



UNIVERSIDAD DE LA HABANA
FACULTAD DE QUIMICA
LABORATORIO DE BIOINORGANICA

***PROPIEDADES DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE
CICLODEXTRINAS INMOVILIZADAS EN SUPERFICIES
METALICAS***

Tesis para optar por el grado Científico de Doctor en Ciencias Químicas

Autor: MSc. Eduardo Almirall Romero

**Tutores: Dr. Alex Fragoso Sierra
Prof. Dr. Roberto Cao Vázquez**

Cuidad de La Habana

2003

INDICE

Introducción.....	1
Capítulo 1: Revisión Bibliográfica.....	4
1.1 La Química Supramolecular.....	4
1.2 Características generales de las ciclodextrinas.....	9
1.3 Derivados de las ciclodextrinas.....	17
1.4 Sensores de reconocimiento molecular basados en derivados de las ciclodextrinas.....	23
1.5 Monocapas cargadas. Aplicaciones.....	32
Capítulo 2: Parte Experimental.....	38
Capítulo 3: Resultados y Discusión.....	59
3.1 Síntesis y caracterización espectroscópica de los derivados de las ciclodextrinas estudiados.....	59
3.2 Caracterización electroquímica de las monocapas de los derivados estudiados en electrodo de plata y oro.....	70
3.3 Aplicaciones de los electrodos de plata y oro modificados con los derivados sulfurados de las ciclodextrinas.....	78
Conclusiones.....	101
Recomendaciones.....	103
Bibliografía.....	104
Anexos	

AGRADECIMIENTOS

En mi época de estudiante en el Instituto Superior Pedagógico de Pinar del Río le dije a mi madre, pienso hacer algo en el futuro de lo cual te podrás enorgullecer, y no tenía la menor idea de la envergadura de mis sueños, pero sí, desde ese preciso momento mi madre ha sido una fuente de comprensión y estímulo de mis actos. En estos últimos tiempos, colmados de buenos y malos momentos no ha faltado nunca su presencia para escuchar mis charlas sobre ciclodextrinas, fracasos y logros, para ella, mi hermano Nivaldo y familia pendientes y orgullosos de todo lo que acontecía, a Eva, Luisita, mi tía Luisa, Tuty y mi familia Romero por su apoyo en todo momento, mis agradecimientos por toda la vida.

No podría dejar de agradecer a Sandra, por su ayuda a recuperarme en los momentos en que los experimentos y el propio decursar de la vida no resultaba como esperaba, a su familia (Claudia Liz, Javielito, y Eugely). A mis amigos de siempre Cesar, Quezada, Garrido, Vardi, Julio Felipe, Calderín Hipólito, y Viñales, que a pesar de que algunos no comprendiesen en su totalidad las dimensiones de mi trabajo me estimulaban a continuar, al menos con la esperanza que lograra mis sueños.

Hay un grupo de compañeros del departamento de química del instituto que me han soportado, ayudado por más de veinte años y no quisiera pasar por acto mis mas profundos sentimientos de agradecimiento, especialmente mi amigo, Decano de la Facultad y Dr. en Químicas Carlos Iglesias, primero por estimular cuando muchos no confiaban, mis deseos de superación e investigación en la Facultad de Química de la Universidad de la Habana, a su esposa Teresa, a mis compañeros y amigos Sergio, Waldo, Roberto, Justo, Ariel, Evelio y el ya desaparecido Bili, por las largas y amenas charlas sobre temas de investigación, matizadas en ocasiones por un buen licor. A Estrellita y Wilmian por el café y las tostadas en los momentos de más agobio, soledad y trabajo en el laboratorio. A todas mis compañeras del Departamento: Hilda, Ana Margarita, Nilda, Esther Portela, Katia, Katuska, Odalis, Antonia, Nadina y Andrea, por haber confiado en mí.

Quisiera agradecer a otro buen colectivo de trabajo donde realice mi trabajo de investigación, el laboratorio de Bioinorgánica. Primeramente, a mi tutor Roberto Cao, por haberme transmitido el rigor profesional con que acometer una investigación en ciencia, así como sus ideas y experiencias, unas veces no comprendidas, pero válidas con el decursar del tiempo. A la compañera Alicia, por su ejemplo de trabajo y abnegación en los momentos más difíciles del laboratorio. A los demás compañeros del laboratorio Yan, Ileana, Maysa, Mayreli, el pinareño (administrador Javier), Pedro, Ariadna, Smith, Kike, el Barcelonista Rayser y otros como Estael, Kino, Tacoronte y Gustavo, que en los momentos mas difíciles me brindaron siempre su ayuda. A mis amigos los vidrieros Joaquín, Pancho y Ramón, por sus sinceras amistades y por haberme hecho todos los electrodos, celdas, etc.

Finalmente, quiero agradecer a dos personas, una de ellas, que por la década del 80 comenzamos juntos la superación en la Universidad de la Habana, y ha sido durante todos estos años a pesar de la separación fuente de inspiración, ayuda y vocación hacia la investigación, mi entrañable amigo Raúl González-Jonte Cruz. La otra, mi tutor y amigo Alex Fragoso, primero por haberme aceptado, a pesar de mi desconocimiento en el proyecto de las ciclodextrinas a finales del siglo pasado, así como por haber pasado juntos todos los buenos y malos momentos de la investigación, y la plena confianza de poder concretar un proyecto de investigación digno, donde mis antiguos sueños se convirtieran en esta realidad.

RESUMEN

La presente tesis reporta la síntesis y caracterización de derivados sulfurados de ciclodextrina conteniendo grupos tiol y ditiocarbamato para su inmovilización en electrodos metálicos y el estudio de algunas de sus posibles

aplicaciones. Los procesos de formación de las monocapas fueron estudiados a través de mediciones voltamétricas, de desorción reductiva e impedancia. Los electrodos modificados con derivados de ciclodextrinas se utilizaron como sensores de reconocimiento molecular de varias familias de isómeros de nitrocompuestos aromáticos disustituidos, estudiándose la influencia que tiene, en la respuesta electroquímica, la posición de los sustituyentes en el sustrato estudiado y el tamaño de la cavidad de la ciclodextrina. Se describe además el empleo de electrodos modificados con β -ciclodextrina y ácido tióctico en el desarrollo de una novedosa estrategia para la determinación simultánea de dopamina en presencia de ascorbato basada, sustancias que están asociadas a los procesos de neurotransmisión. La estrategia está basada en una combinación de interacciones electrostáticas y supramoleculares que son capaces de diferenciar entre ambas sustancias. Finalmente, se reporta la inmovilización de proteínas en electrodos empleando interacciones supramoleculares. En particular, se estudió el proceso de inmovilización de la metaloproteína citocromo c conjugada a residuos de adamantano en un electrodo de oro modificado con β -ciclodextrina, lo cual se puede considerar como un modelo de biosensor. Los sistemas estudiados fueron caracterizados por diversas técnicas electroquímicas (voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia) y, en algunos casos, los resultados fueron complementados con estudios computacionales.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los fenómenos de reconocimiento molecular y de autoensamblaje constituye en la actualidad uno de los campos más novedosos de la Química Supramolecular dada su relación con los procesos biológicos. Las especies supramoleculares tienen en el reconocimiento molecular y en los procesos de autoensamblaje sus funciones básicas, las cuales han sido aprovechadas de diversas formas en el desarrollo de nuevos materiales y dispositivos, tales como sensores, catalizadores artificiales, etc.

Entre los diferentes tipos de receptores moleculares existentes, las ciclodextrinas han sido objeto de intenso estudio desde mediados del pasado siglo. Esta familia de oligosacáridos cíclicos naturales posee una

estructura tridimensional muy peculiar de cono anular truncado con una cavidad central hidrofóbica. Tal estructura les permite formar complejos de inclusión con diferentes sustratos orgánicos e inorgánicos, mediante interacciones de tipo no covalentes. Las ciclodextrinas han sido utilizadas como receptores en estructuras supramoleculares para diseñar, entre otros, enzimas artificiales, sistemas de liberación controlada de fármacos y sensores de reconocimiento molecular. Estos últimos dispositivos son receptores moleculares capaces de detectar y discriminar de forma simultánea diversas moléculas mediante la variación de alguna propiedad física del receptor o del sustrato.

Uno de los tipos de sensores de reconocimiento molecular más estudiado es aquel que se obtiene al inmovilizar en la superficie de un electrodo una sustancia que pueda detectar a un sustrato presente en disolución. Sin embargo, el empleo con este fin de receptores moleculares con cavidades bien definidas ha sido reportado sólo muy recientemente, por lo que el comportamiento de estos sistemas es poco conocido. La idea consiste en dotar a la superficie de propiedades de reconocimiento molecular bien definidas y predecibles que le permitan un amplio rango de aplicaciones.

En 1995, se inició el estudio de sensores de reconocimiento molecular formados por un derivado de la β -ciclodextrina inmovilizado en superficies de oro mediante procesos espontáneos de quimisorción. Este proceso genera monocapas estables del receptor con propiedades de reconocimiento molecular. A partir de entonces, sólo algunos autores se han adentrado en este interesante campo, aunque la gran mayoría de los trabajos publicados hasta ahora se han limitado al estudio del fenómeno de inmovilización del receptor en sí mismo, con muy poco énfasis aplicativo. Esto hace que este campo de investigación esté aún prácticamente virgen, lo cual ofrece numerosas perspectivas de desarrollo.

Desde el año 1997, el Laboratorio de Bioinorgánica de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana ha venido trabajando en la inmovilización de derivados sulfurados de las ciclodextrinas en electrodos con el interés de desarrollar sistemas de reconocimiento molecular con diversas aplicaciones. Este tema, hasta donde tiene conocimiento el autor, no ha sido estudiado en nuestro país, a pesar de su gran actualidad y perspectivas futuras, y ha sido explorado por sólo algunos pocos grupos en el mundo.

El presente trabajo se propone demostrar la siguiente hipótesis científica:

“las ciclodextrinas inmovilizadas en superficies metálicas poseen propiedades de reconocimiento molecular que pudieran ser empleadas en la detección de moléculas y en la inmovilización de proteínas.”

En este sentido, el trabajo tiene como objetivo fundamental:

Estudiar voltamétricamente las propiedades de reconocimiento molecular de diferentes derivados sulfurados de las ciclodextrinas inmovilizados en superficies metálicas de oro y plata, en la determinación de moléculas de interés biológico y en el proceso de inmovilización de proteínas.

Los objetivos específicos del trabajo son:

Sintetizar y caracterizar diversos derivados sulfurados de las ciclodextrinas.

Caracterizar los procesos de quimisorción de los derivados sulfurados de las ciclodextrinas sintetizados en electrodos de oro y plata, a través de diferentes técnicas electroquímicas (voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia).

Diferenciar voltamétricamente isómeros de posición de nitrocompuestos aromáticos.

Detectar dopamina en presencia de ascorbato, problema de gran importancia relacionado con la determinación electroquímica de sustancias asociadas a los procesos de neurotransmisión.

Inmovilizar proteínas, en particular de citocromo c, empleando interacciones supramoleculares, el cual constituiría un novedoso sistema de gran importancia práctica en el desarrollo de biosensores.

La novedad científica y originalidad de este trabajo se materializan en el hecho de que el estudio de electrodos modificados mediante quimisorción de ciclodextrinas sulfuradas (objetivo 2) es un aspecto muy reciente, reportado por primera vez en 1995, por lo que existen pocos trabajos en la literatura orientados hacia el empleo práctico de estos dispositivos. En este sentido, los objetivos planteados en 3, 4 y 5 son enteramente novedosos, ya que introducen nuevas ideas y estrategias que pueden ser útiles en el futuro diseño de sensores de reconocimiento molecular y biosensores enzimáticos.

CAPITULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1- La Química Supramolecular.

La química molecular es una disciplina muy antigua que se dedica a la síntesis de moléculas a partir de la ruptura y formación de enlaces covalentes entre los átomos.¹ Con el tiempo, y con el desarrollo de novedosas técnicas de caracterización, la química molecular ha ido evolucionando hacia una nueva química basada en las interacciones intermoleculares que se ponen de manifiesto en las asociaciones moleculares: *la química supramolecular*² (figura 1.1)

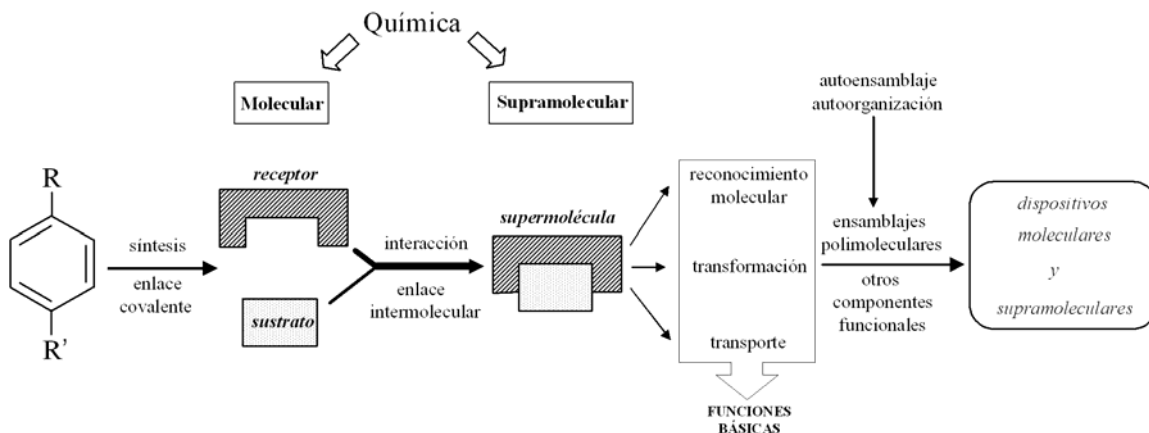


Figura 1.1- Evolución de la química molecular a la química supramolecular.

La química supramolecular es una nueva rama de la química de carácter interdisciplinario, que se ubica en la frontera de la Química (inorgánica, orgánica, analítica, etc.), la Física y la Biología. Estudia la formación de agregados moleculares entre moléculas, iones y radicales, como resultado de la acción de fuerzas intermoleculares de diferente naturaleza tales como fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, dipolares, etc.³ Es, por lo tanto, la química de las interacciones intermoleculares no covalentes, más allá de las moléculas.⁴

Los antecedentes iniciales de la química supramolecular se establecieron a partir de los trabajos de Emil Fischer en 1894, relacionados con la selectividad y reactividad en la unión molecular, que tiene como formulación teórica el principio de “*la llave y la cerradura*”,⁵ que rige la catálisis enzimática. Esta teoría, además, conformó la base teórico-conceptual de los sistemas de reconocimiento molecular y de transporte de sustratos a través de las membranas celulares. Otros conceptos que contribuyeron a la

formación de la química supramolecular como disciplina fueron la teoría de la "coordinación" de Alfred Werner en 1893,³ así como el de "receptor" de Paul Ehrlich.⁶

La formación de especies supramoleculares está regida por un proceso de reconocimiento molecular, que tiene como fundamento teórico el principio de doble complementariedad enunciado por Emil Fischer. Este principio considera que para la formación de especies supramoleculares es necesario que se ponga de manifiesto una doble complementariedad geométrica entre el sustrato y el receptor dada por la compatibilidad en cuanto a tamaño, forma y carga entre ambos. Esto hace que las especies estén en una disposición estructural adecuada para que se produzcan interacciones intermoleculares óptimas entre ambas.²

1.1.1- Reconocimiento molecular y autoensamblaje

La química supramolecular comenzó su desarrollo vertiginoso a partir de los años sesenta, cuando el estudio de las reacciones bioquímicas que se producían en los seres vivos evidenció que muchos de los fenómenos biológicos dependen de procesos enzimáticos o de transporte de sustratos a través de membranas celulares etc. Hoy se conoce que muchos de estos procesos bioquímicos se desarrollan a través de diferentes formas de reconocimiento molecular entre sustrato y receptor.^{3, 7}

El reconocimiento molecular es una función básica de las especies supramoleculares; se define como la energía e información química asociadas a las interacciones no covalentes que se ponen de manifiesto en el proceso de selección de un sustrato por un receptor molecular.³ Un ejemplo de este fenómeno es el llamado proceso de inclusión (host-guest) que, en su caso más simple, da lugar a la formación de una estructura en la que el receptor alberga total o parcialmente al sustrato. Otro concepto importante a tener en cuenta es el autoensamblaje supramolecular (supramolecular self-assembly). Este fenómeno se define como la asociación espontánea de dos ó más unidades complementarias que provoca la formación de agregados polimoleculares.^{3,8} Ello significa que este proceso involucra repetidos reconocimientos moleculares, tal y como se representa en la figura 1.2.

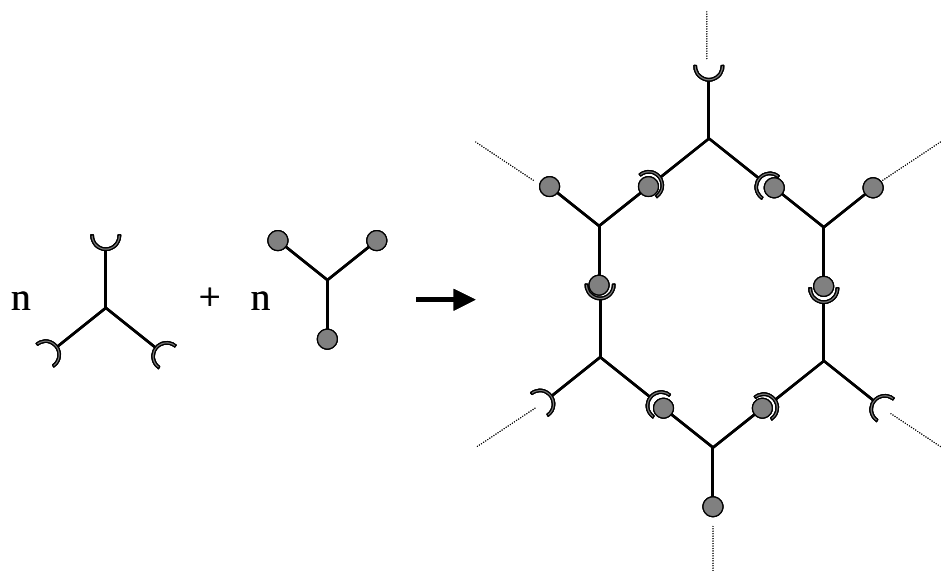


Figura 1.2- Autoensamblaje de subunidades químicas complementarias.

El concepto de autoensamblaje no es una idea totalmente nueva. Un número elevado de sistemas multicomponente utilizan esta vía en los procesos biológicos, incluso el proceso químico de cristalización es también una forma de autoensamblaje.^{9,10} No obstante, lo más importante es que mediante la síntesis y estudio de especies supramoleculares, se han ido comprendiendo mejor los principios que gobiernan los procesos de reconocimiento molecular y de autoensamblaje, aunque queda aún mucho por entender y sistematizar.

1.1.2- Receptores moleculares.

La química supramolecular puede considerarse fundamentalmente, de forma general, como la química de las moléculas con cavidades bi- o tridimensionales. Los receptores moleculares son estructuras capaces de acomplejar selectivamente sustratos iónicos o moleculares, a través de interacciones intermoleculares, con la formación de una estructura supramolecular.³ Una de las formas de clasificación de los receptores moleculares es en función de la estequiometría del complejo formado.^{11,12}

-receptor monotópico: es aquel que posee una sola región molecular capaz de actuar como receptor y por lo tanto puede acomplejar un solo sustrato.

-receptor politópico: es aquel que posee dos ó más regiones moleculares unidas covalentemente, capaces de acomplejar a más de un sustrato.

Una gran variedad de receptores moleculares han sido sintetizados e investigados, especialmente los de tipo macrocíclicos. Estos trabajos precisamente marcaron el inicio de la química supramolecular y fueron llevados a cabo por Pedersen,¹³ Cram,¹⁴ y Lehn,¹⁵ por lo que compartieron el Premio Nóbel de Química en el año 1987. Los compuestos macrocíclicos sintetizados por ellos fueron conocidos como "*éteres corona*," "*esferandos*" y "*criptandos*", que son receptores moleculares capaces de complejar selectivamente cationes de distintos tamaños en función del tamaño del macrociclo. Los trabajos iniciales en química supramolecular se centraron en el diseño de moléculas con funciones receptoras basadas en el reconocimiento molecular y los procesos de acomplejamiento, sin que se llevaran a cabo reacciones químicas con el sustrato. Si el receptor presenta en su estructura determinados grupos reactivos capaces de transformar químicamente al sustrato acomplejado este proceso es conocido como *catálisis supramolecular*.³

Las estructuras receptoras pueden también comportarse como transportadores supramoleculares a través de una membrana biológica, al encontrarse el receptor molecular localizado en el interior de una membrana y

actuar como transportador selectivo del sustrato a través de la misma.³

En resumen, puede decirse que los procesos de reconocimiento, autoensamblaje, transporte y transformación conforman las funciones básicas de los receptores supramoleculares.

En la figura 1.3 se muestran las estructuras de diferentes receptores moleculares. Entre ellos las ciclodextrinas han sido uno de las más estudiados y sirven de base experimental de nuestra investigación, por lo que serán tratadas en detalle en el epígrafe siguiente.

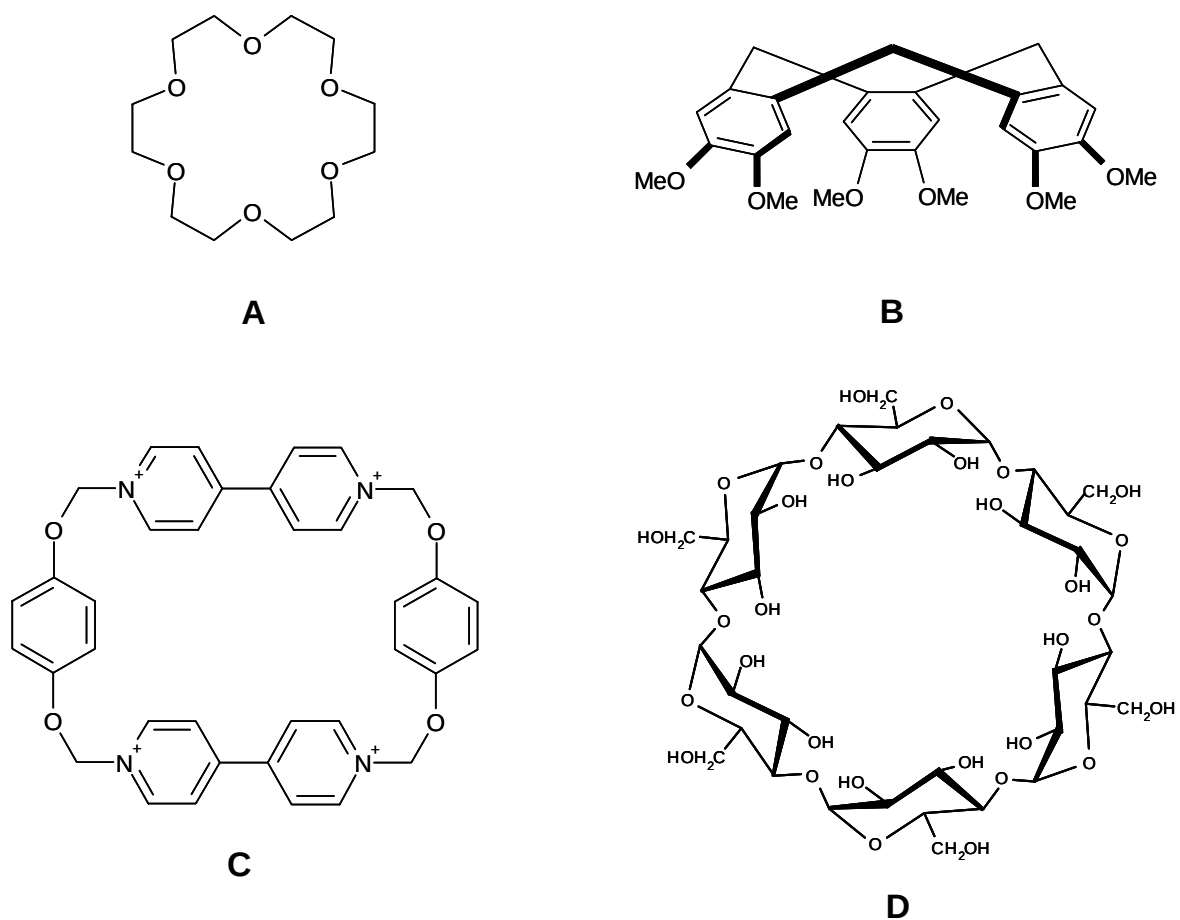


Figura 1.3- Ejemplos de receptores moleculares. A: 18-corona-6. B: ciclotriveratrileno. C: ciclofano. D: α -ciclodextrina.

1.2.- Características generales de las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos naturales no reductores, constituidos por 6, 7, u 8 unidades de D(+)-glucopiranosas unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ glicosídicos, que se denominan α -, β - y γ -ciclodextrina, respectivamente (figura 1.4).

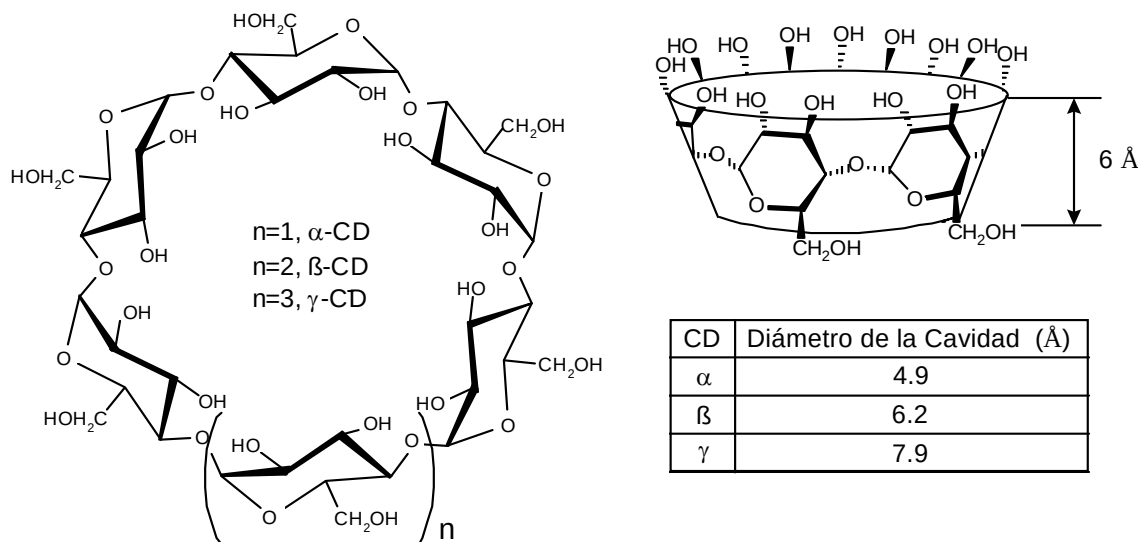


Figura 1.4- Estructura cíclica y dimensiones de las ciclodextrinas.

Son conocidas también ciclodextrinas con más de ocho unidades de D(+)-glucopiranosas (δ , ϵ y η -ciclodextrinas),¹⁶ hasta llegar a tener catorce unidades,¹⁷ aunque no son las más utilizadas por su pobre capacidad en la formación de compuestos de inclusión, debido al gran tamaño de la cavidad.

La estructura de las ciclodextrinas ha sido elucidada a partir de estudios de difracción de rayos X.¹⁸ Como resultado de la conformación silla 4C_1 de las unidades glucopiranósicas, las ciclodextrinas presentan una forma tridimensional de cono anular truncado.¹⁹ (figura 1.4). Los grupos hidroxilo primarios enlazados al carbono 6 de la cara primaria de cada unidad

glucopiranosica quedan orientados hacia el borde más estrecho del cono, mientras que los hidroxilos secundarios situados en los carbonos 2 y 3 de la cara secundaria quedan, por consiguiente, dirigidos hacia el borde más ancho del cono anular. Así, todos los grupos hidrofílicos se ubican alrededor de las aberturas de la cavidad y orientados hacia afuera. De esta forma, la ciclodextrina presenta un revestimiento externo de naturaleza altamente hidrofílica. Los átomos de hidrógeno metínicos de los carbonos 3 y 5, así como los pares electrónicos de los enlaces glicosídicos quedan orientados hacia el interior de la cavidad, dándole un carácter marcadamente hidrofóbico y apolar (figura 1.5).



Figura 1.5- Ubicación de los diferentes grupos funcionales en la molécula de ciclodextrina.

En 1891, Villiers publicó la primera referencia acerca de las ciclodextrinas cuando aisló una sustancia cristalina no reductora a partir de la degradación enzimática del almidón,²⁰ que llamó celulosina. Poco después, la enzima ciclodextrin-transglicosilasa, de origen bacterial, fue aislada por primera vez del microorganismo *Bacillus macerans*²¹ y se utilizó en la degradación enzimática del almidón, obteniéndose mezclas de dextrinas lineales y cíclicas. Posteriormente, Schardinger²¹ desarrolló en 1903 un trabajo sistemático en la síntesis y purificación de sustancias similares a la celulosina obtenida por Villiers, así como al estudio de sus compuestos de inclusión con yodo. Estos

experimentos permitieron diferenciar la α - de la β -ciclodextrina, identificándose como “*dextrinas de Schardinger*”.

En 1936, los trabajos relacionados con la hidrólisis enzimática de las dextrinas de Schardinger definieron la estructura cíclica de estas moléculas y la naturaleza de los enlaces glicosídicos tipo $\alpha(1\rightarrow4)$. En 1948, Freudenberg descubrió una nueva ciclodextrina, la γ .²² En la actualidad las ciclodextrinas se producen industrialmente en grandes cantidades a partir de cepas del bacilo modificadas genéticamente, de forma tal que se obtiene selectivamente solamente una de las ciclodextrinas. Este método evita los procesos de separación de mezclas y hace más rentable el proceso, obteniéndose las ciclodextrinas como reactivos con grados de pureza superior al 99%.^{21,23}

Las ciclodextrinas son receptores moleculares tridimensionales monotópicos, que al poseer una cavidad hidrofóbica central, les permite la formación de complejos de inclusión con una gran variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos. Esta propiedad contribuyó al desarrollo de un gran número de aplicaciones de las ciclodextrinas en la tecnología de los alimentos,²⁴ las industrias farmacéutica, textil, biotecnológica y cosmética.²⁵ A pesar de las potencialidades de aplicación de las ciclodextrinas en la química analítica, sólo han encontrado uso en la electroforesis capilar y la cromatografía quiral.

Una de las principales aplicaciones de las ciclodextrinas en la química supramolecular ha sido en el diseño de enzimas artificiales a partir de los años 60 por Tabushi,²⁶ Bender²⁷ y Breslow.²⁸ Existen algunos casos notables en los que la sustitución de grupos hidroxilo por ciertos grupos funcionales ha permitido obtener enzimas artificiales con una actividad catalítica superior a la enzima natural que se desea modelar.²⁹

Otras aplicaciones de las ciclodextrinas que han motivado un gran desarrollo de la química supramolecular, es su utilización como sistemas de transporte selectivo de sustratos a través de las membranas biológicas.²³ También se ha empleado la modificación selectiva de todos los hidroxilos

primarios o secundarios por grupos apolares, obteniéndose derivados anfifílicos capaces de formar monocapas en la interfase de una disolución y en estado sólido, a través de procesos de auto-organización con diversas aplicaciones.¹⁸

El diseño de artefactos de reconocimiento molecular, es otra de las aplicaciones de las ciclodextrinas que se ha desarrollado aceleradamente en la actualidad, dada su capacidad de formar complejos de inclusión intramoleculares con determinados sustituyente (figura 1.6).^{30,31} En este tipo de sistema, el sustituyente está acomplejado en la cavidad de la ciclodextrina y puede ser desplazado hacia el exterior por un sustrato o molécula huésped, alcanzándose de esa forma un estado de equilibrio entre ambos complejos.

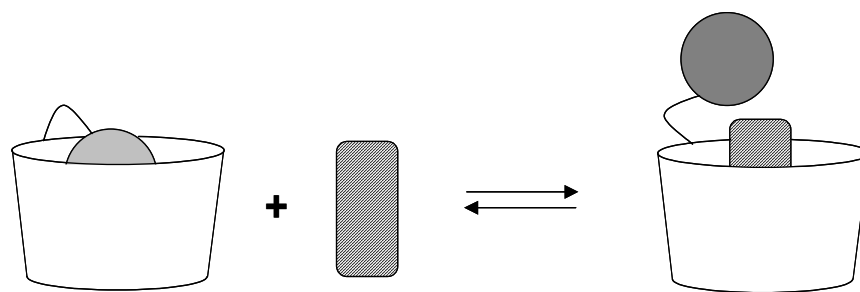


Figura 1.6- Representación de un artefacto de reconocimiento molecular formado por una ciclodextrina modificada.

Finalmente, una de las aplicaciones de las ciclodextrinas en la química supramolecular que ha tenido un desarrollo vertiginoso en la actualidad, y que presenta una importancia fundamental en nuestra tesis, es en el diseño de sensores de reconocimiento molecular a partir de electrodos modificados con ciclodextrinas. Estos sensores se basan en la propiedad de estas moléculas de formar compuestos de inclusión con una gran variedad de sustratos.

1.2.1- Propiedades de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son sólidos cristalinos incoloros. Su hidrólisis ácida parcial produce una mezcla de glucosa y una serie de oligosacáridos lineales. Este proceso transcurre a través de una cinética de pseudo primer orden.³² Las

principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas dependen del número de unidades de D(+)-glucopiranosas presentes en la molécula y se recogen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: **Principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas.**

Propiedades	α CD	β CD	γ CD
Unidades de D(+)-glucopiranosas	6	7	8
Masa molecular (g/mol)	973	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Temperatura de descomposición (°C)	250-260	255-265	240-245
Solubilidad en H ₂ O (g /100 mL a 25°C)	14.5	1.85	23.2
Poder rotatorio de la luz polarizada $[\alpha]_D^{25}$	150	162.5	177.4
Profundidad de la cavidad (Å)	7.9	7.9	7.9
Diámetro de la periferia (Å)	14.6	15.4	17.5
Volumen aproximado de la cavidad:			
Por molécula (Å ³)	174	262	972
Por gramos (Å ³)	0.10	0.14	0.20
Moléculas de H ₂ O en el interior de la cavidad	8	11	17

Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes de las ciclodextrinas es su solubilidad. Son solubles en agua y disolventes polares apróticos como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la dimetilformamida (DMF) y prácticamente insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos comunes tales como alcoholes, acetona, etc.³³

En la molécula de ciclodextrina, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del C₂ de una unidad glucopiranosica forma un enlace por puente de hidrógeno con el protón del grupo hidroxilo del C₃ de la unidad adyacente. En el caso de la β -ciclodextrina, los siete enlaces por puente de hidrógeno forman un cinturón en la cara secundaria con una geometría tal que origina una estructura sustancialmente rígida, estable y difícil de solvatar, lo que explica en cierta medida su menor solubilidad en agua. En la α - y γ -ciclodextrinas este cinturón está distorsionado por razones geométricas, lo cual hace más

débiles los enlaces de hidrógeno que lo forman y, por tanto, son más fáciles de solvatar, aumentando su solubilidad en agua con respecto a la β -ciclodextrina.³⁴

1.2.2- Complejos de inclusión en ciclodextrinas.

Como hemos visto, la estructura cíclica de las ciclodextrinas determina una cavidad apolar (receptor), que les permite la inclusión de moléculas huéspedes (sustratos), preferentemente apolares, en el interior de la cavidad mediante interacciones no covalentes. Este tipo de ensamblaje forma estructuras más o menos estables, que pueden ser aisladas en fase sólida. Es de notar que la inclusión apenas afecta la estructura y la funcionalidad de los sustratos moleculares, aunque puede provocar alguna ligera deformación del receptor.

A pesar de ser muchos y variados los trabajos realizados acerca del poder acomplejante de las ciclodextrinas, todos los autores coinciden en que se trata de un fenómeno huésped-hospedero. Pringsheim, en 1920, descubrió esta propiedad en las ciclodextrinas y lo denominó “coordinación”, y al producto formado “complejo”. La terminología actual es de “complejo de inclusión”, propuesta por Schlenk 30 años después de Pringsheim.²³

El proceso de reconocimiento molecular de sustratos por las ciclodextrinas requiere que el receptor y el sustrato sean compatibles en cuanto a su tamaño y su forma. Si, además, el sustrato posee grupos polares capaces de formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del receptor, la interacción será más fuerte y, por tanto, la estructura será más estable.³⁵ La fuerza motriz en la formación de complejos de inclusión es el desplazamiento, por parte del sustrato, de moléculas de agua situadas en la cavidad de las ciclodextrinas en posiciones energéticamente desfavorables (interacción polar-apolar).³³ Ello provoca un aumento de la entropía del sistema, favoreciendo el proceso de formación del complejo de inclusión. En la figura 1.7 se representa de forma esquemática el proceso de formación de un complejo de inclusión.

