sólo los grupos -NH_2 y -OH queden fuera de la cavidad del CB[8].

Posteriormente se realizó el estudio de ^1H -RMN en D_2O de distintas disoluciones de DOP, CB[8] y DOP con concentraciones crecientes de receptor.

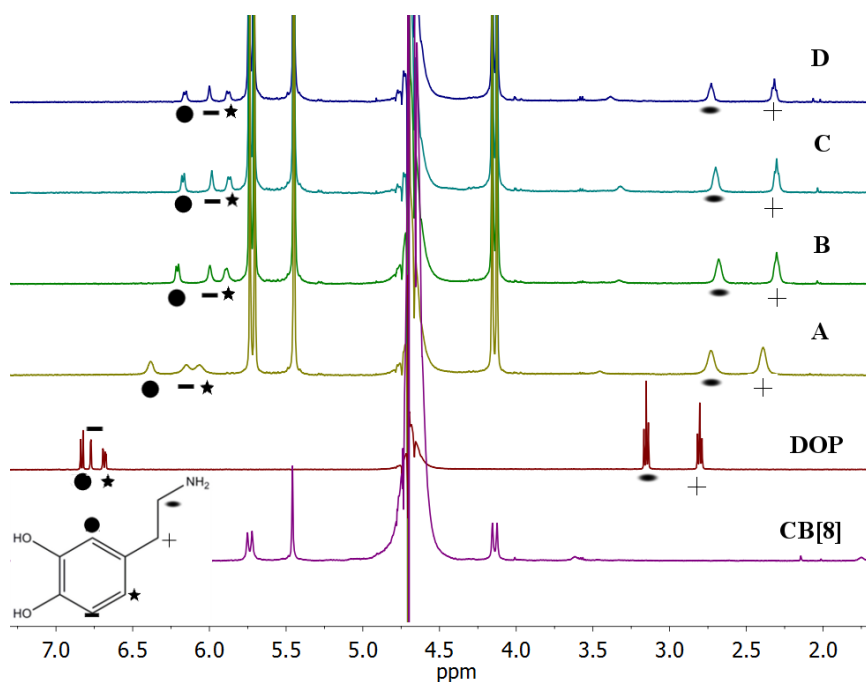


Figura 6.30. Espectros de ^1H RMN registrados para DOP, CB[8] y DOP con diferentes proporciones de CB[8]. A) DOP + CB[8] $_{x=0.5}$, B) DOP + CB[8] $_{x=1}$, C) DOP + CB[8] $_{x=1.5}$, D) DOP + CB[8] $_{x=2}$.

La figura 6.30 muestra como las señales de todos los protones, alifáticos (2.6 y 3.2 ppm) y aromáticos (6.6 - 6.9 ppm) de la DOP, se desplazan a campo alto cuando el CB[8] se encuentra en disolución. Estos $\Delta\delta$, entre 0.43 y 0.50 ppm para los protones alifáticos, y de 0.68 y 0.81 ppm para los protones aromáticos, confirman la formación del complejo de forma que toda la molécula de DOP quedaría incluida en la cavidad del CB[8]. Este resultado estaría en concordancia con el modelo molecular CB[8]-DOP (1:1) de la figura 6.28.

Por otra parte, en el espectro A de ^1H -RMN correspondiente a una proporción DOP/CB[8] 2:1, no se observan señales de DOP libre (2.8 y 3.2 ppm), lo que parece indicar la formación de un complejo de estequiometría 1:2 CB[8]-DOP puesto que todos los protones de la DOP detectables en las condiciones del experimento ($-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ no serían detectables), quedan dentro de la cavidad del CB[8].

En el espectro de MALDI-TOF (figura 6.31) registrado, la señal de máxima intensidad aparece a un valor de m/z de 1482.5 correspondiente al complejo $[\text{CB}[8]\text{-DOP}]^+$. En el espectro también se detecta la señal del analito libre ($m/z = 154$), sin embargo, en ningún caso se detectó la señal correspondiente al complejo 1:2 CB[8]-DOP.

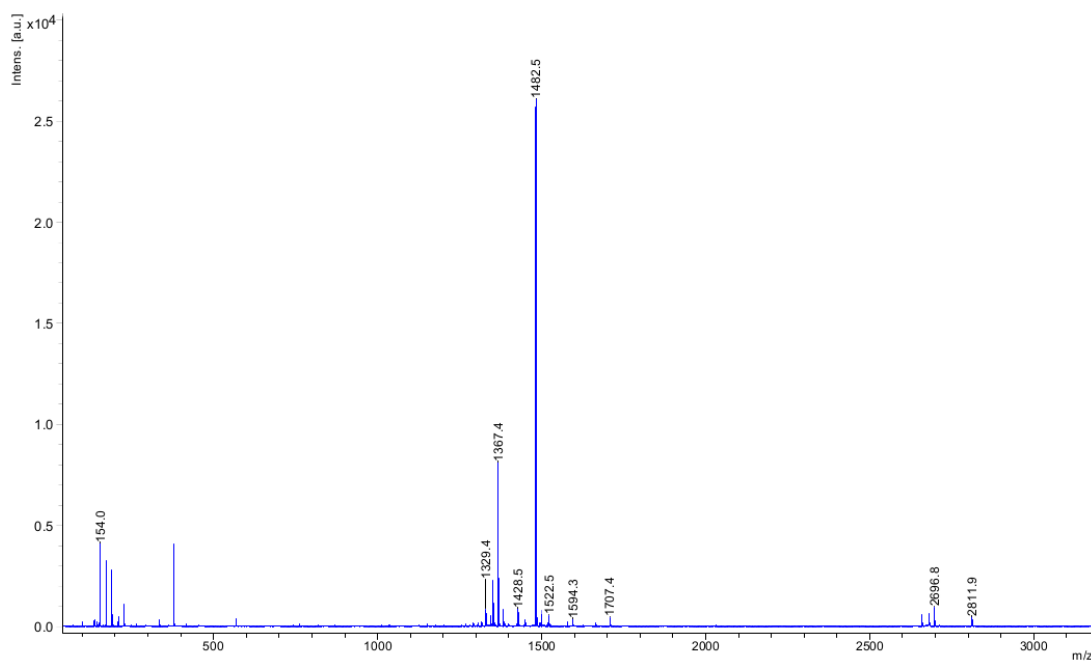


Figura 6.31. Espectro de MALDI-TOF de CB[8]-DOP.

6.4.2.2. Respuesta electroquímica de DOP con los electrodos modificados con CB[8]. Medidas en régimen estático.

Una vez comprobada la formación del complejo de inclusión entre el CB[8] y la DOP, se estudió su comportamiento electroquímico utilizando cada una de las modificaciones ensayadas en el capítulo anterior: Nafion/CB[8], PVC/CB[8] y membrana de diálisis/CB[8].

La figura 6.32 muestra los resultados obtenidos al trabajar con Nafion.

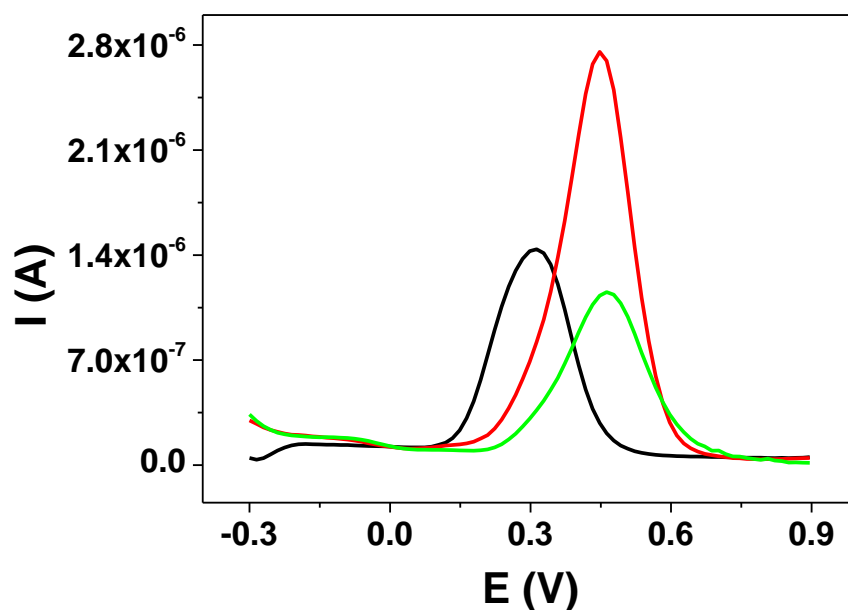


Figura 6.32. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de DOP (5.0×10^{-5} M) en:
— GCE, — GCE/Nafion y — GCE/Nafion + 0.5% CB[8]. NaCl 0.1 M.

Se observa que cuando la superficie se encuentra modificada solamente con Nafion, se produce un aumento en la intensidad de pico fruto de la propiedad de acumulación de cargas positivas que tiene este polímero (figura 6.32A, línea roja). Por otro lado, cuando el CB[8] se encuentra en la superficie, se produce una disminución de la corriente respecto a la correspondiente al electrodo modificado con Nafion, lo que podría atribuirse a la formación del complejo CB[8]-DOP.

En el caso de utilizar PVC o la membrana de diálisis como soportes para la inmovilización del CB[8] (figura 6.33A y B, líneas rojas), se observa que, al igual que en ocasiones anteriores, la modificación de la superficie con el soporte impide la llegada del analito al electrodo provocando una disminución brusca de la corriente y un desplazamiento del potencial a valores más positivos.

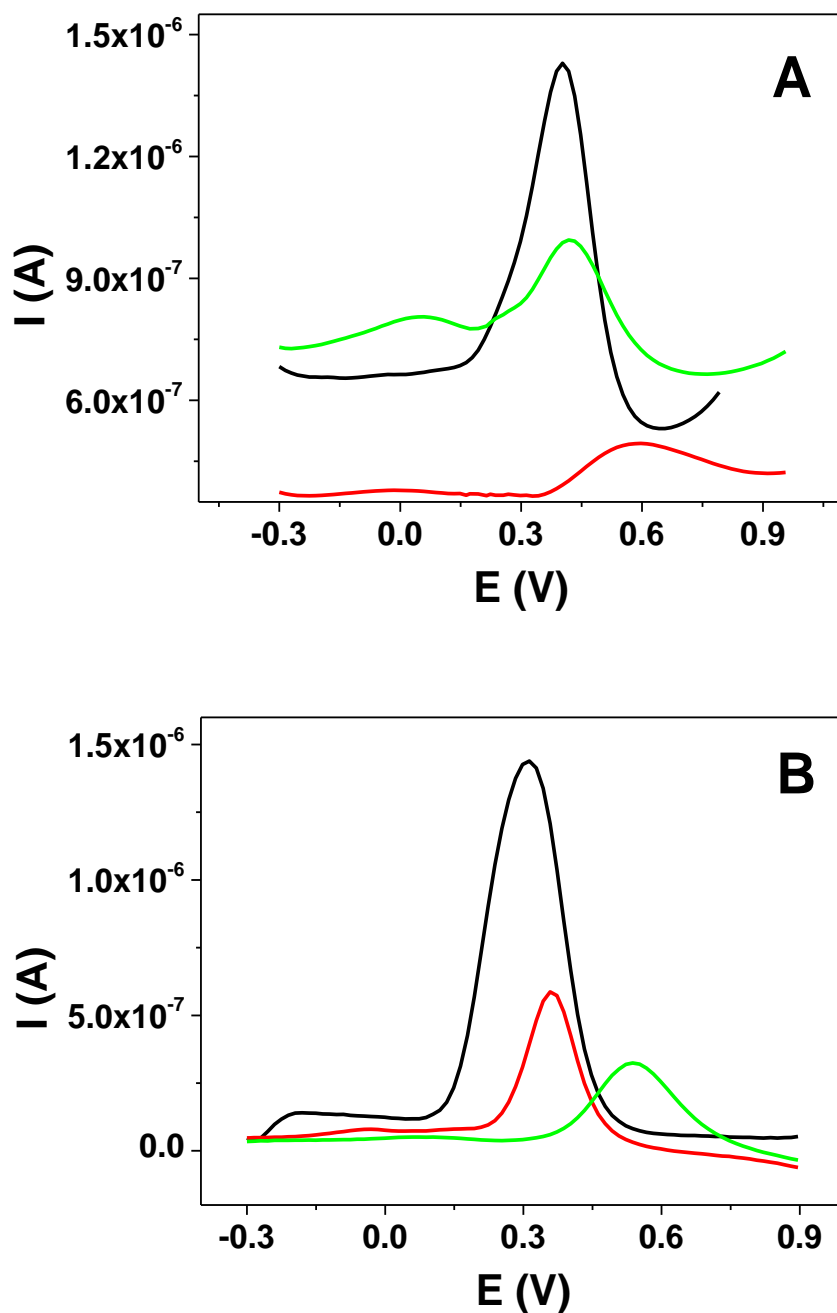


Figura 6.33. Voltamperogramas diferenciales de impulsos de DOP (5.0×10^{-5} M) en los electrodos modificados empleando A) PVC y B) membrana de diálisis como soporte.

— GCE, — GCE/soporte y — GCE/soporte + 0.5% CB[8]. 0.1M NaCl.

Sin embargo, la presencia del receptor en la superficie del electrodo provoca un comportamiento diferente para cada soporte. En el caso de la modificación de PVC/CB[8] (figura 6.33A), la presencia de CB[8] en la superficie produce una

recuperación de la intensidad y del potencial de pico, fruto de la formación del complejo CB[8]-DOP en la superficie electródica.

Por otro lado, cuando el receptor se encuentra inmovilizado con la membrana de diálisis, además de la disminución de la corriente, se produce un desplazamiento en el potencial de oxidación hacia valores más altos, consecuencia de la formación del complejo de inclusión CB[8]-DOP. Al igual que ocurría con las sondas del capítulo 5, este comportamiento es más parecido a lo que ocurre cuando el complejo se forma en disolución.

6.4.2.3. Sistema hidrodinámico. Optimización de las variables en FIA.

Tras comprobar la formación del complejo CB[8]-DOP en la superficie de los electrodos modificados con CB[8], se procedió al estudio de su comportamiento en sistemas hidrodinámicos optimizando las variables que afectan a la señal analítica en sistemas FIA: la altura de la señal y tiempo durante el cual aparece la señal, siendo este último determinante para la frecuencia de análisis conseguida.

Para la optimización de los parámetros hidrodinámicos se eligieron como condiciones iniciales una velocidad de flujo o caudal (q) de 3 ml/min, un volumen de inyección (V_i) de 75 μ l y un reactor de 30 cm de largo con un diámetro interno de 0.5 mm.

- Elección del potencial y pH de detección. Curvas hidrodinámicas I-E.

Con el fin de seleccionar las condiciones óptimas para la detección de DOP en el sistema en continuo, se comenzó con el estudio de las curvas intensidad-potencial a distintos valores de pH.

Como ya se ha mencionado en repetidas ocasiones en el transcurso de esta memoria, la elección del pH para la detección del analito mediante la formación del complejo con CB[n]s, es una variable importante debido a la carga que pueden presentar los compuestos a diferentes valores de pH, y por lo tanto la diferente interacción que presentarán con el CB[n]. Como se muestra en la figura 6.34, la dopamina presenta distintos valores de pKa.

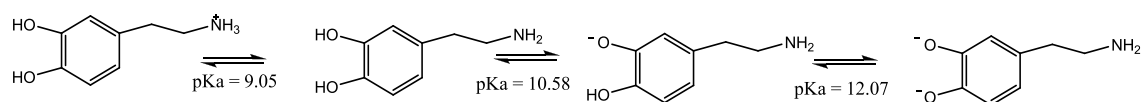


Figura 6.34. Estructuras de la DOP en función del pH.

A valores de pH menores de 9, el analito se encuentra cargado positivamente, lo que permitiría la estabilización del complejo formado mediante la interacción de la amina cargada de la DOP con los grupos carbonilo de los portales del CB[8]. Por tanto, los valores de pH seleccionados para realizar este estudio fueron 2.0, 7.0 y 4.0, utilizando, para tal fin, disoluciones portadoras de tampón fosfórico/fosfato y tampón acético/acetato, respectivamente.

La figura 6.35 presenta las curvas hidrodinámicas I-E obtenidas para el electrodo modificado con Nafion/CB[8] en función del pH del portador.

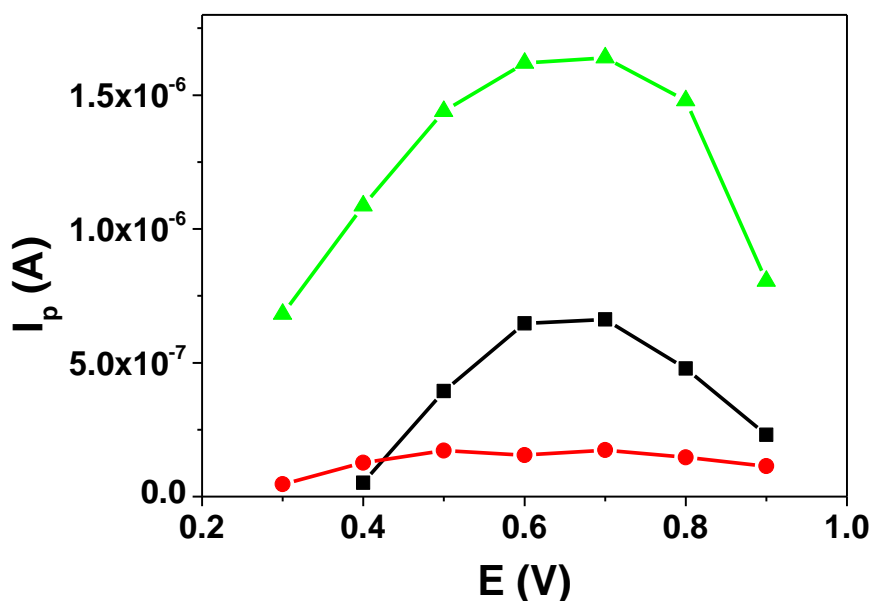


Figura 6.35. Curvas hidrodinámicas I-E de disoluciones de 5.0×10^{-5} M de DOP. Electrodo modificado con Nafion/CB[8]. [Portador] = 0.01 M. — pH = 2.0, — pH = 4.0, — pH = 7.0.

Las curvas hidrodinámicas de la figura anterior muestran que, para los valores de pH estudiados, se registran señales de oxidación a valores de potencial entre 0.3 y 0.9 V, obteniendo mayores intensidades de señal para el pH 7.0 en todo el intervalo de

potencial. El máximo de intensidad se registra a potenciales 0.6 y 0.7 V, por lo tanto, se eligió tampón fosfato pH 7.0 como portador y un potencial de 0.6 V como compromiso entre sensibilidad y selectividad de la medida, debido a que menores potenciales conllevan una detección más selectiva.

Los resultados obtenidos al trabajar con el electrodo GCE/PVC/CB[8] para los distintos valores de pH ensayados, se muestran en la figura 6.36.

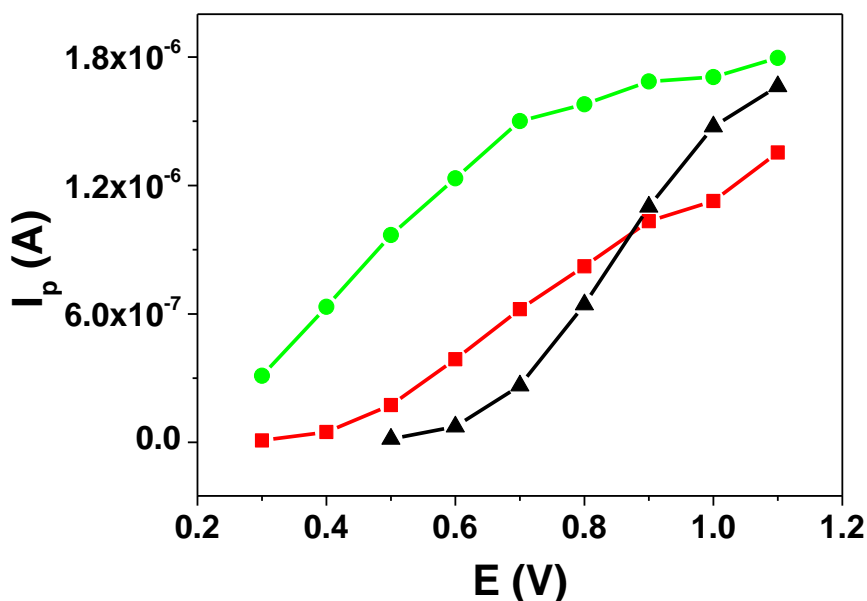


Figura 6.36. Curvas hidrodinámicas I-E obtenidas para DOP (5.0×10^{-5} M) con el electrodo modificado con PVC/CB[8]. [Portador] = 0.01 M. — pH = 2.0, — pH = 4.0, — pH = 7.0.

A la vista de los resultados, al igual que en el caso de la modificación con Nafion/CB[8], la señal de oxidación del complejo CB[8]-DOP, es detectable a partir de un valor de potencial del 0.3 V, obteniéndose la mayor intensidad de señal analítica para pH = 7.0. Considerando que el aumento de la intensidad de señal entre los valores 0.7 y 1.0 V no es muy significativa, se escogió 0.7 V como potencial de trabajo, como compromiso de una detección más selectiva y fijándose un valor de pH = 7.0 para el portador.

Por último, se realizó el estudio con la membrana de diálisis como soporte para la inmovilización de CB[8]. Si bien la modificación de membrana de diálisis/CB[8] ofrece muy buenos resultados en estático, al realizar el estudio en FIA y con las mismas

condiciones instrumentales que para las modificaciones anteriores, se produjo una gran disminución de la relación señal-ruido. Como ejemplo, en la figura 6.37 se muestran los fiagramas correspondientes a la modificación con la membrana de diálisis/CB[8] y su comparativa con los registrados utilizando Nafion en iguales condiciones.

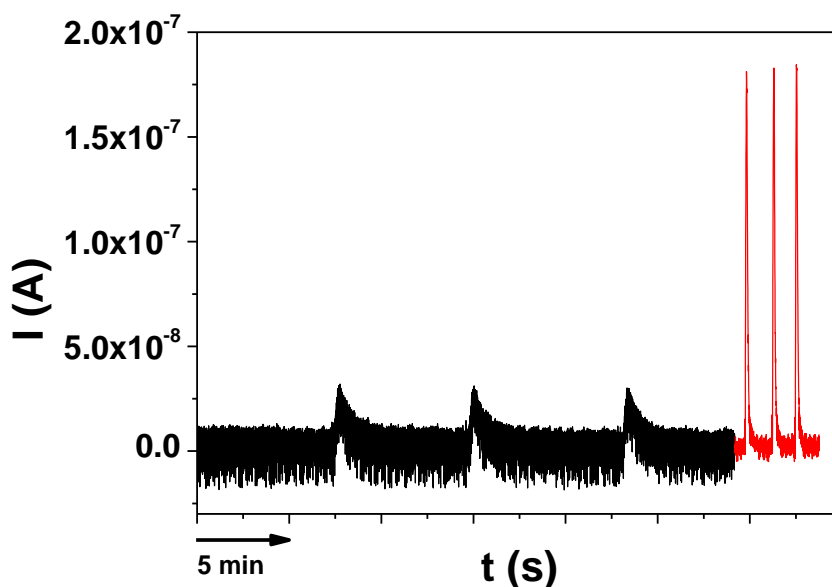


Figura 6.37. Fiagramas obtenidos para DOP (5.0×10^{-6} M) empleando un electrodo modificado con: — membrana de diálisis/CB[8] y — Nafion/CB[8].

A la vista de los resultados, se desestimó el uso de la membrana para la modificación del electrodo en FIA, continuándose el resto de estudios con el electrodo modificado bien con Nafion/CB[8] o bien con PVC/CB[8].

- Estudio de la concentración del portador

Como ya se demostró en la primera parte de este capítulo, la concentración de sales en el medio de medida puede influir en la intensidad de señal de manera diferente cuando el CB[8] está en la superficie electródica, a cuando el complejo se produce en disolución.

Para la realización del estudio del electrolito, se varió la concentración del portador entre 0.01 y 0.20 M, registrándose los fiagramas correspondientes para cada uno de los electrodos modificados. En ambos casos se utilizó como portador tampón fosfato a pH

= 7.0 y se utilizó como potencial de detección 0.6 V al trabajar con el electrodo GCE/Nafion/CB[8] y 0.7 V en el caso del GCE/PVC/CB[8].

La influencia de la concentración de portador en la respuesta electroquímica en el sistema hidrodinámico, no presenta un efecto tan claro como en los estudios realizados en estático. Esto se podría deber a que, al realizar las medidas en flujo, el tiempo de contacto con la superficie modificada es menor y el efecto de lavado por el portador hace que la acumulación por parte de la modificación se produzca en menor medida.

Para el electrodo modificado con Nafion/CB[8] (figura 6.38), se observa un ligero aumento de la intensidad de oxidación con la concentración de portador hasta un valor de éste de 0.05 M, a partir del cual, la señal permanece prácticamente constante.

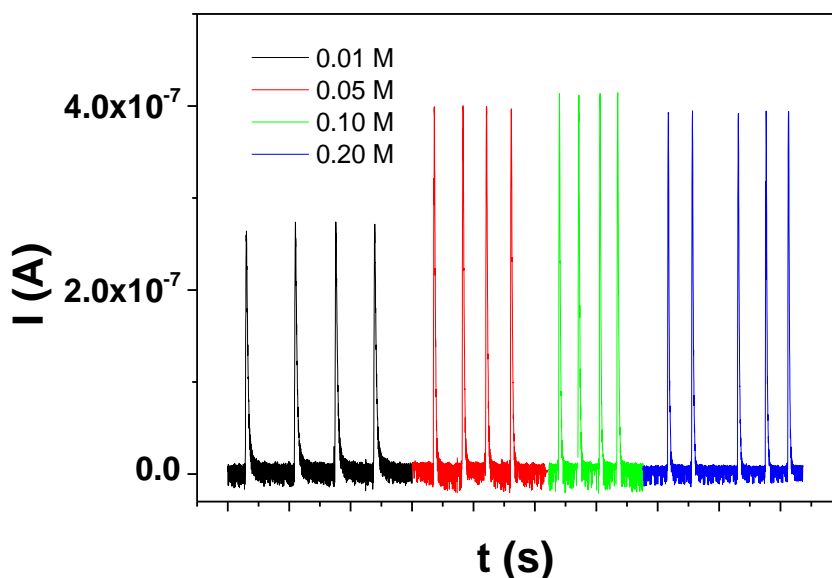


Figura 6.38. Diagramas registrados para la DOP (5.0×10^{-5} M) en función de la concentración de electrolito.

En el caso de la modificación del electrodo con PVC/CB[8], se produce el efecto contrario. Según aumenta la concentración del tampón fosfato, disminuye la intensidad de oxidación de la DOP (figura 6.39).

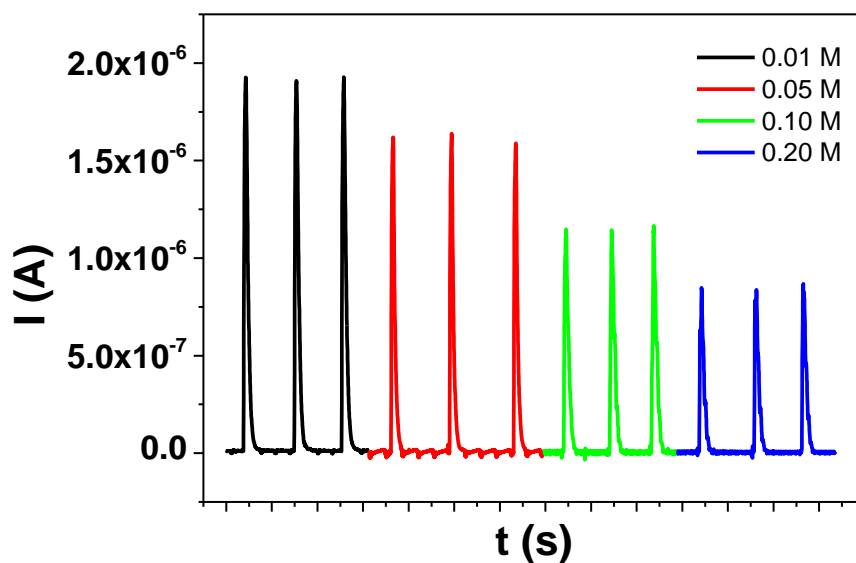


Figura 6.39. Diagramas registrados para la DOP (5.0×10^{-5} M) obtenidos al variar la concentración de electrolito.

Como consecuencia, para continuar con el resto de estudios, se eligieron concentraciones de portador de 0.05 M y 0.01 M para el electrodo GCE/Nafion/CB[8] y GCE/PVC/CB[8], respectivamente.

Una vez optimizadas las variables químicas, y con el objetivo de obtener la máxima intensidad de señal que permita determinar el analito a bajos niveles de concentración, se llevó a cabo la optimización de las variables hidrodinámicas: caudal (Q) y volumen de inyección (V_i).

- Factores hidrodinámicos: caudal.

Se llevó a cabo el estudio variando el q entre 1.0 y 5.0 ml/min, manteniendo constante el V_i en un valor de 75 μ l y el resto de variables en los valores optimizados hasta el momento.

La figura 6.40 muestra los cambios en los diagramas de DOP para el electrodo modificado con Nafion/CB[8].

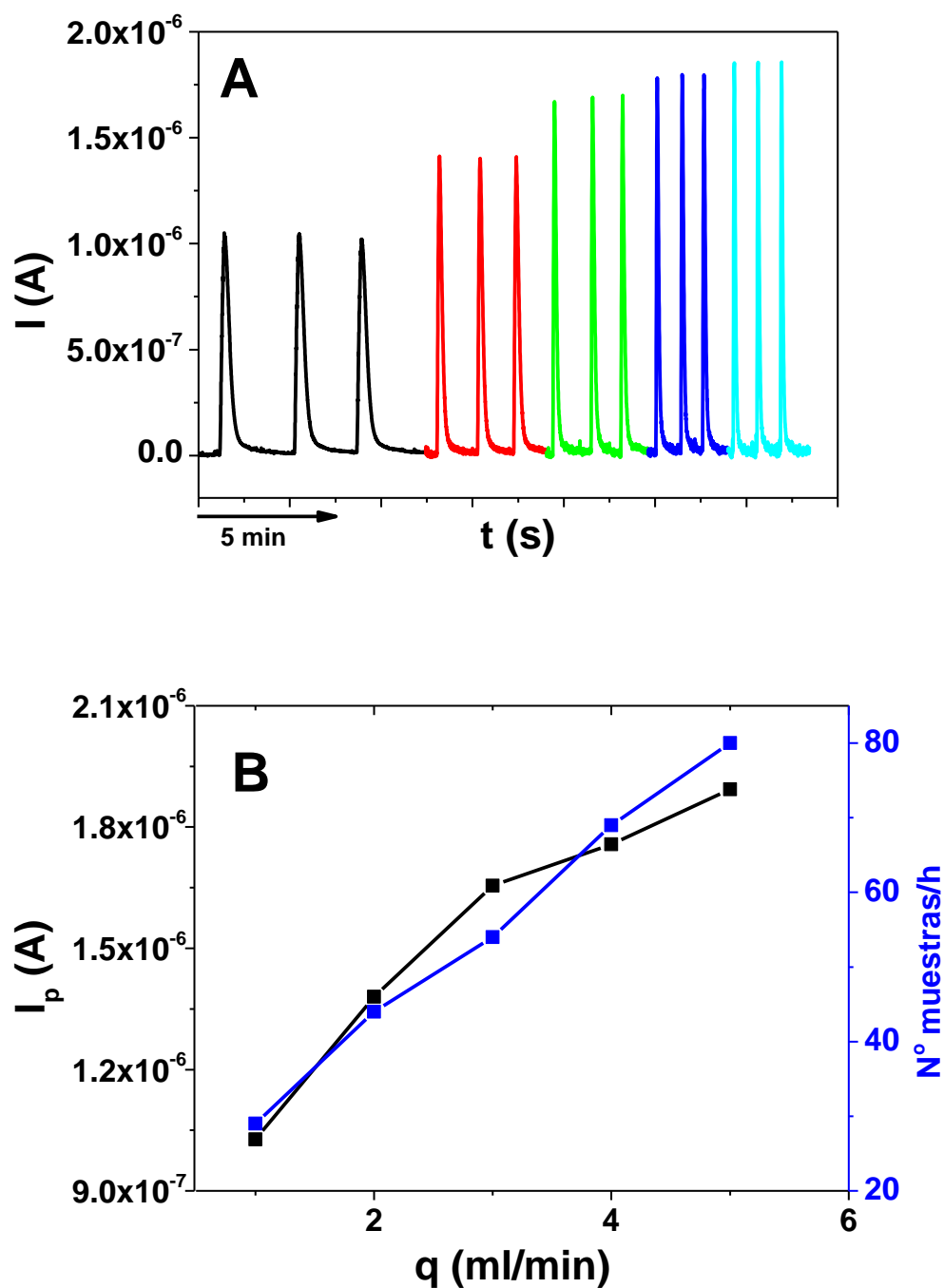


Figura 6.40. A) Diagramas de DOP (5.0×10^{-6} M) obtenidos al variar el q para GCE/Nafion/CB[8]. B) Variación de la intensidad de oxidación y la frecuencia de muestreo con el q . — $q = 1.0$ ml/min, — $q = 2.0$ ml/min, — $q = 3.0$ ml/min, — $q = 4.0$ ml/min y — $q = 5.0$ ml/min.

