



Factores que influyen en el comportamiento electroquímico de sustancias de interés médico y farmacológico en electrodos modificados

**Sabino Menolasina*, Anunziata De Santis, Flor Díaz,
Angelys Sánchez, Anfreli Aguilar, Olga Contreras**

Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Departamento de Análisis y Control,
Laboratorio de Análisis Instrumental, Mérida-Venezuela

(* sabino@ula.ve)

Recibido: 06/08/2009

Revisado: 19/01/2010

Aceptado: 05/04/2010

Resumen:

Se prepararon diferentes sensores y biosensores electroquímicos con electrodos de carbón vítreo, oro y platino para estudiar el comportamiento electroquímico de sustancias inorgánicas (iones Cu(II) y iones Zn(II)) y orgánicas (Dopamina (DA) y glucosa). El comportamiento electroquímico de estas sustancias se ve influenciado por diversos factores, tales como: formación de compuestos intermetálicos, efectos difusionales o efectos electrostáticos, dependiendo del tipo de modificación que se haga sobre la superficie electródica del sensor o biosensor electroquímico.

Palabras clave: Dopamina; glucosa; tirosinasa; glucosa oxidasa; laponita; microgeles; biosensor enzimático.

Abstract

Electrochemical sensors and biosensors with glassy carbon, gold and platinum were prepared to study the electrochemical behavior of inorganic (Cu(II) and Zn(II) ions) and organic (dopamine (DA) and glucose) compounds. The electrochemical behavior of these substances is influenced by various factors, including: intermetallic compounds formation, diffusional effects or electrostatic effects, depending on the type of change that takes place on the electrode surface.

Keywords: dopamine; glucose; tyrosinase; glucose oxidase; laponite; microgel; enzyme biosensor.

Introducción

Las reacciones que se llevan a cabo sobre una superficie electródica son procesos heterogéneos cuya cinética depende de la transferencia de masa, la velocidad con que se realiza la transferencia de carga, así como de la velocidad con que se llevan a cabo las reacciones químicas acopladas con transferencia de carga en la interfase electrodo-solución¹. El éxito en el estudio del comportamiento electroquímico de una sustancia electroactiva radica en utilizar el dispositivo electroquímico adecuado asegurándose de que el mismo se encuentre exento de impurezas que puedan afectar dicho comportamiento y que las modificaciones que se hagan sobre su superficie electroda no afecten considerablemente la respuesta electroquímica del analito de interés. Por ejemplo, la respuesta de un biosensor amperométrico puede ser afectada por efectos microambientales de difusión debido a la naturaleza de la matriz sólida que se emplee para soportar el enzima y el transporte de masa que se desarrolla en las cercanías dicho sensor.

El uso de electrodos modificados físicamente o químicamente al azar o por conveniencia puede disminuir la velocidad de transferencia de carga produciendo cambios en la respuesta electroquímica. Estos cambios pueden ser registrados, por ejemplo utilizando técnicas voltamperométricas, tales como, Voltamperometría Cíclica (VC), Voltamperometría de pulso diferencial (VPD) y Voltamperometría de Onda Cuadrada (VOC). El uso de VC ha permitido caracterizar el comportamiento electroquímico de muchas sustancias electroactivas ya que permite conocer sobre la reversibilidad del proceso electroquímico y sobre la estabilidad del analito en los diferentes estados de oxidación en los cuales se puede presentar en el proceso electroquímico, así como los potenciales a los cuales se reduce o se oxida las especies electroactivas que resultan de la oxidación o reducción del analito de interés electroquímico, permitiendo además conocer sobre el estado de limpieza de la superficie electródica, así como, sobre los procesos de adsorción que se pueden originar en dicha superficie¹.

El Zinc y el Cobre son micros nutrientes esenciales, debido a su química particular; cumplen numerosas funciones estructurales y bioquímicas regulando diferentes sistemas biológicos. Su deficiencia genera desde una gran variedad de manifestaciones clínicas inespecíficas leves hasta una disfunción generalizada en los casos más graves, dando lugar a problemas de salud a nivel mundial que afectan tanto a países desarrollados como a aquellos en vías de desarrollo².

La DA es una de esas especies electroactivas de interés médico y farmacológico. La enfermedad de Parkinson es producto de un desorden degenerativo crónico y lentamente progresivo a nivel cerebral, cuyos síntomas incluyen postura rígida, temblor de reposo, lentitud del movimiento voluntario; en esta enfermedad la principal anomalía bioquímica es la deficiencia de DA en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen)². La DA pertenece al grupo de neurotransmisores llamados catecolaminas. Este neurotransmisor se oxida fácilmente y es por esta razón que han sido desarrollados varios métodos electroquímicos basados en la oxidación de la misma, a fin de monitorear su concentración³⁻⁵. Sin embargo la determinación electroquímica de DA es complicada debido a la interferencia de varias sustancias presentes en el medio donde esta se oxida. El ácido ascórbico (AA) es una de esas sustancias que se encuentran presente en grandes concentraciones y se oxida a potenciales cercanos al propio potencial de oxidación de la dopamina^{3,4}. Para incrementar la selectividad en la detección de esta sustancia se han desarrollado muchos métodos relacionados con el pretratamiento y modificación de la superficie del electrodo utilizado como sensor o biosensor⁶⁻¹³. Por ejemplo se han utilizado electrodos de oro modificados con tioles¹¹, electrodos de carbón vítreo modificados con arcillas¹² y electrodos de pasta de carbón modificados con micelas de dodecil sulfato sódico¹³.

Dentro de los electrodos enzimáticos el mayor número de biosensores desarrollados corresponde sin lugar a dudas a los que se basan en la inmovilización de glucosa oxidasa, dada la alta estabilidad de esta enzima y la gran utilidad de estos sensores en el mercado de los análisis de glucosa en sangre¹⁴⁻¹⁹. La glucosa oxidasa no transfiere electrones directamente a electrodos convencionales, debido a que una gruesa capa proteica rodea su centro FAD, hecho bastante común entre las flavoproteínas. Dicha capa introduce una separación espacial en la pareja dador/aceptor de electrones y, por lo tanto, existe una barrera intrínseca a la transferencia de electrones. Por ello, la minimización de esa distancia es crucial para asegurar un funcionamiento óptimo de esta enzima cuando se trabaja con biosensores amperométricos¹⁸.

En el presente trabajo se estudió el comportamiento electroquímico de ciertas sustancias de interés médico y farmacológico tales como, iones Zn(II), Cu(II), DA y glucosa con sensores y biosensores electroquímicos construidos a través de la modificación de electrodos de carbón vítreo, de oro y platino con sustancias inorgánicas y orgánicas.

Parte experimental

Reactivos

La tirosinasa (TIROS) con una actividad de 1530 UI/mg de sólido, la glucosa oxidasa (GO) con una actividad de 5600UI/mg de sólido y el NN'-metilen-bis-acrilamida fueron suministrados por Sigma-Aldrich. La dopamina (DA) y el glutaraldehído (GA), disolución acuosa 25%, el persulfato de amonio (PSA), el Span 80, NNN'-tetrametil-etilen-diamina (TEMED), el dodecano y el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) fueron suministrados por Fluka. La laponita (LAP) fue suministrada por Rockwood Specialities Inc (Princeton, NJ). Las sales de nitrato de Cu(II), Zn (II) y Hg(II) utilizadas fueron de grado analítico (alta pureza) provenientes de la Merck. El ácido 2-N-bencil-1-ciclopenten-di-tiocarboxílico (tiol I) y el ácido 2-N-metil-1-ciclopenten-di-tiocarboxílico (tiol II) fueron sintetizados y suministrados por el laboratorio de Organometálicos de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Venezuela.

