



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

**FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Estudio de Electrodo Modificados con Películas de las Bases  
del ADN y Nucleolípidos Derivados Mediante la Combinación  
de Métodos Electroquímicos y Espectroscópicos**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria para optar al grado de Doctor en Química presentada por

**Julia Álvarez Malmagro**

Sevilla, 2017



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

**FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Vº Bº La Directora de la Tesis**

**Vº Bº El Director de la Tesis**

Fdo. Manuela Rueda Rueda  
Catedrática de Universidad  
Departamento de Química Física  
Universidad de Sevilla

Fdo. Francisco Prieto Dapena  
Profesor Titular de Universidad  
Departamento de Química Física  
Universidad de Sevilla

## ÍNDICE

<b>Summary / Resumen</b>	
Summary	1
Resumen	6

### **Capítulo 1: Introducción General**

1.1 Objetivos	12
1.2 Estructura de la tesis	15
1.3 Antecedentes	17
1.4 Bibliografía	32

## **PARTE I**

### **Capítulo 2 : Metodología y Procedimientos Experimentales**

2.1 Técnicas electroquímicas	42
2.1.1 Fundamento teórico	42
2.1.1.1 Voltametría cíclica	42
2.1.1.2 Cronoculumbimetría	43
2.1.1.3 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)	43
2.1.2 Medidas electroquímicas	43
2.2 Espectroscopía Infrarroja de Reflexión Absorción.	47
2.2.1 Fundamento teórico	47
2.2.1.1 Attenuated Total Reflection Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy (ATR-SEIRAS)	54
2.2.1.2 Substractively Normalised Interfacial Fourier Transform InfraRed Spectroscopy (SNIFTIRS)	55
2.2.1.3 Polarization Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS)	56
2.2.2 Medidas espectroelectroquímicas de infrarrojos	57
2.2.2.1 Reflexión interna: ATR-SEIRAS	58
2.2.2.2 Experimentos de absorción en disolución	59
2.2.2.3 Reflexión externa: SNIFTIRS	59
2.2.2.4 Reflexión externa: PM-IRRAS	61
2.2.3 Preparación de electrodos metálicos nanoestructurados	63
2.2.3.1 Electrodos de oro depositados químicamente	63
2.2.3.2 Electrodos de oro depositados por sputtering	63
2.3 Membranas biomiméticas	64
2.3.1 Isoterma superficial o Isoterma de Langmuir	64
2.3.2 Preparación de membranas soportadas sobre electrodos	65
2.3.2.1 Autoensamblado de monocapas (SAMs)	65
2.3.2.2 Método de transferencia de Langmuir-Blodgett y Langmuir- Schaeffer.	68
2.4 Cálculos cuánticos GAUSSIAN	69
2.5 Bibliografía	70

### **Capítulo 3: Adsorción y co-adsorción de Adenina y Timina en función del pH**

3.1 Influencia del pH en la Adsorción de Adenina	73
3.1.1. Introducción	73
3.1.2. Experimental	74
3.1.2.1. Reactivos	74
3.1.3. Resultados de voltametría cíclica	74
3.1.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de transmisión en disoluciones neutras y básicas.	76
3.1.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para Adenina Adsorbida sobre Electrodo de Oro desde Disoluciones Neutras y Básicas en D <sub>2</sub> O.	77
3.1.6. Resultados y Discusión de los Espectros ATR-SEIRA para Adenina Adsorbida sobre Electrodo de Oro desde Disoluciones Neutras y Básicas en H <sub>2</sub> O.	84
3.1.7. Conclusiones	89
3.2 Adsorción de timina sobre electrodos de oro. Influencia del pH	91
3.2.1. Introducción	91
3.2.2. Experimental	92
3.2.2.1. Reactivos	92
3.2.3. Resultados de Voltametría cíclica	92
3.2.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de transmisión en disolución	94
3.2.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la timina adsorbida sobre Electrodo de Oro	98
3.2.5.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 cm <sup>-1</sup>	98
3.2.5.2. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 2800 a 3900 cm <sup>-1</sup>	104
3.2.5.3. Influencia del potencial en la adsorción de timina adsorbida sobre electrodos de oro	108
3.2.6. Conclusiones	114
3.3. Co-Adsorción de Adenina y Timina sobre Electrodo de oro	116
3.3.1. Introducción	116
3.3.2. Experimental	117
3.3.2.1. Reactivos	117
3.3.3. Resultados de Voltametría cíclica sobre electrodos Au(111)	117
3.3.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de transmisión en disolución	120
3.3.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la adenina y timina co-adsorbidas sobre Electrodo de Oro.	122
3.3.5.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 cm <sup>-1</sup>	122
3.3.5.2. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 2800 a 3900 cm <sup>-1</sup>	135
3.3.6. Conclusiones	139
3.4 Bibliografía	140

### **Capítulo 4: Estudio Cinético de la Adsorción de la Adenina sobre Electrodo de Au(111) mediante espectroscopía electroquímica de impedancias**

4.1 Introducción	144
4.2 Espectroscopía Electroquímica de Impedancias para un proceso de adsorción con una etapa química previa acoplada.	146



4.3 Experimental	151
4.3.1 Reactivos células y electrodos	151
4.3.1 Procedimiento experimental	152
4.4 Resultados	153
4.4.1. Curvas de pseudocapacidad frente al potencial	153
4.4.2 Análisis en función de la frecuencia	157
4.5 Discusión	162
4.6 Conclusiones	170
4.7 Bibliografía	171

## **Capítulo 5: Adsorción y co-Adsorción de Citosina y Guanina en función del pH**

5.1 Adsorción de Citosina sobre Electrodo de Oro. Influencia del pH	174
5.1.1. Introducción	175
5.1.2. Experimental	175
5.1.2.1. Reactivos	175
5.1.3. Resultados de Voltametría Cíclica	176
5.1.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de Transmisión en Disolución	177
5.1.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la Citosina Adsorbida sobre Electrodo de Oro.	180
5.1.5.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ .	180
5.1.5.2. Influencia del potencial en la adsorción de citosina adsorbida sobre electrodos de oro	184
5.1.5.3. Región espectral 2800-3900 $\text{cm}^{-1}$	189
5.1.6. Conclusiones	190
5.2 Adsorción de Guanina sobre Electrodo de Oro	192
5.2.1. Introducción	192
5.2.2. Experimental	193
5.2.2.1. Reactivos	193
5.2.3. Resultados de Voltametría cíclica	194
5.2.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la Guanina Adsorbida sobre Electrodo de Oro	195
5.2.4.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$	195
5.2.4.2. Influencia del potencial en la adsorción de guanina adsorbida sobre electrodos de oro	203
5.2.4.3. Región espectral 2800-3900 $\text{cm}^{-1}$	205
5.2.5. Conclusiones	206
5.3 Co-Adsorción de Guanina y Citosina sobre Electrodo de oro	208
5.3.1. Introducción	208
5.3.2. Experimental	209
5.3.2.1. Reactivos	209
5.3.3. Voltametría cíclica	209
5.3.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la guanina y citosina co-adsorbida sobre Electrodo de Oro	211
5.3.4.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1400 a 1800 $\text{cm}^{-1}$	211
5.3.4.2. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 2800 a 3900 $\text{cm}^{-1}$	214
5.3.5. Conclusiones	216
5. 4 Bibliografía	217

## PARTE II

### Capítulo 6: Estudio Espectro-Electroquímico Mediante PM-IRRAS de Películas de Nucleolípido de Citidina Adsorbidas Sobre Electrodo de Au(111).

6.1. Introducción	221
6.2. Formación y caracterización de monocapas de nucleolípido de citidina adsorbidas sobre electrodos de oro	225
6.2.1. Experimental	225
6.2.1.1 Reactivos y electrodos	225
6.2.1.2 Isotermas en la interfase aire/agua	225
6.2.1.3 Formación de monocapas de Langmuir	226
6.2.1.4 Caracterización electroquímica	226
6.2.1.5 Recolección de espectros y procesamiento	227
6.2.2. Isotermas del nucleolípido en la interfase aire/disolución	228
6.2.3. Caracterización electroquímica de Monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina Adsorbidas sobre Electrodo de Au(111)	229
6.2.4. Espectros PM-IRRAS de los electrodos recubiertos de la monocapa-nucleolípida	231
6.2.4.1. Región 1300-1800 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de monocapas preparadas en ausencia de guanina	231
6.2.4.2. Región 1300-1800 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de monocapas preparadas en presencia de guanina	234
6.2.4.3. Región 2800-3300 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de monocapas preparadas en ausencia y en presencia de guanina	238
6.3. Formación y caracterización de bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos de Au(111)	244
6.3.1. Introducción	244
6.3.2. Experimental	244
6.3.2.1 Formación de bicapas insolubles	244
6.3.3. Caracterización electroquímica de las bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos de Au(111)	245
6.3.4. Espectros PM-IRRA de los electrodos recubiertos de bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos de Au(111)	246
6.3.4.1. Región 1300-1800 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros PM-IRRA de las bicapas	246
6.3.4.2 Región 2800-3300 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de las bicapas preparadas en ausencia y en presencia de guanina	251
6.4 Conclusiones	257
6.5 Bibliografía	260
<b>Capítulo 7: Conclusions / Conclusiones</b>	
7.1 Conclusions	263
7.2 Conclusiones	271

---

## **Introducción General**

---

**Capítulo 1**

## 1.1 Objetivos

El estudio de las adsorciones y co-adsorciones de las bases del ADN sobre superficies electrónicas sólidas viene siendo en los últimos años un tema de gran interés en la rama de la electroquímica debido a que las interfases electrificadas creadas entre un electrodo sólido y una disolución pueden considerarse en muchos aspectos como sistemas miméticos de las interfases biológicas y, en consecuencia, el estudio de las interfases electrónicas puede ser de ayuda para entender muchos de los comportamientos y propiedades de las interfases biológicas y muy especialmente la influencia de los campos eléctricos. Así, por ejemplo, las cuatro bases del ADN son componentes indispensables en los procesos de replicación y de transcripción de la información genética desde el ADN a las proteínas. Si estos procesos genéticos implican interacciones con las interfases biológicas cabe esperar que puedan afectar a su comportamiento electrónico interfacial. Además, los estudios acerca de la adsorción de bases del ADN sobre electrodos sólidos tienen interés por sus posibles aplicaciones biotecnológicas ya que estos sistemas pueden ser utilizados como biosensores o como plataformas para la liberación de fármacos.

Especial interés merece el estudio de las propiedades ácido-base y a los equilibrios tautoméricos de las bases del ADN, ya que se ha demostrado que el pH del medio juega papeles fundamentales tanto en la formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias como en la formación de tautómeros inestables, lo que puede dar lugar a pares “raros” del ADN y esto originar mutaciones responsables de muchas enfermedades tales como el Parkinson o el Cáncer.<sup>1</sup> El pH del medio puede favorecer unas estructuras respecto a otras de las bases del ADN en disolución, pero, además, la adsorción en la interfase electrónica de cada una de las estructuras puede ser diferente y condicionar las interacciones entre bases.

Los estudios de adsorción y co-adsorción de las bases del ADN han sufrido un gran impulso debido a los avances notables de tipo metodológico que están teniendo lugar durante las dos últimas décadas: se trata, por ejemplo, de la introducción de sustratos electrónicos monocristalinos, de estructuras superficiales bien definidas o el uso de técnicas espectro-electroquímicas y nanoscópicas que permiten obtener información microscópica acerca de la película adsorbida, bajo control del potencial eléctrico. El análisis termodinámico detallado de la adsorción en electrodos sólidos ha permitido

cuantificar parámetros importantes como los excesos superficiales, las energías libres de Gibbs, las energías de adsorción o la presencia de transiciones de fase.<sup>2,3</sup> La información termodinámica sobre la adsorción además puede complementarse con técnicas de microscopía superficial que ofrecen resolución a nivel molecular, como la microscopía de efecto túnel (STM), permitiendo obtener información sobre la organización de las moléculas sobre la superficie electródica. La técnica de espectroscopia superficial de infrarrojos ha resultado ser altamente versátil y ha permitido obtener información sobre los puntos de anclajes de la molécula a electrodos, además de la orientación del plano molecular con respecto a la superficie del electrodo. Estos hechos han convertido a esta técnica en una herramienta muy importante en la caracterización de las interfases electródicas que contienen adsorbidas especies de interés biológico. Además, el desarrollo de microscopías de sonda de barrido “in-situ” y espectroscopías ópticas al igual que la técnica de rayos X han contribuido de manera importante al rápido crecimiento en este campo de la electroquímica de superficies e interfases.

La tesis se encuadra en este campo y en ella se pretende avanzar en la comprensión a escala molecular de algunos de los procesos biológicos de tipo electroquímico relativos a las bases del ADN. Concretamente, se trata de estudiar sus adsorciones y co-adsorciones, así como las interacciones entre ellas en las interfases organizadas de electrodos monocristalinos de oro o de películas de oro nanoestructuradas, en contacto con disoluciones de electrolito. Para ello se utilizará una aproximación novedosa que combina los métodos electroquímicos con las distintas modalidades de la espectroscopía en el infrarrojo in situ. Los sistemas que se van a tratar se han elegido en dos niveles de aproximación a los sistemas vivos:

- ✓ Por una parte se formarán estructuras moleculares de las bases constituyentes del ADN individualmente y con su base complementaria sobre electrodos monocristalinos de oro, partiendo de las especies en disolución del electrolito, mediante el control electroquímico del potencial eléctrico. Una vez que se hayan establecido las condiciones electroquímicas de trabajo con medidas de voltametría cíclica y/o capacidad diferencial se ampliarán los estudios más microscópicos utilizando las técnicas in situ espectro-electroquímicas en el IR, tanto las de reflexión externa (SNIFTIRS, *Subtractively Normalised Interfacial Fourier Transform Infra Red Spectroscopy*) como las de reflexión interna (ATR-

SEIRAS, *Attenuated Total Reflection Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy*) En este último caso se requiere el uso de electrodos de oro nanoestructurados que favorezcan la reflexión interna y activen la intensificación superficial de las señales espectroscópicas. Se pretende así obtener información de la orientación del compuesto orgánico en la interfase y de las posibles interacciones intermoleculares entre compuestos de igual o distinta naturaleza. En algunos casos se estudiará también la cinética de la adsorción que, al ser relativamente rápida, requiere el uso de la técnica menos convencional de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*).

- ✓ Por otra parte, se realizará una aproximación mayor a las interfases biológicas mediante el estudio de electrodos recubiertos de películas de fosfolípidos modificadas con las moléculas orgánicas de interés. Como sistema modelo se ha elegido un nucleolípido comercial que contiene el grupo citosina y como cadenas lipídicas las del fosfolípido (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina). En este caso, la preparación de las estructuras superficiales requiere de un procedimiento diferente, ya que el nucleolípido no es soluble en disolución. Se recurre a la preparación de las películas anfifílicas en la interfase gas | disolución de la balanza de Langmuir, desde la que se realizan transferencias (de Langmuir-Blodgett y/o de Langmuir-Schaefer) a la superficie de los electrodos monocristalinos de oro. La caracterización electroquímica de las películas soportadas sobre oro se realiza mediante la voltametría cíclica, las medidas de capacidad diferencial y las de densidades de carga. Una vez determinados los límites de potencial que garantizan la estabilidad de las películas adsorbidas, se llevan a cabo los estudios espectro-electroquímicos en el IR, que requieren otra metodología distinta, la técnica de infrarrojos de PM-IRRAS (*Polarization Modulated InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy*). El motivo está en la dificultad de obtener las señales de referencia para la absorbancia, con el electrodo sin recubrir, por lo que es preciso recurrir a modular la polarización de la radiación infrarroja (IR) para obtener el espectro de referencia. Se pretende así obtener información sobre las conformaciones y las orientaciones de las películas en función del potencial aplicado y el posible efecto de la presencia de la base complementaria (en este caso la guanina) en disolución, con vistas a la

posible aplicación posterior de las películas para formar plataformas para reconocimiento molecular y/o para la liberación de medicamentos.

## **1.2 Estructura de la tesis**

En función de los objetivos, la tesis se ha estructurado conforme a dos partes: La primera de ellas dedicada a las adsorciones y co-adsorciones de las cuatro bases del ADN sobre electrodos de oro, y la segunda a la formación y caracterización de monocapas y bicapas del nucleolípido de citidina (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina) sobre electrodos de oro. En el capítulo de Introducción En el capítulo I se hace una introducción general de esta tesis, de sus objetivos y su estructura. Asimismo, se muestran los antecedentes bibliográficos acerca de las cuatro bases del ADN: sus propiedades ácido base, sus equilibrios tautoméricos así como sus adsorciones y co-adsorciones sobre electrodos de oro.

La primera parte comprende los capítulos II al V. En el capítulo II, se detallan los fundamentos teóricos de las técnicas de infrarrojos sobre superficies electródicas utilizadas en esta tesis; tanto para la primera como para la segunda parte, describiéndose en profundidad las modalidades de reflexión externa e interna y la modalidad de modulación de la polarización. Además se hace una descripción de las técnicas experimentales electroquímicas y espectroscópicas empleadas en general o sólo en la primera parte de la tesis, además de los métodos utilizados en la presente tesis para preparar depósitos metálicos en capa fina, las células, reactivos y electrodos usados y sus tratamientos o limpiezas previos antes de las medidas y así como los métodos de preparación de membranas miméticas sobre electrodos sólidos y medidas de isotermas en la interfase gas | disolución.

El capítulo III está dedicado al estudio espectro-electroquímico de las adsorciones y coadsorciones de las bases adenina y timina en función del pH (desde pH 1 a pH 12), sobre electrodos de oro monocristalinos o nanoestructurados. Se han realizado experimentos de transmisión en disolución, de reflexión externa “in-situ” sobre electrodos monocristalinos de oro con la orientación cristalográfica (111) en contacto con disoluciones que contienen independientemente adenina o timina o mezcla de ambas bases. Igualmente se han realizado espectros de espectroscopía de reflexión interna, haciendo uso de la configuración de Kretschmann, sobre electrodos

nanoestructurados de oro en disoluciones de H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O. Los resultados se discuten sobre la base de los datos obtenidos previamente por el grupo de investigación acerca de la adenina a otros valores de pHs del medio y de los resultados de cálculos teóricos DFT (*Teoría Funcional de Densidad*), que se han realizado también en esta tesis, así como otros datos teóricos de la bibliografía. De esta manera, en lo que respecta a la adenina se ha podido determinar el segundo pK<sub>a</sub> de la misma en estado adsorbido y se ha propuesto un modelo de adsorción para la forma aniónica de la adenina. En lo que respecta a la timina, se ha concluido que la adsorción va acompañada de la desprotonación de la molécula neutra, a todos los valores de pH estudiados, pero la preponderancia de las distintas formas tautoméricas de la timina aniónica adsorbida depende, en gran medida, del valor del pH del medio. Finalmente se han analizado las co-adsorciones de ambas bases en función del pH del medio.

En el capítulo IV se presenta el estudio cinético de la adsorción de adenina sobre electrodos de Au(111) en función del pH a los distintos potenciales de adsorción, mediante el análisis de la dispersión de los datos de impedancia con la frecuencia. Los resultados obtenidos en medios neutro y básico se han analizado utilizando un modelo descrito previamente en la bibliografía,<sup>4,5</sup> sin embargo, para analizar los resultados en medio ácido se han tenido que deducir las ecuaciones de impedancia para el caso de un proceso de adsorción que implica una etapa química de desprotonación homogénea previa. Del análisis de los datos de impedancia con la frecuencia se han obtenido los valores de resistencia de adsorción (R<sub>ad</sub>), coeficiente de Warburg (σ<sub>ad</sub>) y capacidad (C<sub>ad</sub>) del proceso de adsorción a cada potencial de adsorción, que se discuten en función de la especie adsorbida a cada pH y la dependencia de la adsorción con el potencial eléctrico. En el caso de la adsorción en medio ácido se ha podido determinar, además, la constante de equilibrio de la etapa de desprotonación, pK<sub>a1</sub>, en las proximidades de la superficie electródica.

El capítulo V contiene un estudio espectroelectroquímico de la adsorción y la co-adsorción de la guanina y de la citosina en función del pH, conforme a las mismas pautas metodológicas que en el capítulo IV, para la adenina y la timina. Los resultados de la adsorción sobre electrodos Au(111) dependen del estado reconstruido o no reconstruido de la superficie electródica y de los valores del pH del medio. Las medidas espectro-electroquímicas en el infrarrojos de reflexión interna sobre electrodos



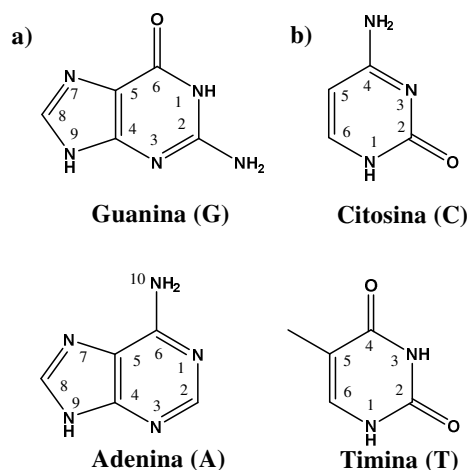
nanoestructurados de oro han resultado particularmente interesantes para analizar las coadsorciones de ambas bases.

La segunda parte comprende el capítulo VI y está dedicado al estudio de las películas del nucleolípido de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina, que contiene la molécula de la base citosina, la preparación y caracterización de monocapas y de bicapas soportadas en electrodos de oro, Au(111), así como las interacciones de la citosina de las películas con guanina en disolución. La primera parte del capítulo se dedica a las monocapas del nucleolípido y la segunda a las bicapas formadas por el nucleolípido y un tiol que se une al electrodo de oro por el átomo de azufre para formar una de las monocapas de la bicapa lipídica soportada sobre el electrodo. Las monocapas y bicapas se han caracterizado electroquímicamente mediante voltametría cíclica, medidas de capacidad diferencial y de densidad de carga, con las que se han delimitado las regiones de potenciales en los que las películas son estables. La caracterización estructural se discute sobre la base de los datos espectro-electroquímicos de infrarrojos obtenidos mediante la técnica de PM-IRRAS (*Polarization Modulated InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy*). Las medidas han permitido determinar la conformación y la orientación de las monocapas y bicapas respecto al electrodo en función del potencial aplicado y la influencia que sobre dichas conformaciones ejerce la presencia de la molécula de guanina en disolución.

Finalmente en el capítulo VII se enumeran las conclusiones generales más importantes obtenidas.

### **1.3 Antecedentes**

La adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C) son cuatro bases nitrogenadas heterocíclicas constituyentes indispensables del ADN, de cofactores y de ciertas moléculas señalizadoras, tales como el ATP,<sup>6,7</sup> que modulan las funciones de las proteínas además de jugar papeles fundamentales en la expresión del material genético, además de participar en diferentes funciones del metabolismo celular.<sup>8</sup> En función de su estructura se clasifican en dos grandes grupos; el primero formado por las bases púricas adenina y guanina mientras que el segundo lo constituyen las bases pirimidínicas timina y citosina como se muestra en la figura 1.1.



**Fig. 1.1** Estructura de las bases del ADN a) púricas; adenina y guanina y b) pirimidínicas; citosina y timina

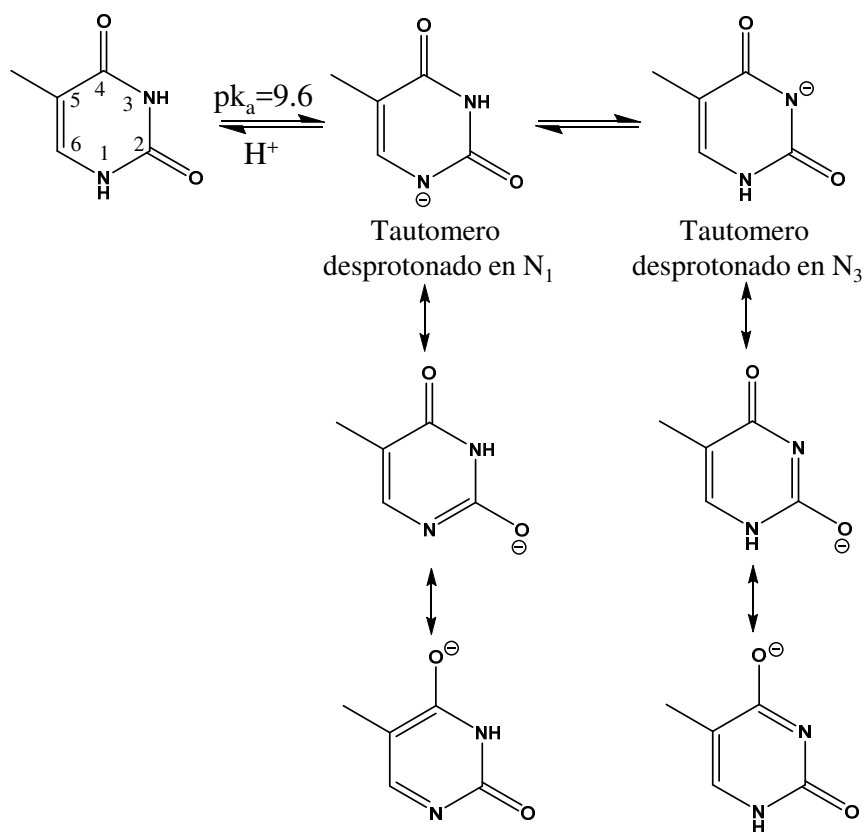
Los iones metálicos también juegan un papel fundamental en ciertas funciones biológicas en las que participa el ADN y el ARN como el ensamblado de las moléculas de ARN o en la estabilización de la estructura terciaria del ADN.<sup>9</sup>

Dado la participación de estas moléculas en equilibrios ácido-base resulta interesante estudiar su comportamiento en función del pH ya que en entornos biológicos bien organizados puede originar diferentes interacciones con el metal,<sup>9-11</sup> o influir en su actividad biológica, por ejemplo, hay claras evidencias de que la triple hélice del ADN se estabiliza en condiciones ácidas de pH,<sup>12</sup> lo que sugiere claramente que la protonación de estas bases puede ayudar a su estabilización. Además, se ha encontrado que estos valores de pH pueden variar dependiendo de donde se localice la base dentro de la cadena de ADN y ARN,<sup>13</sup> su proximidad a iones metálicos<sup>14</sup> e incluso el estado de oxidación que presten las bases nitrogenadas.<sup>15-17</sup>

Así, en función del pH estos compuestos pueden presentarse en distintas formas; neutra, protonada o desprotonada que a su vez pueden presentar diferentes formas tautoméricas dependiendo de la posición de protonación/desprotonación o los equilibrios ceto/enólicos y/o imino/enamina. De forma general la configuración enol se obtiene por migración de un átomo de hidrógeno de un átomo en posición alfa al oxígeno del grupo carbonilo, mientras que la configuración imino se obtiene por el movimiento de un átomo de hidrógeno desde un átomo en alfa al nitrógeno de un grupo enamina. Estos tautómeros “inestables” de las bases del ADN pueden dar lugar a la formación de pares complementarios incorrectos de bases del ADN, que

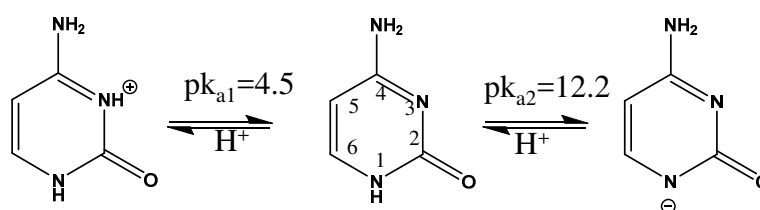
estructuralmente son muy similares, en cuanto a número y posición de puentes de hidrógeno, a los pares naturales de bases complementarias.<sup>18</sup> Sin embargo, suelen contener información genética incorrecta en el proceso de transcripción del ADN y esto se traduce en la aparición de mutaciones espontáneas y enfermedades entre las que se encuentran Cáncer y el Parkinson.<sup>1,19</sup> Debido a su importancia durante la última década se han venido realizando numerosas investigaciones sobre los tautómeros aislados utilizando técnicas espectroscópicas y cálculos DFT<sup>20-26</sup> para analizar su estabilidad en diferentes medios. Así, por ejemplo, estudios teóricos han propuesto modelos en fase gaseosa, en ambiente microhidratado y en fase acuosa, respectivamente.<sup>27-29</sup> Se han estudiado, además, diversos factores que favorecen la interacción entre tautómeros “normales” y “raros” tales como, las modificaciones químicas,<sup>30</sup> las interacciones con cationes metálicos,<sup>31,32</sup> y la carga neta<sup>33</sup>, entre otros. Además, se ha encontrado que las moléculas de agua juegan un papel fundamental, ya que una molécula de agua puede influir en la estabilidad de diferentes formas tautoméricas gracias a la formación de puentes de hidrógeno<sup>29</sup> reduciendo la barrera energética de interconversión entre tautómeros.

La timina puede existir en disolución dos formas químicas fundamentales, neutra y aniónica, relacionadas por un equilibrio ácido-base con un valor de  $pK_a$  de 9.6 (figura 1.2). Está descrito en la bibliografía que la forma neutra se ha encontrado en fase gaseosa,<sup>22</sup> en matrices de gas inerte<sup>34,35</sup> y en estado sólido cristalino<sup>36-39</sup> mientras que la forma aniónica se ha encontrado en complejos metálicos de sales alcalinas<sup>40-42</sup> y adsorbidas sobre las superficies electródicas.<sup>43,44</sup> Estas moléculas poseen grupos funcionales propicios a dar tautomería de tipo ceto-enólica o imina-enamina lo que proporciona la posibilidad de diversas formas tautoméricas. Sin embargo, se ha confirmado que la molécula neutra solamente existe en su forma diceto, mientras que la forma aniónica puede presentar dos formas tautoméricas posibles: bien desprotonada en  $N_1$  en la que la deslocalización de la carga electrónica  $\pi$  del anillo aromático tiene lugar entre los grupos  $[O=C_2=N_1=C_6=C_5=C_4=O]$ , o bien en  $N_3$ , en cuyo caso esta deslocalización se da entre los grupos  $[O=C_2=N_3=C_4=O]$  (Figura 1.2).



**Fig. 1.2** Comportamiento ácido-base de la timina

La otra base pirimidínica, la citosina, en disoluciones moderadamente ácidas tiene protonado el nitrógeno  $N_3$ , mientras que son necesarias condiciones fuertemente alcalinas para conseguir desprotonar el nitrógeno  $N_1$ , ya que posee dos valores de  $pK_a$  el primero a 4.5 mientras que el segundo tiene lugar a 12.2.



**Fig. 1.3** Comportamiento ácido-base de la citosina

Al igual que en el caso de la timina, la citosina puede presentar distintas formas tautoméricas (Figura 1.4) que están próximas en energía y poseen barreras pequeñas de energía potencial que permiten que se interconviertan fácilmente unas en otras.<sup>20</sup> Estudios teóricos de DFT<sup>23,45,46</sup> concluyen que en fase gaseosa la más estable es la forma C2b, seguida por las C1 y C3a. Los otros tautómeros son más inestables ya que presentan energías superiores.

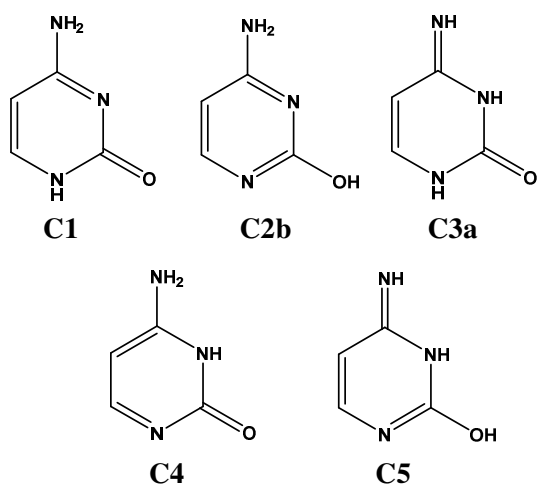


Fig. 1.4 Tautómeros más estables de la citosina

En disoluciones acuosas<sup>47</sup> la adenina presenta dos equilibrios ácido-base; el primero de ellos relacionado con la protonación del nitrógeno piridínico en N<sub>1</sub> con un pK<sub>a1</sub> de 4.2; mientras que el segundo se relaciona con la pérdida de un protón imidazólico en N<sub>9</sub> y presenta un pK<sub>a2</sub> de 9.8 (Figura 5) Esto hace que la adenina en disolución pueda encontrarse en forma protonada (AdH<sub>4</sub><sup>+</sup>), neutra (AdH<sub>3</sub>) y aniónica (AdH<sub>2</sub><sup>-</sup>) dependiendo del valor del pH del medio.

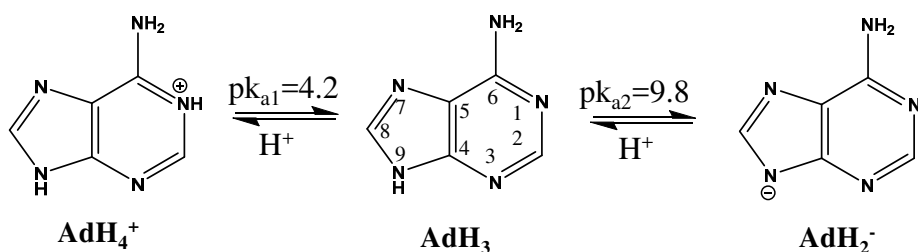


Fig. 1.5 Comportamiento ácido-base de la adenina

Finalmente la guanina en disolución acuosa también participa en dos equilibrios ácido-base con valores de pK<sub>a</sub> de 4.2 y 9.5. De tal forma que al igual que en el caso de la adenina en función del pH la molécula puede estar protonada, neutra o desprotonada como se muestra en la figura 1.6.

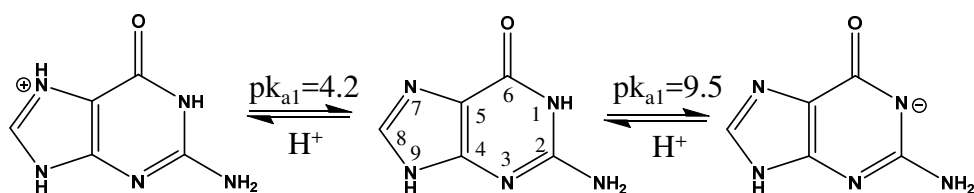
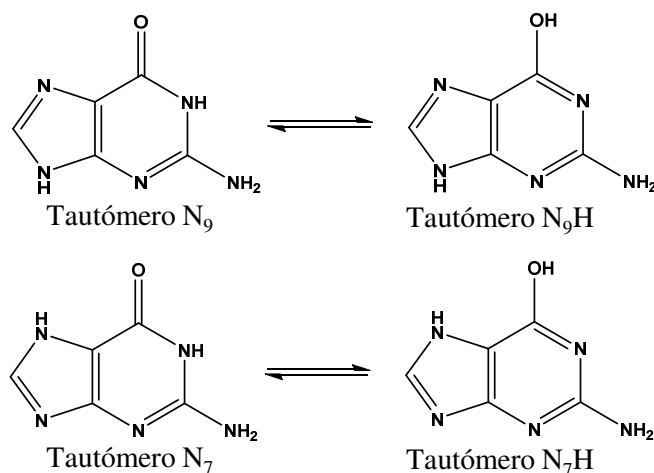


Fig. 1.6 Comportamiento ácido-base de la guanina

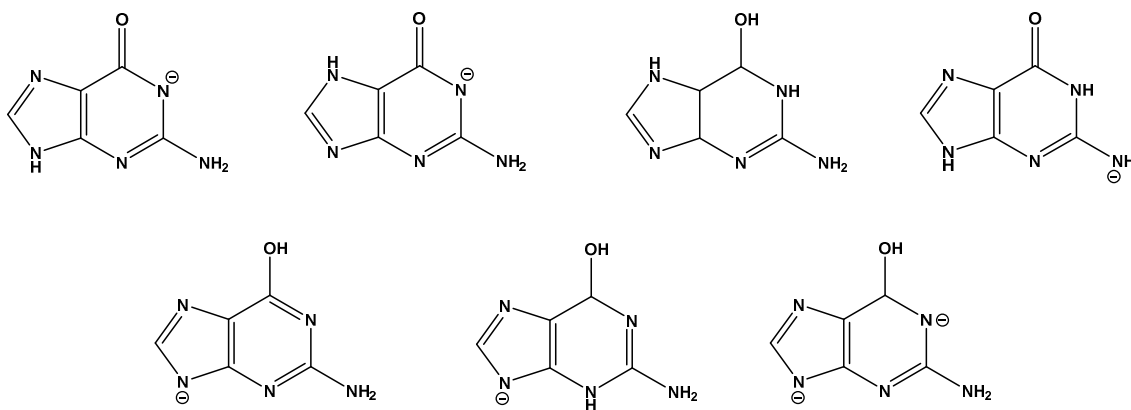
La guanina es la nucleobase con mayor número de formas tautoméricas, ya que puede presentar tanto formas ceto/enol e imino/enamino ( $N_1H-N_3H$ ,  $N_7H-N_9H$ ). Se han realizado estudios y cálculos teóricos acerca del tautomerismo de la forma neutra de la guanina<sup>48-52</sup> que han puesto de manifiesto la presencia de cuatro tautómeros más estables en fase gaseosa de menor energía relacionados con los equilibrios ceto/enólico de acuerdo con la figura 1.7.