Los diagramas que, como ejemplo, se recogen en la figura 6.40A, muestran que la intensidad de oxidación de DOP aumenta con el q a la vez que se produce una disminución del tiempo de retorno y, por tanto, una disminución de la anchura de pico.

Este hecho conduce, como consecuencia, a un aumento en la frecuencia de muestreo de hasta 80 muestras/hora (figura 6.40B). Por lo tanto, se fijó un valor de q de 5 ml/min para el resto de estudios con este electrodo.

Como cabría esperar, los resultados obtenidos al trabajar con PVC fueron similares a los observados en el caso anterior. De nuevo, el aumento de q va acompañado de un aumento en la intensidad de oxidación junto con una disminución de la anchura de la señal, lo que se traduce en una mayor frecuencia de muestreo (figura 6.41).

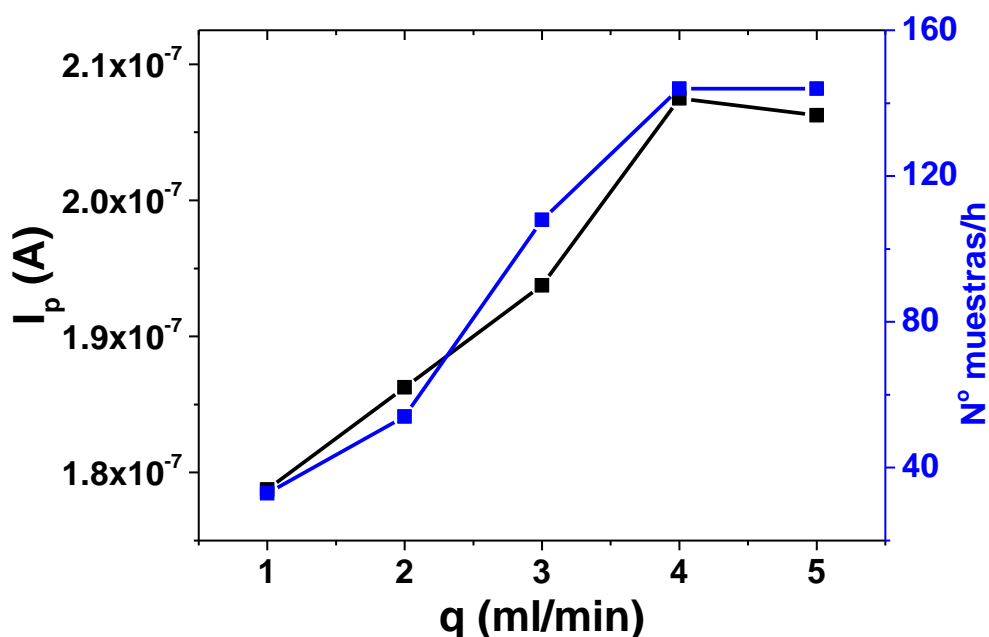


Figura 6.41. Variación de la intensidad de oxidación y de la frecuencia de muestreo de la DOP (5.0×10^{-6} M) con la variación del q para GCE/PVC/CB[8].

En este caso, un valor de q de 4.0 ml/min fue elegido como óptimo permitiendo una frecuencia de muestreo de 144 muestras/h, valor mayor que el obtenido para el caso del GCE/Nafion/CB[8] (80 muestras/h).

- Factores hidrodinámicos: volumen de inyección (V_i).

Una vez optimizada la velocidad de flujo, se procedió a la optimización del volumen de muestra inyectada en el sistema, monitorizando el cambio en la intensidad de oxidación. Se ensayaron volúmenes de inyección entre 25 y 2500 μ l.

La figura 6.42 muestra la respuesta electroquímica del analito para distintos volúmenes de muestra inyectados, cuando se utiliza el electrodo de GCE/Nafion/CB[8].

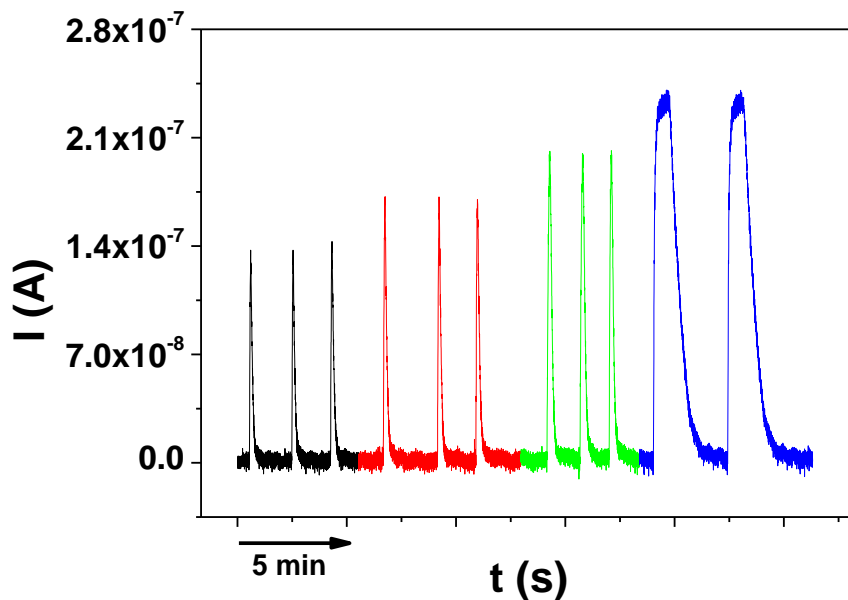


Figura 6.42. Diagramas de DOP (5.0×10^{-6} M) obtenidos al variar el V_i para GCE/Nafion/CB[8].

— $V_i = 25\mu\text{l}$, — $V_i = 50\mu\text{l}$, — $V_i = 250\mu\text{l}$, — $V_i = 2500\mu\text{l}$.

Como se observa en los diagramas obtenidos, un aumento del V_i aumenta el tiempo de residencia y, por tanto, supone un aumento de la anchura de la señal registrada, lo que afecta a la frecuencia de muestreo. Como se observa en la figura 6.43, un valor de V_i de $250\mu\text{l}$ permite el análisis de 55 muestras/h. Sin embargo, un aumento de V_i a $500\mu\text{l}$ reduce el valor de la frecuencia de muestreo hasta 33 muestras/h. En base a estos resultados, se eligió un valor de V_i de $250\mu\text{l}$.

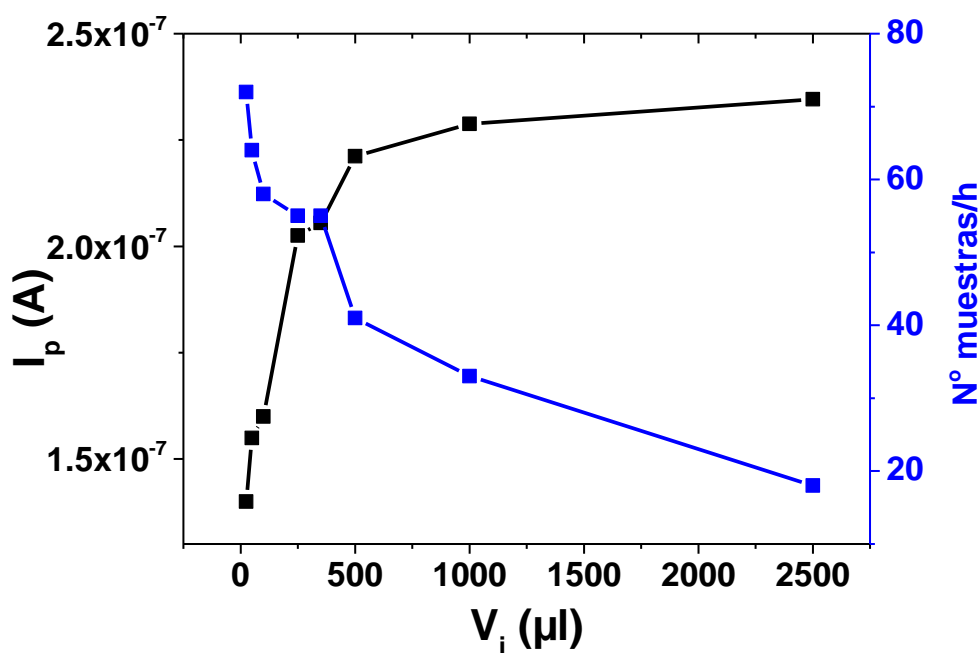


Figura 6.43. Variación de la intensidad y de la frecuencia de muestreo con V_i para la DOP (5.0×10^{-6} M) en el electrodo GCE/Nafion/CB[8].

En el caso de modificar el electrodo con PVC/CB[8] se siguió el mismo criterio entre intensidad de señal y frecuencia de muestreo que para el GCE/Nafion/CB[8]. A la vista de los resultados obtenidos (figura 6.44), se fijó un volumen de inyección de 250 μl obteniendo una frecuencia de muestreo de 72 muestras/hora.

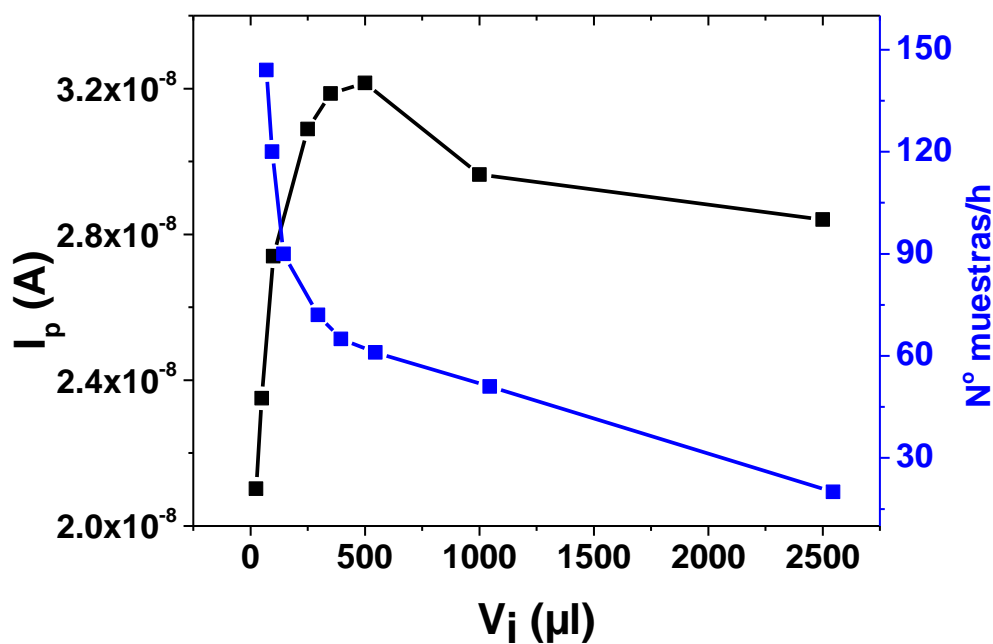


Figura 6.44. Variación de la intensidad y de la frecuencia de muestreo con V_i para la DOP (5.0×10^{-6} M) en el electrodo GCE/PVC/CB[8].

A modo de resumen, en la tabla 6.7 se muestran las condiciones químicas e instrumentales óptimas para la determinación de DOP con cada uno de los electrodos ensayados como detectores para el sistema en flujo.

	Nafion/CB[8]	PVC/CB[8]
pH	7.0	7.0
[H₃PO₄/ H₂PO₄⁻] (M)	0.05	0.01
E (V)	0.6	0.7
q (ml/min)	5.0	4.0
V_i (μl)	250	250

Tabla 6.7. Resumen de las condiciones óptimas para la determinación de DOP en el sistema FIA.

6.4.2.4. Influencia de la concentración en la señal de DOP. Parámetros analíticos.

Una vez optimizados los parámetros químicos e instrumentales para las medidas de DOP en el sistema en continuo, se evaluó su respuesta analítica utilizando cada uno de los electrodos propuestos.

La figura 6.45 muestra que la intensidad de oxidación o altura de la señal para el electrodo GCE/Nafion/CB[8], aumenta con la concentración de DOP en un intervalo comprendido entre 2.99×10^{-7} M y 2.99×10^{-5} M, según la ecuación I_p (A) = $(8 \pm 3) \times 10^{-9} + (3.41 \pm 0.03) \times 10^{-2}$ [DOP] (M); $r = 0.9995$, calculándose unos valores de LD (3σ /pte) y LC (10σ /pte) de 9.9×10^{-8} y 3.3×10^{-7} M, respectivamente.

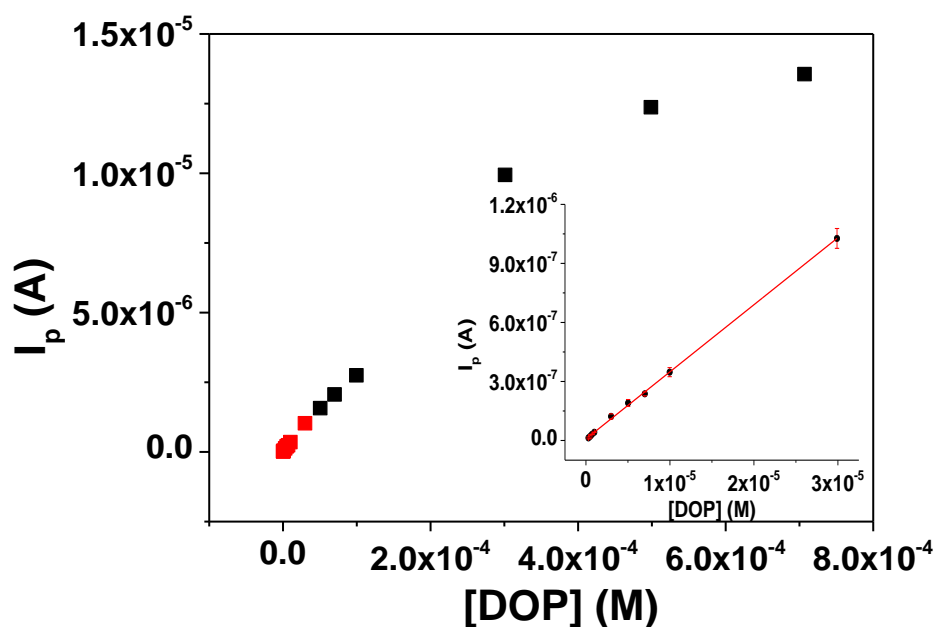


Figura 6.45. Aumento de la intensidad de señal con la concentración de DOP en el electrodo GCE/Nafion/CB[8].

Para la modificación realizada con PVC/CB[8], la figura 6.46 muestra un aumento en la intensidad de oxidación con la concentración de analito en un intervalo comprendido entre 7.00×10^{-8} y 1.00×10^{-5} M. En este caso, el incremento de la intensidad con la concentración se ajusta a la ecuación I_p (A) = $(5 \pm 2) \times 10^{-8} + (7.7 \pm 0.2) \times 10^{-2}$ [DOP] (M); $r = 0.991$. Los valores de LD y LC obtenidos en este caso fueron 2.6×10^{-8} y 8.6×10^{-8} M respectivamente.

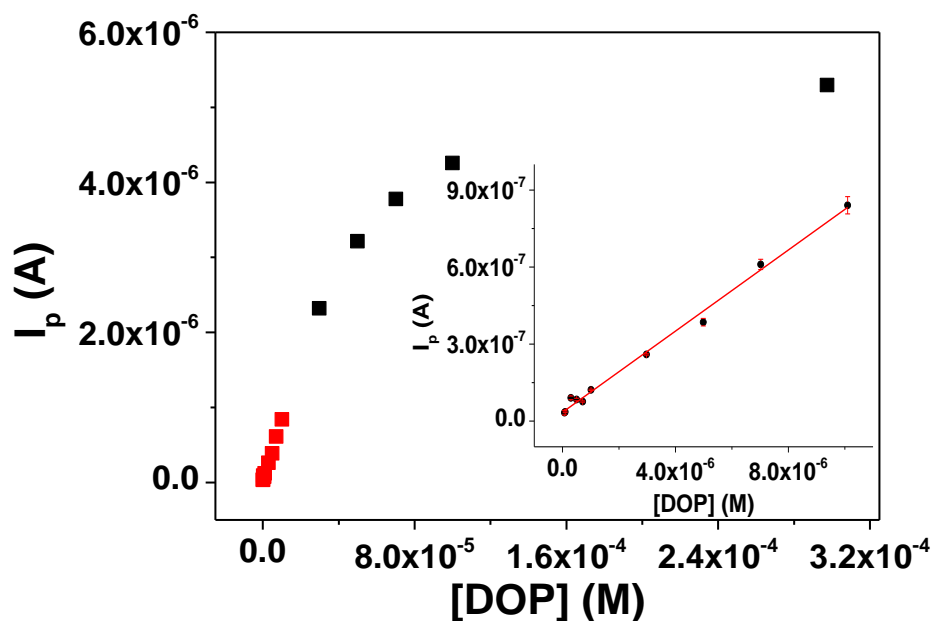


Figura 6.46. Aumento de la intensidad de señal con la concentración de DOP en el electrodo GCE/PVC/CB[8].

Como se puede ver en la tabla 6.8 que se incluye a continuación, los resultados obtenidos son comparables con otros métodos publicados anteriormente para la determinación de DOP en FIA utilizando electrodos modificados.

Electrodo Modificado	LD	Referencia
NC-C/GCE	1.0×10^{-9} M	[39]
Nafion/GCE	1.5 μ M	[40]
PAF/GCE	1.5 μ M	[41]
Nafion/NiHCF/GCE	4.90×10^{-7} M	[42]
Nafion/Q/MWCNTs/GCE	1.4 μ M	[26]
Pt/DENs/GCE	18.19 ppb	[43]
CB[8]/Nafion/GCE	9.9×10^{-8} M	Presente trabajo
CB[8]/PVC/GCE	2.6×10^{-8} M	Presente trabajo

Tabla 6.8. Comparativa del LD con métodos anteriormente publicados. NC-C: Complejo de Ni cargado negativamente, PAF: poly(acriflavina), NiHCF: hexacianoferrato de Ni, Q: quercetina, MWCNTs: nanotubos de carbono de capa múltiple, Pt/DENs: nanopartículas de Pt encapsuladas en un dendrímero.

Para la evaluación de la exactitud y precisión de las medidas obtenidas con los métodos propuestos, se calcularon los valores de Er (%) y D.E.R. (%). Para ello, se inyectaron en el sistema en continuo cinco disoluciones de diferente concentración de DOP dentro del intervalo de respuesta lineal. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla a continuación (tabla 6.9). Con ambos electrodos se obtienen valores de Er (%) y D.E.R. (%) que permiten la aplicación de los métodos propuestos con suficiente exactitud y precisión.

	[Dop] (M)	Er(%) _{n=3}	D.E.R.(%) _{n=3}
GCE/Nafion/CB[8]	7.07×10^{-7}	7.4	2.8
	9.97×10^{-7}	1.6	3.0
	5.02×10^{-6}	6.8	9.3
	7.91×10^{-6}	3.9	4.2
	2.99×10^{-5}	0.2	4.9
GCE/PVC/CB[8]	7.14×10^{-7}	5.2	3.1
	1.01×10^{-6}	13.9	2.1
	2.98×10^{-6}	2.0	1.0
	4.99×10^{-6}	7.3	3.8
	1.01×10^{-5}	2.8	4.0

Tabla 6.9. Resultado del cálculo de exactitud y precisión para distintas concentraciones en los electrodos ensayados.

6.4.2.5. Evaluación de la estabilidad de la respuesta.

Por último, se realizó un estudio más completo de la estabilidad de las medidas en continuo utilizando los electrodos propuestos. Por una parte, se estudió la reproducibilidad a lo largo de un gran número de medidas en el tiempo, realizando inyecciones de DOP consecutivas. Por otro lado, se registró la señal periódicamente, manteniendo el sistema en funcionamiento durante una jornada de trabajo de 8h. Para ambos ensayos se utilizó una concentración de DOP de 5.00×10^{-6} M en las condiciones óptimas para cada electrodo.

En la figura 6.47 se muestran los resultados obtenidos, al realizar medidas de inyecciones consecutivas monitorizando la intensidad de oxidación de DOP de cada una de los casos.

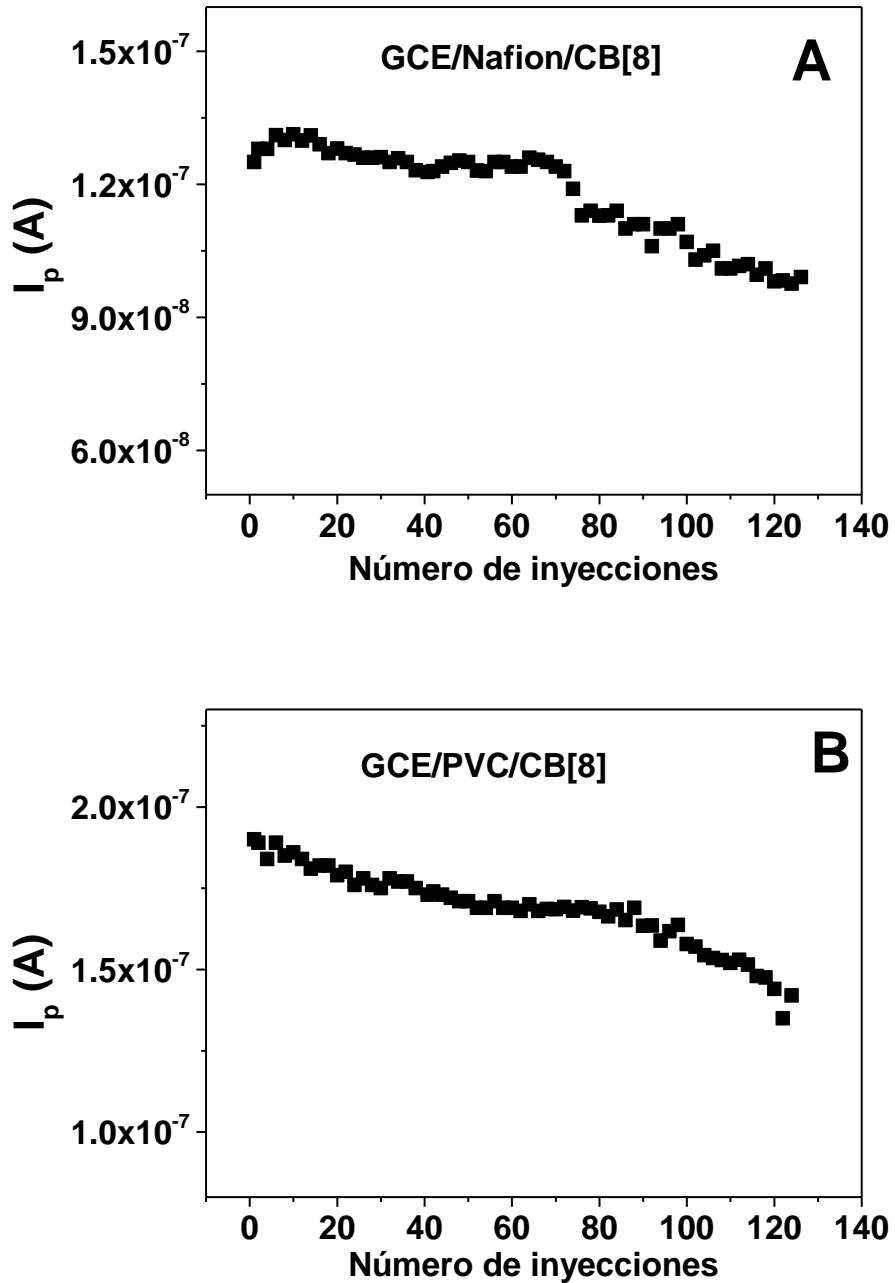


Figura 6.47. Intensidad de la señal para inyecciones consecutivas de DOP. A) GCE/Nafion/[CB[8] y B) GCE/PVC/CB[8].

En general, inyecciones consecutivas y rápidas de DOP producen un descenso progresivo de la intensidad de señal. Comparando los resultados obtenidos para cada electrodo, no se aprecian diferencias importantes entre ellos. Sin embargo, la modificación PVC/CB[8] permite realizar aproximadamente 85 inyecciones antes de que se produzca un descenso significativo de señal (11%). Esta situación se produce algo antes, a partir de unas 75 inyecciones, en el caso de utilizar Nafion/CB[8] como modificación. En ambos casos, la reproducibilidad (en términos de repetitividad) de las medidas consideradas válidas queda reflejada en valores de D.E.R. (%) del 2,8 y 3,9% para GCE/PVC/CB[8] y GCE/Nafion/CB[8] respectivamente, lo que está en consonancia con los obtenidos anteriormente y presentados en la sección 6.4.2.4 (tabla 6.9).

Como se indicó anteriormente, para comprobar que las modificaciones realizadas son suficientemente estables y robustas bajo las condiciones de flujo continuo en estas condiciones de caudal y diseño de célula, se realizaron inyecciones periódicas de DOP manteniendo el sistema en funcionamiento durante 8h.

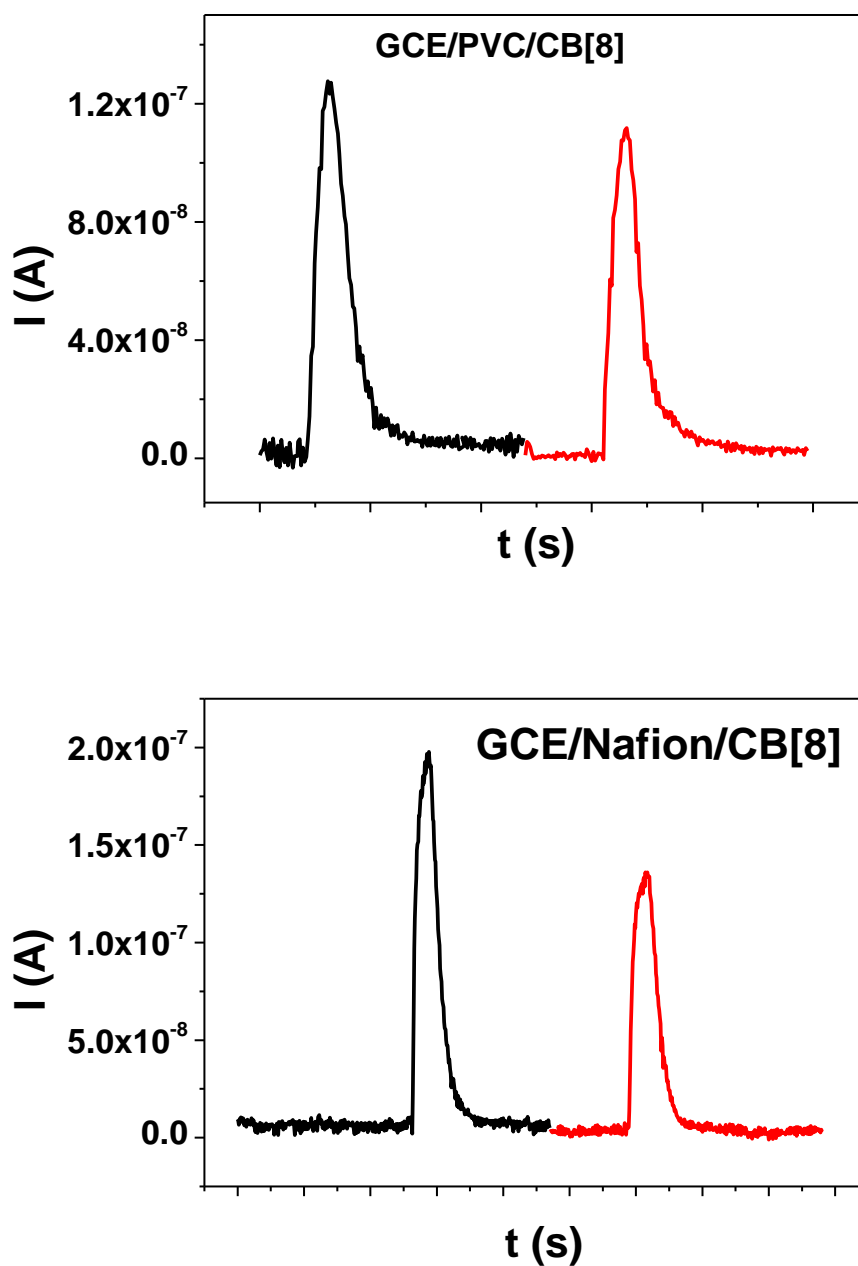


Figura 6.48. Cambio de señal de oxidación de DOP tras monitorizar la señal durante 8h de trabajo. — Señal inicial y — señal final.

Los resultados que se resumen en la figura 6.48, reflejan un comportamiento similar para cada modificación empleada. En ambos casos, se registraron disminuciones de la señal, probablemente fruto del envenenamiento de la superficie electródica, de hasta un 22 y 26% para el GCE/PVC/CB[8] y GCE/Nafion/CB[8], respectivamente. Para ningún

soporte se apreciaron pérdidas de la capa del modificador, puesto que no se detectaron incrementos de señal a lo largo del tiempo.

6.4.2.6. Evaluación de la selectividad. Estudio de interferencias.

Como en ocasiones anteriores, se evaluó la selectividad del método mediante el estudio de otros interferentes que puedan estar presentes junto con el analito en la muestra. En este caso, el ácido ascórbico (ASC) es el interferente más habitual en el análisis de DOP debido a que se oxida a un potencial muy parecido al de oxidación del analito. Por esta razón, se estudio cada analito por separado y una mezcla de ambos con los diferentes tipos de electrodos: GCE, GCE/Soporte y GCE/Soporte/CB[8].