La membrana de diálisis (MD) con un corte de peso molecular (MWCO) comprendido entre 12.000 y 14.000 daltons por Spectrum Medical Industries. El agua utilizada fue de calidad Milli Q 18 M Ω (Millipore, Milford, MA, USA).

Todos los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional de purificación.

Soluciones stock de iones Cu(II), Hg(II) y Zn (II) fueron preparadas y estabilizadas con pequeñas cantidades de HNO₃ en agua desionizada de 18M Ω .cm. Soluciones de más baja concentración de estos iones fueron preparadas por dilución de las soluciones stock con agua desionizada de 18M Ω .cm.

Aparatos

Los voltamperogramas se realizaron en un potenciostato galvanostato Autolab PGSTAT12 y una celda de vidrio de un compartimiento y tres electrodos. Electrodos de Ag/AgCl (sat) y de calomel saturado (ECS) fueron utilizados como electrodos de referencias y un alambre de platino como electrodo secundario. Como electrodos de trabajo se utilizaron, electrodos de disco de carbón vítreo (CV), (d = 3mm); platino Pt (d = 3mm) y de oro (Au) (d =

2mm) sin modificación y modificados con diferentes sustancias orgánicas e inorgánicas.

Tratamiento de la celda electroquímica y del material de vidrio utilizado

Todo el material de vidrio utilizado y la celda electroquímica fueron lavados inicialmente con detergente, posteriormente con una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1) durante 10 min. y finalmente con abundante agua desionizada. Este procedimiento se repitió siempre que se sospechara de una posible contaminación del material de vidrio o de la celda.

Síntesis de microgeles de poliacrilamida

La inmovilización de glucosa oxidasa en el interior de los microgeles de poliacrilamida se realizó mediante el método de polimerización desde emulsión concentrada de fase interna acuosa (W/O)²⁰, siendo la fracción máxima de volumen $\Phi = 0,86$. Para asegurarse de que la emulsión sea de fase interna acuosa (W/O) se utilizó el tensoactivo Span 80 (monooleato de sorbitol), con un coeficiente hidrofili-lipofilia (HLB) de 4,3. La fase oleosa la conformo el Span 80, junto con el dodecano y la fase acuosa la conformo una cierta cantidad de disolución reguladora de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0, el monómero (acrilamida), el agente reticulante (NN'-metilen-bis-acrilamida) y el agente iniciador PSA.

Tratamiento de los electrodos de trabajo sin modificar

Los electrodos de carbón vítreo, oro y platino utilizados como electrodos de trabajo se sometieron en primer lugar a un tratamiento químico por inmersión de estos en una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1) durante 10 segundos y luego fueron pulidos con alúmina 0,05 μm usando agua desionizada como lubricante. Posterior a dicha limpieza mecánica, estos electrodos fueron tratados electroquímicamente; el electrodo de carbón vítreo fue ciclado entre -0,20 V hasta 0,60 V vs. Ag/AgCl (sat) en una solución 0,1 M fosfato buffer pH = 6, durante un determinado número de barridos por VC a 200 mV s^{-1} . Mientras que los electrodos de platino y oro fueron ciclados entre -0,20 V hasta 1,50V vs. Ag/Ag Cl (sat) en una solución 0,1M HClO_4 también durante un determinado número de barridos por VC a 200 mV s^{-1} .

Electrodos de trabajo modificados

Una vez que los electrodos de trabajo fueron tratados siguiendo los pasos descritos anteriormente se procedió a realizar las distintas modificaciones de sus superficies con la finalidad de desarrollar los sensores y biosensores electroquímicos utilizados en el presente trabajo.

A) Sensor electroquímico Hg/CV. La electrodeposición de la película de mercurio sobre la superficie de CV

se realizó in situ en la solución electrolítica que contiene los iones metálicos de interés aplicando un potencial de preconcentración de -1,20 V durante 300 s. Bajo estas condiciones experimentales se forma una amalgama del mercurio con el metal que se quiere determinar la cual es homogénea, estable y reproducible.

- B) Sensor electroquímico DTNB/Au. El electrodo de oro se sumerge en una solución saturada de dicho ditiol en cloroformo, durante 15 min, siguiendo el procedimiento descrito por Menolasina *et.al.*¹¹. Luego el electrodo es lavado con cloroformo para remover la cantidad del tiol que se ha adsorbido físicamente en las paredes cercanas al disco de oro
- C) Sensores electroquímico tiol I/Au. El electrodo de oro se sumerge en una solución saturada de dicho tiol en cloroformo, durante 60 min, siguiendo el procedimiento descrito por Menolasina *et.al.*¹¹. Luego el electrodo es lavado con cloroformo para remover la cantidad del tiol que se ha adsorbido físicamente en las paredes cercanas al disco de oro.
- D) Sensores electroquímico tiol II/Au. El electrodo de oro se sumerge en una solución saturada de dicho tiol en cloroformo, durante 10 min, siguiendo el procedimiento descrito por Menolasina *et.al.*²¹. Luego el electrodo es lavado con cloroformo para remover la cantidad del tiol que se ha adsorbido físicamente en las paredes cercanas al disco de oro.
- E) Sensores electroquímico LAP/CV. Se prepara una suspensión de LAP añadiendo 2 mg de LAP en 1 mL de agua desionizada y se depositan aproximadamente 25 μL de dicha suspensión sobre la superficie del electrodo de CV. Se le aplica aire caliente hasta la total evaporación del líquido con la finalidad de formar una fina película de LAP adsorbida sobre la superficie electródica.
- F) Biosensor electroquímico GA/LAP-TIROS/CV. Se prepara una suspensión de 2 mg de LAP en 1 mL de agua desionizada y una disolución de 2 mg de TIROS en 1 mL de solución buffer fosfato 0,1 M, pH = 6, siguiendo el procedimiento descrito por Mousty *et. al.*²². Se procede luego a mezclar 15 μL de cada una de las suspensiones con la finalidad de que la relación sea 1:1. La cantidad resultante de la mezcla se deposita sobre la superficie del electrodo de CV y se deja secar a temperatura ambiente hasta que se forme una película de la mezcla sobre la superficie del electrodo. Luego se coloca dicho electrodo modificado con LAP/TIROS en un recipiente cerrado saturado con GA gaseoso durante 30 min. Este procedimiento se realiza para que se establezcan

enlaces intermoleculares covalentemente con grupos del soporte y del propio enzima, o intramoleculares entre dos grupos de la misma molécula de enzima, reteniendo de esa forma la enzima en dicha matriz.

- G) Biosensor electroquímico de microgeles de MD/PAA-GO/Pt. Sobre la superficie del electrodo de platino se atrapa físicamente una cantidad determinada de microgeles de policrilamida que contienen la enzima glucosa oxidasa a través de una membrana de diálisis la cual es sujeta al electrodo con hilos, asegurándose de que no quede aire atrapado entre el electrodo y la membrana, siguiendo el procedimiento descrito por Hervás Pérez¹⁴.