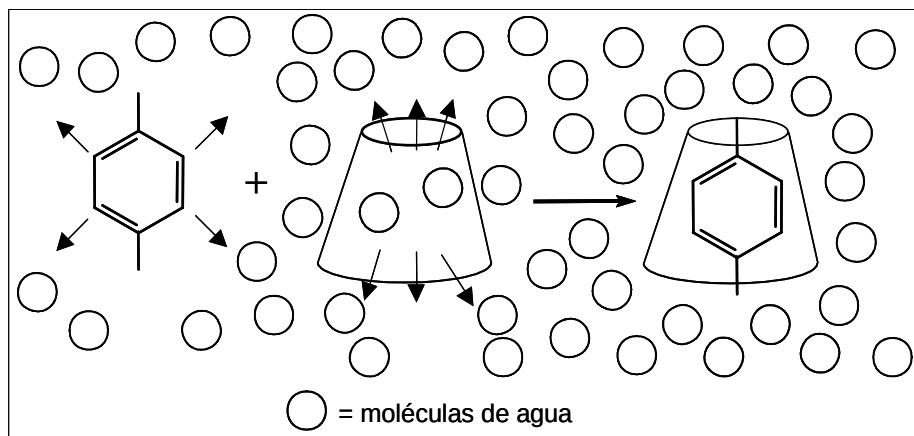


Figura 1.7- Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión.

La naturaleza y contribución de las diferentes interacciones que toman parte en la formación de los complejos de inclusión no son enteramente conocidas, aunque la mayoría de los autores consideran como más importantes las siguientes:

- 1- Interacciones hidrofóbicas.
- 2- Formación de enlaces por puente de hidrógeno entre los centros polares de las moléculas.
- 3- Interacciones de van der Waals.
- 4- Liberación de energía por desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad por el sustrato apolar.
- 5- Energía liberada por cambios conformacionales.
- 6- Interacciones dipolares y dispersivas.
- 7- Interacciones electrostáticas

Las interacciones hidrofóbicas sustrato-receptor son las predominantes en la formación de los compuestos de inclusión, aunque las contribuciones de cada una de estas fuerzas dependen de la naturaleza del sustrato incluido.

La estructura y estabilidad de los complejos de inclusión depende de dos parámetros fundamentales:

1. *Polaridad del sustrato*: La estabilidad de los complejos de inclusión está en función del carácter hidrófobo del sustrato.
2. *Compatibilidad geométrica*: La estabilidad de los complejos de inclusión también depende del tamaño y forma geométrica del sustrato con respecto a las dimensiones de la cavidad de las ciclodextrinas.

El proceso de formación de complejos de inclusión provoca variaciones reversibles en las propiedades fisicoquímicas de la molécula huésped, tales como su solubilidad en agua, volatilidad y fotosensibilidad, confiriéndoles una gran utilidad industrial en la solubilización de drogas,³⁶ la estabilización de sustancias volátiles,²⁴ y la protección contra la oxidación.²⁵ Otras propiedades fisicoquímicas de las moléculas huéspedes que sufren variaciones al formar complejos de inclusión son sus corrimientos químicos en RMN y la intensidad y posición de las bandas de sus espectros de absorción y de fluorescencia, los cuales son muy útiles para detectar la inclusión y determinar sus parámetros cinéticos y termodinámicos.^{37,38}

El sistema más frecuente de inclusión molecular se verifica con estequiometría 1:1 y es descrito mediante la ecuación siguiente:



donde G es la molécula huésped, CD la molécula de ciclodextrina, G-CD es el complejo de inclusión formado y K es la constante de equilibrio.

Los principales tipos de compuestos de inclusión que se observan entre las ciclodextrinas y diferentes sustratos son los siguientes:³³

1. *Parcial*: Inclusión parcial del sustrato en la cavidad de la ciclodextrina. Si la molécula huésped es de dimensiones muy grandes con respecto a la ciclodextrina, el proceso de inclusión se lleva a cabo sólo por una parte del sustrato que se incluye.

2. *Completa*: Inclusión total de una pequeña molécula huésped en la cavidad de la ciclodextrina. Si el huésped posee grupos polares, éstos generalmente quedan orientados hacia el exterior de la cavidad. Los grupos polares pudieran interactuar con los grupos OH periféricos de las ciclodextrinas, mediante enlaces por puente de hidrógeno.
3. *Complejos con estequiometría superior*: Tanto en solución como en estado sólido pueden formarse complejos de inclusión de estequiometría superior, (p.e, 2:1 sustrato-receptor), si el sustrato es de pequeñas dimensiones, o 1:2 si, por el contrario, el sustrato es mucho mayor que la cavidad.

1.3- Derivados de las ciclodextrinas

La síntesis de derivados de ciclodextrinas constituye en la actualidad un desafío de extraordinaria dimensión para la química supramolecular, debido a sus potenciales aplicaciones en diversos campos. Por otro lado, los derivados de las ciclodextrinas en muchas ocasiones poseen una mayor capacidad de formación de complejos de inclusión, como consecuencia de los nuevos grupos funcionales incorporados a las ciclodextrinas.¹⁸

Las estrategias de síntesis de derivados de las ciclodextrinas están regidas por dos de sus principales propiedades estructurales: la capacidad de formación de compuestos de inclusión y la presencia de numerosos grupos hidroxilo en la periferia del cono anular truncado, que pueden ser sustituidos por diferentes grupos funcionales. Los grupos más reactivos en reacciones de sustitución nucleofílica son los hidroxilos más básicos unidos al C₆ (pK_a = 15-16), seguido de los hidroxilos unidos al C₂ (pK_a = 12-13). En C₃ se encuentran los grupos hidroxilos menos accesibles a reacciones de sustitución nucleofílica debido a los enlaces por puentes de hidrógeno en los que intervienen con los grupos hidroxilo de unidades adyacentes de glucopiranosas.^{18,39}

En la década del 50 aparecieron de forma sistemática en revistas especializadas las primeras referencias relacionadas con la síntesis y caracterización de derivados de las ciclodextrinas.²¹ Recientemente,^{39,40} se han reportado recopilaciones de los principales tipos de derivados de las ciclodextrinas, así como de las diferentes estrategias de síntesis

y sus principales aplicaciones.

Diversos autores han intentado clasificar los derivados de las ciclodextrinas atendiendo a variados criterios. A continuación mostramos una propuesta general de clasificación (figura 1.8).

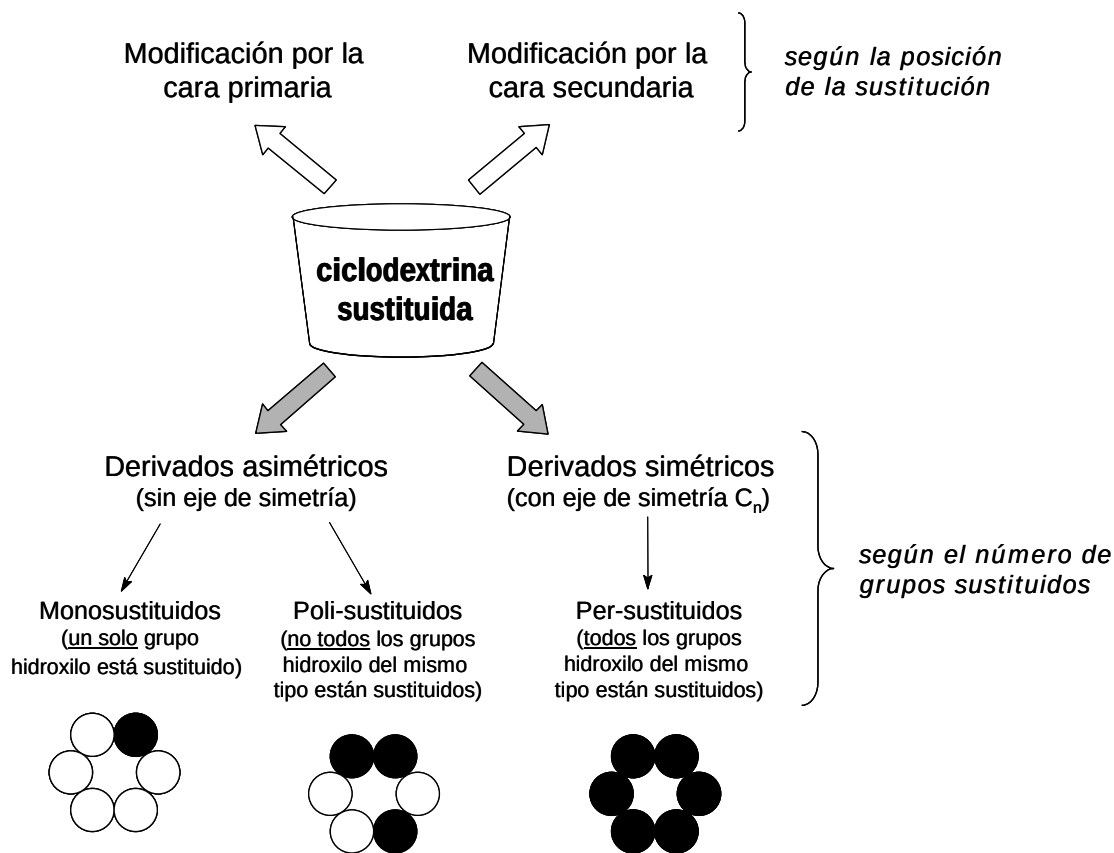


Figura 1.8- Clasificación de los derivados más comunes de las ciclodextrinas.

La forma más directa de síntesis de derivados de las ciclodextrinas es a partir de la sustitución, mediante un reactivo electrofílico, de uno o varios grupos hidroxilo primarios o secundarios de las ciclodextrinas.^{39,41}

En el presente trabajo utilizaremos fundamentalmente la síntesis de derivados simétricos por la cara primaria, por lo que haremos hincapié en este tipo de derivado. Es por ello, que sólo haremos una breve mención de los derivados asimétricos, dada su importancia en la formación de una visión general de los principales métodos de síntesis.

La síntesis de derivados asimétricos de las ciclodextrinas se realiza mediante la sustitución parcial de uno o varios grupos hidroxilo. Entre los más importantes están los monosustituídos, siendo su obtención básicamente un problema estadístico debido al gran número de grupos hidroxilo presentes en la periferia del cono anular. Es por ello, que las condiciones de reacción deben ser ajustadas de forma muy cuidadosa para evitar la polisustitución. Uno de los derivados monosustituídos que ha sido más investigado por su importancia sintética, es el monotosilato de las ciclodextrinas. En la literatura existe una variada recopilación de métodos de monotosilación de ciclodextrinas por la cara primaria o secundaria.^{39,42,43,44} Como el grupo sulfonato es fácilmente sustituible por otros grupos funcionales mediante reacciones de sustitución nucleofílica, los derivados monotosilados son importantes precursores de derivados más complejos (Figura 1.9). Las ciclodextrinas monosustituídas tienen aplicación en el diseño de enzimas artificiales, sensores, etc.^{29,30,40,45}

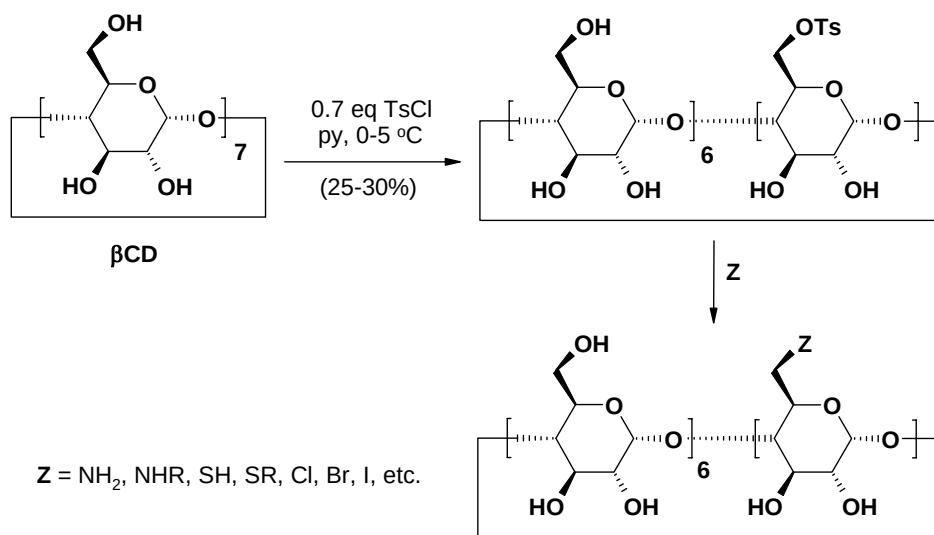


Fig. 1.9- Síntesis de derivados monosustituídos de ciclodextrinas.

La activación del carbono 6 para la síntesis de derivados *per*-sustituídos se puede llevar a cabo de dos formas diferentes.⁴⁶ La primera vía consiste en tratar la ciclodextrina con un ligero exceso de un reactivo electrofílico poco selectivo, por ejemplo, un cloruro

de sulfonilo en piridina a temperatura ambiente. Como es de suponer, esto origina una mezcla de productos que, en muchas ocasiones, es difícil de separar y purificar. La reacción se sigue por cromatografía de capa delgada hasta la formación del producto deseado con el mayor rendimiento posible que es aislado por recristalización o por cromatografía de columna. De esta forma Lautsch, en 1954, obtuvo por primera vez el *heptakis*-(6-*O*-tosil)- β -ciclodextrina con un 50% de rendimiento.⁴⁷ Esta síntesis fue mejorada posteriormente por Takeo y empleada para preparar un derivado *per*-halogenado.⁴⁸

La segunda vía es una versión mejorada de la anterior en la cual se escoge un reactivo electrofílico selectivo a los hidroxilos de alcoholes primarios, los cuales son reemplazados por halógenos. A diferencia del primer método, en este caso se pueden emplear grandes excesos de reactivo y altas temperaturas para garantizar la *per*-sustitución, sin afectar la selectividad de la sustitución. Esto hace que el procedimiento sintético sea más sencillo y la purificación más fácil. En 1974, Takeo sintetizó por primera vez, de forma directa, un derivado *per*-halogenado por C₆, al hacer reaccionar el bromuro de metanosulfonilo con las ciclodextrinas nativas en dimetilformamida, obteniéndose los correspondientes *per*-bromuros con un 76% de rendimiento.⁴⁹ Posteriormente, Defaye^{50,51} propuso un método directo de *per*-halogenación en C-6 a partir de la reacción de α - y β -ciclodextrina con trifenilfosfina y bromo o yodo en dimetilformamida, obteniéndose el correspondiente *per*-(6-halo-6-desoxi)-derivado en un 84-87%. De esta forma se obtuvieron, de forma inequívoca, los primeros derivados *per*-bromados y *per*-yodados que resultaron ser intermediarios de síntesis muy útiles.

La síntesis directa del *heptakis*-(6-cloro-6-desoxi)- β -ciclodextrina fue propuesta por D'Souza en 1994,⁵² a través de la formación de un intermediario de Vilsmeier-Haack, producto de disolver imidazol y cloruro de bencenosulfonilo en dimetilformamida, en exceso con relación a la β -ciclodextrina.

Posteriormente, Defaye⁵³ propuso otros dos métodos generales de *per*-halogenación directa al hacer reaccionar las ciclodextrinas naturales con un exceso de haluro de halometilenmorfolinio (generado *in situ* en presencia de DMF)^{53a} o una mezcla de *N*-halosuccinimida y trifenilfosfina en DMF.^{53b} Estas reacciones también ocurren a

través de intermediarios tipo Vilsmeier-Haack, obteniéndose los *per*-(6-halo-6-desoxi)-derivados con rendimientos que varían entre 76 y 93% (figura 1.10).

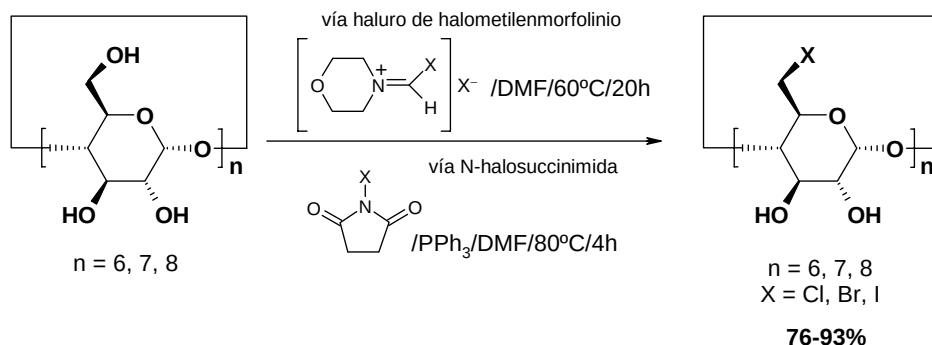


Figura 1.10- Síntesis de los derivados del tipo *per*-(6-halo-6-desoxi)-ciclodextrina.⁵³

Los derivados del tipo *per*-(6-halo-6-desoxi)-ciclodextrina son intermediarios importantes, ya que presentan una mayor estabilidad en comparación con los derivados polisulfonados de las ciclodextrinas. Su utilización, de forma general, es un poco limitada por ser sólo solubles en solventes polares apróticos, como DMF y DMSO y prácticamente insolubles en agua y etanol, propiedad ésta que, en cambio, favorece sus métodos de obtención y purificación.

Como hemos planteado anteriormente, los derivados *per*-halogenados son precursores de un gran número de otros derivados que se pueden obtener por reacciones de sustitución nucleofílica. Por ejemplo, la síntesis de los derivados *per*-(6-azido-6-desoxi)-ciclodextrina se puede realizar con rendimientos casi cuantitativos por reacción de los correspondientes derivados *per*-halogenados con un exceso de azida de sodio en dimetilformamida.^{54,55} (figura 1.11).

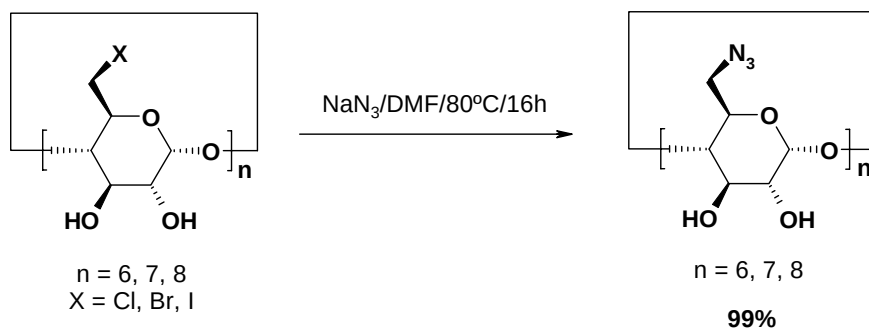


Figura 1.11- Síntesis de los derivados del tipo *per*-(6-azido-6-desoxi)-ciclodextrina.^{54,55}

Las *per*-(6-amino-6-desoxi)-ciclodextrinas se pueden obtener reduciendo la correspondiente azida *per*-sustituida con trifenilfosfina disuelta en una mezcla de dioxano y metanol, seguido de hidrólisis con amoníaco.⁵⁴ (figura 1.12). Este método fue modificado y generalizado por Stoddart,⁵⁶ al utilizar la dimetilformamida como solvente y precipitar directamente con etanol, obteniéndose la amina libre con un 98% del rendimiento.

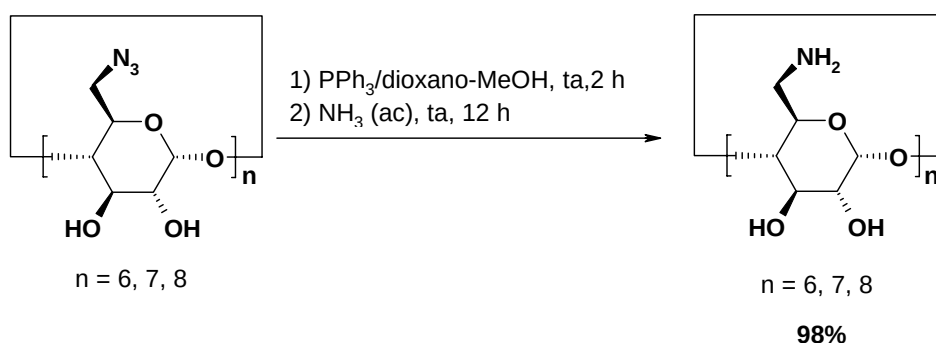


Figura 1.12- Síntesis de los derivados del tipo *per*-(6-amino-6-desoxi)-ciclodextrina.⁵⁴

Los derivados halogenados de las ciclodextrinas son también importantes intermediarios en los métodos de síntesis de otros derivados de las ciclodextrinas, especialmente de compuestos sulfurados.

En la actualidad el derivado *per*-sulfurado más importante y conocido de las ciclodextrinas es el *per*-(6-tio-6-desoxi)- β -ciclodextrina, obtenido por primera vez por Kaifer.⁵⁷ El método de síntesis consta de dos etapas. La primera es la síntesis del *per*-(6-iodo-6-desoxi)- β -ciclodextrina visto anteriormente. En la segunda, este haluro se trata con tiourea en presencia de dimetilformamida a 70°C durante 19 h, seguido de hidrólisis básica y acidulación para obtener el derivado heptatiolado de la β -ciclodextrina con un rendimiento del 90% (figura 1.13).

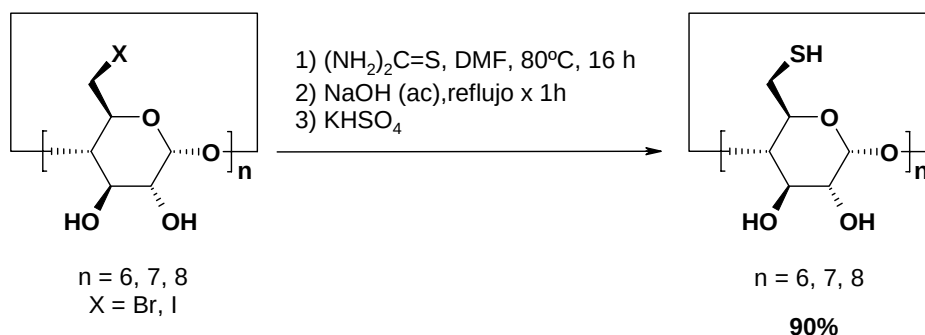


Figura 1.13 - Síntesis de los derivados del tipo *per*-(6-tio-6-desoxi)-ciclodextrina.⁵⁷

Debemos resaltar que, aunque algunos métodos de síntesis indicados anteriormente han sido descritos para la β -ciclodextrina, éstos son aplicables también para la α - y γ -ciclodextrinas. En estos casos los rendimientos pueden variar ligeramente pero en realidad no se observa correlación alguna con el tamaño del anillo.

1.4- Sensores de reconocimiento molecular basados en derivados de las ciclodextrinas

Los sistemas de reconocimiento molecular formados por ciclodextrinas se pueden comportar como sensores moleculares artificiales capaces de detectar de forma selectiva un tipo específico de sustrato, ya sea por su tamaño, disposición de los grupos funcionales en la molécula o por la posibilidad de provocar cambios en alguna de las propiedades físicas del sistema receptor.

Los sensores de reconocimiento molecular basados en las ciclodextrinas y sus derivados pueden actuar, de forma general, en dos formas diferentes:

1. En solución, o sea, sin estar fijados a un soporte.
2. Inmovilizados en un soporte.

El primer tipo de sensor es un derivado soluble de las ciclodextrinas que contiene algún grupo cromóforo o fluoróforo ocluido en su cavidad. Este sustituyente posee una

señal analítica determinada que, al ser desplazado de la cavidad por un sustrato huésped, origina una nueva señal analítica diferente³⁰ (figura 1.13). Esta nueva señal es característica del huésped ocluido y la magnitud del cambio en posición o intensidad con respecto a la señal inicial depende del grado de penetración del huésped en la cavidad.

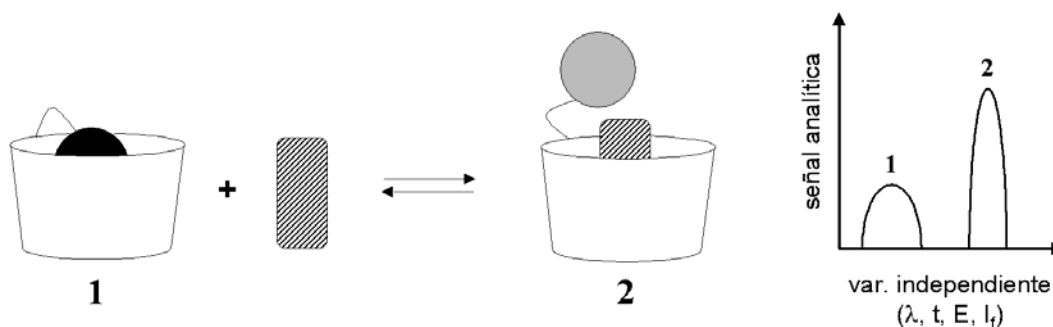


Figura 1.13- Representación esquemática de un sensor no fijo a un soporte.

Una característica fundamental de estos sensores es que las propiedades fisicoquímicas del sustituyente se ven modificadas notablemente al pasar al exterior de la cavidad de la ciclodextrina. Las señales analíticas más empleadas en este tipo de sensores han sido las de fluorescencia,⁵⁸ absorción en el ultravioleta-visible,^{30,59} resonancia magnética nuclear,⁶⁰ dicroísmo circular, etc.⁶¹

El segundo tipo de sensor está formado por un derivado de las ciclodextrinas pero, en este caso, la modificación química tiene como objetivo fijar el sensor a una superficie sólida, generalmente un electrodo.⁶² En este tipo de sensor las ciclodextrinas se pueden inmovilizar de tres formas diferentes (figura 1.14):

- A. formando películas poliméricas (polymer films).⁶³⁻⁶⁵
- B. formando monocapas de derivados anfifílicos autoensamblados mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.⁶⁶
- C. formando monocapas en superficies de metales nobles mediante enlaces M-S.⁵⁷

La formación de películas se puede realizar adsorbiendo físicamente materiales poliméricos o derivados de ciclodextrinas sobre electrodos de pasta de carbón (composites), carbón vítreo o diferentes metales (figura 1.14-A). Los polímeros, al estar formados por múltiples receptores unidos mediante enlaces covalentes, favorecen en muchas ocasiones la capacidad de las ciclodextrinas de formar compuestos de inclusión

con diferentes sustratos, mejorando la sensibilidad del dispositivo.⁶³⁻⁶⁵

La segunda estrategia consiste en la modificación selectiva de todos los grupos hidroxilo de un mismo tipo por grupos apolares para obtener derivados anfifílicos que poseen una cara hidrofóbica (sustituida por grupos apolares) y otra cara hidrofílica (sustituida por grupos polares) los cuales pueden ser inmovilizados en soporte. En este sentido es de resaltar el trabajo desarrollado recientemente por Kaifer.⁶⁶ Este autor inmovilizó un receptor anfifílico cargado positivamente a un electrodo de oro modificado previamente con una monocapa del anión 3-mercaptopropanoato (figura 1.14-B). Se demostró además que la estructura formada está mucho más organizada que la que se origina por simple autoensamblaje del mismo receptor sobre el electrodo sin modificar. Este tipo de

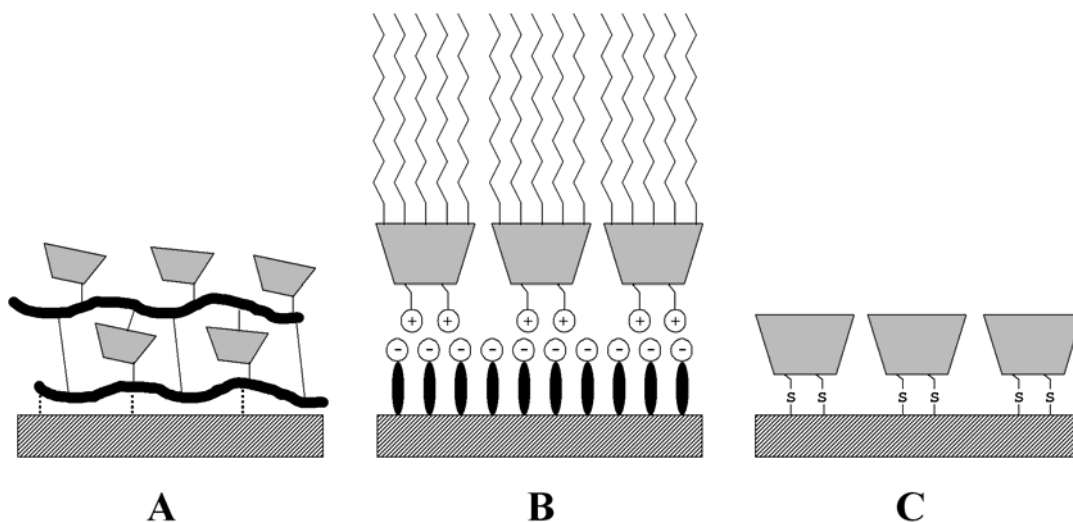


Figura 1.14- Métodos de inmovilización de ciclodextrinas en superficies sólidas.

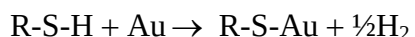
autoensamblaje organizado se asemeja al que ocurre en las membranas biológicas, además de poseer propiedades de reconocimiento molecular.

La tercera estrategia de modificación consiste en formar monocapas de compuestos sulfurados en superficies de metales preciosos (figura 1.14-C). Esta es precisamente la estrategia empleada en nuestro trabajo por lo que será expuesta con un mayor grado de detalle en el epígrafe siguiente.

1.4.1- Quimisorción en superficies sólidas. Características generales.

El proceso de autoensamblaje en superficies sólidas con la formación de monocapas (*self-assembled-monolayers*) se define como el ordenamiento molecular, en dos o tres dimensiones, que ocurre a través de procesos espontáneos de quimisorción. Este fenómeno se origina en la interfase que existe entre una superficie sólida (p.e. una barra metálica) y una sustancia activa en disolución, que trae consigo la formación de bloques estructurales supramoleculares^{67,68} (figura 1.15).

La reacción química general que representa la quimisorción de un alcanotiol en una superficie de oro es considerada como una reacción de oxidación-adición del grupo tiol seguido de una posterior eliminación reductiva del hidrógeno, como se muestra en la ecuación siguiente:⁶⁸



Estas monocapas muestran, en general, un óptimo grado de organización, compactación y estabilidad como resultado de los fuertes enlaces Au-S.⁶⁹⁻⁷¹ A pesar de esto, se ha encontrado que en las monocapas pueden existir ciertos defectos de autoorganización, especialmente cuando la cadena carbonada es muy corta (figura 1.16).⁶⁹

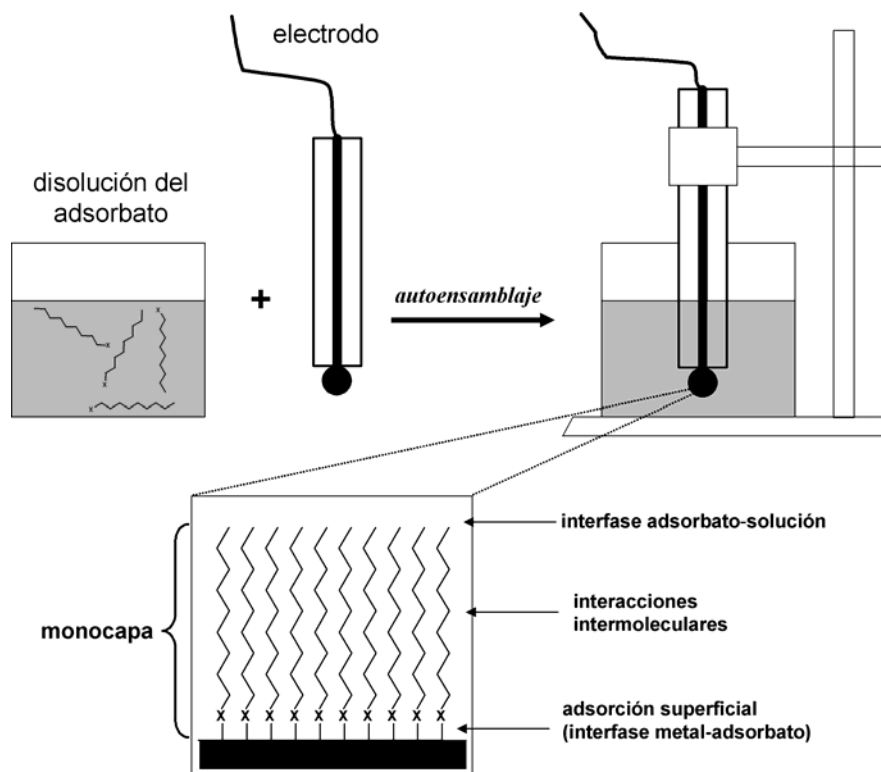


Figura 1.15- Proceso de quimisorción sobre una superficie sólida, con formación de monocapas (*self-assembled-monolayers*).

Además de los compuestos tiolados, se ha demostrado que otros tipos de compuestos sulfurados presentan la propiedad de autoensamblarse en superficies metálicas. Entre ellos están los tiocarbamatos⁷² y las tioureas.^{73,74} Como soportes sólidos se han estudiado otras superficies metálicas tales como plata,⁷⁵ platino,⁷⁶ cobre,⁷⁷ y hierro.⁷⁸

La posibilidad de caracterizar la estructura química, así como los defectos de las monocapas electródicas mediante métodos electroquímicos y espectroscópicos, ha sido un elemento de vital importancia para el desarrollo de sensores de reconocimiento molecular basados en procesos de quimisorción. En particular, los experimentos de desorción reductiva y las mediciones de impedancia permiten estudiar el grado de revestimiento de la monocapa y su permeabilidad. La caracterización electroquímica del recubrimiento electródico se puede complementar con diferentes técnicas espectroscópicas como, por ejemplo, la espectroscopia Raman superficial, la elipsometría o las mediciones de ángulo de contacto.⁷⁹

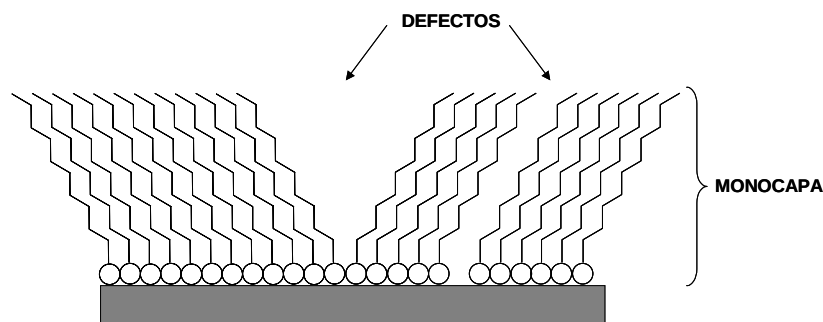


Figura 1.16- Diagrama esquemático de una monocapa sobre electrodo de oro y algunos de los defectos más comunes.

Es evidente que la naturaleza de las moléculas adsorbidas le puede conferir al soporte determinadas propiedades que pueden ser útiles para construir determinados dispositivos. Los ejemplos más sencillos los tenemos en las monocapas de ácidos ω -mercaptocarboxílicos o de ω -mercaptoaminas, que pueden ser utilizadas como soportes iónicos o para reconocer iones de carga opuesta. Por su parte, las monocapas de alcanotioles de cadena larga se pueden emplear para inducir determinadas orientaciones en proteínas inmovilizadas que posean dominios hidrofóbicos.⁶⁷

1.4.2-Electrodos modificados con derivados sulfurados de las ciclodextrinas

A partir de mediados de la década del 90, se inició el estudio de nuevas generaciones de sensores voltamétricos basados en derivados tiolados de determinados receptores quimiabsorbidos en electrodos de oro. La idea consistió en dotar a la superficie de propiedades de reconocimiento molecular aprovechando las características del receptor inmovilizado. Como hemos visto, las ciclodextrinas están entre los receptores moleculares más importantes y más aplicados. Sin embargo, su estudio como modificadores de electrodos ha comenzado sólo hace muy pocos años, como veremos a continuación.

El primer trabajo en este tema fue publicado por Kaifer en 1995 al reportar la síntesis y quimisorción del *heptakis*-(6-tio-6-desoxi)- β -ciclodextrina sobre un electrodo de oro.⁵⁷ La monocapa fue caracterizada por medidas de capacitancia y desorción reductiva. Como resultado, se obtuvo que los receptores forman una monocapa

relativamente imperfecta que recubría alrededor del 65% de la superficie. Los defectos en el proceso de recubrimiento fueron sellados con pentanotiol para, de esta forma, obligar a que toda reacción redox del sustrato en la superficie electródica se llevara a cabo a través de la cavidad de la ciclodextrina (figura 1.17).

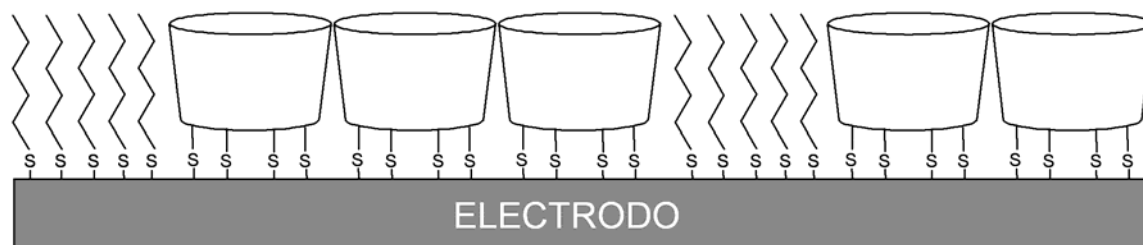


Figura 1.17- Sensor de reconocimiento molecular basado en un derivado heptatiolado de la β -ciclodextrina y pentanotiol quimiabsorbido en un electrodo de oro.