Al inicio de este capítulo, se mostró que la modificación Nafion/CB[8] provocaba la pérdida de la señal de ASC (figura 6.26B). Para confirmar el papel del CB[8] en la eliminación de la interferencia se registraron los espectros ^1H -RMN del CB[8], del ASC y de la mezcla de ambos en D_2O (figura 6.49), con el fin de confirmar que no existe interacción entre el interferente y el CB[8].

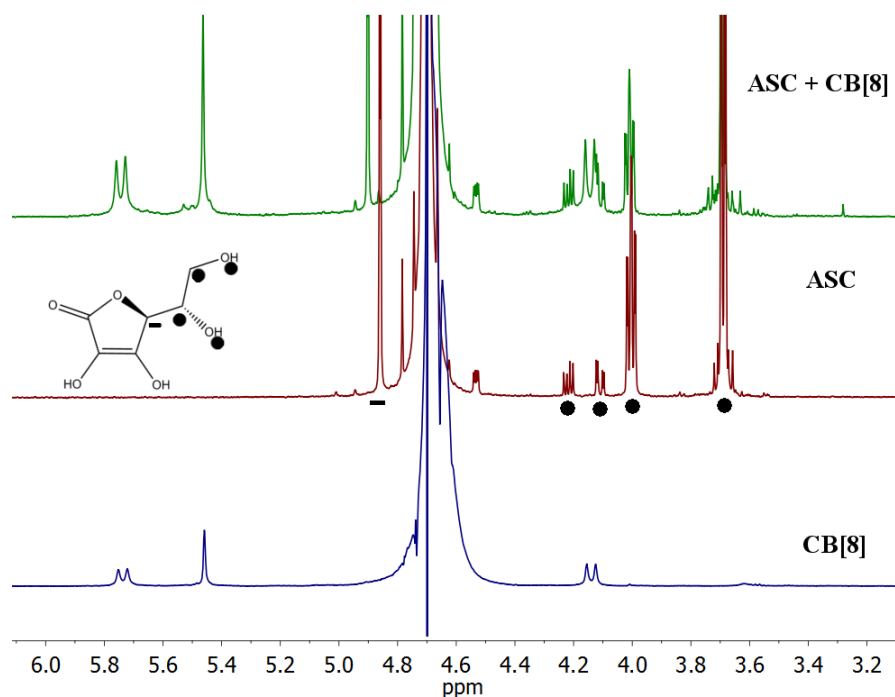


Figura 6.49. Espectros de ^1H -RMN registrados para disoluciones de CB[8], ASC y ASC con exceso de CB[8] en D_2O .

En el espectro de ^1H -RMN de la mezcla, no se observan cambios en los desplazamientos de las señales correspondientes al ASC por la presencia de CB[8], lo que indicaría que no existe interacción entre ellos. La estructura y la densidad de carga negativa que presenta el ASC en las condiciones experimentales de determinación de DOP, impiden la interacción con el CB[8] probablemente por una repulsión con los grupos carbonilo de los portales del receptor. Este hecho, se traducirá en un electrodo más selectivo permitiendo la eliminación de este interferente. La consecuencia de esta mayor selectividad de DOP frente a ASC queda reflejada en la figura 6.50 que se muestra a continuación.

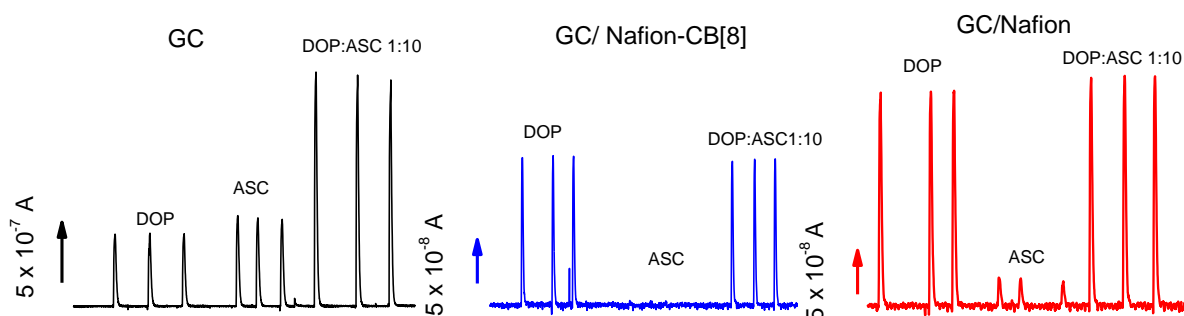


Figura 6.50. Diagramas de DOP, ASC y mezcla DOP: ASC en — GCE, — GCE/Nafion/CB[8] y — GCE/Nafion. $[\text{DOP}] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{ASC}] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $[\text{DOP}] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M} + [\text{ASC}] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Como se observa en los diagramas de la figura anterior, cuando el electrodo se encuentra modificado con Nafion/CB[8], la señal del ASC desaparece en su totalidad con respecto a la registrada con el electrodo sin modificar. De esta manera, también se puede observar que no se registra un incremento de señal cuando ambos analitos se encuentran juntos en la misma muestra.

Al realizar las medidas en un electrodo modificado sólo con Nafion, se ve que el soporte también contribuye a la eliminación de la interferencia pero no en su totalidad, en este caso la reducción de la señal frente al electrodo sin modificar es del 91% (figura 6.50, líneas rojas). Por tanto, la presencia de CB[8] contribuye en gran medida a la eliminación total del interferente.

Como se puede ver en la figura 6.51, los resultados obtenidos cuando se utilizó el electrodo modificado con PVC como soporte, fueron muy parecidos.

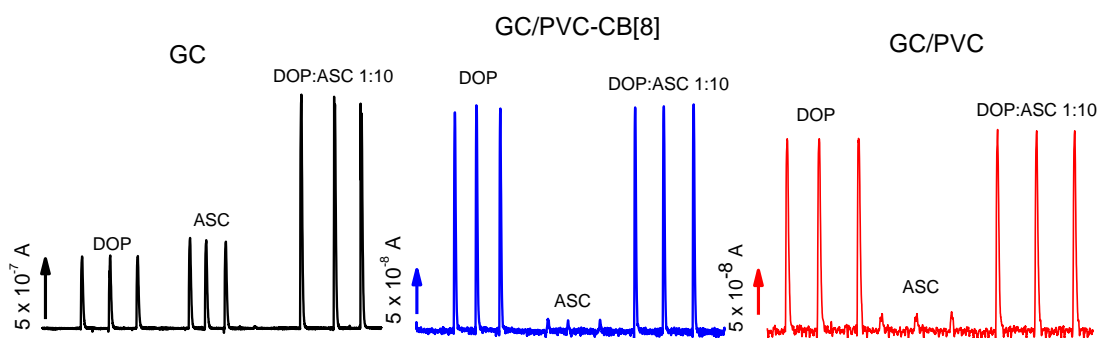


Figura 6.51. Diagramas de DOP, ASC y mezcla DOP:ASC en — GCE, — GCE/PVC/CB[8] y — GCE/PVC. $[DOP] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $[ASC] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $[DOP] = 5.0 \times 10^{-6} \text{ M} + [ASC] = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$.

En este caso, la reducción de la intensidad de oxidación del ASC frente al electrodo no modificado fue de un 97% empleando GCE/PVC/CB[8]. Al igual que ocurría con el Nafion, el PVC contribuye por si solo a la disminución de la interferencia. Sin embargo, analizando en mayor profundidad los resultados, la relación de señales DOP/ASC fue de 9 veces con el electrodo modificado con PVC frente a las 14 veces que se consigue en el caso de estar presente el CB[8] en la superficie del electrodo.

Los resultados muestran que ambos electrodos presenta una gran selectividad de DOP frente a ASC, contribuyendo a disminuir así los procesos de preparación de muestra en un análisis en muestra real.

A continuación se muestra una tabla resumen comparando los resultados obtenidos para ambos electrodos de una manera más general (tabla 6.10).

	LD (M)	Sensibilidad (A × M⁻¹)	Selectividad (ASC)	Estabilidad (D.E.R., %)
GCE/PVC/CB[8]	2.6×10^{-8}	7.7×10^{-2}	Si	~ 85 (2.8)
GCE/Nafion/CB[8]	9.9×10^{-8}	3.4×10^{-2}	Si (>)	~ 75 (3.9)

Tabla 6.10. Resumen comparativo de los resultados obtenidos para ambos electrodos.

Independientemente del soporte utilizado para la inmovilización de CB[8], ambos métodos ofrecen una gran sensibilidad permitiendo alcanzar excelentes límites de detección. Aunque el electrodo GCE/Nafion/CB[8] presenta una menor estabilidad en la respuesta frente a inyecciones sucesivas, 75 respecto a 85 cuando se utiliza PVC/CB[8], permite una mayor selectividad frente al ASC. Sin embargo, el electrodo GCE/PVC/CB[8] fue elegido para la determinación de DOP en una muestra real de suero sanguíneo mediante el sistema en continuo debido a su mayor sensibilidad respecto al electrodo GCE/Nafion/CB[8].

6.4.2.7. Aplicación en muestra real.

La aplicación del método propuesto, consistió en la determinación de DOP en suero humano. La muestra de sangre fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 min a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, el suero fue separado con una jeringa y tras separarlo en diferentes alícuotas de 0.5 ml, se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Una alícuota de 0.5 ml de suero fue filtrado a través de un filtro de jeringa de 0.45 µm y diluido a 5.0 ml con disolución portadora de fosfato 0.05 M a pH = 7.0. Se llevó a cabo una calibración por adición estándar, suplementando alícuotas de 0.5 ml de suero diluido, con concentraciones de DOP de 3.19×10^{-7} M, 6.39×10^{-7} M, 1.49×10^{-6} M, 2.56×10^{-6} M, 3.41×10^{-6} M, 4.26×10^{-6} M y 5.11×10^{-6} M. Las alícuotas no suplementadas y suplementadas a los niveles de concentración indicados, se diluyeron a 10.0 ml con portador, previamente a ser inyectados en el sistema en continuo.

Los diagramas de la figura 6.52 muestran los resultados obtenidos de las diferentes inyecciones de muestra realizadas.

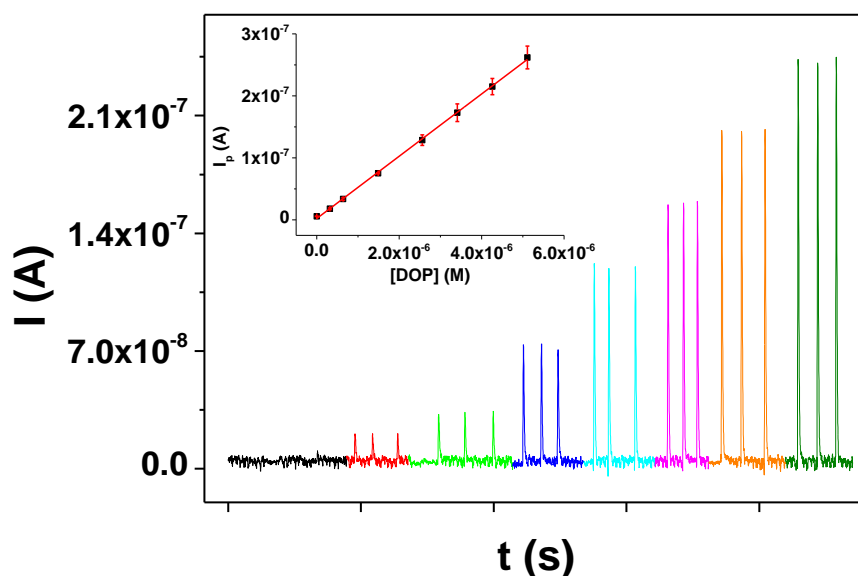


Figura 6.52. Fíagramas correspondientes a inyecciones de muestra de suero suplementadas con concentraciones crecientes de DOP. $[DOP]_{añadida}$: — muestra, — 3.19×10^{-7} M, — 6.39×10^{-7} M, — 1.49×10^{-6} M, — 2.56×10^{-6} M, — 3.41×10^{-6} M, — 4.26×10^{-6} M y — 5.11×10^{-6} M. Inserto: Influencia de la I_p con la $[DOP]_{añadida}$.

Como muestra la figura, la intensidad de oxidación aumenta linealmente con la concentración según la ecuación $I_p \text{ (A)} = (2 \pm 1) \times 10^{-9} + (5.02 \pm 0.04) \times 10^{-2} [DOP]_{añadida} \text{ (M)}$; $r = 0.9994$. A la vista de los fíagramas correspondientes a la muestra suplementada, no se pudo detectar DOP en la misma, calculándose un valor de LD en esta matriz de 4.9×10^{-8} M.

La tabla 6.11 muestra los valores de recuperación y D.E.R. obtenidos para en la determinación de DOP en la muestra de suero para las diferentes concentraciones añadidas.

[DOP]_{añadida} (M)	[DOP]_{encontrada} (M)	D.E.R. (n = 3) (%)	Recuperación (%)
3.19×10^{-7}	3.15×10^{-7}	7.9	99
6.39×10^{-7}	6.20×10^{-7}	6.6	97
1.49×10^{-6}	1.46×10^{-6}	1.1	98
2.56×10^{-6}	2.50×10^{-6}	7.0	98
3.41×10^{-6}	3.38×10^{-6}	8.4	99
4.26×10^{-6}	4.24×10^{-6}	6.6	99
5.11×10^{-6}	5.19×10^{-6}	7.7	102

Tabla 6.11. Recuperación y reproducibilidad del método propuesto para las concentraciones de DOP ensayadas.

Los valores de recuperación del método en continuo con el electrodo modificado con PVC/CB[8] para la determinación de DOP, resultan excelentes para todas las concentraciones ensayadas, valores comparables o que incluso mejoran a los conseguidos con otras metodologías propuestas para esta misma muestra [29, 44-46]. Los valores de reproducibilidad obtenidos confirman que el electrodo modificado con PVC/CB[8] puede ser aplicado con suficiente precisión, incluso trabajando con muestras reales.

6.5. Conclusiones.

En este capítulo se ha demostrado que los electrodos desarrollados en el capítulo 5, pueden ser utilizados para el análisis de compuestos de interés biológico en muestras reales.

En primer lugar, se ha desarrollado un sensor de TRP mediante la modificación de un electrodo de carbón vítreo con Nafion y CB[8]. Se ha observado que la presencia del receptor en la superficie electródica presenta un comportamiento con la concentración de sales diferente al expuesto hasta el momento para la formación de complejos en disolución. Además, el CB[8] demuestra una gran selectividad frente a posibles interferentes. En especial se ha demostrado la desaparición de las señales del ASC y del URI debido a la presencia del CB[8].

Bajo las condiciones óptimas de medida, se obtuvo un límite de detección de 1.8×10^{-7} M con valores de exactitud y precisión menores del 7.9 y 11%, respectivamente. Además, el sensor ha sido aplicado en la determinación de TRP en suero humano con unos valores de recuperación comprendidos entre el 94 y el 104 %.

En segundo lugar, se ha demostrado que estos electrodos pueden funcionar como detectores en sistemas de flujo. Las modificaciones de PVC/CB[8] y Nafion/CB[8] demostraron ofrecer una muy buena estabilidad de la señal. En las condiciones óptimas para la determinación en continuo, se obtuvieron los valores de límite de detección de 2.6×10^{-8} M y de 9.9×10^{-8} M para los electrodos GCE/PVC/CB[8] y GCE/Nafion/CB[8], respectivamente. En ambos casos, los valores de límites de detección y cuantificación, igualan o incluso mejoran los previamente publicados en la bibliografía.

Además, estos electrodos han demostrado una alta estabilidad con frecuencias de muestro de 85 y 75 inyecciones, respectivamente. El método propuesto ha sido aplicado en la determinación selectiva de DOP en suero humano con muy buenos valores de exactitud, precisión y recuperación (97-102 %).

La presencia del receptor macrocíclico en la superficie electródica abre un camino de análisis para compuestos de interés, con suficiente sensibilidad y una alta selectividad tanto en medidas en estático como en continuo.

6.6. Bibliografia.

- [1] A. Babaei, M. Zendehtdel, B. Khalilzadeh, A. Taheri, Simultaneous determination of tryptophan, uric acid and ascorbic acid at Iron(III) doped zeolite modified carbon paste electrode, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 66, **2008**, 226-232.
- [2] X. Zhang, Y. He, M. Ding, Simultaneous determination of tryptophan and kynurenine in plasma samples of children patients with kawasaki disease by high-performance liquid chromatography with programmed wavelength ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 877, **2009**, 1678-1682.
- [3] J. Zhao, P. Gao, D. Zhu, Optimization of Zn²⁺-containing mobile phase for simultaneous determination of kynurenine, kynurenic acid and tryptophan in human plasma by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 878, **2010**, 603-608.
- [4] M. Sa, L. Ying, T. Ai-Guo, X. Le-Dong, R. Ya-Ping, Simultaneous determination of tyrosine, tryptophan and 5-hydroxytryptamine in serum of MDD patients by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Clinica Chimica Acta*. 413, **2012**, 973-977.
- [5] A.A.-. Badawy, C.J. Morgan, J.A. Turner, Application of the phenomenex ez : faast (TM) amino acid analysis kit for rapid gas-chromatographic determination of concentrations of plasma tryptophan and its brain uptake competitors, *Amino Acids*. 34, **2008**, 587-596.
- [6] K. Balal, H. Mohammad, B.a.A. Bahareh Babaei, H. Maryam, Z. Mozhgan, Zeolite nanoparticle modified carbon paste electrode as a biosensor for simultaneous determination of dopamine and tryptophan, *Journal of the Chinese Chemical Society*. 56, **2009**, 789-796.
- [7] J. Raouf, R. Ojani, M. Baghayeri, Simultaneous electrochemical determination of glutathione and tryptophan on a nano-TiO₂/ferrocene carboxylic acid modified carbon paste electrode, *Sensors and Actuators B-Chemical*. 143, **2009**, 261-269.
- [8] X. Tang, Y. Liu, H. Hou, T. You, Electrochemical determination of L-tryptophan, L-tyrosine and L-cysteine using electrospun carbon nanofibers modified electrode, *Talanta*. 80, **2010**, 2182-2186.
- [9] A.A. Ensafi, H. Karimi-Maleh, S. Mallakpour, Simultaneous determination of ascorbic acid, acetaminophen, and tryptophan by square wave voltammetry using N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3,5-dinitrobenzamide-modified carbon nanotubes paste electrode, *Electroanalysis*. 24, **2012**, 666-675.
- [10] C. Xu, K. Huang, Y. Fan, Z. Wu, J. Li, T. Can, Simultaneous electrochemical determination of dopamine and tryptophan using a TiO₂-graphene/poly(4-aminobenzenesulfonic acid) composite film based platform, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*. 32, **2012**, 969-974.
- [11] S. Mao, W. Li, Y. Long, Y. Tu, A. Deng, Sensitive electrochemical sensor of tryptophan based on Ag@C core-shell nanocomposite modified glassy carbon electrode, *Analytica Chimica Acta*. 738, **2012**, 35-40.
- [12] C. Wang, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, F. Hu, M. Zhang, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan on gold nanoparticles/overoxidized-polyimidazole composite modified glassy carbon electrode, *Analytica Chimica Acta*. 741, **2012**, 15-20.
- [13] M.U.A. Prathap, R. Srivastava, Tailoring Properties of polyaniline for simultaneous determination of a quaternary mixture of ascorbic acid, dopamine, uric acid, and tryptophan, *Sensors and Actuators B-Chemical*. 177, **2013**, 239-250.
- [14] K. Deng, J. Zhou, X. Li, Direct Electrochemical reduction of graphene oxide and its application to determination of L-tryptophan and L-tyrosine, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 101, **2013**, 183-188.
- [15] J.W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.J. Kim, K. Kim, Cucurbituril homologues and derivatives: new opportunities in supramolecular chemistry, *Accounts of Chemical Research*. 36, **2003**, 621-630.
- [16] M. Bush, N. Bouley, A. Urbach, Charge-mediated recognition of n-terminal tryptophan in aqueous solution by a synthetic host, *Journal of the American Chemical Society*. 127, **2005**, 14511-14517.

- [17] H.J. Buschmann, L. Mutihac, R.C. Mutihac, E. Schollmeyer, Complexation behavior of cucurbit[6]uril with short polypeptides, *Thermochimica Acta.* 430, **2005**, 79-82.
- [18] O. Danylyuk, V.P. Fedin, Solid-State Supramolecular Assemblies of tryptophan and tryptamine with cucurbit[6]uril, *Crystal Growth & Design.* 12, **2012**, 550-555.
- [19] L.M. Heitmann, A.B. Taylor, P.J. Hart, A.R. Urbach, Sequence-specific recognition and cooperative dimerization of n-terminal aromatic peptides in aqueous solution by a synthetic host, *Journal of the American Chemical Society.* 128, **2006**, 12574-12581.
- [20] H. Cong, L.L. Tao, Y.H. Yu, F. Yang, Y. Du, Z. Tao, S.F. Xue, Formation of host-guest complexes of amino acids and cucurbit[7]uril, *Asian Journal of Chemistry.* 19, **2007**, 961-964.
- [21] P. Rajgariah, A.R. Urbach, Scope of amino acid recognition by cucurbit[8]uril, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 62, **2008**, 251-254.
- [22] D.M. Bailey, A. Hennig, V.D. Uzunova, W.M. Nau, Supramolecular tandem enzyme assays for multiparameter sensor arrays and enantiomeric excess determination of amino acids, *Chemistry-A European Journal.* 14, **2008**, 6069-6077.
- [23] L.A. Baumes, M.B. Sogo, P. Montes-Navajas, A.a.G. Corma H., A colorimetric sensor array for the detection of the date-rape drug gamma-hydroxybutyric acid (GHB): a supramolecular approach, *Chemistry-a European Journal.* 16, **2010**, 4489-4495.
- [24] V. Sindelar, M.A. Cejas, F.M. Raymo, W.Z. Chen, S.E. Parker, A.E. Kaifer, Supramolecular assembly of 2,7-dimethyldiazapyrenium and cucurbit[8]uril: a new fluorescent host for detection of catechol and dopamine, *Chemistry-a European Journal.* 11, **2005**, 7054-7059.
- [25] H. Kim, J. Oh, W.S. Jeon, N.a.H. Selvapalam Ilha, Y.H. Ko, K. Kim, A new cucurbit[6]uril-based ion-selective electrode for acetylcholine with high selectivity over choline and related quaternary ammonium ions, *Supramolecular Chemistry.* 24, **2012**, 487-491.
- [26] P. Chen, R. Vittal, P. Nien, K. Ho, Enhancing dopamine detection using a glassy carbon electrode modified with MWCNTs, Quercetin, and Nafion (R), *Biosensors & Bioelectronics.* 24, **2009**, 3504-3509.
- [27] X. Tian, C. Cheng, H. Yuan, J.a.X. Du Dan, S. Xie, M.M.F. Choi, Simultaneous determination of L-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles-beta-cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry, *Talanta.* 93, **2012**, 79-85.
- [28] J. Mathiyarasu, S. Senthikumar, K. Phani, V. Yegnaraman, Selective detection of dopamine using a functionalised polyaniline composite electrode, *Journal of Applied Electrochemistry.* 35, **2005**, 513-519.
- [29] Q. Liu, X. Zhu, Z. Huo, X. He, Y.a.X. Liang Maotian, Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using PVP/graphene modified electrodes, *Talanta.* 97, **2012**, 557-562.
- [30] E. Gogol, G. Evtugyn, J. Marty, H. Budnikov, V. Winter, Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors, *Talanta.* 53, **2000**, 379-389.
- [31] K.-. Frith, J.L. Limson, pH tuning of Nafion (R) for selective detection of tryptophan, *Electrochimica Acta.* 54, **2009**, 3600-3605.
- [32] M.V. Rekharsky, H. Yamamura, C. Inoue, M. Kawai, I. Osaka, R. Arakawa, K. Shiba, A. Sato, Ko, Y. H. and Selvapalam,N., K. Kim, Y. Inoue, Chiral recognition in cucurbituril cavities, *Journal of the American Chemical Society.* 128, **2006**, 14871-14880.
- [33] H. Wang, Y. Zhou, Y. Guo, W. Liu, C. Dong, Y. Wu, S. Li, S. Shuang, Beta-cyclodextrin/Fe₃O₄ hybrid magnetic nano-composite modified glassy carbon electrode for tryptophan sensing, *Sensors and Actuators B-Chemical.* 163, **2012**, 171-178.
- [34] K. Huang, C. Xu, W. Xie, W. Wang, Electrochemical behavior and voltammetric determination of tryptophan based on 4-aminobenzoic acid polymer film modified glassy carbon electrode, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* 74, **2009**, 167-171.
- [35] S. Zhu, H. Li, W. Niu, G. Xu, Simultaneous electrochemical determination of uric acid, dopamine, and ascorbic acid at single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode, *Biosensors & Bioelectronics.* 25, **2009**, 940-943.

-
- [36] C. Li, Y. Ya, G. Zhan, Electrochemical investigation of tryptophan at gold nanoparticles modified electrode in the presence of sodium dodecylbenzene sulfonate, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 76, **2010**, 340-345.
- [37] Y. Fan, J. Liu, H. Lu, Q. Zhang, Electrochemistry and voltammetric determination of l-tryptophan and l-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO₂-graphene composite film, *Microchimica Acta*. 173, **2011**, 241-247.
- [38] K. Balal, H. Mohammad, B.a.A. Bahareh Babaei, H. Maryam, Z. Mozhgan, Zeolite nanoparticle modified carbon paste electrode as a biosensor for simultaneous determination of dopamine and tryptophan, *Journal of the Chinese Chemical Society*. 56, **2009**, 789-796.
- [39] G. Xu, M. Xu, H. Zhang, S.a.B. Kim Zun-Ung, Electropolymerization of negatively charged Ni(II) complex for the selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid, *Bioelectrochemistry*. 72, **2008**, 87-93.
- [40] T. Yao, G. Okano, Simultaneous determination of l-glutamate, acetylcholine and dopamine in rat brain by a flow-injection biosensor system with microdialysis sampling, *Analytical Sciences*. 24, **2008**, 1469-1473.
- [41] P. Nien, P. Chen, K. Ho, On the amperometric detection and electrocatalytic analysis of ascorbic acid and dopamine using a poly(acriflavine)-modified electrode, *Sensors and Actuators B-Chemical*. 140, **2009**, 58-64.
- [42] S.J.R. Prabakar, S.S. Narayanan, Catalytic oxidation of dopamine at a nickel hexacyanoferrate surface modified graphite wax composite electrode coated with Nafion, *Electroanalysis*. 21, **2009**, 1481-1489.
- [43] M.G. García, G.M.E. Armendariz, L.A. Godinez, J. Torres, S. Sepulveda-Guzman, E. Bustos, Detection of dopamine in non-treated urine samples using glassy carbon electrodes modified with PAMAM dendrimer-Pt composites, *Electrochimica Acta*. 56, **2011**, 7712-7717.
- [44] H. Park, I.R. Paeng, Development of direct competitive enzyme-linked aptamer assay for determination of dopamine in serum., *Analytica Chimica Acta*. 685, **2011**, 65-73.
- [45] L. Wu, L. Feng, J. Ren, X. Qu, Electrochemical detection of dopamine using porphyrin-functionalized graphene, *Biosensors & Bioelectronics*. 34, **2012**, 57-62.
- [46] L.M. Niu, K.Q. Lian, H.M. Shi, Wu, Yi Bing and Kang, Wei Jun, S.Y. Bi, Characterization of an ultrasensitive biosensor based on a Nano-Au/DNA/Nano-Au/Poly(SFR) composite and its application in the simultaneous determination of dopamine, uric acid, guanine, and adenine, *Sensors and Actuators B-Chemical*. 178, **2013**, 10-18.

Capítulo 7 / Chapter 7

Grafeno y electrodos macroporosos modificados con CB[n]: nuevas perspectivas en el desarrollo de sensores.

Graphene and macroporous electrodes modified with CB[n]: new trends in sensor development.

7.1. Introducción.

El empleo de una reacción química de reconocimiento molecular con fines analíticos persigue la mejora en la selectividad de la determinación, sin embargo, habitualmente la respuesta electroquímica sufre una pérdida de intensidad, provocando una disminución de la sensibilidad del método. Por esta razón, el uso de materiales que puedan producir un aumento en la corriente, bien por tener propiedades de acumulación como el Nafion, bien por generar una rápida transferencia electrónica o bien por tratarse de superficies con gran superficie activa, pueden ser muy útiles en el desarrollo de sensores que involucren la formación de un complejo con un receptor macrocíclico. Por esta razón, en este capítulo se presentan dos vías de desarrollo de sensores de CB[n] que puedan proporcionar mejores límites de detección que para el electrodo sin modificar. Por una parte, se utilizará un material de excelente conductividad como el grafeno y por otra, electrodos macroporosos de oro que proporcionarán una gran superficie activa.

El grafeno es una monocapa de átomos de carbono de hibridación sp^2 , que se encuentran ordenados en disposición hexagonal como el grafito. Existen diferentes estructuras de carbono con hibridación sp^2 : los fulerenos, los nanotubos de carbono, el grafeno y el grafito (figura 7.1).

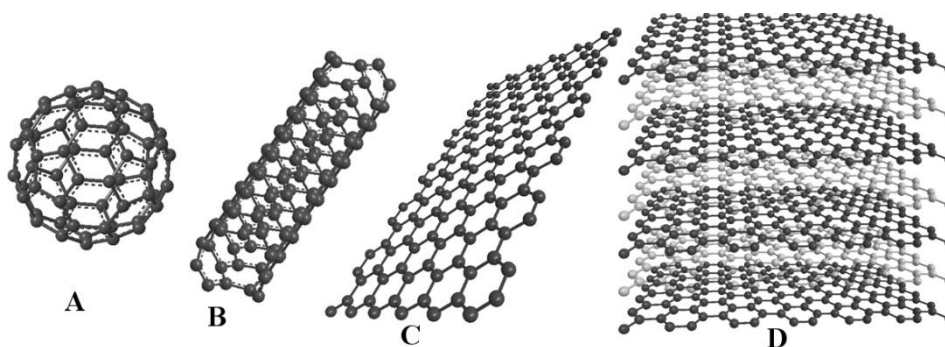


Figura 7.1. Estructuras de carbono con hibridación sp^2 . A) Fulereo, B) nanotubo de carbono, C) grafeno y D) grafito [1].

Desde que Geim y Novoselov, los llamados “los padres del grafeno”, obtuvieron el premio Nobel de Física en 2010 por sus importantes trabajos sobre el grafeno [2], este material ha abierto nuevas y excelentes perspectivas en todos los campos de la ciencia y la tecnología, incluyendo la química analítica [3-6]. El grafeno presenta unas

propiedades fisicoquímicas muy atractivas desde el punto de vista electroanalítico ya que, gracias a su gran superficie activa y a su excelente conductividad eléctrica, puede producir un aumento en la corriente consiguiendo detectar concentraciones más pequeñas que con electrodos convencionales de grafito [1]. Este material presenta distintas ventajas frente a otros materiales de carbono utilizados para modificar electrodos como son los nanotubos de carbono, ya que no presenta impurezas metálicas y su síntesis, a partir de grafito, es barata y accesible. Además, presenta una alta flexibilidad, necesaria para el desarrollo de sensores mecánicamente robustos, y su alto grado de transparencia ha permitido que se esté comenzando el desarrollo de sensores basados en principios ópticos [6].

