

**MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES DE ORO CON TIOUREA COMO  
HERRAMIENTA  
PARA LA INMOVILIZACIÓN Y DETECCIÓN DE VITAMINA K<sub>3</sub>**

**Pedro Matheus<sup>1</sup>, Jeling Sánchez<sup>1</sup>, Pedro Navarro<sup>1</sup>,  
Emily Pacheco<sup>1</sup>, Olga Belandria<sup>1</sup>**

**1. Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control.  
Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Laboratorio de Electroquímica. Facultad de  
Ciencias. Departamento de Química. Universidad de Los Andes. Mérida 5101,  
Venezuela.**

**Correspondencia:** Pedro Matheus. Núcleo la Liria, sector La Hechicera. Laboratorio de Electroquímica. Facultad de Ciencias. Departamento de Química

**E-mail:** pmateus@ula.ve

## **RESUMEN**

Se realizó la inmovilización de moléculas de vitamina K<sub>3</sub> mediante la modificación de superficies de oro por quimisorción de tiourea, para formar monocapas autoensambladas de tioles uniformemente orientadas. El oro presenta, frente a otros materiales, la ventaja de no poseer un óxido estable lo que permite manejarlo en condiciones atmosféricas, esto hace que este metal sea uno de los materiales mayormente utilizados en la modificación con monocapas autoensambladas de tioles. Así, tras la inmersión de la superficie limpia de oro en una disolución de tiourea 5mM y vitamina K<sub>3</sub> 100mM, se obtiene una monocapa empaquetada de tiourea (Au/SAM/TOU-Vit.K<sub>3</sub>) y simultáneamente vitamina K<sub>3</sub> inmovilizada. La inmovilización de la vitamina K<sub>3</sub> no se logró con la modificación de la superficie de oro sólo con tiourea 5mM y posterior incubación en vitamina K<sub>3</sub>. Para comprobar si ocurre la formación de las monocapas, se efectuaron voltametrías cíclicas en KOH 0,5M en atmósfera de N<sub>2</sub> (con los electrodos modificados), en la ventana de potencial entre -0,2V hasta -1,2V vs Ag/AgCl, donde se muestra una onda próxima a -0,9V característica de los tiocompuestos

adsorbidos sobre el oro. Para la detección de vitamina K<sub>3</sub> se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,1M y ventana de potencial desde -0,2V hasta -0,8V, obteniéndose las señales correspondientes a la vitamina K<sub>3</sub> ( $E_{p_c} \approx -0,45V$  y  $E_{p_a} \approx -0,35V$ ). También se optimizaron condiciones de pH, concentración de vitamina K<sub>3</sub>, tiempos de incubación en tiourea y vitamina K<sub>3</sub>, y el límite de detección para voltametría cíclica (50mM).

**PALABRAS CLAVE:** vitamina K<sub>3</sub>, monocapa de tioles, electroquímica, voltametría, tiourea.

### **MODIFICATION OF GOLD SURFACES WITH TIOUREA AS A TOOL FOR THE IMMOBILIZATION AND DETECTION OF VITAMIN K<sub>3</sub>**

#### **ABSTRACT**

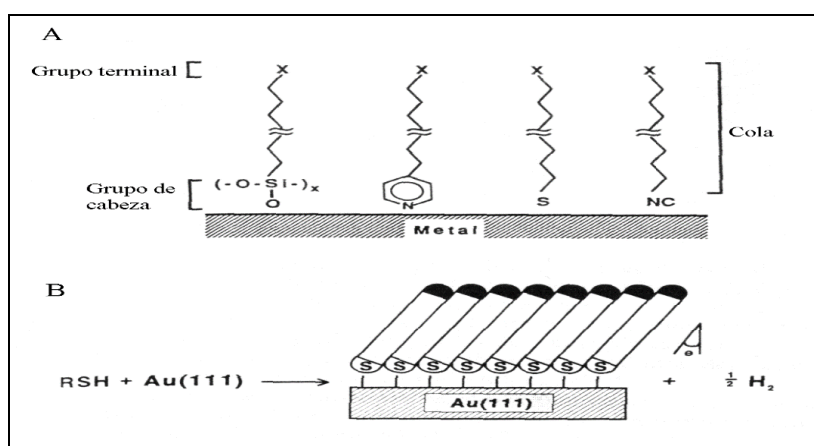
Immobilizing molecules of vitamin K<sub>3</sub> was performed by modification of gold surfaces by chemisorption of thiourea, to form self-assembled monolayers of thiols uniformly oriented. Gold over other materials presents the advantage of not having a stable oxide, allowing handle under atmospheric conditions, this makes this metal is one of the materials mostly used in the modification with self-assembled monolayers of thiols. Thus, after immersing the clean gold surface in a solution of 5mM thiourea and vitamin K<sub>3</sub> 100mM thiourea packed monolayer (Au/SAM/TOU-Vit.K<sub>3</sub>) and immobilized simultaneously vitamin K<sub>3</sub> is obtained. The immobilization of vitamin K<sub>3</sub> was not achieved by modifying the gold surface with 5mM thiourea and subsequent incubation in vitamin K<sub>3</sub>. To check if the formation of monolayers occurs, cyclical voltammetries were made in 0.5M KOH under N<sub>2</sub> (with modified electrodes), in the window of potential between -0.2V to -1.2V vs Ag/AgCl, where a wave is shown next to -0.9V characteristic of sulfur compounds adsorbed on gold. For detection of vitamin K<sub>3</sub> cyclic voltammetries in 0.1M KCl and potential window from -0.2V they were performed to -0.8V, resulting signals corresponding to vitamin K<sub>3</sub> ( $E_{p_c} \approx -0.45V$  and  $E_{p_a} \approx -0.35V$ ). Conditions of pH, concentration of vitamin K<sub>3</sub>, incubation times thiourea and vitamin K<sub>3</sub>, and the detection limit for cyclic voltammetry (50mM) was also optimized.