**Fig. 1.7** Tautómeros más estables de la guanina neutra

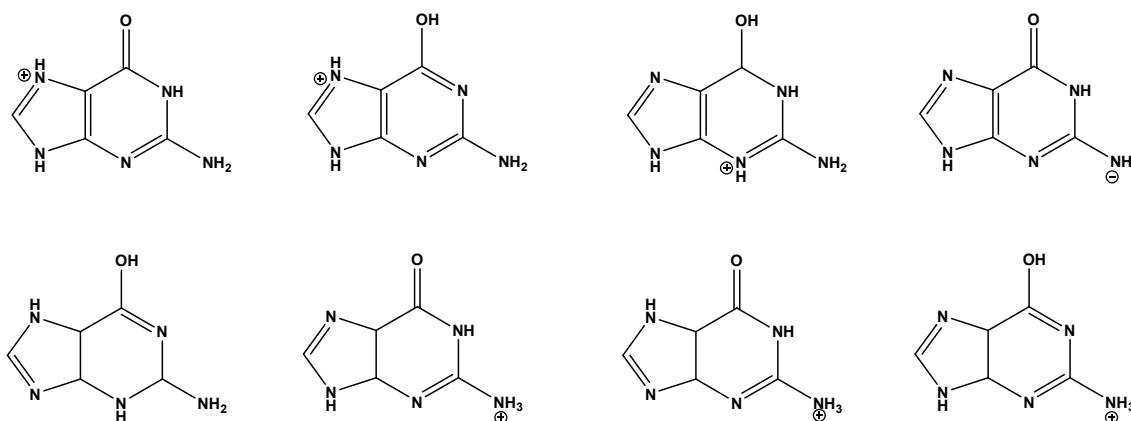
*Leonid Gorb y col.*<sup>27</sup> han encontrado que los tres tautómeros más estables de la guanina son N<sub>7</sub>, N<sub>9</sub> y N<sub>9</sub>H y, que además, difieren mucho con la energía del tautómero N<sub>7</sub>H. Sin embargo, en disolución acuosa o disolventes polares la estabilidad es algo diferente debido a los efectos de solvatación que pueden influir en factores tales como el momento dipolar de la molécula. En estas condiciones se ha encontrado que la forma ceto predomina sobre la enol siendo el orden de estabilidad el siguiente: N<sub>9</sub>>N<sub>7</sub>>N<sub>9</sub>H>N<sub>7</sub>H. Además en disolución acuosa se ha encontrado que existe una mezcla de las dos formas ceto (N<sub>9</sub> y N<sub>7</sub>).<sup>49</sup>

Sin embargo los estudios de los tautómeros de la guanina protonada o desprotonada en disolución acuosa son más escasos. Los tautómeros más estables de la guanina desprotonada y protonada se muestran en las figuras 1.8 y 1.9 respectivamente.



**Fig. 1.8** Tautómeros más estables de la guanina desprotonada

Se ha encontrado que para los tautómeros desprotonados de la guanina los que se encuentran en su forma ceto también son más estables que los que están en forma enólica.<sup>53</sup>

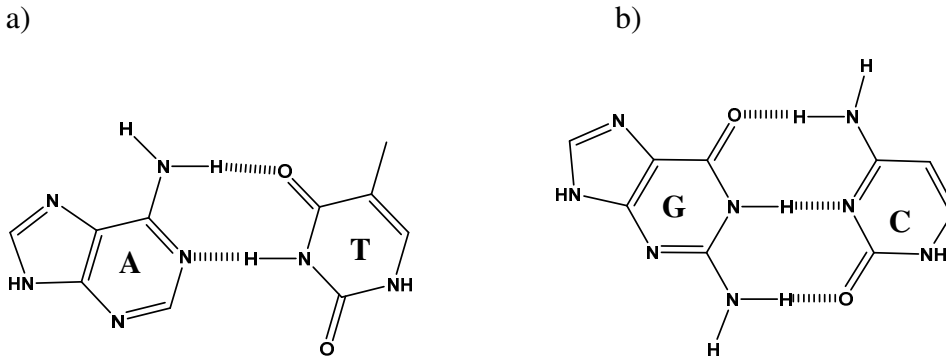


**Fig. 1.9** Tautómeros más estables de la guanina protonada

Según los estudios teóricos DFT el tautomero ceto protonado en N7 es el más estable mientras que de nuevo los tautómeros en forma enol se ha encontrado que son los menos estables.<sup>53</sup>

Por otro lado estos compuestos tienen mucha facilidad para formar complejos con su base complementaria uniéndose a través de puentes de hidrógeno en los que un átomo actúa de donador de un átomo de hidrógeno mientras otro lo hace de aceptor. Estas interacciones son las responsables del reconocimiento molecular entre las bases complementarias del ADN y ARN y, en última instancia por tanto, del mantenimiento del código genético. De acuerdo con la bibliografía existen actualmente dos modelos que describen estas interacciones; el de Watson-Crick y el de Hoogsteen. El primero de ellos fue descrito en 1953 por J.Watson y F.Crick y publicado en la revista Nature.<sup>54</sup>

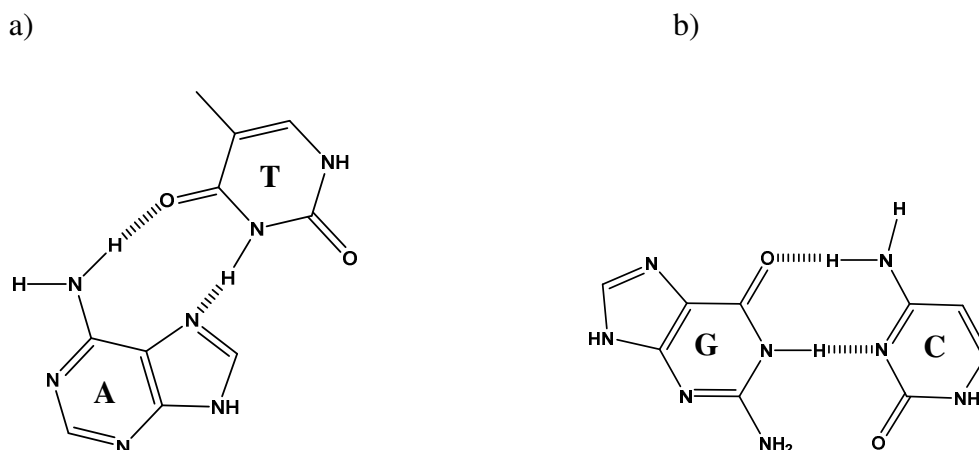
Este tipo de interacción es la que en principio se pensó que tenía lugar en el ADN y ARN. Según este modelo (Figura 1.10) el par adenina-timina se estabiliza por dos puentes de hidrógeno entre los átomos  $N_1(A) \leftarrow N_3(T)$  y  $N_{10}(A) \rightarrow O_4(T)$ , mientras que el par guanina-citosina lo hace a través de tres puentes de hidrógeno entre  $N_1(G) \rightarrow N_3(C)$ ,  $O_6(G) \leftarrow N_4(C)$  y  $N_2(G) \rightarrow O_2(C)$ .



**Fig. 1.10** Modelo de Watson-Crick de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias; a) adenina (A)-timina (T) y b) guanina (G)-citosina(C)

Por otro lado K. Hoogsteen<sup>55</sup> fue el primero en confirmar experimentalmente la capacidad de las nucleobases para formar pares de bases y determinó la especificidad de esta unión según la cual la adenina se une a la timina mientras que la guanina lo hace a la citosina. Se han llevado a cabo experimentos en disoluciones mixtas que fueron analizados con la técnica de difracción de rayos X,<sup>56</sup> encontrándose que la geometría de las interacciones era diferente a la previamente descrita por Watson-Crick. Según este modelo ambos pares de bases complementarias quedan estabilizadas por dos puentes de hidrógeno en el caso de la adenina-timina entre los átomos  $N_{10}(A) \rightarrow O_4(T)$  y  $N_7(A) \leftarrow N_3(T)$  mientras que en el caso de la guanina-citosina se da entre los átomos  $N_4(C) \rightarrow O_6(G)$  y  $N_1(G) \leftarrow N_3(C)$  (Figura 1.11).

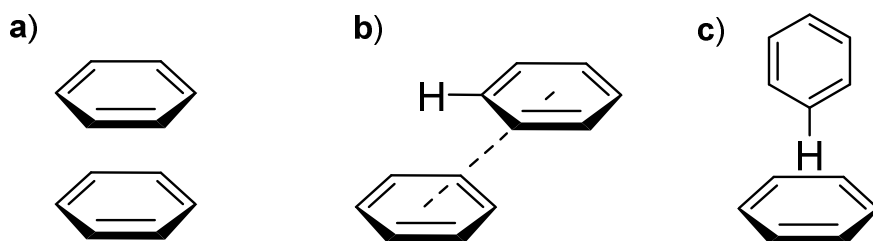




**Fig. 1.11** Modelo de Hoogsteen de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias; a) adenina (A)-timina (T) y b) guanina (G)-citosina(C)

Diversos estudios mecánico-cuánticos han confirmado la capacidad de las bases complementarias del ADN de formar complejos tanto en la geometría de Watson-Crick como en la de Hoogsteen. Estos estudios concluyen que las uniones de tipo Hoogsteen son más estables,<sup>57</sup> aunque las diferencias estructurales entre ambos tipos de interacciones son aun objeto de estudio en la actualidad. De hecho algunos artículos en la bibliografía proponen actualmente que la unión entre bases complementarias en el ARN<sup>58</sup> y ADN<sup>59</sup> es de tipo Hoogsteen en vez de Watson-Crick como se venía pensando. De hecho este tema también resulta de gran interés actualmente y muchos estudios mecanico-cuánticos se centran en intentar aclarar las peculiaridades de la estructura y organización de estas interacciones.

Las interacciones entre bases nitrogenadas pueden estar estabilizadas también mediante interacciones no covalentes<sup>60</sup> jugando estas un papel fundamental en la distancia de separación entre bases.<sup>61</sup> Una de las interacciones no covalentes más significativa en biomoléculas, y por tanto en el ADN, es la interacción areno-areno, también denominada como interacción  $\pi$ - $\pi$  o “ $\pi$ -stacking”. Entre las geometrías descritas para esta interacción se encuentran: (a) la geometría face-to-face o de tipo sándwich; (b) desplazamiento paralelo y (c) edge-to-face o en forma de T (Figura 1.12).<sup>62</sup>



**Fig. 1.12** Modelos de interacción  $\pi$ - $\pi$  o “ $\pi$ -stacking”

La estabilidad de cada una de estas geometrías depende del tamaño y los sustituyentes de los arenos implicados. No obstante, en base a cálculos DFT y estudios cristalográficos las geometrías más estables, en general, son la de desplazamiento paralelo y en forma de T.<sup>63,64</sup> Cuando se analizan anillos de tipo heteroaromáticos, la geometría más estable es la de tipo edge-to-face.<sup>65</sup> En este contexto, las bases nitrogenadas están implicadas en este tipo de interacciones. Así, se dan interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre nucleobases y aminoácidos como modelo de las interacciones proteína-DNA.<sup>66,67</sup>

El estudio del comportamiento interfacial de las bases del ADN en interfases creadas entre un electrodo y una disolución puede proporcionar información relevante sobre su comportamiento en interfases biológicas reales.<sup>68,69</sup> Por tanto, la adsorción de estos compuestos ha sido ampliamente estudiada inicialmente sobre electrodos de mercurio y carbono, utilizando técnicas electroquímicas como la polarografía de corriente alterna, las medidas de capacidad diferencial y la voltametría cíclica. En los últimos años, al poder disponer de superficies metálicas sólidas limpias y bien definidas, de metales nobles tales como la plata, el cobre o el oro ha permitido el uso de técnicas microscópicas y espectroscópicas en el estudio de la adsorción de estos compuestos pudiendo estudiar de forma más detallada las interacciones entre el adsorbato y el metal en la interfase. En el caso de las bases del ADN el estudio a nivel fundamental de la morfología, la organización y la estructura cristalina y electrónica de la capa de adsorbato en la interfase puede ser muy interesante aunque compleja ya que estas biomoléculas presentan diferentes sitios por los que pueden interactuar con la superficie metálica, además, como se ha mencionado anteriormente, presentan distinto grado de protonación en función del pH del medio y tienen también la posibilidad de encontrarse en diferentes formas tautoméricas. Sin embargo, se sabe que tanto las bases púricas como las pirimidínicas forman monocapas organizadas sobre superficies electródicas.

En lo que respecta a la adsorción de la adenina, en los últimos años el grupo de la Universidad de Sevilla en el que se ha realizado la Tesis, viene estudiando el comportamiento espectro-electroquímico de la adsorción de adenina sobre electrodos monocristalinos y nanoestructurados de oro combinando técnicas electroquímicas y distintas modalidades de espectroscopía FT-IR in situ, así como la microscopía STM-Electroquímica. Los estudios han estado limitados a los medios neutros y ácidos. En medio neutro se ha analizado mediante voltametría cíclica, medidas de capacidad diferencial y cronoamperometría, la adsorción de la adenina sobre electrodos de oro de bajo índice de Miller (Au(111) y Au(100)).<sup>2</sup> Se ha encontrado que la adsorción depende fuertemente de la orientación cristalográfica del electrodo y de la estructura reconstruida o no-reconstruida de la superficie del electrodo. De hecho, la adsorción de la adenina sobre electrodos recién tratados a la llama siguiendo el procedimiento de Clavilier va acompañada de la pérdida de la reconstrucción de la superficie del electrodo. Los resultados obtenidos del análisis termodinámico de la adsorción de la adenina sobre electrodos Au(111) en medios neutros han indicado que la adenina interacciona químicamente con el electrodo de oro, probablemente mediante una unión covalente entre ambos en la que la adenina se esperara que actúe como agente donador de electrones,<sup>2</sup> con un valor máximo de energía libre de Gibbs de  $-35 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Además los datos de exceso superficial máximo ( $3.5 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ ) han indicado que la adenina se debe adsorber con una cierta inclinación del plano molecular respecto a la estructura del oro. Por otra parte, se ha estudiado la cinética de la adsorción de la adenina sobre electrodos Au(111), en medio neutro, mediante la técnica de espectroscopía electroquímica de impedancias.<sup>70</sup> Se han podido obtener los parámetros cinéticos para el proceso de adsorción/desorción de la adenina analizando la dispersión con la frecuencia de los datos de impedancia electroquímica a los diferentes potenciales de adsorción, conforme al modelo cinético desarrollado en la bibliografía.<sup>4,5</sup> Para poder realizar el análisis cuantitativo se tuvo que diseñar un procedimiento de medidas de impedancia que evitara la interferencia con los fenómenos de reconstrucción/pérdida de la reconstrucción de la superficie del oro.

Con el fin de obtener información microscópica sobre el proceso de adsorción así como una mayor comprensión sobre la naturaleza de las interacciones en la interfase se han venido realizando en el grupo de la Universidad de Sevilla estudios de espectroscopía de reflexión-absorción en el infrarrojo (IRRAS) y de microscopía de efecto túnel (STM)

ambos in situ en células electroquímicas, bajo control de potencial. Las medidas de STM electroquímico han confirmado que la quimisorción de la adenina provoca la eliminación de la reconstrucción superficial del oro, y se ha observado que el 4% de átomos en exceso contenidos en la superficie reconstruida se acomodan en muchas “islas” muy pequeñas que se agrupan siguiendo las direcciones a lo largo de las cuales discurrían los solitones de la superficie reconstruida, lo que sugiere que, en presencia de adenina quimisorbida, la movilidad de los átomos de oro de la superficie es muy baja. Además se ha encontrado que la adenina se organiza formando cordones de moléculas de adenina alineados a lo largo de las tres direcciones cristalográficas principales del monocristal. La distancia entre moléculas en una misma cadena sugiere la existencia de interacciones entre los orbitales  $\pi$  de los grupos aromáticos. Por otra parte, la aplicación de las técnicas “in-situ” de espectroscopía de reflexión-absorción en el infrarrojo al estudio de la adsorción en medios neutros ha aportado información acerca de los sitios de adsorción y de la inclinación del plano molecular de la especie adsorbida, entre otros aspectos. Así, se ha concluido que efectivamente la adenina se adsorbe con su plano ligeramente inclinado respecto a la superficie del electrodo e interacciona con la superficie del oro a través del nitrógeno amínico  $N_{10}$  y el nitrógeno pirimidídico,  $N_1$ , o alternativamente el nitrógeno imidazólico,  $N_7$ . Un análisis cuantitativo posterior<sup>71</sup> de la adsorción de la adenina en medio neutro, que hace uso de la técnica llamada SNIFTIRS cuantitativo ha facilitado determinar exactamente que el plano de la molécula de adenina neutra adsorbida está inclinado  $40^\circ$  respecto a la normal a la superficie del electrodo y rota  $16^\circ$  alrededor de su eje normal cuando se produce un aumento del potencial. Esta orientación implica que la molécula de adenina debe interaccionar con el electrodo a través de  $N_{10}$  y  $N_1$ . Además de ello se ha propuesto que existen interacciones de tipo  $\pi$  stacking entre moléculas adyacentes.<sup>71</sup> Por otra parte, el análisis de los resultados espectro-electroquímicos en medio muy ácido permitido concluir que aunque en disolución la adenina se encuentra protonada en estas condiciones de pH, solamente la adenina neutra es capaz de interaccionar químicamente con el metal. No obstante, se ha podido detectar la adsorción física de la adenina protonada a bajos potenciales y concentraciones. Fuera de estas condiciones, la adsorción química, más favorable energéticamente, induce la desprotonación previa de la adenina que existe en la disolución.

Uno de los trabajos pioneros acerca de la adsorción de la timina,<sup>72</sup> que hace uso de las técnicas microscópicas de STM y AFM, ha concluido que la timina no se adsorbe espontáneamente sobre electrodos de Au(111) si no que es necesario aplicar un potencial superior a  $0.4V_{SCE}$  para que la timina se organice sobre la superficie del electrodo formando una red oblicua. Más recientemente Roelfs *et al*<sup>73</sup> han estudiado la formación de películas de timina sobre superficies de Au(100) en disoluciones acuosas mediante medidas de voltametría cíclica y capacidad diferencial. Estos estudios han permitido demostrar que sobre superficies reconstruidas recién tratadas a la llama se adsorben adcapas condensadas de timina mientras que sobre la superficie no-reconstruida del electrodo no se ha observado ningún estado adsorbido condensado de la timina. Un estudio similar realizado por Holzle *et al*<sup>74</sup> sobre electrodos de Au(111) ha determinado cuatro regiones en el voltograma separadas por picos de transiciones de fase. Así, a potenciales bajos proponen la existencia de una fase fisisorbida que se va ordenando al aumentar el potencial, mientras que a potenciales mayores la timina se adsorbe químicamente formando una fase condensada ordenada. Han observado una fuerte dependencia con el pH en la formación de la fase quimisorbida que se explica como consecuencia de la desprotonación previa de la molécula antes de adsorberse. Además sugieren que esta fase quimisorbida queda estabilizada por interacciones intermoleculares entre moléculas de timina. Por último han completado los estudios electroquímicos sobre electrodos monocristalinos de Au(111) y (100) y ampliado a electrodos de Au(210), para los que han corroborado que los diferentes estados de adsorción de la timina dependen fuertemente del potencial del electrodo, de la temperatura y de la naturaleza del disolvente, de la concentración de la disolución y del pH. Además sobre el electrodo de Au(210) no se ha observado la fase condensada desordenada. Por otra parte, sobre electrodos de Au(111) estudios “in-situ” de STM y “ex-situ” de XPS han confirmado la alta estabilidad de la región quimisorbida ordenada y que la transformación desde un estado fisisorbido a uno quimisorbido implica una desprotonación previa de la molécula de timina.<sup>75</sup> Se han encontrado dos fases adsorbidas que presentan diferentes estructuras. La primera de ellas se ha descrito como una fase desordenada en la que las moléculas de timina están paralelas respecto a la superficie del electrodo, mientras que la segunda a potenciales mayores está compuesta por moléculas de timina verticales unidas a la superficie del electrodo de oro a través del nitrógeno  $N_3$ , ordenadas en filas que se conectan entre sí a través de puentes de hidrógeno. Finalmente los espectros de infrarrojo de absorción-reflexión externa de la

timina adsorbida sobre superficies electrónicas de Au(111) se han utilizado para evaluar la estructura y la unión de las moléculas de timina al sustrato.<sup>43</sup> El estudio de las bandas asociadas a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos en medio ácido en comparación con la timina en disolución y espectros de complejos metálicos publicados en la bibliografía han permitido concluir que en la fase quimisorbida la timina se coordina al electrodo a través de sus dos grupos carbonilos y su N<sub>3</sub>, previamente desprotonado, mientras que en la fase fisisorbida la molécula se dispone con el plano molecular paralelo respecto a la superficie del electrodo.

En el caso de la citosina existen en la bibliografía diversos estudios de STM en interfases líquido-sólido que han sido indispensables para estudiar la adsorción y la estructura que la citosina adopta sobre electrodos de Au(111). Así en disolución bajo control electroquímico o sin él la citosina se adsorbe espontáneamente sobre la superficie del electrodo de Au(111) formando una red oblicua<sup>72</sup>. Wandloswski *et al.*<sup>76</sup> combinando la voltametría cíclica con técnicas microscópicas de STM han descrito en medio neutro y ácido tres regiones de adsorción diferentes para la molécula de citosina en función del potencial. En orden creciente de potencial se han descrito como una fase desordenada “diluida” (estado I), seguida por una región de transición en la que la molécula se reorienta (estado II) para acabar con una fase quimisorbida (estado III) a los potenciales más altos. Se ha propuesto un modelo estructural para la fase quimisorbida en el que las moléculas de citosina se coordinan a la superficie del oro a través del nitrógeno en posición tres. Otros estudios por espectroscopía de reflexión-adsorción en el infrarrojo han mostrado un crecimiento en 2D de la monocapa de citosina sobre la superficie electrónica de oro en medio neutro y ácido.<sup>77</sup> El análisis de los espectros en la región entre 1800-1350 cm<sup>-1</sup> ha confirmado la existencia de una fase fisisorbida a potenciales negativos y una quimisorbida a potenciales positivos. En ambos casos se ha descrito que la molécula interacciona con la superficie del electrodo a través del oxígeno del grupo carbonilo en posición 2, del nitrógeno del grupo amino y del N<sub>3</sub> del anillo pirimidínico. Todos estos estudios realizados han resultado depender tanto del potencial aplicado como del pH del electrolito por tanto estas estructuras debían verse afectadas fuertemente por las propiedades de la disolución. Recientemente se han combinado la microscopía de STM con cálculos teóricos DFT<sup>78</sup> que han permitido determinar que la citosina se adsorbe sobre superficies electrónicas de Au(111) formando una red de filamentos y anillos unidimensionales interconectados entre sí.

Debido a la débil interacción de las moléculas de citosina con la superficie del oro las estructuras bidimensionales quedan estabilizadas principalmente por puentes de hidrógeno entre las moléculas de citosina.

Por el contrario hasta el momento existen pocos estudios de la adsorción de la guanina sobre electrodos de oro ya que se ha encontrado que la adsorción/desorción de la guanina tiene lugar a potenciales muy próximos a los que tiene lugar la oxidación/reducción de esta molécula,<sup>79,80</sup> quedando así la ventana de trabajo para estudiar el proceso de adsorción/desorción muy limitada. Las medidas de reflexión sobre electrodos de oro han permitido proponer una reorientación de las moléculas de guanina de paralelo a perpendicular al aumentar el potencial.<sup>81</sup> Las imágenes de STM han revelado que las guanina al adsorberse sobre electrodos de Au(111) forma matrices poliméricas apiladas desordenadas en las que las moléculas interaccionan a través de puentes de hidrógeno.<sup>72</sup> Los estudios recogidos en la bibliografía se han centrado en la oxidación electroquímica sobre electrodos de oro a valores de pH neutro,<sup>82</sup> proponiendo la formación de 8-oxo-7,8-dihidroguanina. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios espectroelectroquímicos sobre oro del proceso de adsorción/desorción.

Los estudios de co-adsorción de las bases complementarias son más escasos. Desde un punto de vista teórico se han estudiado los pares complementarios de moléculas de bases del ADN en estado gaseoso<sup>83,84</sup> lo que ha permitido analizar de forma teórica el efecto que los puentes de hidrógeno producen en los espectros de las moléculas individuales. En el caso particular del par complementario adenina-timina se ha estudiado por voltametría cíclica de forma cualitativa su co-adsorción sobre electrodos de Au(111).<sup>85</sup> En estos estudios proponen la interacción entre ambas bases a potenciales negativos donde se encuentran orientadas con su plano molecular paralelo a la superficie del electrodo. La interacción en estas condiciones depende fuertemente de la temperatura, del valor del pH, de la rugosidad de la superficie del electrodo y de la relación de concentraciones. Sin embargo a los potenciales positivos donde proponen que ambas están orientadas perpendicularmente respecto al electrodo no han encontrado co-adsorción entre ambas bases. Kimura-Suda *et al.*<sup>86</sup> han estudiado mediante espectroscopía FTIR sobre superficies de oro policristalino la adsorción competitiva entre los pares de bases del ADN adsorbiendo sobre esta superficie hebras de ADN monocatenario. En este caso sus estudios no han demostrado la existencia de complejos

de transferencia de carga con el oro en los que participen conjuntamente moléculas de adenina y timina. Demuestran que la alta capacidad de adsorción del oligonucleótido de adenina permite que compita con el oligonucleótido tiolado de timina, adsorbido químicamente, haciendo esto que los híbridos formados por timina y adenina se desnaturalicen en presencia de oro. Utilizando la técnica TERS (*Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*) se ha investigado el complejo A-T sobre electrodos de Au(111),<sup>87</sup> proponiéndose que la interacción con el electrodo tiene lugar a través de la molécula de adenina, por los mismos puntos de unión que lo hace la adenina aislada, quedando la molécula de timina expuesta hacia el exterior de la superficie de oro. Estos hechos están en concordancia con los resultados previos obtenidos por Kimura-Suda *et al.*<sup>86</sup> y Demers *et al.*,<sup>88</sup> quienes demostraron que la timina presenta la interacción más débil con el oro mientras que la adenina es la base que más fuertemente interacciona con este metal. Se ha propuesto que el pH y la concentración relativa de ambas bases juega un papel importante en este proceso ya que la interacción se ve favorecida cuando la concentración de timina se mantiene en la interfase en mayor proporción que la adenina y a valores de pHs en el que ambas bases están protonadas.<sup>87</sup> Las interacciones por puentes de hidrógeno entre bases complementarias se han estudiado también utilizando medidas de infrarrojos de reflexión externa en complejos formados por timidina y un derivado tiolado de adenina, adsorbidos sobre electrodos de oro.<sup>89</sup> En este estudio se ha demostrado que la interacción por puentes de hidrógeno está fuertemente afectada por la protonación y orientación del derivado de adenina respecto al electrodo además de por el potencial aplicado. Los puentes de hidrógeno solo se han observado a potenciales positivos mayores de 0.1V<sub>SCE</sub>, debido a motivos estéricos, ya que a estos valores de potencial se ha propuesto que el derivado de adenina esta desprotonado y con la orientación más adecuada, perpendicular, para dar la interacción con la timidina.

#### 1.4 Bibliografía

1. Cekan, P. & Sigurdsson, S. T. Identification of single-base mismatches in duplex DNA by EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18054–18056 (2009).
2. Prado, C., Prieto, F., Rueda, M., Feliu, J. & Aldaz, A. Adenine adsorption on Au(1 1 1) and Au(1 0 0) electrodes: Characterisation, surface reconstruction effects and thermodynamic study. *Electrochim. Acta* **52**, 3168–3180 (2007).
3. Wandlowski, T. & Holzle, M. H. Structural and thermodynamic aspects of phase



- transitions in uracil adlayers. A chronocoulometric study. *Langmuir* **12**, 6604–6615 (1996).
4. A. Frumkin, V. M. Determination of the Kinetics Adsorption of Organic Substances by ac Measurements of the Capacity and the Conductivity at the Boundary Electrode-Solution. *Dolk. Acad. Nauk* **77**, 855 (1951).
  5. Kerner, Z. & Pajkossy, T. Measurement of adsorption rates of anions on Au(111) electrodes by impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* **47**, 2055–2063 (2002).
  6. Huang, F. Efficient incorporation of CoA, NAD and FAD into RNA by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res.* **31**, 8e–8 (2003).
  7. Schwiebert, E. M. & Zsembery, A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1615**, 7–32 (2003).
  8. Young-Tae, C. *et al.* Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Biol.* **6**, 361–375 (1999).
  9. Pyle, A. M. Metal ions in the structure and function of RNA. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 679–90 (2002).
  10. Gregory W. Muth, Lori Ortoleva-Donnelly, S. A. S. & Muth, G. W. A Single Adenosine with a Neutral pKa in the Ribosomal Peptidyl Transferase Center. *Science* (80-. ). **289**, 947–950 (2000).
  11. Oyelere, A. K., Kardon, J. R. & Strobel, S. A. pKa perturbation in genomic Hepatitis Delta Virus ribozyme catalysis evidenced by nucleotide analogue interference mapping. *Biochemistry* **41**, 3667–3675 (2002).
  12. Völker, J. & Klump, H. H. Electrostatic effects in DNA triple helices. *Biochemistry* **33**, 13502–8 (1994).
  13. Acharya, S. *et al.* Significant pKa perturbation of nucleobases is an intrinsic property of the sequence context in DNA and RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8674–8681 (2004).
  14. Roitzsch, M. & Lippert, B. Metal Coordination and Imine-Amine Hydrogen Bonding as the Source of Strongly Shifted Adenine pKa Values. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2421–2424 (2004).
  15. Candeias, L. P. and Steenken, S. Structure and Acid-Base Properties of One-Electron-Oxidized Deoxyguanosine, Guanosine, and 1 -Met hylguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1094–1099 (1989).
  16. Steenken, S. & Jovanovic, S. V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J.*

- Am. Chem. Soc.* **119**, 617–618 (1997).
17. Steenken, S., Jovanovic, S. V., Bietti, M. & Bernhard, K. The trap depth (in DNA) of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as derived from electron-transfer equilibria in aqueous solution [2]. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2373–2374 (2000).
  18. Tsolakidis, A. & Kaxiras, E. A TDDFT study of the optical response of DNA bases, base pairs, and their tautomers in the gas phase. *J. Phys. Chem. A* **109**, 2373–2380 (2005).
  19. Polymeropoulos, M. H. *et al.* Mutation in the  $\alpha$ -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science (80-. )*. **276**, 2045–2047 (1997).
  20. Chen, Z. *et al.* Identifying Cytosine-Specific Isomers via High-Accuracy Single Photon Ionization. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, (2016).
  21. Choi, M. Y. & Miller, R. E. Four tautomers of isolated guanine from infrared laser spectroscopy in helium nanodroplets. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7320–7328 (2006).
  22. Colarusso, P., Zhang, K., Guo, B. & Bernath, P. F. The infrared spectra of uracil, thymine, and adenine in the gas phase. *Chem. Phys. Lett.* **269**, 39–48 (1997).
  23. Kostko, O., Bravaya, K., Krylov, A. & Ahmed, M. Ionization of cytosine monomer and dimer studied by VUV photoionization and electronic structure calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 2860–2872 (2010).
  24. Nir, E., Janzen, C., Imhof, P., Kleinermanns, K. & De Vries, M. S. Guanine tautomerism revealed by UV-UV and IR-UV hole burning spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **115**, 4604–4611 (2001).
  25. Padermshoke, A., Katsumoto, Y., Masaki, R. & Aida, M. Thermally induced double proton transfer in GG and wobble GT base pairs: A possible origin of the mutagenic guanine. *Chem. Phys. Lett.* **457**, 232–236 (2008).
  26. Serrano-andre, L. *et al.* A Three-State Model for the Photophysics of Guanine RNA base monomers has reached in the last few years the. *Science (80-. )*. 1782–1786 (2008).
  27. Gorb, L. & Leszczynski, J. Intramolecular proton transfer in mono- and dihydrated tautomers of guanine: An ab initio post Hartree-Fock study. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5024–5032 (1998).
  28. Gu, J. & Leszczynski, J. A DFT Study of the Water-Assisted Intramolecular Proton Transfer in the Tautomers of Adenine. *J. Phys. Chem. A* **103**, 2744–2750 (1999).

29. Hanus, M. *et al.* Correlated ab initio study of nucleic acid bases and their tautomers in the gas phase, in a microhydrated environment and in aqueous solution. Guanine: Surprising stabilization of rare tautomers in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7678–7688 (2003).
30. Waring, A. J. K a t d x k y and Waring : 299. Tautomeric Axines. Part I . The Tautomerism of 1 - Methyluracil and 5-Bromo- 1 -mei%yluracil. 1540–1544 (1955).
31. Muller, J., Sigel, R. K. O. & Lippert, B. Heavy metal mutagenicity: Insights from bioinorganic model chemistry. *J. Inorg. Biochem.* **79**, 261–265 (2000).
32. Schollhorn, H. Metal-Stabilized Rare Tautomers of Nucleobases. 2.' 2-Oxo-4-hydroxo Form of Uracil: Crystal Structures and Solution Behavior of Two Platinum( 11) Complexes Containing Imino1 Tautomers of l-Methyluracilt. **7213**, 7213–7221 (1989).
33. Roehrig, G. H., Oyler, N. A. & Adamowicz, L. Can electron attachment alter tautomeric equilibrium of guanine? Theoretical ab initio study. *Chem. Phys. Lett.* **225**, 265–272 (1994).
34. I, T. R. & Peticolas, W. L. Ab Initio Transform Calculation of Resonance Raman Spectra of Uracil, 1-Methyluracil, and 5-Methyluracil. *J. Phys. Chem.* **99**, 14647–14658 (1995).
35. Nowak, M. J. IR matrix isolation studies of nucleic acid constituents: the spectrum of monomeric thymine. *J. Mol. Struct.* **193**, 35–49 (1989).
36. Aida, M. *et al.* Vibrational modes in thymine molecule from an ab initio MO calculation. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **53**, 393–407 (1997).
37. Florián, J. & Hroudá, V. Scaled quantum mechanical force fields and vibrational spectra of solid state nucleic acid constituents V: thymine and uracil. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **49**, 921–938 (1993).
38. Susi, H. & Ard, J. S. Planar valence force constants and assignments for pyrimidine derivatives. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **30**, 1843–1853 (1974).
39. Zhang, S. L., Michaelian, K. H. & Loppnow, G. R. Vibrational Spectra and Experimental Assignments of Thymine and Nine of Its Isotopomers. *J. Phys. Chem. A* **102**, 461–470 (1998).
40. Lippert, B. Uracil and thymine monoanions in solution: Differentiation of

- tautomers by laser Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **8**, 274–278 (1979).
41. Lippert, B. On the tautomerism of the thymine anion in the solid state: A Raman and infrared study. *J. Raman Spectrosc.* **9**, 324–333 (1980).
  42. Wierzchowski, K. L., Litońska, E. & Shugar, D. Infrared and ultraviolet studies on the tautomeric equilibria in aqueous medium between monoanionic species of uracil, thymine, 5-fluorouracil, and other 2,4-diketopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4621–4629 (1965).
  43. Haiss, W. *et al.* In-situ infrared spectroscopic studies of thymine adsorption on a Au(111) electrode. *J. Electroanal. Chem.* **454**, 107–113 (1998).
  44. Li, W. H., Haiss, W., Floate, S. & Nichols, R. J. In-situ infrared spectroscopic and scanning tunneling microscopy investigations of the chemisorption phases of uracil, thymine, and 3-methyl uracil on Au(111) electrodes. *Langmuir* **15**, 4875–4883 (1999).
  45. Bravaya, K. B. *et al.* Electronic structure and spectroscopy of nucleic acid bases: ionization energies, ionization-induced structural changes, and photoelectron spectra. *J. Phys. Chem. A* **114**, 12305–12317 (2010).
  46. Wolken, J. K., Yao, C., Turek, F., Polce, M. J. & Wesdemiotis, C. Cytosine neutral molecules and cation-radicals in the gas-phase. Structures, energetics, ion chemistry, and neutralization-reionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **267**, 30–42 (2007).
  47. Broomhead, J. M. The structures of pyrimidines and purines. IV. The crystal structure of guanine hydrochloride and its relation to that of adenine hydrochloride. *Acta Crystallogr.* **4**, 92–100 (1951).
  48. Academy, P. *Journal of Molecular Structure*, 156 (1987) 29–42 Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Printed in The Netherlands. **156**, 29–42 (1987).
  49. Colominas, C., Luque, F. J. & Orozco, M. Tautomerism and protonation of guanine and cytosine. Implications in the formation of hydrogen-bonded complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6811–6821 (1996).
  50. Dolgounitcheva, O., Zakrzewski, V. G. & Ortiz, J. V. Ionization energies and Dyson orbitals of thymine and other methylated uracils. *J. Phys. Chem. A* **106**, 8411–8416 (2002).
  51. Leszczynski, J. The Potential Energy Surface of Guanine Is Not Flat: An ab Initio Study with Large Basis Sets and Higher Order Electron Correlation Contributions. *J. Phys. Chem. A* **102**, 2357–2362 (1998).