En la bibliografía se encuentran diferentes métodos de preparación de grafeno, no obstante, sólo algunos resultan adecuados para su uso en el desarrollo de sensores:

- Obtención de grafeno mediante exfoliación mecánica de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG) lo que produce la separación física de monocapas de grafito [2].
- Crecimiento epitaxial en superficies semiconductoras, principalmente el carburo de silicio [7, 8].

Estos dos métodos proporcionan un buen material para estudios de sus propiedades electrónicas. Sin embargo, para muchas aplicaciones como el desarrollo de sensores, se necesitan mayores cantidades que se pueden obtener siguiendo diferentes vías:

- Deposición química en fase vapor (CVD) de hidrocarburos sobre metales de transición, como el níquel o el rutenio. Mediante este método se sintetizan monocapas de grafeno de una gran calidad estructural, aunque el hecho de involucrar altas temperaturas y bajas presiones lo convierte en un método muy costoso e instrumentalmente complejo [9].
- Intercalación de pequeñas moléculas en el entramado del grafito y su posterior exfoliación mediante tratamiento térmico o aplicación de ultrasonidos [10, 11].
- A partir de la oxidación de grafito. Se somete al óxido de grafito obtenido a un proceso de exfoliación, obteniéndose láminas de óxido de grafeno que

pueden ser reducidas, química o electroquímicamente, generando grafeno. Mediante esta técnica se obtiene gran cantidad de grafeno estable en dispersión acuosa o en disolventes orgánicos y con un bajo coste [12].

Las excelentes propiedades que presenta este material explican que, en los últimos años, su uso para el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos haya estado muy explorado como se demuestra por la gran variedad de artículos publicados en este tema [13-15]. En un intento de evitar que las láminas de grafeno formen aglomerados produciendo de nuevo grafito, algunos autores han propuesto el uso de compuestos macromoleculares como las ciclodextrinas. Estos receptores actúan bien, como aditivos con el fin de preparar una suspensión acuosa estable de grafeno [16] o bien, como agentes dispersantes de las láminas de grafeno dando lugar a la formación de un material combinado de β -CD-grafeno [17-19]. Esta estrategia combina las propiedades eléctricas del grafeno con las de reconocimiento molecular de las ciclodextrinas. De esta forma, se generan diferentes materiales como CDs-grafeno o CD-nanopartículas de platino-grafeno, que han sido aplicados en la modificación de electrodos en el diseño de sensores sensibles y selectivos para la resolución de distintos problemas analíticos [16, 20-22].

La combinación de las propiedades de los CB[n]s con las del grafeno podría ser muy interesante desde el punto de vista analítico. Como se ha visto en capítulos anteriores, sería lógico esperar un aumento en la selectividad del sensor a través de la eliminación de posibles interferencias cargadas negativamente y, además, gracias a las propiedades del grafeno, se compensaría la disminución de señal de intensidad debida a la formación de un complejo de inclusión.

Por otro lado, un aumento en el área del electrodo permitiría conseguir menores límites de detección. Así, una de las vías para la obtención de electrodos con mayores superficies, es la fabricación de electrodos porosos. Gracias a la elevada área activa por unidad de volumen que presentan estos electrodos, su empleo en el desarrollo de métodos analíticos presenta un gran interés. Además, su superficie interna permite la inmovilización de reactivos que presenten propiedades que puedan ser utilizadas en aplicaciones analíticas.

Los electrodos porosos se clasifican según el tamaño de poro que presentan. Se denominan electrodos microporosos aquellos de un tamaño de poro menor de 2 nm,

mesoporosos los de tamaño de poro entre 2 y 50 nm y macroporosos los de tamaño mayor de 50 nm.

En la preparación de este tipo de electrodos resulta de gran importancia el control de la porosidad. Para obtener una mejor interconexión entre los poros y tener una efectiva transferencia de carga en la superficie del electrodo resulta importante que la distribución de los mismos sea lo más uniforme y ordenada posible.

La preparación de los electrodos macroporosos utilizados en este capítulo se lleva a cabo a través de la infiltración o recubrimiento de un molde de partículas depositado sobre una placa de oro disolviendo, posteriormente, dicho molde. La figura 7.2 muestra un esquema del procedimiento seguido.

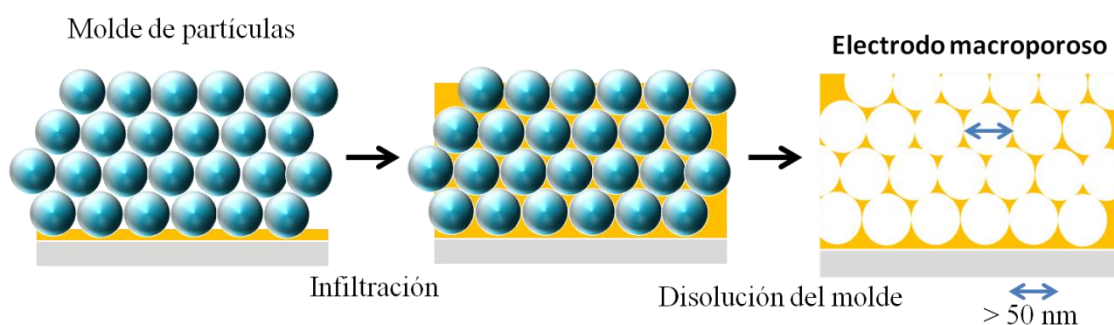


Figura 7.2. Esquema de preparación de un electrodo macroporoso.

Existen diferentes métodos de preparación de los moldes de partículas. Se pueden emplear las técnicas de evaporación, sedimentación [23], mediante la aplicación de un campo eléctrico [24] o mediante la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) [25]. Esta última técnica ha sido la utilizada para la preparación de los electrodos empleados en este capítulo. Con ella se consigue un mayor orden de las partículas en la estructura ya que se depositan lámina a lámina, como se explicará más adelante.

Gracias a la elevada área que presentan estos electrodos respecto a los electrodos planos convencionales, se pueden registrar intensidades de más de dos órdenes de magnitud superiores respecto a las registradas con un electrodo plano. Este hecho hace que sean muchas las aplicaciones en química electroanalítica relativas a la utilización de electrodos porosos. En este tipo de electrodos, además de aumentar la corriente

capacitativa, aumenta en paralelo la corriente faradaica, mejorando la respuesta electroquímica, en especial, para analitos adsorbidos en la superficie [26].

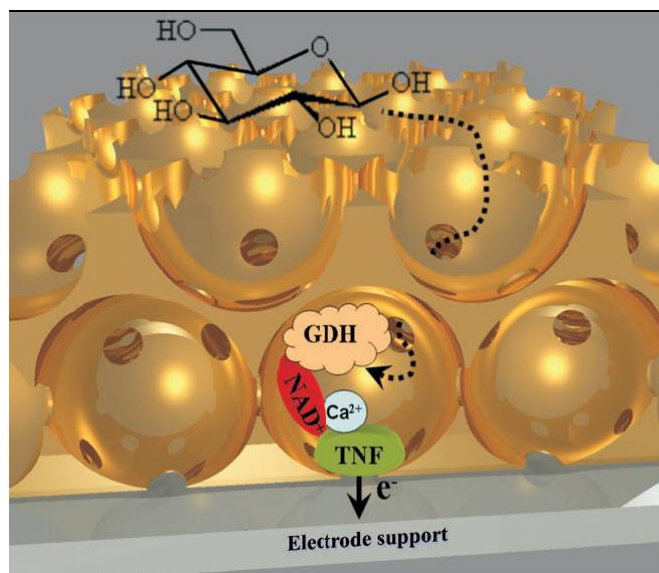


Figura 7.3. Representación de un electrodo macroporoso utilizado como biosensor de glucosa [27].

En la figura 7.3 se muestra un ejemplo de un biosensor de glucosa en el que todas las especies necesarias, incluyendo el mediador redox (4- carboxi-2,5,7-trinitro-9-fluorenilideno)malononitrilo; TNF) y el cofactor (NADH), fueron inmovilizados en la estructura porosa [27]. Existen otros ejemplos en los que únicamente se inmoviliza el mediador y el resto de reactivos son añadidos en disolución [28, 29]. El trabajo mostrado como ejemplo, demuestra que los huecos de conexión presentes entre poros adyacentes son lo suficientemente grandes para permitir el acceso de la glucosa en el interior de los poros. Además, la oxidación enzimática de la glucosa aumenta linealmente con el espesor de la estructura porosa, demostrando que estos sistemas permiten un incremento de la sensibilidad del método analítico. Otros ejemplos de biosensores, muestran también mejoras significativas en los valores de sensibilidad para la detección de glucosa, adenosin-5-trifosfato (ATP) o de la proteína c-reactiva (CRP), entre otros [30-38]. En la bibliografía también se pueden encontrar sensores basados en electrodos macroporosos para otro tipo de analitos como por ejemplo, metales pesados [39-42]. Autores como Walcarius han presentado amplias revisiones que resumen la gran variedad de aplicaciones analíticas que presentan este tipo de electrodos [26, 43], si

bien, también resultan muy interesantes para el almacenamiento o conversión de energía incluyendo su uso en baterías, supercapacitadores y células de combustible, como ejemplos de otras aplicaciones electroquímicas [44].

Aprovechando la elevada superficie activa que presentan los electrodos macroporosos, se estudiará su utilización como base para desarrollar sensores mediante su modificación con CB[8], bien directamente, o bien aprovechando la formación del complejo con un grupo ferroceno adsorbido previamente a la superficie del electrodo.

7.2. Objetivos parciales.

El objetivo principal de este capítulo es el desarrollo de nuevas superficies sensoras que bien, por la naturaleza de la modificación (grafeno) o bien, por la estructura del electrodo utilizado (electrodo macroporoso), permitan la detección de analitos a niveles bajos de concentración. De esta manera se obtendrán sensores más sensibles y además, más selectivos, fruto de la presencia del receptor CB[n].

De acuerdo con el objetivo planteado, se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Preparación y caracterización del material de grafeno y grafeno-CB[n].
2. Desarrollo de un método analítico para la determinación de triptófano con el sensor de grafeno-CB[8].
3. Preparación de los electrodos macroporosos de oro empleando la técnica de Langmuir-Blodgett. Caracterización de la superficie activa mediante voltamperometría cíclica.
4. Modificación de los electrodos macroporosos de oro con CB[n] mediante dos estrategias diferentes: mediante modificación directa con una suspensión de CB[8] o a través de la formación del complejo CB[n]-Ferroceno, generado a partir de ferrocenil hexanotiol (FcS) previamente adsorbido en la superficie electródica.

7.3. Procedimientos.

7.3.1. Electrodo modificado con grafeno y CB[n].

7.3.1.1. *Preparación de grafeno (G) y grafeno-CB[n] (G-CB[n]).*

Los materiales de grafeno utilizados para la modificación del electrodo se sintetizaron en Instituto de Tecnología Química de Valencia, fruto de una colaboración con el grupo del Prof. Hermenegildo García.

La síntesis se realizó a partir de la reducción de una suspensión de óxido de grafeno (GO), en presencia o ausencia del correspondiente homólogo de CB[n]. El GO fue sintetizado por oxidación química de grafito de acuerdo con el método de Hummers [45]. Así, una cantidad de 3 g de láminas de grafito se suspenden en una mezcla de H_2SO_4 (conc)/ H_3PO_4 (conc) (360:40 ml). Posteriormente, se añaden 18 g de KMnO_4 bajo refrigeración a una temperatura de 35-40 °C. Tras la adición completa del KMnO_4 , la suspensión resultante se agita durante 30 minutos y posteriormente, se mantiene bajo agitación durante 12 h a 50 °C. La reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se vierte en 400 g de hielo que contienen 3 ml de H_2O_2 al 30%, dejándolo reaccionar durante 4 h. Tras este tiempo la suspensión se filtra y se lava con una disolución 1:10 de HCl (37%) y después, con agua destilada. A continuación, 50 mg del sólido obtenido es exfoliado en 300 ml de agua Milli-Q mediante el uso de ultrasonidos, con una potencia de 400 W durante 2 h. La suspensión acuosa de láminas individuales de GO obtenidas tiene una concentración de 167 mg/l.

El material de G sin CB[n], se obtuvo mediante la reducción química de 100 ml de suspensión de GO (0.167 mg/ml) con 70 μl de hidracina bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se somete a agitación durante 24 h a 100 °C.

Por otra parte, el material de G-CB[n] se preparó mediante el siguiente procedimiento: a 100 ml de la suspensión de GO (0.167 mg/ml) se añaden 20 mg del homólogo correspondiente de CB[n] ($n = 7,8$), la mezcla se somete a ultrasonidos durante 5 minutos y se agita a 40 °C durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se añaden 70 μl de hidracina y se agita la suspensión durante 24 h a 100 °C.

Tras las 24 h, las suspensiones de G y G-CB[n] se centrifugan a 9000 rpm durante 15 minutos descartando, posteriormente, la disolución sobrenadante. El residuo sólido se lava con 10 ml de agua Milli-Q y se centrifuga a 9000 rpm durante 15 minutos, repitiendo el ciclo de lavado una vez más. El residuo se recoge y se liofiliza con el objetivo de obtener un material seco que será utilizado para la modificación del electrodo de trabajo.

7.3.1.2. Modificación del electrodo.

Se utilizó un electrodo de carbón vítreo (GCE; superficie de 3 mm de diámetro) como electrodo de trabajo que será modificado tanto con grafeno (GCE/G) como con grafeno/CB[n] (GCE/G-CB[n]).

Previamente a la modificación del electrodo, éste se preparó según el procedimiento descrito en la sección 3.3 (procedimientos generales). La modificación de la superficie se realizó como sigue: una suspensión de 0.3 mg/ml de G o de G-CB[n] en agua, se somete a ultrasonidos durante 30 minutos con el fin de obtener una suspensión homogénea. A continuación, una alícuota 10 μ l de la correspondiente suspensión, se deposita sobre la superficie electródica y se deja secar a 40 °C durante 30 minutos en la estufa.

Una vez el electrodo se encuentra modificado se realizan barridos de potencial entre -0.2 y 1.3 V en electrolito soporte y a una V_b de 100 mV/s hasta obtener una señal reproducible.

7.3.1.3. Medidas electroquímicas.

Los voltamperogramas cíclicos se registraron a una V_b de 100 mV/s en tampón fosfato 0.1 M a pH = 7.0 utilizando disoluciones de concentración 1.0×10^{-3} M de cada una de las sondas redox empleadas (FcOH, MV^{2+} y DOP).

Para la determinación de TRP se utilizó la DPV como técnica de medida bajo las siguientes condiciones: se acumuló durante 150 s a un potencial de 0.3 V, llevando a cabo el barrido entre 0.3 y 1.2 V con un valor de “a” de 80 mV y una $V_b = 30$ mV/s ($\Delta E_s = 15.0$ mV y $t_s = 0.5$ s).

7.3.1.4. *Preparación de las muestras para el análisis de TRP con el sensor de G-CB[8].*

La aplicación del método analítico optimizado con el sensor desarrollado se llevó a cabo en dos muestras: suero humano y un producto farmacéutico.

La muestra de sangre se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm y 4 °C. El suero se separa con cuidado mediante una jeringa y, tras separarlo en diferentes alícuotas, se almacena a 4 °C hasta ser analizado. Previamente al análisis, se eliminan las proteínas mediante la adición una disolución al 5 % (v/v) de ácido perclórico y dejándose bajo refrigeración durante toda la noche. Antes de ser analizadas, las muestras se centrifugan a 6000 rpm durante 10 minutos separando el sobrenadante y desechando el residuo sólido.

La otra muestra analizada consistió en pastillas para consumo humano (El Reco, 400 mg de TRP/ pastilla). El peso medio por pastilla, calculado a partir de 20 pastillas, fue de 581 mg. Se pesa con exactitud una cantidad de alrededor de 10 mg de producto farmacéutico triturado previamente y se disuelve en una mezcla MeOH/H₂O (50/50, v/v). La disolución se somete a ultrasonidos, se filtra con un filtro de jeringa de 0.45 µm y se diluye a 50 ml con MeOH/H₂O (50/50, v/v).

7.3.2. Electrodos macroporosos.

7.3.2.1. *Preparación de las placas de oro.*

Las placas de oro fueron cortadas en piezas de 1.0 × 1.5 cm con una punta de diamante. Previamente a la deposición del molde, éstas fueron modificadas mediante la formación de una lámina empaquetada de cisteamina para asegurar una superficie hidrofílica. La modificación se realizó sumergiendo las muestras en una disolución de concentración 10 mM de cisteamina en etanol durante una noche. Esta modificación se lleva a cabo después de un proceso de lavado con disolución piraña durante 10 minutos.

7.3.2.2. *Empleo de la técnica Langmuir-Blodgett.*

La preparación del molde de los electrodos macroporosos se realizó mediante la deposición de láminas de partículas de sílice de 330 nm previamente derivatizadas con

aminopropiltriethoxisilano (10 mg/ml). Las partículas se lavan cuidadosamente con etanol mediante procesos de ultrasonidos y centrifugación. A continuación, se resuspenden en 2 ml de una mezcla de cloroformo:etanol (80:20, v/v). Tras limpiar y preparar el equipo, las partículas se dispersan sobre la cubeta llena de agua destilada y, tras dejar evaporar el disolvente (cloroformo:etanol), se obtiene la película de Langmuir mediante compresión de las barreras hasta que se alcanza un valor de presión superficial prefijado al cual, el área ocupada por las moléculas en la superficie no varía. Una vez la película está formada, se procede a sumergir las muestras para la transferencia de la lámina sobre las placas de oro. El proceso de modificación de las placas se realiza capa a capa y se encuentra controlado por el programa correspondiente.

7.3.2.3. Electrodeposición de oro.

Una vez preparado el molde con las partículas de sílice sobre los sustratos de oro, se realiza la electrodeposición de oro para la preparación de los electrodos porosos. Para ello, la placa de oro con el molde de partículas funcionará como electrodo de trabajo en una típica celda electroquímica de 3 electrodos, utilizando un electrodo de Ag/AgCl (KCl 3 M) como electrodo de referencia y una malla de platino como electrodo auxiliar. Se utiliza un baño de oro de concentración 10 g/l y se realiza la electrodeposición mediante cronoamperometría, a un potencial constante de -660 mV, controlando la corriente resultante de la reducción del oro en función del tiempo.

7.3.2.4. Modificación de los electrodos con FcS.

La modificación de la superficie de los electrodos con FcS se realiza sumergiendo el electrodo en una disolución de concentración 1.0×10^{-3} M en etanol durante 6 h. En el caso de modificar con capas mixtas de FcS y pentanotiol (5C-SH), se utiliza una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de ambos en concentración 5.0×10^{-4} M de cada uno, denominando a la modificación como FcS-5C-SH.

7.3.2.5. Medidas electroquímicas.

Tanto la caracterización electroquímica como las medidas de los electrodos modificados se realizaron empleando voltamperometría cíclica en las condiciones que se especificarán para cada caso particular.

7.4. Resultados y discusión.

7.4.1. Sensor de Grafeno/CB[n].

7.4.1.1. *Caracterización de los materiales sintetizados G y G-CB[n] (n = 7 y 8).*

Las muestras de G y G-CB[n] (n = 7, 8) fueron preparadas como se indicó en la sección 7.3.1.1. El grado de oxidación de GO se determinó mediante análisis químico del polvo de GO seco, obteniendo un 37.38 % en peso de contenido de C siendo el resto oxígeno.

Las muestras de G y G-CB[n] fueron caracterizadas mediante espectroscopia Raman siguiendo las bandas D y G correspondientes a materiales de grafeno que aparecen a 1353 y 1594 cm^{-1} , respectivamente (figura 7.4).

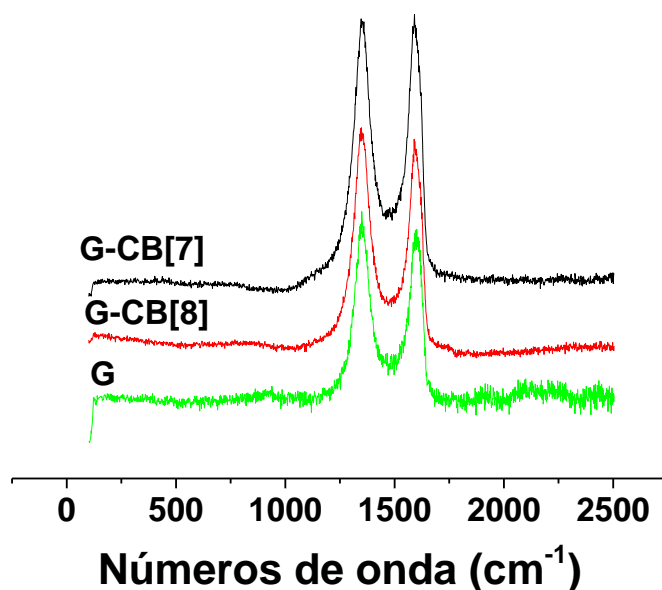


Figura 7.4. Espectros Raman registrados para G, G-CB[7] y G-CB[8].

En el espectro Raman no se observaron picos correspondientes a CB[n] lo que se podría deber a la baja proporción del receptor en los materiales y a la mayor intensidad Raman registrada para el grafeno.

Se tomaron imágenes de TEM de una muestra de polvo seco de G-CB[8] en las que tampoco se consiguió una imagen que confirmara la presencia del receptor, y

únicamente se observaron características relativas al material. Como se observa en la figura 7.5, está constituido por láminas de unos 10 x 12 μm de tamaño, relativamente libre de estructuras de carbono amorfas. El pliegue o arruga que se observa en la figura de mayor aumento es indicativo de la flexibilidad de una lámina del material estudiado. La formación de estos pliegues o arrugas es altamente beneficiosa para mantener la gran superficie activa que caracteriza a este material [46-48]. El hecho de que no se pueda observar la presencia de CB[8] mediante esta técnica podría explicarse suponiendo una buena dispersión del receptor en la capa de grafeno.

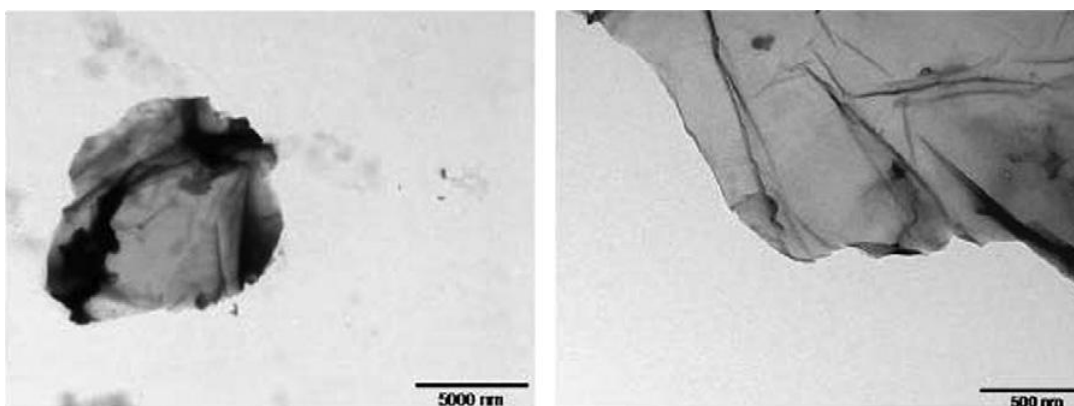


Figura 7.5. Imágenes de TEM para G-CB[8] utilizado para modificar el electrodo.

Por último, se realizó el análisis elemental de cada material para confirmar el éxito en la incorporación del receptor en la etapa de preparación del mismo. En este caso, los resultados que se muestran en la tabla 7.1 permiten confirmar que los materiales sintetizados presentan CB[n] en su estructura, como se puede deducir a partir de los valores de nitrógeno obtenidos, de más del 12 y 14 %, lo que supone un porcentaje de CB[7] y CB[8] en el material de 66 y 78 %, respectivamente.

	% N	% C	%H
G	0.100	73.198	1.230
G-CB[7]	12.192	61.051	2.564
G-CB[8]	14.310	48.971	2.635

Tabla 7.1. Resultados obtenidos mediante análisis elemental.

7.4.1.2. Caracterización electroquímica de los electrodos GCE/G y GCE/G-CB[n].

Con el objetivo de confirmar la presencia de CB[n] en la superficie, y por tanto, en el material sintetizado, se realizó la caracterización electroquímica del electrodo modificado mediante el uso de distintas sondas. Además, a continuación se estudió la posibilidad de aplicación del electrodo modificado con G-CB[n] como sensor electroquímico. Las sondas elegidas fueron, nuevamente, FcOH, MV^{2+} y $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$.

Se comenzó estudiando la respuesta electroquímica del FcOH en los distintos electrodos modificados, GCE/G y GCE/G-CB[7,8], así como en el electrodo sin modificar.

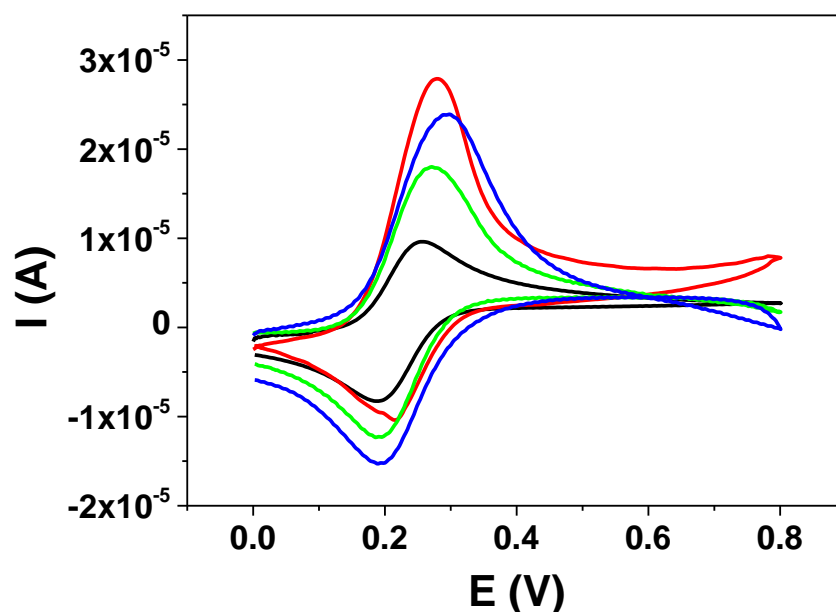


Figura 7.6. Voltamperogramas cíclicos de FcOH (1.0×10^{-3} M) registrados para los distintos electrodos: — GCE, — GCE/G, — GCE/G-CB[7] y — GCE/G-CB[8].

La figura 7.6 muestra como la corriente del FcOH aumenta considerablemente con la modificación GCE/G respecto al electrodo sin modificar, como se podría esperar debido a las propiedades de este material. Además, se observa que el FcOH se aleja de su comportamiento reversible ya que, aunque se mantiene la diferencia entre el

potencial anódico y catódico (ΔE) con un valor de 61 mV, la diferencia entre las intensidades catódica y anódica es diferente a 1, obteniendo un valor de $I_a/I_c = 2.46$.

Por otro lado, se podría confirmar la presencia de cada receptor macrocíclico en la superficie del electrodo debido al cambio que se produce en la respuesta electroquímica respecto al no modificado y al modificado únicamente con grafeno. Como se observó en el capítulo 5, la formación del complejo CB[n]-FcOH en disolución producía una disminución en la intensidad de señal de la respuesta electroquímica de la sonda con la formación del complejo CB[n]-FcOH. Estos mismo resultados son los que se obtuvieron al registrar los voltamperogramas cíclicos del FcOH en los electrodos GCE/G-CB[7] y GCE/G-CB[8]. Como se puede observar en la figura 7.6 (líneas verde y azul) la presencia de CB[n] en la superficie del electrodo provoca una disminución de la intensidad de señal del FcOH respecto al electrodo modificado únicamente con grafeno. Este comportamiento es más acusado para el homólogo CB[7] que para CB[8], sin embargo, la diferencia de potencial entre el pico anódico y catódico es mayor para el GCE/G-CB[8] con un valor de $\Delta E = 98$ mV, frente a 76 mV para GCE/G-CB[7] y 59 mV para el electrodo no modificado. En ambos casos el valor de I_a/I_c es distinto de 1 obteniendo valores de 1.50 y 1.73 para GCE/G-CB[7] y GCE/G-CB[8] respectivamente, lo que indica un comportamiento electroquímico menos reversible.

Como ya se presentó en el capítulo 5, utilizar el MV^{2+} como sonda electroquímica para seguir la formación del complejo con CB[8] puede resultar muy interesante, debido a que la formación del complejo CB[8]- MV^{2+} produce un gran desplazamiento del potencial, pudiendo ser detectado fácilmente.

La figura 7.7 muestra la respuesta electroquímica del MV^{2+} en los electrodos modificados de GCE/G y GCE/G-CB[8] y su comparativa con el electrodo sin modificar.

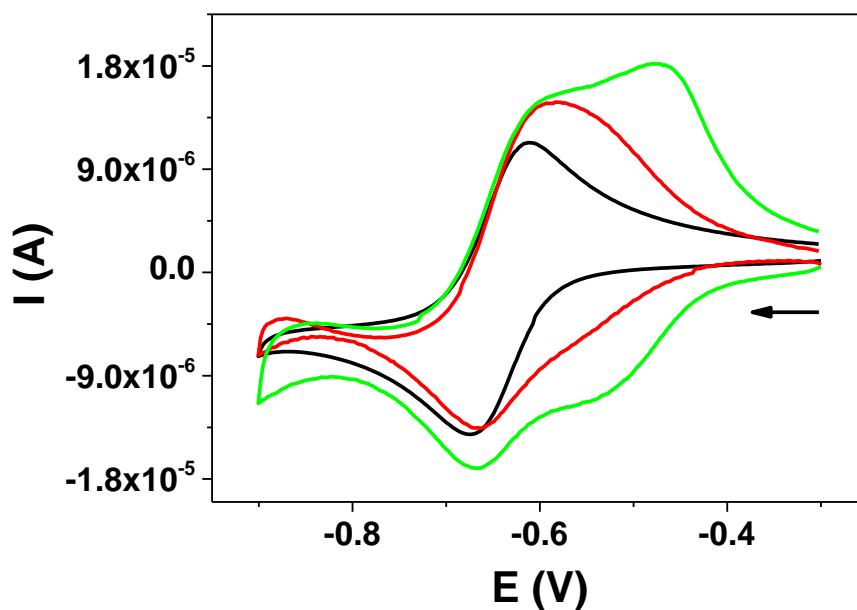


Figura 7.7. Voltamperogramas cíclicos registrados para MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en: — GCE, — GCE/G, — GCE/G-CB[8].

La respuesta electroquímica del MV^{2+} con el electrodo modificado con grafeno resulta habitual para este tipo de electrodos, con un aumento de la corriente (figura 7.7, línea roja) y una disminución ligera (~ 20 mV) del potencial formal hacia valores menos negativos. Por otro lado, al registrar el voltamperograma cíclico del MV^{2+} en el electrodo GCE/G-CB[8], se observa un nuevo par redox a un potencial formal de -0.491 V correspondiente al complejo $CB[8]-MV^{2+}$, pudiendo confirmar de nuevo, la presencia del receptor macrocíclico en el material sintetizado. Este nuevo par redox se encuentra desplazado 152 mV hacia potenciales menos negativos, como sucedía al formar el complejo en disolución y como se comprobó cuando el receptor se encontraba en la superficie electródica en el capítulo 5. A partir de estos resultados se podría concluir la presencia del CB[8] en el material compuesto de grafeno y, además, puesto que se puede monitorizar la onda del analito libre, se deduciría que la cantidad de receptor no es suficiente para cubrir todo el material.