Este electrodo fue estudiado como sensor voltamétrico de reconocimiento molecular del ferroceno, encontrándose que la constante de acomplejamiento interfacial era relativamente alta ($3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Por otro lado, la formación del complejo de inclusión ferroceno/ β -ciclodextrina fue comprobada a través del fenómeno de competición selectiva con un sustrato no electroactivo, el ácido 3-metilbenzóico. Se observó que la señal redox del ferroceno disminuyó, en la medida que la concentración del ácido aumentó en solución. Este trabajo marcó la pauta en el estudio y caracterización de otros electrodos modificados con derivados sulfurados de las ciclodextrinas como sistemas de reconocimiento molecular.⁸⁰⁻⁸⁷

Un trabajo muy interesante fue el desarrollado por Osa,⁸¹ a partir de la modificación de un electrodo de oro con el derivado *hepta*-(6-lipoil-6-desoxi)- β -ciclodextrina. El electrodo modificado fue utilizado como sensor de reconocimiento molecular de sustratos no electroactivos empleando marcadores electroactivos (figura 1.18). La intensidad de la señal del marcador electroactivo disminuye y es proporcional a la concentración del sustrato que compite por los receptores de ciclodextrina, y al valor de su constante de inclusión interfacial. Otro trabajo en la misma línea fue el desarrollado por Ferri⁸² mediante la modificación de un electrodo de oro según el método propuesto por Kaifer. La monocapa fue utilizada como sensor en la determinación voltamétrica de

una serie de sustancias orgánicas no electroactivas, tales como sales biliares y detergentes. Estos sensores constituyen una alternativa a la detección de sustancias no electroactivas y pudieran encontrar aplicaciones diversas.

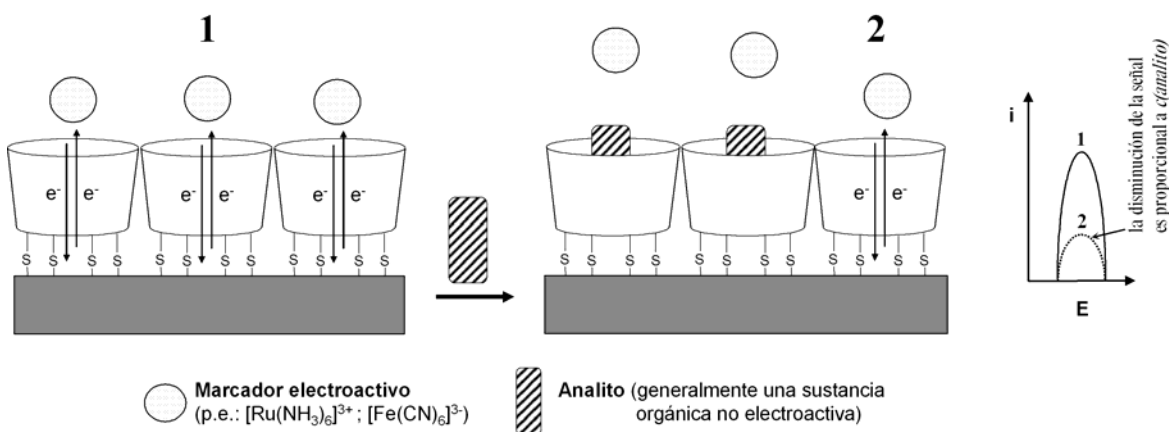


Figura 1.18- Sensor voltamétrico para sustratos no electroactivos empleando ciclodextrinas inmovilizadas.

La misma estrategia fue empleada por Kitano para determinar las constantes de inclusión de los isómeros *orto* y *para* del conjugado del rojo de metilo con la fenetilamina en una monocapa de α -ciclodextrina.⁸³ El valor obtenido para el isómero *orto* resultó ser mayor que el del isómero *para*, lo cual se pudiera explicar considerando que la forma en “V” del primero le permite interactuar, a la vez, con dos de los receptores inmovilizados (figura 1.19). Una revisión bibliográfica realizada hasta finales de año 2003 indica que este trabajo es el único relacionado con la diferenciación interfacial de isómeros por ciclodextrinas inmovilizadas.

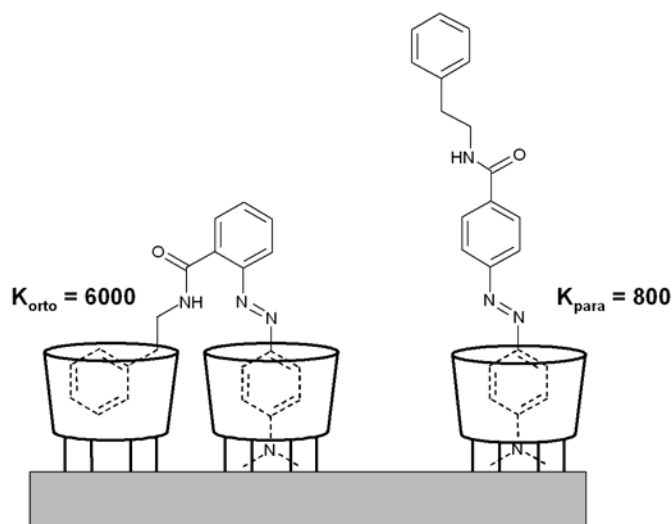


Figura 1.19 Diferenciación de isómeros de posición por ciclodextrinas inmovilizadas.⁸³

Wenz^{84,85} estudió mediante diferentes métodos electroquímicos y espectroscópicos la influencia de la separación que se origina entre la superficie del electrodo y la cavidad de las ciclodextrinas. Para ello, sintetizó una serie de derivados mono- y *per*-tiolados con espaciadores de diferente longitud y naturaleza. Estos estudios demostraron la influencia de la estructura química del derivado tiolado en la arquitectura de la monocapa, donde la orientación, permeabilidad de la cavidad, así como la cinética del proceso de quimisorción, varían con el número de grupos tiol inmovilizados y su distancia a la cavidad de la ciclodextrina. La permeabilidad de las monocapas con diferentes espaciadores fue demostrada desde el punto de vista cualitativo, a través del estudio voltamétrico del proceso redox del anión hexacianoferrato en solución. Además, se estudió mediante voltametría cíclica la inclusión de diversos sustratos orgánicos como el ácido ferrocenocarboxílico, el metilnaranja, el ácido 4-*ter*-butilbenzoico y el ciclohexanol.

A partir de estos trabajos se pudo concluir que la cinética del proceso de quimisorción en una superficie sólida es influenciada, entre otros factores, por la estructura química del receptor y puede ser descrita mediante tres etapas fundamentales:

- 1- Proceso físico de adsorción,
- 2- Enlace y orientación.

3- Formación de la monocapa.

Finalmente, Reinhoudt desarrolló métodos novedosos de síntesis de derivados de ciclodextrinas conteniendo grupos tioéter con diferentes grados de ramificación y estudió mediante métodos electroquímicos y espectroscópicos la formación de monocapas en electrodos de oro.^{79,86} La arquitectura de la monocapa resultó ser dependiente del tipo de ciclodextrina, siendo los derivados de β -CD los que formaron las monocapas más compactas. Estas monocapas son capaces de acomplejar sustratos orgánicos fluorescentes con valores de K superiores a los obtenidos con el receptor en disolución.

En resumen, los trabajos de Kaifer, Wenz y Reinhoudt fueron muy importantes en el estudio de los factores que afectan la estructura, orientación y permeabilidad de las monocapas de ciclodextrinas. Además, demostraron que la arquitectura y orientación de los bloques supramoleculares formados dependen de la estructura del derivado inmovilizado que conforma la interfase. Pero más importante, quizás, resultó ser que demostraron las potencialidades de estos electrodos modificados para comportarse como sensores voltamétricos de reconocimiento molecular capaces de detectar moléculas de la más diversa naturaleza. A pesar de esto, existen muy pocos trabajos en la literatura orientados con fines aplicativos por lo que el tema tiene amplias posibilidades de desarrollo en un futuro muy próximo.

1.5- Monocapas cargadas. Aplicaciones.

Otra variante de inducir eventos de reconocimiento molecular en superficies electródicas es mediante la formación de monocapas cargadas. Para ello, se inmovilizan compuestos alcanotiolados que poseen grupos terminales $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{COO}^-$ o $-\text{NH}_3^+$. Entre otras aplicaciones, estos sistemas constituyen modelos de marcada utilidad en el estudio de fenómenos biológicos, como son los procesos de transferencia electrónica e iónica a través de las membranas.⁶⁷

Una de las aplicaciones más estudiadas de los sensores voltamétricos desarrollados a partir de monocapas cargadas es la determinación de neurotransmisores en fluidos extracelulares del sistema nervioso central en organismos vivos. El problema esencial en

la determinación del neurotransmisor dopamina en presencia de ácido ascórbico está dado por la similitud de los potenciales de oxidación de ambas especies a pH fisiológico, así como por la reacción que ocurre entre el ácido ascórbico y la dopamina oxidada (figura 1.20).

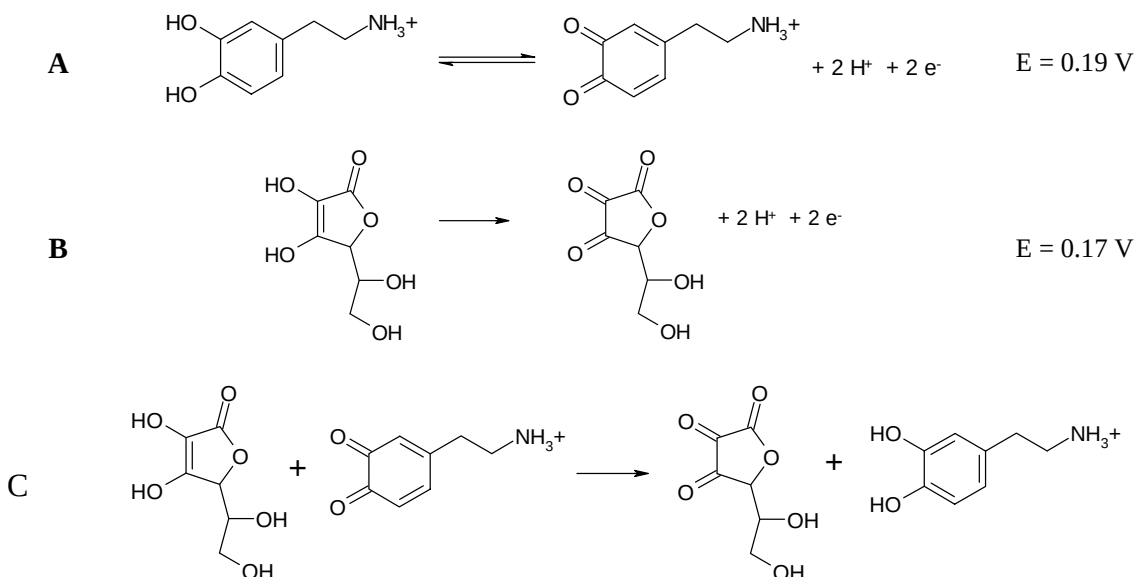


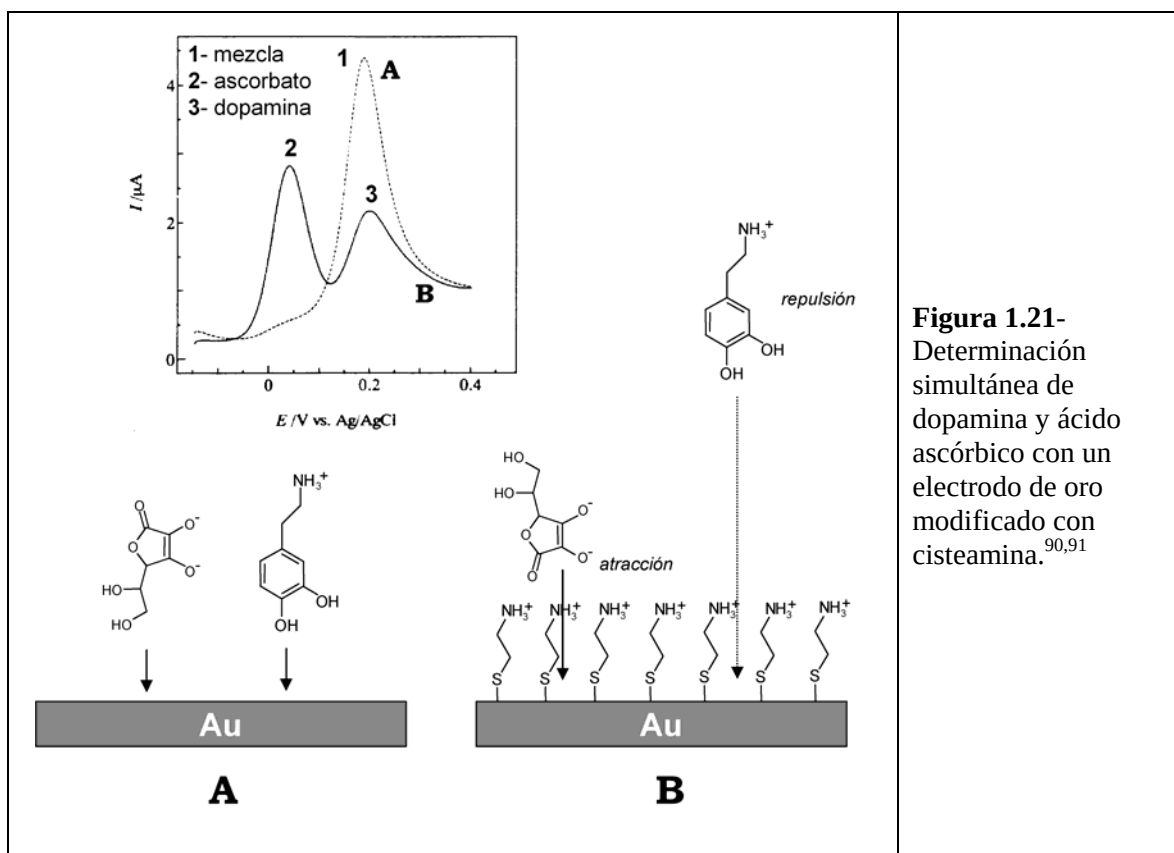
Figura 1.20- Reacciones de oxidación de la dopamina (**A**) y del ácido ascórbico (**B**) y oxidación del ácido ascórbico por la forma oxidada de la dopamina (**C**).

Adicionalmente, la concentración de ácido ascórbico en los fluidos es unas 1000 veces mayor que la de la dopamina en el plasma humano y en la orina.^{88,89} Esto hace necesario el desarrollo de métodos eficientes de determinación simultánea de ambas especies.

Varias han sido las estrategias electroanalíticas desarrolladas con el objetivo de mejorar la determinación simultánea de dopamina y ácido ascórbico. Estas estrategias se centran en las interacciones electrostáticas que se ponen de manifiesto entre la superficie electródica cargada y las especies electroactivas a determinar, trayendo consigo la separación de los potenciales de oxidación y la posibilidad de determinación de las sustancias implicadas.

Ohsaka^{90,91} ha empleado electrodos de oro modificados mediante monocapas cargadas positivamente, por ejemplo, cisteamina protonada ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) o complejos macrocíclicos tiolados de níquel (II) (cargados di-positivamente). La interacción electrostática entre la superficie cargada positivamente y el ácido ascórbico

cargado negativamente trae consigo el desplazamiento del potencial de oxidación del ácido ascórbico de 0.20 V hasta aproximadamente 0.05 V. En contraste, el potencial de oxidación de la dopamina sólo varía de 0.20 V a 0.24 V, a pesar de las repulsiones electrostáticas que se ponen de manifiesto entre la monocapa electródica positiva y la dopamina cargada positivamente. De esta forma, el electrodo modificado con la superficie positiva separa el potencial de ambos procesos en 0.19 V, ocurriendo primeramente la oxidación del ácido ascórbico a 0.05 V y posteriormente la oxidación de la dopamina (figura 1.21). A pesar de esto, esta separación no logra resolver completamente los picos de oxidación de ambas especies ya que aún existe una componente de corriente anódica correspondiente al ascorbato en el pico de oxidación de la dopamina.



Recientemente, el propio Ohsaka propuso una variante al método anterior empleando nanopartículas de oro inmovilizadas en la superficie de oro modificada con cisteamina protonada.⁹² La adsorción de las nanopartículas genera una mayor superficie

activa del electrodo provocando un aumento notable en selectividad y sensibilidad en la determinación de dopamina en presencia de ácido ascórbico. También la reversibilidad del proceso redox de la dopamina se ve significativamente mejorada.

La variante contraria a la representada en la figura 1.21 ha sido estudiada recientemente por Tao.⁹³ En este caso, el electrodo de oro fue modificado con ácido 3-mercaptopropanoico con la formación de una monocapa cargada negativamente. La separación de los picos de oxidación de la dopamina y el ácido ascórbico obtenida de este modo fue de 0.25 V. Este valor, aunque ligeramente mayor que la reportada por Ohsaka, tampoco es suficiente para resolver completamente los picos.

Las estrategias antes mencionadas han sido objeto de intensos estudios tratando de mejorar la resolución de los picos de oxidación.⁹⁴⁻¹⁰² Para ello, han modificado los electrodos con diferentes materiales, tales como polímeros iónicos de diferente naturaleza, complejos metálicos y diversos compuestos orgánicos ionizables, aunque no siempre con resultados satisfactorios.

Otra importante aplicación de las monocapas cargadas relacionada con el diseño de biosensores es la inmovilización de enzimas por vía electrostática o hidrofóbica. Existen, al menos, tres estrategias generales para la inmovilización de enzimas en electrodos^{103,104} (figura 1.22):

- A) Conjugación covalente.
- B) Adsorción física.
- C) Formación de películas.

La conjugación covalente es casi siempre irreversible, dando origen a monocapas estables de la enzima en la superficie electródica. Además, requiere de un proceso de preactivación de la superficie del electrodo y de una reacción de acoplamiento (p. e., formación de amidas). Por su parte, la adsorción física es fácil de realizar pero tiene los inconvenientes de ser poco reproducible y de depender grandemente de la fuerza iónica del medio. Finalmente, la formación de películas se puede llevar a cabo empleando surfactantes o polímeros cargados en los cuales la enzima queda atrapada en la superficie electródica. Las fuerzas motrices en estos dos últimos métodos son comúnmente

interacciones de tipo electrostáticas o hidrofóbicas que determinan la fortaleza de la interacción y, por tanto, su estabilidad.^{103,104}

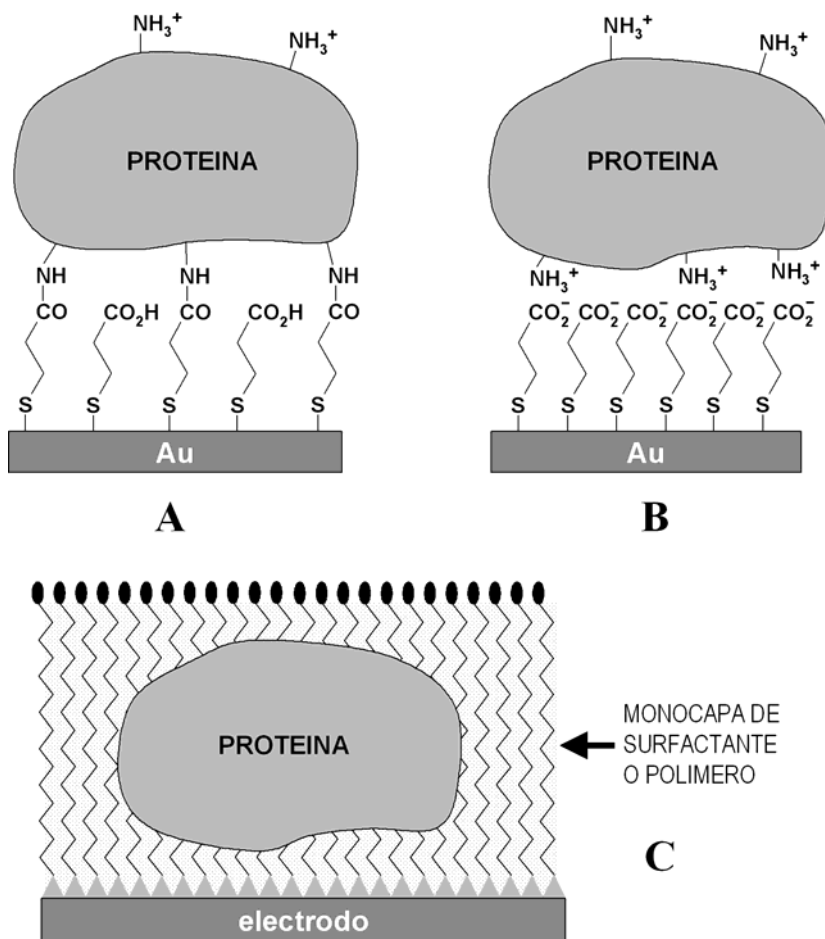


Figura 1.22- Estrategias generales para la inmovilización de proteínas en electrodos: (A): conjugación covalente, (B), adsorción física (C) formación de películas.

Una de las proteínas más estudiadas desde el punto de vista electroquímico ha sido el citocromo c. Bowden¹⁰⁵ estudió la adsorción electrostática del citocromo c en un electrodo modificado con el ácido 16-mercaptohexadecanoico y determinó que la orientación de la proteína depende del pH del medio. La respuesta voltamétrica del citocromo c no se ve alterada por la inmovilización, lo cual permite inferir que la estructura de la proteína

permanece intacta. Esto es de gran importancia ya que para cualquier aplicación relacionada con proteínas o enzimas inmovilizadas es necesario que su funcionalidad se vea lo menos alterada posible para lograr un máximo de actividad.

Como ha podido verse a lo largo de este capítulo, las ciclodextrinas constituyen una familia de compuestos muy versátiles, que han encontrado aplicación en campos muy diversos. A pesar de ser conocidas desde hace más de un siglo, cada día se descubren y explotan nuevas posibilidades de aplicación. Un ejemplo de ello es el desarrollo de sistemas de reconocimiento molecular basados en ciclodextrinas inmovilizadas en electrodos, los cuales han comenzado a estudiarse hace solamente 10 años. Esto hace que el tema sea de gran actualidad, abriendo numerosas posibilidades de estudio y desarrollo futuro.

CAPITULO 2: PARTE EXPERIMENTAL.

2.1- Reactivos.

Las α -, β - y γ -ciclodextrinas utilizadas en este trabajo provienen de la firmas Merck, Sigma y Wacker, respectivamente. En caso necesario, las ciclodextrinas se

secaron en una estufa de vacío a 120 °C sobre pentóxido de difósforo (P₂O₅), durante 20 h.

La dimetilformamida (DMF) se secó por agitación con hidruro de calcio (CaH₂) durante 20 h, seguido de destilación a presión reducida, y fue guardada sobre tamices moleculares de 4 Å. El imidazol (ImH) se secó a vacío durante 8 h. El dioxano utilizado se purificó tratándolo con sodio metálico durante 12 h y posteriormente se redestiló al vacío. El metanol (MeOH) y etanol (EtOH) utilizados fueron previamente destilados. El resto de los reactivos empleados fueron de calidad analítica y utilizados sin tratamiento previo.

2.2- Equipos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados en un espectrómetro Bruker AC 250 en D₂O o DMSO-d₆, según el caso, a 25 °C.

Los espectros de masas (FAB+) fueron obtenidos en un equipo Autospec EQ207 empleando una matriz de glicerina.

Los espectros UV-Vis fueron realizados en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultrospec III, utilizando el software auxiliar *Wavescan* en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Electrothermal Engineering Ltd.

Las mediciones voltamétricas fueron realizadas en un analizador polalográfico Yanaco P900 (Japón) acoplado a un registrador XY Graphtec 1000 o en un equipo CHI-660 de CH Instruments (USA), acoplado a una computadora personal. Se empleó un sistema de tres electrodos:

- indicador: electrodos de plata (ϕ 2 mm) u oro (ϕ 1 mm), modificados o no.
- referencia: electrodo de plata/cloruro de plata saturado (Bioanalytical Systems).
- contraelectrodo: lámina de platino de 2 cm².

Las mediciones voltamétricas se realizaron a velocidades de barrido entre 50-100 mV/s en buffer fosfato de pH 7 (0.1 mol/L) o sulfato de sodio (Na₂SO₄) de concentración

0.2 mol/L, previamente desoxigenados con argón. El convenio utilizado para representar los voltamogramas cíclicos se muestra en la figura 2.1.

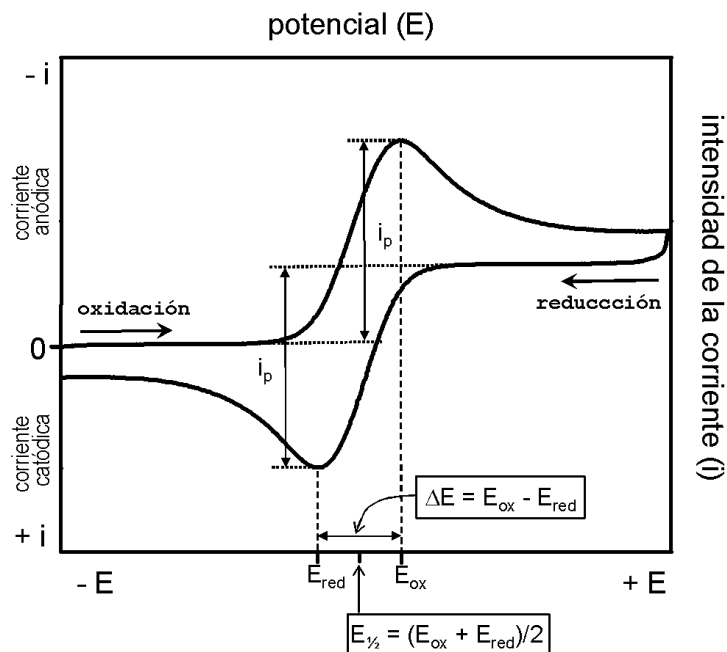


Figura 2.1 Convenio utilizado para representar los voltamogramas cíclicos en el presente trabajo.

2.3- Métodos generales de síntesis de derivados de las ciclodextrinas.

2.3.1- Per-(6-cloro-6-desoxi)-ciclodextrinas (2).

*Método de D'Souza.*⁵² Se disolvieron 0.75 g, 0.88 g o 1.02 g de imidazol y 4.0-4.2 mL de cloruro de bencenosulfonilo en 35 mL de dimetilformamida seca a 70°C y se esperó unos 10 minutos hasta que la disolución pasó de una coloración amarilla a rojo vino. A continuación, se añadieron 0.97 g, 1.13 g o 1.30 g, respectivamente, de α -, β - o γ -ciclodextrina seca y se agitó durante 24 h a 70°C, provisto de un tubo de cloruro de calcio. La disolución se concentró al vacío hasta menos de la mitad del volumen inicial a una temperatura de 70°C, posteriormente se añadió sobre 1.5 L de agua con hielo y se agitó vigorosamente durante 1 hora, obteniéndose un precipitado blanco muy fino. A esta suspensión se le añadió una disolución de NaOH (0.5 mol/L) hasta pH 10, y se agitó durante 10 min. Posteriormente, la suspensión se neutralizó con una disolución de HCl (0.5 mol/L), se centrifugó y el precipitado se lavó varias veces con agua y acetona,

secándose al vacío sobre pentóxido de difósforo (P_2O_5) durante 72 h.

Hexakis-(6-cloro-6-desoxi)- α -ciclodextrina: (**2 α**). Rendimiento: 72%. p.f: 254-256°C (desc).

Heptakis-(6-cloro-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**2 β**). Rendimiento: 76%. p.f: 265-267°C (desc).

Octakis-(6-cloro-6-desoxi)- γ -ciclodextrina: (**2 γ**). Rendimiento: 70%. pf: 238-240°C (desc).

2.3.2- *Octakis*-(6-cloro-6-desoxi)- γ -ciclodextrina (**2 γ**).

*Método de Defaye.*⁵³ Se disolvió 1.30 g de γ -ciclodextrina seca en 40 mL de dimetilformamida y se le añadieron 2.07 g de *N*-clorosuccinimida y 4.19 g de trifenilfosfina. La disolución se agitó manteniendo la temperatura entre 70 y 80°C durante 4 horas empleando un tubo de cloruro de calcio. La mezcla de reacción se diluyó con 100 mL de metanol y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se enfrió a 15°C y se ajustó el pH de la disolución a 9 con una disolución de metóxido de sodio 3 mol/L en metanol. Finalmente, la disolución se precipitó en 600 mL de agua con hielo con agitación vigorosa, el precipitado fue filtrado y lavado varias veces con metanol, secándose al vacío sobre P_2O_5 durante 24 h.

Octakis-(6-cloro-6-desoxi)- γ -ciclodextrina: (**2 γ**). Rendimiento: 92%. pf: 240-241°C (desc).

2.3.2- *Heptakis*-(6-bromo-6-desoxi)- β -ciclodextrina (**3 β**).

*Método de Defaye.*⁵³ Se disolvió 1.13 g de β -ciclodextrina seca en 40 mL de dimetilformamida y se añadieron 2.43 g de *N*-bromosuccinimida y 3.64 g de trifenilfosfina. La disolución se agitó manteniendo la temperatura entre 70 y 80°C durante 4 horas empleando un tubo de cloruro de calcio. La mezcla de reacción se diluyó con 100 mL de metanol y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se enfrió a 15°C y se ajustó el pH de la disolución a 9 con una disolución de metóxido de sodio 3 mol/L en metanol. Finalmente, la disolución se precipitó en 600 mL de agua con hielo con agitación vigorosa, el precipitado fue filtrado y lavado varias veces con

metanol, secándose al vacío sobre P₂O₅ durante 24 h.

Heptakis-(6-bromo-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**3 β**). Rendimiento: 90%. pf: 239-241°C (desc).

2.3.3- *Heptakis*-(6-yodo-6-desoxi)- β -ciclodextrina (**4 β**).

(A) *Método de Defaye*.^{50,51} Se disolvieron 13.31 g de trifenilfosfina en 50 mL de dimetilformamida seca, posteriormente se añadieron lentamente 13.45 g de yodo y se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. A la disolución se le añadieron 4.32 g de β -ciclodextrina seca y se agitó vigorosamente durante 18 h a 80°C. Posteriormente, la disolución se concentró a presión reducida hasta la mitad del volumen y se enfrió hasta 5°C, ajustándose el pH a 9 con una disolución de metóxido de sodio 3 mol/L en metanol. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se precipitó sobre 1.5 L de agua con hielo y el producto obtenido se lavó varias veces con agua destilada y se dejó secar al aire durante 24 h. Para eliminar el exceso de yodo, el sólido se suspendió en 1 L de diclorometano, se filtró y lavó varias veces con diclorometano. Finalmente, el sólido se redisolvió en 100 mL de dimetilformamida seca y se precipitó sobre 1.5 L de agua con hielo. El sólido blanco obtenido se lavó con MeOH, y se secó al vacío sobre P₂O₅ durante 72 h.

Heptakis-(6-yodo-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**4 β**). Rendimiento: 70%. pf: 232-235°C (desc).

(B) *Método de Stoddart*.⁵⁶ Este método se diferenció del de Defaye a partir de los procedimientos de extracción y purificación del producto. Luego de ser precipitado el producto sobre agua con hielo, se lavó con metanol y se secó superficialmente. Finalmente, se eliminaron las impurezas de yodo presentes en el producto mediante el extractor de Soxhlet, utilizando metanol como solvente durante 12 horas. Rendimiento: 82%. pf: 230-232°C (desc).

2.3.4- *Per*-(6-azido-6-desoxi)-ciclodextrinas (**5**).

Método de Defaye.^{54,55} Se disolvió 1.08 g, 1.26 g o 1.44 g de **2 α** , **2 β** o **2 γ** ,

respectivamente, en 20 mL de dimetilformamida y se le añadieron 0.84 g, 0.97 g o 1.10 g, respectivamente, de azida de sodio. La mezcla se agitó vigorosamente a una temperatura de 70°C durante 24 h, provisto de un tubo de cloruro de calcio. Posteriormente, la disolución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió muy lentamente, con agitación vigorosa, sobre 1 L de agua con hielo. El precipitado blanco formado se centrifugó y se lavó varias veces con agua y acetona y se secó al vacío sobre P₂O₅ durante 72 h.

Hexakis-(6-azido-6-desoxi)- α -ciclodextrina: (**5 α**). Rendimiento: 93%. pf: 252-255°C (desc).

Heptakis-(6-azido-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**5 β**). Rendimiento: 96%. pf: 243-245°C (desc).

Octakis-(6-azido-6-desoxi)- γ -ciclodextrina: (**5 γ**). Rendimiento: 95%. pf: 223-225°C (desc).

2.3.5- *Per*-(6-amino-6-desoxi)-ciclodextrinas (**6**).

(A) *Método de Defaye*.⁵⁴ Se suspendió 0.95 g, 1.11 g o 1.29 g, respectivamente, de **5 α** , **5 β** o **5 γ** finamente dividido en 25 mL de una mezcla 5:1 (v/v) de dioxano y metanol. A continuación se añadieron 4.98 g, 5.24 g o 5.50 g de trifenilfosfina. Se observaron burbujas de un gas en solución (N₂) y, pasada una hora, la mezcla se volvió transparente. Posteriormente, se añadieron muy lentamente 2.3-2.5 mL de amoniaco al 25% y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 12 h. La disolución resultante se concentró al vacío hasta sequedad. El sólido obtenido se disolvió en 25 mL de H₂O acidulada con ácido clorhídrico (pH 2) y el óxido de trifenilfosfina se filtró al vacío. El filtrado, que contiene el clorhidrato de la *per*-amina correspondiente, se precipitó sobre 200 mL de acetona, se centrifugó y lavó varias veces con acetona. El sólido obtenido se secó al vacío sobre P₂O₅ durante 72 h.

Clorhidrato de *hexakis*-(6-amino-6-desoxi)- α -ciclodextrina: (**6 α**). Rendimiento: 73%. pf: 172-173°C (desc).

Clorhidrato de *heptakis*-(6-amino-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**6 β**). Rendimiento: 78%. pf: 182-185°C (desc).

Clorhidrato de *octakis*-(6-amino-6-desoxi)- γ -ciclodextrina: (**6 γ**). Rendimiento: 76%. pf: 190-193°C (desc).

(B) *Método de Stoddart*.⁵⁶ Este método se diferenció del A en que se utilizó como solvente la dimetilformamida y el producto se precipitó directamente sobre etanol, seguido de lavados abundantes con etanol y éter. De esta forma se obtuvo la *per*-amina libre con rendimientos superiores al método anterior. La ausencia de impurezas de óxido de trifenilfosfina se confirmó por RMN-¹H.

Hexakis-(6-amino-6-desoxi)- α -ciclodextrina: (**6 α**). Rendimiento: 92%. pf: 210-213°C (desc).

Heptakis-(6-amino-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**6 β**). Rendimiento: 90%. pf: 205-207°C (desc).

Octakis-(6-amino-6-desoxi)- γ -ciclodextrina: (**6 γ**). Rendimiento: 85%. pf: 200-202°C (desc).

2.3.6- *Poli*-(6-ditiocarbamato-6-desoxi)-ciclodextrinas (**7**).

(A) *Método de Cao*⁴⁵ (*modificado*). Se añadieron 0.6 - 0.8 mmol de CS₂ a 6 mL de una mezcla 1:1:1 (v/v/v) de agua, etanol y amoníaco al 25 %, en dependencia del tipo de ciclodextrina empleada. Posteriormente, se añadieron 0.10 g, 0.11 g o 0.13 g de **6 α** , **6 β** o **6 γ** , respectivamente. La suspensión se agitó vigorosamente en un baño con hielo durante 6 h; al cabo de este tiempo el sólido se disolvió completamente. Finalmente, la mezcla se precipitó con acetona, obteniéndose un sólido blanco que se centrifugó, lavó con acetona y se secó al vacío sobre P₂O₅ durante 24 h.

Sal de amonio de *poli*-(6-ditiocarbamato-6-desoxi)- α -ciclodextrina: (**7 α**). Rendimiento: 71%. pf: 234-240°C (desc).

Sal de amonio de *poli*-(6-ditiocarbamato-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**7 β**). Rendimiento: 75%. pf: 240-242°C (desc).

Sal de amonio de *poli*-(6-ditiocarbamato-6-desoxi)- γ -ciclodextrina: (**7 γ**). Rendimiento: 78%. pf: 247-249°C (desc).

(B) Este método fue esencialmente igual al anterior pero, en este caso, se empleó trietilamina como base. El producto fue precipitado y purificado de forma similar. Los rendimientos obtenidos fueron ligeramente mayores (80% para **7 α** , 85% para **7 β** y 82% para **7 γ**).

2.3.7- *Heptakis*-(6-tio-6-desoxi)- β -ciclodextrina (**8 β**).

*Método de Kaifer.*⁵⁷ Se disolvieron 0.88 g o 0.96 g de **3 β** o **4 β** , respectivamente, en 10 mL de dimetilformamida y se añadió 0.30 g de tiourea, dejándose reaccionar con agitación vigorosa a una temperatura de 70°C durante 19 h. La disolución se concentró al vacío a temperatura ambiente hasta que se obtuvo un sirope amarillo, que posteriormente fue disuelto en 50 mL de agua. A continuación, se añadieron 0.26 g de hidróxido de sodio y se reflujo durante 1 h. Posteriormente se neutralizó con una disolución de KHSO₄ al 10%, con la finalidad de precipitar el producto. El precipitado se filtró y se lavó varias veces con agua destilada y acetona y se secó al vacío sobre P₂O₅ durante 24 h.

Heptakis-(6-tio-6-desoxi)- β -ciclodextrina: (**8 β**). Rendimiento: 83-85%. pf: 135-137°C.

2.3.8- Modificación del citocromo c con residuos de adamantano (Cyt c-A).

Se disolvieron 20 mg de citocromo c (liofilizado, de corazón de caballo, Merck), 100 mg de 1-adamantanocarboxilato de sodio y 50 mg de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida en 50 mL de buffer fosfato de pH 6 y se agitó durante 16 h a 4°C.