**KEY WORDS:** vitamin K<sub>3</sub>, monolayers of thiols, electrochemistry, voltammetry, thiourea.

## INTRODUCCIÓN

Las monocapas autoensambladas son entramados moleculares formados espontáneamente por inmersión de una superficie apropiada en una disolución de

una molécula anfifílica que se quimisorbe sobre el sustrato. Existen varios métodos de formación de las monocapas autoensambladas que dan lugar a monocapas orgánicas (ver figura 1).



**Figura 1. A. Diferentes tipos de moléculas adsorbidas sobre metales. B. Monocapas autoensambladas de tioles sobre oro [1].**

Los átomos de azufre coordinan fuertemente con el oro, formando monocapas orientadas y sumamente ordenadas sobre la superficie de este metal, mientras que las fuerzas de Van der Waals entre los grupos metilenos, orientan y estabilizan la monocapa formada. En

cuanto al proceso de quimisorción hay acuerdo en que es un proceso de quimisorción oxidativa en el que tiene lugar la adición del enlace S-H a la superficie del oro, seguida por una eliminación reductiva de hidrógeno de acuerdo con el siguiente esquema:



Estas monocapas serán las que utilizaremos en este trabajo (1,2). Además

de la abundante información acerca de las monocapas autoensambladas de tioles, se

conoce bien la cinética de quimisorción de estos compuestos en superficies de Au. Cuando se ha estudiado la quimisorción con disoluciones relativamente diluidas se han observado dos cinéticas de adsorción distintas: primero una etapa muy rápida con una escala en minutos, durante la que se consigue un recubrimiento próximo a 80-90% del máximo, seguido de una etapa más lenta de varias horas hasta completar la monocapa. La segunda etapa se ha descrito como un proceso de cristalización superficial donde las cadenas alquílicas pasan desde un estado desordenado a un cristal bidimensional y como se ha dicho, tiene una escala en el tiempo en horas (2). La cinética de la primera etapa está gobernada por la reacción superficial Au-SH y la energía de activación dependerá de la densidad electrónica del átomo de azufre que se adsorbe. Por el contrario, la cinética de la segunda etapa está relacionada con el

desorden de las cadenas, las interacciones cadena-cadena y con la movilidad superficial de las cadenas, por lo tanto, la cinética de ordenación de la monocapa es más rápida cuanto más larga es la cadena alquílica, probablemente debido al aumento de las interacciones de Van der Waals (2). La vitamina K, también llamada vitamina antihemorrágica o vitamina de la coagulación, puede ser sintetizada por las bacterias de la flora intestinal y aproximadamente la mitad de los requerimientos de ésta, pueden obtenerse de esta manera (3). La vitamina K presenta estructuras diferentes dependiendo de su procedencia: vitamina K<sub>1</sub> o filoquinona, vitamina K<sub>2</sub> o menaquinona y vitamina K<sub>3</sub> o menadiona, la cual es de origen sintético producida por el hombre y es la forma más activa de la vitamina K. Esta es la vitamina utilizada en este trabajo (ver figura 2).

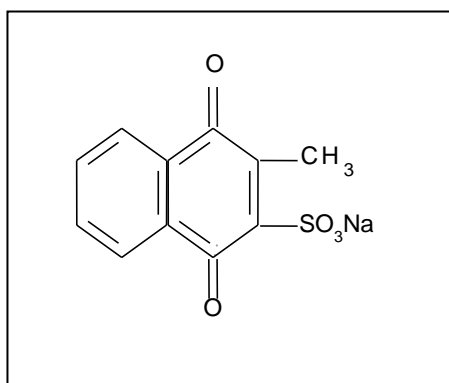


Figura 2. Estructura de la vitamina K<sub>3</sub> o menadiona (3).

## METODOLOGIA

Los experimentos electroquímicos se realizaron utilizando una celda de vidrio de un sólo compartimiento, con una tapa también de vidrio, con tres orificios para introducir los electrodos, y otros dos orificios para la entrada y salida de gases; esta celda está conectada a un cilindro de Nitrógeno y al potenciostato analizador Autolab-USB modelo PGSTAT12/30 conectado a un PC Pentium 4. Como electrodos de trabajo se usaron hilos de oro con 99,99% de pureza, de 0,50mm de diámetro y una longitud aproximada de 15mm e hilos de oro modificados con tiourea 5mM (Au/SAM/TOU), con tiourea 5mM y posteriormente Vit.K<sub>3</sub> 100mM (Au/SAM/TOU/Vit.K<sub>3</sub>) y modificados con una solución tiourea 5mM + Vit.K<sub>3</sub> 100mM (Au/SAM/TOU-Vit.K<sub>3</sub>); como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino con 99,9% de pureza y como electrodo de referencia Ag/AgCl, en solución saturada de KCl 3M. Todos los experimentos fueron realizados a

temperatura ambiente, presión atmosférica y atmósfera saturada de Nitrógeno.

### ▪ Preparación de las superficies de oro.

Los electrodos de hilo de oro se pasaron por llama suave hasta el rojo vivo, se dejaron enfriar y posteriormente se pulieron con gamma-alúmina 3 (0.05 micron, Buehler) sobre lana para pulir. Se lavaron con agua de 18MΩ, se sonicaron durante 15 minutos en mezcla etanol-H<sub>2</sub>O y finalmente se secaron al aire.