Por otra parte, haciendo una comparativa con los resultados obtenidos con las otras modificaciones utilizadas en el capítulo 5 para esta sonda (figura 7.8), queda claro el efecto de este material proporcionando la mejor intensidad de señal. Esto demostraría

que su uso podría resultar altamente ventajoso en su aplicación en el desarrollo de sensores electroquímicos.

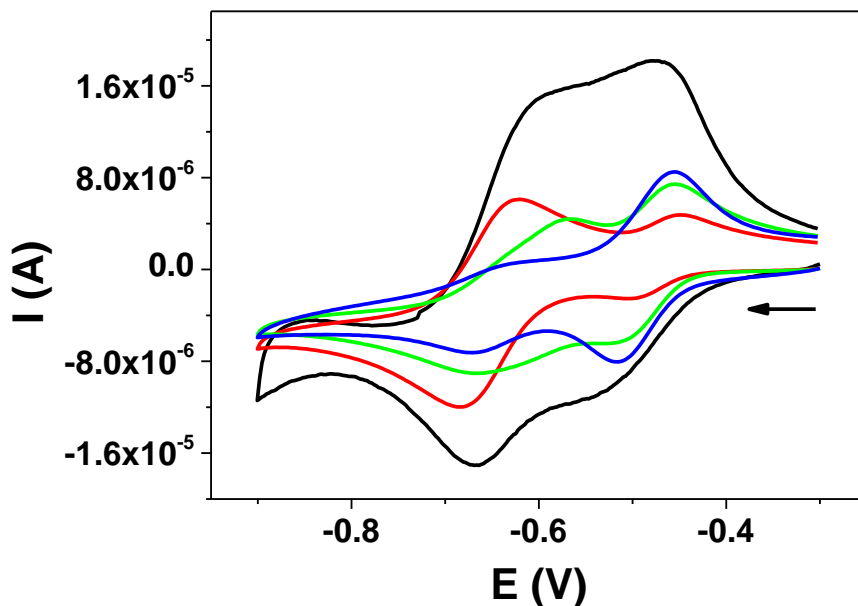


Figura 7.8. Voltamperogramas cíclicos de MV^{2+} (1.0×10^{-3} M) en: — GCE/G-CB[8], — GCE/PVC/CB[8], — GCE/Nafion/CB[8] y — GCE/Membrana de diálisis/CB[8].

Desde la concesión del premio Nobel a Andre Geim y Konstantin Novoselov en 2010, ha sido tan grande el interés en explorar las aplicaciones de este material dentro del electroanálisis que, en relativamente poco tiempo, se han desarrollado un gran número de sensores para la determinación de distintos analitos, incluyendo las biomoléculas DOP y TRP [49-54]. Como ambos analitos interaccionan con los CB[n]s, se abordó su estudio utilizando los electrodos desarrollados.

La figura 7.9 muestra los voltamperogramas cíclicos registrados para la DOP como huésped del CB[8].

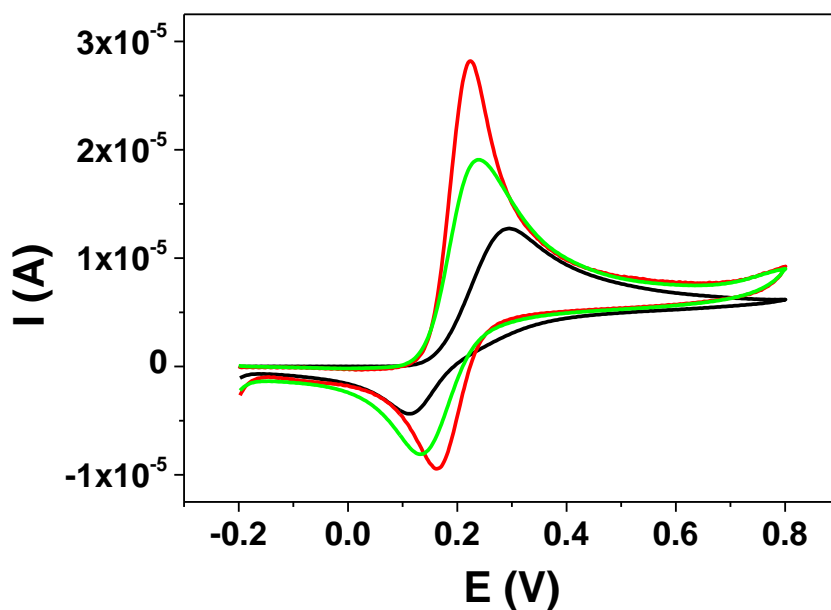


Figura 7.9. Voltamperogramas cíclicos registrados de DOP (1.0×10^{-3} M) en: — GCE, — GCE/G, — GCE/G-CB[8].

Al igual que en estudios previamente realizados por otros autores [55, 56], cuando el electrodo está modificado con grafeno, la señal voltamperométrica de la DOP presenta un aumento de la corriente y una disminución de ΔE_p , de 181 mV a 65 mV frente al electrodo sin modificar, produciendo una respuesta electroquímica más reversible para este compuesto (figura 7.9 línea roja). Cuando el CB[8] se encuentra en la superficie se mantiene la morfología del voltamperograma, sin embargo, debido a la interacción con el receptor se registra una disminución de la intensidad de señal y un ligero aumento en el valor de ΔE_p (107 mV) respecto al GCE/G.

Por otro lado, la figura 7.10 muestra los resultados obtenidos para TRP empleando los electrodos modificados con grafeno y grafeno-CB[8].

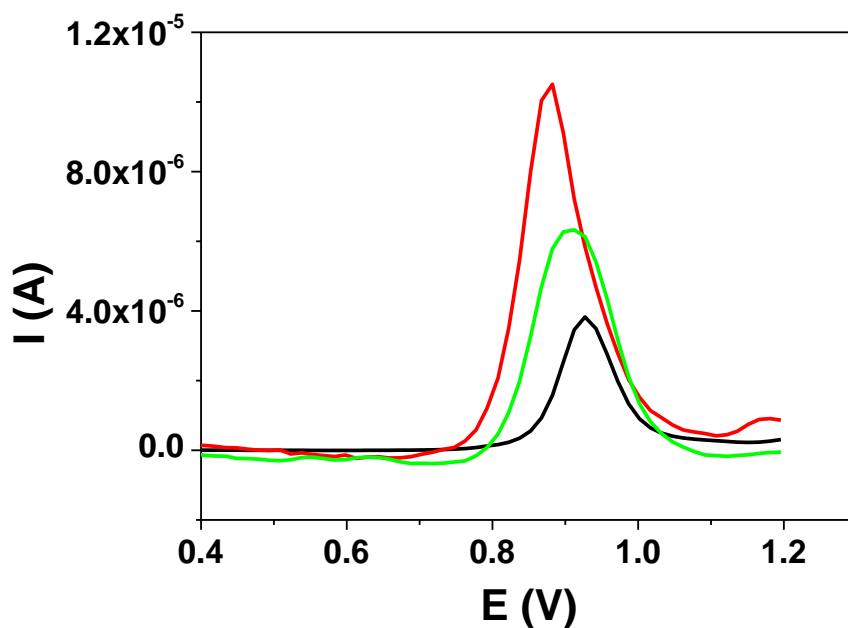


Figura 7.10. Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados de TRP (5.0×10^{-5} M) en: —GCE, — GCE/G, — GCE/G-CB[8].

Al registrar la señal de oxidación del TRP en el electrodo GCE/G se produce una disminución del potencial de oxidación del analito junto con un aumento considerable de la corriente (2.9 veces respecto al no modificado). Cuando el CB[8] se encuentra en la superficie, se produce una disminución de la intensidad de oxidación respecto a la modificación con grafeno, acompañada de un pequeño aumento del potencial lo que se atribuye a la formación del complejo CB[8]-TRP. Al comparar este comportamiento con el electrodo sin modificar, se observa que la combinación G-CB[8] conduce a un potencial de oxidación menor y un aumento de 1.8 veces la corriente respecto al electrodo de carbón vítreo.

La respuesta electroquímica del TRP en estos electrodos resulta similar a la obtenida para la modificación Nafion y Nafion/CB[8] ($I_p \text{ GCE/Nafion/CB[8]}/I_p \text{ GCE} = 1.7$), se presentó en el capítulo anterior, por lo que se podría esperar que tras la optimización de las diferentes variables se puedan mejorar los límites de detección. Por esta razón se decidió llevar a cabo el estudio de la respuesta del sensor con la concentración de analito, así como de posibles interferentes que pueden acompañar al TRP en una muestra real.

7.4.1.3. Desarrollo del método analítico para la determinación de TRP.
Optimización de variables.

Una vez más, para el desarrollo del método de análisis se lleva a cabo la optimización de las variables químicas e instrumentales que afectan a la intensidad de oxidación del complejo, con el objetivo de obtener la mayor señal analítica. En este caso el pH de trabajo elegido para el electrolito fue pH = 2.2 tampón fosfato ya que, en el capítulo anterior, se comprobó que era el mejor pH para la formación del complejo al encontrarse la amina del TRP cargada positivamente y poder estabilizarse el complejo formado.

Con respecto a la influencia de la concentración de electrolito soporte en la señal analítica, la figura 7.11 muestra los resultados obtenidos al variar la concentración del tampón fosfato entre 0.05 y 0.50 M.

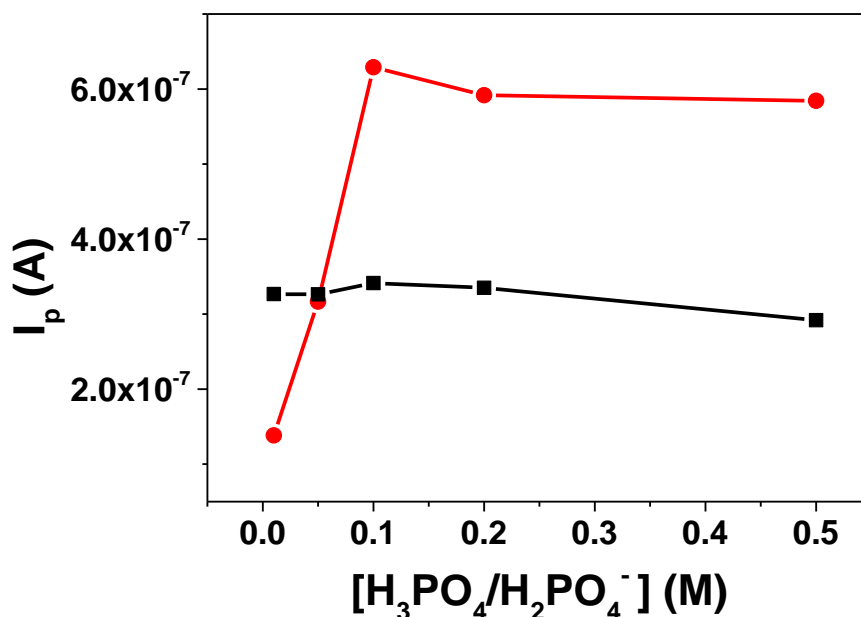


Figura 7.11. Variación de la I_p del TRP (5.0×10^{-6} M) con la concentración de electrolito en:
— GCE/G, — GCE/G-CB[8].

La intensidad de oxidación del TRP aumenta según aumenta la concentración de electrolito cuando el electrodo está modificado con G-CB[8], sin embargo, el valor de la intensidad se mantiene prácticamente constante cuando se registra la señal con el electrodo GCE/G. Resultados similares se presentaron en el capítulo anterior en la

determinación de TRP utilizando el electrodo de GCE/Nafion/CB[8]. De nuevo, los resultados sugieren que el aumento en la intensidad de pico con la concentración de electrolito se debe a la presencia del receptor macrocíclico en la superficie electródica. El valor de la concentración de electrolito elegido fue 0.50 M debido a que se observó una ligera disminución, de aproximadamente 30 mV, del potencial de pico con el aumento de la concentración de electrolito, obteniendo el valor más pequeño para 0.50 M.

Una vez optimizadas las variables químicas y tomando las mismas variables instrumentales que en el caso del GCE/Nafion/CB[8], se optimizó el tiempo de acumulación a distintas concentraciones de TRP.

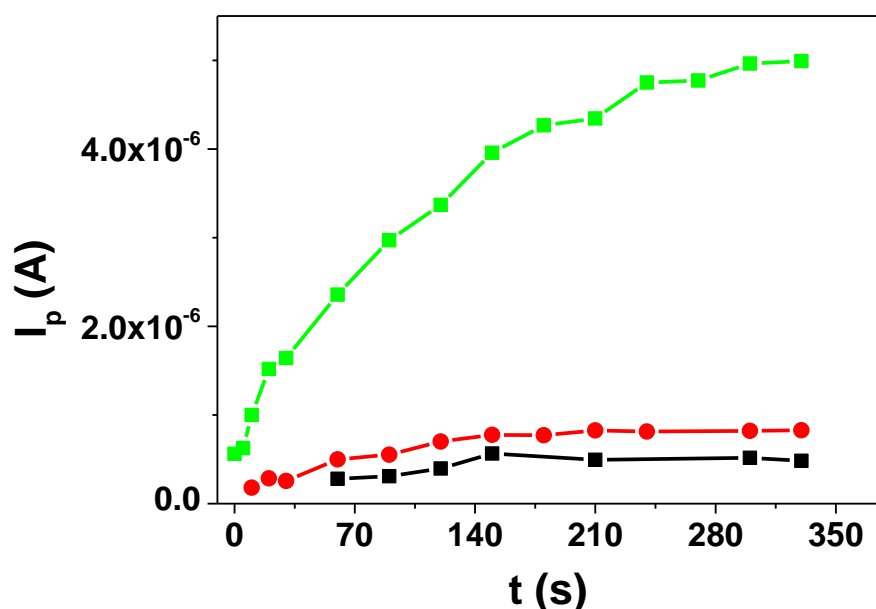


Figura 7.12. Variación de la I_p con el tiempo de acumulación para: — $[TRP] = 3.0 \times 10^{-7} M$,
— $[TRP] = 7.0 \times 10^{-7} M$ y — $[TRP] = 3.0 \times 10^{-6} M$.

Como se muestra en la figura 7.12, se observa que la intensidad de señal aumenta con el tiempo de acumulación, hasta un valor en el que se alcanza el equilibrio entre la concentración de TRP en la superficie del electrodo y la concentración en disolución y a partir del cual, no se aprecia variación significativa de la intensidad. El equilibrio se alcanza a menor tiempo cuanto mayor es la concentración de analito. En base a esto, se

escogió un tiempo de acumulación al potencial inicial de 150 s para el resto de experimentos.

A modo de resumen, en la tabla 7.2 se muestran las condiciones químicas e instrumentales empleadas en el análisis de TRP con el electrodo GCE/G-CB[8].

Variable	Valor óptimo
pH	2.2
[H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻] (M)	0.50
E ₀ – E _f (V)	0.3-1.2
a (mV)	80
ΔE _s (mV)	15.0
t _s (s)	0.5
V _b (mV/s)	30

Tabla 7.2. Variables óptimas para la determinación de TRP en GCE/G-CB[8].

7.4.1.4. Influencia de la concentración de TRP. Parámetros analíticos.

Bajo las condiciones presentadas en la tabla 7.2, se evaluó la respuesta del sensor con la concentración de analito. La figura 7.13 muestra el incremento de la intensidad de señal con la concentración de TRP.

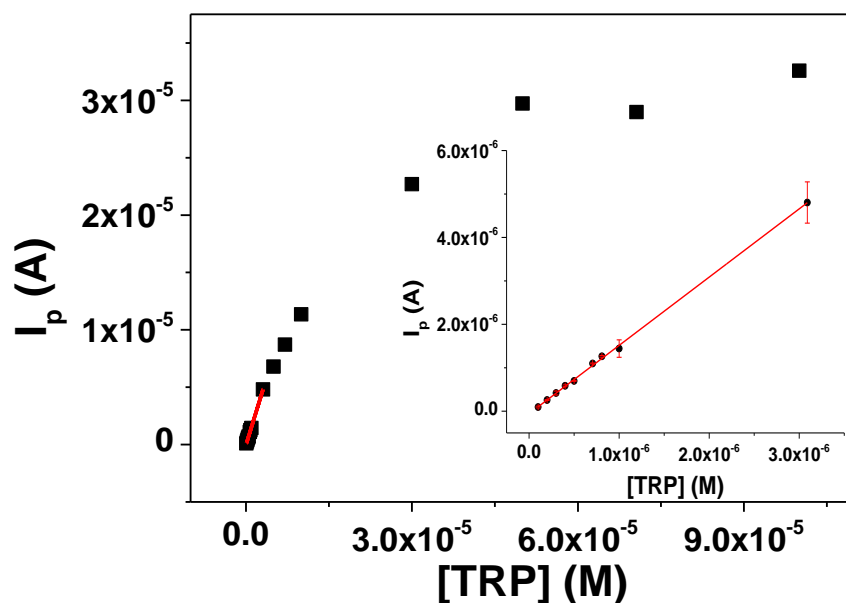


Figura 7.13. Influencia de la concentración de TRP en la I_p utilizando el electrodo GCE/G-CB[8].

Se observa que la intensidad de oxidación aumenta linealmente con la concentración de TRP en un intervalo comprendido entre 2.00×10^{-7} y 3.10×10^{-6} M según la ecuación $I_p = (-6 \pm 1) \times 10^{-8} + (1.57 \pm 0.01) [\text{TRP}] \text{ (M)}$. Se calcularon los valores de LD ($3\sigma/\text{pte}$) y de LC ($10\sigma/\text{pte}$), resultando de 0.9×10^{-7} M y 2.7×10^{-7} M, respectivamente. Estos valores son ligeramente mejores que los obtenidos en el capítulo 6 con el sensor de Nafion/CB[8] y mejoran los límites en comparación con otros métodos electroanalíticos, incluso utilizando grafeno como material modificador, como se muestra en la tabla 7.3.

Electrodo Modificado	LD (μM)	Referencia
Nafion/TiO ₂ -GR/GCE	0.7	[57]
TiO ₂ -GR/4-ABSA/GCE	0.3	[51]
PTCA-GS/GCE	0.06	[50]
Co ₃ O ₄ /GR/Nafion/GCE	0.01	[58]
ERGO/GCE	0.1	[53]
G-CB[8]/GCE	0.09	Presente trabajo

Tabla 7.3. Comparativa valores de LD con otros sensores de grafeno para el análisis de TRP. GR o GS: grafeno, 4-ABSA: ácido aminobenzosulfónico, PTCA = ácido 3,4,9,10-perileno-tetracarboxílico, ERGO: grafeno electroquímicamente reducido.

Respecto a los valores de exactitud y precisión obtenidas, la tabla 7.4 muestra los valores de Er y D.E.R. (%) para diferentes concentraciones ensayadas.

Concentración (M)	Er (%)	D.E.R. (n = 5) (%) (Repetitividad)	D.E.R. (n = 5) (%) (Reproducibilidad)
3.00×10^{-7}	6.7	7.7	10.3
4.00×10^{-7}	1.9	5.9	3.7
8.09×10^{-7}	3.8	3.8	1.5
3.09×10^{-6}	3.3	3.3	9.9

Tabla 7.4. Resultados obtenidos de la exactitud y precisión a distintas concentraciones dentro del intervalo de respuesta lineal.

La tabla 7.4 resume los resultados obtenidos tanto en términos de repetitividad como reproducibilidad, para diferentes electrodos modificados siguiendo el mismo procedimiento y empleando el mismo material de G-CB[8]. Los valores obtenidos muestran que el sensor desarrollado presenta unas propiedades analíticas adecuadas para ser utilizado para la determinación de TRP en muestras reales con suficiente exactitud y precisión.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad de una única modificación mediante medidas de una concentración de 8.09×10^{-7} M de TRP en días sucesivos, obteniendo un valor

de D.E.R. mejor del 15 % durante 11 días, a partir del cual se produce una disminución notable de la intensidad de oxidación.

7.4.1.5. Estudio de interferencias.

La selectividad del sensor se evaluó frente a la presencia de diferentes aminoácidos que puedan estar junto con el analito en una muestra: L-tirosina (TIR), L-cisteína (CIS), D-fenilalanina (PHE) y arginina (ARG).

Para la realización del estudio se monitorizó el cambio producido en la señal analítica de una disolución de TRP de concentración 8.09×10^{-7} M cuando se adicionan concentraciones crecientes de interferente. Se consideró que se produce interferencia cuando el cambio en la señal de TRP es superior al valor máximo obtenido de Er (%) para el sensor GCE/G-CB[8] (Er = 6.7 %).

En primer lugar se estudió la interferencia producida por la TIR. Este aminoácido presenta, en las condiciones de medida, una señal de oxidación a un potencial de pico ($E_p = 0.898$ V) muy parecido al del analito, lo que conduce a un aumento en la intensidad de oxidación del TRP al aumentar la concentración de TIR. Como se muestra en la figura 7.14, la TIR comienza a producir un cambio significativo en la señal cuando se encuentra en la disolución con TRP en una concentración superior a 1.62×10^{-6} M, lo que corresponde a una proporción [interferente]/[analito] del doble.

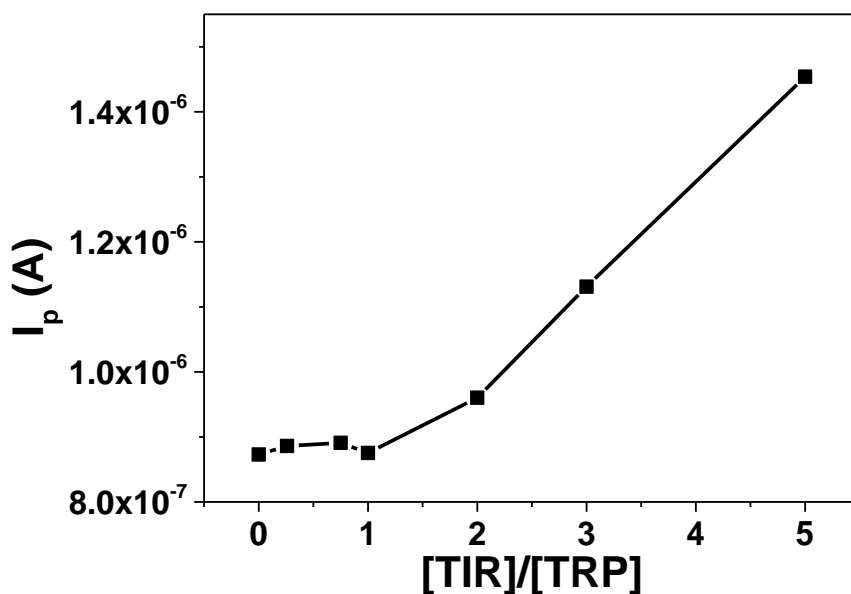


Figura 7.14. Variación de I_p de TRP con concentraciones crecientes de TIR.

El resto de aminoácidos estudiados como posibles interferentes no presentan señal electroquímica en las condiciones de medida. La presencia de PHE o CIS, junto al analito, prácticamente no producen interferencia permitiendo concentraciones de hasta 4.06×10^{-5} M y 8.09×10^{-5} M respectivamente, lo que corresponde a una proporción [interferente]/[analito] de 50 y 100 veces en cada caso. Sin embargo, en el caso de ARG como interferente, concentraciones superiores a 1.67×10^{-6} M, que corresponde a una proporción [interferente]/[analito] = 2, ya produce interferencia en la determinación de TRP (figura 7.15).

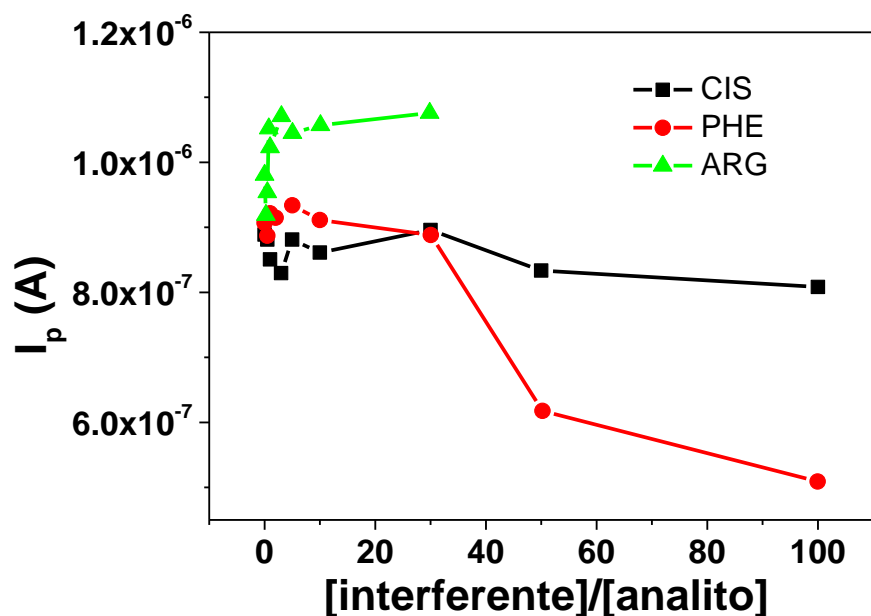


Figura 7.15. Variación de la I_p de TRP con concentraciones crecientes de interferente.

Estos resultados son similares o incluso mejoran los obtenidos para el sensor de Nafion/CB[8]. Como ya se ha comentado previamente, el estudio de la interacción de los 20 aminoácidos con CB[8] presentado por Rajgariah y col., concluye que únicamente 3 de ellos son incluidos en el CB[8]: PHE, TIR y TRP, siendo la TIR la que, en este caso, produce la mayor interferencia.

7.4.1.6. Determinación de TRP en muestras reales con el sensor GCE/G-CB[8].

Se procedió a la aplicación del método desarrollado mediante el análisis de TRP en dos muestras reales: suero humano y un preparado farmacéutico. En ambos casos se utilizó la adición estándar como método de cuantificación.

Determinación de TRP en suero humano.

La muestra de sangre se preparó según el procedimiento indicado en la sección 7.3.1.4. Se midieron disoluciones diferentes de muestra sin suplementar y suplementada con concentraciones crecientes de TRP en un intervalo entre 5.88×10^{-7} M y 2.94×10^{-6}

M. El aumento de la corriente obtenido con el aumento de la concentración se ajusta a la ecuación $I_p \text{ (A)} = (1.0 \pm 0.3) \times 10^{-7} + (0.37 \pm 0.02) [\text{TRP}] \text{ (M)}$, $r = 0.992$ (figura 7.16).

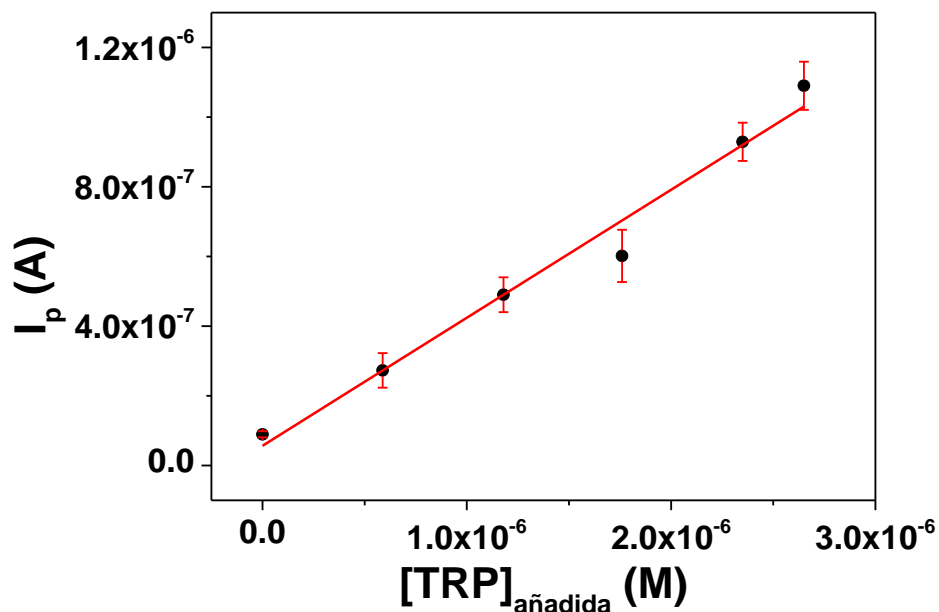


Figura 7.16. Incremento de la I_p con la concentración añadida de TRP en la muestra de suero.

El valor medio de la concentración de TRP en muestra fue de $42.2 \pm 4.0 \mu\text{M}$ ($n=3$). Este valor concuerda con el obtenido para el sensor de Nafion/CB[8] y con la concentración de TRP en sangre en pacientes sanos [59, 60].

La tabla 7.5 presenta los valores de recuperación y de D.E.R. (%) obtenidos para diferentes concentraciones añadidas de TRP en suero, demostrando que el sensor desarrollado resulta adecuado para su análisis en este tipo de muestras.

[TRP]_{añadida} (M)	Recuperación (%)	D.E.R. (%) (n = 3)
5.88×10^{-7}	106	6.9
1.18×10^{-6}	71	10.2
1.76×10^{-6}	93	12.5
2.35×10^{-6}	98	5.9
2.94×10^{-6}	108	6.3

Tabla 7.5. Valores de recuperación y reproducibilidad obtenidos en la determinación de TRP en muestra de suero.

Determinación de TRP en preparado farmacéutico.

El sensor desarrollado se utilizó también para el análisis de TRP en un producto farmacéutico en forma de cápsulas. Para ello, se pesó, exactamente, una cantidad aproximada de 10 mg de muestra. Tras disolverse en una mezcla de MeOH/H₂O (50/50, v/v), la muestra se filtra a través de un filtro de jeringa de 0.45 μ m y se diluye a 50 ml. A continuación, diferentes alícuotas de 40 μ l sin suplementar o suplementadas con concentraciones crecientes de TRP entre 2.94×10^{-7} M y 3.23×10^{-6} M, se diluyen en 25 ml con electrolito soporte.

A partir de los voltamperogramas diferenciales de impulsos obtenidos de cada una de estas disoluciones, se representa la respuesta electroquímica del TRP en la muestra empleando el sensor desarrollado (figura 7.17), pudiéndose observar como aumenta la intensidad de oxidación en cada muestra que ha sido suplementada con cantidades crecientes de TRP.

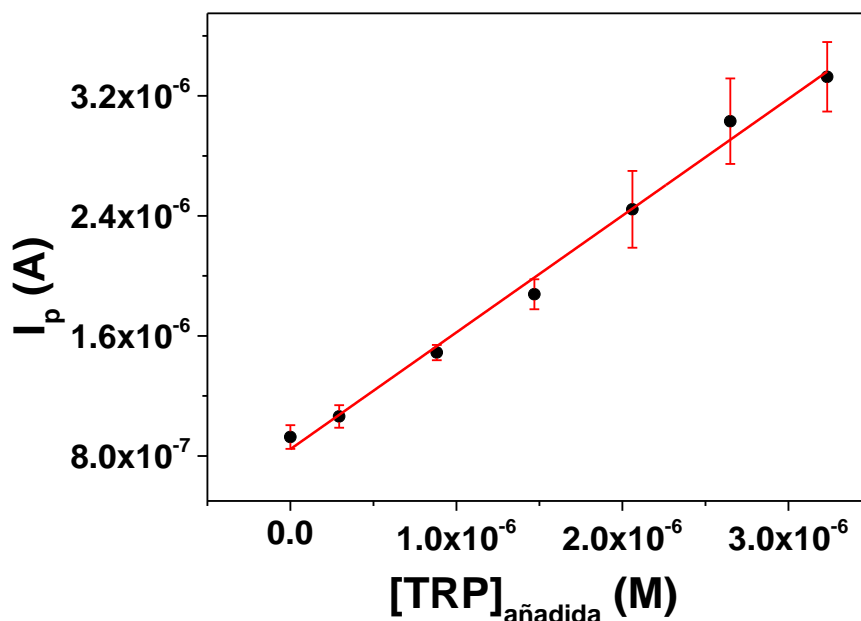


Figura 7.17. Incremento de la I_p con la concentración de TRP añadida en la muestra de preparado farmacéutico.