Posteriormente, la mezcla se dializó varias veces contra agua destilada para eliminar las sales y los componentes de baja masa molecular. Para ello se, empleó una membrana de diálisis de límite de exclusión ~1000 (Spectra-Pore®, ϕ 1.5 $\times$ 25 cm) y la disolución se mantuvo a 4°C mientras no se usó en las mediciones voltamétricas.

2.4- Determinación del grado de sustitución en 7.

El cálculo del grado de sustitución de los grupos ditiocarbamato en **7 α** , **7 β** y **7 γ** se

realizó a partir de sus correspondientes espectros de RMN de ^{13}C desacoplados a banda ancha y con extinción de NOE. Para ello se calculó la relación de integración de las señales correspondiente al grupo NCSS (~206 ppm) y al C_1 (~102 ppm), tomando esta última como el 100 %. Las condiciones típicas para la realización de los espectros fueron:

Concentración de muestra: 30 mg/0.5 mL de DMSO- d_6 ;

Rango espectral: 20000 Hz.

Ancho de pulso: 4 μs .

Tiempo de relajación: 10 s.

Número de barridos: 4800.

Cada uno de los productos, **7 α** , **7 β** y **7 γ** , se sintetizó tres veces y el grado de sustitución se determinó para cada muestra, por lo que es el promedio de tres determinaciones.

Tabla 2.1- Rendimientos y señales de RMN-¹³C (63 MHz, DMSO-d₆) de los derivados sintetizados.

Comp	Rend (%) [†]	C-1 (ppm)	C-2 (ppm)	C-3 (ppm)	C-4 (ppm)	C-5 (ppm)	C-6 (ppm)	C-6' (ppm)	C-7 (ppm)
2 α	72	101.95	72.72	71.68	83.68	70.96	45.32	-	-
2 β	76	102.07	72.55	72.06	83.68	71.30	45.03	-	-
2 γ	70	102.10	72.50	72.50	83.14	71.29	45.12	-	-
3 β	82	102.50	72.50	72.13	86.36	71.45	9.81	-	-
4 β	90	102.31	72.64	72.30	84.92	71.4	34.57	-	-
5 α	93	101.10	72.89	71.75	83.57	70.59	51.54	-	-
5 β	96	102.12	72.66	72.05	83.26	70.42	51.38	-	-
5 γ	95	101.34	74.43	72.22	82.63	70.44	51.15	-	-
6 α *	92	104.34	74.89	73.24	81.98	69.43	41.21	-	-
6 β *	90	104.72	74.94	74.49	84.72	70.43	42.70	-	-
6 γ *	85	103.90	74.20	72.77	83.36	69.96	41.11	-	-
7 α	71	101.56	72.00	72.40	84.00	70.01	50.40	55.70	205.6
7 β	75	102.19	72.24	72.50	83.40	70.00	50.05	54.50	206.5
7 γ	78	102.03	72.30	72.45	83.90	70.04	51.04	55.00	206.0
8 β	83	102.26	72.61	72.36	85.02	71.19	26.05	-	-

* Los espectros se obtuvieron en D₂O conteniendo un 2% de ácido trifluoroacético.

[†] En el caso de los compuestos que se prepararon por más de un método (2 γ , 3 β , 6 α - γ) se indica el mayor rendimiento obtenido.

Tabla 2.2- Señales de RMN-¹H (250 MHz, DMSO-d₆) y de espectrometría de masas de los derivados obtenidos.

Comp	H-1 (ppm)	H-2 (ppm)	H-3 (ppm)	H-4 (ppm)	H-5 (ppm)	H-6a,b (ppm)	OH-2 (ppm)	OH-3 (ppm)	m/z
2α	4.93(d)	3.84(m)	3.84(m)	4.07(d)	3.60(m)	3.33 (m)	5.83(d)	5.62(s)	
2β	4.95(d)	3.81(m)	3.81(m)	4.07(d)	3.62(m)	3.35 (m)	5.79(d)	5.60(s)	1264.1 [M+H] ⁺
2γ	4.96(d)	3.82(m)	3.81(m)	4.03(d)	3.57(m)	3.35 (m)	5.80(d)	5.65(s)	
3β	4.99(d)	3.70(m)	3.70(m)	3.80(d)	3.45(m)	3.28 (m)	6.05(d)	5.90(s)	1927.0 [M+Na] ⁺
4β	4.90(d)	3.78(m)	3.78(m)	3.99(d)	3.55(m)	3.30 (m)	5.70(d)	5.57(s)	1597.8 [M+Na] ⁺
5α	4.90(d)	3.65(m)	3.70(m)	3.85(d)	3.62(m)	3.30(m) 3.42(m)	5.92(d)	5.77(s)	1160.9 [M+K] ⁺
5β	4.90(d)	3.71(m)	3.80(m)	3.90(d)	3.60(m)	3.35(m) 3.40(m)	5.92(d)	5.75(s)	1310.1 [M+H] ⁺ , 1347.9 [M+K] ⁺
5γ	4.91(d)	3.79(m)	3.82(m)	4.00(d)	3.64(m)	3.33(m) 3.41(m)	5.90(d)	5.70(s)	1497.0 [M+H] ⁺ , 1534.8 [M+K] ⁺
6α*	5.20(d)	3.69(t)	4.12(m)	3.92(d)	3.78(dd)	3.36(m) 3.50(dd)			966.0 [M+H] ⁺ , 989.2 [M+Na] ⁺
6β*	5.25(d)	3.66(t)	4.13(m)	3.90(d)	3.76(dd)	3.38(m) 3.52(dd)			1129.3 [M+H] ⁺
6γ*	5.21(d)	3.65(t)	4.10(m)	3.90(d)	3.78(dd)	3.33(m) 3.50(dd)			
7α	5.00(s)			3.2-4.4(m)			5.8(s)		
7β	5.04(s)			3.2-4.4(m)			5.8(s)		
7γ	5.02(s)			3.2-4.4(m)			5.8(s)		
8β	4.95(d)	3.36(m)	3.60(m)	3.40(d)	3.68(t)	2.79(m) 3.21(m)	5.97(d)	5.83(s)	1269.2 [M+Na] ⁺

* Los espectros se obtuvieron en D₂O conteniendo un 2% de ácido trifluoroacético.

2.5- Preparación y caracterización de las superficies electródicas.

2.5.1- Preparación de las superficies electródicas de plata y oro.

I. Preparación de los electrodos de plata en forma de gota.

- a) Se cortó un alambre de plata (99.9%, Aldrich) de ϕ 2 mm por 10 cm de longitud.
- b) Se calentó la parte final del alambre de plata en una llama gas-oxígeno hasta la formación de una pequeña esfera.
- c) Se repitió el procedimiento hasta que la esfera alcanzó el diámetro deseado de ~4 mm.
- d) Se introdujo el alambre de plata en un tubo de vidrio, y se selló con silicona y una cinta de teflón, dejando libre la esfera de plata y 1 cm del alambre en el otro extremo para la conexión externa.
- e) Se lavó con ácido nítrico diluido (0.1 mol/L), de forma tal que la esfera de plata y la silicona fuese atacada lo menos posible por el ácido.
- f) Se pulió la superficie de plata con una suspensión en agua de alúmina fina (>200 mesh) hasta quedar brillante.
- g) Se limpió con papel de filtro.
- h) Se lavó varias veces con etanol y agua bidestilada.
- i) Se secó al aire durante 10 min.
- j) Se prepararon 3 electrodos por el mismo método, tratando de reproducir diámetro de la esfera obtenida.

II. Preparación del electrodo de oro de en forma de gota.^{57,106}

- a) Se cortó un alambre de oro (99.99%, Aldrich) de ϕ 1 mm por 5 cm de longitud.
- b) Se calentó la parte final del alambre de oro en una llama gas-oxígeno hasta la formación de una pequeña esfera.
- c) Se repitió el procedimiento cuidadosamente hasta que la esfera alcanzó el diámetro deseado (~2 mm).
- d) Se hirvió el electrodo de oro en ácido nítrico al 37%.
- e) Se lavó varias veces con metanol y agua destilada.
- f) Se repitió el calentamiento de la esfera de oro en la parte más caliente de una llama

gas-oxígeno hasta lograr la incandescencia (¡con extremo cuidado para evitar que la gota se caiga!) sin permitir que la esfera incrementara su diámetro, y se enfrió rápidamente en agua bidestilada.

- g) Se repitió el procedimiento cuidadosamente de 5 a 8 veces.
- h) En el último tratamiento, la esfera de oro se enfrió en un flujo de argón en lugar de agua. La inspección ocular de la superficie del electrodo bajo una lupa o alguna lente de aumento debe revelar una superficie pareja, limpia y brillante.
- i) Se introdujo el alambre en un tubo capilar de vidrio blando de 2 mm de diámetro y se selló a la llama de tal forma que quedara lo más próximo a la superficie esférica libre del electrodo.
- j) Se soldó el otro extremo del alambre de oro a un alambre de plata de igual diámetro que sirvió como conductor electrónico.
- k) Finalmente, el electrodo indicador de oro se limpió electroquímicamente en una celda electrolítica que contenía una disolución de ácido sulfúrico de concentración 0.1 mol/L, un electrodo de referencia de Ag/AgCl(sat) y un contraelectrodo formado por una lámina de platino. El voltamograma se registró por más de 10 veces consecutivas en un rango de potenciales entre -0.2 y +1.85 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s.
- l) Se prepararon 3 electrodos, tratando de reproducir diámetro de la esfera obtenida.

2.5.2- Procedimiento de determinación de las áreas geométricas de los electrodos indicadores de plata y de oro.

Se calcularon las áreas geométricas de las superficies electródicas de plata policristalina y de oro sin modificar, mediante el registro de los voltamogramas reversibles de una disolución de cloruro de hexaminrutenio(III) de concentración 0.01 mol/L, utilizando como electrolito soporte una disolución de sulfato de sodio (Na_2SO_4) de concentración 0.2 mol/L. Los voltamogramas se registraron en una celda estándar formada por un sistema de tres electrodos: electrodos indicadores de plata u oro sin modificar, electrodo de referencia, plata/cloruro de plata saturado y como contraelectrodo una lámina de platino, en un rango de potenciales entre -0.10 y 0.50 V y a velocidades de barrido comprendidas entre 0.025 y 0.25 V/s.

Posteriormente, las áreas geométricas de los electrodos de plata y oro sin modificar, se determinaron mediante el cálculo de las pendientes de las líneas rectas obtenidas al relacionar los valores de las corrientes anódicas (i_{pa}) en función de la raíz cuadrada de las velocidades de barrido correspondientes a cada uno de sus voltamogramas.

La ecuación utilizada para el cálculo del área superficial electródica fue la de Randles-Sevcik.⁵⁷

$$i_p = 269000 A n^{3/2} D^{1/2} c v^{1/2} \text{ (ecuación 2.1)}$$

donde:

i_p - corriente del pico anódico (μA).

A - área geométrica del electrodo (cm^2).

n - número de electrones intercambiados; en este caso $n = 1$.

D - coeficiente de difusión de la especie electroactiva (cm^2/s); en este caso

$D_{[Ru(NH_3)_6]^{3+}} = 7.5 \times 10^{-6} cm^2/s$.⁵⁷

c - concentración de la especie electroactiva en disolución (mmol/L).

v - velocidad de barrido (Vs^{-1}).

2.5.3- Modificación de los electrodos de plata y oro por los derivados de ciclodextrina.

El electrodo de plata previamente limpio se sumergió durante toda la noche en un recipiente que contenía una disolución de **7 α** , **7 β** o **7 γ** de concentración 10 mmol/L en dimetilsulfóxido/agua (60:40 v/v), tapado herméticamente. A continuación, se introdujo el electrodo previamente modificado en una disolución etanólica de adamantanol y morfolinditiocarbamato de sodio de concentración 0.01 mol/L durante 6 horas, para sellar los espacios no cubiertos por los receptores de ciclodextrina. Finalmente, se lavó el electrodo cuidadosamente varias veces con dimetilsulfóxido, metanol y agua bidestilada, y se dejó secar durante 10 min.

Por su parte, la modificación de los electrodos de oro se realizó en dos variantes:

- A. El electrodo de oro previamente limpio se introdujo en un pequeño recipiente que contenía una disolución 1 mmol/L de **8β** en dimetilsulfóxido/agua (60:40 v/v), durante toda la noche, seguido de lavados con dimetilsulfóxido, metanol y agua. Posteriormente, se sumergió por segunda vez en una disolución etanólica de 1-adamantanol y ácido tióctico de concentración 1 mmol/L, durante 6 h. Finalmente, se lavó varias veces con dimetilsulfóxido, etanol y agua bidestilada y se dejó secar durante 10 min.
- B. Para los estudios de inmovilización de citocromo c, el electrodo sólo se modificó con **8β** y no se trató con ningún sellante con el objetivo de no reducir el área activa del electrodo.

2.5.4- Caracterización electroquímica de la formación de monocapas en superficies electródicas.

Una de las formas de caracterizar la formación de monocapas electródicas fue electroquímicamente, a través de experimentos de desorción reductiva. Estos se realizaron en una celda electrolítica formada por un sistema de tres electrodos en los cuales el electrodo indicador fue el de plata u oro modificado con **7α**, **7β**, **7γ** o **8β**, plata/cloruro de plata como electrodo de referencia y un contraelectrodo de platino. Como electrolito soporte se empleó una disolución de hidróxido de potasio de concentración 0.5 mol/L y se registró el voltamograma en un rango de potenciales entre 0 y -1.2 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Otra de las formas electroquímicas de demostrar el proceso de autoensamblaje de derivados sulfurados de las ciclodextrinas en superficies electródicas fue a través de las mediciones de impedancia,¹⁰⁷ las cuales se realizaron en un equipo CHI-660 (CH Instruments, USA) empleando un sistema de tres electrodos. El potencial de trabajo se fijó al valor del potencial redox de la especie estudiada (+0.20 V para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, +0.22 V para el ascorbato y +0.25 para la dopamina). La concentración de la especie estudiada fue de 1 mmol/L y el electrolito soporte fue KCl 0.1 mol/L o buffer fosfato de pH 7. La respuesta de impedancia se midió con una corriente de 5 mV de amplitud a frecuencias entre 0.1 y 1000 Hz. Los resultados se analizaron empleando el gráfico de Nyquist. La resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) se determinó por extrapolación de la parte

semicircular del grafico de Nyquist al eje de las x (Z') empleando el programa *Equivalent Circuit* desarrollado en la Universidad de Twente, Holanda.

2.5.5 -Cálculo de la concentración superficial de receptores inmovilizados.

La concentración superficial de receptores inmovilizados (Γ) se determinó a partir de los experimentos de desorción reductiva descritos en 2.5.4. Para ello se determinó el área bajo la curva correspondiente al proceso catódico, registrado a sensibilidades $S_y = 1 \mu\text{A/cm}$ y $S_x = 0.1 \text{ V/cm}$, y a una velocidad de barrido $v = 0.1 \text{ V/s}$ (figura 2.2).

El área bajo la curva es equivalente a la carga involucrada en el proceso de desorción según la ecuación $Q = \int i(t)dt$. Teniendo en cuenta los valores de S_x , S_y y v empleados en el registro, se obtiene que 1 cm^2 equivale a $1 \mu\text{C}$, por lo que la carga (en μC) será numéricamente igual al valor del área obtenida (en cm^2).

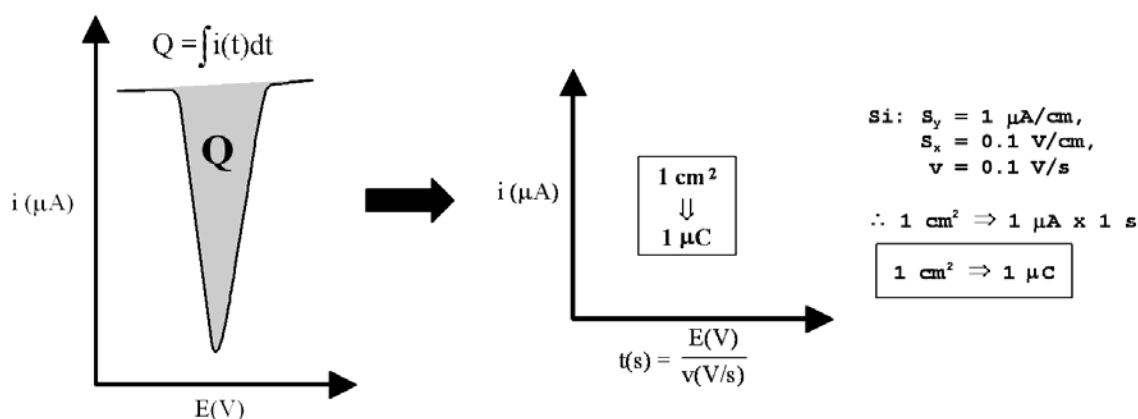


Figura 2.2- Equivalencia entre el área bajo la curva de desorción y la carga para las condiciones empleadas en el registro.

Según la Primera Ley de Faraday, la carga involucrada en el proceso es proporcional a la cantidad de sustancia transformada:

$$Q = n n_e F$$

donde:

n - cantidad de sustancia transformada,

n_e - número de electrones involucrados en el proceso (que depende del número de enlaces M-S formados por cada receptor),

F = constante de Faraday (96500 C/mol).

Entonces:

$$n = Q/n_e F.$$

Si se divide el valor de n obtenido por el área geométrica del electrodo A (obtenida en 2.5.2) se puede determinar Γ según:

$$\Gamma = n/A$$

Esta magnitud, que se expresa en mol/cm^2 , indica la cantidad de sustancia de los receptores inmovilizados por unidad de área del electrodo.

2.5.6- Cálculo del grado de recubrimiento superficial en los electrodos modificados.

Para realizar este cálculo, es necesario determinar primero la concentración superficial máxima (Γ_{max}) que puede obtenerse con los receptores empleados, lo cual se puede hacer a partir de consideraciones geométricas sencillas.

Si se considera que el diámetro exterior de la molécula de β -ciclodextrina es de unos $16 \text{ \AA}$ ¹⁹, el área ocupada por un receptor se puede calcular según:

$$A_{\beta\text{CD}} = \pi r^2 = 3.1416 \times (8 \times 10^{-8} \text{ cm})^2 = 200 \times 10^{-16} \text{ cm}^2 = 200 \text{ \AA}^2$$

Si una molécula ocupa un área de $200 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ y considerando que el máximo recubrimiento se logra con un empaquetamiento hexagonal (figura 2.3), entonces 1 cm^2 de superficie estará ocupado aproximadamente por:

$$1/A_{\beta\text{CD}} = 1/(200 \times 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{molécula}) = 5 \times 10^{13} \text{ moléculas}/\text{cm}^2$$

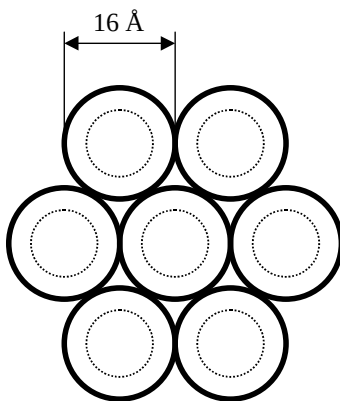


Figura 2.3- Empaquetamiento hexagonal de la β -ciclodextrina.

Por lo tanto:

$$\Gamma_{\max} = 1/(A_{\beta\text{CD}}N_A)$$

$$\Gamma_{\max} = (5 \times 10^{13} \text{ moléculas/cm}^2)/(6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol})$$

$$\Gamma_{\max(\beta\text{CD})} = 8.3 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2 = 83 \text{ pmol/cm}^2$$

Análogamente, para la α - y γ -ciclodextrina se obtienen, respectivamente, los valores siguientes:

$$\Gamma_{\max(\alpha\text{CD})} = 10.8 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2 = 108 \text{ pmol/cm}^2$$

$$\Gamma_{\max(\gamma\text{CD})} = 6.5 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2 = 65 \text{ pmol/cm}^2$$

El grado de recubrimiento (R) será entonces:

$$R = 100 \Gamma/\Gamma_{\max}$$

donde Γ es la concentración superficial de receptores inmovilizados determinada en 2.5.5.

Esta magnitud representa el % de superficie electródica ocupada por un receptor dado. R depende del tipo de ciclodextrina y del número de enlaces M-S mediante el cual se fije al electrodo.

2.6- Estudios voltamétricos realizados con los electrodos modificados en diferentes aplicaciones.

2.6.1- Estudio voltamétrico de nitrocompuestos aromáticos disustituídos empleando electrodos de plata modificados con los derivados 7 α , 7 β y 7 γ .

Se realizó un estudio voltamétrico comparativo de diferentes sustancias orgánicas electroquímicamente activas, tales como los isómeros de posición *orto*-, *meta*- y *para*- del nitrobenzoato, del nitrofenol y del alcohol nitrobencílico. La concentración de la sustancia electroactiva varió entre 1 mmol/L y 10 mmol/L y se empleó como electrolito soporte una

disolución de sulfato de sodio de concentración 0.2 mol/L. Los voltamogramas fueron registrados en un sistema de tres electrodos, donde el electrodo indicador fue de plata sin modificar y modificados con los derivados **7 α** , **7 β** y **7 γ** , electrodo de referencia de Ag/AgCl y como contraelectrodo una lámina de platino. Los voltamogramas se registraron a valores de potenciales entre +0.10 y -0.75 V y velocidades de barrido de 100 mV/s.

2.6.2- Estudio del comportamiento voltamétrico de la dopamina en presencia de ácido ascórbico empleando electrodos de oro modificados con **8 β .**

Primeramente, se registraron los voltamogramas de las disoluciones de dopamina y ácido ascórbico de concentración 1 mmol/L, mezcladas y por separado. Dada la gran facilidad de oxidación de la dopamina y el ácido ascórbico, sus disoluciones se prepararon en buffer fosfato de pH = 7, cuidadosamente desoxigenadas con argón, y se aislaron del aire en la medida de lo posible. Las disoluciones se emplearon rápidamente y se descartaron al finalizar cada medición.

Se usó un sistema clásico de tres electrodos empleando electrodos indicadores de oro sin modificar o modificados con ácido tióctico o **8 β** , o ambos. Los voltamogramas fueron registrados a valores de potenciales entre 0.2 y 0.6 V a velocidades de barrido de 100 mV/seg.

2.6.3 Determinación de la constante de inclusión interfacial de los sustratos estudiados mediante la isoterma de Langmuir.

Se registraron los voltamogramas de disoluciones del sustrato a diferentes concentraciones (1-5 mmol/L para los nitrocompuestos; 0.1-1 mmol/L para la dopamina) empleando los electrodos modificados correspondientes y se determinó el valor de la corriente de pico correspondiente para cada concentración.

El valor de la constante de inclusión interfacial (K) se determinó mediante la ecuación de la isoterma de Langmuir:

$$\frac{c}{i_p} = \frac{1}{K \cdot i_{\max}} + \frac{c}{i_{\max}} \quad (\text{ecuación 2.2}).$$

- i_p es la intensidad del pico de reducción.
- c es la concentración del sustrato.

- K es la constante de inclusión interfacial.

Graficando c/i_p vs c se obtiene una línea recta cuya pendiente (b) equivale a $1/i_{\max}$ y el intercepto (a) corresponde a $1/(K \cdot i_{\max})$. Por lo tanto: $K = b/a$.

2.6.3- Estudio voltamétrico del proceso inmovilización del citocromo c modificado con unidades de adamantano (Cyt c-A).

Se monitoreó voltamétricamente el proceso de inmovilización del citocromo c (Cyt c) de concentración 10 mmol/L en una superficie electródica de oro modificada con el derivado **8 β** . Se utilizó como electrodo de referencia plata/cloruro de plata, como contraelectrodo una lámina de platino, y como electrolito soporte buffer fosfato de pH = 7, previamente desoxigenado con argón. Los voltamogramas se registraron inmediatamente después de sumergido el electrodo en la solución de Cyt c o Cyt c-A, así como a diferentes tiempos, en un rango de potenciales entre 0.0 y 0.6 V, a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Posteriormente, se repitió el experimento para las mismas condiciones anteriores de registro después de agregar alícuotas de disoluciones saturadas de 1-adamantanol o 4,4'-bipiridina.

Finalmente, se realizaron estudios comparativos en presencia de sustratos electroactivos, en particular 1,2-naftoquinona y $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, ambos de concentración 1 mM, en ausencia y en presencia de Cyt c-A.

2.7- Estudios Computacionales.

Se desarrolló una serie de cálculos de optimización de geometría de los derivados 7 β y 8 β y sus complejos de inclusión por métodos de mecánica molecular (MM2)¹⁰⁷ o semiempíricos (PM3)¹⁰⁸ soportados en el programa MOPAC 6.0,¹⁰⁹ en una computadora personal Pentium 4.

7 β : La optimización de geometría comenzó a partir de la estructura cristalina reportada para la β -ciclodextrina.¹⁹ A continuación, los siete grupos hidroxilo primarios fueron sustituidos por siete grupos amino y la estructura resultante fue optimizada mediante MM2 usando HyperchemTM. Teniendo en

cuenta que el grado de sustitución en 7β determinado por RMN era ~ 4 , cuatro grupos CSS^- fueron adicionados a los grupos amino en diferentes posiciones. Se optimizaron a nivel PM3 las geometrías de los cinco isómeros de posición posibles ($6^A, 6^B, 6^C, 6^D-$, $6^A, 6^B, 6^C, 6^E-$, $6^A, 6^B, 6^C, 6^F-$, $6^A, 6^B, 6^D, 6^E-$ y $6^A, 6^B, 6^D, 6^F-$),[†] obteniéndose que el isómero ($6^A, 6^B, 6^D, 6^F$) resultó ser el más estable (figura 2.4).

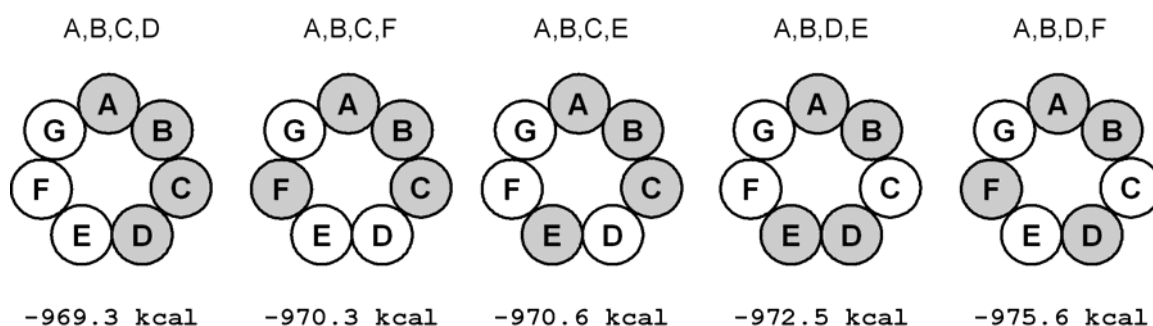


Figura 2.4- Posibles isómeros de posición de un derivado tetrasustituido de βCD y calores de formación obtenidos para sustituyentes del tipo ditiocarbamato.

Finalmente, en la estructura optimizada de este último isómero se colocaron en el centro de la cavidad los sustratos *orto*- y *para*-nitrobenzoato y se optimizó la geometría de los complejos de inclusión a nivel MM2 y PM3.

8β : A partir de la estructura cristalina de la β -ciclodextrina,¹⁹ los siete grupos hidroxilo primarios fueron sustituidos por siete grupos $-\text{SH}$ y la geometría fue optimizada mediante MM2 y PM3. Posteriormente, los sustratos dopamina y ácido ascórbico se colocaron en el interior de la cavidad del receptor y se optimizaron las geometrías de los compuestos de inclusión mediante MM2 y PM3.

[†] Esta nomenclatura se interpreta de la siguiente forma: el anillo de ciclodextrina se mira desde el lado primario y cada unidad de glucosa es identificada con una letra mayúscula siguiendo las manecillas del reloj. Así, por ejemplo: $6^A, 6^B, 6^D, 6^F$ quiere decir que los sustituyentes están situados en la posición 6 de las unidades A, B, D y F, respectivamente.

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSION

3.1- Síntesis y caracterización espectroscópica de los derivados de ciclodextrina estudiados.

La síntesis de derivados de las ciclodextrinas es, sin duda alguna, uno de los aspectos más importantes de la presente tesis, ya que constituye el punto de contacto del tránsito de la química molecular a la química supramolecular. A continuación se describen los aspectos fundamentales relacionados con la síntesis de los derivados estudiados.

3.1.1- Síntesis de los derivados halogenados (2-4).

Existe una notable variedad de reportes en la literatura especializada donde las estrategias de síntesis de estos derivados, los métodos de aislamiento, purificación y los rendimientos de reacción son reportados de diferentes maneras.^{49-53,56} Es por ello que se procedió a ensayar algunos de estos métodos con el objetivo de comparar los resultados obtenidos y, de esa forma, conformar una adecuada estrategia de síntesis (figura 3.1).

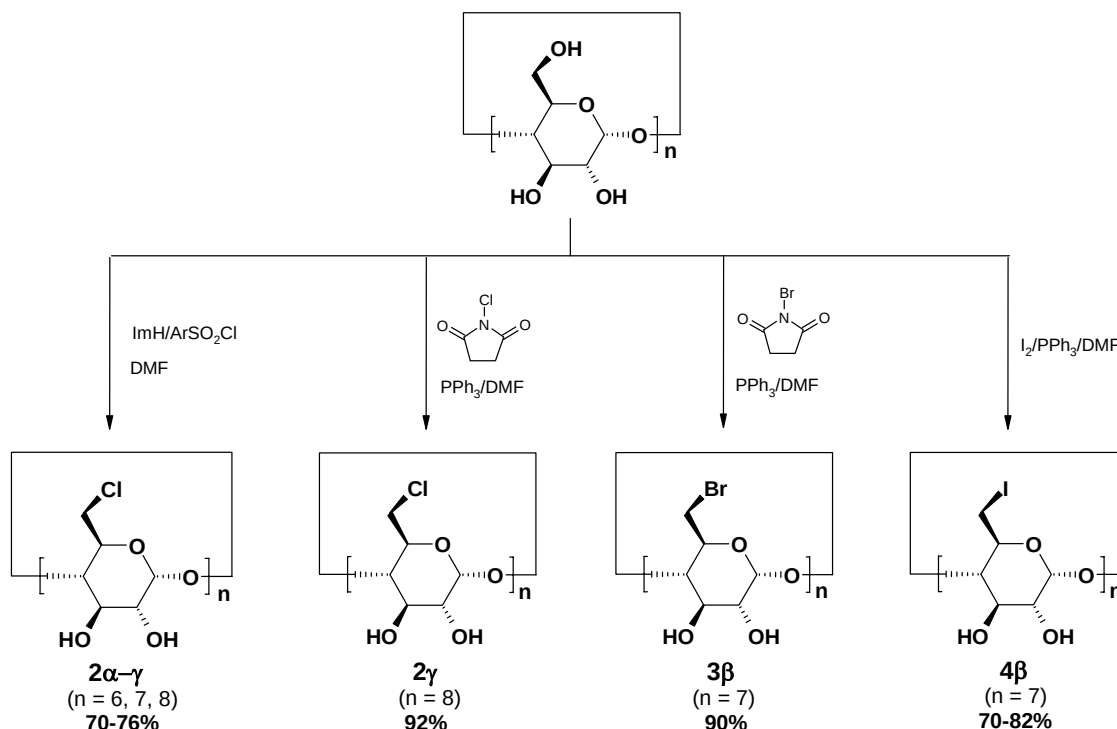


Figura 3.1- Síntesis de los derivados halogenados estudiados.

Los halogenuros de las ciclodextrinas (2-4) constituyen los precursores del resto de los derivados sintetizados. Estos derivados fueron obtenidos mediante reacciones del tipo Vilsmeier-Haack a partir de la ciclodextrina nativa y un agente halogenante generado *in situ* en presencia de DMF.

Entre los derivados halogenados sintetizados, los cloruros **2α-γ** fueron sintetizados adaptando el método de D'Souza,⁵² que está reportado solamente para la síntesis de **2β**. Esta reacción ocurre mediante un ataque nucleofílico de los iones cloruro al carbono 6 activado (figura 3.2). La función del imidazol es inhibir la reacción competitiva de formación de ésteres y formiatos que pudieran provocar una disminución en el rendimiento de la reacción.

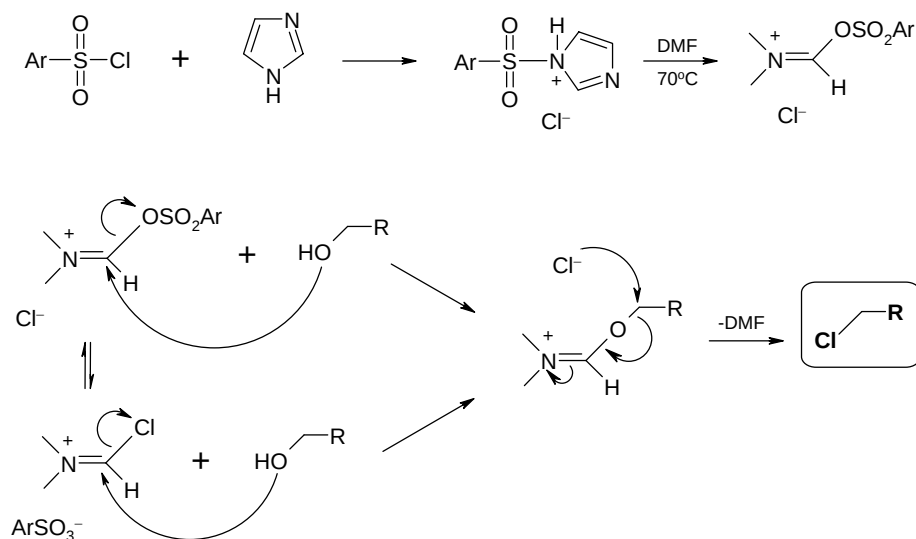


Figura 3.2- Mecanismo de la reacción de formación de **2β**.⁵²

Una de las condiciones experimentales necesarias en esta reacción fue el uso de un medio anhidro. Las ciclodextrinas de partida se secaron durante 20 horas a 120°C sobre P_2O_5 , lo cual garantizó la eliminación del ~12% de agua de cristalización con que se comercializan. Dadas las condiciones de humedad relativa elevada existentes en nuestro medio, se empleó un tubo de cloruro de calcio para aislar el sistema lo más posible de la humedad. El estricto control de la temperatura a 70°C es otro de los aspectos importantes a tener en cuenta en esta síntesis. La formación del intermediario sulfonil-imidazol al inicio de la reacción (figura 3.2) es un proceso muy exotérmico en el que la temperatura puede alcanzar valores superiores a los 90°C , provocando su descomposición y la formación de productos colaterales formilados y sulfonados con la consiguiente disminución en los rendimientos del cloruro. Para aislar el producto se prefirió la centrifugación a la filtración, ya que se trabajó con cantidades relativamente pequeñas de

producto. Bajo estas condiciones los rendimientos de reacción fueron de entre un 70 y un 76%, los cuales son menores que el reportado para **2β** (89%).

Como el rendimiento de la síntesis de **2γ** (70%) fue el más bajo obtenido, se ensayó el método recientemente reportado por Defaye,^{53b} el cual reporta un 93% de rendimiento para este derivado (figura 3.1). En este método se emplea *N*-cloro-succinimida y trifenilfosfina en DMF y tiene la ventaja de que el tiempo de reacción es mucho menor (4 horas) comparado con el de D'Souza (24 horas). Esta reacción ocurre también a través de reacciones del tipo Vilsmeier-Haack con la diferencia de que, en este caso, el grupo hidroxilo primario es activado por la formación de una sal de trifenilfosfonio^{50,53b} (figura 3.3). El método de aislamiento y purificación del producto fue similar al anterior, obteniéndose un rendimiento del 92%. Análogamente, se obtuvo el derivado *per*-bromado **3β** empleando, en este caso, *N*-bromo-succinimida, con un rendimiento del 90%.

El derivado *per*-yodado **4β** fue sintetizado por los métodos propuestos por Defaye⁵⁰ y Stoddart.⁵⁶ En este caso el reactivo de Vilsmeier-Haack se forma por la reacción del yodo con la trifenilfosfina en DMF a 80°C (figura 3.3). En el procedimiento de aislamiento y purificación de ambos métodos se utilizó una disolución de metóxido de sodio en metanol de concentración 3 mol/L, con la finalidad de eliminar los ésteres y formiatos que se forman como resultado de reacciones colaterales no deseadas. Para el método de Stoddart se utilizó el extractor de Soxhlet y metanol como disolvente para eliminar el exceso de yodo que coprecipita con el producto y que es sumamente difícil de eliminar por simples lavados. Esta forma de extracción contribuyó además a la obtención de **4β** con un mayor rendimiento, el cual fue un 12% superior que el obtenido según Defaye.