52. Sabio, M., Topiol, S. & Lumma, W. C. An Investigation of Tautomerism in Adenine and Guanine. *J. Phys. Chem.* **94**, 1366–1372 (1990).
53. Jang, Y. H. *et al.* pKa values of guanine in water: Density functional theory calculations combined with Poisson-Boltzmann continuum-solvation model. *J. Phys. Chem. B* **107**, 344–357 (2003).
54. Watson, J. & Crick, F. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. **171**, 737–8 (1953).
55. Hoogsteen, K. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr.* **16**, 907–916 (1963).
56. Petrenko, Y. M. The structural and dipole-structural peculiarities of the Hoogsteen base pairs that are formed from complementary nucleobases according to ab initio quantum-mechanical studies. *Biophysics (Oxf)*. **60**, 701–707 (2015).
57. Nash, H. a. Calculation of the Lowest Energy Configurations of Nucleotide Base Pairs on the Basis of an Electrostatic Model. *J. Chem. Phys.* **45**, 1380 (1966).
58. Sharma, P., Chawla, M., Sharma, S. & Mitra, A. On the role of Hoogsteen:Hoogsteen interactions in RNA: ab initio investigations of structures and energies. *RNA* **16**, 942–57 (2010).
59. Nikolova, E. N. *et al.* Transient Hoogsteen base pairs in canonical duplex DNA. *Nature* **470**, 498–502 (2011).
60. Fiethen, A., Jansen, G., Hesselmann, A. & Sch??tz, M. Stacking energies for average B-DNA structures from the combined density functional theory and symmetry-adapted perturbation theory approach. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1802–1803 (2008).
61. Cooper, V. R. *et al.* Stacking Interactions and the Twist of DNA Twist parameter may be attributed to stacking interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 1304–8 (2008).
62. Salonen, L. M., Ellermann, M. & Diederich, F. F. Aromatic rings in chemical and biological recognition: Energetics and structures. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 4808–4842 (2011).
63. Hobza, P., Selzle, H. L. & Schlag, E. W. Potential Energy Surface for the Benzene Dimer. Results of ab Initio CCSD(T) Calculations Show Two Nearly Isoenergetic Structures: T-Shaped and Parallel-Displaced. *J. Phys. Chem.* **100**, 18790–18794 (1996).

64. Tauer, T. P., Derrick, M. E. & Sherrill, C. D. Estimates of the ab initio limit for sulfur- $\pi$  interactions: the H<sub>2</sub>S-benzene dimer. *J. Phys. Chem. A* **109**, 191–196 (2005).
65. Tsuzuki, S., Honda, K. & Azumi, R. Model chemistry calculations of thiophene dimer interactions: Origin of  $\pi$ - $\pi$ -stacking. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12200–12209 (2002).
66. Leavens, F. M. V, Churchill, C. D. M., Wang, S. & Wetmore, S. D. Evaluating how discrete water molecules affect protein-DNA  $\pi$ - $\pi$  And  $\pi$ + $\pi$  stacking and T-shaped interactions: The case of histidine-adenine dimers. *J. Phys. Chem. B* **115**, 10990–11003 (2011).
67. Rutledge, L. R., Durst, H. F. & Wetmore, S. D. Evidence for stabilization of DNA/RNA protein complexes arising from nucleobase amino acid stacking and T-shaped interactions. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 1400–1410 (2009).
68. Pilla, A. A. Electrochemical Information Transfer at Living Cell Membrances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **238**, 149–170 (1974).
69. Getsova, V. M., York, R. & Wetzel, W. Mechanisms of serotonin involvement in conditioned reflex consolidation. *Neurosci. Behav. Physiol.* **13**, 197–201 (1983).
70. Prieto, F., Rueda, M., Prado, C., Feliu, J. M. & Aldaz, A. Kinetics of adenine adsorption on Au(1 1 1) electrodes: An impedance study. *Electrochim. Acta* **55**, 3301–3306 (2010).
71. Prieto, F., Su, Z., Leitch, J. J., Rueda, M. & Lipkowski, J. Quantitative Subtractively Normalized Interfacial Fourier Transform Infrared Reflection Spectroscopy Study of the Adsorption of Adenine on Au(111) Electrodes. *Langmuir* **32**, 3827–3835 (2016).
72. Tao, N. J., DeRose, J. a. & Lindsay, S. M. Self-Assembly of Molecular Superstructures Studied by in situ Scanning Tunneling Microscopy: DNA bases on Au(111). *J Phys Chem Phys Chem* **97**, 910–919 (1993).
73. Roelfs, B. & Baumgärtel, H. Adsorption and Film Formation of Thymine on a Gold (100) Single Crystal Electrode. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* 677–681 (1995). doi:10.1002/bbpc.19950990412
74. Hölzle, M. H., Kolb, D. M., Krznarić, D. & Čosović, B. Adsorption and Phase Formation of Uracil Derivatives on Gold and Silver Single-Crystal Electrodes. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **790**, 1779–1790 (1996).
75. Roelfs, B. *et al.* Adsorption of thymine on gold single-crystal electrodes. *J. Phys.*

- Chem. B* **101**, 754–765 (1997).
76. Wandlowski, T., Lampner, D. & Lindsay, S. M. Structure and stability of cytosine adlayers on Au(111): an in-situ STM study. *J. Electroanal. Chem.* **404**, 215–226 (1996).
  77. Ataka, K. & Osawa, M. In situ infrared study of cytosine adsorption on gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **460**, 188–196 (1999).
  78. Kelly, R. E. A. *et al.* Understanding the disorder of the DNA base cytosine on the Au(111) surface. *J. Chem. Phys.* **129**, (2008).
  79. Wang, J., Jiang, M. & Mukherjee, B. On-demand electrochemical release of DNA from gold surfaces. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **52**, 111–114 (2000).
  80. Wang, J., Rivas, G., Jiang, M. & Zhang, X. Electrochemically induced release of DNA from gold ultramicroelectrodes. *Langmuir* **15**, 6541–6545 (1999).
  81. Kiyoto Takamura, A. M. and F. W. Structural effects of nucleic acid bases, nucleosides and nucleotides on their adsorption at gold electrode studied by specular reflectivity measurement. *J. Electroanal. Chem* **128**, 125–136 (1981).
  82. Ferapontova, E. E. Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes. *Electrochim. Acta* **49**, 1751–1759 (2004).
  83. Granatum, P. U. & Unicaceae, P. ( P , P ) 1. **92**, 1935–1941 (2005).
  84. Ten, G. N., Nechaev, V. V., Pankratov, A. N. & Baranov, V. I. Hydrogen bonding effect on the structure and vibrational spectra of complementary pairs of nucleic acid bases. I. Adenine-uracil. *J. Struct. Chem.* **51**, 453–462 (2010).
  85. Donner, C., Camargo, A. P. M. & Baumgärtel, H. Adsorption behaviour of DNA bases at the Au ( 111 ) electrode. *PhysChemComm* **5**, 151–157 (2002).
  86. Kimura-suda, H., Petrovykh, D. Y., Tarlov, M. J. & Whitman, L. J. Base-Dependent Competitive Adsorption of Single-Stranded DNA on Gold Base-Dependent Competitive Adsorption of Single-Stranded DNA on Gold. **125**, 9014–9015 (2003).
  87. Zhang, D., Domke, K. F. & Pettinger, B. Tip-Enhanced Raman Spectroscopic Studies of the Hydrogen Bonding between Adenine and Thymine Adsorbed on Au (111). *ChemPhysChem* **11**, 1662–1665 (2010).
  88. Demers, L. M. *et al.* Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11248–11249 (2002).
  89. Sato, Y., Noda, H., Mizutani, F., Yamakata, A. & Osawa, M. In situ surface-enhanced infrared study of hydrogen bond pairing of complementary nucleic acid

bases at the electrochemical interface. *Anal. Chem.* **76**, 5564–5569 (2004).



---

**Capítulo 2**

**Metodología y Procedimientos Experimentales**

---

## 2.1 Técnicas electroquímicas

### 2.1.1 Fundamento teórico

#### 2.1.1.1 Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es quizás una de las técnicas más utilizadas en la actualidad para el estudio de las reacciones y procesos electroquímicos. Se basa en aplicar al electrodo de trabajo un potencial que varía linealmente con el tiempo con una determinada velocidad de barrido y trascurrido un tiempo determinado se invierte la polaridad del barrido. Como respuesta se obtiene una corriente neta debida a los procesos de carga de la doble capa, de adsorción/desorción química y/o de oxidación/reducción de las especies que están presentes en la disolución.

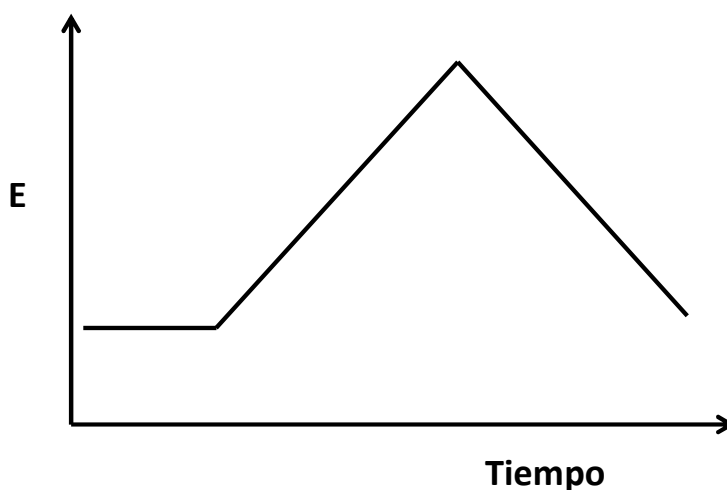


Fig. 2.1 Señal de excitación potencial-tiempo empleada en voltametría cíclica.

La voltametría es una técnica muy utilizada ya que es una fuente de información importantísima y además permite comprobar el estado de limpieza superficial de los electrodos así como el de la disolución antes de comenzar los estudios. Se utiliza normalmente para estudiar reacciones redox o procesos de adsorción que tienen lugar en la superficie del metal y que dependen del potencial aplicado. En esta tesis se ha utilizado para estudiar los procesos de adsorción/desorción de las bases del ADN individualmente o las co-adsorciones entre bases complementarias que tienen lugar sobre electrodos

metálicos monocristalinos de Au(111), así como para caracterizar las supervise nanoestructuradas de oro previamente a los estudios espectroelectroquímicos.

### **2.1.1.2 Cronoculumbimetría**

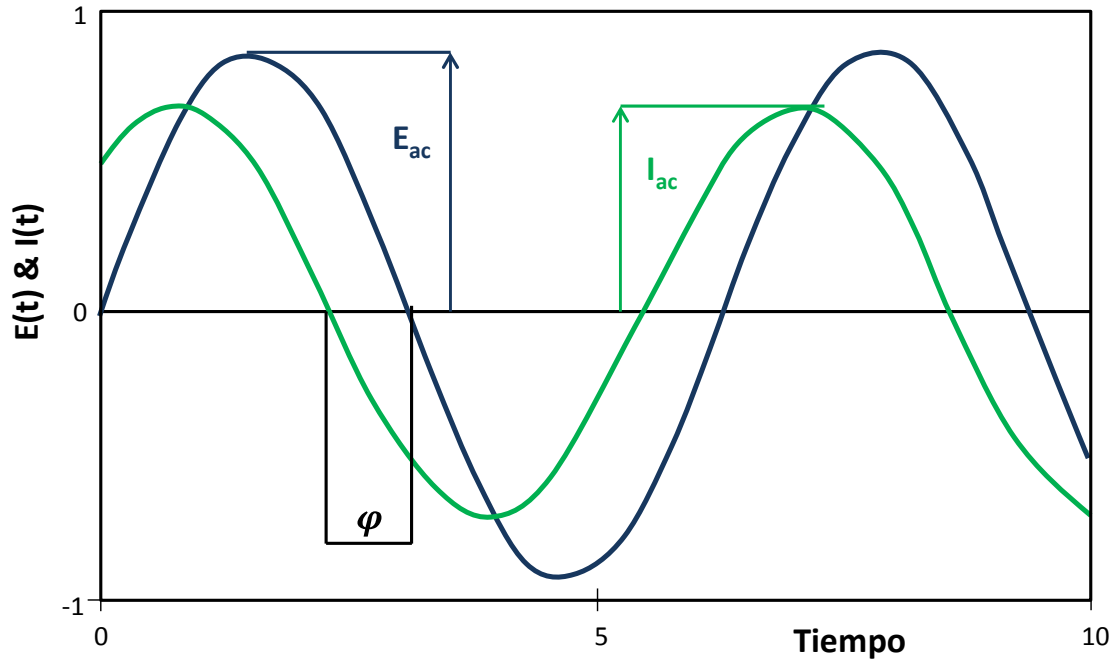
Es una técnica electroquímica que se utiliza para determinar la densidad de carga en la superficie del electrodo. Se basa en llevar inicialmente el electrodo de trabajo a un potencial base ( $E_b$ ) durante un tiempo ( $t_1$ ), transcurrido ese tiempo se aplican saltos de potencial ( $E_i$ ) sucesivos. En cada salto se mantiene el potencial ( $E_i$ ) durante un tiempo ( $t_2$ ) y se realizan las medidas de intensidad. Después de cada salto se recupera el potencial ( $E_b$ ) durante un tiempo ( $t_3$ ). Finalmente se aplica un potencial de desorción ( $E_{des}$ ) durante un tiempo ( $t_4$ ). La integración de los transitorios de corriente proporciona la diferencia entre las cargas a los potenciales ( $E_i$ ) y ( $E_{des}$ ).

### **2.1.1.3 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)**

Las técnicas electroquímicas convencionales, tales como la voltametría cíclica o la cronoamperometría, han sido muy utilizadas para estudiar reacciones que tienen lugar sobre superficies electródicas, ya que con ellas se pueden obtener de forma rápida un gran número de resultados que permiten construir una imagen aproximada del proceso. Sin embargo la información obtenida por estos métodos electroquímicos convencionales es limitada. Por un lado los resultados que se obtienen en un experimento electroquímico clásico pueden incluir información de varios fenómenos simultáneamente: carga de la doble capa, transporte de masa, adsorción, procesos de transferencia electrónica, reacciones químicas homogéneas y/o heterogéneas acopladas, etc. Por otro lado, para el estudio de un fenómeno específico la ventana de tiempo accesible va a estar limitada por la velocidad del resto de fenómenos que contribuyen a la velocidad global. Así por ejemplo en estudios cinéticos de procesos electródicos, los valores más altos de para las constantes de velocidad que se pueden medir van a estar limitados por el transporte de materia. Para velocidades extremas de transporte de materia las limitaciones estarían impuestas por el tiempo característico de los fenómenos de doble capa.

La Espectroscopía de Impedancia Electroquímica, (EIS) es una técnica electroquímica que permite separar en numerosas situaciones las diferentes contribuciones a la respuesta electroquímica, convirtiéndose así en una herramienta muy utilizada en el estudio de los mecanismos y la cinética de reacciones electródicas. En su modo potenciostático está

basada en la aplicación a un sistema electroquímico de una perturbación de potencial de corriente alterna (ac) de pequeña amplitud  $E(t)$  y de frecuencia  $f$ , durante un tiempo ( $t$ ) suficiente que permita alcanzar el estado estacionario. Esta perturbación de corriente alterna se superpone sobre un potencial de continua (dc). La respuesta de corriente alterna  $I(t)$  que se obtiene tendrá la misma frecuencia que la señal de la perturbación de corriente alterna pero desfasada un ángulo  $\varphi$  (Fig. 2).



**Fig. 2.2** Representación gráfica de  $E(t)$  e  $I(t)$

$E(t)$  e  $I(t)$  tienen forma sinusoidal por lo que las expresiones de estas funciones vendrán dadas por las ecuaciones (1) y (2).

$$E(t) = E_{ac} \text{sen}(\omega t) \quad (1)$$

$$I(t) = I_{ac} \text{sen}(\omega t + \varphi) \quad (2)$$

Donde  $E_{ac}$  e  $I_{ac}$  son las amplitudes de ambas señales y  $\omega$  es la frecuencia angular.

La impedancia del sistema ( $Z$ ) es una magnitud compleja que se define como la relación entre el potencial y la intensidad de alterna:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_{ac}}{I_{ac}} e^{i\varphi} \quad (3)$$

Donde  $i$  es la unidad imaginaria  $(-1)^{0.5}$ .

Se puede realizar la descomposición en las componentes real e imaginaria de la impedancia haciendo uso de la fórmula de Euler de acuerdo con las ecuaciones (4).

$$Z = \frac{E_{ac}}{I_{ac}} \cos\varphi + i \frac{E_{ac}}{I_{ac}} \operatorname{sen}\varphi = Z' + iZ'' \quad (4)$$

La ecuación (4) puede representarse gráficamente como se muestra en la figura 3. Esta representación recibe el nombre de representación de Nyquist.

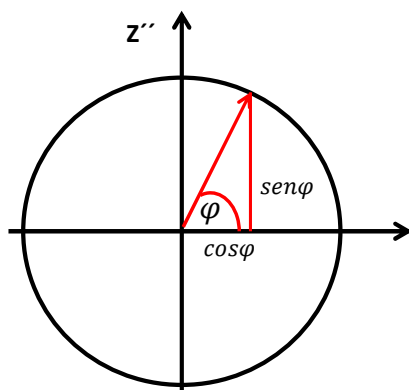

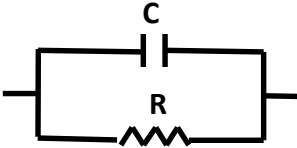
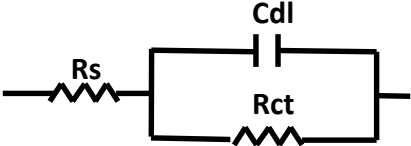


Fig. 2.3 Representación de Nyquist

La impedancia es por tanto función de la frecuencia de la perturbación aplicada, de tal forma que el análisis de la impedancia (o la admitancia, que es la inversa de la impedancia) en función de la frecuencia, de acuerdo a un modelo determinado, permite obtener los parámetros del proceso electroquímico.<sup>1</sup>

La contribución que cada uno de los distintos procesos elementales que pueden tener lugar en una célula electroquímica a la impedancia total de la misma es formalmente equivalente a la de diversos elementos de circuito eléctrico. Así, la impedancia de la disolución de electrolito se comporta como una resistencia. Una interfase idealmente polarizable se puede representar como un condensador de placas paralelas caracterizado por su capacidad. La impedancia asociada al transporte por difusión de una especie electroactiva se puede representar, en casos elementales, por una impedancia de Warburg. Finalmente la impedancia de la célula electroquímica será el resultado de combinar las distintas impedancias de los procesos elementales que tienen lugar. El tipo de circuito, y por tanto la dependencia de la impedancia con la frecuencia, va a depender del sistema de estudio. En la tabla 1 se recogen algunos modelos de circuitos y sus impedancias asociadas.

**Tabla 1.** Distintos tipos de circuitos y sus valores de impedancia asociados

<u>Circuito</u>	<u>Representación</u>	<u>Ecuación de impedancia</u>
R-C serie		$Z_c = R - \frac{1}{\omega C_s}$
R-C paralelo		$Z_c = \frac{1}{R} + \frac{1}{i\omega C}$
Rs+RC paralelo		$Z_c = R_s + \frac{1}{\frac{1}{R_{ct}} + i\omega C_{dl}}$

## 2.1.2 Medidas electroquímicas

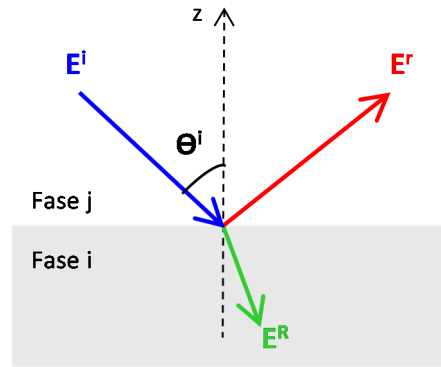
Las medidas electroquímicas se realizaron en esta tesis tanto con un sistema multifuncional Autolab, PTGSTAT 30 controlado por un software Nova 1.7 como por un sistema multifuncional Ivium Stat. XR controlado por un software IviumSoft. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo saturado de sulfato mercurioso (Radiometer) conectado a la célula mediante un puente salino con la misma disolución de electrolito soporte. El electrodo de referencia consistió en un hilo de oro que se trató a la llama poniéndolo al rojo y posteriormente enfriado bruscamente sumergiéndolo en agua ultrapura para eliminar cualquier impureza. Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo monocristalino de Au(111) preparado a partir de un hilo de oro (99.9998% Alfa-Aesar) siguiendo el método desarrollado por Clavilier.<sup>2</sup> Este electrodo se trató a la llama<sup>3</sup> y posteriormente se enfrió sobre agua ultrapura, transfiriéndose a la célula con una gota de agua ultrapura sobre su superficie. Este procedimiento nos permitió mantener la estructura reconstruida a la llama y evitar la contaminación de la superficie por la atmósfera del laboratorio. El contacto con la disolución de trabajo se hizo con ayuda de un tornillo micrométrico utilizando la técnica del “menisco colgante” para conseguir que solamente la cara que tuviera orientación cristalográfica (111) contactara con la disolución.

## 2.2 Espectroscopía Infrarroja de Reflexión Absorción.

### 2.2.1 Fundamento teórico

La disponibilidad de superficies electródicas limpias y bien definidas ha facilitado un desarrollo espectacular de las técnicas espectroscópicas y microscópicas “in-situ”, aplicadas, entre otros casos, a los estudios de adsorción de compuestos orgánicos sobre electrodos, lo que ha permitido obtener información de este tipo de sistemas a nivel estructural. Concretamente, en los últimos años las técnicas de espectroscopia infrarroja de absorción-reflexión (IRRAS) “in-situ” en celdas electroquímicas se han convertido en una herramienta de gran importancia en el estudio de la interfase metal-disolución a nivel molecular. Están basadas en el análisis de la intensidad de la luz reflejada por una superficie metálica electródica en contacto con una disolución, en función de la longitud de onda de la radiación incidente y del potencial aplicado al electrodo. El espectro vibracional obtenido de las moléculas adsorbidas aporta información de tipo estructural, como la orientación de los adsorbatos sobre las superficies electródicas, los fragmentos de la molécula que interaccionan con la superficie o con otras moléculas presentes en la interfase.

Cuando un haz ( $i$ ) de radiación electromagnética alcanza la superficie que separa una fase sólida de otra fase homogénea isotrópica parte de esta radiación se propaga en la segunda fase, es decir, se refracta ( $R$ ) y otra parte se refleja ( $r$ ) volviendo a propagarse en el aire en otra dirección (Fig. 2.4). Cuando la superficie sobre la que incide la radiación electromagnética está pulida la reflexión que se origina es regular, es decir, los rayos reflejados son paralelos entre sí. Sin embargo cuando la superficie es mate tiene lugar una reflexión difusa en cuyo caso los rayos reflejados tienen diferentes direcciones. En cualquier caso ambos fenómenos, como demostraron inicialmente Greenler<sup>4,5</sup> y Francis y Ellison,<sup>6</sup> dependen fuertemente de la naturaleza de las dos fases, de las propiedades ópticas de la superficie (pulida o mate), de la posible presencia en la interfase de una capa adsorbida de otras especies, del estado de polarización de la radiación y del ángulo con el que la radiación incide sobre la superficie del metal. Los detalles de esta dependencia se pueden comprender usando las condiciones de contorno que regulan el paso de la radiación electromagnética entre los distintos medios que atraviesa la radiación.



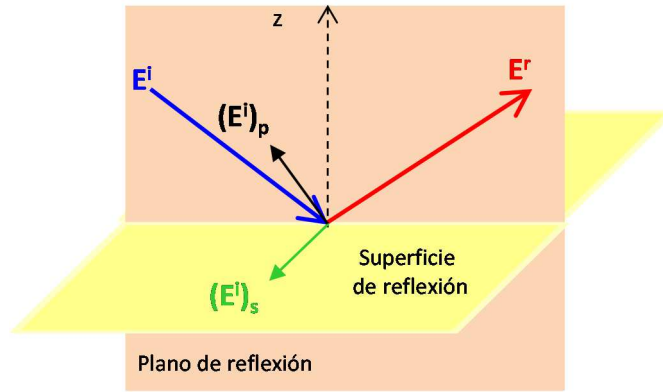
**Fig. 2.4** Esquema del fenómeno de reflexión: radiación refractada ( $\rightarrow$ ) y reflejada ( $\rightarrow$ ) de la radiación electromagnética incidente ( $\rightarrow$ ) en la interfase entre dos fases con un índice de refracción diferente. La línea discontinua representa la dirección normal a la interfase.

De acuerdo con las leyes de Fresnel, cuando el ángulo de incidencia ( $\theta^i$ ) supera un ángulo crítico ( $\theta_c$ ) tiene lugar la reflexión total en la interfase entre ambas fases y no se transmite nada a la segunda (fase I). El valor de este ángulo crítico depende de los índices de refracción de las dos fases, según la ecuación 5.

$$\theta_c = \arcsen\left(\frac{n_i}{n_j}\right) \quad (5)$$

El plano de reflexión se define como el plano que contiene ambos haces, el incidente y el reflejado, como se muestra en la figura 2.5, en una de las direcciones perpendiculares a la superficie de reflexión. A su vez el haz incidente de radiación electromagnética puede expresarse como la suma vectorial de dos componentes ortogonales linealmente polarizados, que reciben el nombre de luz p, cuando la dirección del vector del campo eléctrico de la radiación está en el plano de incidencia (perpendicular a la superficie reflectora), o luz s cuando es perpendicular a dicho plano y, por tanto, paralelo a la superficie reflectora. De igual manera el haz reflejado de radiación electromagnética también puede descomponerse en dos componentes ortogonales. Así, la amplitud del vector campo eléctrico en la superficie de reflexión queda expresada como la suma vectorial de los campos eléctricos de los haces incidentes y reflejados, y dependerá en gran medida, del cambio de fase que se produce tras la reflexión, del ángulo de incidencia y de la polarización de la radiación.



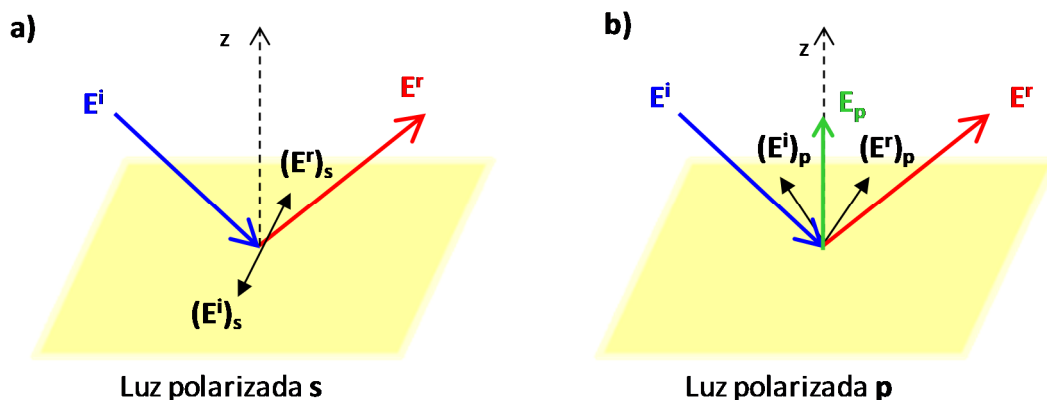


**Fig. 2.5** Representación del plano de reflexión y las componentes paralelas (—) y perpendicular (—) al plano de reflexión de la radiación electromagnética incidente.

En la reflexión regular estas magnitudes están relacionadas entre sí por las leyes de Maxwell de la radiación electromagnética y las leyes de Fresnel para la reflexión y son relativamente simples para el fenómeno de reflexión en la interfase entre dos fases, y su complejidad aumenta considerablemente cuando se consideran sistemas de tres o más fases. La reflectividad o reflectancia,  $R_{s,p}$ , en la interfase entre estas dos fases, puede expresarse como la relación entre las intensidades normalizadas de los haces incidentes y reflejados, que a su vez están relacionadas con el cuadrado del módulo del coeficiente de Fresnel,  $r_{s,p}$  de la siguiente forma:

$$R_{s,p} = \frac{I_{s,p}^r}{I_{s,p}^i} = |r_{s,p}|^2 \quad \text{con} \quad r_{s,p} = \frac{E_{s,p}^r}{E_{s,p}^i} \quad (6)$$

Como consecuencia de la reflexión se produce un desfase en la radiación reflejada, que depende del ángulo de incidencia y del de polarización. Así, para radiación polarizada tipo s el desfase entre los haces incidente y reflejado es de  $180^\circ$  para todos los ángulos de incidencia, por lo que el coeficiente de Fresnel tiende a valer  $-1$ . De acuerdo con la ecuación (6) esto significa que los campos eléctricos de ambos haces se anulan en la superficie (Fig. 3a). Por el contrario para un haz incidente de radiación polarizada-p y ángulos de incidencia inferiores a  $80^\circ$  el coeficiente de Fresnel tiende a  $1$  por lo que los campos eléctricos de ambos haces son coincidentes en la superficie siendo prácticamente nulo el cambio de fases entre ellos (Fig. 2.6b). Para ángulos de incidencia de radiación polarizada-p superiores a  $80^\circ$  el desfase aumenta rápidamente, llegando a alcanzar el valor de  $180^\circ$  para ángulos de incidencia próximos a  $90^\circ$ .



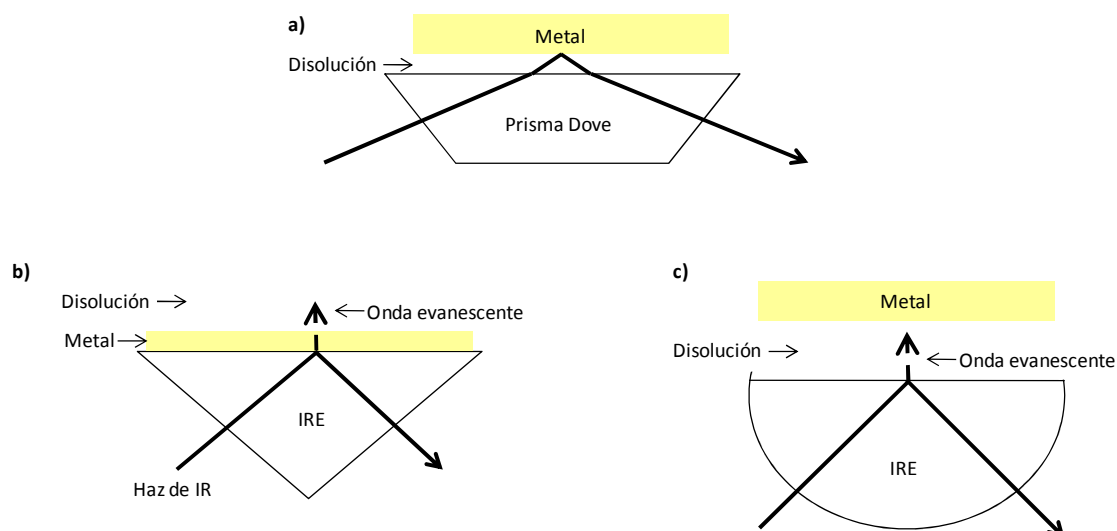
**Fig. 2.6** Dirección de los vectores de campo eléctrico para los haces incidentes y reflejados para a) la luz polarizada s y b) la luz polarizada p.

La técnica de la espectroscopía de absorción-reflexión en el infrarrojo (IRRAS) en los últimos años se viene utilizando para estudiar adsorbatos sobre metales incluso en concentraciones superficiales inferiores a las correspondientes a una monocapa. La interacción entre la radiación infrarroja (IR) y la materia es de tipo dipolar lo que implica una interacción entre el campo eléctrico de la radiación electromagnética con el momento dipolar instantáneo de las moléculas. Si sobre la superficie del metal existen moléculas de adsorbato, solamente la componente polarizada-p de la radiación electromagnética podría interactuar con los momentos dipolares de estas moléculas, pues la componente polarizada-s se anula en la superficie. Por tanto, únicamente los modos de vibración que contengan una componente del momento dipolar perpendicular al plano de reflexión, susceptible de interactuar con la componente en esa dirección del campo eléctrico de la radiación, son activos en IRRAS. Esta es la denominada “regla de selección superficial”.<sup>4,7</sup>

Uno de los mayores problemas en la aplicación de las técnicas espectroscópicas de IR a los sistemas electroquímicos es la gran absorción de la radiación que presentan la mayoría de los disolventes, lo que dificulta bastante conocer cuál es la fracción de luz adsorbida por el adsorbato, ya que éste se encuentra en una proporción muy pequeña respecto al disolvente. Inicialmente, para solventar esta dificultad se utilizó la técnica de reflexión externa (IRRAS, *Infrared Reflection Absorption Spectroscopy*) en la configuración de capa fina (Figura 2.7a) utilizada por primera vez en los años 80 por Bewick para caracterizar la interfase electrodo | disolución para el proceso de adsorción de hidrógeno sobre platino.<sup>8,9</sup> La distancia a la que se coloca el electrodo de la ventana ha sido siempre uno de los aspectos claves en este tipo de técnicas ya que el electrodo generalmente

monocristalino, cuya superficie esta paralela a la cara interna del prisma se presiona contra éste originando entre ambos una capa delgada de disolución cuyo espesor está condicionado por la distancia a la que se coloca el electrodo y no debe ser mayor de 100  $\mu\text{m}$  para reducir la pérdida de intensidad de la radiación debida a la absorción por parte del disolvente (agua u óxido de deuterio en la mayoría de las ocasiones) ya que el haz de radiación infrarroja se refleja en la interfase después de atravesar la capa de disolución formada entre la superficie del metal y la ventana. Sin embargo la absorción por parte del disolvente en este tipo de configuración sigue siendo importante.

En las experiencias electroquímicas de adsorción de compuestos orgánicos sobre electrodos, la absorción debida a las especies en la capa delgada de disolución contenida entre el prisma y el metal se puede cancelar en buena medida al comparar los espectros obtenidos a dos potenciales diferentes: un potencial de referencia, al que el compuesto no está adsorbido, y el potencial de muestra. Esta configuración resulta de gran utilidad para estudios de especies consumidas o formadas sobre la superficie del electrodo. En este tipo de medidas supone una ventaja el uso de radiación polarizada. La interacción de radiación con las moléculas adsorbidas sobre el electrodo es diferente en función de la polarización de la luz utilizada, de tal forma que es posible obtener información tanto de las moléculas adsorbidas como de las que están en disolución. Así el espectro obtenido con luz polarizada-s, dado que la radiación se cancela en la superficie de reflexión, es insensible a las moléculas que se encuentran adsorbidas, y solamente proporcionará información de las moléculas de adsorbato que pasan de la disolución a la interfase mientras que de los espectros utilizando luz polarizada-p interaccionará con las moléculas adsorbidas en la superficie, dando lugar a señales de absorción para aquellos modos de vibración que originen una variación del momento dipolar de la molécula en la dirección perpendicular a la superficie de reflexión, de acuerdo con la regla de selección. De esta forma se puede deducir información acerca de la orientación de las moléculas adsorbidas.



**Fig. 2.7** Representación esquemática de los tres tipos de configuraciones ópticas utilizados en las técnicas de reflexión-absorción: a) de reflexión externa y de reflexión interna en b) configuración de Kretschmann y c) configuración de Otto. Adaptadas de ref<sup>10</sup>

Otra alternativa para evitar la interferencia de la fuerte absorción del disolvente en las medidas de espectroscopía IRRA en células electroquímicas es la utilización de una configuración llamada de reflexión interna en condiciones de reflexión total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*). Se basan en que en sistemas de reflexión total de la radiación en la interfase prisma | metal parte del haz, una vez alcanzada la interfase, es capaz de penetrar en el medio con menor índice de refracción. Esta fracción de radiación se conoce como onda evanescente y la intensidad de su campo eléctrico decae exponencialmente con la distancia a la superficie.

La condición de reflexión total como se definió en la ecuación (5) se alcanza cuando el ángulo de incidencia de la radiación es superior al ángulo crítico y esto está estrechamente relacionado con los índices de refracción de la ventana,  $n_i$ , y del medio en contacto con ella,  $n_j$ .

Se define la distancia de penetración de la onda evanescente,  $d_p$ , como la distancia necesaria para que la amplitud del campo eléctrico de la radiación sea igual a  $1/e$  de su valor en la superficie (aproximadamente un 37% de su valor original) y viene definida por la ecuación (7).<sup>11</sup>

$$d_p = \frac{\lambda_j}{2\pi(\text{sen}^2\theta - n_j^2)^{\frac{1}{2}}} \quad (\theta > \theta_c) \quad (7)$$

donde  $\lambda_j = \frac{\lambda}{n_j}$  es la longitud de onda en el medio más denso y  $n_{ij} = \frac{n_i}{n_j}$  es la relación entre los índices de refracción de ambos medios, resultando así la distancia de penetración proporcional a la longitud de onda la radiación incidente.

En reflexión interna existen dos configuraciones la de tipo Krestsmann (Fig. 2.7b) y la de tipo Otto (Fig. 2.7c). En la primera de ellas se deposita una fina capa de metal sobre la superficie de un prisma cristalino con un alto índice de refracción usado como elemento de reflexión interna (IRE). En esta configuración el espesor de la disolución atravesada por el haz es mínimo, de tal forma que la absorción por parte del disolvente es menor que en la configuración de reflexión externa. Sin embargo sigue siendo necesario comparar los espectros obtenidos al potencial de la muestra con el espectro de referencia para cancelar completamente la absorción del disolvente. Además la configuración de Kretschmann presenta una gran ventaja ya que debido al uso de películas metálicas nanoestructuradas se produce una intensificación de la absorción infrarroja por parte de las moléculas adsorbidas (efecto SEIRA).<sup>12</sup> Sin embargo la estabilidad de las películas es limitada.

Finalmente en la configuración de Otto el electrodo se sitúa cerca de un prisma que actúa de elemento de reflexión interno (IRE) de forma que entre ambos se crea una capa delgada de disolución, que el haz evanescente generado tras la reflexión en la interfase prisma/disolución puede atravesar y llegar al metal. Así esta configuración combina elementos de reflexión interna con elementos de configuración en capa fina.

Por otro lado el uso de configuraciones de películas delgadas supone una alta resistencia en el electrolito, y por lo tanto, un aumento del tiempo de respuesta electroquímica. Por consiguiente la modulación del potencial implica una incertidumbre en el potencial que realmente se está aplicando. Sin embargo, la configuración de película delgada viene siendo muy utilizada para el estudio de la adsorción de compuestos sobre superficies metálicas monocristalinas.