Resultados y discusión

Efectos de preconcentración

Entre los factores que pueden influir en la detección y cuantificación de sustancia sobre superficies electródicas modificadas esta el modo en que se pre-concentra el analito. Para determinar concentraciones muy bajas de metales, tales como Cu(II) y Zn(II) que son micro nutrientes esenciales se suele emplear técnicas de preconcentración de estas sustancias sobre la superficie de electrodos modificados con películas de metales o compuestos orgánicos. Esta técnica se basa prácticamente en dos etapas, una de preconcentración de la sustancia que se desea analizar sobre la superficie del electrodo de trabajo y otra de redisolución al aplicar un determinado

barrido de potencial ya sea por oxidación o reducción de dicha sustancia u otro compuesto en donde la sustancia se ha preconcentrado formando un complejo. El grado de sensibilidad que se obtiene depende de la señal de excitación que se le aplique al electrodo de trabajo y del tipo de electrodo modificado que se utilice para tal fin.

Comportamiento electroquímico del zinc en un electrodo de Hg/CV. En la figura 1 se muestra la familia de voltamperogramas obtenidos por VPD al aplicar un barrido de potencial en la dirección anódica, una vez que se aplicado un potencial de preconcentración de -1,2 V durante un tiempo determinado a un electrodo de CV en soluciones preparadas al adicionar sucesivamente una solución patrón de Zn(II) a una muestra de líquido seminal previamente pretratada en medio ácido, observándose que el pico de corriente de redisolución anódica a -1,17 V vs. ECS correspondiente a la oxidación de Zn(0) a Zn(II) se incrementa, siendo proporcional al aumento en concentración de Zn(II) en la celda electroquímica. Este comportamiento muestra que el electrodo de CV una vez modificado con una delgada capa de mercurio bajo ciertas condiciones experimentales es bastante sensible a cambios de concentración en iones Zn(II).

La estabilidad y definición de este pico de corriente de redisolución anódica del Zn a Zn(II), depende del pH en la celda electroquímica, así como del potencial, tiempo de electrodeposición aplicado al electrodo de trabajo y de la

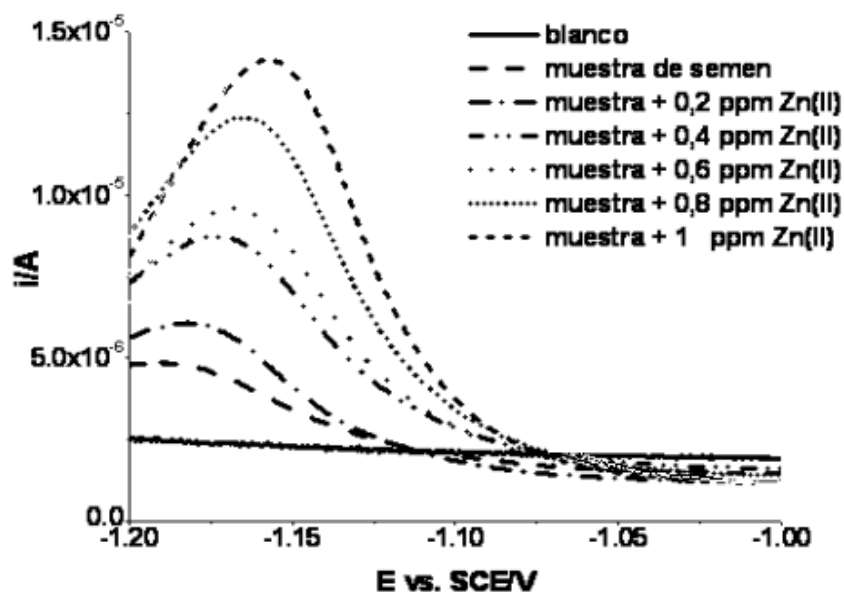


Figura 1: Voltamperogramas obtenidos por VPD de la oxidación de Zn(0) a Zn(II) en una muestra de líquido seminal a la cual se añadieron cantidades determinadas de una solución patrón de Zn(II), utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado electroquímicamente con una película de mercurio.

presencia o no de otros iones metálicos en la solución. La presencia de otros iones metálicos puede originar la formación de compuestos intermetálicos con el analito en la película de mercurio. Este es un factor que puede afectar el comportamiento electroquímico del analito de interés.

La figura 2A muestra el comportamiento del electrodo de CV en una solución que contiene solamente iones Hg(II) y iones Zn(II) en donde el barrido de potencial se ha iniciado en la dirección catódica desde +1,25 V hasta -1,20 V. Durante el barrido catódico entre 0,25 V hasta -0,90 V se observan varios picos, algunos de los cuales se solapan entre sí (B*, C*, D*). Estos picos son atribuidos al proceso de reducción de los iones Zn(II) y Hg(II) sobre la superficie de CV. A potenciales más negativos de -1,20 V se observa un incremento de la corriente el cual es atribuido a la formación de hidrogeno. Al revertirse el barrido de potencial en la dirección anódica desde -1,20 V

hasta +1,25 V se observan los picos A y B. El pico A a -1,10 V corresponde a la oxidación del Zn metálico depositado en la amalgama de mercurio y el pico B a la oxidación del Hg metálico de la película depositada sobre la superficie electrodo.

Cuando en el medio electrolito existe la presencia de iones Cu(II) (figura 2B), no se observa el pico de oxidación de Zn metálico que se observa en la figura 2A y se observa además que cuando el barrido de potencial se invierte en la dirección anódica desde -1,20 V se produce un entrecruzamiento con la respuesta obtenida durante el barrido en la dirección catódica en el voltamperograma, este entrecruzamiento es atribuido a la respuesta de una superficie electrodo distinta a la que se tiene cuando el barrido se realiza en la dirección catódica.