El incremento lineal de la intensidad de oxidación con la concentración de TRP en el intervalo comprendido entre 2.94×10^{-7} M y 3.23×10^{-6} M, responde a la ecuación de la recta: I_p (A) = $(8.7 \pm 0.5) \times 10^{-7} + (0.73 \pm 0.03) \times 10^{-1} [TRP]_{añadida}$ (M); $r = 0.996$. La concentración de TRP encontrada en la muestra fue de 379 ± 23 mg/cápsula ($n = 3$). El preparado farmacéutico contiene 400 mg de TRP por cápsula, por lo que la recuperación fue del 95 %.

La tabla 7.6 muestra que los valores de recuperación y de D.E.R. (%) obtenidos para diferentes concentraciones añadidas de TRP para esta muestra. El valor medio de D.E.R. calculado fue del 7.5 %, siendo un resultado adecuado para la aplicación de método desarrollado en este tipo de muestras.

[TRP]_{añadida} (M)	Recuperación (%)	D.E.R. (%) (n = 3)
2.94×10^{-7}	90	8.1
8.82×10^{-7}	96	4.8
1.47×10^{-6}	94	5.5
2.06×10^{-6}	105	10.5
2.65×10^{-6}	107	8.5

Tabla 7.6. Valores de recuperación y de reproducibilidad obtenidos en la determinación de TRP en la muestra farmacéutica.

Igual que en el caso anterior, los resultados obtenidos muestran que el sensor desarrollado puede ser aplicado para el análisis de TRP en muestras reales.

7.4.2. Desarrollo y modificación de electrodos macroporosos de oro.

7.4.2.1. *Preparación de electrodos macroporosos. Técnica de Langmuir-Blodgett.*

Los electrodos macroporosos se preparan mediante la infiltración de un molde de partículas de sílice y la posterior disolución del molde, quedando la estructura porosa. Para la preparación del molde, se depositan partículas de sílice sobre un sustrato de oro mediante la técnica de LB.

La técnica de LB fue desarrollada para transferir capas de moléculas desde el agua a una superficie sólida. Uno de sus “progenitores” fue Irving Langmuir cuando se encontraba centrado en el estudio del ensamblaje de moléculas anfifílicas en una interfaz aire-agua [25]. En el desarrollo de la técnica fue esencial la colaboración de Katherine Burr Blodgett, quien estudiaba la transferencia de estas moléculas a una superficie sólida [61]. De esta forma, finalmente, la técnica recibió ambos nombres.

El fundamento principal de esta técnica se encuentra esquematizado en la figura 7.18. Las moléculas anfifílicas que forman una capa sobre la superficie de agua, presentan la cabeza polar inmersa en el agua, mientras que la cadena hidrocarbonada queda en el aire. Así, mediante inmersión de un soporte sólido en el agua, las moléculas pueden ser transferidas a dicho soporte. Cuando el sustrato se extrae del agua de nuevo, otra capa de moléculas se transfiere sobre la depositada anteriormente, quedando los grupos hidrofílicos de ambas capas juntos. Repitiendo este proceso de inmersión y extracción se obtienen multicapas sobre los soportes.

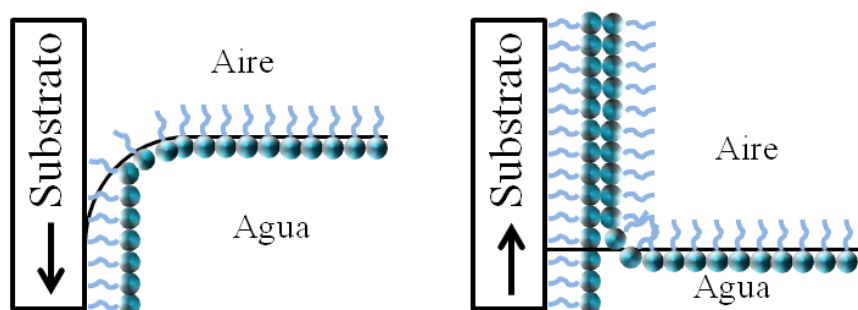


Figura 7.18. Esquema del fundamento de transferencia de una capa de moléculas a un sustrato.

Con el objetivo de obtener capas bien ordenadas, antes de transferir las moléculas a los soportes sólidos, la superficie molecular de la interfaz aire-agua se comprime empleando unas barreras. Este proceso de compresión se puede controlar monitorizando la presión superficial en función del área por molécula. En la figura 7.19, se puede ver un gráfico típico de la compresión de una película, donde se distinguen tres tipos de estados que se pueden clasificar análogamente a los estados de la materia: gas, líquido y sólido. Al inicio de la compresión las moléculas están lejos unas de otras por lo que no hay ninguna interacción entre ellas. Cuando la compresión empieza, interacciones electrostáticas o estéricas entre las moléculas producen un aumento en la presión superficial, alcanzando la zona denominada estado líquido. La subida pronunciada de la presión corresponde a las moléculas en contacto formando una monocapa de moléculas sobre la superficie de agua. Un aumento de la compresión en este punto, produciría la ruptura de la monocapa provocando capas apiladas una encima de otra.

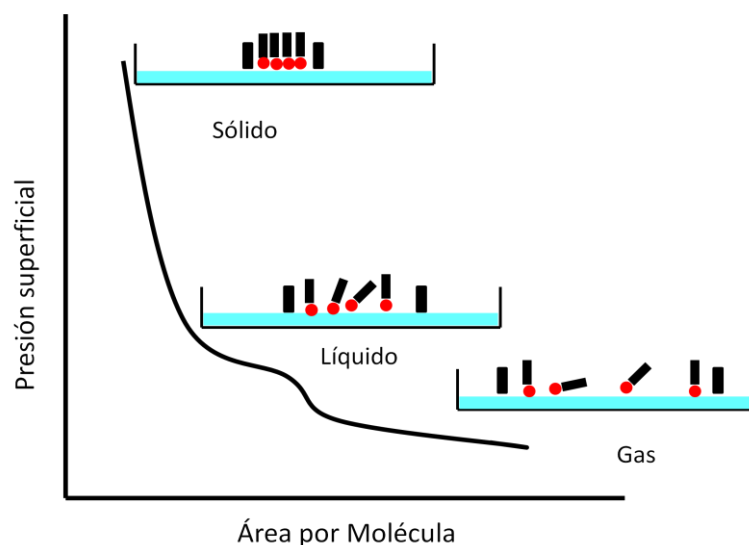


Figura 7.19. Esquema de la compresión de las moléculas en el interfaz aire-agua mediante la representación presión superficial frente a área por molécula.

El empleo de la técnica de LB en combinación con partículas coloidales requiere la formación de una capa estable sobre la superficie del agua. Para ello, se utilizan partículas de sílice modificadas mediante reacción de sililación, con el fin de cambiar las propiedades de la superficie de las partículas de hidrofílicas a más hidrofóbicas [62, 63]. Gracias a la funcionalización de la superficie de las partículas se evita que éstas se

hundían en el agua cuando se dispersan sobre ella (figura 7.20A). No obstante, se ha demostrado que para tamaños de partícula pequeños (180-360 nm), no sería necesaria esta modificación en la superficie de las mismas para obtener una monocapa estable sobre la superficie de agua [64]. Como ya se ha mencionado, la compresión de las moléculas se controla monitorizando la presión superficial del agua (figura 7.20B). Al contrario del proceso esquematizado en la figura 7.18, la técnica de LB únicamente transfiere las partículas cuando el sustrato sale del agua por lo que, para formar una capa, se tiene que cumplir un ciclo de entrada y salida (figura 7.20C). Esta técnica permite la formación controlada de capas en sustratos que sean lo suficientemente hidrofílicos para la formación de los meniscos en la interfaz entre el sustrato y el líquido.

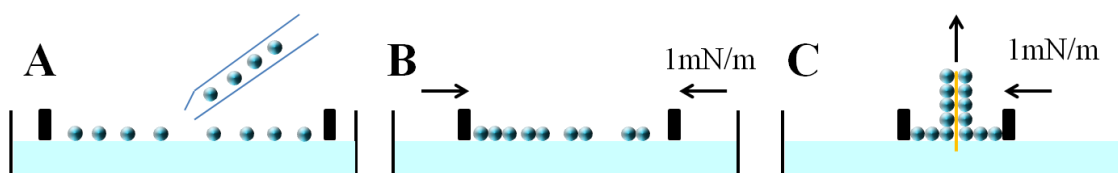


Figura 7.20. Diferentes etapas en el proceso de Langmuir-Blodgett. A) dispersión de las moléculas de sílice sobre la superficie de agua, B) compresión controlada de las barreras para formar la lámina de Langmuir y C) transferencia de la lámina al sustrato manteniendo una presión superficial fija.

El equipo de LB utilizado en los experimentos se muestra en la figura 7.21. Presenta una superficie de 1200 cm² que permite la obtención de monocapas de buena calidad.

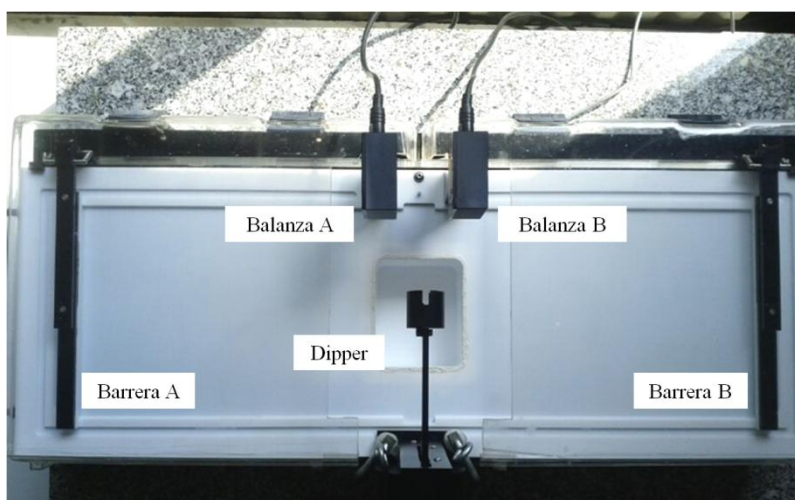


Figura 7.21. Equipo de LB utilizado.

Las barreras A y B junto con las balanzas A y B permiten comprimir la lámina simultáneamente, midiendo la presión superficial del agua. Una vez que se llega al estado de compresión final, la presión superficial permanece constante y, en ese momento, se introduce el sustrato mediante el mecanismo de inmersión (dipper). La película se transfiere durante la extracción del mismo a una velocidad de 1mm/min. El equipo se encuentra tapado por una carcasa desde el momento inmediatamente posterior a la dispersión de las partículas para evitar la contaminación o la degradación de las capas transferidas.

La figura 7.22 muestra una curva de presión superficial respecto al área obtenida con el programa de control del equipo. La transferencia ocurre entre 5 y 10 mN/m. Mientras las capas de partículas están siendo transferidas, las barreras continúan cerrándose para mantener el valor de la presión superficial constante.

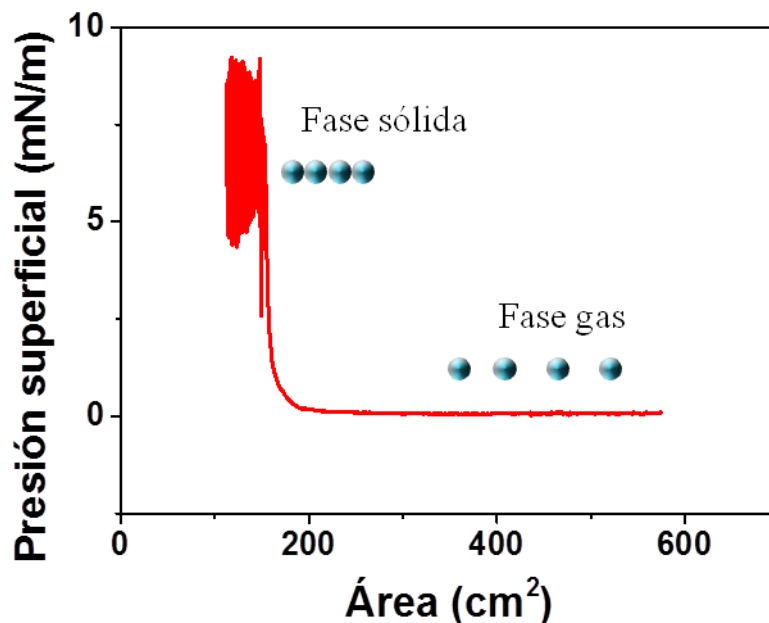


Figura 7.22. Relación presión superficial con el área durante la compresión de la película.

El control que sobre el proceso ofrece esta técnica asegura la obtención de estructuras de gran calidad en comparación con las obtenidas con otras técnicas. Además, es posible controlar el número de capas depositadas y evitar la presencia de fracturas en la estructura.

Tras la preparación de los moldes de partículas sobre las placas de oro, se procede a la infiltración de los mismos mediante deposición electroquímica del metal. Para ello, la placa de oro que presenta depositadas las capas de partículas de sílice, se prepara conectando un cable y delimitando la zona a electrodepositar pintando el resto del soporte con un esmalte, como se esquematiza en la figura 7.23. De esta manera se podrá controlar el área geométrica depositada.

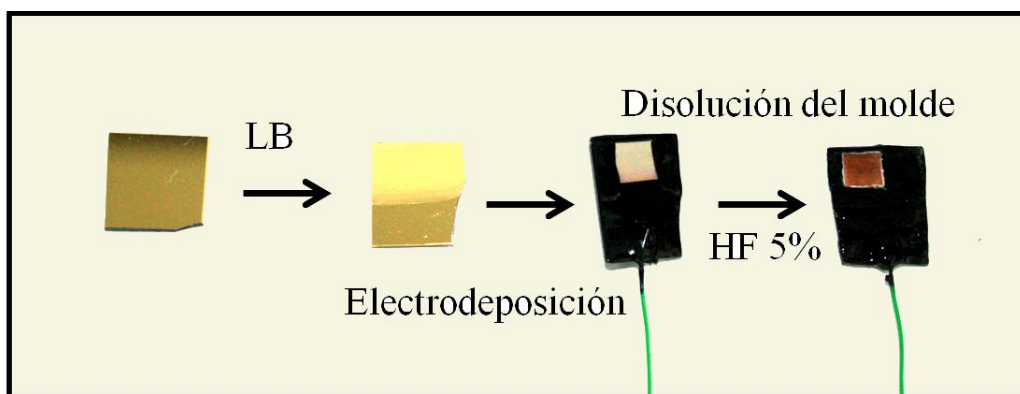


Figura 7.23. Esquema de preparación de los electrodos macroporosos.

Se utiliza un sistema típico de celda electroquímica con tres electrodos donde el molde funcionará como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl (KCl 3M) como electrodo de referencia y una malla de platino como contraelectrodo. El electrodo auxiliar debe tener un área activa grande, por lo menos el doble que el área del electrodo de trabajo, con el fin de evitar problemas anódicos durante la electrodeposición. Los electrodos se sumergen en un baño de oro de concentración 10 g/l. Controlando que el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se encuentren en posición paralela y a una cierta distancia se asegura una velocidad de crecimiento homogénea en todo el substrato.

La electrodeposición comienza desde el substrato de oro y el oro depositado va creciendo según se aplica un potencial de -0.66 V que produce la reducción del catión metálico del baño, recubriendo así, los huecos alrededor de las partículas de sílice [27, 65, 66].

La corriente se registra en función del tiempo de electrodeposición según se muestra en figura 7.24. Se observan oscilaciones muy regulares durante la infiltración de oro. Los parámetros fundamentales que afectan a la corriente durante la electrodeposición son el potencial aplicado, la composición y temperatura del baño de oro y el área activa del electrodo de trabajo. Como el potencial permanece constante durante el proceso de electrodeposición y la composición y temperatura no sufren cambios muy significativos, la respuesta amperométrica con el tiempo se debe exclusivamente a la superficie activa del electrodo. De esta manera, la respuesta que se espera en un proceso de electrodeposición sobre un electrodo plano es un valor de corriente constante. Sin embargo, la presencia del molde sobre la superficie del electrodo provoca la oscilación en la corriente debido a la variación periódica de la superficie disponible para la electrodeposición.

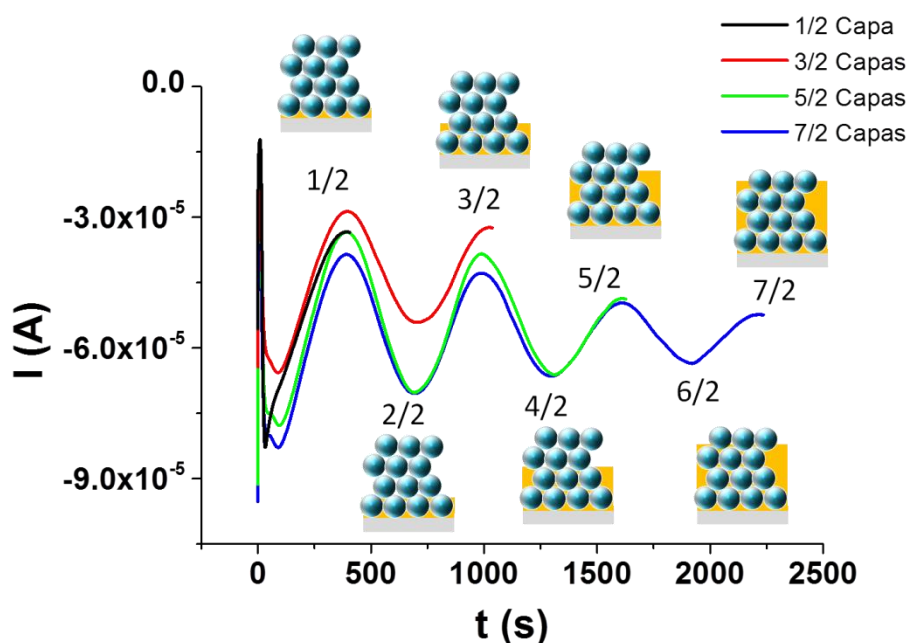


Figura 7.24. Cronoamperometría de la electrodeposición de oro según el número de capas elegidas.

Como se muestra en la figura 7.24, al comenzar la electrodeposición la intensidad de reducción aumenta debido a que el metal se adhiere a la superficie aumentando el área activa. Desde este punto, la intensidad comienza a disminuir conforme la deposición de oro aumenta recubriendo los huecos del molde que corresponden a la

primera capa de partículas. En este momento, la superficie se hace más y más pequeña hasta alcanzar un mínimo, cuando el crecimiento en la electrodeposición corresponde a la mitad de la primera capa de partículas. De esta manera, se ha rellenado la mitad de una capa con oro como se muestra en la figura. A continuación, el espacio entre partículas aumenta y como consecuencia aumenta la intensidad de señal produciendo un aumento en la superficie con el crecimiento del metal. Este incremento en la superficie alcanzará un valor que corresponderá con el momento en que se cubre completamente la primera capa de partículas. De esta manera, la infiltración del metal mediante electrodeposición permite controlar el número de capas cubiertas evitando que se produzca un crecimiento desmedido del material en la parte superior. Para la preparación de electrodos se parará la deposición en la mitad de la capa, contando el número de medias capas electrodepositadas. La figura 7.24 muestra la electrodeposición para electrodos con $1/2$, $3/2$, $5/2$ y $7/2$ capas. Este tipo de oscilaciones en la electrodeposición ha sido previamente presentando por otros autores pudiéndose ver incluso, el cambio en la oscilación en función del tamaño de la partícula [27, 65, 67-69].

Una vez realizada la electrodeposición, se disuelve el molde en ácido fluorhídrico al 5% durante 10 minutos.

7.4.2.2. Caracterización electroquímica de los electrodos porosos.

Una vez que se prepararon los electrodos y con el fin de caracterizar el material poroso, se procedió a determinar el área activa empleando CV. Dicha determinación se realiza mediante el cálculo del número de iones metálicos que se encuentran en la superficie. Para ello, se realizan barridos cíclicos que, en el barrido anódico, provocan la oxidación de la monocapa de iones metálicos de la superficie siendo, posteriormente en el barrido catódico, totalmente reducida la capa de óxido metálico formado. Tomando el valor de $390 \pm 10 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ para una superficie plana de oro policristalino [70], se puede calcular el área activa real de los electrodos determinando la carga asociada a la reducción de la monocapa de óxido metálico.

Se registraron voltamperogramas cíclicos en ácido sulfúrico 0.5 M para los electrodos macroporosos y para un electrodo plano con el fin de comparar la superficie

activa obtenida. En la figura 7.25 se representa la densidad de corriente como la corriente registrada entre el área geométrica del electrodo.

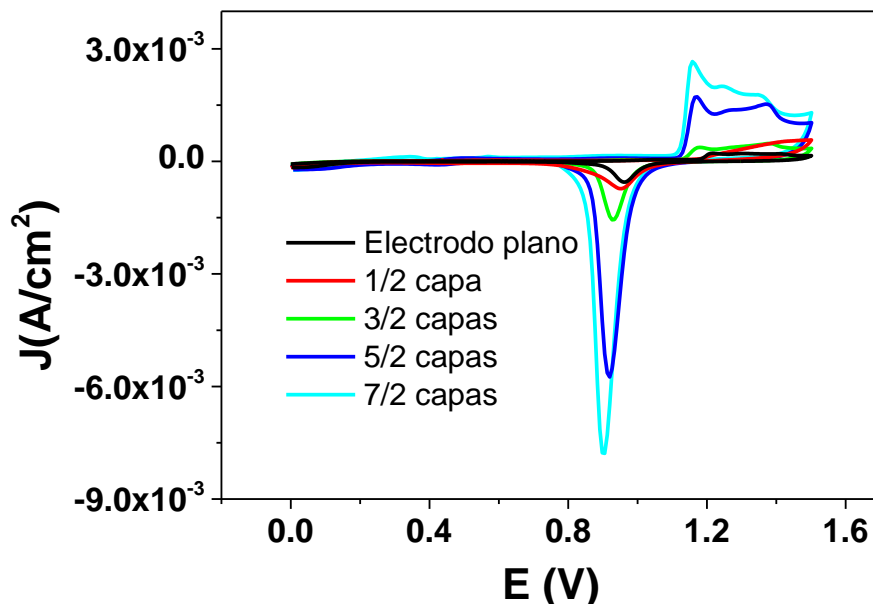


Figura 7.25. Voltamperogramas cíclicos de electrodos macroporosos en H_2SO_4 0.5 M.

Se puede observar claramente como el pico de reducción del oro aumenta según aumentan el número de medias capas electrodepositadas y como se obtienen valores de carga mucho mayores a las registradas para un electrodo plano (línea negra). Con el objetivo de cuantificar el aumento en la superficie activa, se calcularon el factor de rugosidad (R) y la superficie activa real (S_r) para cada uno de los electrodos en función de su área geométrica (A_g) y de la carga (Q) registrada en la reducción electroquímica (tabla 7.6).

Electrodo	A_g (cm^2)	Q (μC)	R ($(\text{Q}/\text{A})/(390\mu\text{C}/\text{cm}^2)$)	S_r ($\text{A}\times\text{R}$) (cm^2)
Electrodo plano	0.02	11.2	1.4	2.87×10^{-2}
1/2 capa	0.25	2.70×10^2	2.8	0.7
3/2 capas	0.275	3.65×10^2	3.4	0.9
5/2 capas	0.25	1.21×10^3	12.4	3.1
7/2 capas	0.275	1.77×10^3	16.5	4.5

Tabla 7.6. Cálculo del factor de rugosidad y de la superficie real activa para cada uno de los electrodos.

En la tabla 7.6 se observa como los valores de la rugosidad y de la superficie real activa aumentan según aumenta el número de medias capas. Se puede concluir que los electrodos preparados presentan las características adecuadas para ser denominados electrodos porosos.

7.4.2.3. Modificación de los electrodos macroporosos.

Una vez preparados y caracterizados, se realizó la modificación los electrodos macroporosos siguiendo dos estrategias diferentes: mediante modificación directa con una suspensión de CB[8] o aprovechando la formación del complejo CB[n]-Fc, con el grupo ferroceno del ferrocenil hexanotiol (FcS) que se encuentra previamente quimiadsorbido al electrodo por el grupo tiol, con el fin último de llevar a cabo la determinación indirecta de analitos no electroactivos.

Para realizar la modificación del electrodo se preparó una suspensión de CB[8] al 0.5% en etanol. El electrodo se modificó con 20 μ l de la suspensión en 4 etapas de 5 μ l cada una para intentar evitar la formación de agregados y que el receptor pudiera difundir dentro de las capas de los electrodos porosos. La sonda electroquímica utilizada para caracterizar los electrodos macroporosos modificados fue ferroceno dimetanol (Fc(OH)₂).

Debido a que esta sonda presenta un valor de transferencia de carga alto, al medir directamente una disolución de la misma con un electrodo poroso, no se obtiene un aumento apreciable en la intensidad de señal en comparación con la intensidad obtenida con un electrodo plano. Esto significa que únicamente se está oxidando lo que llega a la zona más expuesta del electrodo, sin que transcurra el tiempo necesario para que el analito difunda en el interior del electrodo [27, 71]. Por esta razón, se llevó a cabo la medida acumulando durante 15 minutos en una disolución Fc(OH)₂ para medir, posteriormente, en el electrolito (NaCl 0.5 M). En la figura 7.26 se muestra, como ejemplo, un electrodo de 7/2 capas sin modificar y modificado con CB[8], tanto acumulando como midiendo directamente una disolución de Fc(OH)₂.

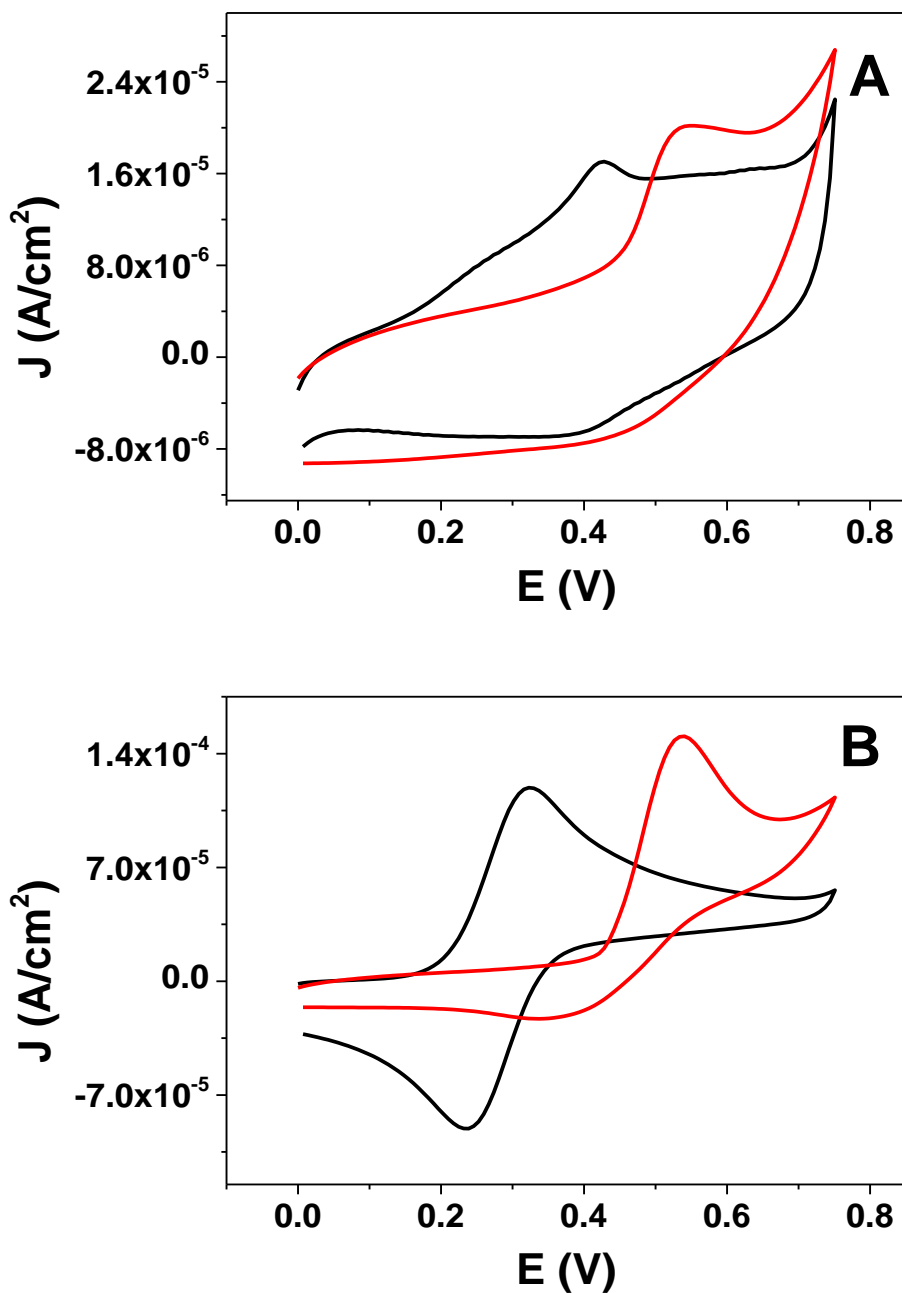


Figura 7.26. Voltamperogramas cíclicos de $\text{Fc}(\text{OH})_2$ registrados con un electrodo macroporosos de 7/2 capas: A) acumulando 15 minutos, B) medida directa: — electrodo sin modificar y — electrodo modificado con 0.5 % CB[8].

Los resultados obtenidos para la modificación directa del electrodo con CB[8] parecen indicar la presencia del receptor en el interior de los poros, sin embargo, resulta complicado buscar una explicación para el extraño comportamiento de irreversibilidad que presenta el $\text{Fc}(\text{OH})_2$. En base a los estudios presentes en la bibliografía en relación a

la formación del complejo de inclusión de CB[7]-Fc(OH)₂ en disolución, se observa que dicha formación produce una disminución de la corriente del Fc(OH)₂ con un cambio de potencial muy pequeño (32 mV) [72]. No obstante, los resultados obtenidos muestran un cambio en el potencial de oxidación mayor en comparación con el obtenido en disolución y un comportamiento irreversible. Una posible explicación sería la formación de agregados de CB[n] en la superficie fruto de la estrategia de modificación, impidiendo alcanzar la superficie electroactiva a la sonda. Estos agregados también impedirían la formación del complejo de inclusión en la cavidad del CB[8].

Por esta razón y habiendo comprobado por imágenes de SEM que la modificación no es homogénea y que se forman agregados de CB[n] que impiden monitorizar la formación del complejo, se descartó este método de modificación.

La segunda estrategia a seguir se esquematiza en la figura 7.27. Tras la modificación de la superficie de oro con el FcS, se inmoviliza el CB[n] a través del complejo formado con el grupo Fc con el fin de realizar un análisis indirecto por competencia del analito a determinar por el CB[n].