La elección del material y geometría de la ventana óptica es un factor muy importante a tener en cuenta en este tipo de configuración. En la actualidad existen cuatro tipos fundamentales de ventanas: planas en forma de disco, prismas equiláteros, semiesféricos o semicilíndricos. La principal desventaja de las ventanas planas en forma de disco es que cuando la luz las atraviesa se produce una fuerte pérdida de la radiación entre el 20 y el

40% debido a la reflexión de la interfase aire | ventana cuando los ángulos de incidencia son altos. Generalmente las ventanas prismáticas se fabrican con materiales de altos índices de refracción. En cuanto al material, la elección depende de la región espectral que se vaya a estudiar así como del sistema electroquímico. En los estudios de reflexión externa con electrolitos acuosos se suelen emplear ventanas de  $\text{CaF}_2$  ( $4000\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ ), aunque adsorben radiación IR a números de onda menores de  $1100\text{ cm}^{-1}$ . También es bastante común usar  $\text{BaF}_2$  ( $6666\text{-}770\text{ cm}^{-1}$ ). Con ambos materiales la pérdida de radiación en la interfase aire | ventana es solamente del 10%. En las medidas de reflexión interna se vienen usando ventanas semiesféricas de  $\text{ZnSe}$  que permiten estudiar regiones hasta los  $700\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo este material no se puede utilizar para medidas en medios ácidos debido a su gran solubilidad en este tipo de disolventes. Otros materiales que vienen siendo muy utilizados para solventar estos problemas son los prismas de Si o Ge que presentan mayor estabilidad a diferentes electrolitos.

Hoy en día se viene utilizando una terminología específica para este tipo de técnicas: Se utiliza el término espectroscopía ATR-SEIRAS (*Attenuated Total Reflection Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy*) para las técnicas de reflexión interna y espectroscopía IRRAS para referirse a las técnicas de reflexión externa. Como variedad de la espectroscopía IRRAS se conocen la técnica conocida como SNIFTIRS (*Subtractively Normalised Interfacial Fourier Transform InfraRed Spectroscopy*) la técnica de PM-IRRAS (*Polarization Modulated InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy*).

### **2.2.1.1 Attenuated Total Reflection Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy (ATR-SEIRAS)**

La espectroscopía de reflexión total atenuada (ATR) es una herramienta excelente para obtener información estructural y propiedades superficiales de muchos sistemas de interés, una de sus principales aplicaciones es la caracterización de la interfase metal | disolución.<sup>13-15</sup>

Como electrodo de trabajo se utilizan películas nanoestructuradas de forma que cuando existen moléculas orgánicas adsorbidas sobre ellas se ha observado que éstas muestran bandas de absorción en el espectro de infrarrojos entre 10 a 1000 veces que las que se observan por los métodos convencionales, constituyendo el denominado efecto SEIRA (*Surface-Enhanced Infrared Absorption*). El efecto SEIRA puede considerarse como una

combinación del efecto que el campo magnético tiene sobre la superficie y sobre las moléculas adsorbidas sobre dicha superficie y da lugar al desarrollo de la espectroscopía de ATR-SEIRA.

El incremento de las señales obtenidas en los espectros de infrarrojos cuando se utilizan películas nanoestructuradas depende de varios factores entre los que se puede destacar la morfología de la superficie metálica y el tamaño de las partículas que constituyen estas películas nanoestructuradas, encontrándose que el máximo aumento de las intensidades de las señales de infrarrojo se produce cuando las partículas están muy compactas pero no llegan a tocarse entre sí.<sup>16</sup> Este hecho se ha atribuido al acoplamiento cooperativo dipolo-dipolo de los plasmones apoyados por las partículas vecinas.<sup>16</sup>

El tamaño de las partículas y el espesor de las películas delgadas se pueden controlar en función del tipo de depósito que se realice. En los depósitos químicos el control se realiza a través del tiempo de depósito mientras que en los depósitos preparados por técnicas físicas, como la evaporación en vacío o por pulverización catódica o “sputtering”, el espesor y las características de la película formadas van a depender de la temperatura, del sustrato y de la velocidad de depósito. Las películas obtenidas son generalmente rugosas no monoorientadas, aunque con un buen control de las condiciones de depósito es posible obtener superficies cuasi monoorientadas. Generalmente los depósitos químicos permiten obtener superficies más monoorientadas aunque resultan también más sucios que los depósitos realizados por procedimientos físicos.

#### **2.2.1.2 Subtractively Normalised Interfacial Fourier Transform InfraRed Spectroscopy (SNIFTIRS)**

Bewick y colaboradores adaptaron la espectroscopía de absorción-reflexión en el infrarrojos desarrollada por Greenler<sup>4,5,17</sup> para realizar estudios in-situ con sistemas electroquímicos. Para ello introdujeron en la técnica una modulación del potencial que se le aplicaba al electrodo con lo que conseguían una alta sensibilidad superficial.<sup>8,9,18,19</sup>

Con este sistema mientras se recoge el espectro de reflectancia de absorción-reflexión dado en la ecuación 6 se va modulando el potencial entre dos valores; un potencial base  $E_1$  al que la especie generalmente está desorbida y un potencial  $E_2$  que es el potencial de medida  $E_1$ . El espectro diferencial se calcula utilizando la ecuación (8):

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R(E_2) - R(E_1)}{R(E_1)} \quad (8)$$

O bien en términos de absorbancia dados en la ecuación (9):

$$A = -\log \left( \frac{R(E_2)}{R(E_1)} \right) \quad (9)$$

Donde  $R(E_1)$  y  $R(E_2)$  son las reflectancias a los potenciales de referencia y de medida respectivamente.

En los espectros aparecerán señales cuando se produzcan cambios en la frecuencia de vibración del adsorbato con el potencial o bien cuando se produzcan cambios en su concentración. Al representar los espectros de acuerdo a la ecuación (8) como diferencia de reflectividades relativas aparecerán bandas negativas cuando la concentración de la especie adsorbida sea mayor al potencial de medida que al de referencia, mientras que aparecerán bandas positivas en la situación inversa. Para las especies en disolución, si se produce la adsorción como consecuencia del cambio de potencial la concentración en disolución disminuirá y por tanto disminuirá la intensidad de la señal.

### **2.2.1.3 Polarization Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS)**

El estudio de películas insolubles adsorbidas sobre superficies electródicas presenta un problema adicional en el uso de las técnicas convencionales de FT-IRRAS “in-situ” ya que a la hora de obtener el espectro de referencia en estos casos no es posible encontrar el potencial de desorción. Para solventar este problema se introduce la técnica de PM-IRRAS (Polarization Modulated Infrared Reflection Absorption), que emplea la regla de selección superficial, mencionada anteriormente, para obtener el espectro de referencia. La técnica viene siendo utilizada con éxito para el estudio de películas superficiales en balanza de Langmuir.<sup>20-22</sup> Más recientemente Lipkowski y col. la están empleando para obtener información cuantitativa sobre las orientaciones de los grupos funcionales presentes en películas orgánicas insolubles adsorbidas sobre electrodos de Au(111).<sup>23-25</sup> La calidad de los espectros de PM-IRRAS ha permitido caracterizar las especies superficiales y obtener información acerca de su orientación sobre la superficie electródica.



En esta técnica un modulador fotoelástico (PEM), que opera a altas frecuencias (~50-100 KHz) modula el haz de radiación infrarroja muy rápidamente entre una dirección perpendicular (luz polarizada-s) y una paralela (luz polarizada-p) al plano de incidencia. De esta forma el espectro obtenido con luz polarizada-p puede utilizarse como el espectro de las especies adsorbidas al potencial de medida y el de luz polarizada-s como espectro de referencia. Así al obtener la diferencia entre la reflectividad de la radiación -p y -s se elimina fácilmente la señal de fondo. Finalmente se normaliza respecto a la media entre las reflectividades de ambas radiaciones. De esta forma el espectro de infrarrojos de reflexión-absorción viene dado por:

$$\frac{\Delta R}{\langle R \rangle} = \frac{|R_s - R_p|}{\langle R_s + R_p \rangle / 2} \quad (10)$$

donde  $R_s$  y  $R_p$  son respectivamente la reflectividad de la componente s y p del haz de infrarrojos modulado.

La técnica PM-IRRAS ha sido empleada en un gran número de estudios sin embargo no ha sido tan utilizada como los métodos FTIRS más sencillos. Esto puede deberse a la complejidad de la instrumentación necesaria y/o a que no se obtienen buenas líneas bases ya que la luz polarizada-s tiene intensidad cero en la superficie del electrodo pero además presenta una intensidad muy pequeña en disolución aproximadamente hasta unos 0.1  $\mu\text{m}$ , que no está compensada.<sup>26</sup>

Por otro lado las señales obtenidas con la técnica de PM-IRRAS son más difíciles de interpretar y su análisis cuantitativo es más complejo que con otras metodologías de IRRAS que hacen uso de la modulación del potencial. Sin embargo la técnica PM-IRRAS presenta una gran ventaja ya que permite registrar bandas absolutas en espectros a un solo potencial en vez de una diferencia de espectros como las técnicas SNIFTIRS, lo que facilita el acceso a estudiar películas insolubles adsorbidas sobre superficies electródicas.

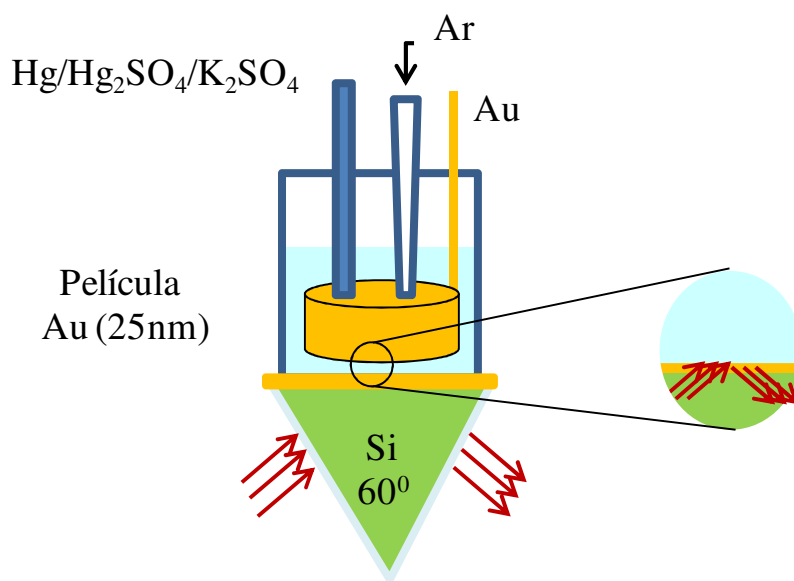
### **2.2.2 Medidas espectroelectroquímicas de infrarrojos**

En las medidas espectroelectroquímicas de ATR-SEIRAS, SNIFTIRS e infrarrojos de adsorción en disolución el control electroquímico se ha llevado a cabo con un sistema electroquímico multifuncional de CH instruments. Las medidas espectroscópicas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Nicolet 6700 equipado con un accesorio de reflectancia Veemax de Pike Technologies. La purga de la cámara del espectrofotómetro

se realizó con aire comprimido libre de CO<sub>2</sub> y vapor de agua. En todas las medidas se ha usado un detector MCT-A refrigerado con nitrógeno líquido. Los espectros se recogieron con una resolución espectral de 4 cm<sup>-1</sup> en el rango de frecuencias desde 4000 hasta 700 cm<sup>-1</sup>. Como ventana transparente para la radiación se utilizó un prisma de ZnSe biselado a 45° para las medidas de transmisión en disolución, un prisma de CaF<sub>2</sub> biselado a 60° en los experimentos de reflexión externa, SNIFTIRS (Subtractively Normalised Interfacial Fourier Transform InfraRed Spectroscopy), y un prisma de silicio en los de reflexión interna, ATR-SEIRAS (Attenuated Total Reflection Surface Enhanced Spectroscopy). Los espectros se recogieron con luz polarizada s o p seleccionada con un polarizador de ZnSe.

### 2.2.2.1 Reflexión interna: ATR-SEIRAS

En los experimentos de reflexión interna, ATR-SEIRAS se utilizó la configuración de Kretschmann (figura 2.8) lo que nos ha permitido trabajar con concentraciones pequeñas de adsorbatos.



**Fig. 2.8** Esquema de la célula espectroelectroquímica utilizada en los experimentos de ATR-SEIRAS

La célula electroquímica se unió al prisma de silicio mediante una unión de teflón. Se empleó como electrodo de referencia un electrodo saturado de sulfato mercurioso (Radiometer) y como contraelectrodo una lámina de oro de gran superficie. El electrodo de trabajo consistió en una película de oro nanoestructurada obtenida por depósito catódico en plasma de argón directamente sobre la base del mismo prisma de silicio. Para

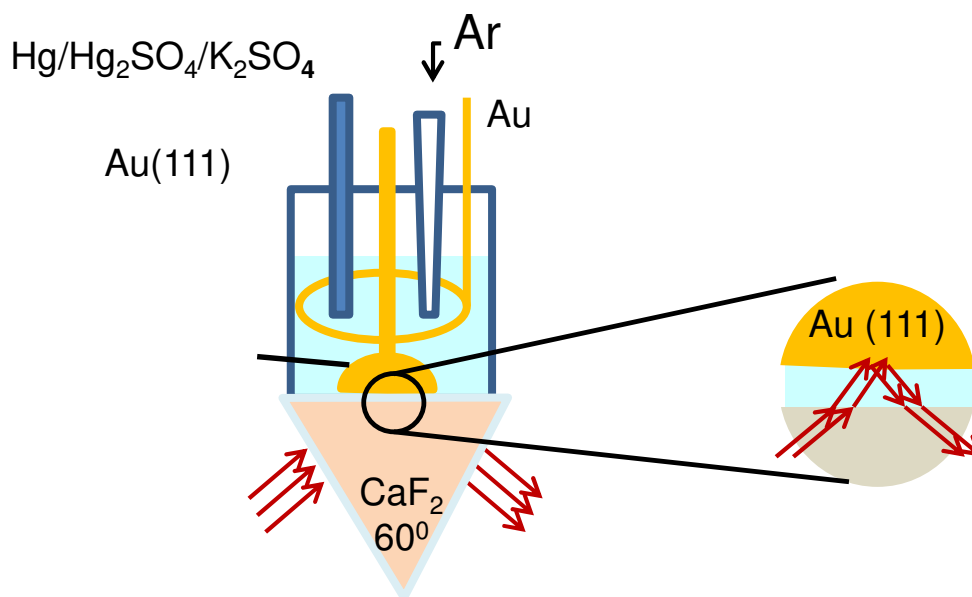
realizar el contacto eléctrico del electrodo se utilizó una fina lámina de oro situada entre la unión de teflón y el prisma. Una vez montada la célula espectroelectroquímica se rellenó la con la disolución de electrolito y se introdujeron los electrodos restantes, se realizaron experimentos de voltametría cíclica en un amplio margen de potenciales para activar la película y conseguir el voltagrama característico, y registrar los espectros de reflectancia en ausencia de adsorbato a distintos potenciales. Posteriormente se procede a la adicción de la base del ADN objeto de estudio y al registro de los espectros de reflectancia. En este caso, la reflectancia de referencia (R1) se ha obtenido bien con la misma disolución a la que se ha obtenido la reflectancia de la muestra (R2) pero a un potencial de desorción, o bien al mismo potencial que se ha obtenido la muestra, pero antes de añadir el adsorbato a la disolución de trabajo. En el espectro se representa  $-\log(R2/R1)$  en función del número de onda. Se registraron los espectros de reflectancia, compuestos de 100 interferogramas, a distintos valores de potencial en intervalos regulares.

#### **2.2.2.2 Experimentos de absorción en disolución**

En los experimentos de absorción en disolución se utilizó la misma célula que en los espectros de ATR, pero usando como ventana de IR un prisma de SeZn biselado a 45°, y sin depositar la capa delgada de oro. Los espectros se obtuvieron acumulando 1000 interferogramas y en todos los casos se tomó como referencia el espectro del electrolito en las mismas condiciones experimentales.

#### **2.2.2.3 Reflexión externa: SNIFTIRS**

Para las medidas espectroelectroquímicas en la configuración de reflexión externa se emplearon los mismos electrodos que los descritos para voltametría cíclica. La célula utilizada se basa en el diseño de Iwasita y colaboradores<sup>27</sup> y se esquematiza en la figura 9.



**Fig. 9** Esquema de la célula electroquímica utilizada en los experimentos de reflexión externa

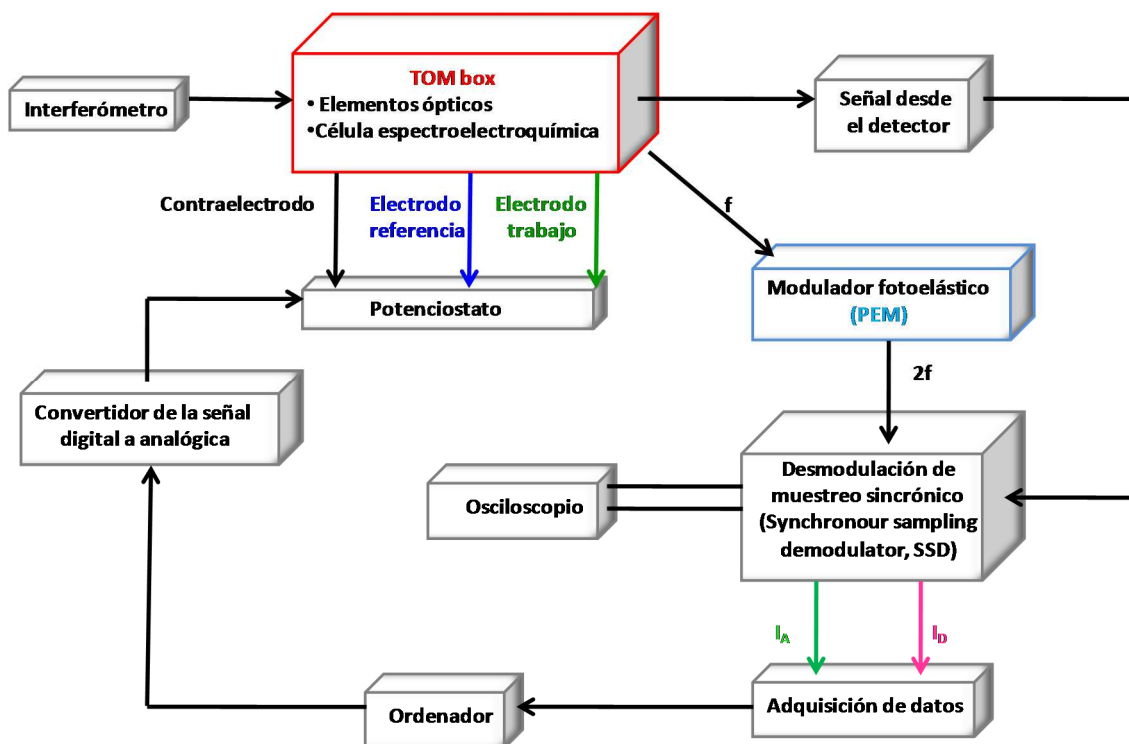
En la parte inferior se monta un prisma de  $\text{CaF}_2$  mientras que en la parte superior hay entradas para la corriente de argón y para los tres electrodos. La célula se colocó en configuración vertical fuera de la cámara del espectrofotómetro y por encima del elemento de reflectancia situándola para trabajar a un ángulo de incidencia de  $60^\circ$ . Con este tipo de configuración vertical se facilita la operación de montaje y la alineación del electrodo de trabajo antes de llevar a cabo la recogida de los espectros. Además de esta forma se pudieron realizar medidas previas de voltametría cíclica para comprobar la correcta orientación cristalográfica de la superficie del electrodo de trabajo y la pureza de la disolución en los instantes previos. Finalmente el electrodo de trabajo, cuya superficie debe estar paralela a la cara interna de la ventana presionó contra ésta para formar una capa delgada. En los experimentos de reflexión externa se usó la técnica SNIFTIRS. En ella se registran 50 interferogramas a un potencial de medida,  $E_2$ , y seguidamente otros 50 al potencial de referencia,  $E_1$  consiguiendo eliminar la mayor parte de la contribución de la capa delgada de disolución de electrolito. Este ciclo de medida se repite 40 veces y se promedian los espectros correspondientes, mejorándose así la relación señal/ruido de las medidas.

Las medidas se realizaron con luz polarizada s y p. En los espectros que se presentan en la tesis, teniendo en cuenta la ecuación (8) se representa  $-\frac{\Delta R}{R}$ . Por tanto, los espectros obtenidos con luz polarizada s solamente proporcionan información de las moléculas que desaparecen de la disolución como consecuencia del proceso de adsorción, dando lugar a

señales negativas. Por el contrario los espectros realizados con luz polarizada p registran tanto la absorción por parte de moléculas adsorbidas al potencial de medida (señales positivas) como la pérdida de absorción de radiación por parte de especies en disolución que han pasado a la interfase (señales negativas).

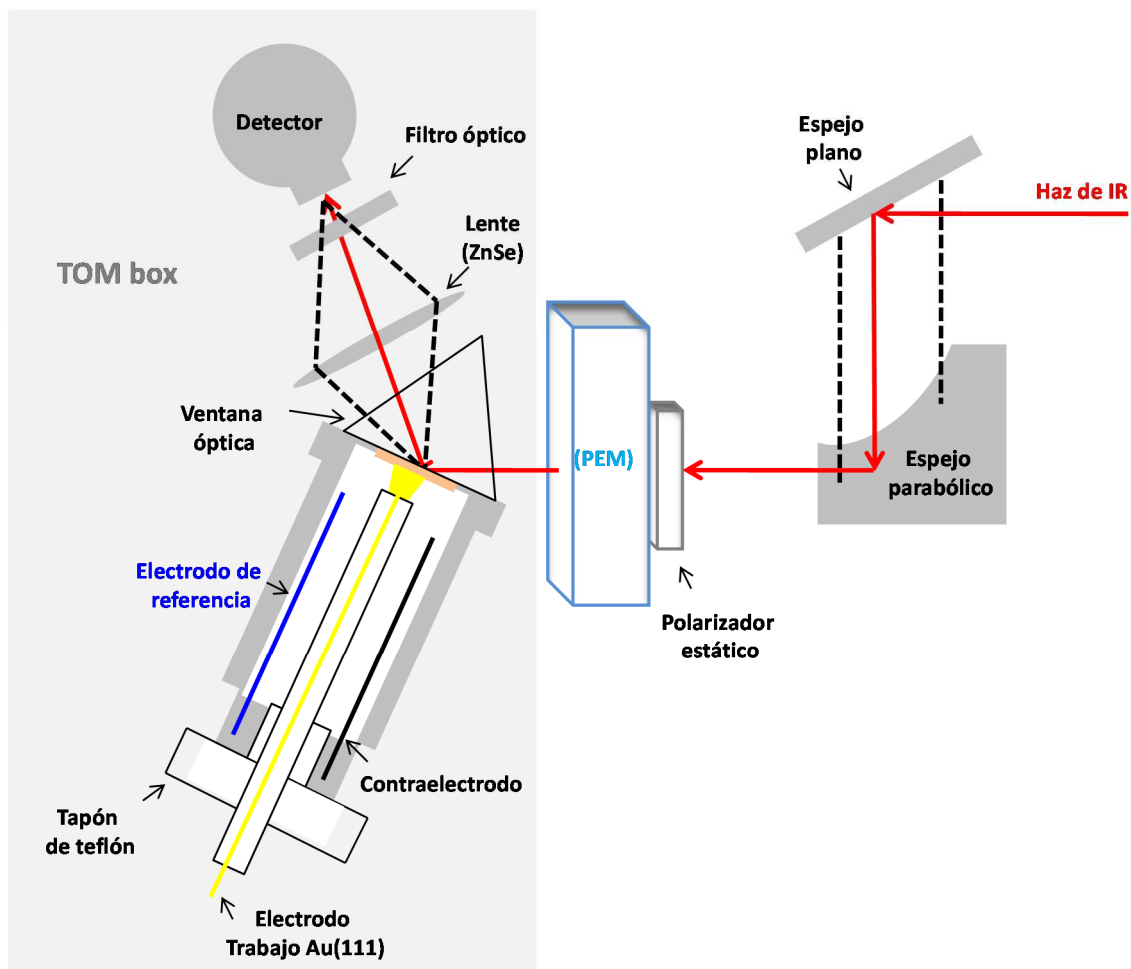
### 2.2.2.4 Reflexión externa: PM-IRRAS

Corn y colaboradores<sup>28,29</sup> fueron pioneros en describir como se obtenían espectros de diferencia de reflectancia de PM-FTIR utilizando velocidades normales del espejo y fueron capaces de demostrar como en ciertas ocasiones es posible evitar la necesidad de tomar el background si se conocen bien las propiedades ópticas y la dependencia con la longitud de onda teórica. El instrumento que se utiliza en técnica espectroscópica está esquematizado en la figura 10 y es el que se ha utilizado para la realización de esta tesis.



**Fig. 2.10** Diagrama de cajas que representa el dispositivo experimental utilizado en un experimento de PM-IRRAS, adaptado de la bibliografía.<sup>30</sup>

En el interior del TOM box, cámara externa al propio espectrofotómetro, se encuentran los elementos ópticos necesarios para la polarización modulada de la radiación, la célula electroquímica y el detector. Su disposición en el sistema puede esquematizarse como se muestra en la figura 2.11. En esta figura además pueden verse la disposición de estos elementos respecto a otros componentes del sistema.



**Fig. 2.11** Esquema del dispositivo experimental de PM-IRRAS mostrando los detalles de la célula electroquímica que se encuentra en el interior del TOM box. Adaptada de la bibliografía.<sup>30</sup>

El haz colimado de radiación infrarroja procedente del espectrofotómetro se redirecciona utilizando un espejo plano (Nicolet) y finalmente reenfoca hacia un polarizador estático (1'' de diámetro, Speac) colocado justo delante del modulador fotoelástico (PEM - Instrumento Hinds, PM 90 y II/ZS50 con cabeza óptica de ZnSe 50Hz) utilizando un espejo parabólico (f=6'', Nicolet). Al salir del modulador fotoelástico (PEM) el haz se refleja en la superficie del electrodo de trabajo y luego es reenfocado con una lente de ZnSe (f=1'', 1.5'' de diámetro con antirreflejos, Janos Technology) al detector de conductividad térmica (TRS 50MHz de anchura de banda, Nicolet). Finalmente la señal que llega al detector entra en un demodulador de muestreo sincrónico (Synchronous sampling demodulator, SSD de GWC). Simultáneamente la señal que proviene del PEM se está utilizando como señal de referencia y de entrada del SSD. Para conseguir poner en fase el SSD con el PEM se utiliza un osciloscopio. Como consecuencia de este proceso

se obtienen dos señales de salida correspondientes a la intensidad promedio,  $I_A$  y la de la diferencia de intensidad,  $I_D$  de las radiaciones polarizadas-p y -s.

### **2.2.3 Preparación de electrodos metálicos nanoestructurados**

En las experiencias de infrarrojos de reflexión externa se realizaron se realizaron depósitos de oro sobre un prisma de Silicio triangular para conseguir películas nanoestructuradas de Au (111) de 25 nm de espesor. Estos depósitos se realizaron tanto químicamente como por depósito catódico en plasma de argón, también conocido como sputtering

En ambos casos antes de realizar el depósito el plano de reflexión del prisma sobre el que se va a realizar el depósito se pulió con alúmina 0.05  $\mu\text{m}$  y se lavó con abundante agua ultrapura para eliminarla. Seguidamente se sonicó durante 10 minutos en 2-propanol. Finalmente, después de enjuagarlo exhaustivamente con agua ultrapura, se secó con argón.

#### **2.2.3.1 Electrodo de oro depositado químicamente**

En primer lugar, para eliminar la capa de óxidos de la superficie del prisma de Si se sumerge durante 3 minutos en una disolución 40% (peso/volumen) de  $\text{NH}_4\text{F}$ . Seguidamente la superficie sobre la que se va a realizar el depósito se limpia con agua ultrapura, se seca con Ar y se introduce en un vaso de precipitado sumergido en un baño a 55 °C, con la superficie a recubrir hacia arriba. Transcurridos 2-3 minutos en los que se estabiliza la temperatura, se añade sobre la superficie del prisma una disolución 1:1:1 en volumen de (1) 0.03 M  $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$ , (2) 0.3 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 0.1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  + 0.1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y (3) 2 % vol HF, con la que se mantiene en contacto durante 100 s, para controlar el espesor de la película  $\sim 25$  nm. Finalmente el depósito se limpia con abundante agua destilada y se seca con argón. Como está descrito en la bibliografía<sup>31,32</sup> la reducción del oro por el HF involucra una etapa de disolución del Si.

#### **2.2.3.2 Electrodo de oro depositado por sputtering**

El depósito catódico de oro en plasma de argón se ha llevado a cabo en una cámara de vacío de un sistema (Leica EM SCD500) equipado con una bomba turbomolecular. Previamente al proceso de depósito se hace ultra alto vacío en la cámara en la que se sitúa el prisma de silicio durante una hora. Posteriormente se abre la corriente de argón

hasta conseguir una presión en la cámara de  $5 \cdot 10^{-2}$  mbar e inmediatamente después se aplica un alto voltaje al cátodo de 3mA. En función de la corriente circulada y la distancia de la oblea metálica a la superficie del prisma pueden conseguirse distintas velocidades de depósitos. Para las condiciones concretas empleadas en esta tesis, la velocidad de depósito es de 0.01-0.02  $\text{nm s}^{-1}$ . El espesor de la película de oro se controla con una microbalanza de cuarzo colocada a la misma distancia de la oblea de oro de la que se encuentra la superficie del prisma de silicio.

## **2.3 Membranas biomiméticas**

### **2.3.1 Isoterma superficial o Isoterma de Langmuir**

Es la representación de la presión superficial en función del área de la interfase aire | disolución en presencia de un tensioactivo. En una isoterma superficial característica se pueden distinguir tres regiones así cuando el área disponible para formar la monocapa es grande las moléculas adyacentes están separadas, sus interacciones son débiles y se comportan como un gas en dos dimensiones. Si se reduce el área superficial por un sistema de barreras las moléculas empiezan a interactuar entre sí formándose un líquido en dos dimensiones. En ocasiones primero tiene lugar la formación de un líquido expandido y al seguir disminuyendo el área superficial se forma un líquido condensado. Al comprimir aún más la monocapa puede llegar a formarse un sólido bidimensional de tal forma que la monocapa pierde su fluidez. En ese momento una pequeña disminución del área originaria un aumento muy rápido de la presión pudiéndose incluso llegar a fracturar la monocapa y formar estructuras tridimensionales tales como micelas, bicapas o liposomas. Esta presión se denomina presión de colapso ( $\pi_c$ ). El área mínima que ocupa una molécula se puede obtener extrapolando el tramo de la isoterma previo a la presión de colapso.



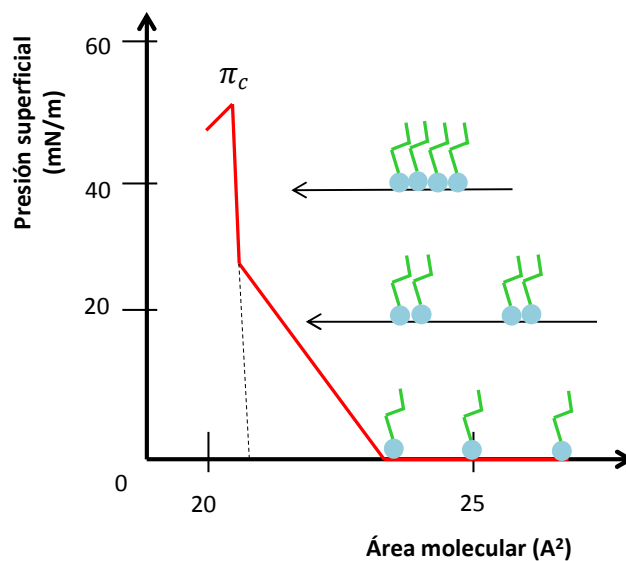


Fig. 2.12 Representación esquemática de una isoterma de Langmuir característica.

### 2.3.2 Preparación de membranas soportadas sobre electrodos

Existen descritos en la bibliografía diversos procedimientos para crear monocapas y bicapas miméticas sobre electrodos sólidos. Entre ellos se encuentran el método de transferencia de Langmuir-Blodgett y el de Langmuir-Schaeffer que permiten transferir monocapas o bicapas desde la interfase aire|agua hasta el soporte sólido, monocapas autoensambladas (SAMs) y la fusión de vesículas que permite la formación de bicapas a partir de vesículas lipídicas que se encuentran en disolución acuosa. Actualmente los métodos más comunes son la fusión de vesículas (VF) o los métodos de transferencia de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaeffer (LS). Sin embargo cuando el material muestra una alta afinidad por el sustrato como ocurre con los tioles con el oro es muy común formar monocapas con el procedimiento de autoensamblado de monocapa. Estas dos últimas metodologías son las utilizadas en esta tesis y se describen a continuación

#### 2.3.2.1 Autoensamblado de monocapas (SAMs)

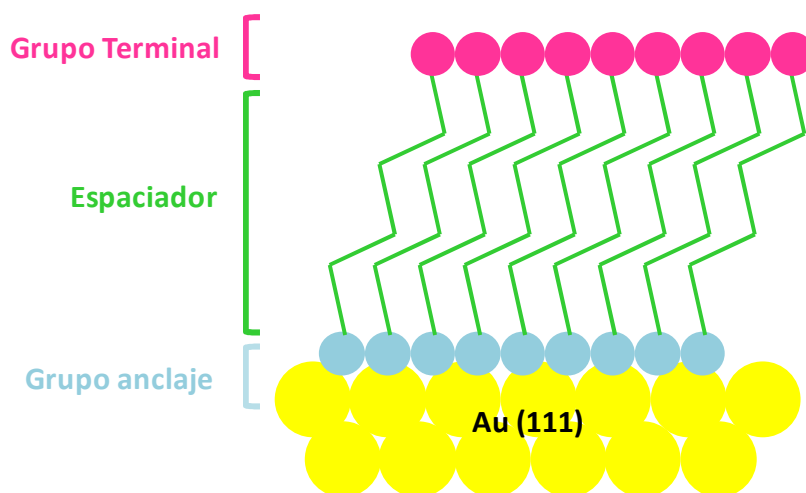
Las monocapas o películas autoensambladas (self-assembled monolayer, SAMs) están formadas por un conjunto de moléculas que como consecuencia del proceso de adsorción se han organizado espontáneamente sobre la superficie quedando en mayor o menor medida ordenadas en dominios de mayor o menor tamaño sobre la superficie. Es una técnica muy utilizada porque presenta las siguientes ventajas:

- Fácil preparación puesto que no requiere condiciones especiales como por ejemplo el ultravacío o equipos muy costosos.
- Versatilidad en el sustrato ya que se pueden formar sobre sustratos de diferentes tamaños y formas
- Gran utilidad para funcionalizar y estabilizar otras estructuras a escala nanométrica
- La estructura a nivel molecular puede modificar propiedades macroscópicas del sistema

Estos procesos de autoensamblaje están generalmente relacionados con un proceso de quimisorción exotérmico. En ellos debe tenerse en cuenta además de la energía de enlace “molécula-superficie” las interacciones no covalentes entre las moléculas como pueden ser los puentes de hidrógeno o las interacciones de Van der Waals, así como las interacciones que las moléculas tienen con el disolvente.

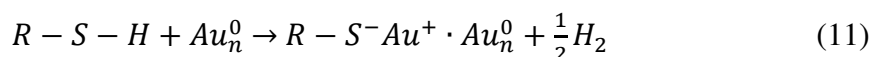
De esta forma la formación de la monocapa viene determinada por la afinidad entre el sustrato y el grupo de anclaje del compuesto activo. Sin embargo otras propiedades de la monocapa como su estructura, empaquetamiento, orientación y las propiedades fisicoquímicas superficiales dependen de las diferentes regiones que se pueden distinguir en la estructura del compuesto activo de la monocapa:

- El grupo de anclaje como se ha dicho es el responsable de la unión química de la monocapa al sustrato.
- El espaciador es el encargado de las fuerzas laterales y normalmente es una cadena alquílica.
- El grupo funcional terminal va a definir las propiedades de la nueva superficie. Además si es muy voluminoso o electrostático puede tener especial importancia en el orden compacto de la monocapa.



**Fig. 2.13** Representación esquemática de una monocapa autoensamblada, SAM, ideal sobre un electrodo monocristalino de Au(111).

Actualmente se conocen un gran número de grupos de anclaje que pueden unirse a metales específicos, óxidos metálicos o semiconductores. Concretamente el oro es un sustrato muy utilizado para formación de SAMs con compuestos que tengan como grupo terminal el azufre, como por ejemplo los tioles. En este caso el proceso de adsorción es posible dado la gran afinidad entre el sustrato y el grupo de anclaje. De hecho esta unión (ecuación 11) tiene lugar por la eliminación del átomo de hidrógeno terminal del grupo tiol (RSH), formándose un enlace S-Au parcial. La reacción por la que la molécula de tiol se enlaza covalentemente al oro se puede considerar como una adsorción oxidativa del enlace S-H con una eliminación reductiva del hidrógeno, aunque este último punto aún se sigue debatiendo.



El procedimiento general de preparación de monocapas autoensambladas compactas consiste en exponer el sustrato pulido y limpio durante unas horas (mínimo 12) a una disolución diluida del compuesto a depositar. Durante este tiempo tendrá lugar la adsorción rápida de las moléculas de adsorbato, sin embargo su reorganización para formar SAMs bien organizadas requiere tiempos largos. De esta forma el compuesto activo quedara anclado al sustrato por su grupo funcional, también conocido como cabeza de la monocapa, y exponer hacia fuera el grupo funcional que caracteriza la monocapa.