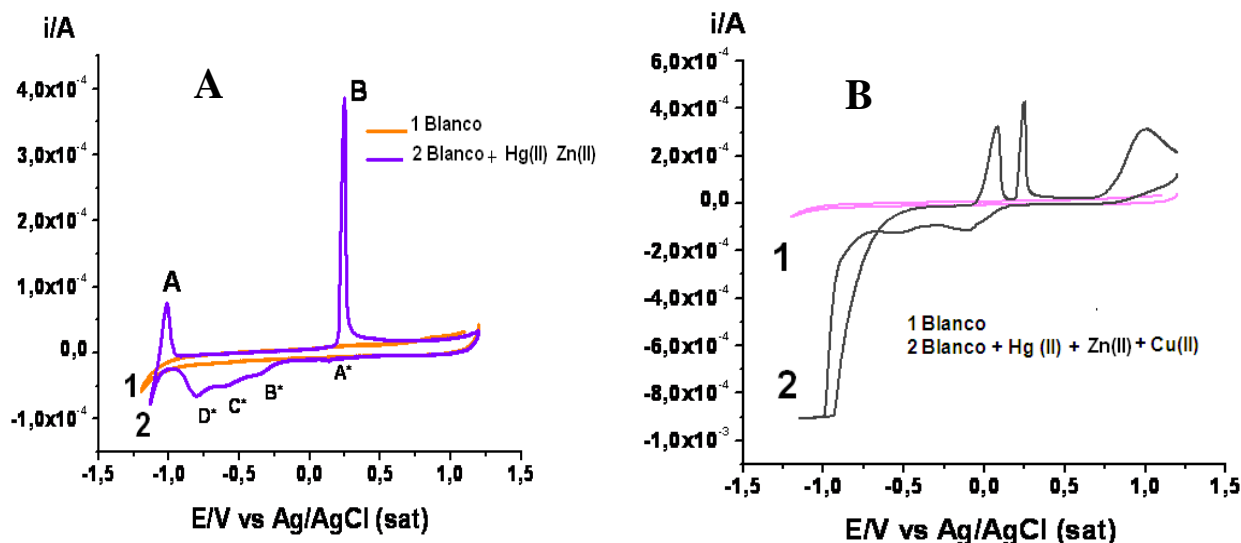


Figura 2: Voltamperogramas cíclicos obtenidos con un electrodo de carbón vítreo en: A) una solución 0,1 M KNO_3 (1=solución blanco) y en una solución 0,1 M $\text{KNO}_3 + 5 \times 10^{-3}$ M $\text{Hg}^{2+} + 1 \times 10^{-3}$ M Zn^{2+} , pH 5,7 (2); B) 0,1 M $\text{KNO}_3 + 5 \times 10^{-3}$ M $\text{Hg}^{2+} + 1 \times 10^{-3}$ M $\text{Zn}^{2+} + 1 \times 10^{-3}$ M Cu^{2+} , pH 5,7 desde 1,2 hasta -1,2 a 200 mV s^{-1}

Esto se debe a la formación de compuestos íter metálicos en la amalgama de mercurio. La formación de estos compuestos íter metálicos constituye una interferencia importante para la determinación de iones Zn(II) o iones Cu(II) debido a que las aleaciones formadas se comportan como un compuesto químico con características particulares y no se redisuelve de igual forma que el metal puro.

Comportamiento electroquímico del zinc en un electrodo de DTNB/Au. La figura 3 muestra la familia de voltamperogramas registrados por VOC en una solución buffer fosfato pH 7,2 libre de iones Zn(II), una vez que el electrodo modificado con el ácido DTNB fue sumergido en una solución acuosa de concentración variable de iones Zn(II) aplicando un potencial de +0,60 V durante 30 s, así

como, la curva de calibración que se obtiene a partir de los valores de i_p vs concentración de iones Zn(II). Se muestra que la corriente del pico de reducción del complejo es proporcional con la concentración de iones Zn(II).

Dado que los iones Zn(II) son adsorbidos y preconcentrados en la monocapa autoensamblada a través de la formación de un complejo metálico en lugar de ser preconcentrados por su deposición al potencial de reducción reversible de Nernst, el potencia de reducción del complejo metálico es más positivo y la corriente de reducción más sensible a la concentración de iones metálicos. Este comportamiento permite la cuantificación de iones Zn(II) en un intervalo de potencial donde el medio electrolítico no se descompone.

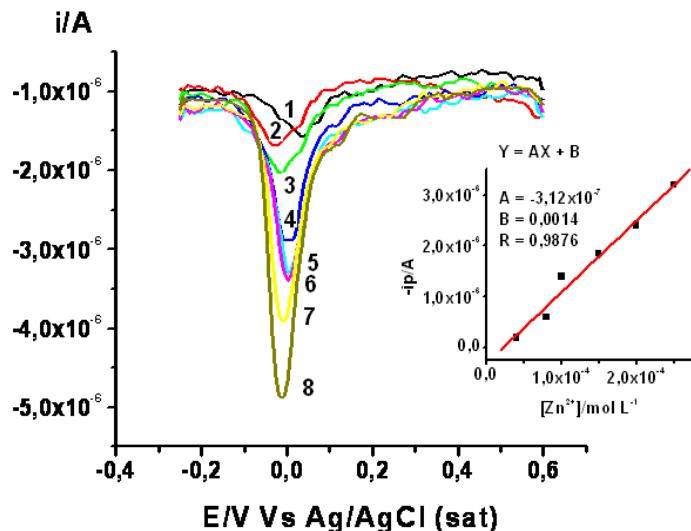


Figura 3: Familia de voltamperogramas obtenido por VOC en solución buffer fosfato (solución blanco = SB) libre de iones Zn(II) pH 7,2 después de haber colocado el electrodo de oro modificado con DTNB en: 1) SB; 2) SB + 4×10^{-5} M Zn(II); 3) SB + 8×10^{-5} M Zn(II); 4) SB + 10×10^{-5} M Zn(II); 5) SB + 12×10^{-5} M Zn(II); 6) SB + 15×10^{-5} M Zn(II); 7) SB + 20×10^{-5} M Zn(II); 8) SB + 25×10^{-5} M Zn(II), durante 30 s aplicando un potencial de +0,6V.

Efectos electrostáticos

Otro factor que puede influenciar el comportamiento electroquímico de sustancias de interés médico y farmacológico cuando se emplean electrodos modificados son las fuerzas de atracción o repulsión que se desarrollan entre la superficie electródica modificada y la sustancia electroactiva de interés (factor electrostático).

Comportamiento electroquímico del cobre en un electrodo de tiol I/Au. Cuando el electrodo de oro modificado con el tiol I se sumerge en una solución reguladora + Cu (II) a pH = 4,2 ó 7,2, durante un determinado tiempo a circuito abierto y luego es utilizado en una solución blanco donde se le aplica primero un potencial de -0,25 V durante un determinado tiempo y luego un barrido de potencial en la dirección anódica por VOC, no se observa ningún pico de oxidación del metal. Estos resultados indican que en el electrodo modificado no se pueden preconcentrar los iones Cu(II) a circuito abierto a través de las interacciones de los grupos funcionales presentes en el tiol con los iones metálicos. En cambio, cuando dicho electrodo modificado se introduce en una solución reguladora + Cu(II) de concentración variable a pH = 4,2 ó 7,2, y se le aplica un potencial de -0,25 V durante un determinado tiempo y luego se coloca en una solución blanco y se realiza un barrido de potencial en la dirección anódica, se observa el comportamiento descrito en las figuras 4A, 4B, 5A y 5B.

A pH = 4,2 (figuras 4A) se observa que el pico de oxidación del cobre depositado a potenciales más negativos que E_{red}^0 comienza a definirse y hacerse proporcional a la concentración de iones Cu (II) cuando la misma es $> 1,5 \times 10^{-4}$ M y $< 4,8 \times 10^{-4}$ M (figura 4b). El limite de detección (LD) obtenido fue de 140 μ M para Cu (II).

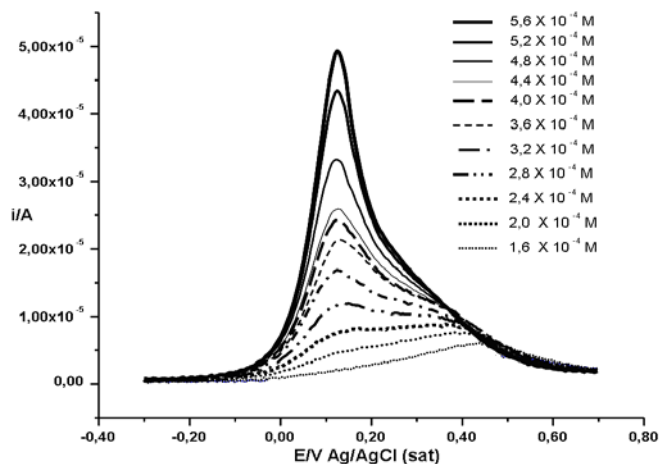


Figura 4A: Familia de voltamperogramas obtenidos por VOCDA en una solución reguladora acético/acetato (pH = 4,2) con un electrodo de oro modificado después de su inmersión en solución reguladora acético/acetato (pH = 4,2) de concentración variable en iones Cu(II) y aplicación de un potencial de -0,25 V durante un tiempo determinado.