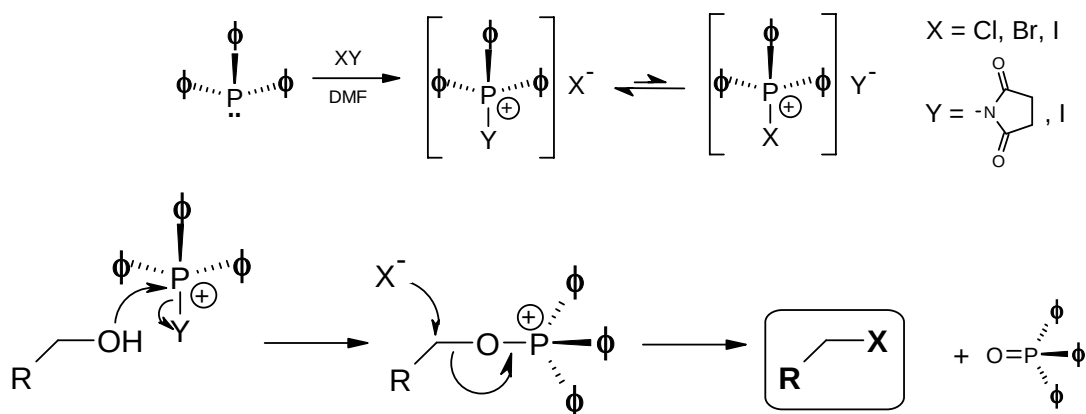


Figura 3.3- Mecanismo general de la reacción de formación de **2γ**, **3β** y **4β**.^{50,53}

3.1.2 Síntesis de los intermediarios 5 y 6.

Los azido-derivados **5α**, **5β** y **5γ** se obtuvieron con 93-96% de rendimiento por simple

desplazamiento de un átomo de cloro en **2α-γ** con un exceso de azida de sodio en DMF (figura 3.4), a través de un mecanismo S_N2.

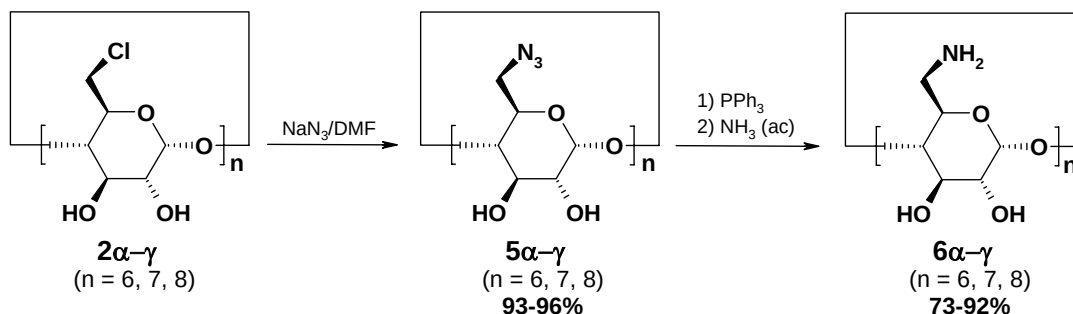


Figura 3.4- Síntesis de los intermediarios **5** y **6**.

Entre los derivados nitrogenados más importantes de las ciclodextrinas están las aminas **6α**, **6β** y **6γ**, que se obtienen por reducción de las azidas **5α**, **5β** y **5γ** con trifenilfosfina (figura 3.4). La síntesis se realizó por los métodos de Defaye^{54,55} y Stoddart⁵⁶ que difieren, esencialmente, en la forma de aislar el producto. Se plantea que en el primer paso de esta reacción se forma un intermediario del tipo azo-fosfina como resultado del ataque nucleofílico de la trifenilfosfina al nitrógeno electrofílico de la azida, con desprendimiento de nitrógeno gaseoso.⁵⁶ A continuación, el amoníaco concentrado hidroliza este intermediario con la formación de la amina correspondiente y óxido de trifenilfosfina (figura 3.5).

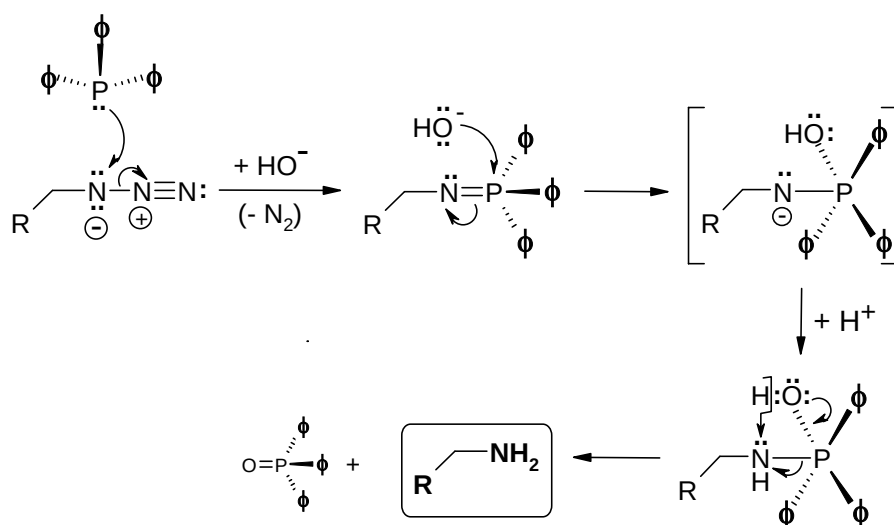


Figura 3.5- Mecanismo de la reacción de formación de **6α**, **6β** y **6γ**.⁵⁶

En el método original reportado por Defaye^{54,55} se obtiene la amina en forma de clorhidrato, lo cual es muy conveniente para su caracterización, como se verá posteriormente. La mezcla de reacción se precipita directamente con agua y

el óxido de trietilfosfina se elimina por lavados con metanol. Sin embargo, esta operación no eliminó completamente la impureza de óxido de trietilfosfina, según se comprobó por RMN protónica, por lo que se empleó una variante en la que el producto se precipitó directamente sobre agua acidulada con HCl y se filtró el óxido de trietilfosfina. El filtrado, que contiene el clorhidrato de la amina, se precipitó con acetona. De esta forma se facilita la purificación del producto aunque los rendimientos obtenidos (73-78%) fueron ligeramente inferiores a los reportados en la literatura.

Finalmente, la necesidad de obtener la amina libre para la síntesis de los ditiocarbamatos **7 α - γ** , nos inclinó por el método de Stoddart en el cual la amina libre se precipita de la mezcla de reacción con etanol. De esta forma la impureza de óxido de trietilfosfina queda disuelta y la purificación de la amina se puede llevar a cabo muy fácilmente. Una característica muy interesante de las aminas **6 α** , **6 β** y **6 γ** es su insolubilidad en agua y el resto de los disolventes orgánicos comunes, incluyendo DMSO y DMF. Por ello, debieron transformarse en clorhidratos para su caracterización espectroscópica. Los rendimientos obtenidos según el método de Stoddart fueron superiores (85-92%) a los obtenidos según Defaye.

3.1.3 Síntesis de los derivados sulfurados (7 y 8).

Los derivados sulfurados de las ciclodextrinas son los productos finales y más importantes de nuestro trabajo ya que, mediante su fijación a electrodos metálicos, pudieron ser empleados como sensores voltamétricos de reconocimiento molecular o soportes enzimáticos.

Los derivados de tipo ditiocarbamato **7 α** , **7 β** y **7 γ** se obtuvieron a través de la reacción de condensación entre el grupo amino de **6 α** , **6 β** y **6 γ** y el disulfuro de carbono en medio básico (figura 3.6).

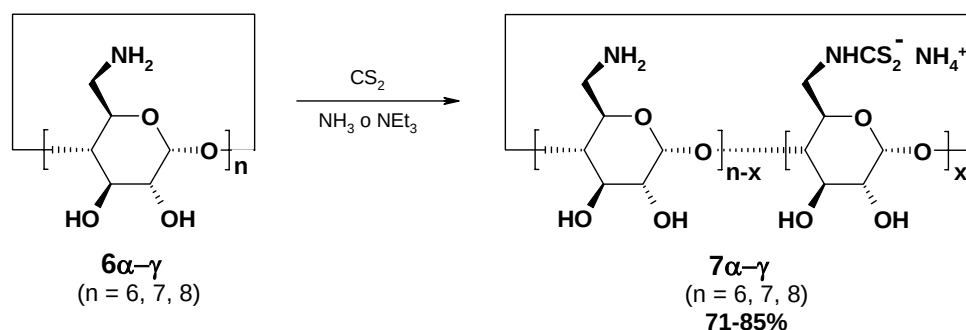


Figura 3.6- Síntesis de los ditiocarbamatos **7 α - γ** .

En reportes previos de nuestro grupo sobre derivados de este tipo se había descrito la síntesis de ditiocarbamatos derivados de ciclodextrinas monosustituidas por reacción de mono-

metilamino- β -ciclodextrinas con 1 equivalente de CS_2 en presencia de una base con un 89% de rendimiento.⁴⁵ Es por ello que para la obtención de **7 α** , **7 β** y **7 γ** se decidió emplear esencialmente el mismo método, adaptando las cantidades de reactivos a la presencia de numerosos grupos amino susceptibles de reaccionar con el CS_2 . Sin embargo, como se verá más adelante, esto no garantizó la sustitución completa de todos los grupos amino, sino que se obtuvo una mezcla de productos con diferentes grados de sustitución, como se evidenció por RMN. Esta reacción se realizó por triplicado, obteniéndose un grado de sustitución que coincidió en $\pm 10\%$. Los ditiocarbamatos se sintetizaron primero en forma de sal de amonio pero posteriormente se ensayó la síntesis utilizando una base más fuerte, la trietilamina. De esta forma, se obtuvieron las correspondientes sales de trietilamonio que resultaron ser más estables y permitieron una mejor purificación y mayores rendimientos (80-85%) que los obtenidos para las sales de amonio (70-75%).

El derivado *hepta*-tiolado **8 β** se obtuvo inicialmente según el método de Kaifer⁵⁷ tratando el *hepta*-yoduro **4 β** con tiourea en dimetilformamida, seguido de hidrólisis básica (figura 3.7). En esta reacción se produce un ataque nucleofílico del azufre de la tiourea a los átomos de carbono de la posición 6 de **4 β** , formándose un intermediario del tipo tiouronio que, al hidrolizarse con NaOH y neutralizar el medio, originó el derivado *hepta*-tiolado deseado en un 83% de rendimiento (figura 3.7).

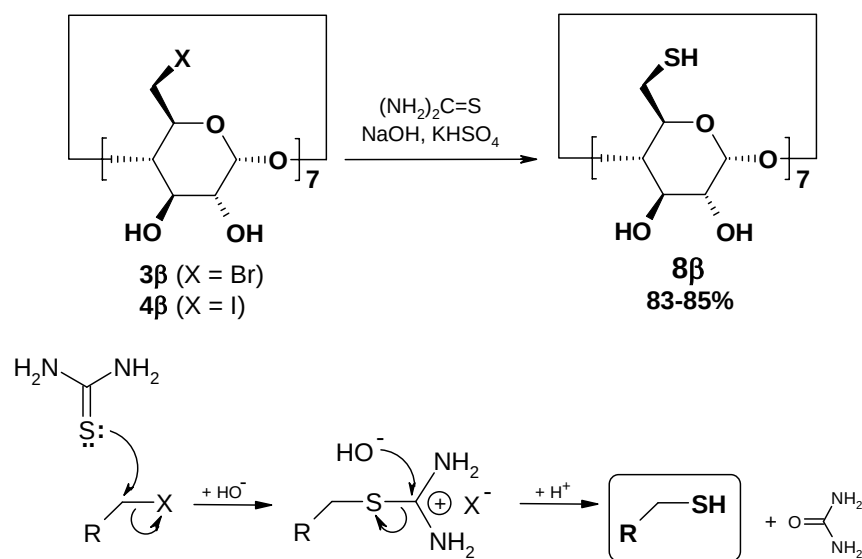


Figura 3.7- Síntesis y mecanismo de formación de **8 β** .⁵⁷

Esta reacción se ensayó, además, partir del cloruro **2 β** y del bromuro **3 β** . En el primer caso no se verificó la reacción, recuperándose intacto el producto de partida, mientras que el *hepta*-bromuro, como era de esperar, si reaccionó fácilmente. Es por ello que cuando se hizo necesario preparar de nuevo el *hepta*-tiol **8 β** se empleó **3 β** en lugar de **4 β** , dada la mayor sencillez y rendimiento en su obtención, aunque el rendimiento de formación de **8 β** fue muy similar (85%). La

diferencia de reactividad observada para los haluros frente a la tiourea puede explicarse atendiendo al mayor volumen atómico de los sustituyentes yoduro o bromuro, que son mejores grupos salientes que el cloruro en las reacciones de sustitución nucleofílica y al menor poder nucleofílico de la tiourea con respecto, por ejemplo, al grupo azido que sí reacciona fácilmente con el *hepta*-cloruro.

3.1.4- Caracterización espectroscópica de los derivados de ciclodextrina sintetizados.

La identificación y caracterización de los derivados de las ciclodextrinas estudiados se desarrolló mediante diferentes técnicas espectroscópicas: espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas, teniendo en cuenta las características estructurales de cada derivado.

La espectroscopia de RMN se ha convertido en uno de los métodos más importantes de caracterización estructural de compuestos orgánicos, especialmente en disolución. En la actualidad, esta técnica ha alcanzado una marcada utilidad en el control de la síntesis y caracterización de derivados de las ciclodextrinas.

La caracterización de los derivados de las ciclodextrinas obtenidos se llevó a cabo por RMN protónica y de ^{13}C empleando DMSO- d_6 o D_2O como disolvente y sus resultados aparecen recogidos en las tablas 2.1 y 2.2. Una selección de algunos de los espectros más representativos se muestra en el Anexo 1.

De forma general, los espectros de RMN- ^1H de los derivados **2 α** , **2 β** , **2 γ** , **3 β** , **4 β** , **5 α** , **5 β** , **5 γ** y **8 β** en DMSO- d_6 , mostraron las señales de los grupos -OH entre 5 y 6 ppm y del protón H-1 anomérico alrededor de los 5 ppm. Se observó, además, un grupo de señales entre 3 y 4 ppm correspondiente a los restantes protones, que aparecen solapadas entre sí. No obstante, en esta zona aparece también la señal del agua (~3.4 ppm) que en algunos casos impidió determinar adecuadamente la posición y multiplicidad de estas señales, a pesar de los cuidados que se tuvieron en excluir el agua de la muestra.

En el caso de las aminas **6 α** , **6 β** y **6 γ** , sus espectros se obtuvieron en D_2O acidulada con ácido trifluoroacético, dada su insolubilidad en DMSO o D_2O como aminas libres (ver anexo1). Estos espectros son muy similares a los de las ciclodextrinas libres, excepto por el desplazamiento a campos más altos de -0.48 ppm que muestran las señales de H-6a y H-6b, que aparecen como multipletes ensanchados

Por otro lado, los espectros de los ditiocarbamatos **7 α** , **7 β** y **7 γ** mostraron las señales de los grupos -OH entre 5 y 6 ppm, una señal a ~5 ppm correspondiente a H-1 y un multiplete centrado a los 3.7 ppm correspondiente al resto de los protones de las unidades de glucosa (figura 3.8). Como puede verse, estas señales aparecen sustancialmente ensanchadas, lo cual resultó ser el primer indicio de que estos productos constituyen una mezcla de compuestos con diferentes grados de sustitución.

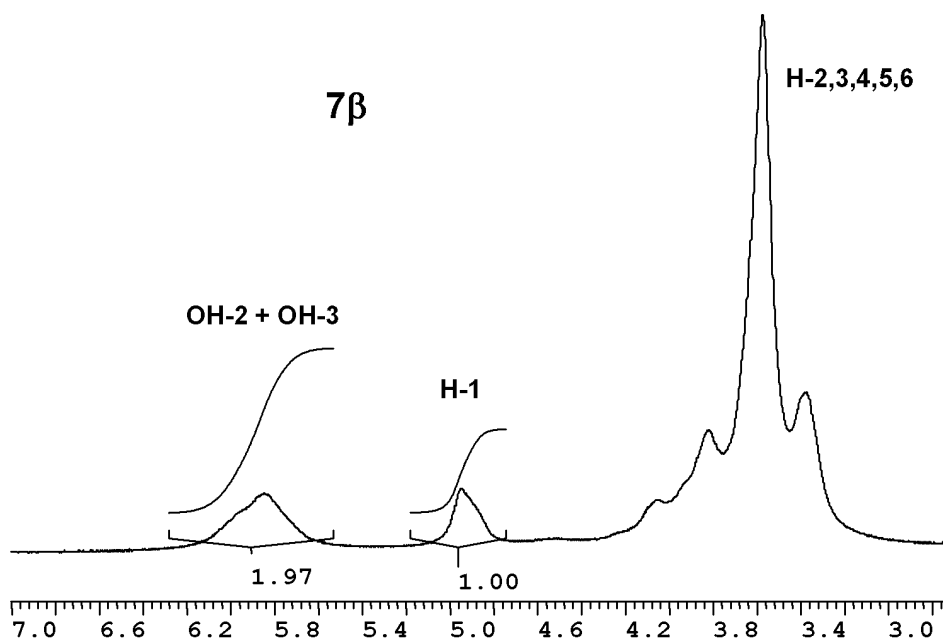


Figura 3.8- Espectro RMN- ^1H de **7 β** en DMSO- d_6 .

El análisis de los espectros de RMN- ^{13}C nos permitió establecer una serie de consideraciones generales:

1. Los espectros de los compuestos sintetizados (excepto **7 α** , **7 β** y **7 γ**) muestran un único sistema de 6 señales, característico de los derivados *per*-sustituídos (ver Anexo 1). Ello se debe a que sus compuestos poseen un eje de simetría C_n (donde $n = 6-8$) en los que todas las unidades de glucosa son magnéticamente equivalentes como resultado de la sustitución en todos los carbonos de la posición 6.
2. En la tabla 2.I se puede observar que el C-1 anomérico evidencia un marcado desblindaje, como resultado de su entorno electrónico (está unido a dos átomos de oxígeno), por lo que la señal aparece a los mayores valores de δ (alrededor de los 102 ppm). A continuación aparecen, a mayores campos, la señal del C-4 a 83 ppm, las señales de los C-2, C-3, C-5 entre 70 y 72 ppm.
3. Como es de esperar, las señales correspondientes al C-6, que es el que contiene el sustituyente, aparecen en posiciones variables en dependencia de la naturaleza del grupo enlazado al átomo de carbono.

En el caso de los ditiocarbamatos **7 α** , **7 β** y **7 γ** , los espectros de ^{13}C mostraron señales ensanchadas, características de un producto polidiserso (figura 3.9).

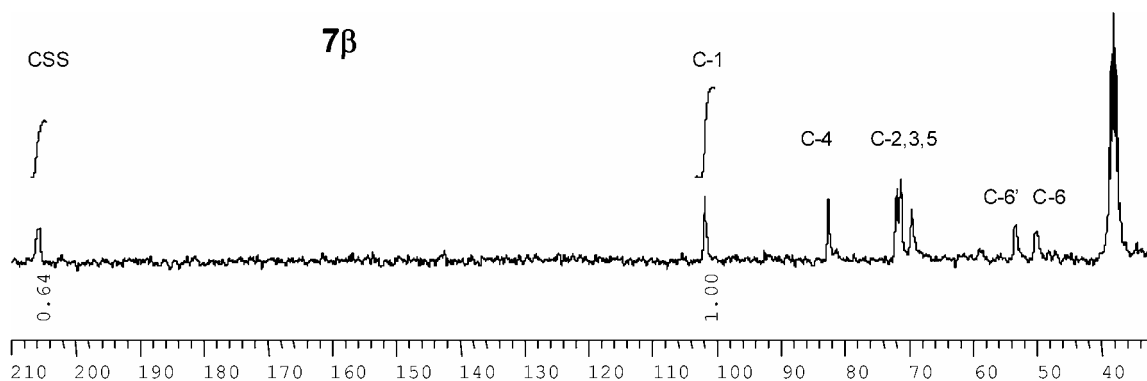


Figura 3.9- Espectro de RMN- ^{13}C con extinción de NOE de **7β** en DMSO- d_6 .

El espectro representado en la figura 3.9 muestra una señal a los 206 ppm, característica del grupo ditiocarbamato y dos señales de C-6 que aparecen a 50 y 54 ppm, asignadas mediante un experimento DEPT-135. Esto demuestra que la reacción de condensación entre los derivados **6α**, **6β** y **6γ** con el disulfuro de carbono no ocurre completamente. Esto puede deberse a que la cara primaria de las ciclodextrinas no puede acomodar 6, 7 u 8 grupos ditiocarbamato, presumiblemente por razones estéricas al ser ésta la cara más estrecha.

La señal que apareció a menores valores de δ , 50 ppm, se asigna al C-6 más blindado unido directamente al grupo amino, mientras la que apareció a mayor δ , 54 ppm, fue asignada al C-6 que está unido al grupo ditiocarbamato (C-6'). Empleando los espectros de RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ con extinción de NOE (figura 3.9), los cuales se pueden integrar, se logró determinar el grado de sustitución de los grupos ditiocarbamato en **7α**, **7β** y **7γ**. Para ello se calculó la relación entre el área bajo la curva espectral de las señales correspondientes al grupo CSS (206 ppm) y al carbono anomérico (102 ppm), que representa el 100% ya que todas las unidades de glucosa, sustituidas o no, poseen esta señal. De la aplicación de este método a los espectros obtenidos para 3 réplicas de los compuestos sintetizados se obtuvieron grados de sustitución de $55 \pm 8\%$, $64 \pm 10\%$ y $59 \pm 9\%$ para **7α**, **7β** y **7γ**, respectivamente. De ahí que $x = 3.3 \pm 0.5$, 4.5 ± 0.7 y 4.7 ± 0.7 en las fórmulas de **7α**, **7β** y **7γ**, respectivamente (figura 3.10).

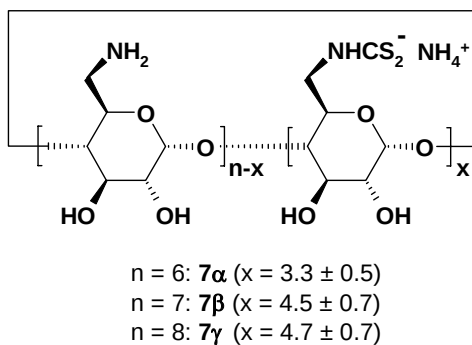


Figura 3.10- Grados de sustitución de los derivados **7α**, **7β** y **7γ**.

Los espectros UV-Vis de los derivados **7 α** , **7 β** y **7 γ** presentaron dos bandas de absorción muy intensas correspondientes a las transiciones π - π^* del grupo ditiocarbamato. La primera banda se observó alrededor de los 254 nm ($\log \varepsilon \cong 4$) y corresponde a transiciones π - π^* del grupo S-C=S. La segunda banda, correspondiente a las transiciones de grupo N-C=S, aparece alrededor de los 287 nm ($\log \varepsilon \cong 4$). La aparición de estas bandas permitió seguir en el tiempo la formación de estos productos lo cual ocurrió, como norma, a las 6 horas.

Finalmente, la gran mayoría de los derivados *per*-sustituidos obtenidos fueron caracterizados por espectrometría de masas empleando la técnica FAB (Fast Atom Bombardment). La presencia de los iones moleculares $[M+H]^+$ y/o de sus aductos con Na^+ o K^+ permitió corroborar las estructuras propuestas para estos productos. Es de notar que los espectros obtenidos no presentaron señales correspondientes a productos con menor grado de sustitución en C-6, lo cual confirmó los resultados obtenidos por RMN de ^{13}C . Desafortunadamente, no se lograron obtener espectros de masas de los ditiocarbamatos **7 α** , **7 β** y **7 γ** a pesar de ensayarse diferentes técnicas y matrices (FAB, MALDI, ionización por electrospray).

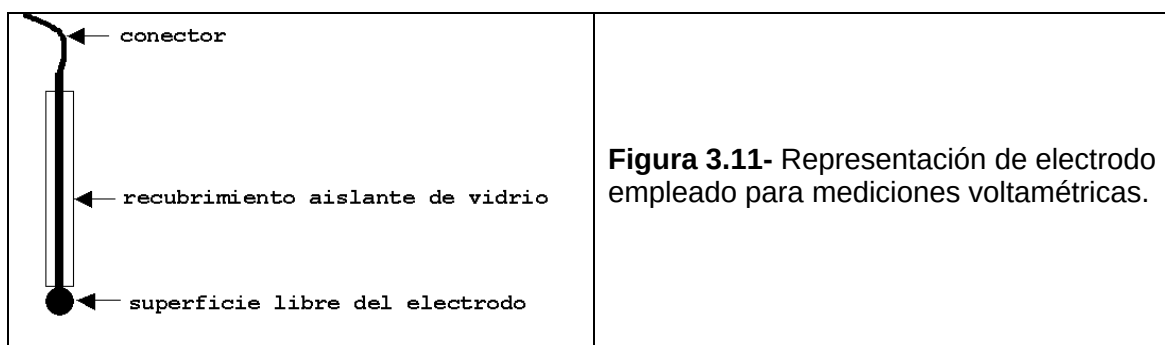
3.2- Caracterización electroquímica de las monocapas de los derivados **7 α , **7 β** , **7 γ** y **8 β** , en electrodos de plata y oro**

Una vez sintetizados los derivados sulfurados empleados en nuestro trabajo, se estudiaron sus propiedades de adsorción en superficies de plata y oro. Este estudio se dividió en las siguientes etapas:

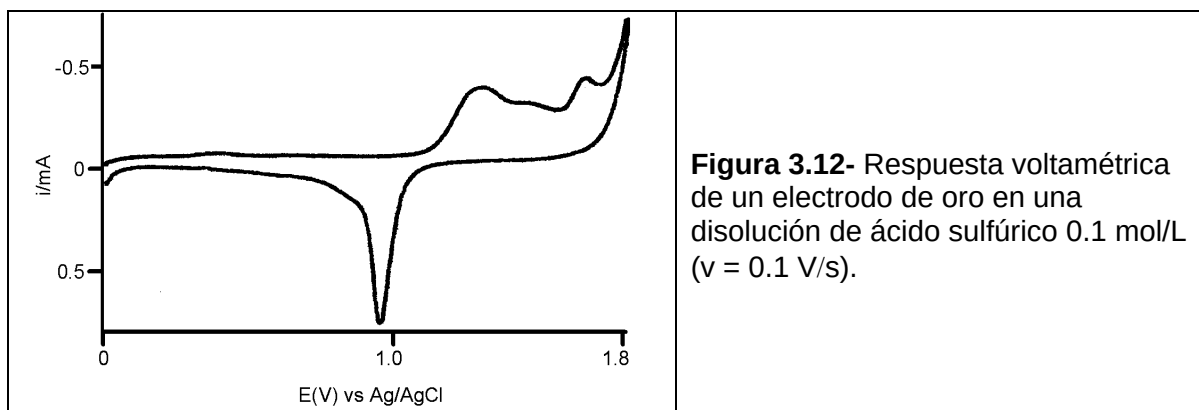
- Construcción de los electrodos de plata y oro y determinación de sus áreas geométricas.
- Formación y caracterización electroquímica de las monocapas.
- Comprobación de las propiedades de reconocimiento molecular de los derivados **7 α** , **7 β** , **7 γ** y **8 β** .

3.2.1- Construcción, limpieza y determinación de las áreas geométricas de los electrodos de plata y oro.

La preparación de los electrodos (figura 3.11) se llevó a cabo a través de toda una serie de operaciones que aparecen descritas en el epígrafe 2.5. Es importante destacar que el éxito en la preparación del electrodo de plata radicó en el sellaje del tubo de vidrio con silicona y una cinta de teflón. En el caso del electrodo de oro, el sellaje se llevó a cabo por fusión de un capilar de vidrio blando muy próximo a la superficie esférica libre del electrodo. El tratamiento realizado previo al sellaje, que consiste en el calentamiento de la esfera al rojo seguida de enfriamientos bruscos garantiza una superficie homogénea que hace que la monocapa formada tenga pocos defectos.¹⁰⁶. En ambos casos estas operaciones fueron muy importantes ya que cualquier tipo de interacción entre la solución electroactiva y el interior del electrodo produciría errores en las mediciones electroquímicas. De cada tipo de electrodo se prepararon, al menos, 3 ejemplares.



La limpieza química y electroquímica de las superficies electródicas según la metodología descrita en el epígrafe 2.5.1 fue también una operación muy importante. El electrodo de oro se limpió adicionalmente de forma electroquímica, mediante el registro del voltamograma de una disolución de ácido sulfúrico de concentración 0.1 mol/L por más de 10 veces hasta obtener una respuesta constante (figura 3.12).



Una vez limpios los electrodos de plata y de oro se le calculó el área geométrica (A) según la ecuación de Randles-Sevcik ($i_p = 269000 A n^{3/2} D^{1/2} c v^{1/2}$). El cálculo del área se realizó a partir del registro de los voltamogramas de una disolución de $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ de concentración 10

mmol/L a diferentes velocidades de barrido (figura 3.13 A). Para ello, se calculó la pendiente de la recta obtenida al relacionar la intensidad de los picos de corriente anódica (i_p) contra la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$) (figura 3.13 B). Conocidos los valores de c y D , se determinó el área geométrica a partir de la pendiente de este gráfico. Se obtuvieron valores entre 0.12 y 0.14 cm^2 para la plata y 0.04-0.07 cm^2 para el oro. Esta diferencia se debe al mayor diámetro del alambre de plata empleado para construir los electrodos.

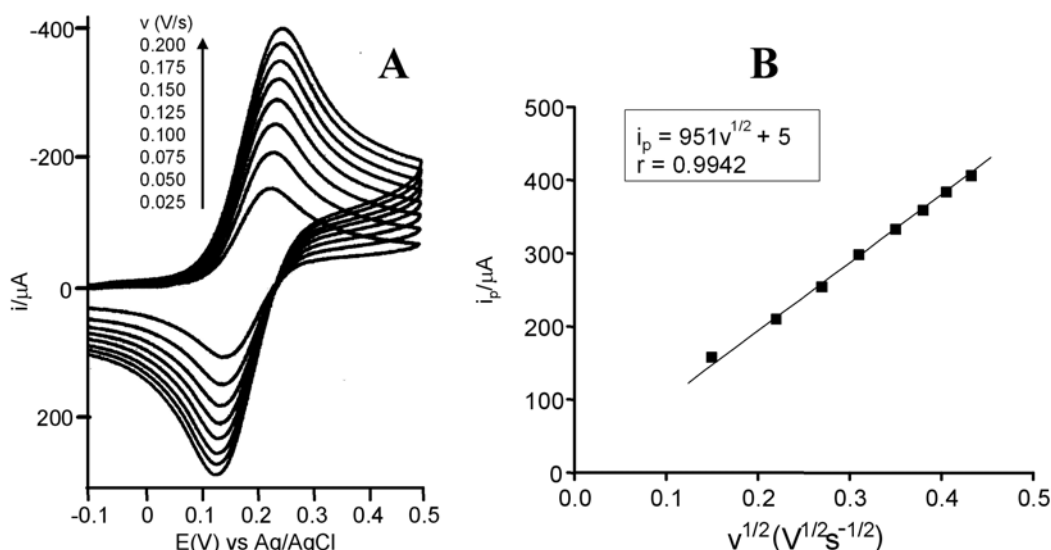


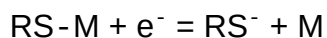
Figura 3.13- A)- Voltamogramas cíclicos de una disolución 10 mmol/L de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ obtenidos con un electrodo de plata sin recubrir ($A = 0.129 \text{ cm}^2$) a diferentes velocidades de barrido. **B)-** Gráfico de i vs $v^{1/2}$ empleado para el cálculo de A .

3.3.2- Formación y caracterización electroquímica de las monocapas de los derivados 7α , 7β , 7γ y 8β en electrodos de plata y oro.

La modificación de la superficie se realizó sumergiendo durante toda la noche los electrodos de plata y oro en disoluciones diluidas de 7α - γ y 8β , respectivamente, en atmósfera inerte. Por ser más baratos, los electrodos de plata se utilizaron como indicadores en la región catódica (de reducción). Entretanto, dada la mayor inercia química del oro, este metal, aunque mucho más caro, se utilizó para los experimentos en la zona anódica. La formación de monocapas de 7α - γ en superficies de oro resultó ser un proceso sumamente lento y las monocapas obtenidas fueron muy poco estables y con bajos porcentajes de recubrimiento, por lo que los electrodos de oro debieron ser modificados con derivados conteniendo grupos tiol (8β) y no ditiocarbamato. La razón de esta diferencia de comportamiento entre ambos grupos viene dada, fundamentalmente, por el mayor carácter π -aceptor del grupo $-\text{SH}$, lo que favorece mucho más la formación de compuestos de $\text{Au}(\text{I})$ con respecto a los ditiocarbamatos.

Una vez formadas las monocapas con los derivados 7α , 7β , 7γ y 8β , se

procedió a su caracterización a través de experimentos de desorción reductiva. Este proceso es inverso a la quimisorción y se puede describir según la ecuación siguiente:



Los experimentos fueron realizados empleando como electrolito soporte una disolución de KOH 0.5 mol/L. Esto tiene como objetivo desplazar la reducción del disolvente a potenciales mucho más negativos que permitan observar la señal de desorción reductiva. En la figura 3.14 se muestran los voltamogramas obtenidos con los electrodos Ag/7 β y Au/8 β .

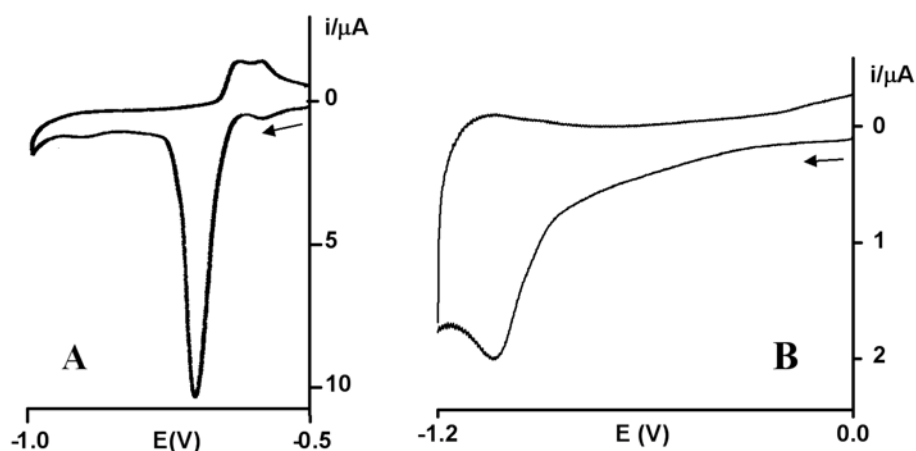


Figura 3.14- Voltamogramas cíclicos de los procesos de desorción reductiva de derivados sulfurados de la β -ciclodextrina, A) electrodo de plata modificado con 7 β . B) electrodo de oro modificado con 8 β . Electrolito soporte: KOH 0.5 mol/L. $v = 50$ mV/s.

El voltamograma de desorción reductiva de 7 β mostró un pico irreversible de reducción muy intenso a un potencial de -0.69 V, correspondiente al proceso de desorción de 7 β de la superficie electródica de plata. También aparecen dos pequeñas señales anódicas a potenciales de -0.58 V y -0.62V, que pueden ser asignadas a la readsorción parcial de 7 β , ya que cuando se registró el voltamograma a potenciales entre 0 y -0.6 V estas señales no aparecieron. En el caso del electrodo de oro modificado con 8 β , el voltamograma mostró un pico irreversible de reducción a -1.03 V que, de igual forma, fue asignado a la desorción reductiva de 8 β de la superficie de oro. Este desplazamiento catódico del pico de desorción de 8 β indica una mayor fortaleza de los enlaces Au-S.

La integración de los picos de desorción reductiva obtenidos permitió el cálculo de la concentración superficial de receptores inmovilizados (Γ), según la metodología descrita en el epígrafe 2.5.5. El grado de recubrimiento superficial (R) de la superficie electródica fue calculado dividiendo los valores de Γ obtenidos por las concentraciones superficiales máximas ($\Gamma_{\max}$), calculadas mediante consideraciones geométricas, según se describe en el epígrafe 2.5.6. Estos resultados se muestran en la tabla 3.1. Como puede verse, el grado de recubrimiento R es máximo para **7 α** lo que pudiera explicarse a partir de su menor diámetro que conlleva a un mejor empaquetamiento en la superficie del electrodo. Como era de esperar los valores de R de Ag/**7 β** y de Au/**8 β** son muy semejantes.

Una de las técnicas más empleadas en la caracterización de monocapas en electrodos es la espectroscopía de impedancia.¹⁰⁶ En esta técnica se le impone al sistema una corriente alterna de frecuencia y fase conocidas y se mide la respuesta de impedancia del electrodo de trabajo a un potencial fijo, que corresponde al potencial redox de una especie utilizada como marcador. Teóricamente, el sistema se trata como un circuito equivalente (figura 3.15 A) formado por una resistencia (la resistencia del solvente, R_{Ω}) en serie con un subcircuito que corresponde a la monocapa y que está formado por una resistencia (la resistencia a la transferencia de carga, R_{tc}) en paralelo con un elemento capacitivo (C_d) cuyo valor es despreciable en los rangos de frecuencia típicamente utilizados (0.1 Hz - 1000 Hz). Como es lógico, mientras más compacta y menos permeable sea la monocapa, mayor será R_{tc} . La forma más común de representar los resultados

Tabla 3.1 Potenciales de desorción reductiva, concentración superficial de receptores y grado de recubrimiento de los electrodos de plata y oro modificados.

Electrodo	$E_{\text{desorción}}$ (V)	Γ (pmol/cm ²) [¶]	R (%) [¶]
Ag/ 7α	-0.72	78 $\pm$ 4	72 $\pm$ 4
Ag/ 7β	-0.69	52 $\pm$ 3	63 $\pm$ 5
Ag/ 7γ	-0.67	42 $\pm$ 3	65 $\pm$ 5
Au/ 8β	-1.03	50 $\pm$ 3	60 $\pm$ 4

[¶] Calculado considerando la formación de 3, 4, 5 y 7 enlaces M-S para **7 α** , **7 β** , **7 γ** y **8 β** , respectivamente

es mediante el gráfico de Nyquist¹⁰⁶ que relaciona las componentes real (Z') e imaginaria ($-Z''$) de

la impedancia y está formado por dos ramas, una semicircular y otra recta (figura 3.15 B).[†] Extrapolando la rama semicircular al eje de las x (Z') se obtiene R_{tc} , valor que usualmente se divide por el área del electrodo para obtener resultados comparables en todos los casos.