### ▪ Caracterización y determinación del área efectiva del electrodo.

Se llevó a cabo mediante la realización de voltametrías cíclicas en medio ácido, sometiendo el electrodo de oro limpio a un barrido de potencial desde +0,5V hasta +1,4V en ácido sulfúrico 0,5M a 100mV.seg<sup>-1</sup>. El área efectiva del electrodo se determinó integrando el área bajo el pico catódico característico del oro y próximo a +0,9V tomando como referencia el valor de 482 μC cm<sup>-2</sup> para una

monocapa de óxido adsorbida sobre oro policristalino [4].

▪ **Formación de monocapas de tiourea (SAM/TOU).**

El electrodo de hilo de oro, una vez calculada su área efectiva, se sumergió durante 24 horas en una disolución 5mM de tiourea preparada en etanol-H<sub>2</sub>O (2:1) para formar una monocapa sobre oro SAM/TOU. Seguidamente se lavó con una mezcla etanol-H<sub>2</sub>O (2:1) durante 5 minutos y luego se secó al aire.

▪ **Inmovilización de la vitamina K<sub>3</sub>.**

Se realizó mediante incubación de los electrodos de oro modificados con SAM/TOU en disoluciones de vitamina K<sub>3</sub> preparada en H<sub>2</sub>O a las diferentes concentraciones, durante 24 horas y a temperatura ambiente, identificándose como (Au/SAM/TOU/Vit.K<sub>3</sub>). Seguidamente se lavó con H<sub>2</sub>O durante 5 minutos y luego se secó al aire.

▪ **Formación de la monocapa de tiourea con inmovilización simultánea de vitamina K<sub>3</sub>.**

Se preparó mediante incubación de los electrodos de oro en disoluciones con mezcla de tiourea 5mM y vitamina K<sub>3</sub> preparada en etanol-H<sub>2</sub>O, a diferentes concentraciones de vitamina (100, 50, 25 y 10mM) durante 24 horas, a temperatura ambiente, para formar una monocapa de tiourea-vitamina K<sub>3</sub> identificada como (Au/SAM/TOU-Vit.K<sub>3</sub>). Seguidamente se lavó con una mezcla etanol-H<sub>2</sub>O (2:1) durante 5 minutos y luego se secó al aire.

▪ **Control electroquímico de la formación de las monocapas autoensambladas de tiourea.**

Para comprobar la formación de la monocapa en los electrodos de hilo de oro, se efectuaron sobre los electrodos modificados, voltametrías cíclicas en KOH 0,5M como electrolito soporte y corriente de N<sub>2</sub>. Estas voltametrías se realizaron en un intervalo de potencial desde -0,2V hasta -1,2V, a velocidad de barrido de 100mV.seg<sup>-1</sup>.

▪ **Ensayos electroquímicos.**

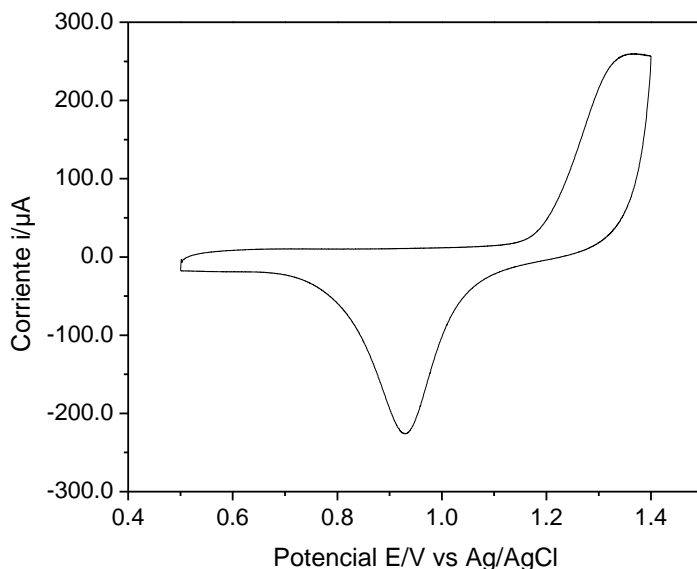
Los electrodos de oro modificados (Au/SAM/TOU-Vit.K<sub>3</sub>) se colocaron en la celda electroquímica, previamente

desoxigenada mediante burbujeo con corriente de  $N_2$  y a temperatura ambiente, conteniendo KCl 0,1M a pH 6,04, realizando las voltametrías cíclicas correspondientes. Antes de medir la respuesta de la Vitamina  $K_3$  se realizaron diferentes voltametrías con el fin de obtener las condiciones óptimas de trabajo, con respecto al pH, concentración de tiourea, concentración de Vitamina  $K_3$ , tiempo de incubación del electrodo de oro en solución TOU-Vit. $K_3$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

### ▪ Caracterización electroquímica de los soportes de oro.

En la figura 3 se presenta La voltametría cíclica en  $H_2SO_4$  0,5M de un electrodo de hilo de oro preparado según los procedimientos descritos anteriormente, donde se muestran los picos anódico y catódico del óxido. Estos picos se encuentran próximos a +1,35V y +0,93V respectivamente, característicos de una superficie de oro policristalina limpia (1, 2, 5). A partir del pico de reducción a +0,93V se puede cuantificar el área de los electrodos empleados en este trabajo, obteniéndose para los hilos de oro un valor de  $0,24 \pm 0,10 \text{ cm}^2$  (4, 6).