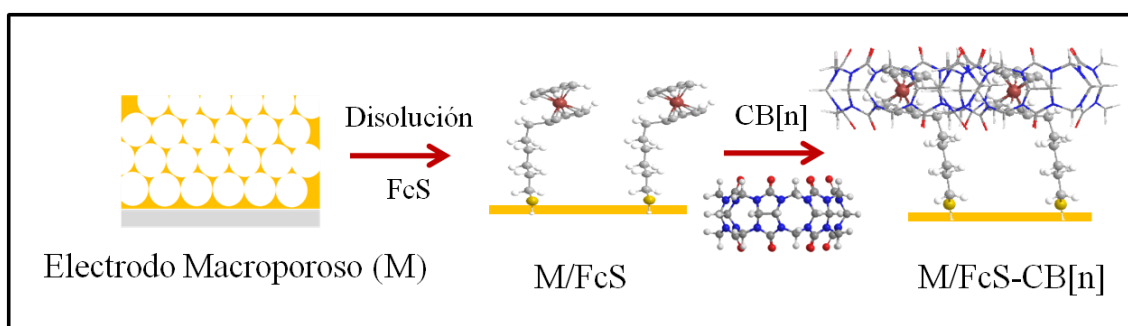


Figura 7.27. Esquema de modificación de los electrodos macroporosos con FcS y CB[8].

7.4.2.4. Estudios preliminares con electrodo de oro plano.

Antes de llevar a cabo la modificación de los electrodos macroporosos con FcS y con el fin de comprobar que la estrategia final planteada es viable, se llevó a cabo el mismo experimento planteado pero utilizando un electrodo plano de oro y los homólogos de CB[n] con 7 y 8 unidades de glicoluril.

La modificación se realiza sumergiendo el electrodo en una disolución de FcS 1.0×10^{-3} M en etanol durante 6 h. Una vez modificado y tras lavarlo con abundante agua, se transfiere a una celda electroquímica con NaClO_4 0.1 M como electrolito soporte registrando los voltamperogramas cíclicos correspondientes. A continuación, el electrodo se sumerge en una disolución 1.0×10^{-3} M de CB[7] en agua y/o una disolución saturada de CB[8] también en agua. Mediante medidas de CV se monitoriza la formación del complejo con el CB[7] y el CB[8].

Como se muestra en la figura 7.28, el voltamperograma correspondiente al electrodo modificado con FcS, presenta una onda catódica y otra anódica, cuya morfología se corresponde a un comportamiento electroquímico para especies electroactivas adsorbidas en la superficie del electrodo [73]. Tras sumergir el electrodo en CB[7] y/o CB[8], se observa una disminución de la intensidad de pico atribuible a la formación del complejo CB[n]-FcS. Esta disminución de intensidad se produce también cuando se estudia el complejo CB[n]-Fc en disolución, como se comentó en el capítulo 5.

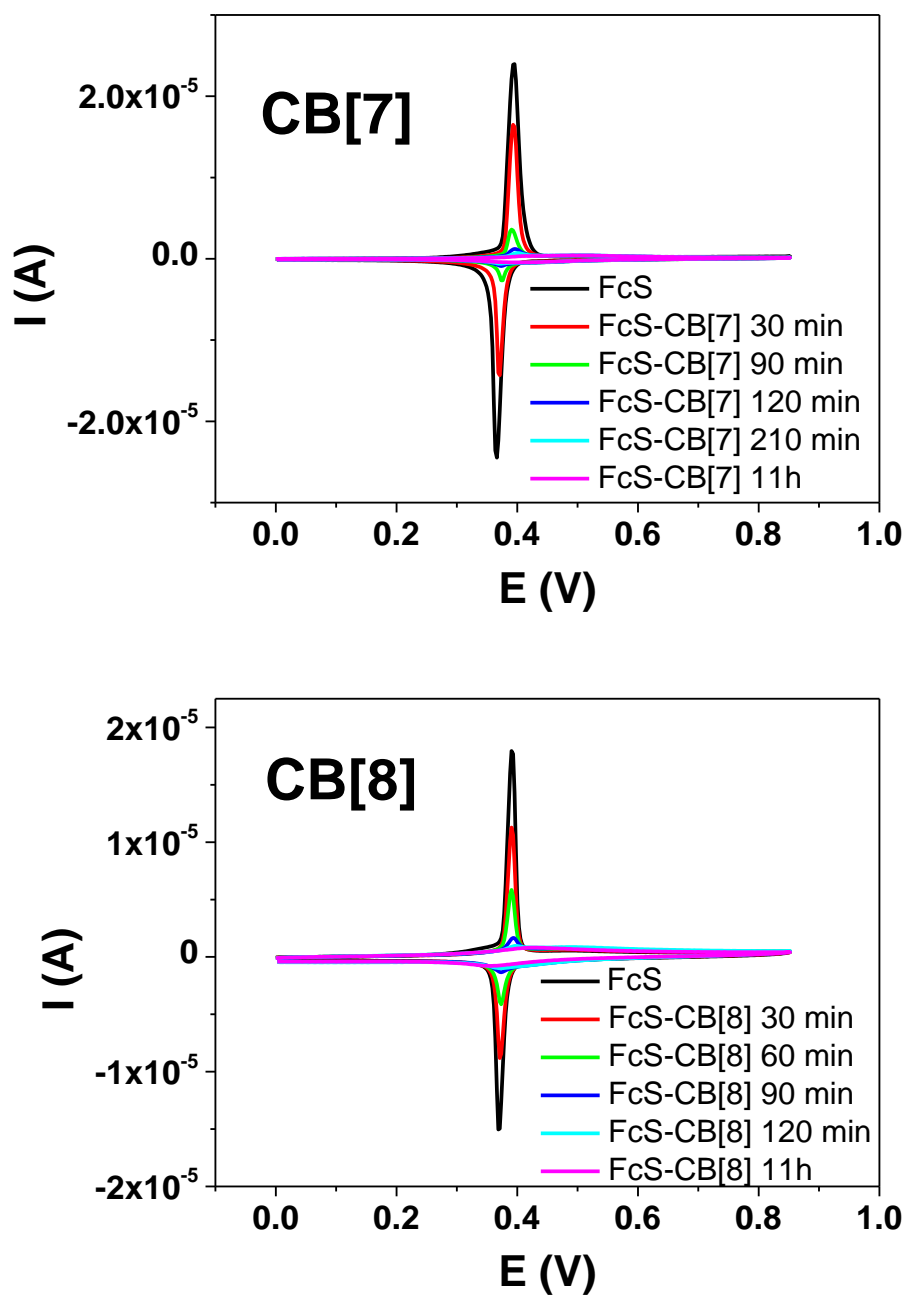


Figura 7.28. Voltamperogramas cíclicos de FcS en función del tiempo en la disolución de CB[n].

Sabapathy y col. presentaron un comportamiento similar para las ciclodextrinas como receptores [74]. Estos autores explicaron la pérdida de corriente como que el grupo Fc deja de ser electroactivo producto de la inclusión en la cavidad del receptor β -CD. Este comportamiento sería fruto de la protección que produce la β -CD impidiendo la llegada desde el electrolito de los iones que compensan la oxidación del grupo Fc,

iones que son imprescindibles para registrar la oxidación del Fc [75]. Esta misma explicación justificaría el comportamiento obtenido en el caso de CB[n]s encapsulando el FcS adsorbido al electrodo.

Comparando la formación del complejo para cada uno de los receptores, se observa que la desaparición de la señal electroquímica de FcS se produce más rápidamente con CB[8] que con CB[7]. Para este último receptor, pasados 210 minutos todavía se observan señales de oxidación y reducción, siendo necesarias 11 h para que prácticamente todo el FcS se encuentre encapsulado en el receptor. Sin embargo, en el caso de CB[8], a los 120 minutos prácticamente no se detecta señal de FcS, sin variar esta señal residual pasadas 11 h.

El objetivo final de este proceso es la determinación indirecta de analitos en disolución por competencia con FcS por el CB[n]. Por este motivo se eligió un compuesto, la amantadina, que, aunque es electroactiva, presenta una constante de formación con los CB[n] muy alta ($\sim 10^{12} \text{ M}^{-1}$), mientras que los valores tabulados de derivados neutros de ferroceno son del orden de 10^9 M^{-1} . En caso de obtener resultados satisfactorios con este planteamiento, la metodología propuesta podría ser aplicada para el análisis de analitos no electroactivos.

De esta forma, una vez formado el complejo, se sumergieron los electrodos modificados con FcS-CB[n] en una disolución de amantadina ($5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) registrándose los voltamperogramas cíclicos correspondientes.

La figura 7.29 muestra la respuesta electroquímica del FcS formando complejo con cada uno de los receptores, tras ser sumergido cierto tiempo en la disolución de amantadina.

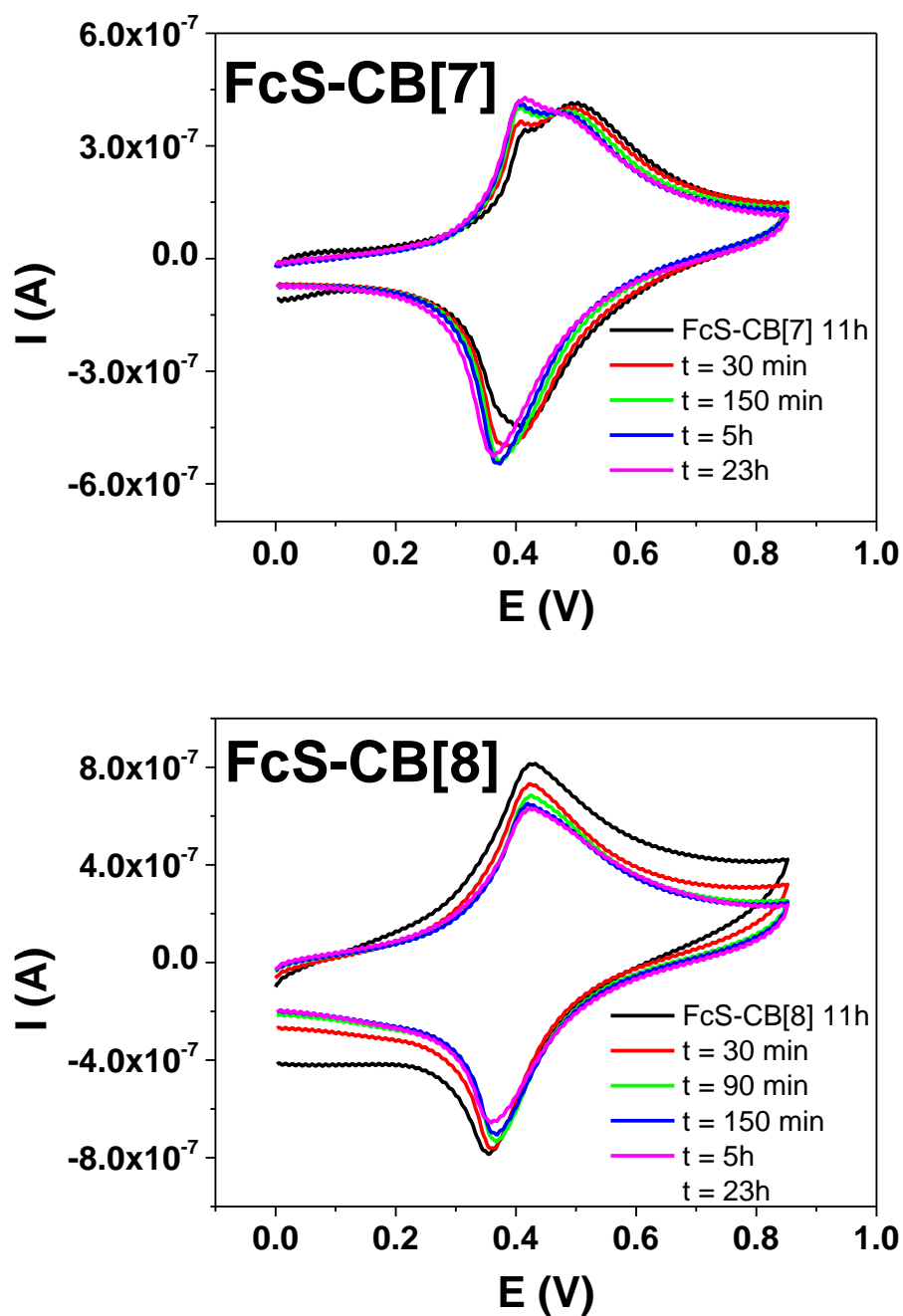


Figura 7.29. Voltamperogramas cíclicos de FcS-CB[n] en función del tiempo que el electrodo ha sido sumergido en la disolución de analito.

Como se muestra en la figura 7.29, cuando el receptor utilizado en la formación del complejo con el FcS es el CB[7], se observa una ligera recuperación de la intensidad de pico, que también es mayor que utilizando CB[8]. En base a estos resultados y dado que el objetivo es la determinación indirecta de analitos, se continuó el resto de estudios con CB[7] como receptor.

A continuación y con el objetivo de intentar que la cavidad del CB[7] se encuentre más accesible para el analito, se decidió realizar la modificación del electrodo con una capa mixta de FcS con pentanotiol (5C-SH), ya que este alcanotiol presenta una longitud idónea. En la bibliografía se pueden encontrar estudios electroquímicos con capas mixtas, observando mejores resultados que para capas únicamente del derivado de ferroceno [74, 76-78]. En este caso, se monitorizó únicamente la formación del complejo con CB[7], como se muestra en la figura 7.30.

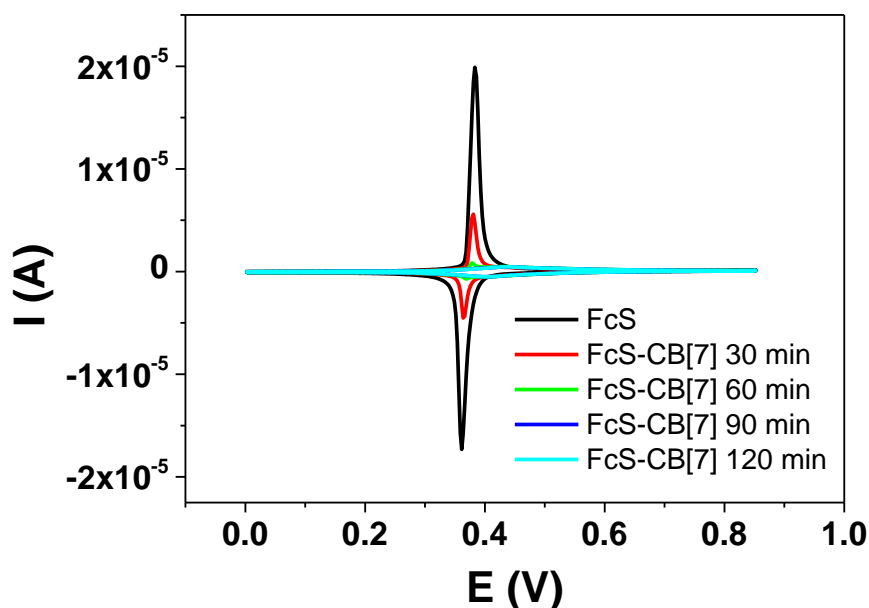


Figura 7.30. Voltamperogramas cíclicos de la capa mixta FcS-5C-SH con la formación del complejo con CB[7].

Se observa que la formación del complejo de FcS-CB[7] produce una disminución de la corriente como en los resultados anteriores. Para la capa mixta, únicamente es necesario sumergir el electrodo 120 minutos en la disolución del receptor para que se forme el complejo con todos los grupos Fc disponibles, frente a las 11 h necesarias en el caso de una capa únicamente de FcS.

A continuación, se realizó el estudio sumergiendo el electrodo diferentes tiempos en la disolución de analito. La figura 7.31 muestra una ligera recuperación de la señal de FcS a medida que aumenta el tiempo de interacción. Esta recuperación es mayor que la obtenida para el electrodo modificado solamente con FcS. Por esta razón, se continuarán

el resto de experimentos con los electrodos macroporosos modificando con una capa mixta 1:1 (v/v) FcS-5C-SH.

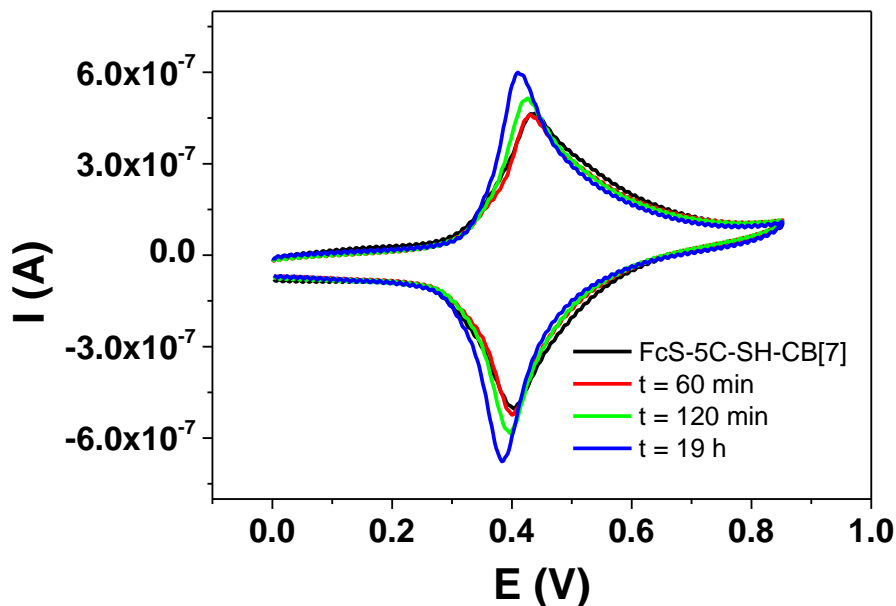


Figura 7.31. Voltamperogramas cíclicos de FcS-CB[n] en función del tiempo que el electrodo ha sido sumergido en la disolución de amantadina.

7.4.2.5. Modificación de electrodos porosos.

Se procedió a la modificación de los electrodos macroporosos de 1/2, 3/2 y 5/2 capas, de la misma manera que para el electrodo plano, por inmersión en la disolución de FcS-5C-SH durante 17 h. Tras la modificación, fueron sumergidos en agua durante un tiempo para limpiarlos antes de ser utilizados en la célula electroquímica. Tras realizar distintos experimentos, se observó que el tiempo necesario para que el electrolito difundiera en el interior del electrodo, dependía del número de capas que presentara, por lo que se realizó un estudio para cada electrodo. Los resultados se muestran en la figura 7.32 que se recoge a continuación:

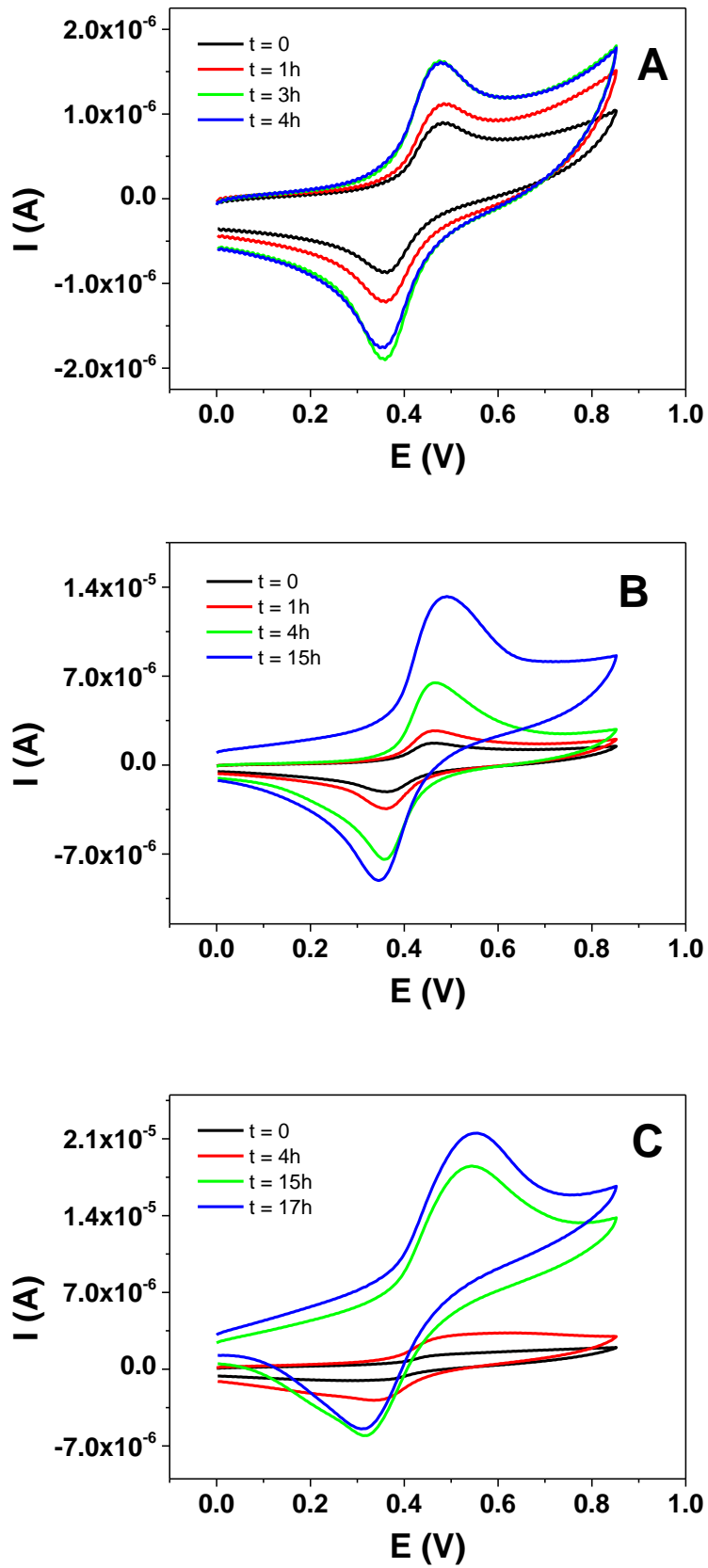


Figura 7.32. Voltamperogramas cíclicos de electrodos de A) 1/2, B) 3/2 y C) 5/2 modificados con FcS-5C-SH capas en función del tiempo sumergido en electrolito.

Cuanto mayor es el tiempo que el electrodo ha estado sumergido en electrolito soporte, mayor es la intensidad de señal registrada, puesto que se necesita más tiempo para que el electrolito difunda en toda la superficie. En todos los casos, el mayor tiempo que aparece en la figura, es aquél al que se estabiliza el aumento de intensidad. En el caso del electrodo de 1/2 capa, lógicamente es la que menos tiempo necesita, 4h frente a las 15 y 17 h de los electrodos de 3/2 y 5/2 capas.

Comparando las respuestas en función del número de capas, a la vista del aumento de intensidad señalado para un mismo tiempo, se puede concluir que la mezcla FcS-5C-SH sí difunde dentro de los poros y que por tanto, se están modificando los electrodos macroporosos y no sólo la capa superficial (figura 7.33).

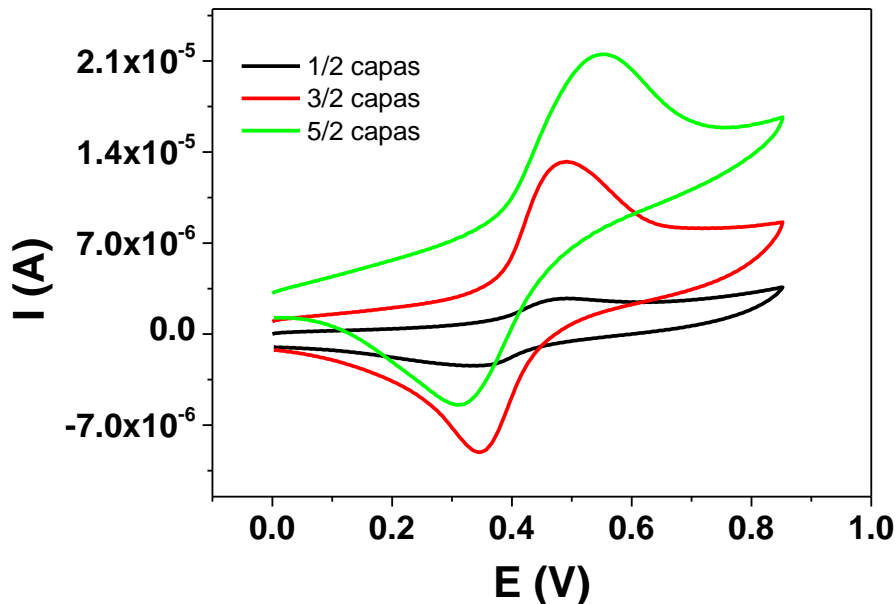


Figura 7.33. Voltamperogramas cíclicos de electrodos modificados en función del número de capas que presentan ($t = 17$ h).

Tras comprobar la modificación de los electrodos macroporosos con FcS-5C-SH, se procedió a estudiar la formación del complejo con CB[7] y a comprobar si la respuesta electroquímica es la misma que la que se obtuvo empleando un electrodo plano. En la figura 7.34 se muestra, como ejemplo, la formación del complejo con CB[7] para un electrodo con 5/2 capas.

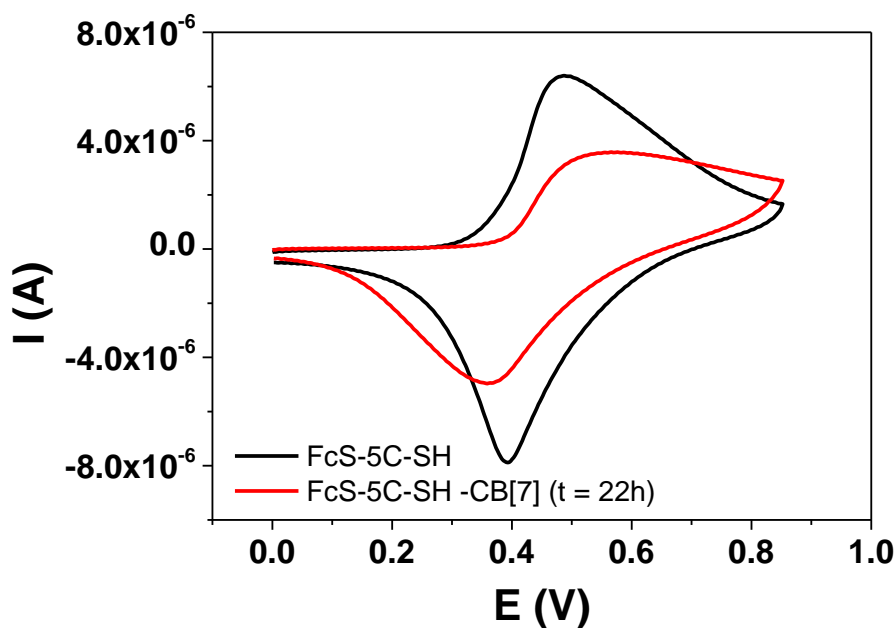


Figura 7.34. Voltamperogramas cíclicos de FcS para un electrodo de 5/2 capas antes y tras sumergirlo en CB[7].

Estos resultados preliminares obtenidos en los que se observa una disminución de la corriente, inducen a pensar que el comportamiento electroquímico con la formación del complejo será el mismo que en el electrodo plano, permitiendo confirmar que se está formando el complejo FcS-CB[7].

7.4.2.6. Perspectivas del trabajo.

A la vista de los resultados obtenidos, y solventando ciertos problemas de solubilidad del CB[7] en las condiciones de medida y su difusión en el interior de la estructura porosa, es previsible obtener resultados satisfactorios de la formación del complejo FcS-CB[7] en el interior de los poros. Una vez formado este complejo y optimizadas las variables de tiempos de trabajo necesario, se comenzarán los estudios de competición con analitos de interés que no sean electroactivos, para así realizar la determinación indirecta de los mismos.

7.5. Conclusiones.

En este capítulo se presentan dos nuevas superficies sensoras empleando CB[n]s.

Con respecto al desarrollo de un material de grafeno modificado con CB[8], los resultados obtenidos permiten concluir que durante la síntesis de grafeno se produce la incorporación del receptor macrocíclico para su posterior utilización en la modificación del electrodo. Estas conclusiones se pueden extraer a partir de los resultados de análisis elemental y gracias al cambio en la respuesta electroquímica con la formación del complejo de las sondas MV^{2+} , DOP y TRP al emplear el electrodo modificado con el material sintetizado.

Se ha desarrollado un método de análisis para la determinación de TRP que combina las excelentes propiedades de conductividad que presenta el grafeno y la selectividad de los receptores macrocíclicos. Bajo las condiciones óptimas de medida se consiguieron valores de límites de detección y cuantificación de 0.9×10^{-7} M y 2.7×10^{-7} M respectivamente. El empleo de materiales como el grafeno permite la determinación de analitos con límites de detección ligeramente inferiores a los conseguidos con el electrodo GCE/Nafion/CB[8]. El método presenta valores de exactitud y precisión menores de 6.7 y 10.3 % respectivamente, adecuados para su aplicación en muestras reales. Este sensor ha sido aplicado en la determinación de este aminoácido en suero humano y en un preparado farmacéutico con valores de recuperaciones medias de 95 % y 98 %, en cada caso. Los resultados obtenidos para la muestra de sangre fueron similares a los obtenidos para el sensor GCE/Nafion/CB[8] y los relativos al preparado farmacéutico se obtuvieron con una recuperación del 95% respecto al contenido señalado por el fabricante.

Con respecto a la preparación de electrodos macroporosos de oro empleando la técnica de Langmuir-Blodgett, a partir de la caracterización electroquímica de los electrodos obtenidos se puede concluir que los valores de superficie activa que presentan son mucho más elevados que los de un electrodo plano; hasta 156 veces para un electrodo de 7/2 capas.

Estudios preliminares realizados en un electrodo plano demuestran que sí se produce la formación del complejo FcS-CB[7] en la superficie y que éste es susceptible de ser destruido por la formación de otro más estable.

Es posible la modificación de todas las capas de los electrodos macroporosos de oro con FcS. El número de capas electrodepositadas resulta determinante para el diseño del proceso de modificación. La difusión del electrolito a través de las capas para monitorizar la señal total del FcS adsorbido requiere mayor tiempo según aumenta el número de éstas,. Además, es posible la inmovilización de CB[7] en los electrodos macroporosos a través de la formación del complejo con un grupo ferroceno adsorbido a la superficie.

Estudios preliminares muestran la interacción de CB[7]-FcS en la superficie de los electrodos macroporosos, lo que abre puertas a futuros experimentos para realizar la determinación indirecta, por competencia con el CB[7], de analitos no electroactivos de interés en distintos campos.