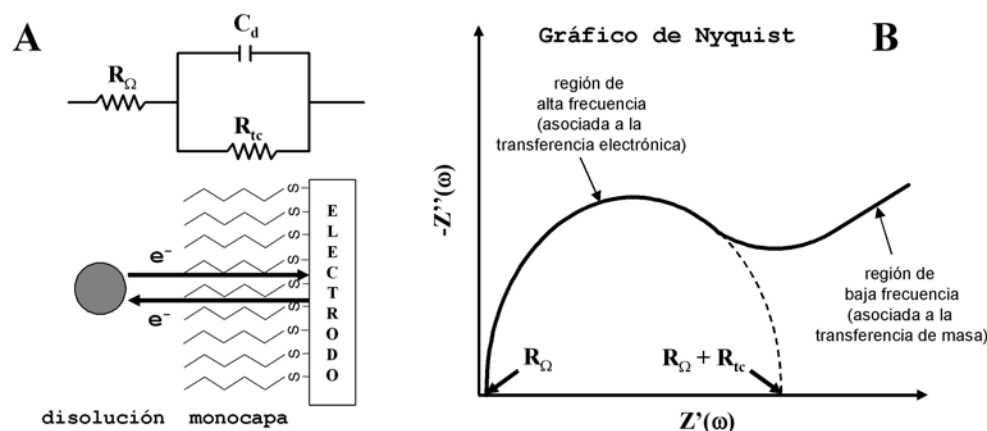


Figura 3.15- (A) Representación del circuito empleado las mediciones de impedancia. (B) Gráfico de Nyquist para la determinación de R_{tc} .

En nuestro caso, se determinaron los valores de R_{tc} para el proceso que involucra el catión $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ en los diferentes electrodos estudiados (figura 3.16). Los valores obtenidos ($9 - 18 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$) se encuentran en el rango de los observados para monocapas de receptores de similar tamaño, aunque son mucho menores que los obtenidos para monocapas compactas de alcanotioles de cadena lineal en oro.⁷⁹ Esto significa que las monocapas que forman los derivados de ciclodextrina estudiados son relativamente permeables, lo cual se explica por la presencia de las cavidades en la superficie del metal que permiten la interacción de especies electroactivas con el electrodo.

[†] Las componentes real (Z') e imaginaria ($-Z''$) de la impedancia representadas en el gráfico de Nyquist provienen de aplicar la ley de Ohm al subcircuito en paralelo representado en la figura 3.15A, considerando que por el mismo circula una corriente alterna de frecuencia conocida (ω). La impedancia de este subcircuito (que es el que está asociado a la transferencia de carga) es la que más información brinda sobre la naturaleza de la monocapa y es predominante a altas frecuencias. La componente capacitiva (C_d) también se puede obtener del gráfico de Nyquist aunque su determinación es más complicada y es poco utilizada con fines interpretativos.

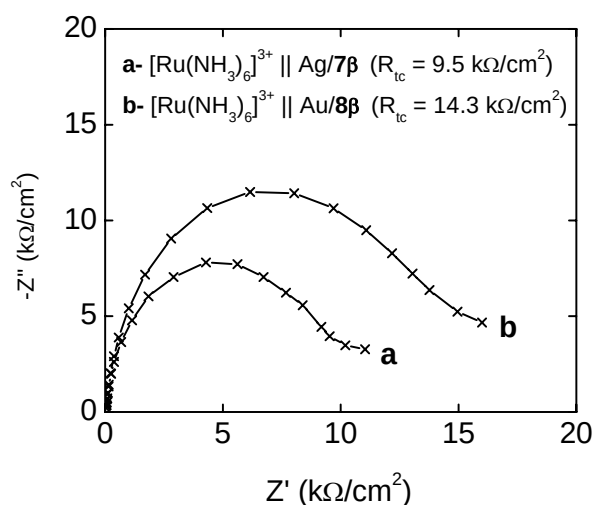


Figura 3.16- Gráficos de Nyquist para los electrodos Ag/7 β y Au/8 β en presencia de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (1 mmol/L en KCl 0.1 mol/L). Rango de frecuencias: 0.1 – 1000 Hz.

Ahora bien, los resultados de los experimentos de desorción reductiva (tabla 3.1) indicaron que sólo entre el 60 y el 72% de la superficie de los electrodos fue recubierta por los receptores de ciclodextrina. Esto significa que la monocapa aún presenta defectos, lo cual ha sido explicado por las débiles interacciones laterales que existen entre los receptores adsorbidos.⁵⁷ Por otra parte, la naturaleza aproximadamente circular en que las ciclodextrinas se adsorben sobre la superficie del electrodo obliga a que queden espacios vacíos en el electrodo, tal y como se representa en la figura 2.2 del epígrafe 2.5.5.

Es por ello que se procedió al sellaje de los espacios vacíos en la superficie del electrodo para, de esa forma, lograr que la interacción de los sustratos estudiados sólo tuviera lugar a través de la cavidad de la ciclodextrina. Para ello se sumergió el electrodo en una mezcla equimolar del agente sellante seleccionado (morfolilditiocarbamato o ácido tióctico) y 1-adamantanol. El 1-adamantanol forma complejos de inclusión muy estables con las ciclodextrinas por lo que tiene la función de “tapar” las cavidades de los receptores inmovilizados, haciendo que el agente sellante sólo interactúe con la superficie no recubierta del electrodo. Se monitoreó la respuesta voltamétrica del complejo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ con los electrodos antes y después de ser tratados con el agente sellante (figura 3.17).

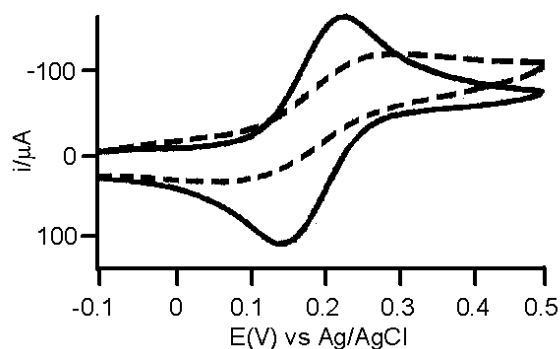


Figura 3.17- Voltamogramas cíclicos del complejo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (0.1 mmol/L) registrados con electrodo de Ag modificado con **7β** antes (—) y después (-----) de ser sellado con morfolilditiocarbamato durante 6 h. Electrolito soporte: Na_2SO_4 0.2 mol/L. $v = 50 \text{ mV/s}$.

Como puede verse en la figura 3.17, la diferencia entre los potenciales de los picos anódico y catódico (ΔE) aumentó y la intensidad de la señal disminuyó para el electrodo luego de ser tratado con el agente sellante. El aumento de ΔE indica que la reversibilidad del proceso disminuye notablemente, mientras que la intensidad disminuye al ser recubiertos los espacios libres del electrodo, lo que restringe la interacción del sustrato con el electrodo. Este experimento corroboró que el proceso de sellaje ocurre de forma efectiva. Similar comportamiento se observó para el resto de los electrodos utilizados.

Es de notar que las monocapas de los derivados estudiados resultaron ser estables durante largos períodos de tiempo (varios meses) si se mantenían protegidos de cualquier contacto con sustancias o microorganismos que pudieran dañar la monocapa de carbohidrato. Esto permitió su uso múltiple en los estudios realizados. Los electrodos modificados, cuando no se usaron, se guardaron en soluciones de acuosas de KCl al 10%.

3.3- Aplicaciones de los electrodos de plata y oro modificados con los derivados **7α**, **7β**, **7γ** y **8β**.

Como hemos visto, la inmovilización de derivados sulfurados de las ciclodextrinas en superficies de plata y oro genera monocapas estables del receptor. Este fenómeno ha sido más estudiado en lo que se refiere al propio proceso de inmovilización que con fines aplicativos. Es por ello que en el presente trabajo decidimos explorar las posibilidades que ofrecen las propiedades de reconocimiento molecular de las ciclodextrinas en el diseño de sensores moleculares o de soportes para la inmovilización de enzimas.

3.3.1- Reconocimiento molecular de nitrocompuestos aromáticos disustituídos con electrodos de plata modificados con **7α**, **7β** y **7γ**.

Las propiedades de reconocimiento molecular de electrodos de plata modificados con **7α**, **7β** y **7γ** fueron estudiadas voltamétricamente empleando tres series de isómeros de

nitrocompuestos aromáticos disustituidos (figura 3.18). Los nitrocompuestos aromáticos experimentan un proceso de reducción del grupo nitro a hidroxilamino a potenciales negativos en medio ácido o neutro (figura 3.19). Además, forman complejos de inclusión con las ciclodextrinas,¹¹⁰ por lo que fueron seleccionadas como sustratos electroactivos para estudiar las propiedades de reconocimiento molecular de las monocapas de ciclodextrinas.

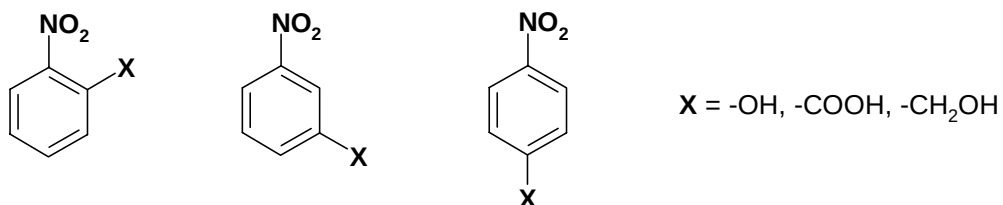


Figura 3.18- Familias de nitrocompuestos aromáticos estudiados.

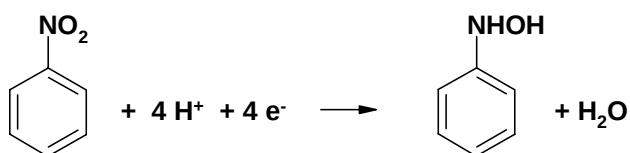


Figura 3.19- Reducción de nitrocompuestos aromáticos a hidroxilaminas.

El estudio voltamétrico se realizó en una celda electroquímica formada por un sistema de tres electrodos. El electrodo indicador fue de plata sin modificar o modificado con los derivados **7α**, **7β** o **7γ**. En la tabla 3.2 se reportan los potenciales de reducción del grupo nitro obtenidos con los electrodos estudiados, mientras que en la figura 3.20 se muestra una selección de los voltamogramas obtenidos.

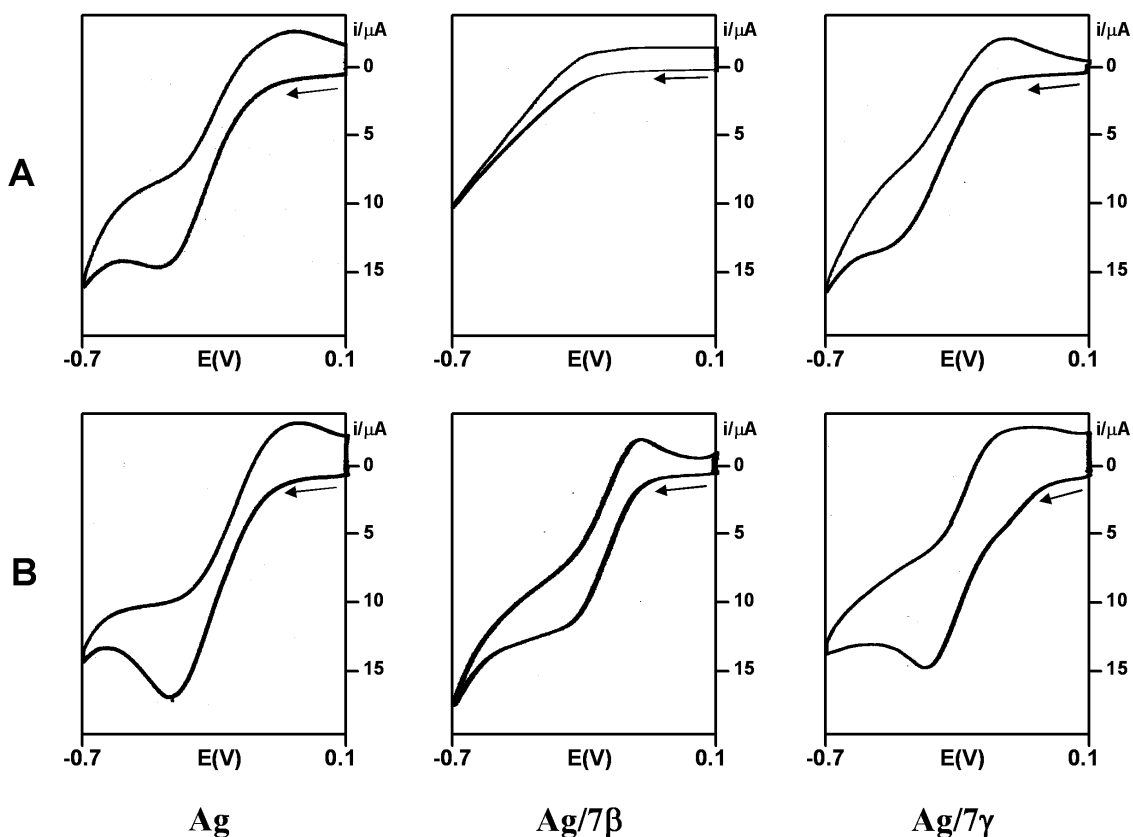


Figura 3.20- Voltamogramas cíclicos obtenidos para el *orto*-nitrobenzoato 10 mmol/L (**A**) y *meta*-nitrobenzoato 10 mmol/L (**B**) en el electrodo de plata sin modificar (izquierda), modificado con **7β** (centro) y con **7γ** (derecha). Electrolito soporte: Na₂SO₄ 0.2 mol/L; $v = 100$ mV/s.

Tabla 3.2- Potenciales (V) de los picos de reducción del grupo nitro en los nitrocompuestos estudiados con diferentes electrodos indicadores.

Electrodo	Nitrobenzoato			Nitrofenol			<i>Nitrobencilalcohol</i>		
	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>
Ag	-0.48	-0.30	-0.44	-0.26	-0.56	-0.26	-0.36	-0.35	-0.34
Ag/ 7α	—*	-0.43	-0.48	—*	-0.58	-0.32	—*	-0.40	-0.39
Ag/ 7β	—*	-0.34	-0.42	—*	-0.57	-0.28	—*	-0.39	-0.36
Ag/ 7γ	-0.51	-0.32	-0.40	-0.30	-0.56	-0.26	-0.39	-0.38	-0.30

* No se observa señal.

Una característica que se obtiene del análisis de los voltamogramas de la figura 3.20 es

que la intensidad de la señal del pico de reducción del grupo nitro en los electrodos modificados decrece en un 20-30% con respecto al electrodo sin modificar. Este resultado es lógico, si se considera que el área del electrodo modificado disminuye como resultado de la quimisorción de los derivados de ciclodextrinas y del agente sellante.

A nuestro juicio, la característica más llamativa de los resultados reportados en la tabla 3.2 y en la figura 3.20 es que los isómeros *orto* de las tres familias de nitrocompuestos aromáticos no dieron señales de reducción del grupo nitro en los electrodos modificados con **7 α** y **7 β** , al menos a potenciales accesibles. Este fenómeno fue observado incluso a concentraciones relativamente altas del sustrato (10 mmol/L). En el caso del electrodo Ag/**7 γ** , los isómeros *orto* sí dieron señales, pero desplazadas a potenciales más negativos. En este caso, el mayor diámetro y volumen de la cavidad de la γ -ciclodextrina hacen que el sustrato se pueda incluir en la cavidad con el grupo nitro orientado hacia la superficie electródica. Estos resultados implican que el electrodo es capaz de detectar o no los isómeros *orto* en dependencia del tipo de ciclodextrina adsorbida, lo que tiene necesariamente que estar relacionado directamente con el diámetro de la cavidad.

En el caso de las restantes familias de isómeros (*meta* y *para*) sí fueron observadas las señales de reducción del grupo nitro en los electrodos modificados con **7 α** , **7 β** , y **7 γ** , aunque con un determinado grado de desplazamiento hacia potenciales picos de reducción más negativos, con respecto al electrodo sin modificar (tabla 3.2). Los isómeros *meta* y *para* pueden incluirse en cualquiera de los receptores y de esta forma, los grupos funcionales nitro quedan orientados hacia la superficie electródica de plata, facilitando el proceso de reducción. En estos casos, fue observado un comportamiento de saturación de la intensidad de la señal a medida que aumentaba la concentración del sustrato, lo cual es indicio del acomplejamiento interfacial del sustrato en las cavidades de la monocapa. Por ende, empleando la isoterma de Langmuir (ver ecuación 2.2), y utilizando la metodología descrita en el epígrafe 2.6.3, fue posible determinar las constantes de equilibrio de los complejos de inclusión (figura 3.21).¹¹⁰

Los valores obtenidos para el *meta*-nitrofenol ($K_{\text{meta}} = 180 \pm 20$ L/mol) y *para*-nitrofenol ($K_{\text{para}} = 140 \pm 20$ L/mol) en el electrodo **7 β** indican que el acomplejamiento es relativamente débil, aunque están en el orden de los reportados en la literatura para la β -ciclodextrina.

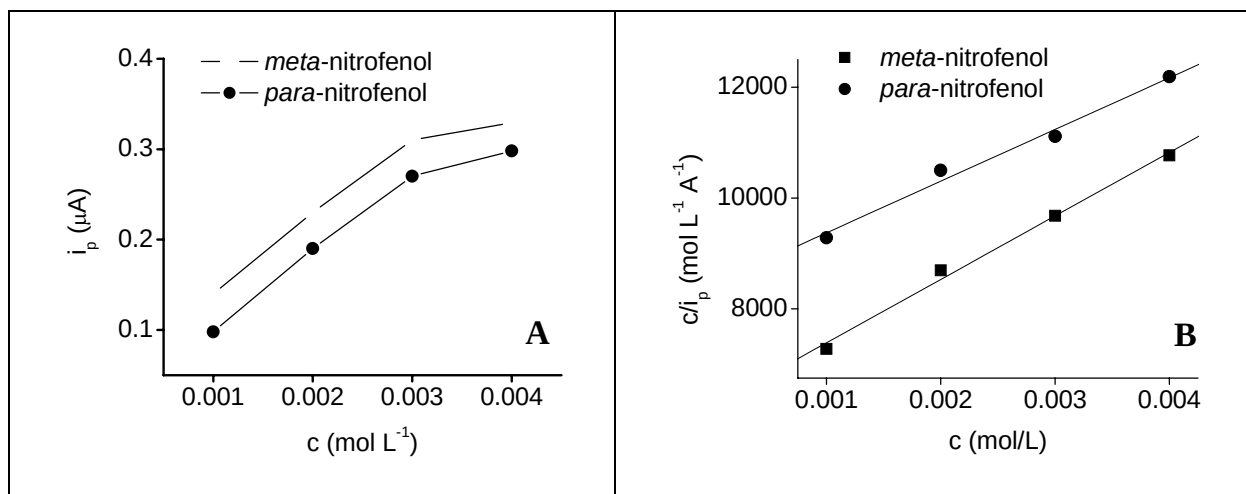


Figura 3.21- Variación de i_p en función de c (A) y gráfico de Langmuir (B) para el acomplejamiento interfacial de *meta*- y *para*-nitrofenol en Ag/7β.

Puede observarse también que, como regla, los potenciales de reducción del grupo nitro son desplazados hacia valores más negativos en el orden $7\alpha > 7\beta > 7\gamma$, lo que sugiere una influencia directa del tamaño de la cavidad en la respuesta electroactiva. El mayor desplazamiento (-0.13 V) fue observado para el *meta*-nitrobenzoato en el electrodo Ag/7α. En general, los nitrofenoles dieron los menores desplazamientos de potencial mientras que los nitrobenzoatos dieron los mayores. Esto pudiera explicarse en función del mayor tamaño y de la carga negativa que porta el grupo carboxilato con respecto al grupo hidroxilo que hacen que su inclusión total sea menos favorable y su reducción más difícil.

Los resultados presentados hasta ahora sugieren que las propiedades de reconocimiento molecular de los electrodos modificados pudieran analizarse, no sólo por la presencia o no de señal, sino también por el grado en que éstas se desplazan con respecto al electrodo sin modificar. En el caso de isómeros *orto*, la estructura geométrica de los complejos de inclusión de estos isómeros, combinada con el relativamente pequeño tamaño de las cavidades de 7α y 7β pueden ser las causas fundamentales de la ausencia de respuesta electroquímica del grupo nitro en el intervalo de potenciales estudiado. En los isómeros *orto* ambos grupos funcionales están muy próximos, lo que hace que sólo puedan incluirse parcialmente en la cavidad de la α- y la β-ciclodextrina a través del anillo aromático. Esto hace que el grupo nitro quede orientado hacia el exterior de la cavidad, muy alejado de la superficie electródica.

Para verificar esta hipótesis, se realizó un estudio computacional de la inclusión de *orto*- y *para*-nitrobenzoato en la cavidad de 7β.

Como 7β es, en realidad, una mezcla de productos de grado de sustitución variable y cercano a 4, primeramente se optimizaron las geometrías de los cinco posibles isómeros de posición de un derivado tetrasustituido ($6^A,6^B,6^C,6^D-$, $6^A,6^B,6^C,6^E-$, $6^A,6^B,6^C,6^F-$, $6^A,6^B,6^D,6^E-$ y $6^A,6^B,6^D,6^F-$), empleando el método semiempírico PM3 (epígrafe 2.7, figura 2.4). El isómero

$6^A, 6^B, 6^D, 6^F$ resultó ser el de menor energía ya que la repulsión electrostática entre los grupos NCSS^- es la mínima posible. La geometría optimizada de este receptor sugiere que los cuatro grupos NCSS^- están situados en un plano casi regular con una cavidad de 7.5 Å de diámetro y 8.2 Å de profundidad (ver Anexo 2).

Posteriormente, se optimizó a nivel PM3 la geometría de los complejos de inclusión de los sustratos *orto*- y *para*-nitrobenzoato en este receptor (figura 3.22). Como puede observarse, el isómero *orto* se incluye sólo parcialmente en la cavidad a través del anillo aromático, con los sustituyentes apuntando hacia fuera del anillo. El átomo de nitrógeno del grupo nitro queda separado 8.5 Å con respecto al plano formado por los grupos NCSS^- . La estructura está estabilizada por un puente de hidrógeno formado entre el grupo carboxilato y un grupo hidroxilo secundario del receptor. Aunque no se realizaron cálculos con receptores de α -CD, es de esperar que un *orto*-derivado esté mucho menos incluido ya que el diámetro de la cavidad es mucho menor que el de la β -CD. En el caso de la γ -CD sí se optimizó la geometría de su complejo de inclusión con el *orto*-nitrobenzoato a nivel PM3, obteniéndose que puede incluirse de diferentes modos con mínimas diferencias de energía. En una de ellas, el sustrato está orientado de forma tal que el eje $\text{N}_{\text{nitro}}\text{-C}_{\text{carboxilato}}$ queda casi paralelo al eje C_8 de la cavidad, haciendo posible de esa forma la interacción del grupo nitro con la superficie electródica.

En contraste, la geometría optimizada obtenida para el complejo de inclusión del *para*-nitrobenzoato (figura 3.22) es 7.6 kcal más estable y sugiere que el grupo nitro se incluye profundamente en la cavidad de la ciclodextrina y que está separado en sólo 2.5 Å del plano que forman los grupos NCSS^- . Adicionalmente, como en el caso del isómero *orto*-, la estructura supramolecular está estabilizada a través de un puente de hidrógeno entre el grupo carboxilato y un grupo hidroxilo secundario del receptor. Como es lógico, el cálculo también predice una orientación inversa del sustrato (con el grupo nitro apuntando hacia la cara secundaria), pero esta geometría es 4 kcal/mol menos estable, lo cual se pudiera atribuir a que la carga negativa del grupo carboxilato presente en el interior de la cavidad desestabiliza el complejo de inclusión.

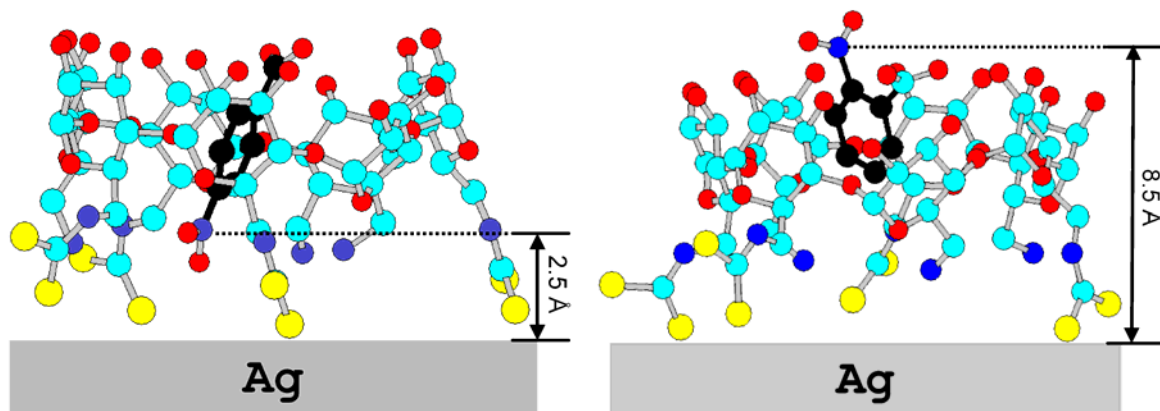


Figura 3.22- Geometrías de mínima energía (PM3) obtenidas para los complejos de

inclusión del *orto*-nitrobenzoato (izquierda) y el *para*-nitrobenzoato (derecha) con el (6^A,6^B,6^D,6^F)- β -ciclodextrin-tetraditiocarbamato. Los átomos de carbono del huésped han sido resaltados en color negro y los átomos de hidrógeno han sido omitidos para ganar en claridad. C: azul claro, O: rojo, N: azul oscuro, S: amarillo

El estudio computacional realizado sugiere que la respuesta electroactiva obtenida para los *orto*- y *para*-isómeros puede explicarse considerando las diferentes geometrías de sus complejos de inclusión. En el primer caso el grupo nitro no puede penetrar en la cavidad de la ciclodextrina, dificultando de esa forma el proceso de transferencia electrónica hacia la superficie electródica.

Hasta donde conocemos, si descontamos el trabajo realizado por Kitano⁸³ con isómeros de posición de derivados del rojo de metilo, este es el único estudio sistemático sobre reconocimiento molecular de isómeros de posición mediante ciclodextrinas inmovilizadas. Como puede verse, el reconocimiento puede modularse variando el tamaño de la ciclodextrina adsorbida, lo cual induce diferentes orientaciones en el sustrato en dependencia de su estructura y la naturaleza de los grupos funcionales que posee.

Estos resultados demuestran, una vez más, que los efectos estéricos en la formación de complejos de inclusión son muy importantes y determinan en gran medida su estabilidad, lo cual puede ser aprovechado para diseñar sensores de reconocimiento molecular. Como veremos en el epígrafe siguiente, los efectos estéricos se pueden complementar con otro tipo de interacción para lograr una mayor selectividad en el dispositivo. La estrategia de dotar a una superficie de propiedades de reconocimiento molecular mediante la adsorción de receptores artificiales debe encontrar importantes aplicaciones en un futuro próximo en el diseño de sensores de nueva generación.

3.3.2- Reconocimiento molecular de dopamina en presencia de ácido ascórbico con un electrodo de oro modificado con 8 β y ácido tióctico.

Como hemos visto, las ciclodextrinas inmovilizadas son capaces de reconocer determinados sustratos en dependencia del diámetro de la cavidad y de la forma en que el sustrato se incluye en la cavidad. En este epígrafe veremos la aplicación de este fenómeno a un problema

práctico: la detección de dopamina (DA) en presencia de ácido ascórbico (AA).

El problema fundamental de la determinación electroquímica de dopamina en presencia de ácido ascórbico viene dado por la similitud de los potenciales de electrodo del proceso de oxidación de ambas especies a pH fisiológico, así como por la reacción que ocurre entre el ácido ascórbico y la dopamina oxidada. (figura 1.20). Por otro lado, el ácido ascórbico está presente en el medio biológico en concentraciones hasta 1000 veces mayores que la de la dopamina por lo que eliminar su interferencia no resulta tarea fácil.

A pH neutro el grupo amino de la dopamina está protonado ($pK_b = 8.87$), mientras que el grupo hidroxilo adyacente al grupo carbonilo en el ácido ascórbico está desprotonado ($pK_a = 4.10$). Este hecho, de por sí, induce un elemento de discriminación que ha sido aprovechado previamente empleando monocapas cargadas, aunque de forma no totalmente satisfactoria.⁹⁰⁻⁹³

La estrategia diseñada en nuestro trabajo para resolver este problema consistió en formar una monocapa mixta compuesta por **8β** y ácido tióctico en una superficie de oro. La presencia de **8β** en la monocapa añade un segundo elemento de discriminación que está dado por las propiedades de reconocimiento molecular que poseen las ciclodextrinas. Se conoce que la dopamina forma complejos de inclusión mucho más fuertes con la β-ciclodextrina que el anión ascorbato a pH 7 ($K_{AA} = 130 \text{ L/mol}$ ¹¹¹, $K_{DA} = 2000 \text{ L/mol}$).⁸⁷ La idea se basa entonces en inducir una doble selectividad en la monocapa basada en interacciones electrostáticas, debidas al grupo COO^- del ácido tióctico, y supramoleculares, aportadas por **8β** (figura 3.23).

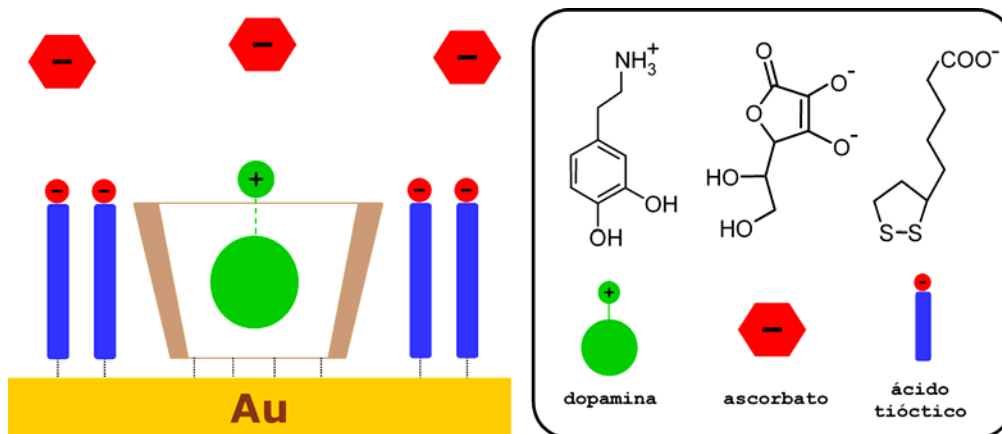


Figura 3.23- Estrategia empleada para la detección simultánea de dopamina en presencia de ácido ascórbico empleando un electrodo doblemente modificado con ciclodextrina y ácido tióctico.

Los electrodos doblemente modificados se prepararon sumergiendo un electrodo de oro en **8β**, seguido de la inmersión en una mezcla de ácido tióctico y 1-adamantanol. Este último tiene la función de sellar las cavidades de ciclodextrina para evitar que el ácido tióctico interactúe a través de ellas, dejándolas inutilizadas. A partir de experimentos de desorción reductiva de la monocapa mixta se obtuvo que la relación molar **8β**:ácido tióctico es de 1:1.7. Esta diferencia se debe a que

las moléculas de ácido tióctico ocupan una superficie menor que las de **8β** obteniéndose, por tanto, una concentración superficial mayor.

En la figura 3.24 se muestran los voltamogramas cíclicos de la dopamina y el ácido ascórbico de concentración 1 mmol/L, así como de una mezcla de ambos, registrados en el electrodo de oro. Puede verse claramente que ambas especies son oxidadas a potenciales muy cercanos ($E_{DA} = +0.25$ V, $E_{AA} = +0.22$ V). La mezcla de ambos muestra un único pico de oxidación a un potencial de +0.23 V, como resultado de la superposición de las señales correspondientes a los procesos oxidativos de la dopamina y del ácido ascórbico. Esto quiere decir que el electrodo de oro sin modificar es incapaz de determinar ambas especies por separado en una mezcla, lo cual concuerda con reportes previos.⁹⁰⁻⁹³

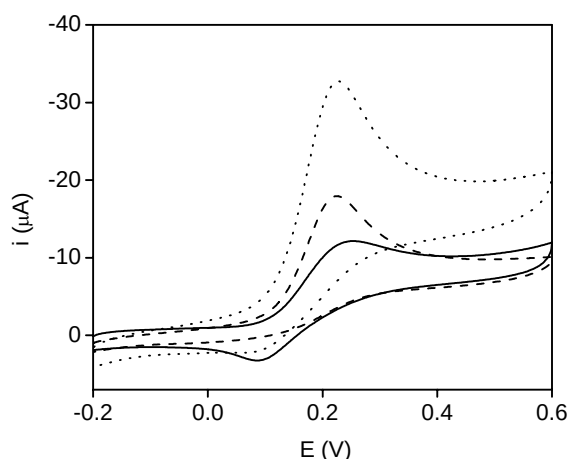


Figura 3.24. Voltamogramas cíclicos obtenidos para la dopamina 1 mmol/L (—), el ácido ascórbico 1 mmol/L (---) y una mezcla equimolar de dopamina y ácido ascórbico 1 mmol/L (.....) en el electrodo sin modificar. Electrolito soporte: KH_2PO_4 (pH 7) 0.1 mol/L. $v = 100$ mV/s.

Posteriormente, se procedió al estudio voltamétrico por separado de DA y AA bajo las mismas condiciones experimentales, con los electrodos Au/**8β** y Au/**8β**+tióctico. Como puede verse en la figura 3.25, en el electrodo Au/**8β** la dopamina presentó una señal cuasireversible a un potencial muy similar al del electrodo sin modificar, aunque su intensidad disminuyó en un 20%.

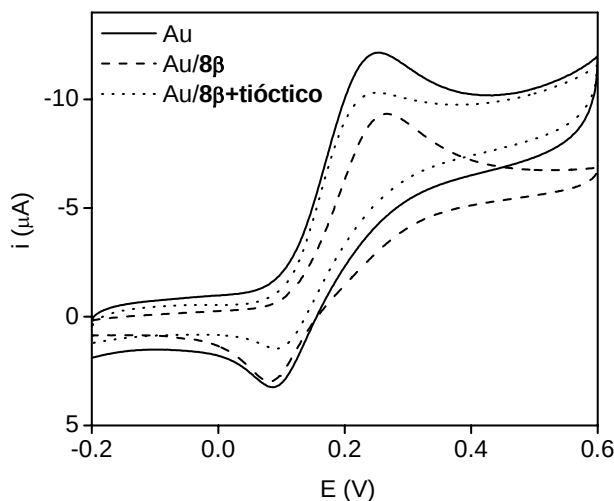


Figura 3.25. Voltamogramas cíclicos obtenidos para la dopamina (1 mmol/L) empleando diferentes electrodos. Electrolito soporte: KH_2PO_4 (pH 7) 0.1 mol/L $v = 100$ mV/s.

Esta observación se puede explicar considerando que la monocapa de 8β ejerce una barrera al proceso electroquímico que hace disminuir la intensidad señal. Sin embargo, la presencia de ácido tióctico en la monocapa provocó que la intensidad de la señal aumentara con respecto a $\text{Au}/8\beta$. Aunque con el incremento de intensidad observado no se llega al valor correspondiente al electrodo sin modificar, resulta un efecto positivo para nuestros intereses. Esto implica que el ácido tióctico facilita la difusión de la dopamina hacia la superficie del electrodo, lo cual se puede explicar considerando la atracción que ejerce el grupo carboxilato sobre el sustrato catiónico.

Ahora bien, como la dopamina sólo puede acceder a la superficie del electrodo a través de las cavidades de las ciclodextrina, resulta lógico pensar que debe formar un compuesto de inclusión con los receptores inmovilizados. Esto se comprobó estudiando la dependencia de la intensidad de la señal con la concentración de dopamina, la cual mostró un comportamiento de saturación de la intensidad de la señal (figura 3.26). Aplicando la isoterma de Langmuir, se obtuvo un valor de la constante de inclusión interfacial de 6400 ± 300 L/mol. Este valor es 3.2 veces mayor que el reportado para el complejo formado entre la dopamina y la βCD nativa⁸⁷ y sugiere que la presencia del ácido tióctico en la monocapa favorece la estabilización de la inclusión, de forma similar a lo observado en la figura 3.24.