**Figura 3. Voltamograma Cíclico de un electrodo de hilo de oro en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M. Velocidad de barrido 100mV.seg<sup>-1</sup>. Atmósfera de N<sub>2</sub>.**

▪ **Funcionalización de electrodos de oro con monocapas autoensambladas (SAM).**

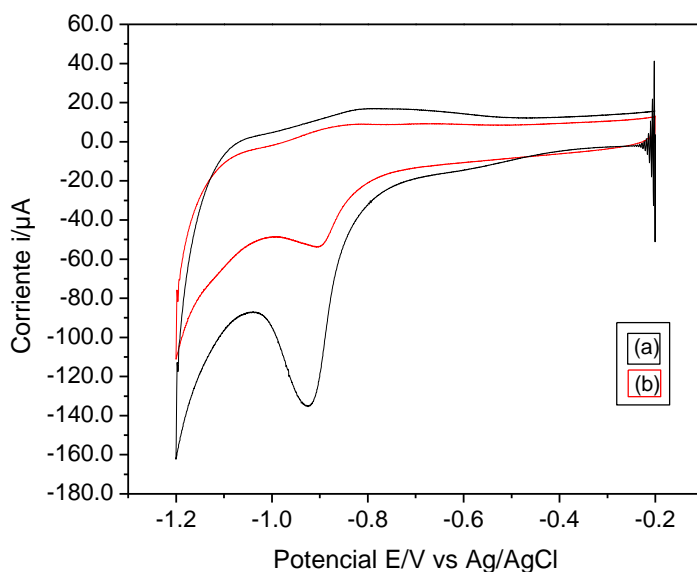
Los modelos experimentales desarrollados en este trabajo, se basaron en la modificación de hilos de oro mediante el uso de monocapas de tiourea con el objetivo principal de poder inmovilizar la vitamina K<sub>3</sub>. Trabajos previos han demostrado que las monocapas autoensambladas de tioles (SAMs), son

muy apropiadas para estudios electroquímicos, dada su buena estabilidad y permeabilidad a iones y moléculas de disolvente (1, 7-10). Las diferentes preparaciones se realizaron por inmersión de los hilos de oro, previamente preparados (ver materiales y métodos) en una disolución 5 mM de tiourea en etanol-agua (2:1). Para comprobar si hubo formación de la monocapa y estimar su integridad, se efectuaron voltametrías cíclicas (VC) en KOH 0,5M bajo corriente de N<sub>2</sub> con el



electrodo modificado en el intervalo desde -0,2V hasta -1,2V vs Ag/AgCl, estimándose el recubrimiento de la superficie por átomos de azufre, mediante integración de las corrientes de desorción reductivas experimentales. En la figura 4 se muestra el voltamograma cíclico de desorción, donde se observan las respuestas obtenidas para el primer barrido (voltamograma (a)) y segundo barrido

[voltamograma (b)]; en ambos casos aparece una onda próxima a -0,93V característica de los tiocompuestos adsorbidos sobre oro. A partir de la carga correspondiente al pico y asumiendo un valor de un electrón consumido en la reducción de cada átomo de azufre, se estimó un recubrimiento de la superficie de oro por átomo de azufre de  $15,7 \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>2</sup>.



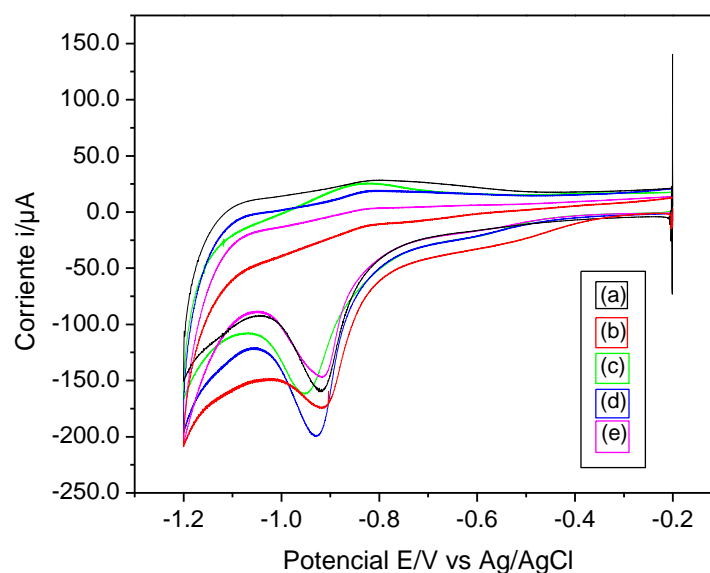
**Figura 4. Voltamograma cíclico típico de desorción reductiva en KOH 0,5M de un electrodo de hilo de oro modificado con SAM/TOU. (a) Primer barrido.**

**(b) Segundo barrido. Velocidad de barrido 100mV.seg<sup>-1</sup>. Atmósfera de N<sub>2</sub>.**

▪ **Optimización del tiempo de incubación en tiourea.**

Para seleccionar el tiempo de incubación del electrodo de oro con tiourea se realizaron voltametrías cíclicas en KOH 0,5M para medir la desorción de las

monocapas formadas a diferentes tiempos de incubación (17, 24, 48, 72 y 120 horas) (ver figura 5).



**Figura 5. Voltamograma cíclico en KOH 0,5M de electrodo de hilo de oro modificado, a 100mV.seg<sup>-1</sup> a diferentes tiempos de incubación en tiourea a: (a) 17 horas, (b) 24 horas,(c) 48 horas, (d) 72 horas y (e) 120 horas. Atmósfera de N<sub>2</sub>.**

En esta figura se observa que para todos los tiempos de incubación se obtiene la

formación de monocapas. Las incubaciones realizadas a 24 y 72 horas

son las que presentan corrientes de desorción más grandes, por tal motivo se selecciona 24 horas como tiempo de incubación, ya que es tiempo suficiente para la formación de una buena monocapa.