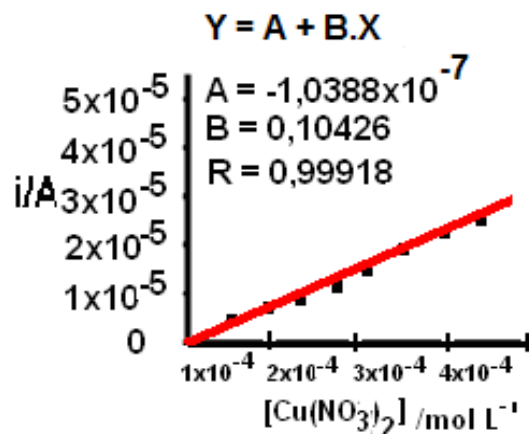


Figura 4B: Curva de calibración con los datos obtenido en de i_p vs concentración de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ de la figura 4A.

A pH = 7,2 (figura 5A) se observa que el pico de la redisolución de la monocapa de cobre a potenciales menos positivos que E_{red}^0 comienza a definirse y hacerse proporcional a la concentración de iones Cu(II) cuando la

misma es $\geq 1 \times 10^{-5}$ M y $< 6 \times 10^{-5}$ M (figura 5B). El LD fue de $8 \mu\text{M}$ para Cu(II).

Estos resultados muestran que la transferencia electrónica sobre el sensor electroquímico tiol I/Au no es bloqueada completamente y se ve afectada por la naturaleza de la carga de las especies redox y por la carga parcial que se origina en la monocapa autoensamblada del tiol en función del pH de la solución de acuerdo a los resultados obtenidos por Menolasina *et.al.*²¹ en 2009.

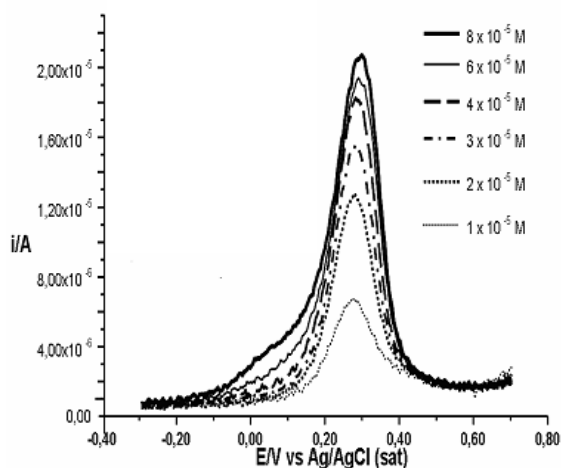


Figura 5A: Familia de voltamperogramas obtenidos por VOCDA en una solución reguladora acético/acetato (pH = 7,2) con un electrodo de oro modificado después de su inmersión en solución reguladora acético/acetato (pH = 7,2) de concentración variable en iones Cu(II) y aplicación de un potencial de -0,25 V durante un tiempo determinado.

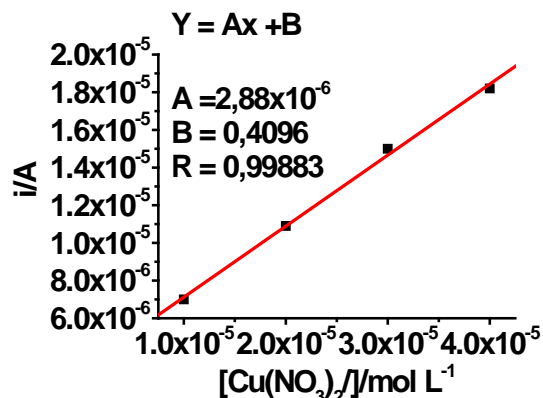


Figura 5B: Curva de calibración con los datos obtenidos en de i_p vs concentración de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ de la figura 5A.

Comportamiento electroquímico de la DA en un electrodo de tiol II/Au. En la figura 6 se muestra el comportamiento de la oxidación de DA en presencia de AA cuando se utiliza, un electrodo de oro modificado químicamente con una película de ácido 2-N-metil-1-ciclopenten-1-ditiocarboxílico (tiol II/Au). Se observó que la señal de oxidación de DA en el tiol/Au se ha desplazado 0,28 V y la de AA 0,15 V hacia valores más positivos con respecto a las señales de oxidación de estos compuestos en el electrodo de oro sin modificar. Este comportamiento sugiere que la monocapa adsorbida del tiol II, actúa como una barrera para la oxidación de DA en mayor proporción con respecto a la oxidación del AA. A pH 5,1 la DA se encuentra en su forma catiónica y el AA en su forma aniónica, lo que implica que el efecto de bloqueo para la oxidación de DA es más pronunciado debido a que al pH de la solución buffer la monocapa adsorbida está cargada

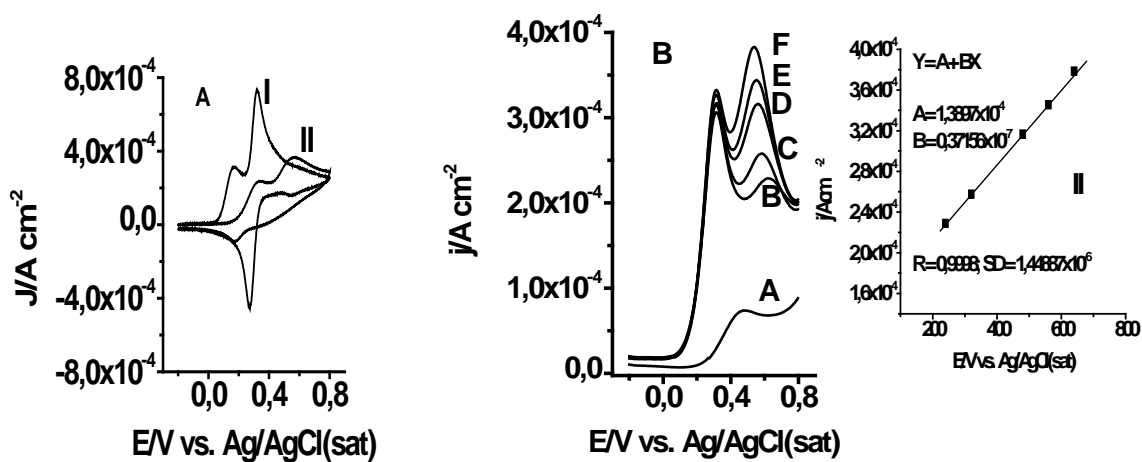


Figura 6: Voltamperogramas obtenidos en una solución buffer acetato pH 5,1 con: A) I. Un electrodo de oro sin modificar y II. Con un electrodo de oro modificado químicamente con ácido N-metil-1-ciclopenten-2-ditiocarboxílico en presencia de $640 \mu\text{M}$ DA + $1000 \mu\text{M}$ AA; $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$. B) Voltamperogramas obtenidos por VOC en presencia de $1000 \mu\text{M}$ AA y concentraciones variables de DA: 240; 320; 480; 560 y $640 \mu\text{M}$; frecuencia: 60 Hz y amplitud: 25 mV. II) Comportamiento de la densidad de corriente de pico con la concentración de DA en presencia de $1000 \mu\text{M}$ AA (datos tomados de B).

positivamente ejerciendo una repulsión electrostática con las moléculas de DA (efectos electrostáticos). Sin embargo, esta modificación permite la cuantificación de la DA en presencia de AA debido a que la monocapa de tiol adsorbida evita el envenenamiento de la superficie del electrodo con productos de la oxidación de la DA y del AA.