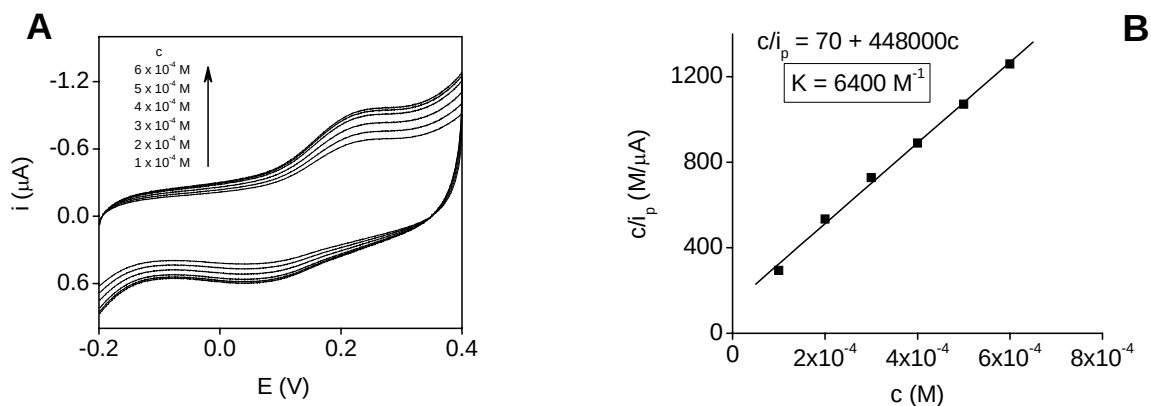


Figura 3.26 (A) Dependencia de la respuesta voltamétrica de la dopamina a diferentes concentraciones obtenida con el electrodo Au/8 β +tióctico. **(B)** Isotherma de Langmuir para la determinación de la constante de inclusión interfacial de la dopamina.

En contraste, cuando se registró la respuesta voltamétrica de una disolución de ácido ascórbico en las mismas condiciones con el electrodo Au/8 β +tióctico se obtuvo que la señal de oxidación prácticamente desapareció (figura 3.27). Esto quiere decir que el electrodo Au/8 β +tióctico no es capaz de reconocer la presencia de ácido ascórbico en la disolución, lo cual se puede explicar por una doble combinación de factores: la baja estabilidad de su complejo de inclusión con la β CD y la repulsión electrostática ejercida por los grupos carboxilato del ácido tióctico.

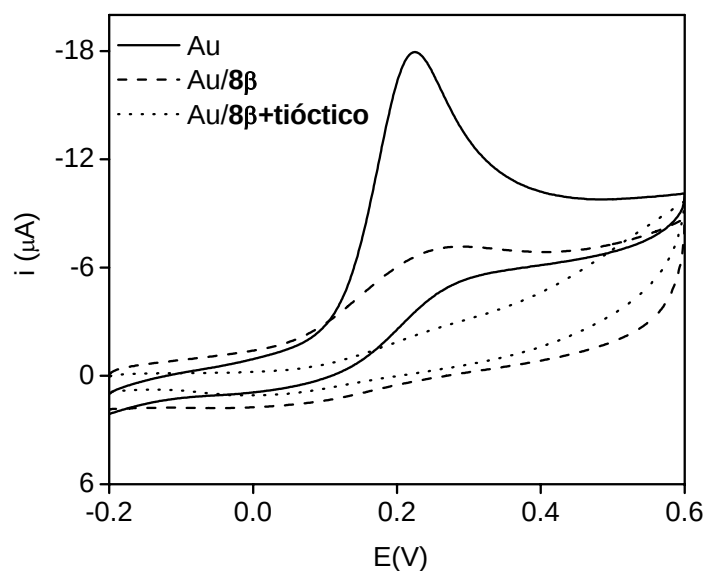


Figura 3.27. Voltamogramas cíclicos obtenidos para el ácido ascórbico (1 mmol/L) empleando diferentes electrodos. Electrolito soporte: KH_2PO_4 (pH 7) 0.1 mol/L. $v = 100$ mV/s.

La variación de la intensidad de la señal con la concentración de ácido ascórbico resultó muy pequeña, lo cual impidió la estimación de la constante de inclusión mediante la isoterma de Langmuir. Esto implica que el acomplejamiento interfacial del ácido ascórbico, de existir, debe ser muy débil. En la figura 3.28 se muestran las geometrías de mínima energía obtenidas para la inclusión de ambos sustratos en **8β**. Como puede observarse, el ácido ascórbico no es capaz de penetrar en la cavidad, si bien por su tamaño le debía ser posible. Esto puede estar relacionado con su alta hidrofiliicidad que hace que sólo pueda interactuar con la superficie externa del receptor.

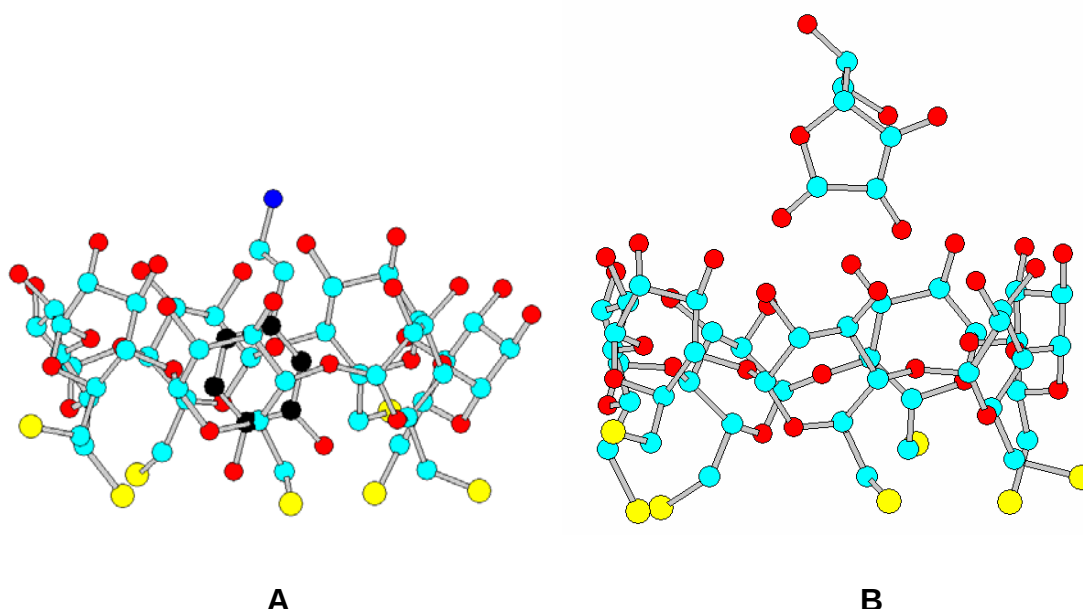


Figura 3.28- Geometrías optimizadas (PM3) obtenidas para los complejos de inclusión de la dopamina (**A**) y el ascorbato (**B**) con **8β** (vista lateral). Los átomos de carbono de la dopamina han sido resaltados en color negro y los átomos de hidrógeno han sido omitidos para ganar en claridad. C: azul claro, O: rojo, N: azul oscuro, S: amarillo.

El factor electrostático que ejerce el ácido tióctico se pudo comprobar registrando el voltamograma del anión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ en las mismas condiciones (figura 3.29). Como puede verse, el valor de ΔE observado (220 mV) indica que la monocapa de **8β** y ácido tióctico obstaculiza notablemente la transferencia electrónica del complejo aniónico. En este caso, sin embargo, la señal no es completamente suprimida, debido probablemente a que en este complejo la transferencia electrónica es mucho más rápida que la asociada a la oxidación del ácido ascórbico.

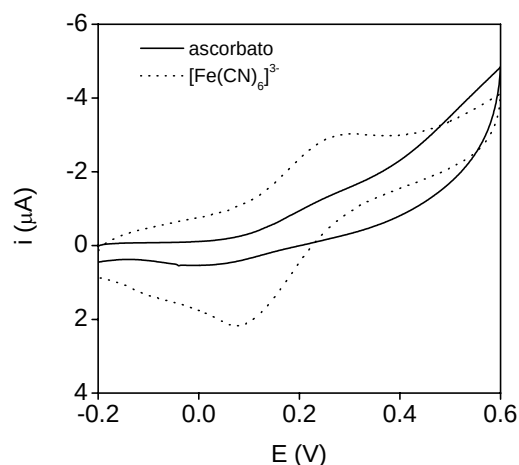


Figura 3.29. Voltamogramas cíclicos obtenidos para el ácido ascórbico (1 mmol/L) y el anión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1 mmol/L) con el electrodo Au/8β+tióctico. Electrolito soporte: KH_2PO_4 (pH 7) 0.1 mol/L. $v = 100 \text{ mV/s}$.

El comportamiento voltamétrico de la dopamina y el ácido ascórbico es concordante con las respuestas de impedancia obtenidas empleando los electrodos modificados (figura 3.30).

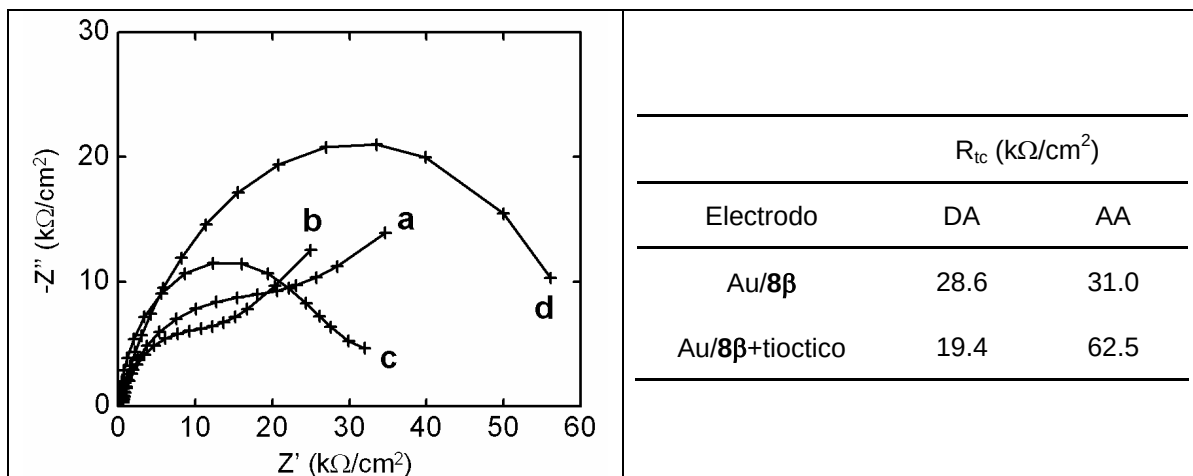


Figura 3.30. Gráficos de Nyquist obtenidos para (a) dopamina (1 mmol/L) con el electrodo de Au/8β; (b) dopamina (1 mmol/L) con el electrodo de Au/8β+tióctico; (c) ácido ascórbico (1 mmol/L) con el electrodo Au/8β; (d) ácido ascórbico (1 mmol/L) con el electrodo Au/8β+tióctico. Electrolito soporte: KH_2PO_4 (pH 7) 0.1 mol/L. Rango de frecuencias: 0.1 – 1000 Hz.

Como puede verse, el electrodo Au/8β+tióctico es capaz de discriminar entre ambas sustancias, a juzgar por los valores de R_{tc} obtenidos. El valor de R_{tc} para la dopamina disminuye cuando el ácido tióctico está presente en la monocapa lo que indica que el proceso de electrodo se

favorece. Lo contrario ocurre para el ácido ascórbico, cuya respuesta de impedancia aumenta 2 veces en el electrodo Au/**8β**+tióctico. El valor obtenido ($62.5 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$) es similar a los observados empleando monocapas compactas de alcanotioles,⁷⁹ lo cual denota que la monocapa mixta ejerce un bloqueo efectivo al la oxidación del ácido ascórbico.

La figura 3.31 muestra los voltamogramas obtenidos para una mezcla equimolar de ambas especies en el electrodo modificado con **8β** y ácido tióctico. Como puede verse, la contribución a la corriente anódica total aportada por el ácido ascórbico es muy pequeña ($\sim 3\%$), si se compara con la respuesta obtenida para la misma mezcla en el electrodo sin modificar (figura 3.24), lo que indica que el electrodo Au/**8β**+tióctico también es capaz de discriminar entre ambas especies cuando están presentes simultáneamente en la disolución. Por otro lado, a señal de reducción de la dopamina no se ve alterada por la

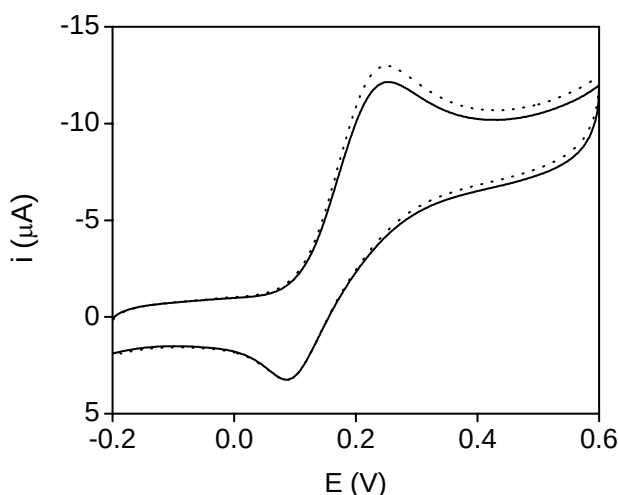


Figura 3.31. Voltamogramas cíclicos obtenidos para la dopamina 1 mmol/LI (—) y una mezcla de dopamina 1 mmol/L y ácido ascórbico 1 mmol/L (.....) en el electrodo modificado con **8β**+tióctico. Electrolito soporte: KH_2PO_4 (pH 7) 0.1 mol/L $v = 100 \text{ mV/s}$

presencia del ácido ascórbico. Esto indica que la posible reacción que pudiera ocurrir entre el ácido ascórbico y la dopamina oxidada no tiene lugar en este caso, probablemente porque ésta última queda protegida dentro de la cavidad impidiendo su interacción con el ácido ascórbico. Evidentemente, este comportamiento resulta muy ventajoso ya que la dopamina no se consume en reacciones colaterales no detectables electroquímicamente.

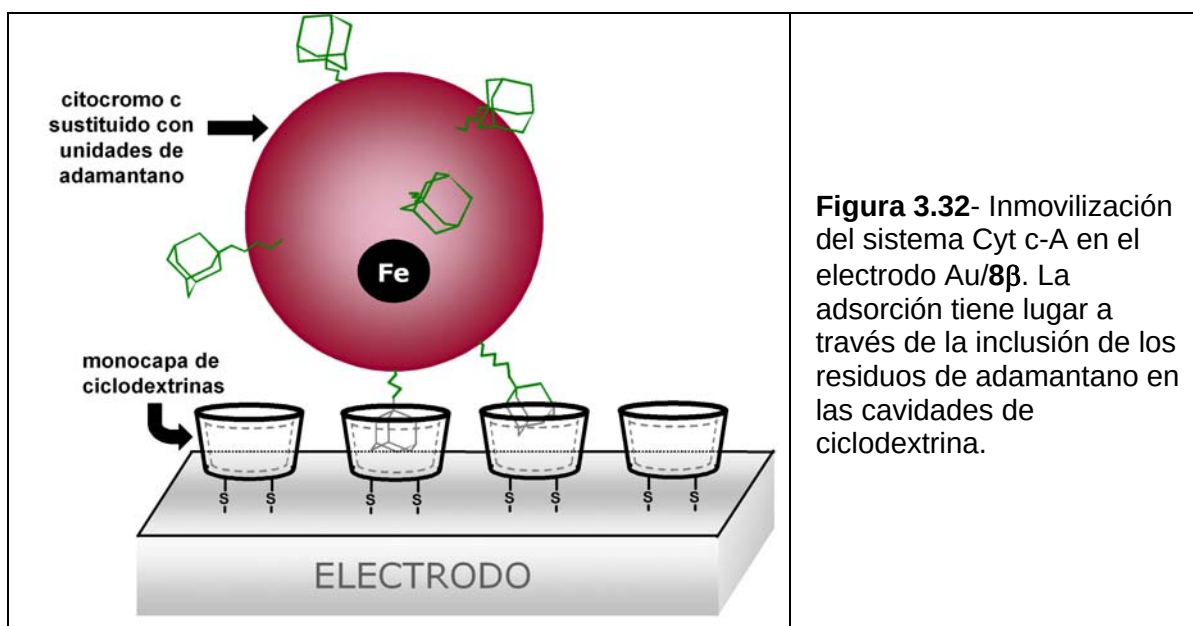
Los resultados presentados aquí indican que el electrodo doblemente modificado es capaz de discriminar efectivamente entre la dopamina y su interferencia más común en sistemas biológicos, el ácido ascórbico. Con los experimentos realizados no fue posible determinar el límite de detección de la dopamina ni la influencia de otras interferencias. Sin embargo, consideramos que esta idea abre interesantes perspectivas en este campo. A diferencia de estrategias

empleadas anteriormente, este método induce una mayor selectividad sobre la dopamina al actuar simultáneamente dos interacciones (una electrostática y otra de inclusión) que tienen un efecto opuesto sobre el sustrato a estudiar respecto a su interferencia.

3.3.3- Inmovilización de citocromo c en un electrodo modificado con 8β mediante interacciones supramoleculares.

Como hemos visto, las ciclodextrinas inmovilizadas en electrodos mantienen sus propiedades de reconocimiento molecular, lo cual nos permitió su uso para diferenciar isómeros de compuestos aromáticos o sustancias de interés biológico. Hemos visto además que las monocapas de distintas sustancias se han empleado para inmovilizar enzimas mediante interacciones electrostáticas o hidrofóbicas. Sin embargo, hasta donde conocemos, los procesos de reconocimiento molecular no han sido empleados para estos propósitos. Esto nos llevó a explorar la posibilidad de utilizar electrodos modificados con ciclodextrinas en la inmovilización de enzimas en su superficie, lo cual pudiera tener interés, por ejemplo, en la construcción de biosensores.

La estrategia consistió en la formación de una estructura supramolecular entre la metaloproteína citocromo c (Cyt c) modificada con unidades de adamantano (Cyt c-A) y el derivado 8β quimiabsorbido en un electrodo de oro (Au/ 8β), a través de la formación de compuestos de inclusión (figura 3.32).



El Cyt c se escogió debido a que sus propiedades electroquímicas se conocen detalladamente y ha sido ampliamente utilizado como modelo en otras estrategias de inmovilización.^{105,112-114} Por otro lado, los derivados del adamantano forman complejos de inclusión muy estables con la β -ciclodextrina, reportándose constantes de equilibrio en el orden de 10^4 L/mol.¹¹⁴

El citocromo c fue modificado con unidades de adamantano a través de los residuos de lisina localizados en la superficie de la proteína. Para ello se trató la proteína con un exceso de 1-adamantanocarboxilato de sodio en presencia de un agente copulante soluble en agua. El grado de sustitución fue determinado a través de la medición del número de residuos de lisina que quedaron sin reaccionar después de la conjugación. El valor obtenido (8.9) implica que el conjugado Cyt c-A contiene alrededor de nueve unidades de adamantano por cada mol de Cyt c, equivalentes a un 47% de sustitución de los residuos de lisina. El espectro UV-Vis del conjugado mostró dos bandas intensas a 409 nm y 527 nm, características del anillo porfirínico. Estas bandas aparecen en posiciones muy similares a las del Cyt c nativo.

Por su parte, el electrodo fue modificado de forma similar a los ejemplos anteriores. En este caso no se sellaron los espacios libres para evitar una disminución en la respuesta voltamétrica de la proteína.

En primer lugar, se estudió la respuesta voltamétrica del Cyt c sin modificar en el electrodo Au/8 β a diferentes intervalos de tiempo (figura 3.33). Como puede observarse, el Cyt c presenta una señal cuasireversible a un potencial de media onda de 0.16 V con una diferencia de potencial ($\Delta E = 120$ mV) que corresponde al proceso redox Fe(II)/Fe(III) del grupo hemo (figura 3.34 A). Esta señal, se deterioró rápida e irreversiblemente con el tiempo, disminuyendo su intensidad y desplazándose el potencial de media onda hacia valores más positivos (figura 3.34 B). A los 10 minutos la señal desapareció (figura 3.34 C), lo que sugirió que la proteína se descompuso en la superficie del electrodo, de modo similar a lo observado por Eddowes en electrodos metálicos sin modificar.¹¹² Sin embargo, en

nuestro caso este proceso es más lento debido a la protección ejercida por la monocapa, como resultado del proceso de quimisorción de **8β**.

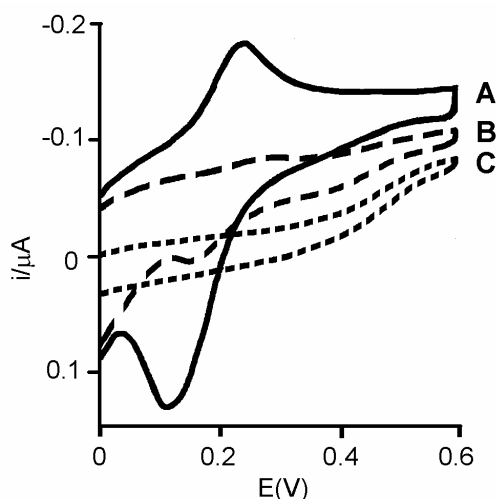


Figura 3.33 Voltamogramas cíclicos de una disolución 0.1 mmol/L de Cyt c registrados con el electrodo Au/**8β** a diferentes tiempos. A) $t = 0$ B) 5 min después; C) 10 min después. Electrolito soporte: KH_2PO_4 0.1 mol/L (pH 7). $v = 50$ mV/s.

Al parecer, la molécula de Cyt c en los primeros momentos no es adsorbida en la superficie electródica como resultado de su interacción con el electrodo de Au/**8β**, ya que la intensidad de los picos redox aumentó linealmente con el aumento de la concentración de Cyt c en el rango de 0.1-0.5 mmol/L. Por otro lado, la intensidad de los picos anódicos y catódicos aumentó linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para similares concentraciones de Cyt c. Este comportamiento es típico de los procesos redox controlados por fenómenos de difusión. La falta de absorción del Cyt c en los primeros momentos de su interacción con la superficie electródica no es sorprendente, ya que la superficie exterior del Cyt c no tiene residuos hidrofóbicos (ej. fenilalanina o tirosina), capaces de interactuar con la cavidad de la ciclodextrina. Sin embargo, al transcurrir el tiempo, el Cyt c puede experimentar interacción, no solamente con la superficie hidrofílica de la ciclodextrina, sino también con la superficie electródica no recubierta.

Posteriormente, se estudió el comportamiento voltamétrico del conjugado Cyt c-A en el electrodo Au/8 β bajo las mismas condiciones, el cual resultó ser muy diferente al del Cyt c nativo (figura 3.34).

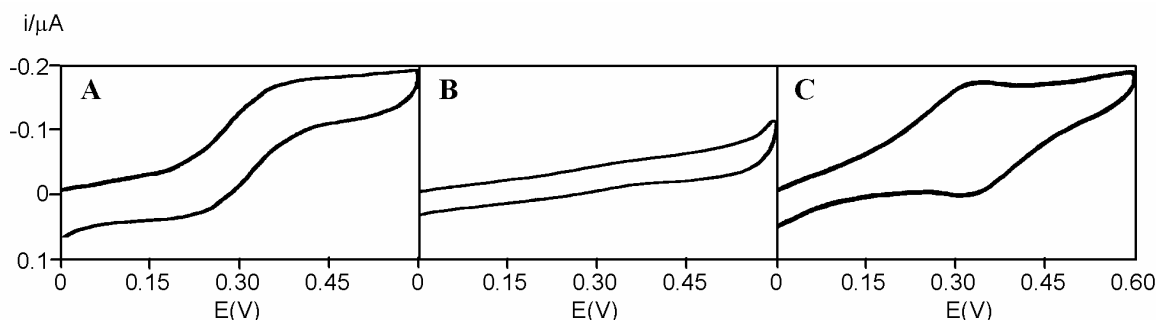


Figura 3.34- (A) Voltamograma cíclico obtenido para el Cyt c-A registrado con el electrodo Au/8 β . (B) *idem* a A pero luego de exposición prolongada a una solución de 1-adamantanol. (C) *idem* a A pero en presencia de un exceso de 4,4'-bipiridilo. Electrolito soporte: KH_2PO_4 0.1 mol/L (pH 7). $v = 50$ mV/s.

Como puede observarse, el conjugado presenta una señal cuasireversible a un potencial de 0.18 V, valor muy cercano al del Cyt c sin modificar, con un $\Delta E = 130$ mV. Esto sugiere que la modificación de la superficie exterior de la proteína con grupos hidrofóbicos no provocó variaciones significativas en la conformación y funcionalidad de la proteína, así como en la esfera de coordinación del hierro (figura 3.34 A). Esta respuesta fue muy reproducible y estable en el tiempo, pudiendo durar hasta una semana si el conjugado se mantiene a 4°C. La intensidad de la señal es independiente de la concentración para $[\text{Cyt c-A}] > 0.1$ mmol/L, lo cual quiere decir que por encima de esta concentración no ocurre más adsorción en el electrodo. Cuando el electrodo Au/8 β se sumergió en una disolución de Cyt c-A por varios minutos, se retiró y lavó con buffer, y se determinó su respuesta voltamétrica, ésta resultó ser idéntica a la del electrodo sumergido en buffer conteniendo 0.1 mmol/L del sistema conjugado. Esto sugiere que la adsorción del conjugado al electrodo es muy fuerte. Este proceso resultó ser además muy rápido, ya que la intensidad de la señal no varió después de 2 minutos de inmersión.

Como era de esperar, en presencia de una disolución saturada de 1-adamantanol (~ 1 mmol/L) la señal correspondiente al Cyt c-A desapareció (figura 3.34 B). Ya hemos planteado que el 1-adamantanol forma complejos de inclusión

muy estables con la β -ciclodextrina¹¹⁵ por lo que, en principio, es capaz de desplazar al conjugado adsorbido al competir por los sitios de anclaje de la proteína en el electrodo. En contraste, este proceso fue muy lento y solamente la señal desapareció después de exponer toda la noche el electrodo modificado a la solución de 1-adamantanol. Esta fue otra evidencia de que el Cyt c-A estaba fuertemente adsorbido en la superficie electródica sin perder sus propiedades electroactivas. La explicación de esta fuerte interacción puede estar dada por la presencia de múltiples unidades de adamantano en la molécula de Cyt c-A que pueden formar múltiples complejos de inclusión con las cavidades de ciclodextrina quimiabsorbida, originándose una interacción multipuntual que debe fortalecer la adsorción de Cyt c-A.

Los resultados anteriormente mencionados permiten considerar que el electrodo está ahora doblemente modificado:

1. Por la monocapa de **8 β** que actúa como soporte.
2. Por la monocapa de Cyt c-A adsorbida a través de interacciones supramoleculares (véase la figura 3.32)

Por integración de la señal catódica (figura 3.34 A) y posterior normalización con el área superficial del electrodo de oro se determinó que la concentración superficial del conjugado Cyt c-A es de $(9.5 \pm 0.8) \text{ pmol/cm}^2$. Este valor es inferior al calculado teóricamente teniendo en cuenta consideraciones geométricas¹¹⁶ (12 pmol/cm^2), lo que indica que la monocapa de Cyt c-A es un tanto imperfecta. Esto puede deberse a la presencia de defectos en la monocapa del soporte de **8 β** y a una reducción en la fortaleza de las interacciones laterales en el conjugado producto de la modificación con grupos hidrofóbicos.

Por otro lado, en presencia de 4,4'-bipiridina (bipy) la señal del Cyt c-A resultó ser mucho más reversible con $\Delta E = 20 \text{ mV}$ (figura 3.34 C). Esto sugiere que la presencia de bipy facilita la transferencia electrónica entre la proteína y el electrodo, lo cual coincide con estudios previos.^{112,113} El valor obtenido de ΔE (20 mV) es típico de una especie electroactiva confinada en una superficie electródica, aunque ligeramente mayor que el valor teórico de 0 mV debido a que los procesos

de inclusión son equilibrios dinámicos.

Evidencia adicional de la adsorción de Cyt c-A sobre el electrodo Au/**8** β se obtuvo del estudio de su interacción con otras especies electroactivas. Las quinonas son compuestos aromáticos que contienen enlaces C=O conjugados, pudiendo reducirse electroquímicamente al correspondiente difenol. En particular, la 1,2-naftoquinona (NQ) tiene la característica adicional de formar complejos de inclusión con las ciclodextrinas, por lo que han sido empleadas como marcadores electroactivos en electrodos modificados con ciclodextrinas.^{80,83,87} En la figura 3.35 se muestran los voltamogramas cíclicos de la NQ en ausencia y en presencia de Cyt c-A. Como puede observarse, el potencial de media onda de NQ y la diferencia de potencial entre los picos de reducción y oxidación se desplazan hacia valores más positivos en presencia del conjugado, mientras que las corrientes anódica y catódica disminuyen ligeramente. Esto es indicativo de la interacción de NQ con el electrodo a través de las cavidades de **8** β . Adicionalmente, se puede observar claramente la señal del Cyt c-A centrada hacia los 0.20 V, lo cual demuestra su presencia en la superficie del electrodo.

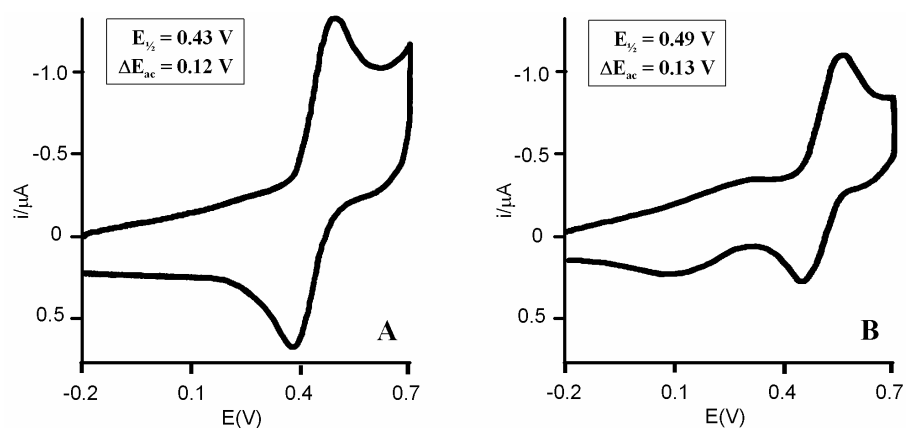


Figura 3.35- Voltamogramas cíclicos de una solución 0.1 mmol/L de NQ en ausencia (A) y en presencia (B) de Cyt c-A. Electrolito soporte: KH₂PO₄ 0.1 mol/L (pH 7). $v = 50$ mV/s.

Finalmente, otra evidencia de la adsorción de Cyt c-A sobre el electrodo Au/**8** β se obtuvo del estudio de su interacción con el complejo [Ru(NH)₆]³⁺. En la figura 3.36 se pueden observar los voltamogramas cíclicos del [Ru(NH)₆]³⁺ en presencia de Cyt c nativo y del sistema Cyt c-A. El complejo [Ru(NH)₆]³⁺ presenta

una señal cuasireversible con $\Delta E = 90$ mV. Este valor es superior los 60 mV obtenidos para el electrodo sin modificar ya que la monocapa de **8 β** ejerce una barrera en el proceso de transferencia electrónica. En presencia del Cyt c nativo ΔE aumenta hasta 180 mV, mientras que para al sistema Cyt c-A alcanza un valor de 280 mV. La intensidad de los picos anódico y catódico también decrece en ambos casos. Esto indica que existe una menor concentración de la especie electroactiva en la interfase electródica que puede ser explicada considerando las interacciones repulsivas entre la carga positiva superficial de la proteína y la carga positiva del $[\text{Ru}(\text{NH})_6]^{3+}$. En este caso, la señal del conjugado no se observa ya que está solapada con la del $[\text{Ru}(\text{NH})_6]^{3+}$ que presenta un potencial muy similar al del Cyt c-A.

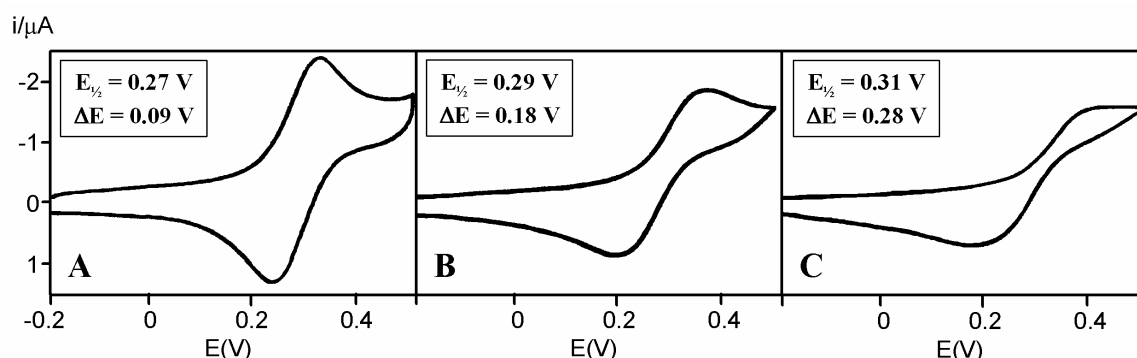


Figura 3.36 Voltamogramas cíclicos de una disolución 10 mmol/L de $[\text{Ru}(\text{NH})_6]^{3+}$ en ausencia (A) y en presencia de Cyt c (B) y Cyt c-A (C). Electrolito soporte: KCl 0.1 mol/L. $v = 100$ mV/s.

Las evidencias aquí mostradas sugieren que los electrodos modificados con ciclodextrinas pudieran ser empleados para inmovilizar enzimas. La novedosa estrategia implica la modificación de la proteína con residuos hidrofóbicos que luego interactúan con una monocapa de receptores previamente inmovilizados en la superficie del electrodo. Como es lógico, la idea se pudiera extender a otras proteínas lo que, en nuestra opinión, abre nuevas perspectivas en el campo de los biosensores. Una ventaja importante del método es la de ser muy poco sensible a cambios de fuerza iónica, que se conoce que afecta grandemente la adsorción de las proteínas. Además, este tipo de inmovilización de naturaleza supramolecular presenta la ventaja de no afectar la actividad de la proteína y es lo suficientemente

estable como para garantizar una durabilidad del dispositivo. Finalmente, y no menos importante, la deposición de la proteína a nivel de una monocapa de espesor conocido y controlable garantizaría la reproducibilidad de la respuesta electroquímica.

CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron cuatro derivados sulfurados de las ciclodextrinas conteniendo grupos ditiocarbamato (**7 α** , **7 β** , **7 γ**) y tiol (**8 β**) a partir de precursores halogenados. Los compuestos obtenidos se caracterizaron mediante diferentes técnicas espectroscópicas: resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas y espectroscopía UV-Vis. Se encontró que los derivados **7 α – γ** son mezclas de productos con diferentes grados de sustitución, cuyos valores son $55 \pm 8\%$, $64 \pm 10\%$ y $59 \pm 9\%$ para **7 α** , **7 β** y **7 γ** , respectivamente.
2. Se comprobó, por diferentes técnicas electroquímicas, la quimisorción de los derivados **7 α** , **7 β** , **7 γ** y **8 β** sobre superficies de plata y oro. Las mediciones de impedancia, desorción reductiva y voltametría cíclica demostraron que estos derivados forman monocapas estables y relativamente permeables en las superficies metálicas. Los receptores inmovilizados cubren entre un 60-72% de la superficie, en dependencia del tipo de ciclodextrina adsorbida. En caso necesario, la superficie no recubierta se selló con un coadsorbato (morfolinditiocarbamato o ácido tióctico).
3. Se estudiaron voltamétricamente tres familias de nitrocompuestos aromáticos disustituidos isómeros (nitrofenoles, nitrobenzoatos y nitrobencilalcoholes) como sustratos en electrodos de plata modificados con **7 α** , **7 β** y **7 γ** . Se encontró que los isómeros *orto* no son reconocidos por los electrodos modificados con **7 α** y **7 β** (no se observa la reducción del grupo nitro). Por su parte, los isómeros *meta* y *para* sí son

reconocidos por los tres electrodos estudiados pero la señal electroquímica está desplazada en diverso grado en dependencia del tipo de ciclodextrina inmovilizada. Estos resultados se interpretaron teniendo en cuenta la posición de los sustituyentes en el sustrato incluido y el tamaño de la cavidad de la ciclodextrina.

4. Se diseñó una novedosa estrategia para la determinación simultánea de dopamina en presencia de ascorbato empleando un electrodo de oro doblemente modificado con **8β** y ácido tióctico. La estrategia combina la mayor selectividad que muestra la β-ciclodextrina por la dopamina con la repulsión electrostática que ejerce el grupo COO^- del ácido tióctico sobre el ascorbato. Por medidas voltamétricas y de impedancia se encontró que la dopamina es detectada selectivamente en presencia de ascorbato y que su constante de inclusión interfacial es 3 veces mayor que la reportada para la β-ciclodextrina en disolución. Estos resultados abren interesantes perspectivas en el campo de la detección de neurotransmisores en medio biológico.
5. Se estudió voltamétricamente el proceso de inmovilización de la metaloproteína citocromo c modificada con residuos de adamantano (Cyt c-A) en un electrodo de oro modificado con **8β** a través de interacciones supramoleculares. Esta novedosa estrategia hace uso de las propiedades de reconocimiento molecular de los receptores de β-ciclodextrina hacia los derivados de adamantano localizados en la superficie de la proteína. Por medidas voltamétricas, se encontró que Cyt c – A forma una monocapa muy estable en el electrodo modificado con **8β** y que su actividad no disminuye ni por la modificación superficial ni por la inmovilización. Esta estrategia es extensible a otras proteínas y presenta varias ventajas lo que, en nuestra opinión, abre nuevas perspectivas en el campo del diseño de novedosos biosensores.