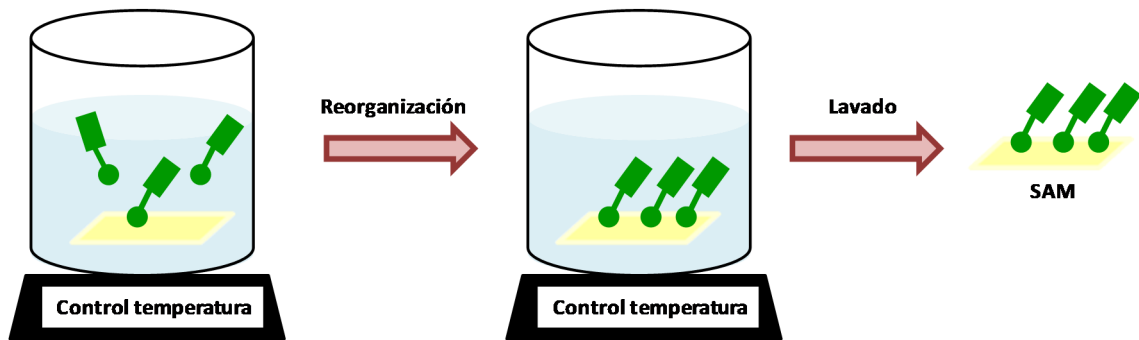


Fig. 2.14 Representación esquemática del proceso de formación de una SAM.

Debe tenerse en cuenta que existen otros muchos factores que pueden alterar la formación y la estructura de la SAM como es la correcta elección del disolvente, la temperatura, la concentración de adsorbato y el tiempo de inmersión, la pureza del adsorbato, la cantidad de oxígeno en la disolución y la limpieza y activación del sustrato.

### 2.3.2.2 Método de transferencia de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaeffer.

La técnica de Langmuir-Blodgett (LB) se basa en el movimiento vertical de un sustrato sólido a través de una monocapa comprimida en la interfase aire | disolución. La presión superficial y la temperatura de la monocapa deben controlarse para conseguir que en el momento de la transferencia la película orgánica esté en un estado condensado. De forma general esto ocurre para valores de presiones superficiales comprendidos entre 10 y 40 mN/m<sup>-1</sup>.

La transferencia de LB puede realizarse tanto sobre sustratos hidrofílicos como hidrofóbicos aunque el proceso es algo diferente. En el caso más común, donde el sustrato es hidrofílico el depósito se realiza elevando el sustrato sólido desde la subfase a través de la monocapa. Por el contrario en el caso de sustratos hidrofóbicos el depósito se hace sumergiendo el sustrato a través de la monocapa.

En ambos caso la transferencia de la película se caracteriza por la relación de transferencia,  $\tau$  que se define en la ecuación 12:

$$\tau = \frac{A_L}{A_S} \quad (12)$$

Donde  $A_L$  es la disminución en el área ocupada por la monocapa en la subfase y  $A_S$  es el área de sólido que queda revestida por las moléculas de sustrato.<sup>33</sup>

Para que la transferencia haya sido perfecta la relación de transferencia debe ser 1 o para considerarla buena estar en el intervalo entre 0.9-1.1. Si esto ocurre es muy probable que la película que se haya formado sea lo suficientemente homogénea. Para obtener una buena relación de transferencia es necesario elegir correctamente la velocidad de deposición, es decir la velocidad que lleva el sustrato a través de la monocapa mientras se está llevando a cabo la transferencia.

En una transferencia de LS el sustrato, que debe estar orientado paralelo a la superficie de monocapa comprimida, se pone en contacto con ella y se retira a velocidad muy lenta. Este procedimiento permite la transferencia de una sola monocapa sobre una superficie hidrofóbica.

Cabe destacar en este punto que si se quieren depositar bicapas se puede utilizar una combinación de ambos métodos de deposición, concretamente una combinación LB, LS con un electrodo de Au(111) daría como resultado una bicapa de tipo Y, en la que la primera monocapa queda unida al electrodo a través de las cabezas hidrofílicas mientras que la segunda capa de la bicapa expondría sus colas hidrofóbicas hacia el exterior.

## 2.4 Cálculos cuánticos GAUSSIAN

En las últimas décadas la Química Cuántica Computacional también ha adquirido un fuerte desarrollo debido al gran avance tecnológico en el campo de la informática, unido al desarrollo de la teoría del funcional de la densidad (DFT, “*Density Funtional Theory*”). Todo este desarrollo ha permitido realizar cálculos con bajo costo computacional pero que a la vez permitían obtener gran cantidad de información ofreciendo unos resultados con gran exactitud. Las aplicaciones de la teoría DFT son bastante extensas. Para sistemas adsorbato metal permite obtener buena información sobre las propiedades de adsorción; es decir geometrías optimizadas de la molécula adsorbida, energías de adsorción o frecuencias de vibración entre otras. Concretamente en esta tesis se han ejecutado cálculos DFT, con el programa Gaussian 09, que han permitido estudiar la geometría de algunas moléculas adsorbidas sobre sustratos sólidos de Au(111). Estos cálculos cuánticos se han llevado a cabo utilizando los funcionales B3LYP y PBE/PBE, y como base, 6-311<sup>++</sup>G(d,p), que ha empleado B. Giese<sup>34</sup> para el uracilo. El funcional B3LYP es el funcional híbrido más popular. Este tipo de funcional apareció a principios de los 90 y desde entonces su utilización ha crecido rápidamente y ha alcanzado gran popularidad. Este funcional permite obtener resultados muy precisos con bajos costes computacionales

sin embargo no puede utilizarse para los clúster de Au en este caso se ha tenido que utilizar el funcional LANL2DZ.

## 2.5 Bibliografía

1. Sluyters, J. H. On the Impedance of Galvanic Cells .1. Theory. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas-Journal R. Netherlands Chem. Soc.* **79**, 1092–1100 (1960).
2. Clavilier, J., Armand, D., Sun, S. G. & Petit, M. Electrochemical adsorption behaviour of platinum stepped surfaces in sulphuric acid solutions. *J. Electroanal. Chem.* **205**, 267–277 (1986).
3. Clavilier J. in *Interfacial electrochemistry: theory: experiment, and applications* (ed. Wieckowski, A.)
4. Greenler, R. G. Infrared Study of Adsorbed Molecules on Metal Surfaces by Reflection Techniques. *J. Chem. Phys.* **44**, 310–15 (1966).
5. Greenler, R. G. Reflection Method for Obtaining the Infrared Spectrum of a Thin Layer on a Metal Surface. *J. Chem. Phys.* **50**, 1963–1968 (1969).
6. Francis, S. A. & Ellison, A. H. Infrared Spectra of Monolayers on Metal Mirrors. *J. Opt. Soc. Am.* **49**, 131 (1959).
7. Hoffmann, F. M. Infrared reflection-absorption spectroscopy of adsorbed molecules. *Surf. Sci. Rep.* **3**, 107 (1983).
8. Bewick, Kunimatsu & Pons, S. Infrared spectroscopy of the electrode-electrolyte interphase. *Electrochim. Acta* **25**, 465–468 (1980).
9. Bewick, A. & Kunimatsu, K. Infra red spectroscopy of the electrode-electrolyte interphase. *Surf. Sci.* **101**, 131–138 (1980).
10. Brooksby, P. A. & Fawcett, W. R. Determination of the electric field intensities in a mid-infrared spectroelectrochemical cell using attenuated total reflection spectroscopy with the otto optical configuration. *Anal. Chem.* **73**, 1155–1160 (2001).
11. Milosevic, M. Internal Reflection and ATR Spectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* **39**, 365–384 (2004).
12. Osawa, M. Dynamic Processes in Electrochemical Reactions Studied by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy (SEIRAS). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **70**, 2861–2880 (1997).
13. Ataka, K., Yotsuyanagi, T. & Osawa, M. Potential-Dependent Reorientation of Water Molecules at an Electrode/Electrolyte Interface Studied by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **100**, 10664–10672 (1996).
14. Wan, L.-J., Terashima, M., Noda, H. & Osawa, M. Molecular Orientation and Ordered Structure of Benzenethiol Adsorbed on Gold(111). *J. Phys. Chem. B* **104**, 3563–3569 (2000).
15. Huck, C. *et al.* Surface-enhanced infrared spectroscopy using nanometer-sized gaps. *ACS Nano* **8**, 4908–4914 (2014).
16. Osawa, M. Surface-Enhanced Infrared Absorption. **81**, 163–187 (2001).
17. Greenler, R. G. Design of a reflection-absorption experiment for studying the ir spectrum of molecules adsorbed on a metal surface. *J. Vac. Sci. Technol.* **12**, 1410–1417 (1975).
18. A, E. S. S., Britz, D. & Mortensen, J. J. *Electroanal. Chem.*, 127 (1981) 231-240. **127**, 231–240 (1981).
19. Pons, S., Davidson, T. & Bewick, A. Vibrational spectroscopy of the electrode-solution interface. 2. Use of Fourier transform spectroscopy for recording infrared spectra of radical ion intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 1802–1805 (1983).
20. Blaudez, D. *et al.* Investigations at the air / water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **92**, 525–530 (1996).
21. Gilli, E., Horvath, A. E., Horvath, A. T., Hirn, U. & Schennach, R. Analysis of CMC attachment onto cellulosic fibers by infrared spectroscopy. *Cellulose* **16**, 825–832

- (2009).
22. Gilli, E. *et al.* Analysis of lignin precipitates on ozone treated kraft pulp by FTIR and AFM. *Cellulose* **19**, 249–256 (2012).
  23. Zamlynyy, V. & Lipkowski, J. in *Advances in Electrochemical Science and Engineering* (eds. Alkire, R. C., Kolb, D. M., Lipkowski, J. & Ross, P.) 315–376 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006). doi:10.1002/9783527616817.ch9
  24. Zamlynyy, V., Zawisza, I. & Lipkowski, J. PM FTIRRAS studies of potential-controlled transformations of a monolayer and a bilayer of 4-pentadecylpyridine, a model surfactant, adsorbed on a Au(111) electrode surface. *Langmuir* **19**, 132–145 (2003).
  25. Zawisza, I., Bin, X. & Lipkowski, J. Potential-driven structural changes in Langmuir-Blodgett DMPC bilayers determined by in situ spectroelectrochemical PM IRRAS. *Langmuir* **23**, 5180–5194 (2007).
  26. Christensen, P. A. In situ Infrared Spectroelectrochemistry. 530–571 (2007).
  27. T. Iwasita, F. C. N. In-situ Fourier transform infrared spectroscopy: a tool to characterize the metal-electrolyte interface at a molecular level. *Adv. Electrochem. Eng.* **4**, 123 (1995).
  28. Barner, B. J., Green, M. J., Saez, E. I. & Corn, R. M. Polarization Modulation Fourier-Transform Infrared Reflectance Measurements of Thin-Films and Monolayers at Metal-Surfaces Utilizing Real-Time Sampling Electronics. *Anal. Chem.* **63**, 55–60 (1991).
  29. Green, M. J., Barner, B. J. & Corn, R. M. Real-time sampling electronics for double modulation experiments with Fourier transform infrared spectrometers. *Rev. Sci. Instrum.* **62**, 1426–1430 (1991).
  30. Kycia, A. H., Su, Z., Brosseau, C. L., & Lipkowski, J. in *Vibrational Spectroscopy at Electrified Interfaces* (ed. John Wiley & Sons) 345–417 (Online 26 JUL 2013, 2013). doi:10.1002/9781118658871.ch11
  31. and, K. A. & Heberle\*, J. Functional Vibrational Spectroscopy of a Cytochrome c Monolayer: SEIDAS Probes the Interaction with Different Surface-Modified Electrodes. (2004). doi:10.1021/JA048346N
  32. Miyake, H., Ye, S. & Osawa, M. Electroless deposition of gold thin films on silicon for surface-enhanced infrared spectroelectrochemistry. *Electrochem. commun.* **4**, 973–977 (2002).
  33. Ania H. Kycia, ZhangFei Su, Christa L. Brosseau\*, and J. L. *In Situ PM-IRRAS Studies of Biomimetic Membranes Supported at Gold Electrode Surfaces your proof. Many thanks for your assistance. 'Vibrational Spectroscopy at Electrified Interfaces'*. (2013).
  34. Giese, B. & McNaughton, D. Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Study of Uracil. The Influence of the Surface Substrate, Surface Potential, and pH. *J. Phys. Chem. B* **106**, 1461–1470 (2002).

---

**Capítulo 3**

**Adsorción y co-adsorción de Adenina y Timina en  
función del pH**

---



## 3.1 Influencia del pH en la Adsorción de Adenina

### 3.1.1. Introducción

En disolución acuosa la adenina presenta dos equilibrios ácido base con valores de  $pK_a$  de 4.2 y 9.8<sup>1</sup> como se describió en el capítulo 1 de esta tesis.

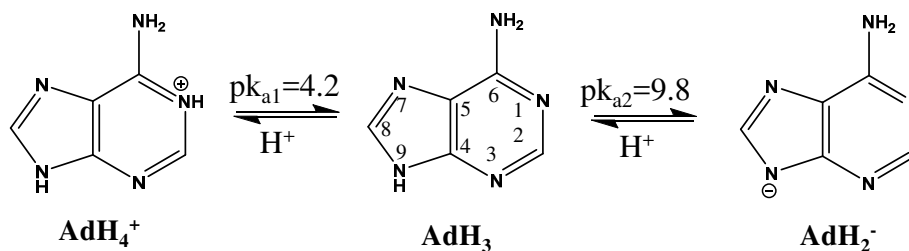


Fig. 3.1 Comportamiento ácido-base de la adenina

En los últimos años el estudio de la adsorción de adenina sobre electrodos de oro monocristalinos o nanoestructurados viene siendo uno de los principales objetos de estudio del Grupo de investigación dentro del cual se ha desarrollado esta tesis. Como se ha descrito en el capítulo 1 estos estudios se han realizado a valores de pH que incluyen el  $pK_{a1}$  de la adenina. Están basados en medidas electroquímicas,<sup>2</sup> de STM<sup>3</sup> y espectroscópicas de infrarrojos tanto en la modalidad de reflexión interna (utilizando la configuración de Kretschmann) como en la de reflexión externa (SNIFTIRS, y PM-IRRAS en el caso de pH neutro)<sup>4-6</sup> a valores de pH neutros y ácidos concluyendo que las interacciones de la molécula de adenina con el electrodo no dependen de la orientación cristalográfica ni del pH, siendo la especie que se quimisorbe la adenina neutra ( $AdH_3$ ) a través de  $N_{10}$  y  $N_1$ . Además se ha observado la fisisorción de la adenina protonada a valores bajos de potenciales y concentraciones bajas de adenina.

En esta parte del capítulo se va a ampliar el estudio electroquímico al caso particular de la adsorción de adenina sobre electrodos de oro a valores de pH que cubren el valor del  $pK_{a2}$ , con el objetivo de poder determinar las características de la adsorción de la forma aniónica de la adenina y determinar el valor del  $pK_{a2}$  en la interfase. Además se estudiará la co-adsorción de la adenina con las moléculas de agua del disolvente. Para ello se van combinar la voltametría cíclica con las técnicas espectroscópicas de infrarrojos en la modalidades de reflexión interna (configuración de Kretschmann) y/o reflexión externa (SNIFTIRS) como vienen descritas en el capítulo 2.

Los resultados obtenidos en esta primera parte del capítulo han dado lugar a una publicación en la revista *Electrochimica Acta*.<sup>6</sup>

### **3.1.2. Experimental**

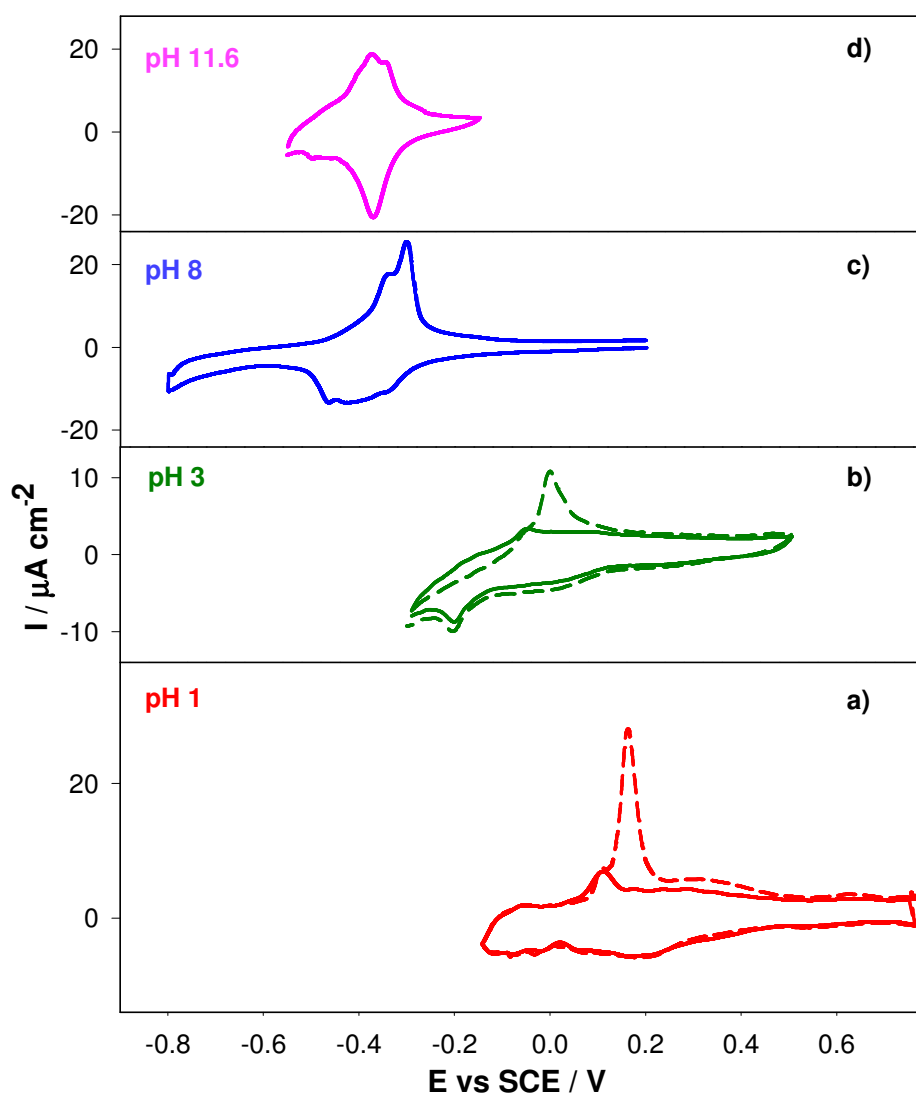
#### **3.1.2.1. Reactivos**

Se utilizó D<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®) para preparar la disolución de electrolito soporte (KClO<sub>4</sub> 0.1 M y KClO<sub>4</sub> 0.1 M + NaOH) y la disolución de stock de adenina (Sigma-Aldrich® sin más purificación) de concentración 10 mM. Los experimentos de infrarrojos obtenidos en configuración de reflexión externa se realizaron en medio deuterado mientras que los experimentos de reflexión interna se realizaron tanto en H<sub>2</sub>O como en D<sub>2</sub>O en los mismos electrolitos soportes (KClO<sub>4</sub> 0.1 M o KClO<sub>4</sub> 0.1 M + NaOH). Tanto en los experimentos de reflexión externa como interna la concentración de adenina fue 1 mM. Los experimentos de transmisión se realizaron en agua y en medio deuterado con una concentración de adenina 10 mM.

#### **3.1.3. Resultados de voltametría cíclica**

Los resultados de voltametría cíclica para la adsorción de la adenina desde disoluciones 1mM de diferentes valores de pH sobre electrodos monocristalinos de Au(111) se muestran en la figura 2. En todas las figuras se presenta el voltagrama estacionario para el proceso de adsorción. Además en las figuras 3.2a y 3.2b se incluye el primer barrido registrado con el electrodo tratado a la llama y puesto en contacto con la disolución a un potencial menor que el de inicio de la adsorción. Se observa que en cada primer ciclo de potencial, en el sentido creciente de potenciales aparecen picos que están relacionados con la adsorción de adenina y con la pérdida de la reconstrucción de la superficie del electrodo,<sup>7</sup> mientras que a partir del segundo ciclo ya hay un comportamiento estacionario, en el que solo se registran picos relacionados con la adsorción y la desorción de la adenina sobre la superficie no-reconstruida del oro. El tiempo de permanencia a los potenciales más bajos en el transcurso de los barridos no es suficiente para que la superficie del electrodo recupere la forma reconstruida por vía electroquímica.<sup>7</sup> Por tanto, los picos que se observan en los barridos estacionarios solamente se deben al proceso de adsorción/desorción de adenina sobre la forma no reconstruida de la superficie del electrodo.

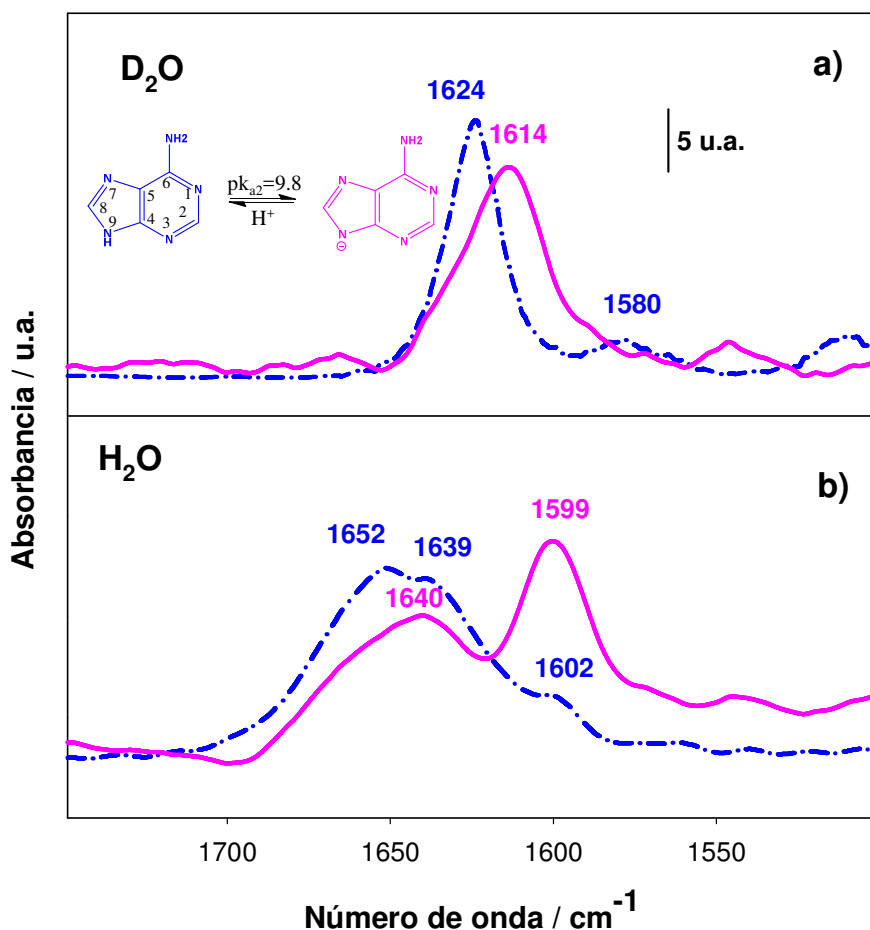
Al pasar de medios ácidos a neutros las señales de adsorción/desorción de la figura 2 se desplazan a potenciales menores, lo que indica que es necesaria la desprotonación previa de la forma catiónica de la adenina antes de adsorberse químicamente. Sin embargo los potenciales de pico de adsorción/desorción en medios neutros y básicos son muy parecidos lo que podría indicar que a valores de pH próximos al  $pK_{a2}$  o superiores podrían adsorberse tanto la forma aniónica de la adenina ( $AdH_2^-$ ) como la forma neutra ( $AdH_3$ ).



**Fig. 3.2** Voltagramas de la región capacitativa del Au(111) en presencia de adenina 1 mM a los valores de pH indicados. Velocidad de barrido =  $50 mVs^{-1}$ . Voltagramas estacionarios (líneas continuas). Primeros barridos obtenidos con el electrodo tratado a la llama, comenzando a los valores de potencial más bajos en cada caso (líneas discontinuas).

### 3.1.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de transmisión en disoluciones neutras y básicas.

En la figura 3.3 se muestran los espectros de transmisión obtenidos en disoluciones 0.1 M  $\text{KClO}_4$  0.1M o  $\text{KClO}_4$  0.1M + NaOH y 10 mM de adenina en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{D}_2\text{O}$  a dos valores de pH. Dado el valor de  $\text{pK}_{a2}$  de la adenina en disolución de 9.8<sup>1</sup> los espectros a pH 7 corresponden a la forma neutra de la adenina mientras que los de pH 11 se deben asociar a su forma aniónica. Sólo se muestra la región comprendida entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  en la que aparecen las bandas más interesantes en el presente estudio, consistentes en una señal intensa debida a tensiones de anillo y a la flexión de tijera del grupo amino, que en óxido de deuterio se desplaza a menores frecuencias. En esta misma región aparece la banda de flexión de OH del agua.



**Fig. 3.3** Región 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  del espectro de transmisión de adenina 10 mM en disoluciones 0.1 M  $\text{KClO}_4$  0.1M o  $\text{KClO}_4$  0.1M + NaOH : a)  $\text{D}_2\text{O}$  y b)  $\text{H}_2\text{O}$  a distintos valores de pH / pD: 7 (- · - · -) y 11 (—).

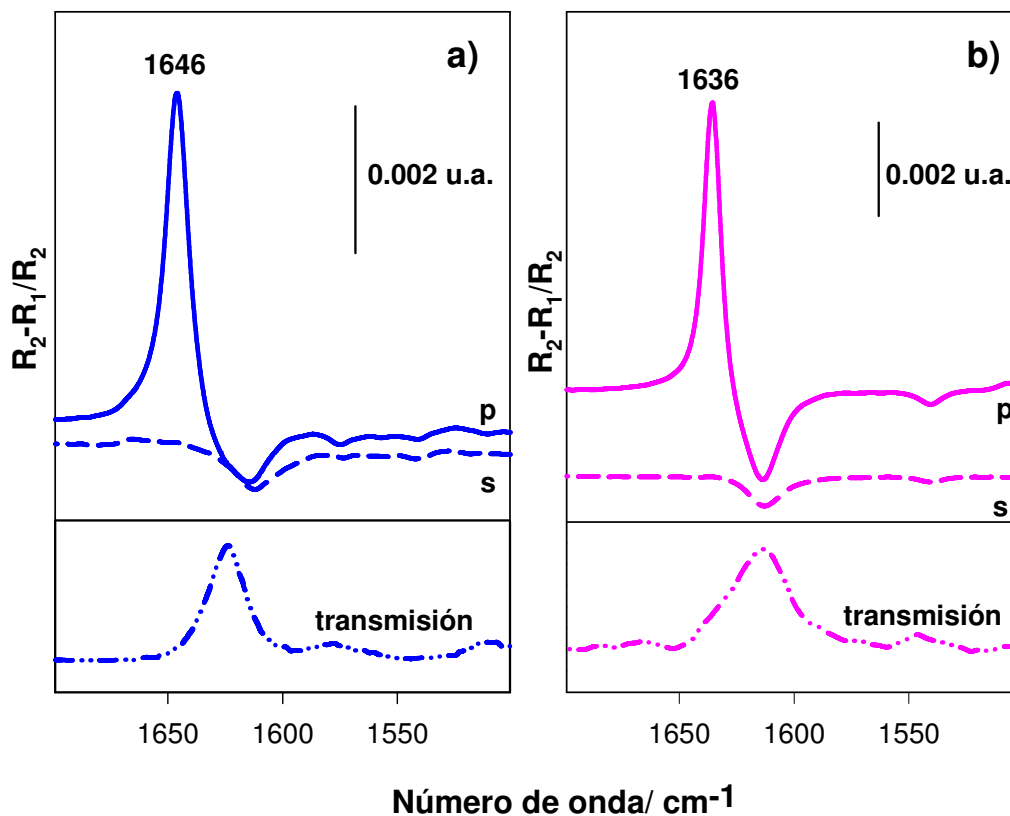
En los espectros obtenidos a los dos valores de pH se observan dos bandas intensas y solapadas, algo más desplazadas hacia el rojo en el caso del medio básico. La de mayor número de onda se asocia con la vibración de tijera del grupo amino mientras que la de menor número de onda corresponde a tensiones de anillo, que incluye fundamentalmente las tensiones C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> y C<sub>6</sub>-N<sub>10</sub>, y además C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>, y N<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.<sup>8</sup> En esa misma región aparece la vibración de flexión de OH correspondiente al agua, en torno a los 1650 cm<sup>-1</sup>. Como consecuencia, las señales de interés en disolución acuosa se observan como bandas anchas. En D<sub>2</sub>O se elimina por completo la contribución de la señal del disolvente ya que el modo de vibración de flexión O-D se desplaza a 1200 cm<sup>-1</sup>. Así, en la figura 3.3 a las señales correspondientes a la adenina son más estrechas. En estas condiciones sólo aparece una señal intensa correspondiente a las tensiones de anillo que al igual que en medio acuoso se desplaza hacia el rojo al aumentar el pH. La señal asociada al grupo amino se desplaza a frecuencias más bajas (< 1200 cm<sup>-1</sup>) como consecuencia de su deuteración.

### **3.1.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para Adenina Adsorbida sobre Electrodo de Oro desde Disoluciones Neutras y Básicas en D<sub>2</sub>O.**

Cuando la adenina se adsorbe sobre superficies metálicas de oro, según la regla de selección superficial, solamente serán activos los modos vibracionales que contengan una componente del momento dipolar de la transición perpendicular a la superficie del electrodo. Para obtener información estructural y poder proponer un modelo para la adsorción de la adenina a valores próximos al pK<sub>a2</sub> se realizan experimentos de infrarrojo de reflexión interna y externa sobre electrodos de oro utilizando como disolvente tanto agua como D<sub>2</sub>O para evitar así la interferencia de la señal de flexión de OH del agua (aproximadamente a 1650 cm<sup>-1</sup>). Así, la comparación de los espectros en disolución con los espectros de reflexión externa e interna de la adenina adsorbida sobre electrodos de oro permite proponer cuáles son los centros de coordinación en la molécula y la orientación molecular respecto a la superficie del electrodo.

En la figura 3.4 se muestran los espectros de reflexión externa con luz polarizada s y p para electrodos de Au(111) en contacto con disoluciones a) neutras y b) básicas de adenina 1mM en perclorato, preparadas en D<sub>2</sub>O. Estos espectros se obtuvieron utilizando la técnica SNIFTIRS a -0.2V vs SCE, potencial al cual la adenina está

adsorbida químicamente, tal como indican los voltagramas registrados en las mismas condiciones, y tomando como potencial de referencia  $-0.6\text{V}$  vs SCE, ya que a este potencial la adenina está completamente desorbida.



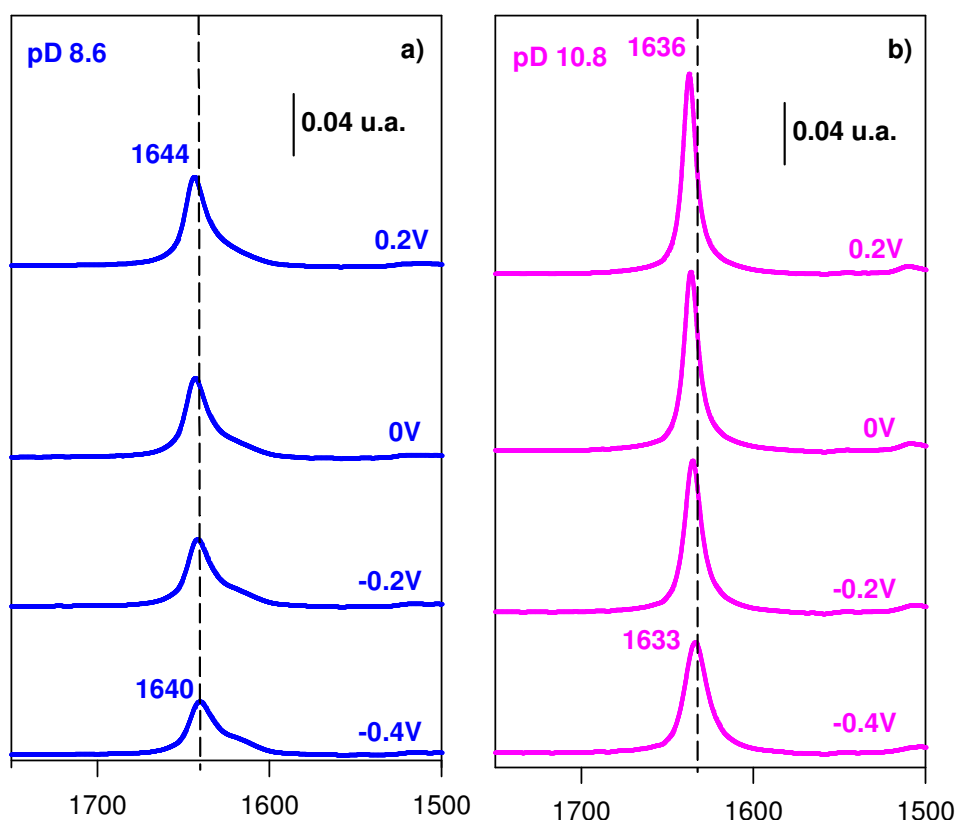
**Fig. 3.4** Espectros SNIFTIR de la adenina 1 mM adsorbida sobre electrodos Au(111) desde disoluciones  $\text{KClO}_4$  0.1 M o  $\text{KClO}_4$  0.1 M + NaOH en  $\text{D}_2\text{O}$ , con luz polarizada p (línea sólida) y s (línea discontinua).

La señal  $R_2$  fue obtenida a  $-0.2\text{ V}$  vs SCE y la señal  $R_1$  a  $-0.6\text{ V}$  vs SCE. a)  $\text{pD} = 7$  y b)  $\text{pD} = 11$ . Parte inferior de las figuras: espectros de transmisión obtenidos para disoluciones 10 mM de adenina en las mismas condiciones de pH.

Se observa que a ambos valores de  $\text{pD}$  los espectros obtenidos con luz polarizada p muestran bandas bipolares cuya parte negativa coincide en número de onda con las bandas que se observan en los espectros recogidos con luz polarizada s, y a su vez con las bandas de absorción de la adenina en disolución. La parte negativa de la banda obtenida con radiación p se puede entender debida a la pérdida de adenina en la capa delgada de disolución entre el electrodo y la ventana de  $\text{CaF}_2$  como consecuencia de la adsorción sobre el metal. La parte positiva de las bandas obtenidas en los espectros con luz p, debidas a la absorción de radiación por moléculas de adenina adsorbidas, aparecen a números de onda ligeramente superiores que en disolución, como

consecuencia de la interacción con el electrodo. Además, en los espectros obtenidos con luz p la banda bipolar se desplaza hacia el rojo en medio fuertemente básico. Por otro lado, la semianchura de la banda positiva en medio básico es aparentemente menor que la correspondiente semianchura en medio neutro lo que sugiere que a cada valor de pD la especie química adsorbida en ambos medios es distinta, en buen acuerdo con los resultados de voltametría cíclica: a valores de pH menores que el  $pK_{a2}$  se adsorbe la forma neutra ( $AdH_3$ ), mientras que a pH mayores que el  $pK_{a2}$  lo hace la forma aniónica ( $AdH_2^-$ ), cada una de ellas mayoritarias en disolución a los respectivos valores de pH

En la figura 3.5 se muestran los espectros de ATR-SEIRA en  $D_2O$  para electrodos nanoestructurados de oro en disoluciones de adenina 1mM, a distintos potenciales, y referidos a las señales recogidas en el electrolito soporte a los mismos valores de potencial, a valores de pD 8.6 y 10.8. Estos espectros se han obtenido sobre la misma película nanoestructurada de oro, modificando el pD de la disolución de  $KClO_4$  0.1 M que contiene adenina 1mM, mediante la adición de una disolución stock de NaOH. Se observa que a ambos valores de pD la señal asignada al modo de vibración de anillo de la adenina se desplaza a frecuencias mayores al aumentar el potencial. Además, se observa que las señales a pD básico son más estrechas e intensas y aparecen ligeramente desplazadas hacia el rojo, cuando se comparan con las correspondientes señales a pD neutro al mismo potencial.

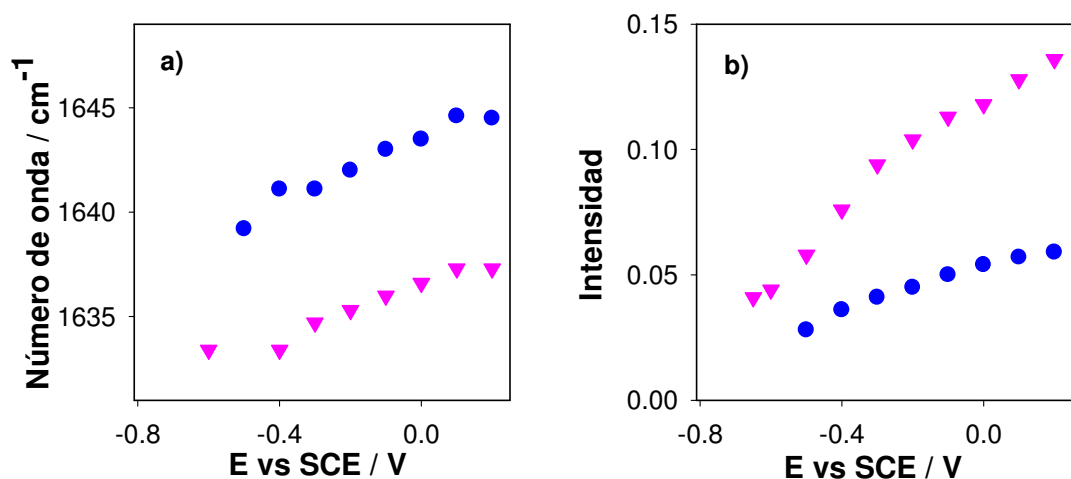


**Fig. 3.5** Espectros de ATR-SEIRA en D<sub>2</sub>O de la adenina 1 mM a los potenciales indicados a: a) pD = 8.6 y b) pD = 10.8. Referidos al electrolito soporte al mismo potencial.