Comportamiento electroquímico de la DA en un electrodo de LAP/CV. En la figura 7 se muestra la respuesta electroquímica de la DA en un electrodo de CV modificado con LAP (LAP/CV). Se observa que la señal de oxidación de la DA se hace menos reversible en el sensor electroquímico de LAP/CV con respecto al electrodo desnudo. Sin embargo la corriente de oxidación se incrementa, lo que hace suponer que por ser la LAP una arcilla de intercambio cationico y la DA una especie cargada positivamente a pH 6, de acuerdo a resultados obtenidos en otro trabajo¹² se produce una preconcentración de la misma cerca de superficie electródica por efectos electrostáticos incrementándose por lo tanto la corriente de oxidación.

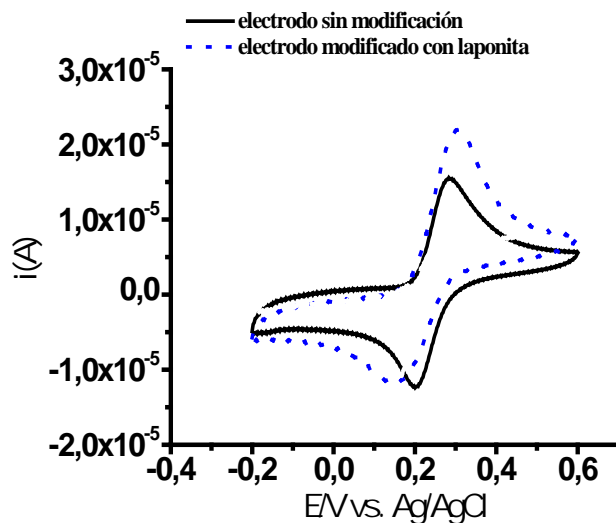


Figura 7: Voltamperogramas obtenidos en una disolución 5×10^{-4} M DA en tampón de fosfato sódico pH 6,0 utilizando un electrodo de carbono vítreo sin modificar y modificado con laponita y modificado con laponita/GA; $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

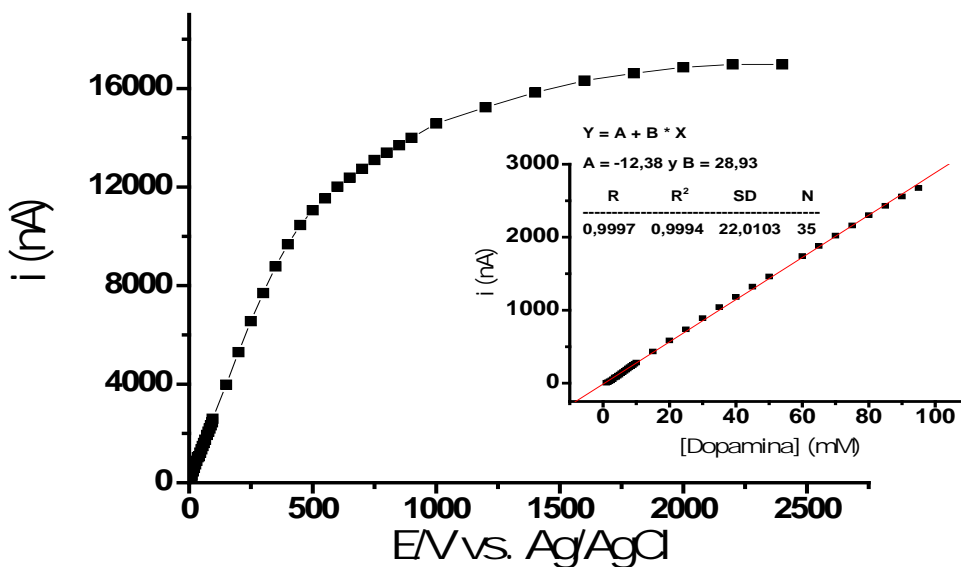


Figura 8: Comportamiento del biosensor GA /LAP-TIROS/CV con la concentración de DA.

Efectos difusionales

Comportamiento electroquímico de la DA en un electrodo de GA/LAP-TIROS/CV (biosensor enzimático amperométrico). En la figura 8 se muestran la curva de calibración de la DA que se obtiene con el biosensor GA/LAP-TIROS/CV. Una forma de averiguar si la reacción enzimática que se desarrolla en el biosensor de DA está siendo afectada por efectos difusionales consiste en determinar si dicha reacción sigue o no una cinética de

primer orden o comportamiento michaeliano con respecto a la concentración del sustrato. La forma de hacerlo es determinado el coeficiente de cooperatividad de Hill (η) a través de la siguiente ecuación:

$$i_k = \frac{i_{\max} [S]^\eta}{K_M + [S]^\eta} \tag{1}$$

donde i_k es la corriente de estado estacionario de un biosensor amperometrico bajo control cinético, i_{\max} es la

máxima corriente que se obtiene cuando $[S] \gg K_M$ y K_M es la constante aparente de Michaelis-Menten²³.

La ecuación (1) puede expresarse como:

$$\log \frac{i_k}{i_{\max} - i_k} = \eta \log[S] - \log K_M \quad (2)$$

Al graficar $\log \frac{i_k}{i_{\max} - i_k}$ vs. $\log[S]$ (figura 9) se puede observar que η es aproximadamente igual a 1.