- **Optimización de pH.**

Se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,1M a diferentes pH y velocidad de barrido de 50mV/s obteniéndose los resultados presentados en la figura 6. Varios autores han demostrado que la electroquímica de las quinonas en medios acuosos depende fuertemente del pH de la solución, llegando a plantear esquemas complejos donde ocurren reacciones de transferencia electrónica, protónica y procesos de adsorción (11). La bibliografía consultada (11-15) reporta que el proceso redox de la vitamina K es reversible, aceptándose de manera general que el proceso involucra una transferencia de dos electrones con una separación de

potenciales de pico (anódico y catódico) de aprox. 30mV y un cociente de las corrientes de pico muy cercano a la unidad, sin embargo, también indica que la reversibilidad de estos sistemas es afectada de manera muy significativa por el pH del medio electrolítico y por el material electrodo. En este estudio podemos decir que a pH igual a 4,58 (voltamograma (a)) no se observa ninguna de las señales (oxidación y reducción de la vitamina K<sub>3</sub>). Cuando el pH es igual a 5,61 (voltamograma (b)) sólo se observa levemente la señal de reducción (-0,45V). A pH 6,04 (voltamograma (c)) se observan ambas señales ( $E_{pc} = -0,45V$  y  $E_{pa} = -0,35V$ ). Por último, cuando el pH es igual a 7,61 [voltamograma (d)] nuevamente desaparecen ambas señales. El voltamograma (b) se presenta en el recuadro pequeño en una escala apropiada para su mejor apreciación.

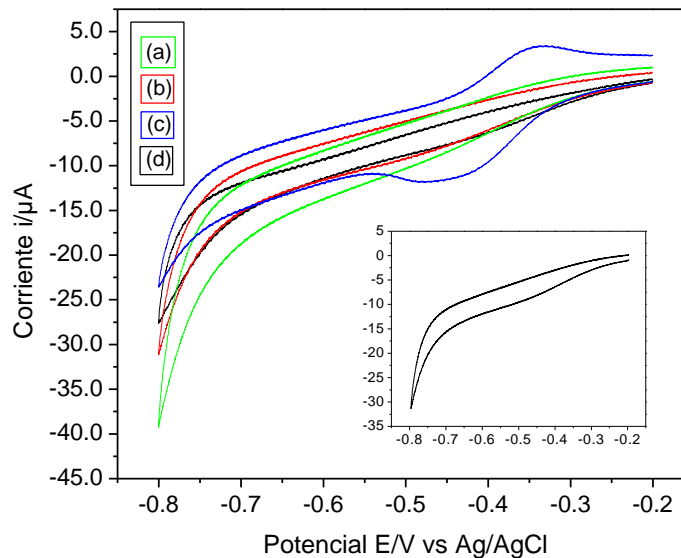


Figura 6. Voltamograma cíclico en KCl 0,1M de un electrodo de hilo de oro (TOU-Vit.K<sub>3</sub>) a 50mV.seg<sup>-1</sup> a: (a) pH 4,58, (b) pH 5,61, (c) pH 6,04, (d) pH 7,61. Atmósfera de N<sub>2</sub>

▪ **Modificación de la superficie de oro con Monocapas Autoensambladas de Tiourea y posterior incubación en Vitamina K<sub>3</sub> (Au/SAM/TOU/Vit.K<sub>3</sub>).**

Para realizar la incubación de los electrodos de oro modificados con tiourea en disoluciones de vitamina K<sub>3</sub>, éstos fueron sumergidos a diferentes concentraciones de vitamina K<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O durante 24 horas, a temperatura ambiente, para formar una monocapa tiourea/vitamina K<sub>3</sub> (Au/SAM/TOU/Vit.K<sub>3</sub>). Seguidamente se

lavarón con H<sub>2</sub>O durante 5 minutos y luego se secaron al aire. En este caso *no se logró la inmovilización de la vitamina K<sub>3</sub>*.

▪ **Modificación de la superficie de oro con Monocapas Autoensambladas preparadas en disolución de Tiourea + Vitamina K<sub>3</sub> (Au/SAM/TOU-Vit.K<sub>3</sub>).**

Por último se realizó la modificación de la superficie de oro incubando el electrodo en una disolución preparada con tiourea 5mM + vitamina K<sub>3</sub> 100mM en etanol-agua (2:1)

durante 24 horas a temperatura ambiente. En este caso *se logró la inmovilización de la vitamina K<sub>3</sub>*. El recubrimiento estimado para la superficie de oro por átomo de azufre fue de  $15,3 \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>2</sup>. Al realizar las voltametrías cíclicas en KCl 0,1M y comparar los voltamogramas obtenidos para las diferentes superficies del electrodo (sin modificar y con modificaciones), observamos para el caso del electrodo modificado con solución

tiourea 5mM-vitamina K<sub>3</sub> 100mM una señal de oxidación a aproximadamente -0,35V que ha sido asignada a la presencia de vitamina K<sub>3</sub>, donde la señal correspondiente a la onda de reducción no está bien definida (Voltamograma (d)), probablemente por la baja concentración de vitamina K<sub>3</sub> en la monocapa. Las voltametrías (a), (b) y (c), no muestran ninguna respuesta en esta ventana de potencial (ver figura 7).