Estos resultados de ATR-SEIRAS son coherentes con los espectros de reflexión externa obtenidos sobre Au(111) a distintos potenciales: la banda de vibración de anillo de la adenina adsorbida a un potencial alto se desplaza unos 9 cm<sup>-1</sup> hacia frecuencias más bajas al pasar de medio neutro a básico. Además la anchura de la banda en medio básico es menor.

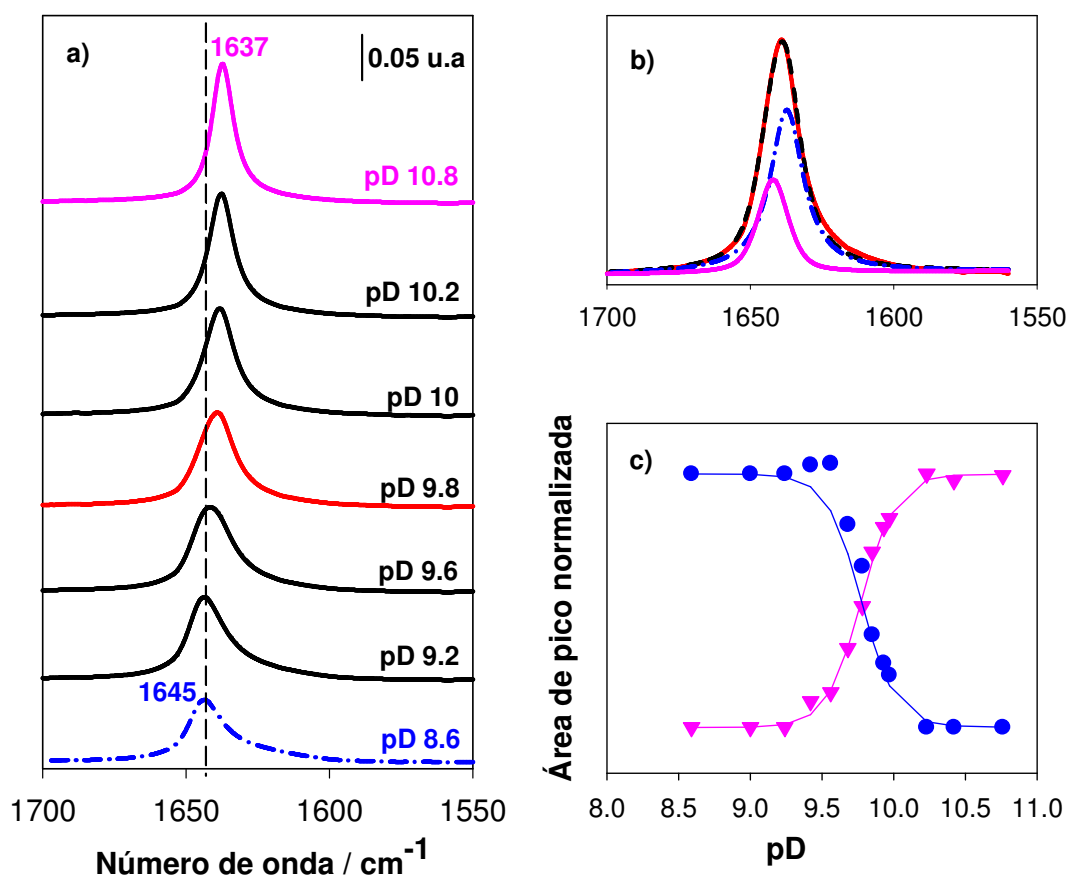
La influencia del potencial en la señal ATR-SEIRAS debida a la tensión de anillo de las formas neutra (AdD<sub>3</sub>) y aniónica (AdD<sub>2</sub><sup>-</sup>) de la adenina en D<sub>2</sub>O, es similar para las dos formas. El ligero desplazamiento con el potencial de los números de onda a los que aparecen las bandas puede estar originado por el efecto Stark y es prácticamente el mismo para las bandas de las dos formas de la adenina (Fig. 3.6a). Las intensidades de las señales debidas a la tensión de anillo de las dos formas de la adenina adsorbida a los distintos potenciales se han registrado en función del potencial en la figura 3.6b. En dicha figura puede observarse la misma dependencia con el potencial para las señales de tensión de anillo de la adenina neutra y aniónica.





**Fig. 3.6** a) Influencia del potencial en el número de onda de la banda de tensión de anillo del espectro ATR-SEIRA de la adenina adsorbida a pD 8 (●) y pD 10.8 (▼). b) Intensidades de las bandas en 6a en función del potencial.

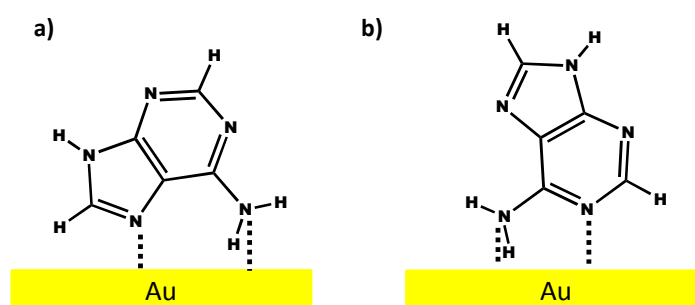
El  $pK_a$  de los compuestos orgánicos adsorbidos sobre superficies electrónicas puede variar respecto al valor en disolución cuando estos se adsorben, como consecuencia de la posible interacción del adsorbato con el metal o de la influencia que el campo eléctrico tiene sobre la actividad local de los protones. Para determinar el valor del  $pK_{a2}$  de la adenina en la interfase se analiza en D<sub>2</sub>O la variación con el pD de la banda correspondiente a las tensiones de anillo. En la figura 8a se observa que a 0.2 V vs SCE, potencial al que la adenina está adsorbida, esta señal se desplaza gradualmente hacia números de onda más bajos al aumentar el pD desde 1645 cm<sup>-1</sup> a valores de pD neutros, anteriores al  $pK_{a2}$ , hasta 1637 cm<sup>-1</sup> a valores de pD mayores que el  $pK_{a2}$ . Se observa igualmente que la señal aumenta en intensidad y se hace más estrecha al aumentar el valor de pD. Es razonable suponer que la banda que se observa en los espectros ATR-SEIRA de la figura 7a corresponde a la forma neutra de la adenina en el caso de pD 8.6 y a la forma aniónica para pD 10.8. A valores intermedios de pD, próximos al  $pK_{a2}$ , ambas formas pueden estar adsorbidas simultáneamente y por tanto ambas contribuyen a la señales totales que aparecen en la figura 3.7a.



**Fig. 3.7** a) Espectros ATR-SEIRA para la adenina adsorbida sobre películas de oro desde disoluciones 1 mM de adenina en D<sub>2</sub>O a los valores de pD indicados y a un potencial de adsorción de 0.2 V vs SCE. Los espectros están referenciados frente al electrolito soporte al mismo potencial (0.2 V vs SCE). b) Deconvolución de la banda experimental a pD 9.8 (—) en una componente a 1637 cm<sup>-1</sup> (—) y otra a 1645 cm<sup>-1</sup> (- · - · -). El resultado de la combinación de las dos señales deconvolucionadas se muestra también (- - -). c) Representación de las áreas normalizadas en función del pD de las bandas a 1637 cm<sup>-1</sup> (▼) y 1645 cm<sup>-1</sup> (●) que se obtienen al deconvolucionar las señales en a) y el mejor ajuste sigmoideal para cada gráfica.

La figura 3.7b muestra la deconvolución de la señal a pD 9.8. Se observa que esta señal se puede descomponer como la combinación de dos bandas gaussianas-lorentzianas centradas a 1645 cm<sup>-1</sup> y 1637 cm<sup>-1</sup> con las mismas anchuras respectivas que las bandas obtenidas a los valores de pD extremos. Las áreas de las señales a 1645 cm<sup>-1</sup> y 1637 cm<sup>-1</sup> obtenidas al deconvolucionar las señales obtenidas a distintos valores de pD deben ser proporcionales a las concentraciones superficiales de la forma neutra (AdD<sub>3</sub>) y aniónica (AdD<sub>2</sub><sup>-</sup>) de la adenina así como a la componente de los momentos de transición en la dirección perpendicular a la superficie electródica de la vibración de anillo en ambas formas. Para poder comparar las variaciones de las concentraciones superficiales de

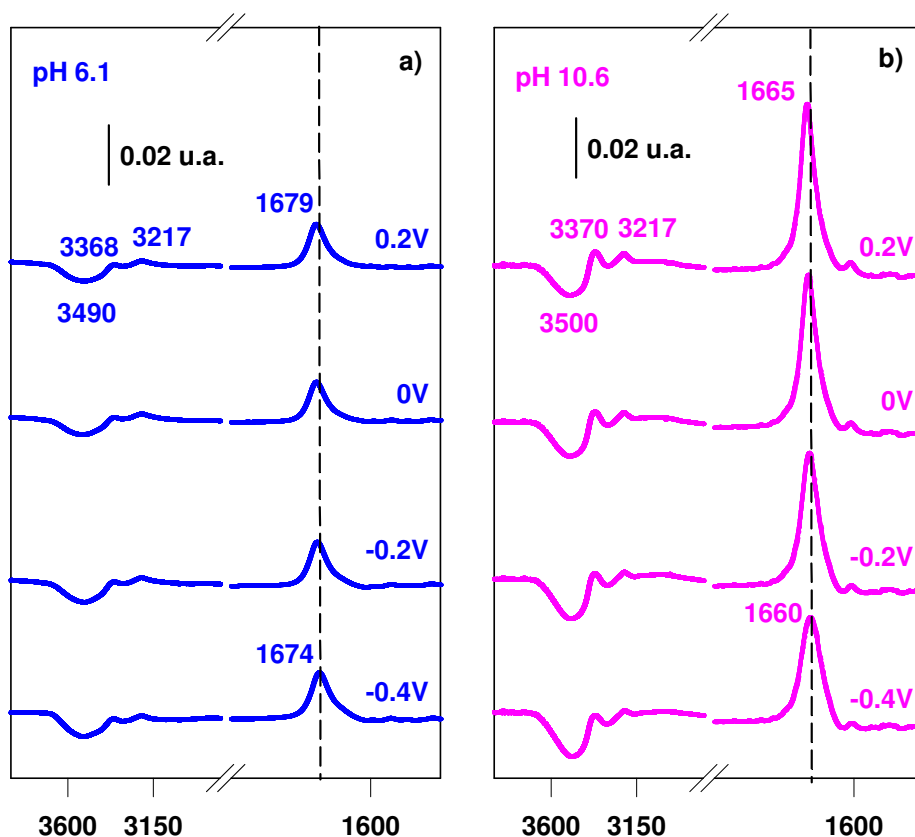
ambas especies con las variaciones de los valores de pD, se han normalizado las áreas de las señales de cada forma de la adenina con respecto a los valores máximos obtenidos a los valores de pD extremos, en cada caso. De esta forma se elimina la influencia de las diferencias en los momentos de transición (en magnitud y dirección) del modo de vibración en cada forma de la adenina adsorbida. El valor del  $pK_{a2}$  en la interfase para la adenina puede así estimarse en buena aproximación como el valor de pD al cual las intensidades normalizadas de ambas señales son iguales. En la figura 7c están representados los valores de las intensidades normalizadas para las dos señales obtenidas por deconvolución a 0.2 V vs SCE en función de los valores de pD del medio. En ambos casos se observa un comportamiento sigmoidal y las dos curvas se cortan a pD 9.8. Este mismo comportamiento se ha observado a valores menores de potenciales. Por tanto el valor de  $pK_{a2}$  para la adenina adsorbida es el mismo que para la adenina en disolución, e independiente del potencial. Esto indica que los sitios por los que la molécula de adenina interacciona con el electrodo están muy lejos de los átomos implicados en el equilibrio ácido base, es decir el N<sub>9</sub>, y por tanto la adsorción tiene lugar por el lado opuesto de la molécula, coordinándose al metal a través del nitrógeno del grupo amino N<sub>10</sub> y de alguno de los nitrógenos del anillo imidazólico, N<sub>7</sub> o N<sub>1</sub> (Fig. 8), tal como se han propuesto anteriormente en medios neutro<sup>6</sup> y ácido.<sup>4</sup> Más recientemente, los estudios de SNIFTIR cuantitativo<sup>5</sup> han permitido confirmar que la interacción tiene lugar a través del nitrógeno del grupo amino N<sub>10</sub> y del nitrógeno pirimidínico N<sub>1</sub>.



**Fig. 3.8** Modelo de adsorción propuesto para la adenina sobre electrodos nanoestructurados de oro a través de N<sub>10</sub> y a) N<sub>7</sub> b) N<sub>1</sub>

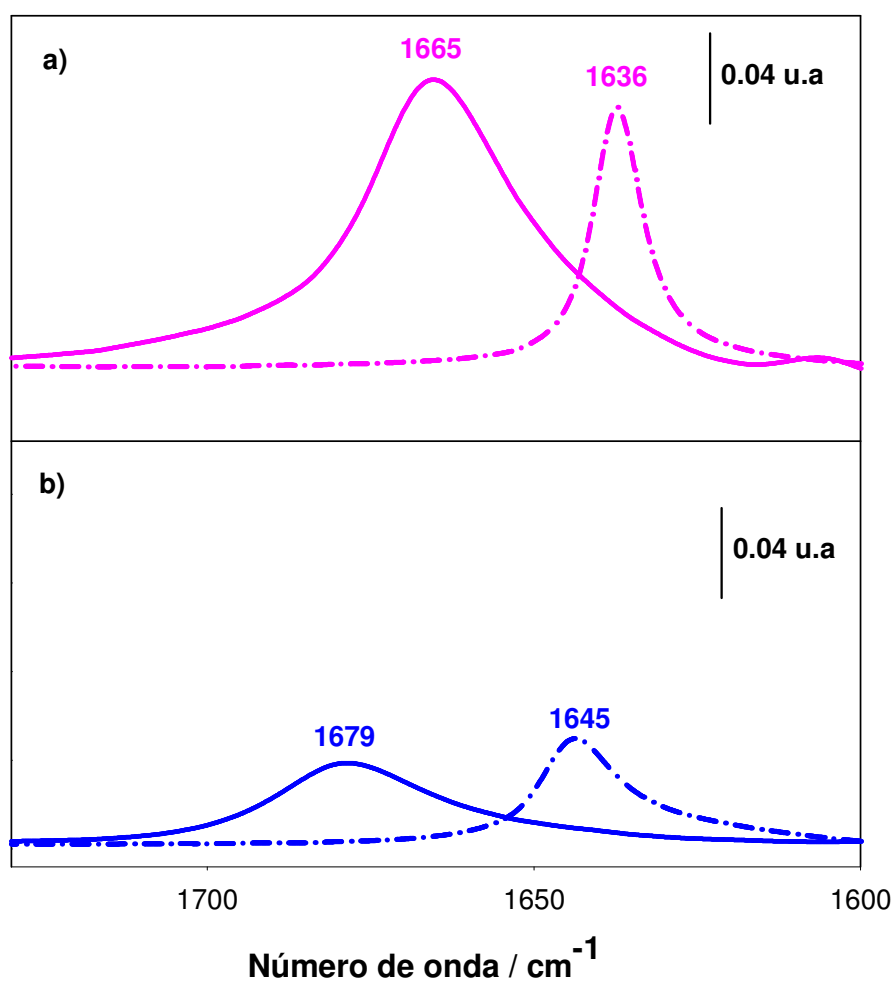
### **3.1.6. Resultados y Discusión de los Espectros ATR-SEIRA para Adenina Adsorbida sobre Electrodo de Oro desde Disoluciones Neutras y Básicas en H<sub>2</sub>O.**

Se han realizado experimentos ATR-SEIRA para la adenina adsorbida desde disoluciones acuosas a distintos valores de pH y de potencial. Algunos de los resultados obtenidos para la adsorción desde disoluciones 1 mM de adenina a distintos potenciales para valores de pH 6.1 y 10.6 se muestran en la figura 3.9. Los espectros están referidos a los obtenidos en el electrolito soporte a los mismos potenciales del electrodo. Se pueden observar los mismos efectos ya comentados para los experimentos en D<sub>2</sub>O, en lo que respecta a la influencia del potencial y del pH, sin embargo las señales espectroscópicas son más anchas porque engloban además de las debidas al modo normal de vibración de anillo, las debidas al modo de vibración de flexión de tijera del grupo amino de la adenina. Además, las señales podrían estar afectadas por la señal de vibración de flexión de los grupos OH del agua, que también aparece en torno a 1600 cm<sup>-1</sup>. En la figura 3.9 también se incluye la región de 2800-3900 cm<sup>-1</sup> en la que se observa una señal ancha y negativa alrededor de 3600 cm<sup>-1</sup> asignada a la vibración de tensión de los OH del agua. Su carácter negativo en los espectros referidos a los obtenidos en ausencia de adenina en disolución a los mismos potenciales, indica la pérdida de moléculas de agua de la interfase al adsorberse la adenina.



**Fig. 3.9** Espectros de ATR-SEIRA de la adenina adsorbida sobre oro desde disoluciones de adenina 1 mM en H<sub>2</sub>O, a los potenciales indicados a a) pH = 6.1 y b) pH = 10.6. Espectros referidos a los obtenidos en el electrolito soporte al mismo potencial.

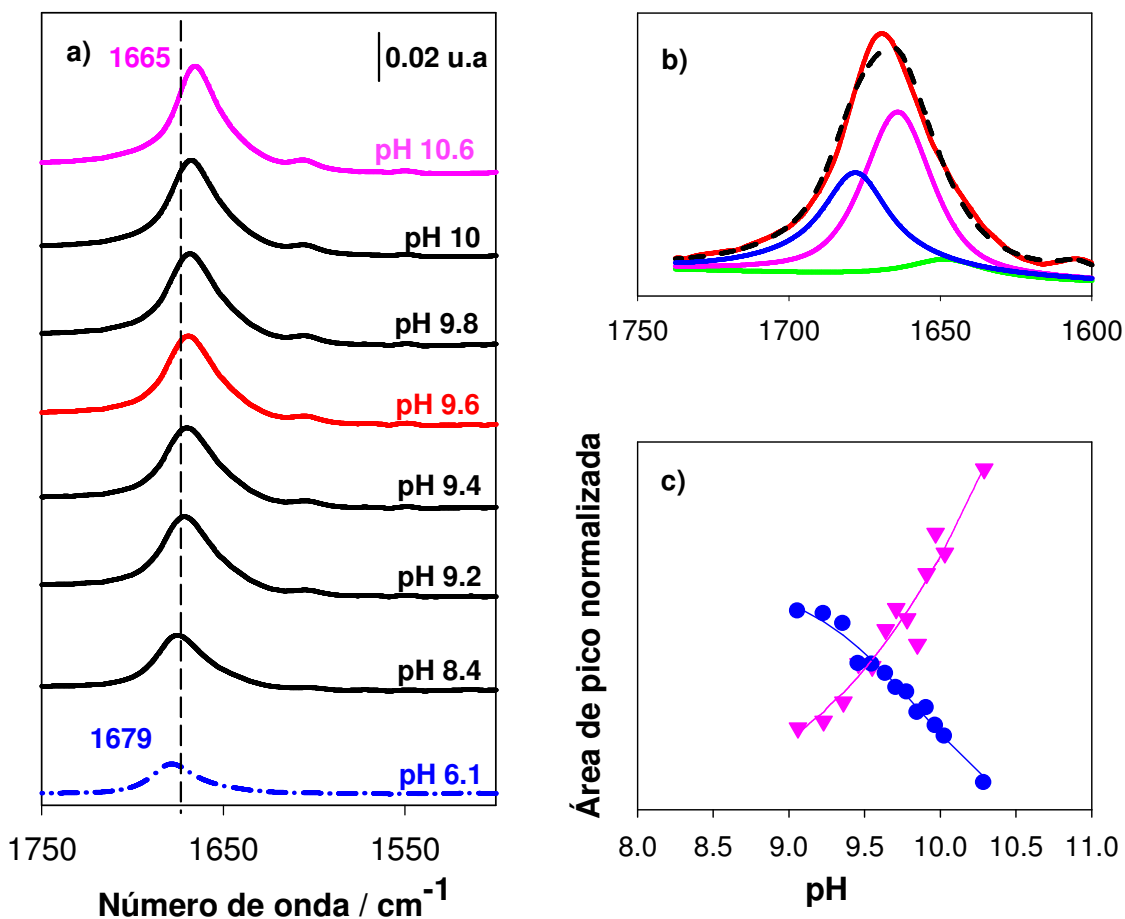
En la figura 3.10 se comparan las señales principales de la región en torno a 1600 cm<sup>-1</sup> de los espectros de la adenina adsorbida a un valor de potencial alto (0.2V vs SCE) en H<sub>2</sub>O con los correspondientes en D<sub>2</sub>O a dos valores de pH, uno neutro y otro básico. Efectivamente se observa que las señales más anchas en H<sub>2</sub>O que en D<sub>2</sub>O. Por otro lado, a ambos valores de pH las señales en medio acuoso aparecen a número de onda más alto que en medios deuterados, al igual que ocurre con los espectros de transmisión (Fig. 3.3). Por otra parte, muestran un comportamiento similar al modificar el pH: la señal se hace más estrecha y se desplaza hacia el rojo 10 cm<sup>-1</sup> al aumentar el pH.



**Fig. 3.10** Comparación de los espectros de ATR-SEIRA para la adsorción de adenina 1mM sobre películas nanoestructuradas de oro a pH/pD: a) 11 y b) 7. Las líneas continuas corresponden a espectros en H<sub>2</sub>O y las discontinuas en D<sub>2</sub>O. Todos los espectros están recogidos a 0.2 V vs SCE y referidos al electrolito soporte al mismo potencial.

A pesar de las complicaciones debidas a la mayor complejidad de las señales de la región en torno a 1600 cm<sup>-1</sup>, se ha realizado un análisis similar al efectuado en medio D<sub>2</sub>O en función del pH, a distintos potenciales de adsorción, para calcular el pK<sub>a2</sub> en la interfase. En la figura 11 se resumen algunos resultados obtenidos a un potencial alto de adsorción (0.2V vs SCE). Los resultados son análogos a los obtenidos en D<sub>2</sub>O. En la figura 3.11b puede observarse como ha sido necesario introducir en la deconvolución la señal correspondiente a los modos de vibración de tensión de OH (1648 cm<sup>-1</sup>) del agua que aparecen en esta región espectral y que no han sido completamente corregidas al referir los espectros a los obtenidos en ausencia de adenina. Con todo, el valor de pK<sub>a2</sub>

que se obtiene en la interfase es el mismo que en disolución, dentro de los errores experimentales.

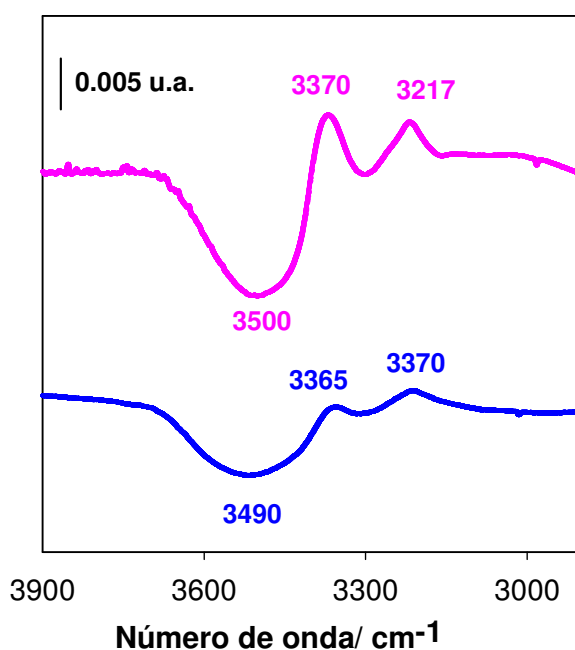


**Fig. 3.11** a) Espectros de ATR-SEIRA para la adenina adsorbida sobre películas de oro a 0.2 V vs SCE desde disoluciones 1 mM en H<sub>2</sub>O a los valores de pH indicados y referenciados a los obtenidos en el electrolito soporte a 0.2V vs SCE. b) Deconvolución de la banda experimental a pH 9.6 (—) en una componente a 1665 cm<sup>-1</sup> (—), 1679 cm<sup>-1</sup> (—) y otra a 1648 cm<sup>-1</sup> (—). Se muestra también el resultado de la deconvolución por combinación de todas las señales (- - -). c) Representación en función del pH de las áreas normalizadas de las señales de las bandas a 1679 cm<sup>-1</sup> (▼) y 1665 cm<sup>-1</sup> (●) que se obtienen al deconvolucionar las bandas experimentales en a). Se muestran también (en líneas continuas rosas y azules) las mejores líneas sigmoidales que se ajustan a las curvas intensidades vs pH.

En estudios previos del grupo de investigación,<sup>4</sup> se ha comprobado que en medios fuertemente ácidos la adsorción de adenina implica también la co-adsorción del disolvente, tal como indicaban las bandas en la región de 2800-3900 cm<sup>-1</sup>, características de la tensión de OH del agua. La intensidad de estas bandas aumenta con el potencial, al igual que las señales de adenina.<sup>4</sup> Además se propuso que la adsorción

de agua está determinada por la co-adsorción de iones perclorato en las regiones del electrodo libres de adenina adsorbida.

Sin embargo, en los espectros de ATR-SEIRA para la adenina adsorbida a valores de pH neutros y básicos en la región de 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 3.12) no se observan bandas positivas que se puedan asignar a los modos normales de vibración de tensión de OH. En esa región espectral solamente se observan dos señales positivas en torno a 3217  $\text{cm}^{-1}$  y 3370  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a los modos normales de vibración de tensión simétrico y asimétrico del grupo amino, respectivamente. Por el contrario, tal como ya se ha comentado, el carácter negativo de la banda ancha a 3490  $\text{cm}^{-1}$ , que se asigna a un modo de tensión característico de agua, sugiere que ésta es desplazada de la superficie del electrodo al adsorberse la adenina. Parece, por tanto, que en medios neutros y básicos no se co-adsorbe el agua, contrariamente a lo observado en medio ácido, por lo que se puede pensar que en medio ácido debe ser el ion hidronio el que induce la co-adsorción. Por otra parte, cabe destacar que la adsorción de la adenina desde los medios neutros y básicos tiene lugar a potenciales más negativos que en medio ácido, a los que no se detecta la adsorción de aniones perclorato, por lo que también podría entenderse que no se produce la co-adsorción del agua, al estar inducida por la co-adsorción de los aniones perclorato, tal como los experimentos en medio ácido parecen indicar.





**Fig. 3.12** Espectros de ATR-SEIRA para la adenina adsorbida sobre electrodos nanoestructurados de oro desde disoluciones 1mM de adenina a diferentes valores de pH. Los espectros se obtuvieron a 0.2 V vs SCE y están referidos al espectro obtenido en el electrolito soporte al mismo potencial.

### 3.1.7. Conclusiones

Tanto los espectros de reflexión externa de la adenina adsorbida sobre electrodos de Au(111) como los de ATR-SEIRA de la adenina adsorbida sobre electrodos nanoestructurados de oro, han puesto de manifiesto la adsorción de dos formas distintas de la adenina en función del pH de la disolución. La conclusión se ha basado en que la señal más intensa en torno a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , asignada a un modo normal de vibración de tensión del anillo pirimidínico, presenta características distintas en medios neutros y básicos: la señal en medio básicos es más intensa y estrecha y está desplazada hacia números de onda más bajos que la señal en medios neutros, en buena concordancia con los espectros de transmisión de la adenina en disoluciones básicas y neutras en las que las formas que predominan en disolución son la forma aniónica desprotonada ( $\text{AdD}_2^-$ ) y la neutra ( $\text{AdD}_3$ ) de la adenina respectivamente.

La alta resolución y sensibilidad de los experimentos ATR-SEIRAS han permitido deconvolucionar las bandas en torno a  $1640\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de anillo de las dos formas moleculares de la adenina en un rango de pD desde 8.6 hasta 10.8. A partir del análisis de las variaciones de las áreas normalizadas de dichas señales se ha podido obtener el valor del  $\text{pK}_{a2}$  de la adenina adsorbida. Este valor de  $\text{pK}_{a2}$  coincide con el de la adenina en disolución y es independiente del potencial de la interfase, lo que confirma el modelo propuesto en trabajos anteriores para la adsorción de adenina sobre electrodos de oro, en el que los átomos implicados en la interacción con el electrodo son el nitrógeno del grupo amino,  $\text{N}_{10}$ , y  $\text{N}_1$ , pero no el  $\text{N}_9$  que es el que está implicado en el segundo equilibrio ácido-base de la adenina.

Los experimentos de FT-IRRAS similares, realizados en  $\text{H}_2\text{O}$  a distintos valores de potenciales y de pH del medio presentan bandas más anchas en la región en torno a los  $1600\text{ cm}^{-1}$  ya que aparecen además en esta región las señales de flexión de tijera del grupo amino y la de flexión de los OH de la molécula de agua (esta última puede no corregirse bien). No obstante, los experimentos confirman las conclusiones acerca de la adsorción de las dos formas de la adenina implicadas en el segundo equilibrio ácido-base, y el análisis de las áreas normalizadas de las señales en función del pH del medio

han permitido obtener el mismo valor de  $pK_{a2}$ . Por otra parte, la comparación de los espectros ATR-SEIRA en la región de altos número de onda ( $2800-2900\text{ cm}^{-1}$ ) obtenidos en disoluciones acuosas a valores de pH neutros y básicos ponen de manifiesto que en estas condiciones no tiene lugar la co-adsorción de agua ni la de iones perclorato, contrariamente a lo observado en medio ácido.

## 3.2 Adsorción de timina sobre electrodos de oro. Influencia del pH

### 3.2.1. Introducción

La timina en disolución está implicada en un único equilibrio ácido-base con un valor de pKa de 9.6. La desprotonación de la timina a su vez puede dar lugar a dos especies tautoméricas (Fig. 3.13) tal y como se describió en el capítulo 1.

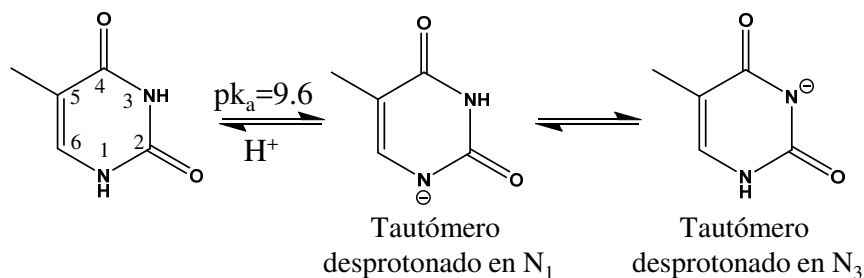


Fig. 3.13 Comportamiento ácido-base de la timina

La estabilidad de ambos tautómeros en disoluciones acuosas ha sido estudiada por espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis) y técnicas espectroscópicas concluyendo que en disoluciones básicas están presentes en las proporciones similares.<sup>9</sup>

La adsorción de la timina sobre electrodos de Au(111) ha sido estudiada utilizando métodos electroquímicos clásicos, XPS “ex situ”, STM “in-situ” y Espectroscopía de reflexión absorción infrarroja por transformada de Fourier in situ (FT-IRRAS) en la configuración de reflexión externa<sup>10,11</sup> concluyendo que el estado quimisorbido o fisorbido y la orientación que la timina adopta respecto al electrodo depende fuertemente del potencial aplicado como se describió en el capítulo 1. Además la adsorción de la timina sobre el electrodo de oro parece indicar la desprotonación previa de la misma antes de adsorberse.

Estudios posteriores en los que se combinan cálculos teóricos DFT con técnicas de espectroscopía Raman han sugerido que adsorbido sobre nanopartículas de oro y plata el tautómero más estable es el  $N_3$ , sin embargo el tautómero  $N_1$  también puede detectarse.

En esta parte del capítulo se utiliza la espectroscopía de ATR-SEIRA (descrita en detalle en el capítulo 2) para estudiar la adsorción de timina sobre electrodos de oro en un amplio rango de pH con el fin de analizar el equilibrio tautomérico de la timina adsorbida. Los resultados espectroscópicos se han interpretado haciendo uso de cálculos

DFT de ambas formas tautoméricas adsorbidas sobre superficies de oro. La gran sensibilidad de la técnica espectroelectroquímica nos ha permitido analizar la preponderancia de cada tautómero de timina en función del pH. Además se ha determinado la influencia del campo eléctrico en la orientación del plano molecular y los sitios de interacción con el metal de los tautómeros adsorbidos estudiando la región espectral entre  $2800-3300\text{ cm}^{-1}$  que comprende las tensiones de CH y CH<sub>3</sub>. Los resultados se han explicado sobre la base de la energía de interacción electrostática con el momento dipolar permanente. También se incluye el estudio de la coadsorción del agua con los tautómeros desprotonados en N<sub>1</sub> y N<sub>3</sub> a partir del análisis de la región espectral  $2800-3900\text{ cm}^{-1}$ .

Los resultados obtenidos en esta segunda parte del capítulo han dado lugar a una publicación en la revista *Electrochimica Acta*.<sup>12</sup>

### **3.2.2. Experimental**

#### **3.2.2.1. Reactivos**

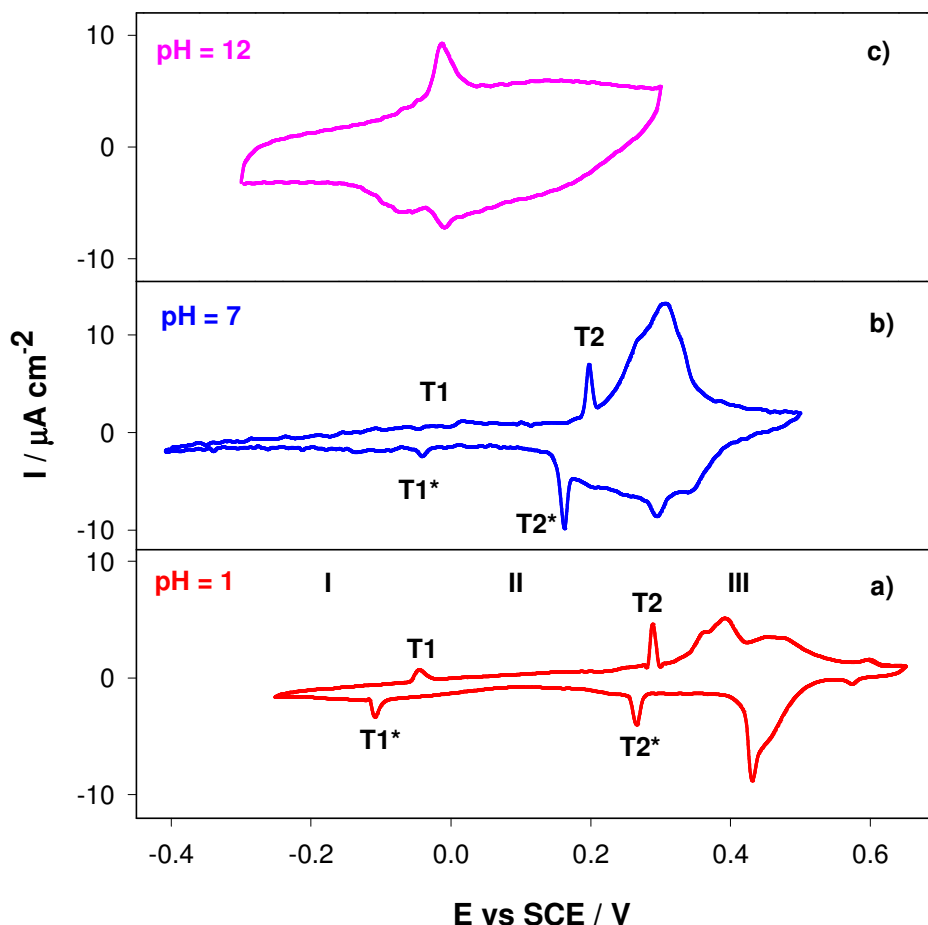
Se utilizó H<sub>2</sub>O ultrapura y D<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®) para preparar la disolución de electrolito soporte (HClO<sub>4</sub> 0.1 M, KClO<sub>4</sub> 0.1 M y KClO<sub>4</sub> 0.1 M + NaOH) y la disolución de stock de timina (Sigma-Aldrich® sin más purificación) de concentración 10 mM. Los experimentos de infrarrojos obtenidos en configuración de reflexión interna se realizaron tanto en H<sub>2</sub>O como en D<sub>2</sub>O en los mismos electrolitos soportes (HClO<sub>4</sub> 0.1 M a pH 1, KClO<sub>4</sub> 0.1 M a pH 7 y KClO<sub>4</sub> 0.1 M + NaOH a pH 12). La concentración de timina en estos experimentos fue 1 mM. Los experimentos de transmisión se realizaron en agua y en medio deuterado con una concentración de timina de 10 mM.

#### **3.2.3. Resultados de Voltametría cíclica**

En la figura 3.14 se muestran los voltagramas cíclicos obtenidos a diferentes valores de pH para disoluciones de timina 1 mM sobre electrodos monocristalinos de Au(111).