7.6. Bibliografia

- [1] M. Pumera, A. Ambrosi, A. Bonanni, E.L.K. Chng, H.L. Poh, Graphene for electrochemical sensing and biosensing, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 29, **2010**, 954-965.
- [2] K. Novoselov, A. Geim, S. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. Dubonos, I. Grigorieva, A. Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science*. 306, **2004**, 666-669.
- [3] A.K. Geim, Graphene: status and prospects, *Science*. 324, **2009**, 1530-1534.
- [4] R.R. Nair, P. Blake, A.N. Grigorenko, K.S. Novoselov, T.J. Booth, T. Stauber, N.M.R. Peres, A.K. Geim, Fine structure constant defines visual transparency of graphene, *Science*. 320, **2008**, 1308.
- [5] M.D. Stoller, S. Park, Y. Zhu, J. An, R.S. Ruoff, Graphene-based ultracapacitors, *Nano Letters*. 8, **2008**, 3498-3502.
- [6] W. Yang, K.R. Ratinac, S.P. Ringer, P. Thordarson, J.J. Gooding, F. Braet, Carbon nanomaterials in biosensors: should you use nanotubes or graphene?, *Angewandte Chemie-International Edition*. 49, **2010**, 2114-2138.
- [7] T. Ohta, A. Bostwick, T. Seyller, K. Horn, E. Rotenberg, Controlling the electronic structure of bilayer graphene, *Science*. 313, **2006**, 951-954.
- [8] W.A. de Heer, C. Berger, X. Wu, P.N. First, E.H. Conrad, X. Li, T. Li, M. Sprinkle, J. Hass, M.L. Sadowski, M. Potemski, G. Martinez, Epitaxial graphene, *Solid State Communications*. 143, **2007**, 92-100.
- [9] A. Reina, X. Jia, J. Ho, D.a.S. Nezich Hyungbin, V. Bulovic, M.S. Dresselhaus, J. Kong, Large Area, Few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition, *Nano Letters*. 9, **2009**, 30-35.
- [10] A. Yu, P. Ramesh, M.E. Itkis, E. Bekyarova, R.C. Haddon, Graphite nanoplatelet-epoxy composite thermal interface materials, *Journal of Physical Chemistry C*. 111, **2007**, 7565-7569.
- [11] P.K. Ang, S. Wang, Q. Bao, J.T.L. Thong, K.P. Loh, High-throughput synthesis of graphene by intercalation - exfoliation of graphite oxide and study of ionic screening in graphene transistor, *ACS Nano*. 3, **2009**, 3587-3594.
- [12] S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon*. 45, **2007**, 1558-1565.
- [13] R. Stine, S.P. Mulvaney, J.T. Robinson, C.R. Tamanaha, P.E. Sheehan, Fabrication, optimization, and use of graphene field effect sensors, *Analytical Chemistry*. 85, **2013**, 509-521.
- [14] F. Valentini, M. Carbone, G. Palleschi, Carbon nanostructured materials for applications in nanomedicine, cultural heritage, and electrochemical biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405, **2013**, 451-465.
- [15] K. Scida, P.W. Stege, G. Haby, G.A. Messina, C.D. Garcia, Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: critical review, *Analytica Chimica Acta*. 691, **2011**, 6-17.
- [16] Y. Guo, S. Guo, J. Ren, Y.a.D. Zhai Shaojun, E. Wang, Cyclodextrin functionalized graphene nanosheets with high supramolecular recognition capability: synthesis and host-guest inclusion for enhanced electrochemical performance, *ACS Nano*. 4, **2010**, 4001-4010.
- [17] L. Tan, K. Zhou, Y. Zhang, H.a.W. Wang Xue-Dong, Y. Guo, H. Zhang, Nanomolar detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at beta-cyclodextrin/graphene nanocomposite platform, *Electrochemistry Communications*. 12, **2010**, 557-560.
- [18] X. Tian, C. Cheng, H. Yuan, J.a.X. Du Dan, S. Xie, M.M.F. Choi, Simultaneous determination of L-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles-beta-cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry, *Talanta*. 93, **2012**, 79-85.
- [19] Z. Liu, X. Ma, H. Zhang, W. Lu, H. Ma, S. Hou, Simultaneous determination of nitrophenol isomers based on beta-cyclodextrin functionalized reduced graphene oxide, *Electroanalysis*. 24, **2012**, 1178-1185.
- [20] G. Zhu, P. Gai, L. Wu, J. Zhang, X. Zhang, J. Chen, β -Cyclodextrin-platinum nanoparticles/graphene nanohybrids: enhanced sensitivity for electrochemical detection of naphthol isomers, *Chemistry Asian Journal* 7, **2012**, 732-737.

- [21] Y.J. Guo, Y.H. Chen, Q. Zhao, S.M. Shuang, C. Dong, Electrochemical sensor for ultrasensitive determination of doxorubicin and methotrexate based on cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets, *Electroanalysis*. 23, **2011**, 2400-2407.
- [22] Q. Han, Y. Wang, Y. Huang, L. Guo, Y. Fu, Electrochemical recognition for carboxylic acids based on multilayer architectures of beta-cyclodextrin and methylene blue/reduce-graphene interface on glassy carbon electrodes, *Analyst*. 138, **2013**, 2051-2056.
- [23] R. Mayoral, J. Requena, J. Moya, C. Lopez, A. Cintas, H. Miguez, F. Meseguer, L. Vazquez, M. Holgado, A. Blanco, 3D Long-range ordering in an sio₂ submicrometer-sphere sintered superstructure, *Advanced Materials*. 9, **1997**, 257-260.
- [24] O.D. Velev, K.H. Bhatt, On-chip micromanipulation and assembly of colloidal particles by electric fields, *Soft Matter*. 2, **2006**, 738-750.
- [25] I. Langmuir, The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids, *Journal of the American Chemical Society*. 39, **1917**, 1848-1906.
- [26] A. Walcarius, Template-directed porous electrodes in electroanalysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396, **2010**, 261-272.
- [27] R. Szamocki, S. Reculosa, S. Ravaine, Bartlett, P. N. and Kuhn, A., R. Hempelmann, Tailored mesostructuring and biofunctionalization of gold for increased electroactivity, *Angewandte Chemie-International Edition*. 45, **2006**, 1317-1321.
- [28] S. Ben-Ali, D.A. Cook, S.A.G. Evans, A.a.B. Thienpont P.N., A. Kuhn, Electrocatalysis with monolayer modified highly organized macroporous electrodes, *Electrochemistry Communications*. 5, **2003**, 747-751.
- [29] S. Ben-Ali, D.A. Cook, P.N. Bartlett, A. Kuhn, Bioelectrocatalysis with modified highly ordered macroporous electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 579, **2005**, 181-187.
- [30] V.R. Goncales, R.P. Salvador, M.R. Alcantara, S.I.C. de Torresi, On the template synthesis of nanostructured inorganic/organic hybrid films, *Journal of the Electrochemical Society*. 155, **2008**, K140-K145.
- [31] T. Cassagneau, F. Caruso, Conjugated polymer inverse opals for potentiometric biosensing, *Advanced Materials*. 14, **2002**, 1837-1841.
- [32] X.J. Chen, Y.Y. Wang, J.J. Zhou, W. Yan, X.H. Li, J.J. Zhu, Electrochemical impedance immunosensor based on three-dimensionally ordered macroporous gold film, *Analytical Chemistry*. 80, **2008**, 2133-2140.
- [33] J. Qiu, H. Peng, R. Liang, M. Xiong, Preparation of three-dimensional ordered macroporous prussian blue film electrode for glucose biosensor application, *Electroanalysis*. 19, **2007**, 1201-1206.
- [34] J.J. Zhou, H.P. Huang, J. Xuan, J.R. Zhang, J.J. Zhu, Quantum dots electrochemical aptasensor based on three-dimensionally ordered macroporous gold film for the detection of ATP, *Biosensors & Bioelectronics*. 26, **2010**, 834-840.
- [35] X. Yang, Y. Jin, Y. Zhu, L. Tang, C. Li, Inverse opal of polyaniline for biosensors prepared by electrochemical and self-assembly techniques, *Journal of the Electrochemical Society*. 155, **2008**, J23-J25.
- [36] M. Gamero, M. Sosna, F. Pariente, E. Lorenzo, P.N. Bartlett, C. Alonso, Influence of macroporous gold support and its functionalization on lactate oxidase-based biosensors response, *Talanta*. 94, **2012**, 328-334.
- [37] M. Gamero, J.L.G. Fierro, E. Lorenzo, C. Alonso, Electrocatalytic activity of 3-dimensional ordered macroporous gold electrode-based lactate biosensors platforms as a function of pore layer number, *Electroanalysis*. 25, **2013**, 179-188.
- [38] Q. Xie, X. Chen, H. Liu, W. Yang, Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized on an interlaced Co(OH)₂ nanosheet-based three-dimensional macroporous film, *Sensors and Actuators B-Chemical*. 168, **2012**, 277-282.
- [39] Y.L. Du, K.L. Lv, B.Q. Su, N.O. Zhang, C.M. Wang, Electro-Reduction of Oxygen and Electro-Oxidation of Methanol at Pd Monolayer-Modified Macroporous Pt Electrode, *Journal of Applied Electrochemistry*. 39, **2009**, 2409-2414.
- [40] V. Urbanova, K. Vytras, A. Kuhn, Macroporous Antimony Film Electrodes for Stripping Analysis of Trace Heavy Metals, *Electrochemistry Communications*. 12, **2010**, 114-117.

- [41] M. Zheng, P. Li, C. Yang, H. Zhu, Y. Chen, Y.W. Tang, Y.M. Zhou, T.H. Lu, Ferric ion immobilized on three-dimensional nanoporous gold films modified with self-assembled monolayers for electrochemical detection of hydrogen peroxide, *Analyst*. 137, **2012**, 1182-1189.
- [42] V. Urbanova, M. Bartos, K. Vytras, A. Kuhn, Porous bismuth film electrodes for signal increase in anodic stripping voltammetry, *Electroanalysis*. 22, **2010**, 1524-1530.
- [43] A. Walcarius, Electrocatalysis, Sensors and biosensors in analytical chemistry based on ordered mesoporous and macroporous carbon-modified electrodes, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 38, **2012**, 79-97.
- [44] A. Arico, P. Bruce, B. Scrosati, J. Tarascon, W. Van Schalkwijk, Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices, *Nature Materials*. 4, **2005**, 366-377.
- [45] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *Journal of the American Chemical Society*. 80, **1958**, 1339-1339.
- [46] H. Du, J. Ye, J. Zhang, X. Huang, C. Yu, A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for simultaneous determination of catechol and hydroquinone, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 650, **2011**, 209-213.
- [47] J.C. Meyer, A.K. Geim, M.I. Katsnelson, K.S. Novoselov, T.J. Booth, S. Roth, The structure of suspended graphene sheets, *Nature*. 446, **2007**, 60-63.
- [48] H. Schniepp, J. Li, M. McAllister, H. Sai, M. Herrera-Alonso, D. Adamson, R. Prud'homme, R. Car, D. Saville, I. Aksay, Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide, *Journal of Physical Chemistry B*. 110, **2006**, 8535-8539.
- [49] K. Deng, J. Zhou, X. Li, Direct electrochemical reduction of graphene oxide and its application to determination of L-tryptophan and L-tyrosine, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 101, **2013**, 183-188.
- [50] W. Zhang, Y. Chai, R. Yuan, S. Chen, J. Han, D. Yuan, Facile synthesis of graphene hybrid tube-like structure for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan, *Analytica Chimica Acta*. 756, **2012**, 7-12.
- [51] C. Xu, K. Huang, Y. Fan, Z. Wu, J. Li, T. Can, Simultaneous electrochemical determination of dopamine and tryptophan using a TiO₂-graphene/poly(4-aminobenzenesulfonic acid) composite film based platform, *Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications*. 32, **2012**, 969-974.
- [52] M. Arvand, N. Ghodsi, A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for the determination of trace amounts of L-Dopa in mouse brain extract and pharmaceuticals, *Journal of Solid State Electrochemistry*. 17, **2013**, 775-784.
- [53] J. Deng, M. Liu, F. Lin, Y. Zhang, Y. Liu, S. Yao, Self-assembled oligo(phenylene ethynylene)s/graphene nanocomposite with improved electrochemical performances for dopamine determination, *Analytica Chimica Acta*. 767, **2013**, 59-65.
- [54] C. Wang, F. Ye, H. Wu, Y. Qian, Depositing Au nanoparticles onto graphene sheets for simultaneous electrochemical detection ascorbic acid, dopamine and uric acid, *International Journal of Electrochemical Science*. 8, **2013**, 2440-2448.
- [55] H. Guo, X. Wang, Q. Qian, F.a.X. Wang Xing-Hua, A green approach to the synthesis of graphene nanosheets, *ACS Nano*. 3, **2009**, 2653-2659.
- [56] F.Y. Zhang, Y.J. Li, Y.E. Gu, Z.H. Wang, C.M. Wang, One-pot solvothermal synthesis of a Cu(2)O/graphene nanocomposite and its application in an electrochemical sensor for dopamine, *Microchimica Acta*. 173, **2011**, 103-109.
- [57] Y. Fan, J. Liu, H. Lu, Q. Zhang, Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO₂-graphene composite film, *Microchimica Acta*. 173, **2011**, 241-247.
- [58] D. Ye, L. Luo, Y. Ding, B. Liu, X. Liu, Fabrication of Co₃O₄ nanoparticles-decorated graphene composite for determination of L-tryptophan, *Analyst*. 137, **2012**, 2840-2845.
- [59] J. Zhao, P. Gao, D. Zhu, Optimization of Zn²⁺-containing mobile phase for simultaneous determination of kynurenine, kynurenic acid and tryptophan in human plasma by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 878, **2010**, 603-608.

- [60] M. Sa, L. Ying, T. Ai-Guo, X. Le-Dong, R. Ya-Ping, Simultaneous determination of tyrosine, tryptophan and 5-hydroxytryptamine in serum of MDD patients by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Clinica Chimica Acta*. 413, **2012**, 973-977.
- [61] K. Blodgett, Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface, *Journal of the American Chemical Society*. 57, **1935**, 1007-1022.
- [62] G. Tolnai, F. Csempesz, M. Kabai-Faix, E. Kalman, Z. Keresztes, A. Kovacs, J. Ramsden, Z. Horvolgyi, Preparation and characterization of surface-modified silica-nanoparticles, *Langmuir*. 17, **2001**, 2683-2687.
- [63] Z. Wu, H. Han, W. Han, B. Kim, K.H. Ahn, K. Lee, Controlling the hydrophobicity of submicrometer silica spheres via surface modification for nanocomposite applications, *Langmuir*. 23, **2007**, 7799-7803.
- [64] M. Bardosova, F.C. Dillon, M.E. Pemble, I.M. Povey, R.H. Tredgold, Langmuir-blodgett assembly of colloidal photonic crystals using silica particles prepared without the use of surfactant molecules, *Journal of Colloid and Interface Science*. 333, **2009**, 816-819.
- [65] R. Szamocki, A. Velichko, F. Muecklich, S.a.R. Reculosa S., S. Neugebauer, W. Schuhmann, R. Hempelmann, A. Kuhn, Improved enzyme immobilization for enhanced bioelectrocatalytic activity of porous electrodes, *Electrochemistry Communications*. 9, **2007**, 2121-2127.
- [66] R. Szamocki, A. Velichko, C. Holzapfel, F.a.R. Muecklich S., P. Garrigue, N. Sojic, R.a.K. Hempelmann A., Macroporous ultramicroelectrodes for improved electroanalytical measurements, *Analytical Chemistry*. 79, **2007**, 533-539.
- [67] N. Sapoletova, T. Makarevich, K. Napolskii, E. Mishina, A. Eliseev, A. van Etteger, T. Rasing, G. Tsirlina, Controlled growth of metallic inverse opals by electrodeposition, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 12, **2010**, 15414-15422.
- [68] T. Sumida, Y. Wada, T. Kitamura, S. Yanagida, Construction of stacked opaline films and electrochemical deposition of ordered macroporous nickel, *Langmuir*. 18, **2002**, 3886-3894.
- [69] M. Heim, S. Reculosa, S. Ravaine, A. Kuhn, Engineering of complex macroporous materials through controlled electrodeposition in colloidal superstructures, *Advanced Functional Materials*. 22, **2012**, 538-545.
- [70] S. Trasatti, O. Petrii, Real Surface-area measurements in electrochemistry, *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 327, **1992**, 353-376.
- [71] A. Walcarius, A. Kuhn, Ordered porous thin films in electrochemical analysis, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 27, **2008**, 593-603.
- [72] L. Cui, S. Gadde, W. Li, A.E. Kaifer, Electrochemistry of the inclusion complexes formed between the cucurbit [7]uril host and several cationic and neutral ferrocene derivatives, *Langmuir*. 25, **2009**, 13763-13769.
- [73] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, 2 ed., John Wiley and Sons, USA, **2001**.
- [74] R. Sabapathy, S. Bhattacharyya, W. Cleland, C. Hussey, Host-guest complexation in self-assembled monolayers: inclusion of a monolayer-anchored cationic ferrocene-based guest by cyclodextrin hosts, *Langmuir*. 14, **1998**, 3797-3807.
- [75] G. Rowe, S. Creager, Redox and ion-pairing thermodynamics in self-assembled monolayers, *Langmuir*. 7, **1991**, 2307-2312.
- [76] C. Chidsey, C. Bertozzi, T. Putvinski, A. Mucsce, Coadsorption of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold - electroactive self-assembled monolayers, *Journal of the American Chemical Society*. 112, **1990**, 4301-4306.
- [77] D. Collard, M. Fox, Use of electroactive thiols to study the formation and exchange of alkanethiol monolayers on gold, *Langmuir*. 7, **1991**, 1192-1197.
- [78] J. Smalley, S. Feldberg, C. Chidsey, M. Linford, M. Newton, Y. Liu, The kinetics of electron-transfer through ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on gold, *Journal of Physical Chemistry*. 99, **1995**, 13141-13149.

Capítulo 8 / Chapter 8

Conclusiones generales / General conclusions

A partir de los objetivos generales planteados al inicio de esta tesis doctoral y en base a los resultados y conclusiones parciales expuestos durante el desarrollo de esta memoria, se puede concluir:

1. Respecto al estudio de las propiedades de formación de complejos de inclusión en disolución de los receptores macrocíclicos conocidos como CB[n]s (n=6 y 7), el CB[7] interacciona más fuertemente con el fungicida CBZ pudiendo incluir dicho analito en el interior de su cavidad. El complejo formado (CB[7]-CBZ) puede presentar estequiometrías 1:1 ó 2:1 con constantes de asociación del orden de 10^5 y 10^4 , respectivamente. Los iones presentes en disolución afectan a esta interacción pudiendo incluso, inhibirla. El estudio electroquímico del complejo muestra un comportamiento cuasirreversible predominantemente difusivo para bajas velocidades de barrido. La formación del complejo inhibe la dimerización del CBZ durante su oxidación electroquímica. Es posible el desarrollo de métodos de análisis para el fungicida a través de la formación del complejo de inclusión con CB[7], aplicables en muestras reales con suficiente exactitud y precisión.
2. Se ha demostrado el éxito de la inmovilización del CB[8] en la superficie de electrodos de carbón vítreo. Los electrodos modificados con CB[8] mantienen las características de selector molecular propias de los CB[n]s, presentándose como sensores selectivos hacia interferencias cargadas negativamente.
3. Los electrodos desarrollados pueden ser utilizados para el análisis de biomoléculas de interés. Del estudio de la formación del complejo entre el analito y el receptor cuando éste último se encuentra en la superficie del electrodo, se ha observado que el comportamiento con la concentración de sales es diferente respecto al mostrado cuando el complejo se forma en disolución. Un aumento en la concentración de electrolito produce un aumento de la intensidad de señal siendo este comportamiento diferente al observado para la formación del complejo en disolución. Se desarrolló un sensor de TRP basado en Nafion/CB[8] que ofrece una alta selectividad eliminando interferencias como la del URI y el ASC y demostrando que puede ser aplicado para la

determinación del aminoácido en muestras reales con excelentes parámetros analíticos.

4. Las modificaciones desarrolladas presentan una excelente estabilidad para el empleo de los sensores como detectores en análisis por inyección en flujo. Ha sido posible la determinación del neurotransmisor DOP en muestra real empleando el sensor GCE/PVC/CB[8] como detector. En este caso también se demostró la selectividad frente al ASC como interferente comprobando mediante $^1\text{H-RMN}$ que no existe interacción entre el receptor y el interferente.
5. Con el objetivo de compensar la posible pérdida de sensibilidad producida como consecuencia de la formación de un complejo de inclusión al trabajar con técnicas electroquímicas, se han desarrollado nuevas plataformas sensoras mediante el empleo de superficies electródicas particulares. Por un lado, se ha realizado con éxito la síntesis de un material compuesto por grafeno y CB[n] ($n = 7$ and 8). Este nuevo material se ha caracterizado con diferentes técnicas y se ha utilizado para el desarrollo de un sensor de TRP obteniendo límites de detección ligeramente más bajos que los obtenidos para el sensor de Nafion/CB[8] propuesto anteriormente. El sensor desarrollado puede ser utilizado en la determinación del aminoácido en muestras reales como suero humano y preparados farmacéuticos.
6. Se han preparado electrodos macroporosos de oro que, por su gran superficie activa, permiten compensar la pérdida de sensibilidad indicada en el punto anterior. Resultados preliminares han demostrado el éxito en la inmovilización de CB[7] en toda la superficie porosa a través de la formación de un complejo con ferroceno hexanotiol previamente adsorbido. Resultados preliminares permiten prever que esta estrategia de modificación permita la determinación indirecta de analitos no electroactivos
7. Finalmente, se ha demostrado que la capacidad de selección molecular que presentan estos receptores macrocíclicos resulta de gran interés para el desarrollo de metodologías analíticas a través del diseño de electrodos sensibles y altamente selectivos eliminando interferentes cargados negativamente. Estos electrodos pueden ser empleados para el análisis de sustancias de interés en distintas muestras reales

As a general view and based on the general objectives previously exposed at the beginning of this thesis and from the results and conclusions presented during this PhD work, it is possible to conclude:

1. With respect to the study related to the complex formation between CB[6] and CB[7] macrocyclic receptors and the fungicide CBZ in solution conditions, CB[7] presents stronger interaction including CBZ into its cavity. The resulted inclusion complex (CB[7]-CBZ) presents 1:1 or 2:1 stoichiometry with association constants about 10^5 and 10^4 , respectively. Ions in solution influence this interaction as much as even can be inhibited. The complex show a quasireversible electrochemical behavior mainly diffusive under low scan rate conditions. The dimerization process that occurs during CBZ electrochemical oxidation is suppressed by the supramolecular interaction. It is possible to develop analytical methodologies for CBZ analysis based on the inclusion complex formation with CB[7], that can be applied in real samples with enough accuracy and precision.
2. The CB[8] was successfully immobilized on a glassy carbon electrode surface by using either Nafion, PVC or a dialysis membrane. The modified electrodes with CB[8] keep the CB[n]s molecular selector properties leading to selective sensors able to eliminate negative charge interferences.
3. The developed electrodes can be employed for the analysis of different biomolecules of interest. The results obtained from the study of the complex formation between the analyte and the receptor, when this receptor is on the electrode surface, allow us to conclude that the increase of the electrolyte concentration in the solution produces an increase in the electrochemical signal. This behavior is different related to the effect observed when the complex is formed in solution conditions. It was developed a TRP sensor based on Nafion/CB[8] that exhibits high selectivity against URI and ASC interferences. In addition, the sensor can be employed for the amino acid determination in a real sample with good analytical parameters.
4. The developed modified electrodes present an excellent stability for their use as flow injection analysis detectors. It was possible the determination of the neurotransmitter DOP in a real sample employing a GCE/PVC/CB[8] sensor as

transducer in a FIA system. In this case, it was also demonstrated the selectivity of the method respect to the ascorbic interference. Further $^1\text{H-NMR}$ experiments allowed us to confirm that it does not produce interaction between the interference and the macrocyclic receptor.

5. With the aim of compensating the decrease in the sensitivity as a consequence of the inclusion complex formation when working with electrochemical techniques, there have been developed new sensing platforms by using special electrodic surfaces. On the one hand, it was satisfactory developed the synthesis of a new combined material of graphene and CB[n] ($n = 7$ and 8). This new material has been characterized with different techniques and it was applied to TRP determination obtaining slightly lower detection limits than that obtained with a Nafion/CB[8] sensor assayed before. Moreover, this sensor can be used for the amino acid determination in two different real samples as human serum and pharmaceutical formulations.
6. There were prepared gold macroporous electrodes that, due to its high surface area, allow compensating the decrease the sensitivity of the method stated above. Preliminary results have shown that CB[7] can be successfully immobilized on all the porous surface through the complex formation with a ferrocene hexanethiol previously adsorbed on it. It is expected that this modification strategy will allow the indirect determination of non electroactive analytes.
7. In summary, the advantages derived from the use of the CB[n]s molecular selection properties in the development of new analytical methodologies has been proved. These abilities can be employed in the design of sensitive and highly selective electrochemical sensors against negatively charged interferences. These devices can be used in the analysis of substances of interest in different real samples.

Acrónimos y símbolos/Acronyms and symbols

$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear de proton	Proton nuclear magnetic resonance
5C-SH	5-pentanotiol	5- pentanethiol
A	Area del electrodo	Area of the electrode
A_g	Area geométrica	Geometric Area
a	Amplitud	Amplitude
Acol	Acetilcolina	Acetilcoline
AFM	Microscopía de fuerza atómica	Atomic force microscopy
ARG	Arginina	Arginine
ASC	Ácido ascórbico	Ascorbic acid
ATP	Adenosin trifosfato	Adenosine triphosphate
BNM	Benomilo	Benomil
C	Concentración	Concentration
C.E.	Contraelectrodo o electrodo auxiliar	Auxiliary electrode
CB[n]s	Cucurbit[n]uriles (n = 5-8,10)	Cucurbit[n]urils (n = 5-8,10)
CBZ	Carbendazim	Carbendazim
C_{dl}	Capacitancia de la doble capa	Double layer capacitance
CDs	Ciclodextrinas	Cyclodextrins
CV	Voltamperometría cíclica	Cyclic voltammetry
CIS	L-Cisteína	L-Cysteine
D	Coeficiente de difusión	Diffusion coefficient
D.E.R.	Desviación estándar relativa	Relative standard deviation
DOP	Dopamina	Dopamine
DPV	Voltamperometría diferencial de impulsos.	Differential pulse voltammetry
DRN	Diuron	Diuron
E_0	Potencial Inicial	Initial potential
EC	mecanismo electroquímica-químico	electrochemical-chemical mechanism
E_f	potencial final	Final potential
EIS	Espectroscopia de impedancia electroquímica	Electrochemical Impedance Spectroscopy
E_p	Potencial de pico	Peak potential
E_{pa}	Potencial de pico anódico	Anodic peak potential
E_{pc}	Potencial de pico catódico	Cathodic peak potential
E_r	Error relativo	Relative error
F	Constante de Faraday	Faraday constant
Fc	Ferroceno	Ferrocene
Fc(OH)_2	Ferroceno dimetanol	Ferrocene dimethanol
Fc^+	Ión ferroceno	ferrocene ion
FcOH	Hidroximetil ferroceno	Hydroxymethyl ferrocene
FcS	6-Hexanotiol ferroceno	6-Hexanethiol ferrocene
Fe(CN)_6^{3-}	Ferricianuro potásico	Ferricyanide potassium
Fe(CN)_6^{4-}	Ferrocianuro potásico	Ferrocyanide potassium
FIA	Análisis por inyección en flujo	Flow injection analysis
G	Grafeno	Graphene
G-CB[n]	Grafeno-Cucurbit[n]uril	Graphene-Cucurbit[n]uril

GCE	Electrodo de carbón vítreo	Glassy carbon electrode
GO	Grafeno oxidado	Graphene oxide
HOPG	Grafito pirolítico altamente ordenado	High ordered pyrolytic graphite
I_f	Intensidad de fluorescencia	Fluorescence intensity
I_{f0}	Intensidad de fluorescencia inicial	Initial fluorescence intensity
I_p	Intensidad de pico	Peak intensity
J	Densidad de corriente	Current density
K, K_f	Constante de formación	Formation constant
LB	Langmuir-Blodgett	Langmuir-Blodgett
LC	Límite de cuantificación	Quantification limit
LD	Límite de detección	Detection limit
LYS	Lisina	Lysine
MSPD	Dispersión de Matriz en fase sólida	Matrix solid phase dispersion
MV^{2+}	Metil viológeno	Methyl viologen
n	Número de electrones	Number of electrons
PHE	D-fenilalanina	D-Phenylalanine
PVC	Cloruro de polivinilo	Poly vinyl chloride
Q	Carga	Charge
q	Caudal o velocidad de flujo	Flow scan rate
R	Factor de rugosidad	Roughness factor
R.E.	Electrodo de referencia	Reference electrode
R_{ct}	Resistencia a la transferencia de carga	Charge transfer resistance
R_{ct}^0	Resistencia a la transferencia de carga para un electrodo sin modificar	Charge transfer resistance of unmodified electrode
R_s	Resistencia del electrolito	Electrolyte resistance
SERS	Espectroscopia raman de superficie mejorada	Surface-enhanced Raman spectroscopy
Sr	Superficie activa	Active surface
t	Tiempo	Time
t_{ac}	Tiempo de acumulación	Accumulation time
TBZ	Tiabendazol	Thiabendazole
TIR	L-Tirosina	L-Tyrosine
TMX	Tiametoxan	Thiamethoxam
TRP	L-Triptófano	L-Tryptophan
t_s	Tiempo de aplicación del escalon de potencial	Interval time
URI	Ácido úrico	Uric acid
V^{2+}	Viológeno	Viologen
V_b	Velocidad de barrido	Scan rate
V_i	Volumen de inyección	Injection volume
W.E.	Electrodo de trabajo	Working electrode
$W_{1/2}$	Anchura de semipico	Width of the peak
Z	Impedancia	Impedance
Z'	Parte real de la impedancia	Real component of impedance
Z''	Parte imaginaria de la impedancia	Imaginary component of impedance
Z_0	Módulo de impedancia	Impedance magnitude
Z_w	Impedancia de Warburg	Warburg impedance
α -CD	α -Ciclodextrina	α -Cyclodextrin

β -CD	β -Ciclodextrina	β -Cyclodextrin
γ -CD	γ -Ciclodextrina	γ -Cyclodextrin
ΔE_p	Diferencia de potencial	Peak potential difference
ΔE_s	Escalón de potencial	Step potential
ΔI_p	Diferencia de la intensidad de pico	Peak intensity difference
θ	Recubrimiento	Coverage
λ_{em}	Longitud de onda de emisión	Emmision wavelength
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación	Excitation wavelength

Lista de publicaciones /List of publications

1. del Pozo, M.; Hernández, L. & Quintana, C. A selective spectrofluorimetric method for carbendazim determination in oranges involving inclusion-complex formation with cucurbit[7]uril, *Talanta*. **2010**, *81*, 1542.
2. del Pozo, M.; Alonso, M.; Hernández, L. & Quintana, C. An Electrochemical Approach for the Cucurbit[7]uril/Carbendazim Supramolecular Inclusion Complex. Application to Carbendazim Determination in Apples, *Electroanalysis*. **2011**, *23*, 189.
3. del Pozo, M.; Hernández, P.; Hernández, L. & Quintana, C. The use of cucurbit[8]uril host-guest interactions in the development of an electrochemical sensor: characterization and application to tryptophan determination, *Journal of Material Chemistry*. **2011**, *21*, 13657.
4. del Pozo, M.; Blanco, E.; Fatas, E.; Hernández, P. & Quintana, C. New supramolecular interactions for electrochemical sensors development: different cucurbit[8]uril sensing platform designs. *Analyst*. **2012**, *137*, 4302.
5. Buaki-Sogo, M.; del Pozo, M.; Hernandez, P.; Garcia, H. & Quintana, C. Graphene in combination with cucurbit[n]urils as electrode modifiers for electroanalytical biomolecules sensing. *Talanta*. **2012**, *101*, 135.
6. Del Pozo, M.; Mejías, J.; Hernández, P. & Quintana, C. Cucurbit[8]uril-based electrochemical sensors as detectors in flow injection analysis. Application to Dopamine determination in serum samples. *Sensor and Actuators B, Chemical*. *Under revision*