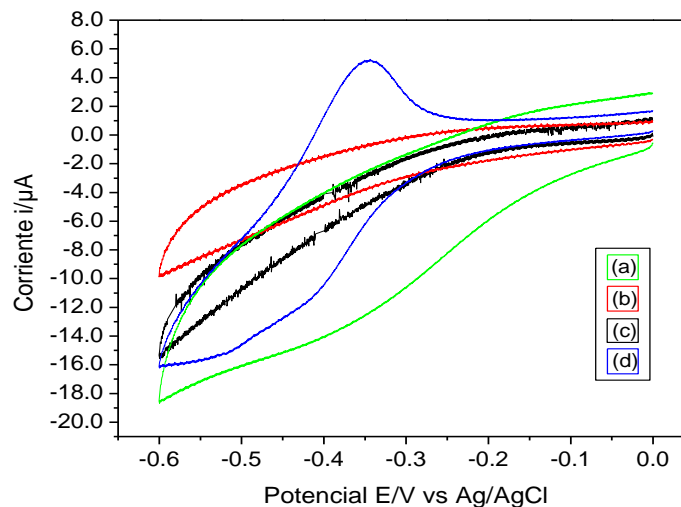


Figura 7. Voltamograma cíclico en KCl 0,1M de un electrodo de hilo de oro a  $50\text{mV}\cdot\text{seg}^{-1}$ .

(a) oro desnudo, (b) Au/TOU, (c) Au/TOU/Vit.K<sub>3</sub>100mM,  
(d) Au/TOU-Vit.K<sub>3</sub> 100mM. Atmósfera de N<sub>2</sub>.

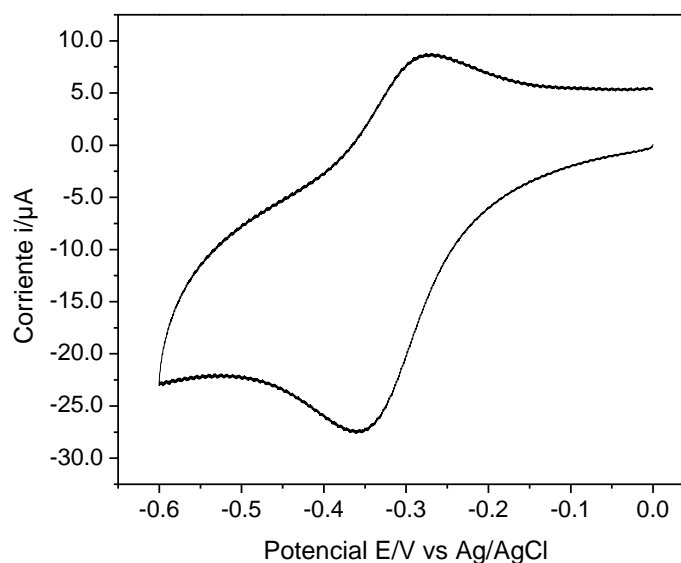
▪ **Recubrimiento de la superficie del electrodo de oro con monocapa formada por una solución tiourea 5mM-1,4-naftoquinona 100mM.**

Tratando de explicar como ocurre la inmovilización de la vitamina K<sub>3</sub> en la superficie del electrodo de oro, se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,1M para electrodos de hilo de oro modificados con monocapa formada por una solución tiourea 5mM-1,4-naftoquinona 100mM. El voltamograma obtenido muestra los picos, catódico y anódico a -0,36V y -0,28V respectivamente, ligeramente desplazados a potenciales menos negativos (ver figura 8), al compararlos con los picos obtenidos para la vitamina K<sub>3</sub>. Los resultados obtenidos sugieren que ocurre la inmovilización de la vitamina K<sub>3</sub>, con bastante probabilidad, a través de los puentes de hidrógeno que se formarían entre los grupos cetónicos de la quinona (también presentes en la 1,4-naftoquinona) y los grupos amida de la tiourea. Además esta inmovilización es favorecida a valores de pH ligeramente ácidos (ver figura 6). Según Shengfu W. y col., en el 2002, “las corrientes catalíticas de la hidroquinona

cambian con el pH, siendo más factible la inmovilización de una quinona cuando el pH del medio es lo suficientemente ácido”. En nuestro caso, la tiourea además de servir de anclaje para el anillo de la quinona, también actuaría como un mediador de la reacción electródica acelerando la transferencia de los electrones entre el electrodo y la quinona. Esto último podría explicarse por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amida de la tiourea y los oxígenos pertenecientes a los dos grupos cetónicos de la quinona, debilitándose la unión N-H y activándose la unión O-H. Los puentes de hidrógeno generalmente se producen por la atracción electrostática entre átomos electronegativos (como Oxígeno ó Nitrógeno) y un átomo de hidrógeno, unido covalentemente a un segundo átomo electronegativo (como Oxígeno ó Nitrógeno). En nuestro caso, los electrones serían transferidos a través de la unión -N-H...O=C-. A pH bajo, la concentración de H<sup>+</sup> es tan alta que los grupos NH<sub>2</sub> de la tiourea y los grupos C=O de la quinona se protonarían, por lo que el ataque se repele. A medida que el pH aumenta (hacia valores ligeramente

ácidos), se favorece la unión  $-N-H \cdots O=C-$ , dado que se favorece la formación de los puentes de hidrógeno, pero no llega

a ocurrir repulsión por un exceso de protones.