A pH 1 se pueden distinguir claramente tres regiones en función del potencial descritas por Roelfs y colaboradores.<sup>10</sup> Los límites entre cada fase vienen marcados por picos de transición de fase T1/T1\* y T2/T2\*. En orden creciente de potencial la primera corresponde a una fase fisisorbida desordenada (I), la siguiente se debe a una fase

fisisorbida con las moléculas ordenadas (II) y la última se atribuye a una fase en la que las moléculas de timina están quimisorbidas (III).



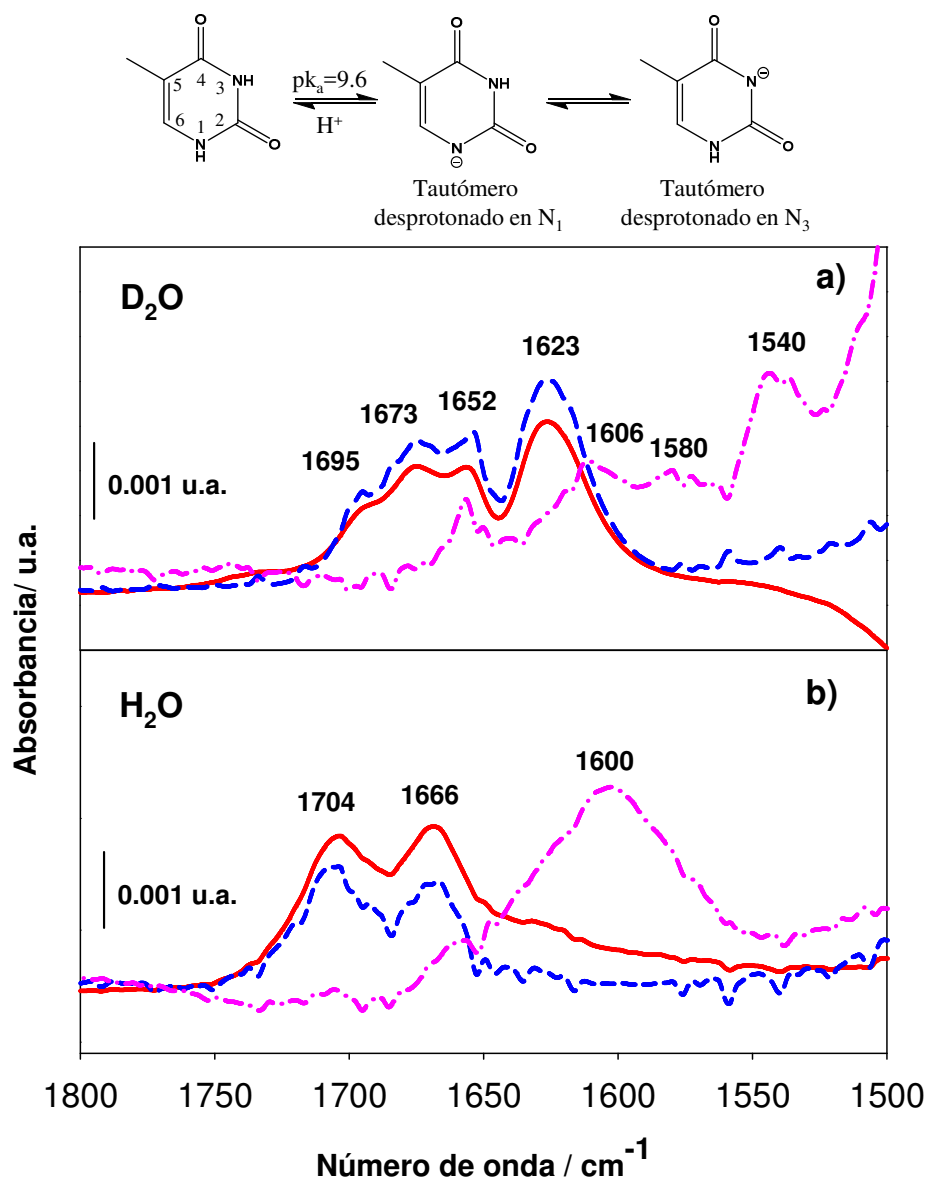
**Fig. 3.14** Voltagramas estacionarios de electrodos Au(111) obtenidos en disoluciones de timina 1mM a los valores de pH indicados. Velocidad de barrido 50 mV/s.

Al aumentar el pH los picos de transición de fase T2/T2\* se desplazan a potenciales menores al tiempo que se hace cada vez más pequeña la región (II) del voltagrama hasta que finalmente desaparece a valores de pH altos. Por su parte, los picos de adsorción química se desplazan hacia valores más bajos de potencial a medida que aumenta el pH del medio. Esto sugiere que la formación de la fase quimisorbida está conectada con una desprotonación previa de la molécula como ya han sugirieron previamente Roelfs y colaboradores.<sup>10</sup>

### 3.2.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de transmisión en disolución

En la figura 3.15 se muestran los espectros de transmisión en la región entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{D}_2\text{O}$  para disoluciones de timina 10 mM a tres valores de pH. Cabe destacar la gran coincidencia de los espectros a pH 1 y 7, y su diferencia con los espectros obtenidos a pH 12, lo que sugiere que los espectros en medios ácido y neutro se deben a la forma neutra de la timina que es la predominante a ambos valores de pH, en tanto que a pH básico el espectro está originado por alguno de los tautómeros de la timina aniónica desprotonada, conforme al valor del  $\text{pK}_a$  en disolución 9.6.

En medios deuterados las bandas de mayor intensidad se corresponden con los modos normales de vibración de los dos grupos CO y con la del modo normal de tensión de  $\text{C}_5=\text{C}_6$ . Además aparecen algunas bandas de menor intensidad que se asocian flexiones de CH o  $\text{CH}_3$ . El espectro de transmisión obtenido en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 12 presenta las mismas características que el obtenido por Wierhowski para la timina en disoluciones de NaOD 0.01 M.<sup>9</sup> En medios acuosos esta región del espectro incluye además el modo normal de vibración de flexión de NH y el de flexión HOH del disolvente. No obstante, las asignaciones se discutirán más adelante sobre la base de cálculos DFT.



**Fig. 3.15** Espectros de absorción de infrarrojos para disoluciones de Timina 10 mM en: a) D<sub>2</sub>O y b) H<sub>2</sub>O a distintos valores de pH; pH 1 (—), pH 7 (- - -) y pH 12 (- · - · -).

En la región del espectro comprendida entre 2800 y 3300 cm<sup>-1</sup> (no mostrada en la figura) se encuentran las señales asociadas a los modos normales de vibración de tensión de CH y NH pero ambas poseen momentos dipolares de la transición pequeños por lo que son bandas muy débiles. Además, la banda correspondiente a los modos normales de vibración de tensión de NH no se puede detectar con facilidad debido al solapamiento con las vibraciones de tensión OH del disolvente. En el caso de los medios deuterados las bandas de los modos de tensión ND y OD se desplazan a números de onda inferiores.

La asignación de las bandas principales se da en la Tabla 1 y están basadas en nuestros cálculos DFT, en comparación con los espectros experimentales obtenidos en los medios acuosos y deuterados. Las frecuencias de las señales de los espectros teóricos en la región entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos para la timina neutra son comparables (teniendo en cuenta las diferencias en los factores de escala correspondientes)<sup>13</sup> con los valores y la asignación aportada por Chandra y colaboradores,<sup>14</sup> obtenida a partir de cálculos DFT usando como nivel de teoría un B3LYP / 6-31++G(d,p), y al espectro experimental de timina en una matriz de Ar y N<sub>2</sub>.<sup>15</sup> Además las frecuencias experimentales obtenidas en medios ácidos y neutros en D<sub>2</sub>O son próximas a las calculadas para la timina neutra. En el caso de la timina no deuterada las señales calculadas en esta región incluyen contribuciones de los modos normales de flexión NH mientras que en el caso de la timina deuterada estas señales se desplazan a números de ondas más bajos como consecuencia del intercambio isotópico con el disolvente. En los espectros experimentales en agua los modos normales de tensión de C<sub>2</sub>O, C<sub>4</sub>O y C<sub>5</sub>C<sub>6</sub> aparecen a frecuencias discretamente menores que las obtenidas teóricamente, esto puede atribuirse a las interacciones por puentes de hidrógeno que experimenta la timina en disolución. De hecho, si se introducen dos moléculas de agua en los cálculos computacionales las frecuencias teóricas se aproximan más a las experimentales. Giese y colaboradores han encontrado un efecto similar en los estudios DFT de Raman realizados para la hidratación del uracilo, al igual que Chandra y colaboradores lo han encontrado para la interacción de timina con una molécula de agua, utilizando un nivel de teoría B3LYP / 6-31++G(d,p).<sup>16</sup>

Las frecuencias de las bandas espectrales obtenidas en medios deuterados a pD 12 son coincidentes con las calculadas para los tautómeros desprotonados en N<sub>1</sub> y N<sub>3</sub>. En disolución acuosa a pH 12 la banda ancha obtenida experimentalmente a 1600  $\text{cm}^{-1}$  podría deberse a una combinación de señales de ambas formas tautoméricas solapadas con una banda ancha de flexión de HOH del disolvente, que a este valor de pH es muy elevada. Estos resultados sugieren que en disoluciones básicas ambas formas tautoméricas desprotonadas de la timina están presentes como ya propusieron previamente Wierchowski y col.<sup>9</sup>



**Tabla 1.** Frecuencias de vibración de los espectros experimentales para la timina en D<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O y las frecuencias de vibración teóricas obtenidas por cálculos DFT para la timina neutra y desprotonada en N<sub>1</sub> y N<sub>3</sub>.

<b>D<sub>2</sub>O</b>				
<b>Expe. pD = 1-7</b>	<b>Calc. Timina D<sub>2</sub></b>	<b>Expe. pD =</b>	<b>Cal. Timina D<sup>-</sup> (N<sub>1</sub>)</b>	<b>Cal. Timina D<sup>-</sup> (N<sub>3</sub>)</b>
2961 cm <sup>-1</sup>	w-3122cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> H	2958 cm <sup>-1</sup>	3004 cm <sup>-1</sup> ; asym str -CH <sub>3</sub>	3050 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> H
2924 cm <sup>-1</sup>	w-3057 cm <sup>-1</sup> ; asym str -CH <sub>3</sub>	2924 cm <sup>-1</sup>	2971 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> H	3001 cm <sup>-1</sup> ; asym str -CH <sub>3</sub>
2852 cm <sup>-1</sup>	w-2972 cm <sup>-1</sup> ; sym str -CH <sub>3</sub>	2857 cm <sup>-1</sup>	2961 cm <sup>-1</sup> ; sym str -CH <sub>3</sub>	2932 cm <sup>-1</sup> ; sym str -CH <sub>3</sub>
1695 cm <sup>-1</sup>	s- 1741 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> O	1658 cm <sup>-1</sup>	s- 1635 cm <sup>-1</sup> , str C <sub>4</sub> O-C <sub>2</sub> O	m- 1655 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> O
1673 cm <sup>-1</sup>	s- 1688 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> O	1606 cm <sup>-1</sup>	s- 1597cm <sup>-1</sup> , str C <sub>4</sub> O-C <sub>2</sub> O	m- 1624 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> O+C <sub>4</sub> O+C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>
1652 cm <sup>-1</sup> 1625 cm <sup>-1</sup>	w- 1641 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>	1545 cm <sup>-1</sup>	m-1550 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>	s-1543 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> O
<b>H<sub>2</sub>O</b>				
<b>Exp. pH = 1-7</b>	<b>Cal.Timina H<sub>2</sub></b>	<b>Exp. pH = 12</b>	<b>Cal. Timina H<sup>-</sup>(N<sub>1</sub>)</b>	<b>Cal . H<sup>-</sup> (N<sub>3</sub>)</b>
1704 cm <sup>-1</sup>	s- 1754 cm <sup>-1</sup> (1685); str C <sub>2</sub> O, bend N <sub>1</sub> H+N <sub>3</sub> H	1600 cm <sup>-1</sup>	s-1630 cm <sup>-1</sup> , sym str C <sub>4</sub> O+C <sub>2</sub> O	s- 1657 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> O-C <sub>2</sub> O-C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>
(sh) 1690 cm <sup>-1</sup>	s- 1699 cm <sup>-1</sup> (1302); str C <sub>4</sub> O, bend N <sub>3</sub> H		vs- 1618 cm <sup>-1</sup> ; asym str C <sub>4</sub> O+C <sub>2</sub> O bend N <sub>3</sub> H	m- 1637 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> O+C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>
1666 cm <sup>-1</sup>	w-1641; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>		m- 1552 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>	s- 1548 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> O-C <sub>2</sub> O-C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>

(w-débil, m-medio, vs-muy fuerte, s-fuerte, str- tensión , bend- flexión, sh-hombro)

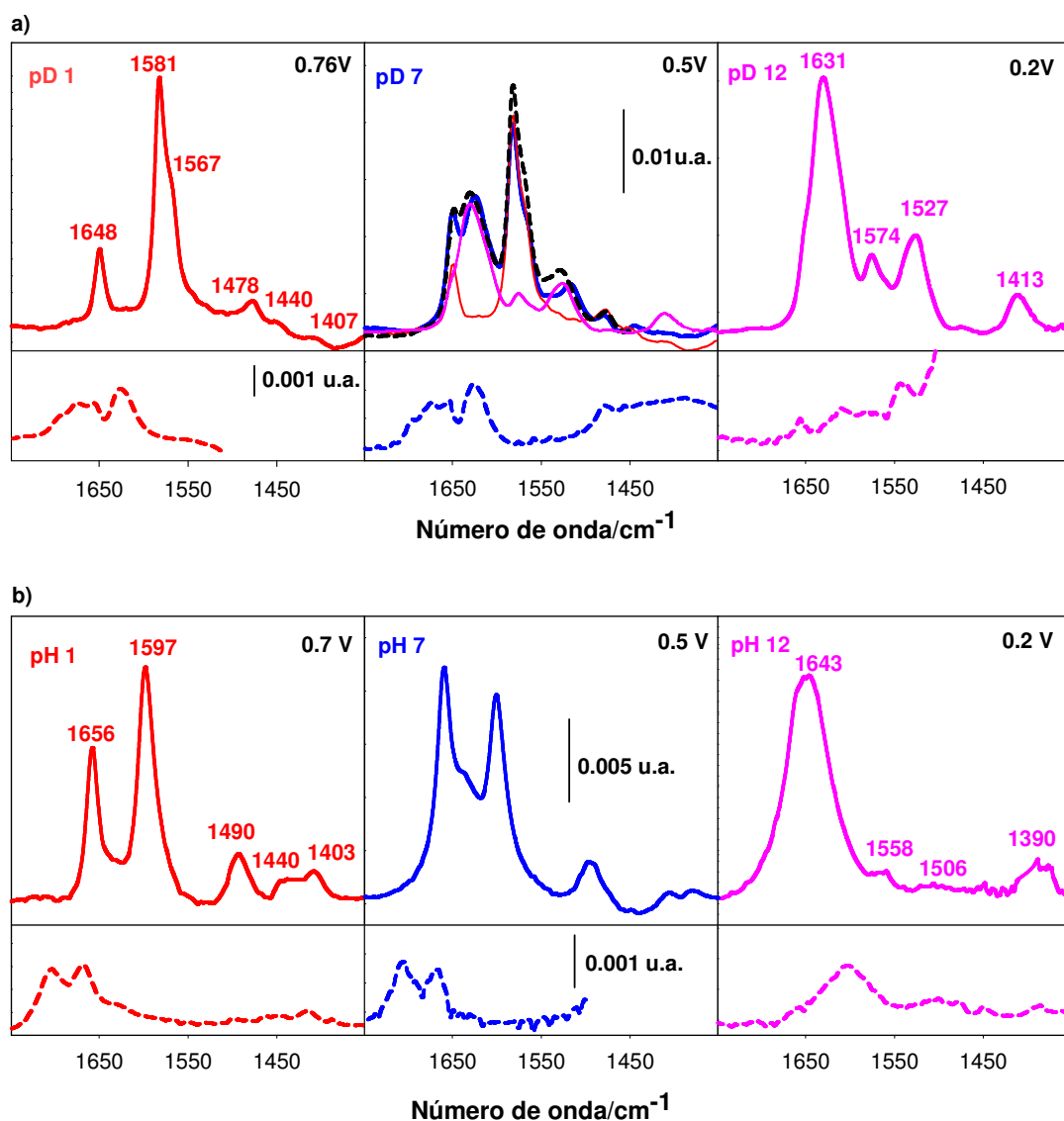
### 3.2.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la timina adsorbida sobre Electroodos de Oro.

#### 3.3.5.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ .

En la figura 16 se representan los espectros de ATR-SEIRA en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  a tres valores de pH, para la timina adsorbida sobre películas de Au a potenciales altos, a los cuales la timina se debe encontrar adsorbida químicamente, según indican los voltagramas correspondientes (Fig. 3.14). El disolvente ha sido  $\text{D}_2\text{O}$  (Fig. 3.16a) y  $\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 3.16b). En la parte inferior de las figuras se han incluido también los correspondientes espectros de transmisión obtenidos en las mismas condiciones, para su comparación con los de las especies adsorbidas. Se puede observar que las bandas muestran mayor relación señal / ruido que los espectros de timina en disolución y una mayor sensibilidad que los espectros de SNIFTIR para la timina adsorbida sobre electrodos de Au(111).<sup>11</sup> De acuerdo con las reglas de selección superficial una vibración solo puede ser activa en ATR-SEIRAS si tiene un momento dipolar de la transición con al menos una componente normal al electrodo. Por tanto, como todas las vibraciones en la región 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a modos vibracionales en el plano, el plano molecular de timina no puede estar orientado paralelo al electrodo, al menos debe estar algo inclinado respecto al mismo.

Los espectros de ATR-SEIRA muestran una clara dependencia con el pH en ambos disolventes. En medio ácido en  $\text{D}_2\text{O}$  se observa una banda de absorción de intensidad media a 1648  $\text{cm}^{-1}$ , una de absorción fuerte a 1581  $\text{cm}^{-1}$ , con un hombro a 1567  $\text{cm}^{-1}$ , y una más débil a 1478  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que en medio básico se pueden distinguir tres señales solapadas a 1631  $\text{cm}^{-1}$ , 1574  $\text{cm}^{-1}$  y 1527  $\text{cm}^{-1}$  (siendo la banda de mayor frecuencia la más intensa) y una señal débil a 1413  $\text{cm}^{-1}$ . En  $\text{H}_2\text{O}$  en medio ácido aparecen dos señales fuertes a 1656  $\text{cm}^{-1}$  y 1597  $\text{cm}^{-1}$  y una débil a 1490  $\text{cm}^{-1}$  mientras que en medio básico se observa una señal intensa y ancha centrada a 1643  $\text{cm}^{-1}$ . A primera vista, las diferencias en los espectros a potencial alto obtenidos a pH 1 y 12 pueden indicar que las especies adsorbidas responsables de las señales de absorción son diferentes a cada valor de pH o, alternativamente, que la misma especie es responsable de la absorción a ambos valores de pH pero con diferentes orientaciones del plano molecular con respecto a la superficie de reflexión. Curiosamente, a pH 7 los

espectros de ATR-SEIRA obtenidos tanto en H<sub>2</sub>O como en D<sub>2</sub>O incluyen señales que están presentes en los espectros a los dos valores de pH extremos (1 y 12).



**Fig. 3.16** Espectros de ATR-SEIRA, en la región entre 1300-1800 cm<sup>-1</sup>, para la timina adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones 1 mM de timina en a) D<sub>2</sub>O y b) H<sub>2</sub>O, a los valores de pH y a los potenciales indicados. Los espectros están referidos a las señales obtenidas en el electrolito soporte al mismo potencial. Espectros de transmisión en disolución de la timina en las mismas condiciones de pH y disolvente (líneas discontinuas a los pies de cada figura).

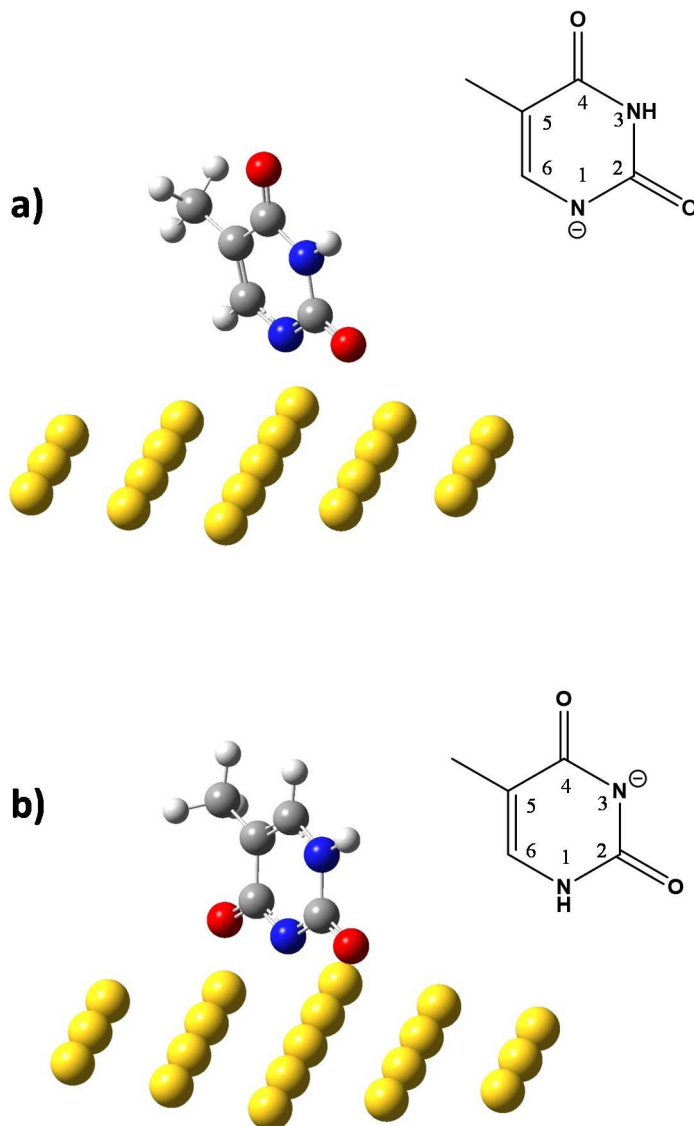
Así en la figura 3.16 el espectro de ATR-SEIRA a pD 7 se representa como combinación lineal (línea discontinua) de los espectros a pD 1 (línea roja continua) y pD 12 (línea rosa continua). Estas observaciones sugieren la existencia de dos especies diferentes adsorbidas a pH 1 y 12 que pueden co-adsorberse a pH 7. Por otro lado se

pueden plantear dos posibilidades sobre la naturaleza de las dos especies adsorbidas dependientes del pH: por una parte, se podría pensar en la co-adsorción de las dos formas implicadas en el equilibrio ácido-base de la timina, es decir, la forma neutra protonada de la timina y alguno de los tautómeros de la timina aniónica desprotonada. Por otra parte, cabe la posibilidad de que solo la timina desprotonada pueda adsorberse, pero en sus dos formas tautoméricas.

La comparación de los espectros de la timina adsorbida a los distintos valores de pH con los correspondientes espectros en disolución puede ayudar a dilucidar estas cuestiones. Así, se observan en la figura 16 claras diferencias en los comportamientos a pH 1 y 12. A pH 12 las señales de los espectros de ATR-SEIRAS para la timina adsorbida aparecen casi a los mismos números de onda que las señales correspondientes de los espectros en disolución, por lo que es probable que a este valor de pH la misma forma de timina que está presente en disolución sea la que se encuentre en estado adsorbido, por lo tanto debe ser la forma aniónica desprotonada. Sin embargo a pH 1 las señales en el espectro de ATR-SEIRA se desplazan al rojo respecto a la disolución cuando la timina se adsorbe. Este efecto se puede deber a la desprotonación de la timina al adsorberse, lo que estaría de acuerdo con los resultados voltamétricos (Figura 3.12c). Por tanto las diferencias en los espectros de adsorción de timina a pH 1 y 12 solamente pueden estar relacionadas con la adsorción de diferentes tautómeros de la timina desprotonada a diferentes valores de pH, de tal forma que el tautómero desprotonado en  $N_3$  sea probablemente el que este adsorbido en medio ácido mientras que el desprotonado en  $N_1$  sea la especie adsorbida en medio básico. Roelfs y colaboradores ya descartaron la adsorción de una forma neutra de timina incluso en medio muy ácidos basándose en estudios de STM electroquímico in-situ y en medidas de SNIFTIRS y SXPS para la timina adsorbida sobre electrodos de oro.<sup>10,11</sup> Estos autores propusieron un modelo para la quimisorción de la timina en medio ácido con la molécula desprotonada en  $N_3$  orientada en posición vertical sobre la superficie electródica de tal forma que la molécula interacciona con el electrodo a través de  $N_3$  y ambos grupos carbonilos.

Para confirmar esta hipótesis se han calculado por el método DFT los espectros de ambos tautómeros de timina adsorbidos sobre superficies de oro. Se ha optimizado la geometría y calculado las propiedades vibracionales de la timina utilizando una superficie no re-reconstruida de Au(111) de 19 átomos, de tal forma que el tamaño del

clúster es suficientemente grande como para evitar la unión de la molécula de timina en los bordes durante la optimización de la geometría.



**Fig. 3.17** Geometrías optimizadas para los tautómeros de la timina desprotonado en a)  $N_1$  y b)  $N_3$  adsorbidos sobre un clúster de 19 átomos de oro

Las geometrías optimizadas se representan en la figura 3.17 de tal forma que una vez optimizadas el tautómero desprotonado en  $N_3$  está orientado en la dirección normal a la superficie con ambos grupos carbonilos y el nitrógeno  $N_3$  dirigidos hacia el electrodo, quedando el plano girado ligeramente (c.a. 10 grados) respecto a la dirección principal del cristal de oro. Las distancias entre el nitrógeno en  $N_3$  y los dos átomos de oxígeno ( $O_7$  y  $O_8$ ) y el correspondiente átomo de oro más cercano son 2.59 Å, 3.19 Å y 2.45 Å,

respectivamente por lo que la interacción con el electrodo se lleva a cabo principalmente por N<sub>3</sub> y O<sub>8</sub>. El tautómero desprotonado en N<sub>1</sub> también está orientado en la dirección normal al electrodo pero en este caso N<sub>1</sub> y O<sub>8</sub> son los átomos más próximos al átomo de oro superficial con unas distancias de 2.77 Å y 2.89 Å respectivamente.

Las frecuencias de vibración en la región alrededor de 1600 cm<sup>-1</sup> calculadas para las geometrías optimizadas de los tautómeros de timina desprotonados en N<sub>3</sub> y N<sub>1</sub> adsorbidos sobre electrodos de oro vienen dadas en la Tabla 2, en comparación con los valores experimentales a pH 1 y 12 en D<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O. Cabe destacar que la mayoría de las señales calculadas en la región espectral entre 1300-1800 cm<sup>-1</sup> muestran contribución de diferentes modos normales de vibración individuales.

En D<sub>2</sub>O el espectro teórico para el tautómero desprotonado en N<sub>3</sub> muestra dos bandas intensas de adsorción; una a 1640 cm<sup>-1</sup> debido a la vibración de tensión de C<sub>5</sub>C<sub>6</sub> y otra a 1586 cm<sup>-1</sup> debido a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilo, así como una señal débil a 1463 cm<sup>-1</sup> como consecuencia de los modos normales de flexión de los grupos metileno y metileno. Estas señales pueden correlacionarse con las bandas experimentales del espectro de ATR-SEIRA obtenidas a pH 1 (dos bandas intensas a 1648 cm<sup>-1</sup> y 1581 cm<sup>-1</sup> y una banda débil a 1478 cm<sup>-1</sup>). Las señales aparecen a frecuencias más bajas que en el espectro calculado para el mismo tautómero en disolución, lo que indica que la molécula interacciona con electrodo de oro por los átomos que participan en estos modos de vibración. Los cálculos DFT proporcionan una señal intensa a 1414 cm<sup>-1</sup> debida fundamentalmente a los modos vibracionales de tensión de C<sub>4</sub>O y C<sub>2</sub>O que pueden asociarse con la banda experimental a 1440 cm<sup>-1</sup> aunque ésta es más débil.

Se puede encontrar una correlación similar para este tautómero desprotonado en N<sub>3</sub> en el caso de disoluciones acuosas. De esta forma el espectro calculado presenta dos bandas intensas a 1645 cm<sup>-1</sup> y 1599 cm<sup>-1</sup> correspondientes a la vibración de tensión de C<sub>5</sub>C<sub>6</sub> y a la vibración de tensión de los grupos carbonilos acoplada con la flexión de N<sub>1</sub>H, respectivamente. Además se observan bandas débiles a 1463 cm<sup>-1</sup> 1447 cm<sup>-1</sup> y 1410 cm<sup>-1</sup> que podrían corresponderse con las señales de los espectros experimentales de ATR-SEIRA que aparecen a 1490 cm<sup>-1</sup>, 1440 cm<sup>-1</sup> y 1403 cm<sup>-1</sup> respectivamente.

**Tabla 2.** Frecuencias experimentales de ATR-SEIRAS de la timina químicamente adsorbida sobre electrodos de oro en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O y las frecuencias teóricas obtenidas por cálculos DFT para los tautómeros desprotonados en N<sub>1</sub> y N<sub>3</sub> para la timina adsorbida sobre un clúster de 19 átomos de oro, optimizando

D <sub>2</sub> O				H <sub>2</sub> O			
<u>pD = 1</u>	<u>pD 12</u>	<u>N<sub>3</sub> tautómero</u>	<u>N<sub>1</sub> tautómero</u>	<u>pH = 1</u>	<u>pH 12</u>	<u>N<sub>3</sub> tautómero</u>	<u>N<sub>1</sub> tautómero</u>
3070 cm <sup>-1</sup>	3070 cm <sup>-1</sup>	w-3101 cm <sup>-1</sup> ; str -CH	w-3051cm <sup>-1</sup> ; v <sub>as</sub> -CH <sub>3</sub>	3072 cm <sup>-1</sup>		w-3101 cm <sup>-1</sup> ; str CH	w-3051 cm <sup>-1</sup> ; as str -CH <sub>3</sub>
2985 cm <sup>-1</sup>	2977 cm <sup>-1</sup>	w-3032 cm <sup>-1</sup> ; asym -strCH <sub>3</sub>	w-3039 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> H	2973 cm <sup>-1</sup>		w-3032cm <sup>-1</sup> ; as str -CH <sub>3</sub>	w-3038cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> H
2962 cm <sup>-1</sup> (sh)	2926 cm <sup>-1</sup>	w-2959 cm <sup>-1</sup> ; sym str -CH <sub>3</sub>	w-2954 cm <sup>-1</sup> , sym str CH <sub>3</sub>	2931 cm <sup>-1</sup>		2959 cm <sup>-1</sup> ; sym str CH <sub>3</sub>	2956 cm <sup>-1</sup> ; sym str -CH <sub>3</sub>
1648 cm <sup>-1</sup>	1631 cm <sup>-1</sup>	s-1642 cm <sup>-1</sup> , str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub> +bend CH	str C <sub>4</sub> O	1656 cm <sup>-1</sup>	1643 cm <sup>-1</sup>	s-1645 cm <sup>-1</sup> , str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub> bend CH	1639 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> O + bend N <sub>3</sub> H
1581 cm <sup>-1</sup> 1567 (sh)	1574 cm <sup>-1</sup>	s-1586 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> O+C <sub>4</sub> O		1597 cm <sup>-1</sup>	1558 cm <sup>-1</sup>	s-1599 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> O+C <sub>4</sub> O bend N <sub>1</sub> H	w-1567 cm <sup>-1</sup> , str C <sub>4</sub> O bend N <sub>3</sub> H
	1527 cm <sup>-1</sup>		w-1558 cm <sup>-1</sup> ;str C <sub>2</sub> O		1506 cm <sup>-1</sup>		vw-1493cm <sup>-1</sup> ;Str-C <sub>5</sub> C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>
1478 cm <sup>-1</sup>		w-1463 cm <sup>-1</sup> ; bend CH <sub>3</sub> +CH	vw-1483 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>	1490 cm <sup>-1</sup>		m-1463 cm <sup>-1</sup> ; bend CH <sub>3</sub> + CH	
1440 cm <sup>-1</sup>		s-1414 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> O+C <sub>2</sub> O	w-1445 cm <sup>-1</sup> ; bend CH <sub>3</sub> + CH	1440 cm <sup>-1</sup>		w-1447 cm <sup>-1</sup> ; bend N <sub>1</sub> H	w-1445 cm <sup>-1</sup> ; bend CH, CH <sub>3</sub>
1407 cm <sup>-1</sup>	1413 cm <sup>-1</sup>	m-1393 cm <sup>-1</sup> ; ring brth	w-1393 cm <sup>-1</sup> ; ring brth	1403 cm <sup>-1</sup>	1390 cm <sup>-1</sup>	m-1410 cm <sup>-1</sup> , str C <sub>4</sub> O	w-1399 cm <sup>-1</sup> ; ring brth

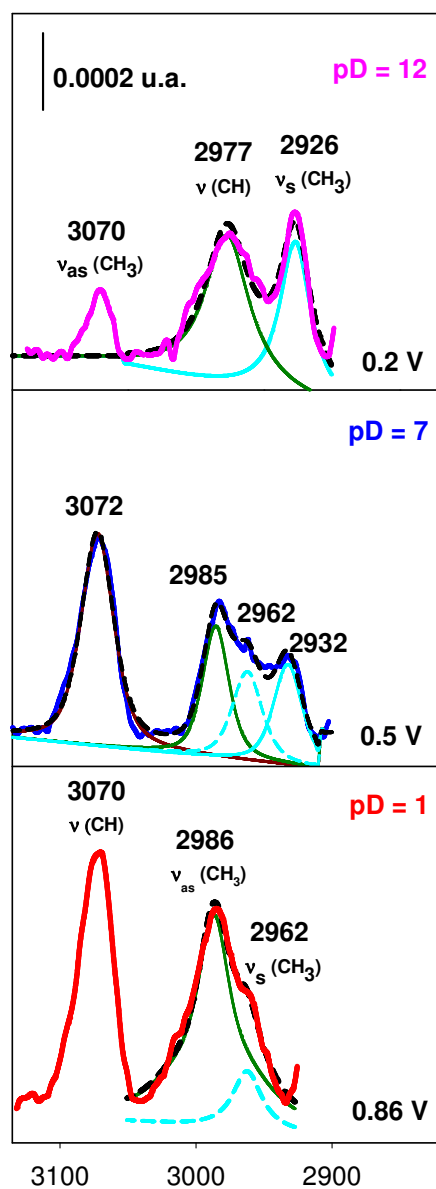
(vw-muy débil, w-débil, m-medio, s-fuerte, str- tensión y bend- flexión)

El espectro teórico de la forma deuterada del tautómero desprotonado en  $N_1$  exhibe una banda de absorción intensa a  $1624\text{ cm}^{-1}$ , asociada con la vibración de tensión de  $C_4O$ , y dos bandas débiles a  $1558\text{ cm}^{-1}$  y  $1483\text{ cm}^{-1}$  que se atribuyen a los modos normales de vibración de tensión de  $C_2O$  y  $C_5C_6$  respectivamente. Estos resultados concuerdan bastante bien con los resultados experimentales en medio básico, en los que se observa una banda intensa y ancha a  $1627\text{ cm}^{-1}$  y dos bandas débiles a  $1573\text{ cm}^{-1}$  y  $1521\text{ cm}^{-1}$ . En medio acuoso el espectro experimental a pH 12 contiene una banda intensa y ancha a  $1643\text{ cm}^{-1}$  que se relaciona bastante bien con los cálculos teóricos para el tautómero en  $N_1$  en los que se obtiene una señal intensa a  $1639\text{ cm}^{-1}$  debido a la vibración de tensión de  $C_4O$  acoplada con la vibración de tensión de  $N_3H$ , dos señales muy débiles a  $1558\text{ cm}^{-1}$  y  $1506\text{ cm}^{-1}$  que pueden asociarse con las frecuencias teóricas calculadas a  $1567\text{ cm}^{-1}$  asociada a los modos normales de tensión de  $C_2O$  y flexiones de  $N_3H$  y una banda a  $1493\text{ cm}^{-1}$  que tiene contribuciones de los modos normales de vibración de tensión de  $C_5C_6$  y  $C_2C_3$  así como de flexiones  $CH_3$ .

### **3.2.5.2. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 2800 a 3900 $\text{cm}^{-1}$ .**

En la figura 18 se muestran algunos espectros de la timina adsorbida, en la región comprendida entre  $2800$  y  $3200\text{ cm}^{-1}$ , obtenidos en medios deuterados a potenciales altos. En esta región se encuentran las bandas débiles asociadas a los modos normales de vibración de tensión del grupo metilo ( $CH_3$ ) y las de tensión del grupo metileno intracíclico ( $CH$ ).