RECOMENDACIONES

1. Estudiar los electrodos modificados con ciclodextrinas en la detección de otras familias de isómeros de sustancias de interés biológico y medioambiental.
2. Estudiar el electrodo modificado con ciclodextrina y ácido tióctico en la identificación de otros neurotransmisores en presencia de otras interferencias, tales como el ácido úrico.
3. Desarrollar métodos analíticos que permitan la determinación cuantitativa de neurotransmisores en presencia de interferencias
4. Extender la estrategia de inmovilización de proteínas mediante interacciones supramoleculares a enzimas de interés aplicativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Lehn, J.-M. *Mundo Científico*, **2**, 21 (1985).
2. Szejtli, J. *Historical Background*, en "Cyclodextrins"; Eds. Szejtli, J., Osa, T.; Pergamon Press: Oxford (1996).
3. Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim (1995).
4. Lehn, J.-M. *Angew. Chem.* **102**, 1347 (1990).
5. Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **27**, 2985 (1894); citada en Wenz, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 803 (1994).
6. Weber, E.; Vogtle, F. *Introduction and Historical Perspective*; en *Molecular Recognition: Receptors For Molecular Guests*; Ed. Vogtle, F.; Pergamon Press: Oxford (1996).
7. Roberts, M. S. *Molecular Recognition-Chemical and Biochemical Problems*; Royal Society of Chemistry: Cambridge (1989).
8. MacGillivray, R. L.; Atwood, L. J. *Adv. Supramol. Chem.* **6**, 157 (2000).
9. Dunits, J. D. *Perspectives in Supramolecular Chemistry. The crystal as a Supramolecular Entity*; Ed. Desiraju, G. R.; Wiley: Chichester (1996).
10. Lehn, J.-M. *Pure Appl. Chem.* **50**, 871 (1978).
11. Brodbelt, S. J.; Liu, C.-C. *Pure Appl. Chem.* **65**, 409 (1993).
12. Lehn, J.-M.; Simón, J.; Wagner, J. *Angew. Chem.* **85**, 621 (1973).
13. (a) Pedersen, C. J. *Angew. Chem.* **100**, 1053 (1988). (b) Pedersen, C. J. *J. Incl. Phenom.* **6**, 337 (1988).
14. (a) Cram, D. J. *Angew. Chem.* **100**, 1041 (1988). (b) Cram, D. J. *J. Incl. Phenom.* **6**, 397 (1988).
15. (a) Lehn, J.-M. *Angew. Chem.* **100**, 91 (1988). (b) Lehn, J.-M. *J. Incl. Phenom.* **6**, 351 (1988).
16. Pulley, A. O.; French, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**, 11 (1961).
17. Szejtli, J. *Chem. Rev.* **98**, 1743 (1998).
18. Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *Modified Cyclodextrins*, Imperial College Press: London (1999).
19. Lindner, K.; Saenger, W. *Carbohydr. Res.*, **99**, 103 (1982).
20. Villiers, A. *Hebd. C. R. Seances. Acad. Sci.* **112**, 536 (1891); citada en: Wenz, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 803 (1994).
21. Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht (1988).
22. Freudenberg, K.; Cramer, F. *Z. Naturforsch.* **3b**, 464 (1948).
23. Szejtli, J. *Cyclodextrins and their Inclusion Compounds*; Akadémiai Kiadó: Budapest

(1988).

24. Gray, Y. J.; Roberts, G. D. *J. Food Technol.* **5**, 231 (1970).
25. Suzuki, Y.; Ito, M.; Osa, T. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1073 (1997).
26. Tabushi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 7100 (1977).
27. VanEtten, L. R.; Sebastian, F. J.; Clowes, A. G.; Bender, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3242 (1967).
28. Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3227 (1978).
29. D'Souza, V. T.; Bender, M. L. *Acc. Chem. Res.* **20**, 146 (1987).
30. Ueno, A.; Kuwabara, T.; Nakamura, A.; Toda, F. *Nature.* **356**, 136 (1992).
31. Kuwabara, T.; Nakamura, A.; Ueno, A.; Toda, F.; *J. Phys.. Chem.* **98**, 6297 (1994).
32. Alm, R. S. *Acta. Chem. Scand.* **6**, 1186 (1952).
33. Wenz, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **33**, 803 (1994).
34. Kondo, H.; Nakatani, H.; Hironi, K. *J. Biochem.* **79**, 393 (1976).
35. Kobayashi, S.; Kainuma, K.; Susuki, S. *Carbohydr. Res.* **61**, 229 (1978).
36. Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **98**, 2045 (1998).
37. Cramer, F.; Saenger, W.; Spatz, H. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 14 (1967).
38. Wood, D.; Hruska, A.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 1735 (1977).
39. Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T. *Chem. Rev.* **98**, 1977 (1998).
40. Jicsinszky, L.; Hashimoto, H.; Fenyvesi, E.; Ueno, A. *Cyclodextrin Derivatives; en Cyclodextrins*; Eds. Szejtli, J; Osa, T.; Pergamon Press: Oxford (1996).
41. Croft, A.; Bartsch, A. R. *Tetrahedron.* **39**, 1417 (1983).
42. Melton, I. D.; Slessor, K. N. *Carbohydr. Res.* **18**, 29 (1971).
43. Zhong, N.; Byun, S. H.; Bittman. *Tetrahedron Lett.* **38**, 2919 (1998).
44. Hamasaki, K.; Ikeda, H.; Nakamura, A.; Ueno, A.; Toda, F.; Susuki, Y.; Osa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5035 (1993).
45. a) Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R. *J. Carbohydr. Chem.* **14**, 1397 (1995); b) Fragoso, A.; Cao, R.; D'Souza, V. T. *J. Carbohydr. Chem.* **16**, 171 (1997).
46. Boger, R. J.; Corcoran, R. J.; Lehn, J.-M. *Helv. Chim. Acta.* **61**, 2190 (1978).
47. Lautsch, W.; Wiechert, R. *Kolloid -Zhem.* **135**, 134 (1954).
48. Takeo, K.; Mitoh, H.; Uemura, K. *Carbohydr. Res.* **187**, 203 (1989)
49. Takeo, K.; Sumimoto, T.; Kuge, T. *Staerke.* **24**, 111 (1974).
50. Gadelle, A.; Defaye, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 78 (1991).

51. Baer, H. H.; Vargas-Berenguel, A.; Shu, Y. Y.; Defaye, J.; Gadelle, A.; Santoyo-González, F. *Carbohydr. Res.* **228**, 307 (1992).
52. Abdul, R. K.; D'Souza, V. T. *J. Org. Chem.* **59**, 7492 (1994).
53. a) Chmurski, K.; Defaye, J. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 7365 (1997); b) Chmurski, K.; Defaye, J. *Supramol. Chem.* **12**, 22 (2000).
54. Baer, H. H.; Vargas-Berenguel, A.; Youn, S.; Defaye, J.; Gadelle, A.; Santoyo-González, F. *Carbohydr. Res.* **228**, 314 (1992).
55. García-Fernández, J. M.; Ortiz-Mellet, C.; Jiménez-Blanco, J.; Fuentes-Mota, J.; Gadelle, A.; Coste-Sarguet, A.; Defaye, J. *Carbohydr. Res.* **268**, 57 (1995).
56. Ashton, R. P.; Koniger, R.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **61**, 903 (1996).
57. Rojas, T. M.; Koniger, R.; Stoddart, J. F.; Kaifer, E. A. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 336 (1995).
58. Ueno, A. *Fluorescent Cyclodextrins for Detecting Organic Compounds with Molecular Recognition*, en *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*; ACS Symposium Series No. 538; Ed. A. W. Czarnik, pp.122-132, (1993)
59. Kuwabara, T.; Nakamura, A.; Ueno, A.; Toda, F.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 689 (1994).
60. Nakashima, N.; Taguchi, T.; Takada, K.; Fuji, K.; Kunitake, M.; Manabe, O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 232 (1991).
61. Hamada, F.; Fukushima, M.; Toda, F.; Ueno, A. *Makromol. Rapid. Commun.* **14**, 287 (1993).
62. Ferancová, A.; Labuda, J. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **370**, 1 (2001).
63. Ferancová, A.; Korgova, E.; Buzinkaiova, T.; Kutner, W.; Stepanek, I.; Labuda, J. *Anal. Chim. Acta*, **447**, 47 (2001).
64. Ferancová, A.; Korgova, E.; Miko, R.; Labuda, J. *J. Electroanal. Chem.* **492**, 74 (2001).
65. D'Souza, T. V.; Hsieh, Y. Y.; Wickman, H.; Kutner, A. *Electroanalysis*. **9**, 1093 (1997).
66. Godinez, L. A.; Lin, J.; Muñoz, M.; Coleman, A. W.; Rubin, S.; Parikh, A.; Zawodzinski, T. A.; Loveday, D.; Ferraris, J. P.; Kaifer, E. A. *Langmuir*. **14**, 137 (1998).
67. Gooding, J. J.; Mearns, F.; Yang, W.; Liu, J. *Electroanalysis*, **15**, 81 (2003).
68. Ulman, A. *Chem. Rev.* **96**, 1533 (1996).
69. Troughton, E. B.; Bain, C.D.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G.; Allara, D. L.; Porter, M. D. *Langmuir*, **4**, 365 (1988).
70. Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films-From Langmuir-Biodget to Self-Assembly*; Academic Press: San Diego (1991).
71. Takehara, K.; Takemura, H.; Ide, Y. *Electrochim. Acta*. **39**, 817 (1994).
72. Mielczarski, J. A.; Yoon, R. H. *Langmuir*, **7**, 101 (1991).
73. Edwards, T. R. G.; Cunnane, V. J.; Parsons, R.; Gani, D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1041 (1989).

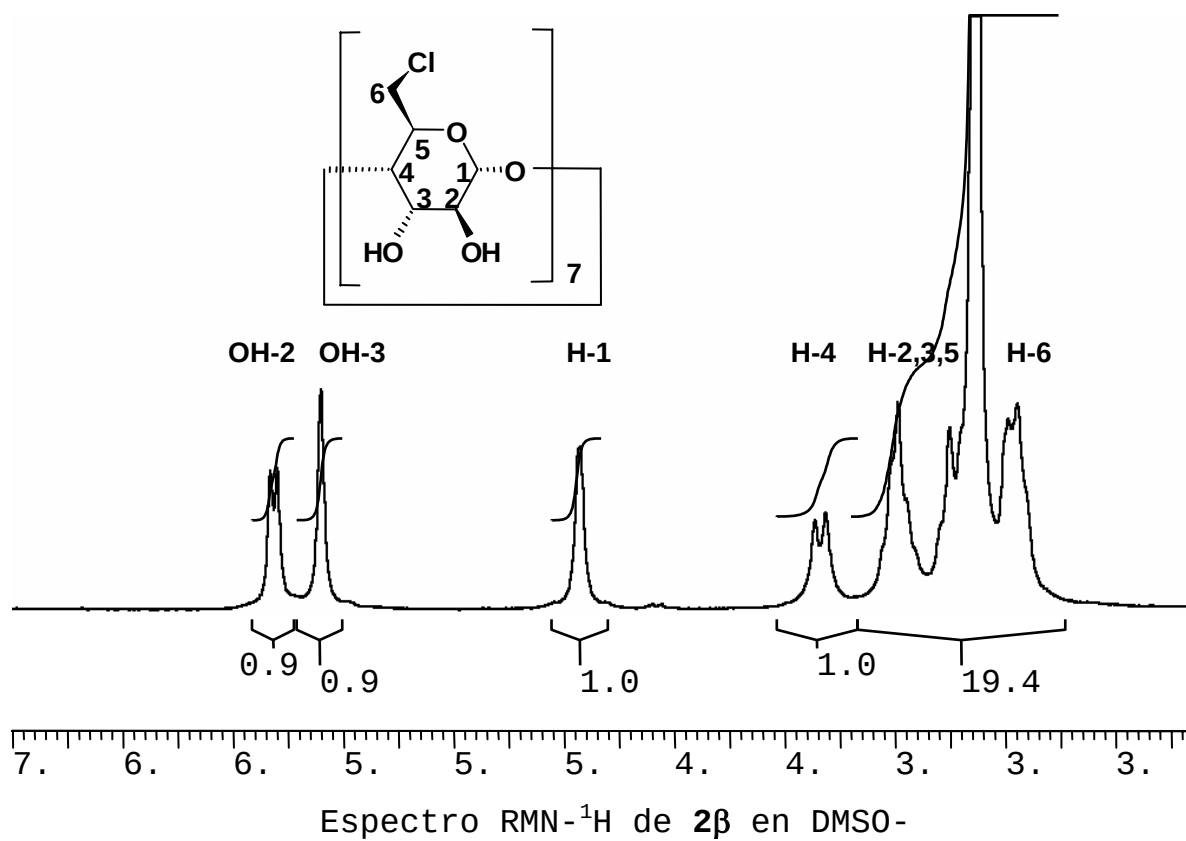
74. Cooper, M -J.; Grenough, K. R.; McNeil, C. J. *J. Electroanal. Chem.* **347**, 267 (1993).
75. Ihs, A.; Liedberg, B. *Langmuir*, **10**, 734 (1994).
76. Shimazu, K.; Sato, Y.; Yagi, Y.; Uosaki, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **67**, 863 (1994)
77. Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9022 (1992).
78. Stratmann, M. *Adv. Mater.*, **2**, 191 (1990).
79. Beulen, M. W. J.; Bugler, J.; DeJong, M. R.; Lammerink, B.; Huskens, J.; Schonherr, H.; Vancso, G. J.; Boukamp, B. A.; Wieder, H.; Offenhauser, A.; Knoll, W.; van Veggel, F. C.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Eur. J.* **6**, 1176 (2000).
80. Weisser, M.; Nelles, G.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S. *Sens. & Actuat. B.* **58**, 38 (1997).
81. Pingang, He.; Jiannong, Ye.; Fang, Y.; Suzuki, Y.; Osa, T. *Anal. Chim. Acta*, **337**, 217 (1997).
82. D'Annibale, A.; Regoli, R.; Sangiorgio, P.; Ferri, T. *Electroanalysis*. **7**, 11 (1999).
83. Maeda, Y.; Fukuda, T.; Yamamoto, H.; Kitano, H. *Langmuir*, **13**, 4187 (1997).
84. Nelles, G.; Weisser, M.; Back, R.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5039 (1996).
85. Nelles, G.; Weisser, M.; Wohlfahrt, P.; Wenz, G.; Mittler-Neher, S. *J. Phys. Chem.* **100**, 17893 (1996).
86. Reinhoudt, D. N.; Geurts, J. A. *Langmuir*. **14**, 6424 (1998).
87. Fukuda, T.; Maeda, Y.; Kitano, H. *Langmuir*, **15**, 1887 (1999).
88. Cantarow, A.; Schepartz, B. *Biochemistry, 2nd Ed.*, Saunders: Philadephia. p.744 (1957).
89. Harrison, A. G. *Chemical Methods in Clinical Medicine, 3rd ed.*, Churchill: London, p.292 (1947).
90. Raj, R. C.; Ohsaka , T. *J. Electrochem. Soc.* **67**, 1175 (1999).
91. Raj, R. C.; Ohsaka, T. *J. Electroanal. Chem.* **496**, 44 (2001).
92. Raj, R. C.; Okajima. T.; Ohsaka , T. *J. Electroanal. Chem.* **543**, 127 (2003).
93. Giz, J. M .; Doung, B.; Tao, J. N. *J. Electroanal. Chem.* **465**, 72 (1999).
94. Malem, F.; Mandler, D. *Anal. Chem.*, **65**, 37 (1993).
95. Roy, P. R.; Okayima, T.; Ohsaka, T. *Bioelectrochemistry*, **589**, 11 (2003).
96. Li, Q. W.; Wang, Y. M.; Luo, G. A. *Mat. Sci. Eng. C.* **11**, 71 (2000).
97. Lacroix, M, P.; Lojou, B. E. *Electroanalysis* **11**, 1068 (1999).
98. Miyazaki, K.; Matsumoto, G.; Yamada, M.; Yasui, S.; Kaneko, H. *Electrochim. Acta.* **44**, 3809 (1999).
99. Ju, H. X.; Ni, J. G.; Gong,Y. H.Y.; Leech, C. D. *Anal. Lett.* **32**, 295 (1999).
100. Popa, E.; Notsu, H.; Miwa,T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *Electrochem. Solid State Lett.* **49**, 2

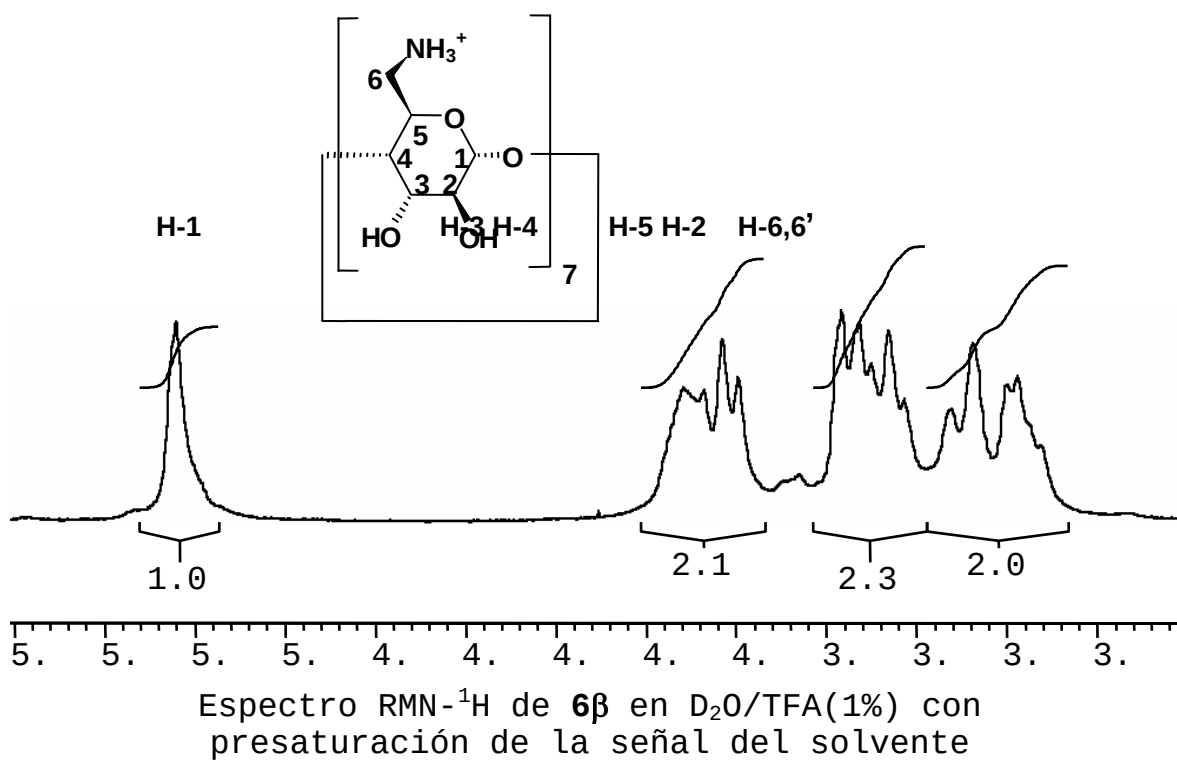
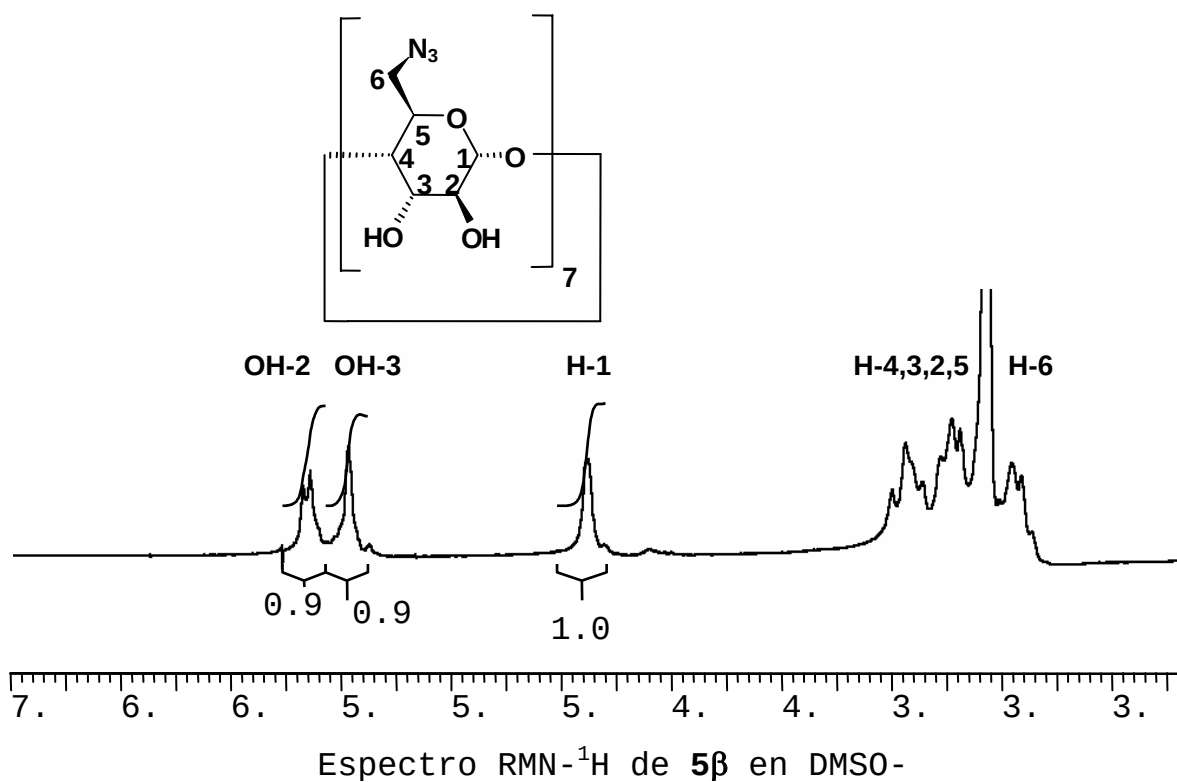
(1999).

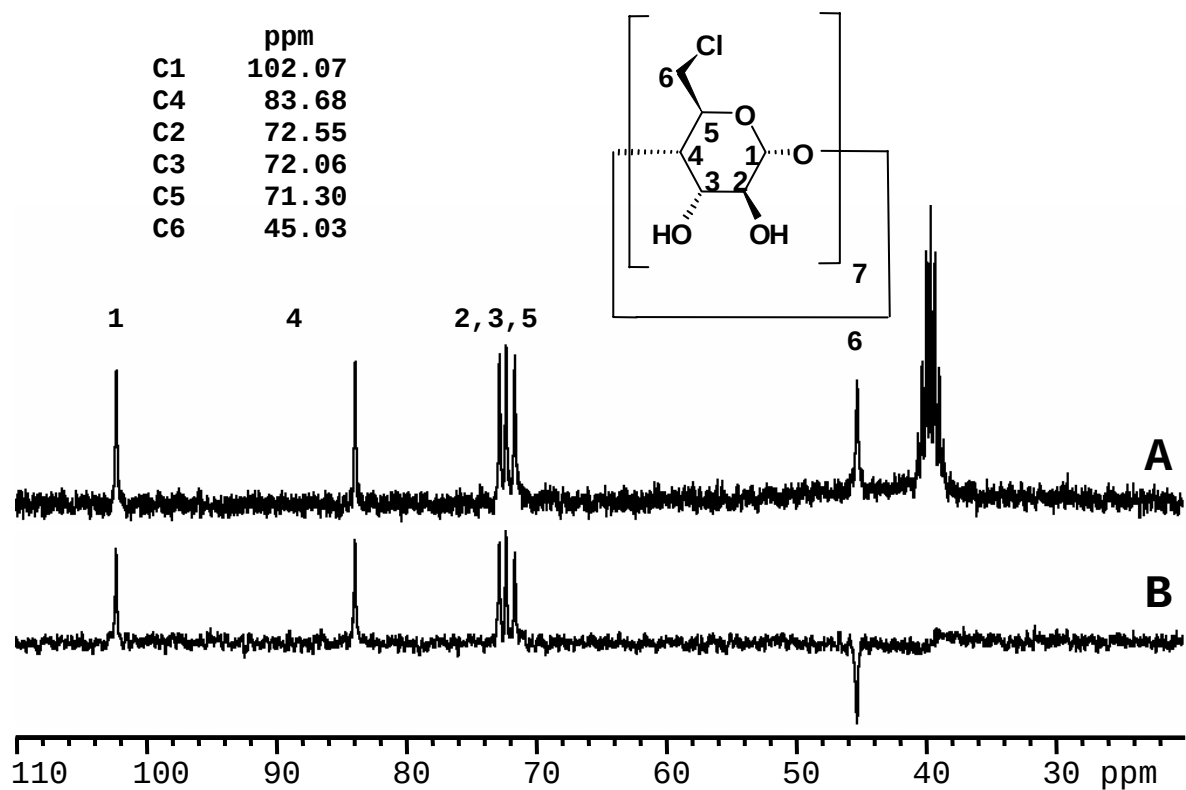
101. Ciszewski, A.; Milczarek, G. *Anal. Chem.* **71**, 1055 (1999).
102. Gao, Z.Q.; Yap, D.; Zhang, K. M. *Anal. Sci.* **14**, 1059 (1998).
103. Armstrong, F. A.; Wilson, G. S. *Electrochim Acta.* **45**, 2623 (2000).
104. Bianco, P. *Rev. Mol. Biotechnol.* **82**, 393 (2002).
105. Son, S.; Clark, R. A.; Bowden, F. E.; Tarlov, J. M. *J. Phys. Chem.* **97**, 6564 (1993).
106. Herranz, M. A; Colonna, B.; Echegoyen, L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **99**, 5040 (2002).
107. Allinger, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 8127 (1977).
108. Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **12**, 320 (1991).
109. Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **10**, 221 (1989).
110. Harata, K. *Bioorg. Chem.* **9**, 530 (1981).
111. Manzanares, M. I.; Solis, V.; de Rossi, R. H. *J. Electroanal. Chem.* **407**, 141 (1996)
112. Eddowes M. J.; Hill, H. A. O. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 771 (1977).
113. Taniguchi, I.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. *J. Electroanal. Chem.* **140**, 187 (1982).
114. Avila, A.; Gregory, B. W.; Niki, K.; Cotton, T. M. *J. Phys. Chem. B.* **104**, 2759 (2000)
115. Cromwell, W. C.; Byström, K.; Eftink, M. R. *J. Phys. Chem.* **89**, 326 (1985).
116. Bushnell, G. W.; Louie, G. V.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* **214**, 585 (1990).

ANEXO 1

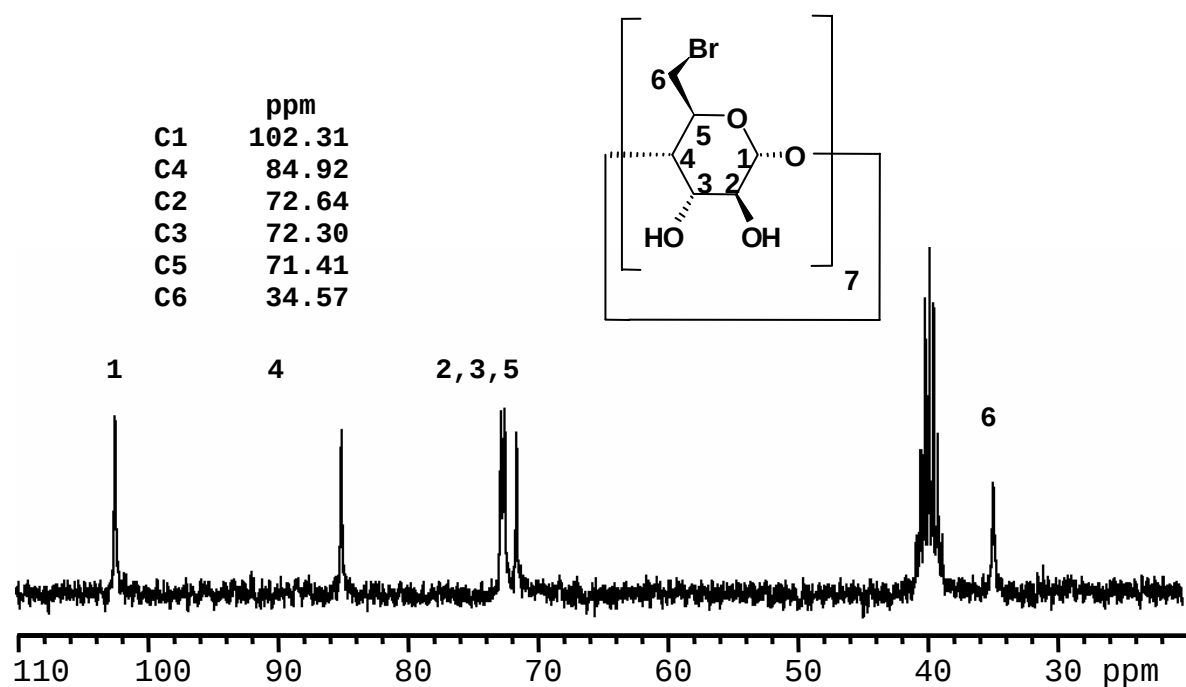
Espectros de RMN- ^1H y de ^{13}C de los principales derivados sintetizados



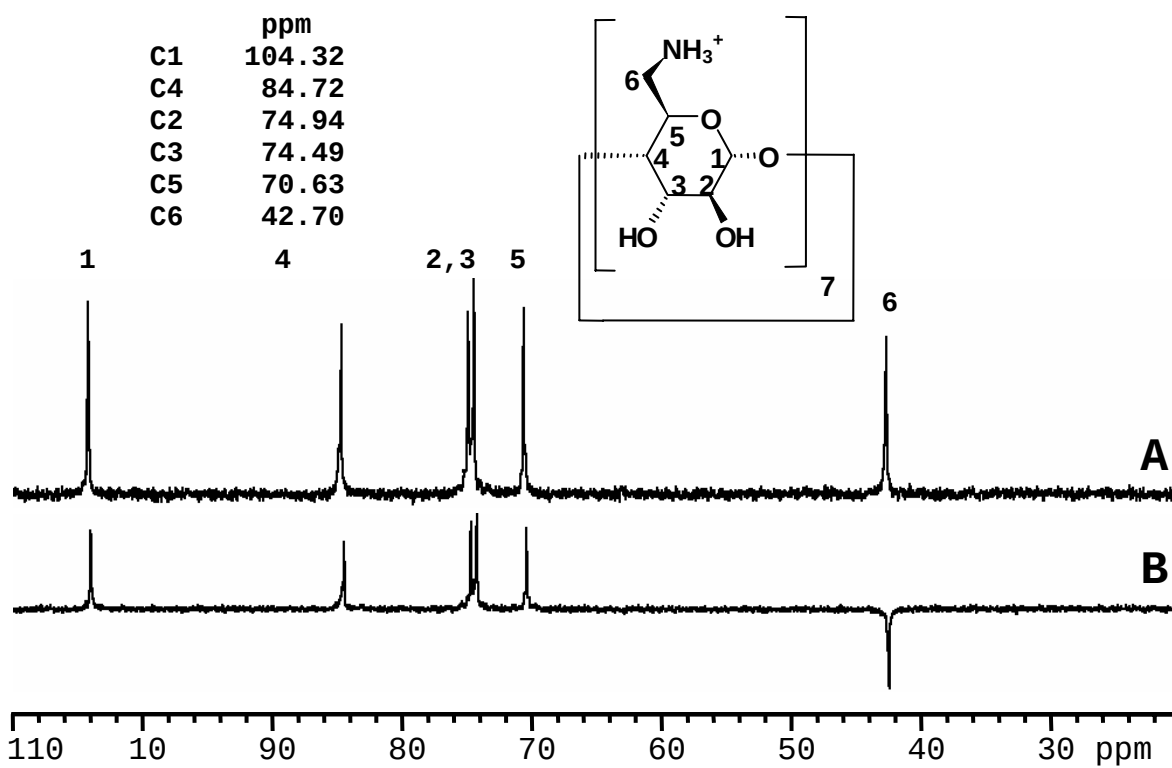
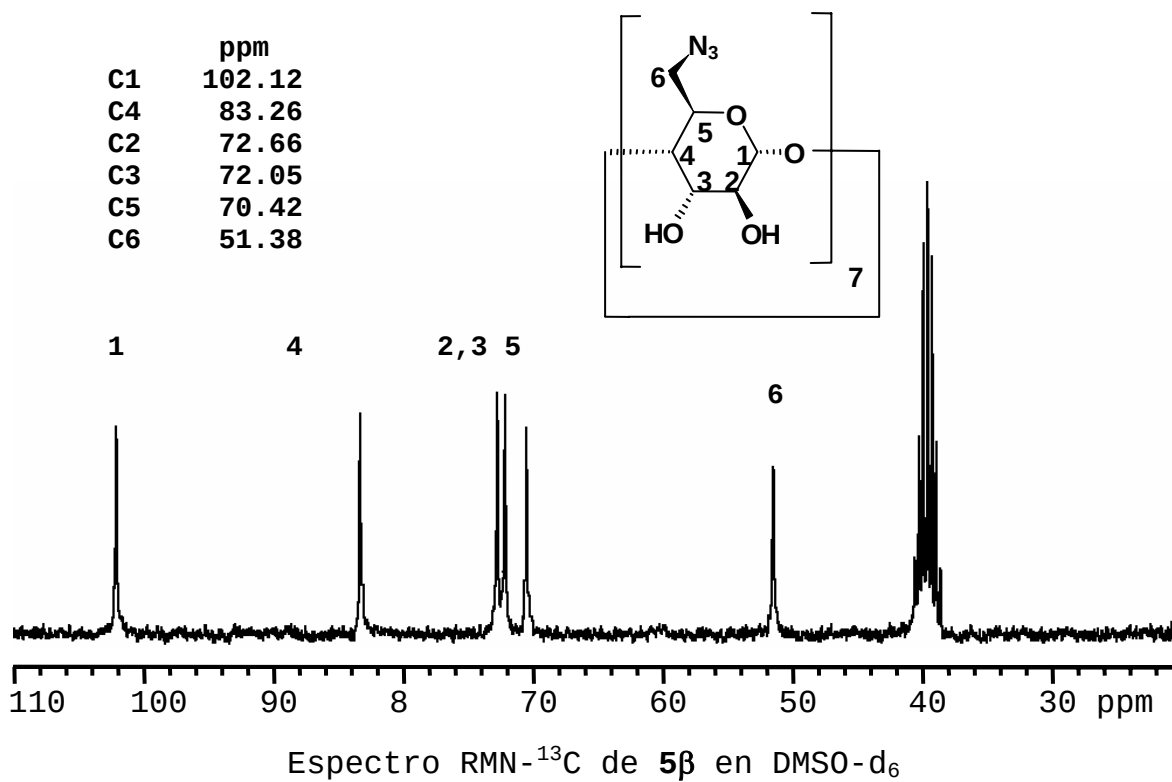


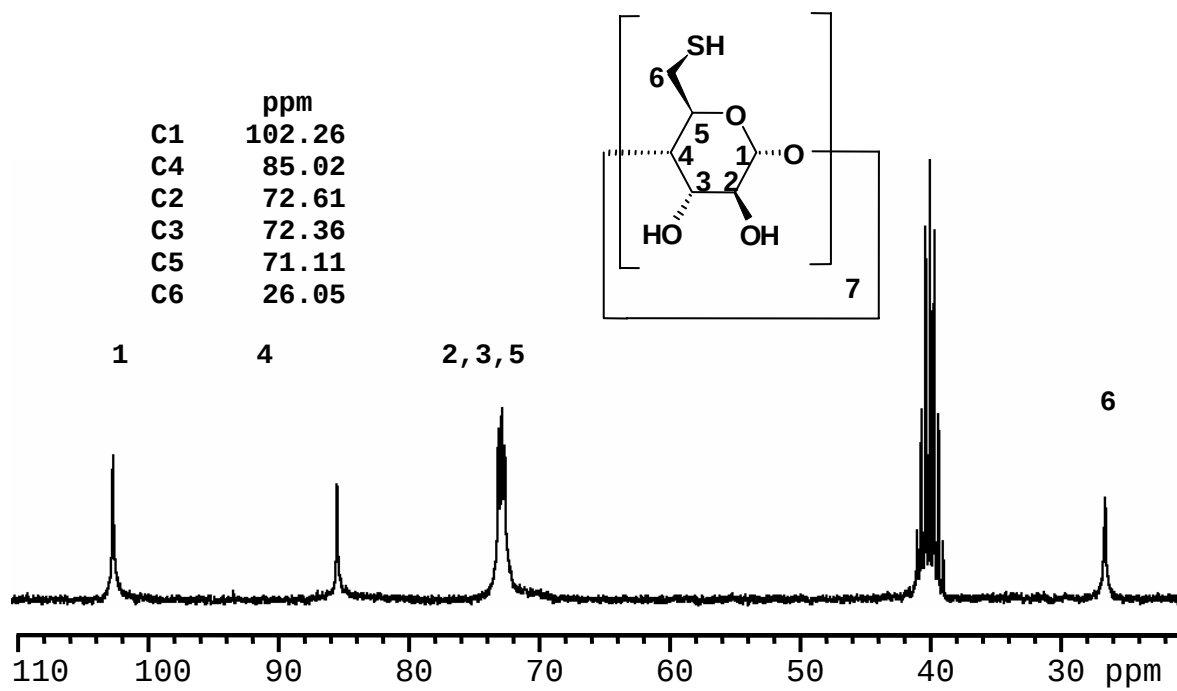


A) Espectro RMN- ^{13}C de 2β en DMSO-d_6 B) DEPT-135



Espectro RMN- ^{13}C de 4β en DMSO-d_6





Espectro RMN- ^{13}C de 8β en DMSO-d_6

ANEXO 2

Geometrías optimizadas (PM3) obtenidas para **7 β** y **8 β**
(los átomos de hidrógeno han sido omitidos para ganar en claridad)