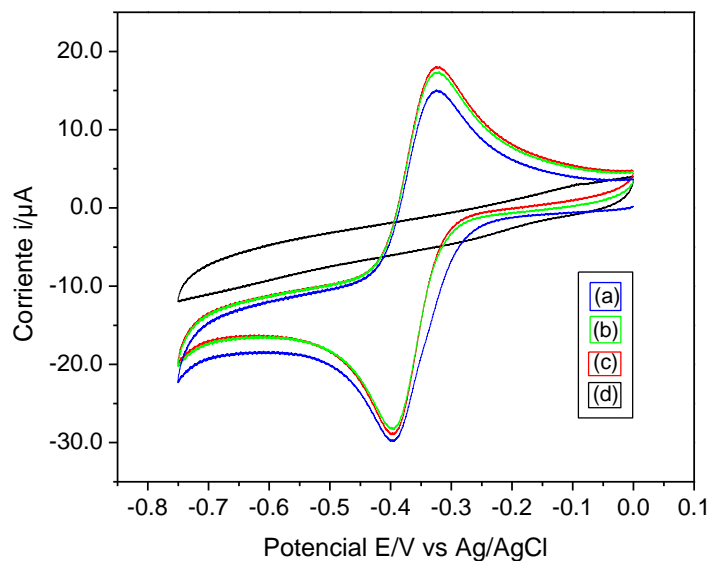
**Figura 8.** Voltamograma cíclico en KCl 0,1M de un electrodo de hilo de oro modificado con monocapa formada por una solución tiourea 5mM-1,4-naftoquinona 100mM a  $50\text{mV}\cdot\text{seg}^{-1}$ .  
Atmósfera de  $N_2$ .

- **Barridos sucesivos para el electrodo de oro modificado con monocapa formada por una solución TOU 5mM-Vit.K<sub>3</sub> 100mM y 100 μL de Vit.K<sub>3</sub> 100mM en la solución electrolítica.**

La figura 9 muestra las voltametrías cíclicas del electrodo de oro modificado con monocapa formada por una solución TOU 5mM-Vit.K<sub>3</sub> 100mM + 100μL de vitamina K<sub>3</sub> en solución. Los resultados obtenidos muestran que a medida que se realizan barridos, la  $i_{p_a}$  aumenta y la  $i_{p_c}$

disminuye. Esto indica que es necesario que la vitamina K<sub>3</sub> esté presente en forma reducida, para que más vitamina sea convertida a su forma oxidada. También observamos que el segundo y tercer barrido son prácticamente iguales, lo que indica que con pocos barridos se alcanza la saturación de la superficie del electrodo de oro con las moléculas de vitamina K<sub>3</sub>.

Cuando el electrodo es de oro desnudo no se observa ninguna de las señales [voltamograma (d)]. En esta figura los voltamogramas (a), (b) y (c) muestran tendencia hacia un comportamiento reversible, dado que los picos anódico ( $E_{p_a} = -0,33V$ ) y catódico ( $E_{p_c} = -0,40V$ ) se separan aproximadamente 35 mV.



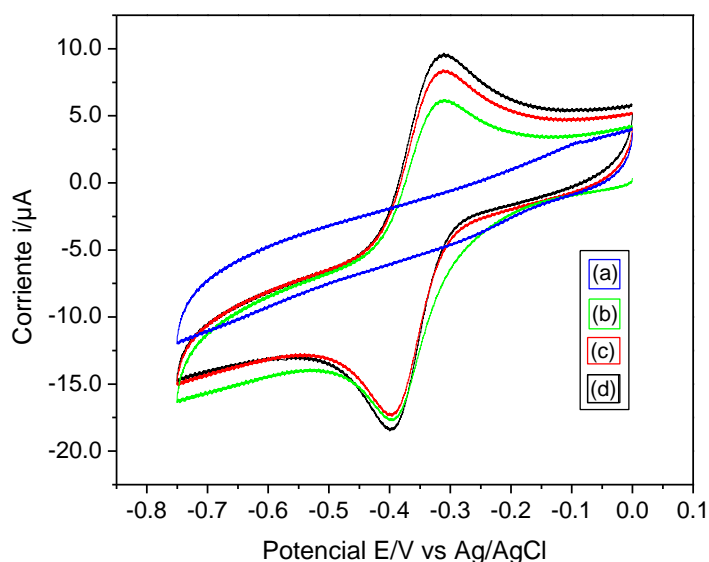
**Figura 9.** Voltamograma cíclico en KCl 0,1M de un electrodo de hilo de oro modificado (TOU 5mM-Vit.K<sub>3</sub> 100mM) + 100μL de Vit.K<sub>3</sub> 100mM a 50mV.seg<sup>-1</sup>. (a) Primer barrido, (b) Segundo barrido, (c) Tercer barrido, (d) Hilo de oro desnudo. Atmósfera de N<sub>2</sub>.



▪ **Barridos sucesivos para el electrodo de oro desnudo con 100 $\mu$ L de Vit. K<sub>3</sub> 100mM en la solución electrolítica.**

Se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,1M a una velocidad de barrido de 50mV.seg<sup>-1</sup> y se compararon las respuestas obtenidas para el oro desnudo con las obtenidas para el electrodo de oro desnudo con 100 $\mu$ L de vitamina K<sub>3</sub> 100mM en la solución electrolítica (ver figura 10). Al comparar ambos ensayos observamos claramente la ausencia de las ondas de oxidación y reducción para el electrodo desnudo, posteriormente al agregar a la solución 100 $\mu$ L de vitamina K<sub>3</sub> 100mM, observamos la reversibilidad del proceso, pero con  $i_{p_a}$  diferente al obtenido en el electrodo modificado (ver figura 9), lo que

podría explicarse por la presencia de vitamina K<sub>3</sub> en la monocapa previamente inmovilizada en el electrodo, lo que haría que su respuesta en corriente fuera mayor. Cuando comparamos los valores de  $i_{p_a}$  obtenidos en el primer barrido de las figuras 9 y 10, notamos que  $i_{p_a}$  en la figura 10, presenta un valor de 9,0 $\mu$ A a diferencia del obtenido en la figura 9, cuyo valor es de 17,6 $\mu$ A. Esta diferencia puede deberse al hecho de que para el caso del electrodo modificado con la monocapa tiourea-Vit.K<sub>3</sub>, el valor obtenido se refiere a los aportes de vitamina K<sub>3</sub> inmovilizada y Vit.K<sub>3</sub> en solución (17,6 $\mu$ A), en cambio para el caso en que el electrodo no ha sido modificado, solo tendríamos el aporte de la vitamina K<sub>3</sub> en solución (9,0 $\mu$ A).