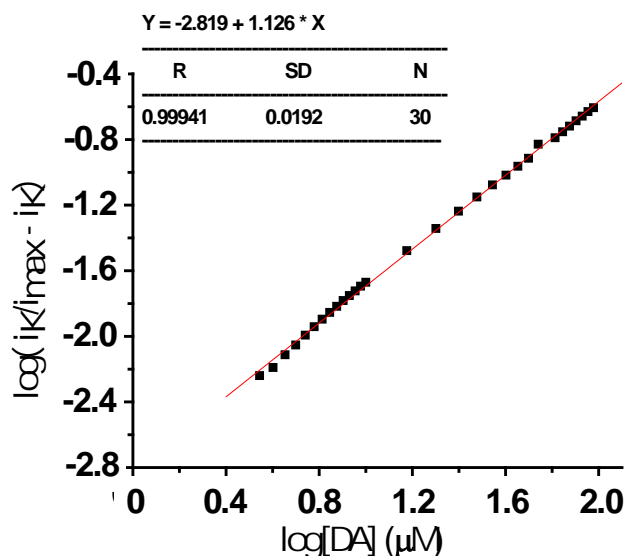


Figura 9: Comportamiento del $\log \frac{i_k}{i_{\max} - i_k}$ vs. $\log[S]$

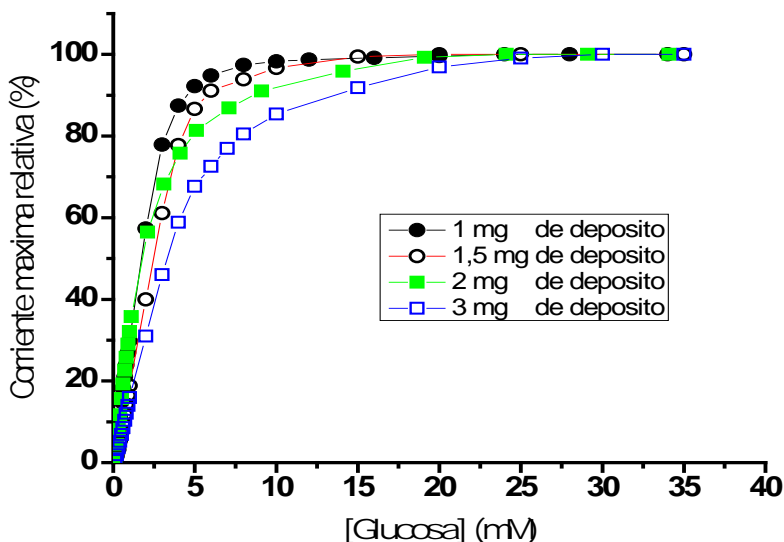


Figura 10: Comportamiento de la corriente relativa en función de la concentración de glucosa al usar diferentes cantidades de microgeles de PAA-GOx

Este valor es indicativo de una cinética de primer orden, por lo tanto, la respuesta del biosensor no se ve afectada por efectos difusionales y parámetros cinéticos como la constante de Michaelis-Menten y Velocidad máxima pueden ser determinados.

Comportamiento electroquímico de la glucosa en un electrodo de MD/PAA-GOx /Pt (biosensor enzimático amperométrico). El uso de microgeles como soporte para atrapar enzimas presenta una serie de ventajas entre las cuales se tiene que la enzima es protegida contra contaminación y biodegradación debido a la matriz polimérica que conforma al microgel. Esto se traduce en un incremento del tiempo de vida media del biosensor enzimático. Sin embargo dependiendo de la cantidad del microgel que se coloque en la superficie eléctrica la respuesta del biosensor puede ser influenciada o no por efectos difusionales internos.

En la figura 10 se muestra el comportamiento que exhiben cuatro biosensores que se construyeron a partir de microgeles de PAA-GOx variando la cantidad que se deposita de estos sobre la superficie del electrodo. Se observa que a medida que aumenta la cantidad en mg de microgeles sobre la superficie del electrodo incrementándose por ende la carga enzimática, la zona que en teoría es controlada por la cinética de la reacción se amplía y la zona de saturación en donde la corriente del biosensor es independiente de la concentración del sustrato se alcanza más rápidamente cuando la cantidad del microgel se disminuye sobre la superficie del electrodo debido a que más rápidamente los sitios activos de la enzima son ocupados por el sustrato. A bajas concentraciones del sustrato donde en teoría la reacción es

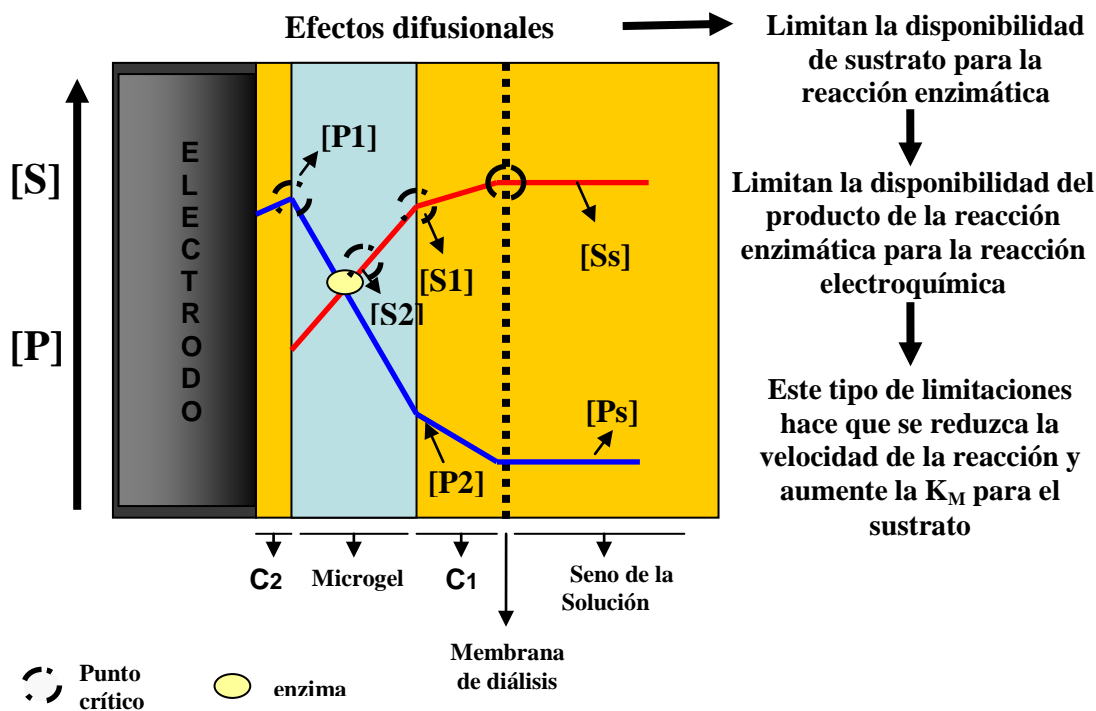


Figura 11: Efectos microambientales de difusión que se pueden desarrollar en la superficie de un biosensor amperométrico construido utilizando microgeles y membrana de diálisis como soporte de la enzima

gobernada por la cinética de la reacción enzimática el orden de la reacción debería ser 1 si no existen efectos difusionales.

Al graficar $\log \frac{i_k}{i_{max} - i_k}$ vs. $\log[S]$, a partir de los datos

obtenidos con cada biosensor (figura 10), se pudo observar que los valores obtenidos de η se alejan considerablemente de 1, estos valores nos indican que la reacción enzimática en cada uno de los biosensores está siendo afectada por diversos procesos que están ocurriendo en la cercanía de la interfase electrodo/solución. Por ejemplo, se esperaría que el coeficiente de Hill se aproxime a 1 cuando la cantidad de microgeles que se deposita es pequeña debido a que los efectos difusionales internos deben ser mínimos al disminuir la resistencia del sustrato a difundir por la matriz sólida que conforma la cantidad de microgeles depositados. Sin embargo pueden ser otros los efectos que estarían gobernando dicho proceso. Al tener una menor cantidad de microgeles, estos van a estar rodeados por más cantidad de líquido. Las condiciones microambientales alrededor del microgel cambian de tal forma que se establecen gradientes de concentración alrededor de dichas partículas ocasionando un efecto sobre la velocidad de reacción.