**Figura 10.** Voltamograma cíclico en KCl 0,1M de un electrodo de hilo de oro sin modificar +100μL de vitamina K<sub>3</sub> 100mM a 50mV.seg<sup>-1</sup>. Donde: (a) Oro desnudo, (b) primer barrido al agregarle 100μL de vitamina K<sub>3</sub> 100mM, (c) segundo barrido, (d) tercer barrido. Atmósfera de N<sub>2</sub>.

## CONCLUSION

1. Los estudios realizados mostraron que no es posible inmovilizar la vitamina K<sub>3</sub> cuando previamente se modificó la superficie de oro con moléculas de tiourea, sin embargo, cuando se mezclan las soluciones de tiourea y la de vitamina K<sub>3</sub>, las voltametrías realizadas muestran que ocurrió la inmovilización de la vitamina.

2. Estos estudios también mostraron que la respuesta voltamétrica para el electrodo modificado con tiourea-vitamina K<sub>3</sub> a pH 6,04, experimenta un proceso de reversibilidad, el cual no se mantiene cuando variamos el pH. Esto muestra la importancia que tiene el pH de la solución electrolítica en la respuesta obtenida.

3. Las superficies de oro funcionalizadas con monocapas autoensambladas de

tiourea (SAM/TOU) mostraron buena afinidad y efectividad, como soportes para la inmovilización de vitamina K<sub>3</sub> y su posterior detección. Esto confirma las conclusiones presentadas por otros autores, quienes indican que las monocapas de tiourea autoensambladas por quimisorción sobre oro, constituyen una herramienta versátil para la modificación de superficies, que permiten la unión específica de moléculas de manera ordenada (16,17).

#### AGRADECIMIENTO

- Los autores agradecen al Laboratorio Regional de Servicios Analíticos (LaRSA) y al Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad de Los Andes (LAI-ULA), por el uso de sus instalaciones y el suministro de equipos y reactivos para la realización de este trabajo.
- Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT-ULA) de la Universidad de Los Andes, a través del proyecto FA-406-07-07-F.

#### REFERENCIAS

1. Madoz J. Funcionalización de electrodos de oro para la inmovilización específica, orientada y reversible de enzimas manipuladas genéticamente: Su aplicación en el desarrollo de biosensores [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.; 1998.
2. Matheus P. Diseño y preparación de electrodos enzimáticos basados en interacciones específicas: Desarrollo de estrategias para su estabilización [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.; 2003.
3. Escalona M, Parodi C. La vitamina K. Labnutricion. [serie en línea] 2002 [citado 2004 Abr] Disponible en: [http://www.labnutricion.cl/vitamina\\_k.htm](http://www.labnutricion.cl/vitamina_k.htm).
4. Oesch U, Janata J. Electrochemical Study of Gold Electrodes with Anodic Oxide Films. I. Formation and Reduction Behavior of Anodic

- Oxides on Gold. *Electrochim. Acta* 1983;28: 1237-1246.
5. Malem F, Mandler, D. An Easy Method to Prepare Gold Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* 1992; 139 (7), L65.
  6. Abad J, Vélez M, Santamaría C, Guisán J, Matheus P, Vázquez L, y col. Immobilization of Peroxidase Glycoprotein on Gold Electrodes Modified with Mixed Epoxy-Boronic Acid Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124(43): 12845-53.
  7. Matheus P, Abad J, Fernández V. Modificación de Superficies de Oro para la Inmovilización Orientada de Peroxidasa de Rábano Recombinante. *Revista Técnica de Ingeniería.* 2007; 30(3):225-35.
  8. Vijayamohanan K, Aslam M. Applications of Self-Assembled Monolayers for Biomolecular Electronics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001; 96: 25-39.
  9. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* 1996; 96: 1533-54.
  10. Nuzzo R, Allara D. Adsorption of Biofunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J. Am. Chem.* 1983; 234: 155-65.
  11. Bockris J, Reddy A. *Electroquímica Moderna. Edición en español (México):* Editorial Reverté; 1980.
  12. Vetter K. *Electrochemical Kinetics.* Academic Press (New York); 1967.
  13. Plekcher D. A first course in electrode process. *Electrochemical Consultance.* (England): Chapter 6 (6.8). 1991.
  14. Southampton Electrochemistry Group. *Instrumental Methods in Electrochemistry.* Ellis Horwood series in Physical Chemistry. 1990.
  15. Bard A, Faulkner L. *Electrochemical Methods.* Editorial Jhon Wiley and Sons (Singapore); Chapter: 5-6; 1980.
  16. Cheanyeh Ch, Chi-Ying K. An Electrochemical Biosensor with Uricase Immobilized Functionalized Gold Coated Copper Wire Electrode for Urinary Uric Acid Assay. *Electroanalysis.* 2015; 27:1-10.



17. Borgmann S, Hartwich G, Schulte A, Schuhmann W. Amperometric Enzyme Sensors based on Direct and Mediated Electron Transfer.

Perspectives in Bioanalysis. 2005; 1:599-655.