La figura 11 muestra una representación esquemática de los efectos microambientales de difusión que se pueden desarrollar en la superficie de un biosensor amperométrico construido utilizando como soporte de la enzima microgeles.

Conclusiones

La modificación de superficies de carbón vítreo con una película de mercurio mejora la sensibilidad del análisis de metales trazas debido a que permite preconcentrar al metal en dicha película formando una amalgama. Sin embargo la formación de compuestos íter metálicos entre el metal de interés y otros sobre la superficie de mercurio limita su uso como sensor electroquímico.

El uso de materiales tales como arcillas y tioles como modificadores de superficies electródicas permite la interacción del analito con los grupos funcionales del material depositado y la posible formación de complejos que pueden ser reducidos electroquímicamente, así como, la formación de densidades de carga parciales ya sean positivas o negativas sobre la superficie del sensor electroquímico haciendo que por efectos electrostáticos se separe o amplifique la señal electroquímica de la sustancia de interés.

El desarrollo de cargas opuestas entre el sensor GA/LAP/CV y el analito DA en soluciones buffer pH 6 permite incrementar la sensibilidad para la determinación y cuantificación de DA. A pH 5,1 la DA se encuentra en su forma catiónica y el AA en su forma aniónica.

El sensor electroquímico tiol II/Au (con carga parcial positiva) permite separar las señales de oxidación de DA y de AA debido a efectos electrostáticos y evita además el envenenamiento de la superficie del electrodo con productos de la oxidación de DA y de AA.

El uso de la matriz laponita-glutaraldehído sin membrana de diálisis para atrapar la enzima tirosinasa (biosensor GA/LAP-TIROS/CV) reduce al mínimo los efectos difusionales haciendo posible la determinación de la K_M de la reacción enzimática.

En el biosensor enzimático a base de microgeles soportados con membrana de diálisis (MD/PAA-GO_x/Pt) para la cuantificación de glucosa, los efectos difusionales externos e internos afectan considerablemente las propiedades cinéticas de la reacción enzimática haciendo imposible la determinación de la K_M de la reacción enzimática.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las doctoras Beatriz López Ruiz y Martas Sánchez-Paniagua López de la Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España y al doctor Ricardo R. Contreras del laboratorio de Órganometálicos de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por su asesoramiento en algunos experimentos realizados y por su colaboración en el suministro de ciertos compuestos orgánicos utilizados como modificadores de las superficies electródicas. Así como también al CDCHT-ULA (FA-430-08-08-B) y FONACIT Venezuela por la financiación de este trabajo.

Referencias

1. S Menolasina. Fundamentos y Aplicaciones de Electroquímica, Consejo de Publicaciones ULA, Mérida (2004).
2. L Serra, J Aranceta, J Mataix. Nutrición y Salud pública. Métodos, bases científicas y aplicaciones. 2da edición. ELSEVIER-MASSON (2006).
3. D Vallone, R Picetti, E Borrelli. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosc. Biobehav. Rev.**, **24**, 125-32 (2000).
4. A Boulton, G Baker, R Adams. Voltammetric Methods and rain Systems. The Humana Press, Clifton, NJ (1995).
5. F Gonon, M Buda, J Pujol. Measurements of Neurotransmitter Release in Vivo. En: Marsden C.A., Editor, Wiley, Chichester, 153-167 (1984).
6. J Justice, A Jaramillo. Selectivity and kinetics of catecholamine oxidation at modified carbon paste electrodes. **J. Electrochem. Soc.**, **131**, C106-C106 (1984).
7. H Zhao, Y Zhang, Z Yuan Z. Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid Using Poly(hippuric acid) Modified Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, **14**, 1031-1034 (2002).
8. A Ciszewski, G Milczarek. Poly Eugenol-modified platinum electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid. **Anal. Chem.**, **71**, 1055-1061 (1999).
9. B Duong, R Arechavaleta, N Tao. In situ AFM/STM characterization of porphyrin electrode films for electrochemical detection of neurotransmitters. **J. Electroanal. Chem.**, **447**, 63-69 (1998).
10. A Frago, E Almirall, R Cao, L Echegoyen, R González. A supramolecular approach to the selective detection of dopamine in the presence of ascorbate. **Chemical Communications**, **19**, 2230-2231 (2004).
11. S Menolasina, R Contreras, A Aguilar, O Contreras, A Rodríguez. Comportamiento electroquímico de la dopamina en presencia de ácido ascórbico utilizando un electrodo de oro modificado electroquímicamente y un electrodo de oro modificado electroquímicamente y químicamente con un tiol. **Revista Técnica. Ing. Univ. Zulia**, **30(2)**, 151-157 (2007).
12. S Menolasina, B Martín-Fernández, F García-Iñigo, B López-Ruiz. Comportamiento electroquímico de la dopamina en un electrodo de carbón vítreo modificado con Laponita/ Glutaraldehído. **An. R. Acad. Nac. Farm.**, **75(3)**, 373-388 (2009).
13. G Alarcón-Angeles, S Corona-Avenidaño, M Palomar-Pardave, A Rojas-Hernández, M Romero-Romo, M Ramírez-Silva. Selective electrochemical determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using sodium dodecyl sulfate micelles as masking agent. **Electrochimica Acta**, **53(6)**, 3013-3020 (2008).
14. J Hervás-Pérez, M Sánchez-Paniagua, E López-Cabarcos, B López-Ruiz. Amperometry tyrosinase biosensor based on polyacrilamidemicrogels. **Biosensors and Bioelectronics**, **22(33)**, 429-439 (2006).
15. P O'Connell, G Guibault. Future Trends in Biosensor research. **Analytical Letters**, **34**, 1063-1078 (2001).
16. M Pravda, M O'Halloran, M Kreuzer, G Guibault. Composite glucose biosensor based on screen-printed electrodes bulk modified with Prussian blue and glucose oxidase. **Analytical Letters**, **35**, 959-970 (2002).
17. B Piro, V Do, L Le, M Hedayatullah, M Pham. Electrosynthesis of a new enzyme-modified electrode for the amperometric detection of glucose. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, **486**, 133-140 (2000).
18. I Popescu, S Cosnier, P Labbé. Peroxidase-glucose oxidase-poly(amphiphilic pyrrole) bioelectrode for selectively mediated amperometric detection of glucose. **Electroanalysis**, **9**, 998-1004 (1997).

19. J Wang. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, **13**, 983-988 (2001).
20. A Terrenos, A Galera-Gomez, E Lopez-Cabarcos. **Progr Colloid Polym Sci**, **50**, 115- 122 (2000).
21. S Menolasina, A De Santis, R Contreras. Comportamiento electroquímico de un electrodo de oro modificado con una monocapa autoensamblada del ácido 2-*N*-bencil-1-ciclopenten-di-tiocarboxílico. **Avances en Química**, **4(1)**, 13-24 (2009).
22. C Mousty, S Cosnier, M Sánchez-Paniagua, E López-Cabarcos, B Lopez-Ruiz. Rutin Determination at an Amperometric Biosensor. **Electroanalysis**, **19**, 253-258 (2007).
23. J Rubio-Retama, B López-Ruiz, E López-Cabarcos. Microstructural modifications induced by the entrapped glucose oxidase in crosslinked polyacrylamide microgels used as glucose sensors. **Biomaterial**, **24**, 2965-2973 (2003).