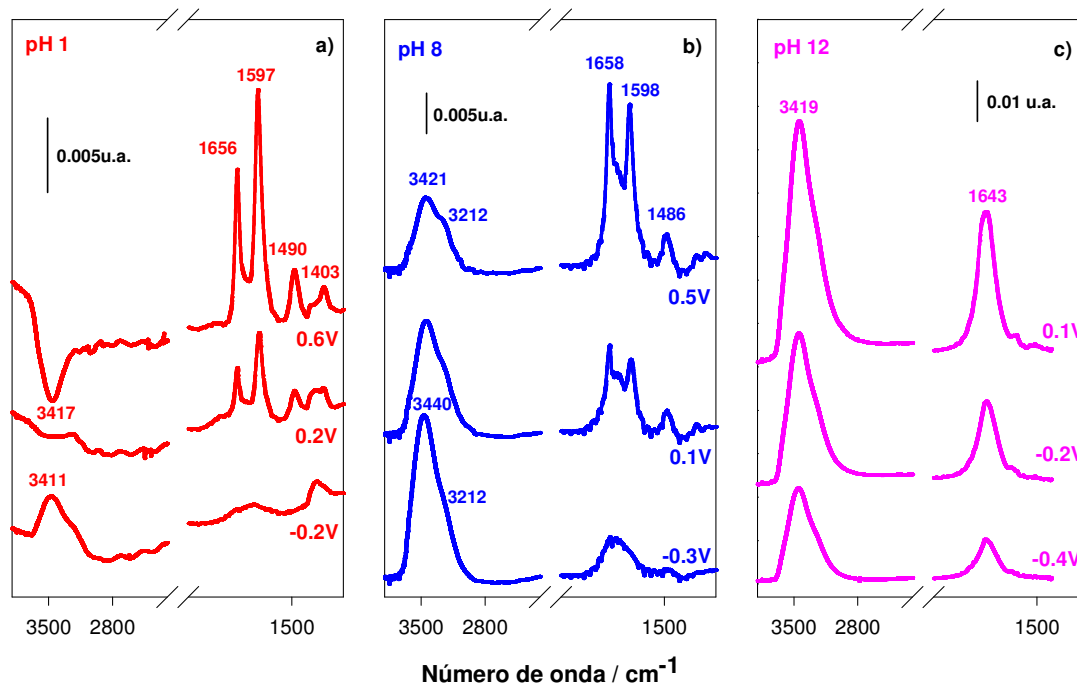
**Fig. 3.18** Espectros de ATR-SEIRA, en la región entre  $2800\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ , para la timina adsorbida sobre películas nanoestructuradas de oro a los potenciales indicados a partir de disoluciones en  $\text{D}_2\text{O}$  a los valores de pH indicados. Los espectros están referidos a las señales obtenidas en el electrolito soporte al mismo potencial. La figura incluye los resultados de la deconvolución de las señales experimentales correspondientes a los modos normales de vibración del grupo metilo: simétrica (- - -) y asimétrica (- · -).

Al comparar con los espectros en disolución (Fig. 3.15) tanto a pD 1 como a pD 12 se observa un desplazamiento de las señales hacia números de ondas mayores como era de esperar para las frecuencias de estos modos normales de vibración de tensión. Los espectros obtenidos a los dos valores de pD extremos se pueden deconvolucionar en tres bandas gaussianas-lorentzianas, que muestran cambios en la altura relativa en función del

pD del medio. Además, al aumentar el pD también se produce un cambio en las frecuencias de las dos bandas hacia números de ondas más bajos. El espectro a valores de pD intermedios es una combinación de los espectros de los dos valores de pD extremos. Si se asume que la timina orienta su plano molecular perpendicular a la superficie del electrodo estas bandas deben corresponderse con las vibraciones de tensión del grupo metilo (la vibración simétrica, y la vibración asimétrica en el plano que contiene una componente del momento dipolar de la transición que se localiza en el plano de la molécula) y la vibración de tensión del metileno. El modo normal de tensión asimétrico de metileno fuera del plano tendría un momento dipolar de la transición que es normal al plano molecular por lo que no es activo para esta orientación de la molécula. En la Tabla 2 se recogen también las frecuencias calculadas en esta región del espectro para los tautómeros de la timina desprotonados en  $N_1$  y  $N_3$ : los valores de las frecuencias calculadas para las vibraciones en esta región de los dos tautómeros son bastante parecidas, lo que dificulta la identificación de los isómeros. No obstante, las asignaciones a los distintos modos es diferente en cada tautómero, de ahí la significativa diferencia de perfiles espectrales que se observan experimentalmente a pD 1 y a pD 12. Así, en el caso del tautómero desprotonado en  $N_3$  la señal a mayor número de onda es debida a la vibración de tensión de CH mientras que para el tautómero desprotonado en  $N_1$  se debe a la vibración de tensión asimétrica de  $CH_3$  en el plano molecular. Los cálculos para las moléculas libres de los dos tautómeros (Tabla 1) también mostraban este intercambio de asignaciones entre las señales  $\nu(CH)$  y  $\nu_{as}(CH_3)$  de los dos tautómeros, por lo que no está originado por la adsorción. Las asignaciones de las bandas experimentales de los espectros a pD 1 y pD 12 que se indican en la figura 18 se han llevado a cabo conforme a los cálculos teóricos realizados para los tautómeros de la timina desprotonados en  $N_3$  y  $N_1$  respectivamente.

En disolución acuosa, la proximidad de las bandas asociadas a los modos normales de vibración de tensión OH del disolvente en esta región espectral no permite una visualización adecuada de las señales debidas a los grupos metileno y metilo.

Sin embargo en la región espectral comprendida entre  $2800-3900\text{ cm}^{-1}$  es posible estudiar la posible co-adsorción las moléculas de agua con los tautómeros  $N_1$  y  $N_3$  de la timina dependiendo del pH del medio como puede verse en la figura 3.19. Además en esta figura también se incluye la región entre  $1300-1800\text{ cm}^{-1}$



**Fig. 3.19** Espectros de ATR-SEIRA en H<sub>2</sub>O de la timina 1 mM adsorbida sobre electrodos nanoestructurados de oro a los potenciales indicados a a) pH = 1, b) pH = 7 y c) pH = 12. Referidos frente al electrolito soporte al mismo potencial.

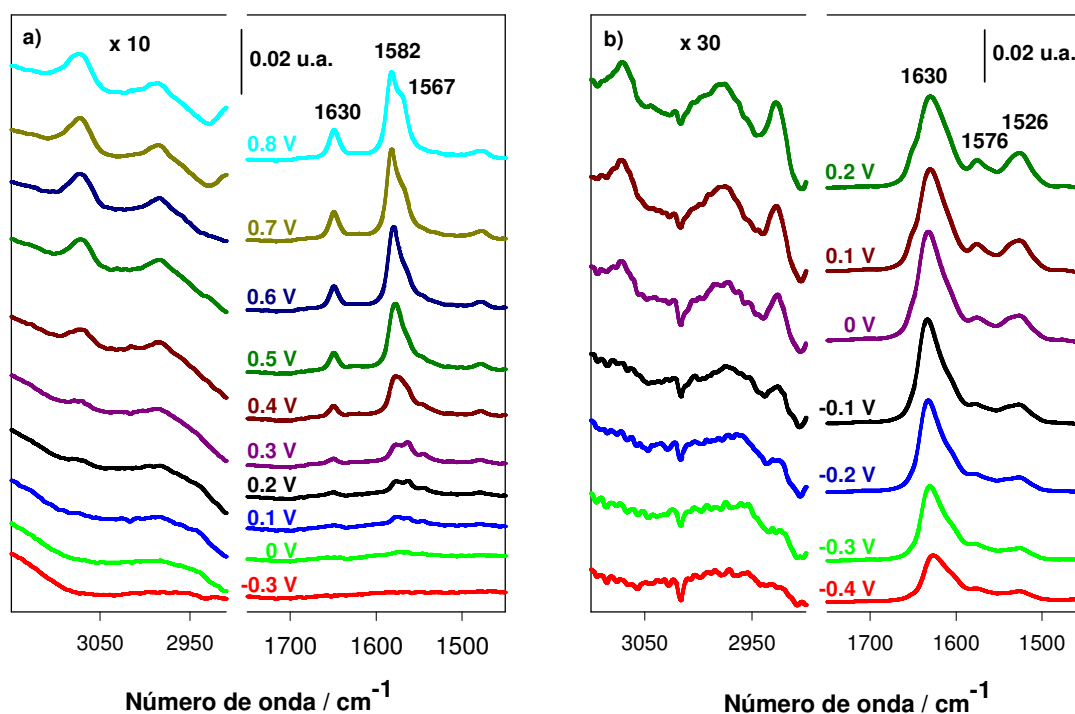
A pH 1 a potenciales a los que la timina no está adsorbida químicamente (-0.2V vs SCE en la Fig. 3.19a) en la región de 2800-3900 cm<sup>-1</sup> se observa una banda ancha a 3411 cm<sup>-1</sup> asignada a las vibraciones de tensión de OH del agua. Esta banda va desapareciendo a medida que aumenta el potencial y la timina va adsorbiéndose químicamente sobre la superficie electródica hasta convertirse en una banda negativa a -0.6V vs SCE lo que sugiere que la timina al adsorberse químicamente desplaza moléculas de agua de la superficie del electrodo.

Sin embargo a pH 8 a potenciales en los que la timina está adsorbida físicamente sobre la superficie electródica (-0.3V vs SCE Fig. 3.19b) en la región de 3000-4000 cm<sup>-1</sup> se puede observar una banda ancha 3440 cm<sup>-1</sup> con un hombro a 3212 cm<sup>-1</sup> que se asignan con la vibración de tensión de OH del agua y la vibración de tensión de NH de los tautómeros N<sub>1</sub> y N<sub>3</sub> de timina. La señal a mayor número de onda disminuye su intensidad a medida que aumenta el potencial sin que cambie significativamente de forma. Estas características están en consonancia con la pérdida de agua poco ligada a la interfase al adsorberse químicamente la timina. Sin embargo a pH 8 la timina no llega a desplazar completamente a las moléculas de agua de la interfase.

Finalmente en medios fuertemente básicos (Fig. 3.19c) resulta más complicado estudiar la co-adsorción de las moléculas ya que en la región espectral entre 3000-4000  $\text{cm}^{-1}$  aparecen señales muy anchas debido a las tensiones de OH libre del disolvente.

### 3.2.5.3. Influencia del potencial en la adsorción de timina adsorbida sobre electrodos de oro

En la figuras 3.20 a y b se representan los espectros de ATR-SEIRA (en las dos regiones que se han venido considerando) para la timina adsorbida a distintos potenciales desde disoluciones de pD 1 y de pD 12 en  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Fig. 3.20** Espectros de ATR-SEIRAS para la timina adsorbida sobre electrodos de oro a los potenciales indicados desde disoluciones 1mM de timina y 0.1 M de  $\text{KClO}_4$  y  $\text{KClO}_4 + \text{NaOD}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  a: a) pD1 y b) pD 12. Los espectros están referidos a las señales registradas desde disoluciones del electrolito soporte al mismo potencial.

En los espectros registrados en disoluciones de pD 1 no se observan bandas características para la timina en la región de 1600  $\text{cm}^{-1}$  ni de 3000  $\text{cm}^{-1}$ , cuando se aplican potenciales menores a los de comienzo de la quimisorción (pico T2 el voltograma, (Fig. 3.13) lo que indica que la timina fisisorbida está orientada con el plano molecular paralelo a la superficie del electrodo. En la región II, sin embargo, comienzan a aparecer señales características, cuyas intensidades van aumentando

conforme aumenta el potencial. A potenciales mayores que 0.3V vs SCE existen dos bandas solapadas a 1567 y 1582 cm<sup>-1</sup> cuyas alturas relativas varían claramente con el potencial. El aumento de la señal a 1582 cm<sup>-1</sup> con el potencial es claramente mayor que el de las otras dos bandas de esta región. Se puede observar un comportamiento similar de las señales espectrales que aparecen a números de onda próximos a 3000 cm<sup>-1</sup>, pero en este caso la altura de las señales a mayor número de onda aumentan con el potencial más que la señal a 2960 cm<sup>-1</sup> y puede observarse como a valores de potencial lo suficientemente altos los espectros son independientes del potencial aplicado.

En los espectros registrados en disoluciones de pD 12 se puede observar un comportamiento diferente con el potencial. Las señales de los espectros aparecen desde potenciales muy bajos y van aumentando con el potencial incluso a valores de potenciales lejanos a los potenciales de quimisorción. Esto indica que la molécula fisisorbida no se orienta paralela al electrodo si no que presenta cierta inclinación desde potenciales negativos. Por otra parte, en este medio los cambios en las alturas relativas de las señales con el potencial son menos significativos, todas las señales parecen crecer en la misma proporción cuando aumenta el potencial.

Los cambios en las intensidades relativas de las bandas de los espectros con de cada tautómero de timina adsorbido a medida que se cambia el potencial se pueden utilizar para determinar los posibles cambios en las orientaciones moleculares de cada uno de los tautómeros respecto al electrodo, inducidas por el campo eléctrico. La intensidad integrada de una banda de reflexión-absorción para una película de moléculas adsorbidas, obtenida con luz polarizada-p es proporcional al producto escalar del vector dipolo de transición y al campo eléctrico del fotón, pudiéndose expresar por la ecuación (1).<sup>17</sup>

$$A_p \propto \Gamma |\vec{\mu} \times \vec{E}_p| = \Gamma |\mu|^2 \langle E_p^2 \rangle \cos^2(\theta) \quad (1)$$

Donde  $\Gamma$  es la concentración superficial de moléculas responsables de la absorción de la radiación de luz,  $\theta$  es el ángulo entre el momento dipolar de la transición y el campo eléctrico del fotón que para la luz polarizada p tiene una dirección normal a la superficie del electrodo,  $|\mu|$  es el módulo del momento dipolar de la transición y  $\langle E_p^2 \rangle$  es la intensidad cuadrática media del campo eléctrico para un haz de luz polarizada-p en la superficie de reflexión. El cambio en las intensidades de las bandas con el potencial

puede ser consecuencia de un aumento del exceso superficial o de un cambio en la orientación de las moléculas y, por tanto, en el ángulo entre el correspondiente momento dipolar de la transición y la dirección normal al electrodo. Los otros dos parámetros en la ecuación 1;  $\langle E_p^2 \rangle$  y  $|\mu|$  son pueden considerarse independientes del potencial.

Si se comparan las intensidades de dos señales que poseen distinta orientación de sus momentos de transición se puede prescindir del efecto del potencial sobre la magnitud de la concentración superficial. Por lo tanto, la relación entre las intensidades integradas de dos bandas de absorción es proporcional a la relación de los cosenos al cuadrado de los ángulos entre cada uno de los momentos dipolares de la transición y la dirección normal al electrodo:

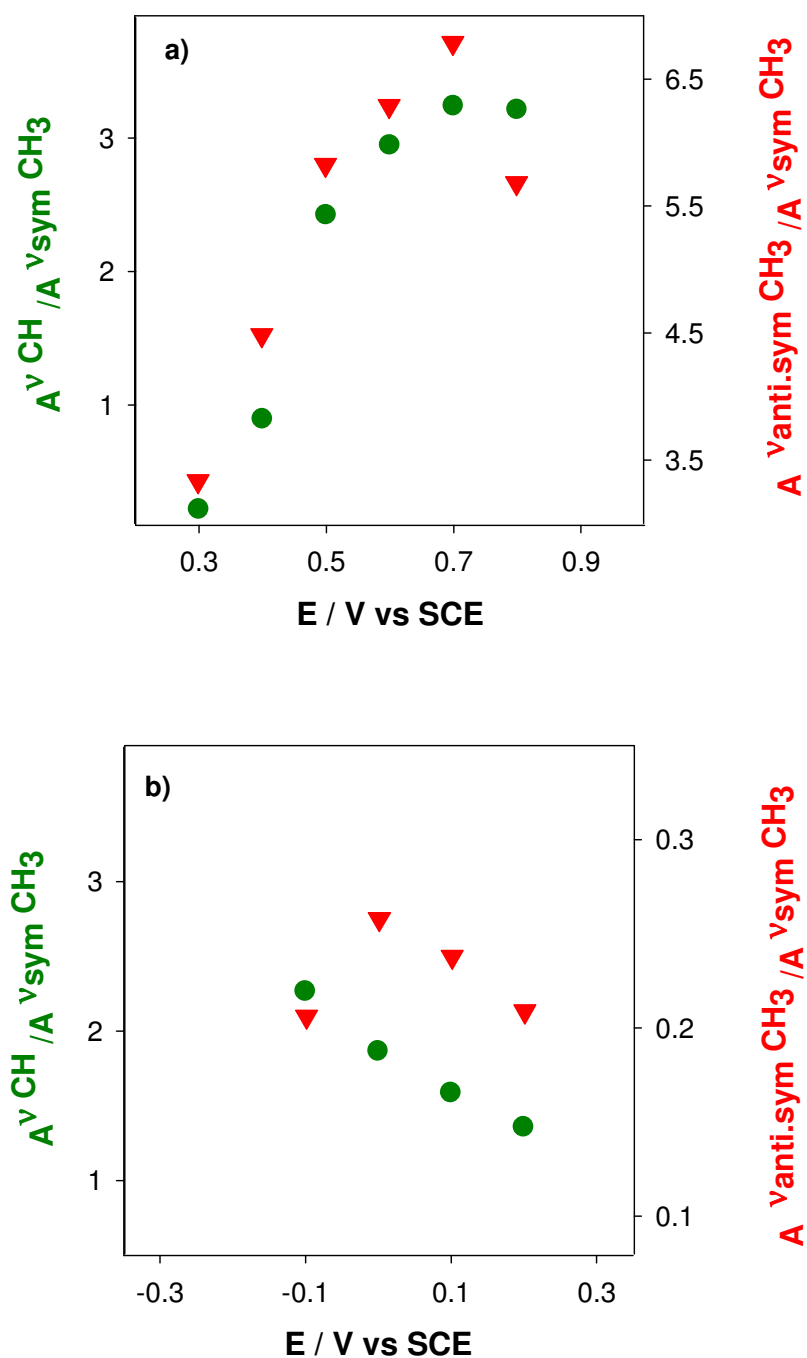
$$\frac{A_p^{\bar{\nu}_1}}{A_p^{\bar{\nu}_2}} \propto \frac{\cos^2(\theta^{\bar{\nu}_1})}{\cos^2(\theta^{\bar{\nu}_2})} \quad (2)$$

Así, las variaciones de la relación de intensidades de dos señales, elegidas adecuadamente, en función de las variaciones en el potencial si las direcciones de los momentos dipolares de la transición asociados a ambas bandas vibraciones son independientes del potencial, se pueden aprovechar para determinar los cambios en la orientación de la molécula adsorbida con el potencial.

Las bandas que aparecen en la región del espectro entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$ , presentan mayor relación señal / ruido que las bandas de la región de 2800-3300  $\text{cm}^{-1}$  debidas a los modos normales de tensión de CH. Sin embargo, las señales en esta última región están asignadas a modos normales de vibración individuales, de forma que los momentos dipolares de la transición tienen direcciones bien definidas mientras que las señales en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  tienen contribuciones de diferentes modos normales de vibración lo que origina incertidumbre en la contribución relativa de cada uno de ellos al total, creando gran ambigüedad en las correspondientes direcciones de los momentos dipolares de la transición. Por lo tanto, la influencia del potencial del electrodo en la orientación molecular de cada tautómero de timina adsorbido se ha analizado utilizando las intensidades integradas de las bandas asociadas a los modos normales de tensión de metilo y metileno.

En la figura 3.21 se representan en función del potencial a pD 1 para el tautómero desprotonado en N<sub>3</sub> la relación entre las áreas correspondientes a las señales de tensión de CH y tensión simétrica de CH<sub>3</sub>, por un lado, y la de tensión asimétrica y simétrica de CH<sub>3</sub>, por otro. En ambos casos, cuando el potencial aumenta la relación de intensidades integradas aumenta alcanzando un valor máximo para altos valores de potenciales. Las vibraciones tensión de CH y de tensión asimétrica de CH<sub>3</sub> tienen momentos dipolares de transición con direcciones cercanas a la línea imaginaria que une N<sub>3</sub> con C<sub>6</sub> mientras que la vibración de tensión simétrica de CH<sub>3</sub> tiene una dirección del momento dipolar cercana a la línea imaginaria que une C<sub>2</sub> y C<sub>5</sub> (Véase Fig. 3.22). Por tanto es de esperar un comportamiento similar con el potencial para la señal asociada a la tensión de CH y a la tensión asimétrica de CH<sub>3</sub>. En la figura 3.21a se observa que ambas relaciones de áreas aumentan al hacerlo el potencial siendo el aumento mayor para la vibración de tensión simétrica de CH<sub>3</sub>. Estos cambios en las intensidades relativas sugieren que a medida que el potencial aumenta el N<sub>3</sub> que esta desprotonado y adsorbido gira de manera que el eje N<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> se acerca gradualmente más a la normal a la superficie del electrodo el comparación con el eje C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>. Por lo tanto, se puede proponer que a potenciales menores en la región de quimisorción la molécula interactúa con el electrodo por el átomo de oxígeno del grupo carbonilo C<sub>2</sub>O y al aumentar el potencial se produce la rotación del plano molecular facilitando las interacciones adicionales por el N<sub>3</sub> y el oxígeno del C<sub>4</sub>O. Las fuerzas impulsoras de esta rotación podrían ser tanto la interacción química con la superficie de oro por N<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>O como la interacción electrostática entre el creciente campo eléctrico y el dipolo permanente del tautómero de timina desprotonado en N<sub>3</sub> que va dirigido desde N<sub>3</sub> hacia C<sub>6</sub>.

A pD 12 la ventana de potencial utilizado para los espectros de ATR-SEIRA debe acortarse para evitar la oxidación de la película de oro. Sin embargo, todavía es posible realizar a pD 12 un análisis similar de la influencia del potencial en la orientación de la molécula del tautómero de timina adsorbido a este pD. Se han elegido para ello, como previamente para los espectros obtenidos en disoluciones de pD 1, la señal debida al modo de tensión CH (que aparece en torno a 2977 cm<sup>-1</sup>) y la debida al modo de tensión asimétrica del CH<sub>3</sub> (que aparece en torno a 3072 cm<sup>-1</sup>) y se han obtenido las relaciones entre sus intensidades integradas respectivas y la intensidad de la señal debida al modo de vibración simétrica del CH<sub>3</sub> (que aparece en torno a 2926 cm<sup>-1</sup>). En la figura 3.21b se han representado ambas relaciones de intensidades integradas en función del potencial.

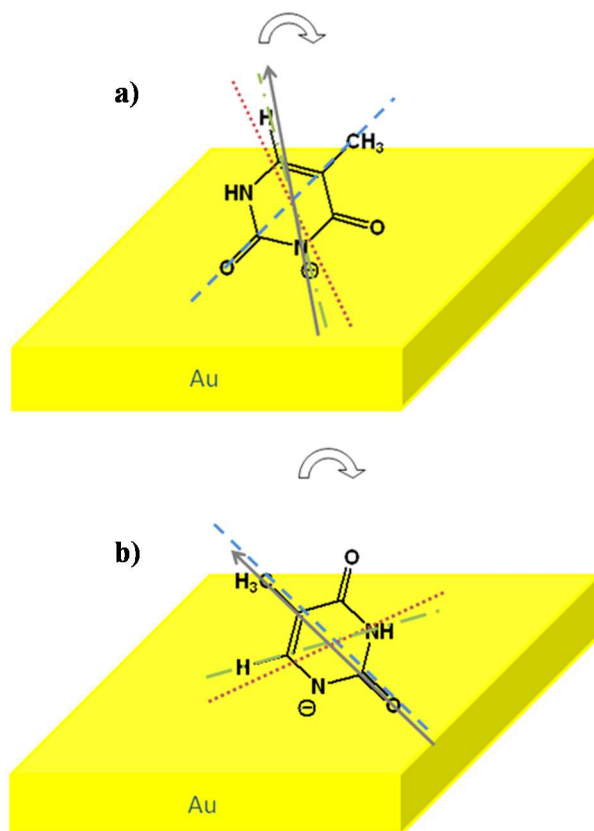


**Fig. 3.21** Intensidades integradas correspondientes a la vibración de tensión de CH (●) y tensión asimétrica de CH<sub>3</sub> (▼), ambas relativas a la intensidad integrada de la vibración de tensión simétrica de CH<sub>3</sub>, calculadas a partir de los espectros ATR-SEIRA de la adenina adsorbida desde disoluciones de a) pD1 y b) pD 12

Se puede observar en la figura 3.21b como, en la región de quimisorción de la timina, ambas relaciones de intensidades integradas disminuyen débilmente al aumentar el potencial, lo que indica una leve rotación del plano molecular de modo que el eje que



comprende a  $C_6$  y  $N_3$  se vuelve gradualmente menos normal al electrodo en comparación con el eje que va desde  $C_2$  hasta  $C_5$  (Fig. 3.22b). Esto se puede explicar suponiendo que el tautómero de la timina desprotonado en  $N_1$  interacciona con el electrodo a través del  $N_1$  y del oxígeno del  $C_2O$  como se predijo por los cálculos DFT. Así el plano molecular también está orientado de acuerdo con estos cálculos. En esta orientación el dipolo permanente de la molécula, que se dirige desde  $C_2$  hasta  $C_5$ , está casi alineado con el campo eléctrico de la superficie de tal manera que la interacción electrostática entre el dipolo permanente de la molécula y el campo eléctrico solamente origina ligeras rotaciones del plano molecular cuando el potencial aumenta. Los sitios de interacción de la molécula con el metal son los mismos en todo el rango de potenciales.



**Fig. 3.22** Direcciones del momento dipolar de la transición para los modos normales de vibración de tensión de CH (-•-•-•-), tensión asimétrica de  $CH_3$  (-•••) y tensión simétrica de  $CH_3$  (-•••) y los vectores de dipolo permanente ( $\rightarrow$ ) para la timina desprotonada en a)  $N_3$  y b)  $N_1$ .

### 3.2.6. Conclusiones

Los resultados espectroelectroquímicos de ATR-SEIRAS in situ para la timina adsorbida sobre electrodos de oro a pH 1, 7 y 12 tanto en H<sub>2</sub>O como en D<sub>2</sub>O han permitido analizar en función del pH la estabilidad de los tautómeros de la timina desprotonada en estado adsorbido. La comparación de los espectros a potenciales altos en la región de quimisorción con los respectivos espectros de transmisión en disolución a los tres valores de pH indica que las especies en medios ácidos y básicos son diferentes, aunque las dos formas corresponden a la timina desprotonada, incluso a valores de pH mucho más bajos que el pK<sub>a</sub> de la timina, por lo que se trata de los tautómeros de la timina aniónica, desprotonados en N<sub>1</sub> o en N<sub>3</sub>.

La asignación del espectro experimental en la región 1300-1800 cm<sup>-1</sup> de la timina adsorbida sobre oro sobre la base de cálculos teóricos de DFT para las moléculas deuteradas y no deuteradas en disolución y para las mismas moléculas adsorbidas sobre superficies electródicas de oro, han permitido identificar que el tautómero desprotonado en N<sub>3</sub> de la timina se adsorbe en medio ácido, mientras que el desprotonado en N<sub>1</sub> es el más estable y el que se adsorbe en medio básico. La deconvolución de los espectros en medio neutro permite confirmar que ambos tautómeros coexisten adsorbidos a pH 7.

Los resultados espectroelectroquímicos de ATR-SEIRAS en la región 2800-3900 cm<sup>-1</sup> han permitido concluir que la timina al adsorberse químicamente sobre electrodos nanoestructurados de oro desplaza a moléculas de agua de la superficie que estaban adsorbidas.

Finalmente, el análisis de los modos normales de vibración de tensión de CH y CH<sub>3</sub> ha permitido estudiar la influencia del campo eléctrico aplicado al electrodo en la orientación de la timina adsorbida y proponer un modelo de adsorción sobre superficies electródicas de oro para ambos tautómeros. Según este modelo, en medio ácido el tautómero desprotonado en N<sub>3</sub> rota su plano molecular, modificando los sitios de interacción con el electrodo pasando de estar coordinado sólo a través del grupo C<sub>2</sub>O a los potenciales menores de la región de quimisorción a coordinarse también a través de N<sub>3</sub> y el grupo C<sub>4</sub>O a potenciales altos. En medio básico el tautómero desprotonado en N<sub>1</sub> interacciona con el electrodo a través de N<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>O en todo el rango de potenciales de quimisorción, y sólo experimenta pequeñas rotaciones del plano molecular. Estas orientaciones de los tautómeros y las rotaciones con el potencial propuestas están

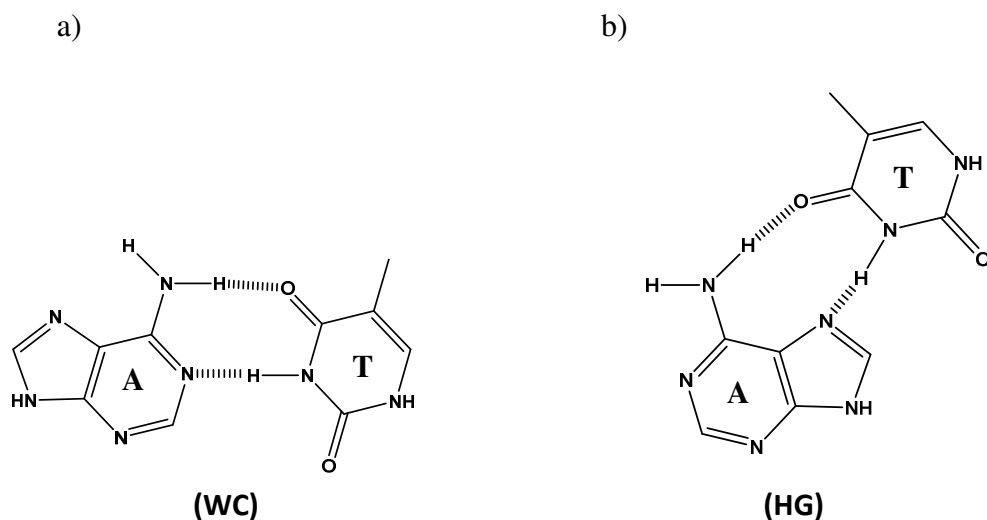
favorecidas en cada caso por las interacciones específicas con el electrodo y por la interacción entre el momento dipolar permanente de la molécula y el campo eléctrico originado por el electrodo.

### 3.3. Co-Adsorción de Adenina y Timina sobre Electrodo de oro

#### 3.3.1. Introducción

Los estudios de las interacciones entre la timina y la adenina en interfaces organizadas resultan de gran interés tanto para la comprensión de sus actividades biológicas como por sus posibles aplicaciones en biotecnología.

Los estudios de las adsorciones individuales de adenina y timina sobre superficies electrónicas de oro han puesto de manifiesto que estas moléculas se unen al electrodo curiosamente por los mismos átomos implicados en la formación de puentes de hidrógeno, de Watson-Crick (WC) o de Hoogsteen (HG), entre ambas bases complementarias (Fig. 3.23)



**Fig. 3.23** Modelo de interacciones por puentes de hidrógeno entre timina (T) y adenina (A) a) Watson-Crick (WC) y b) Hoogsteen (HG)

En esta última parte del capítulo se utiliza la espectroscopia de ATR-SEIRA para estudiar la co-adsorción de timina y adenina sobre electrodos de oro en el mismo rango de pH que están estudiadas las adsorciones individuales de dichas bases. Los resultados se analizan sobre la base de la adsorción de dos formas de la adenina y dos tautómeros de timina dependiendo del pH del medio. La comparación de los espectros de ATR-SEIRA de la co-adsorción con los correspondientes espectros para la adsorción de las bases individuales a los distintos valores de pH ha permitido decidir sobre las interacciones de la timina y la adenina sobre la superficie del electrodo.

Estos estudios han dado lugar a una publicación en la revista *Electrochemistry Communications*<sup>18</sup> y actualmente se está preparando otra publicación que comprende resultados de esta parte de capítulo de la tesis.

### **3.3.2. Experimental**

#### **3.3.2.1. Reactivos**

Se utilizó D<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®) y H<sub>2</sub>O Ultrapura (Millipore y ELGA) para preparar la disolución de electrolito soporte (HClO<sub>4</sub>, KClO<sub>4</sub> 0.1 M y KClO<sub>4</sub> 0.1 M + NaOH) y la disoluciones de stock de adenina y timina (Sigma-Aldrich® sin más purificación) de concentraciones 10 mM. Los experimentos de infrarrojos obtenidos en configuración de reflexión interna se realizaron tanto en H<sub>2</sub>O como en D<sub>2</sub>O en los mismos electrolitos soporte (HClO<sub>4</sub> a pH 1, KClO<sub>4</sub> 0.1 M a pH 7 y KClO<sub>4</sub> 0.1 M + NaOH a pH 11.5). Las concentraciones de adenina y timina se variaron desde 0.01 hasta 1 mM mediante la adición de la cantidad necesaria de la disolución stock correspondiente a potenciales a los que ambas bases están adsorbidas químicamente sobre el electrodo de oro.

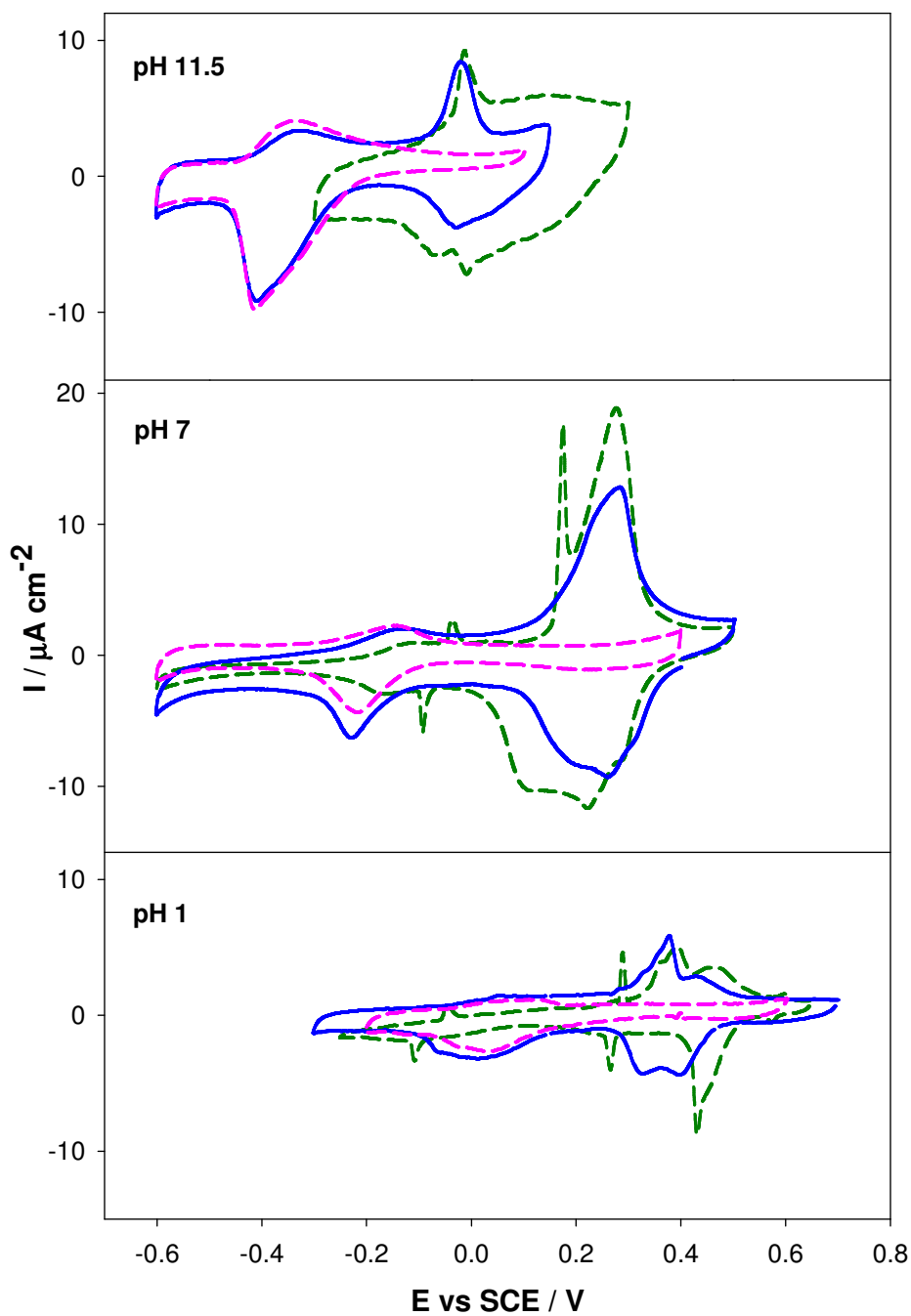
#### **3.3.3. Resultados de Voltametría cíclica sobre electrodos Au(111)**

En la figura 3.24 se muestran los voltagramas cíclicos a diferentes valores de pH obtenidos con electros de Au(111) en disoluciones que contienen adenina 0.01 mM o timina 1mM y se comparan con los obtenidos cuando ambas bases están presentes en la disolución a las mismas concentraciones. Las medidas electroquímicas se han centrado en la región de doble capa para evitar la evolución de hidrógeno a los potenciales bajos y los picos de oxidación/reducción del oro a los potenciales altos. El comportamiento voltamétrico de la adsorción individual de adenina y timina sobre oro ha sido estudiada por métodos electroquímicos y espectroscópicos en los apartados previos de este capítulo, así como en la bibliografía.<sup>4,6,10-12,19</sup>

En los voltagramas de la timina a los diferentes valores de pH se observan las regiones características de adsorción separadas por los picos de transición de fase que se han descrito en el apartado 3.2.3 de esta capítulo. Los voltagramas obtenidos en disoluciones de adenina muestran que esta base permanece adsorbida químicamente en un rango más amplio de potenciales que la timina a los tres valores de pH estudiados. Si

a un potencial en el que la adenina y la timina deben estar adsorbidas químicamente, se adiciona adenina 0.01 mM a disoluciones que contenían timina adsorbida químicamente se produce la desaparición de los picos de transición de fase característicos de la timina adsorbida sobre electrodos de Au(111) <sup>10,12,20</sup> y además solamente a pH 1 (Fig. 3.24a) los picos voltamétricos correspondientes a la adsorción/desorción química de la timina se desplazan hacia potenciales más bajos.

Se observa además en todas las condiciones de pH que la región de potenciales en los que las dos moléculas están adsorbidas químicamente es relativamente estrecha ya que las señales de desorción química de la timina aparecen a potenciales altos. Por su parte, los picos debidos a la desorción/adsorción de adenina apenas se modifican por la presencia de timina en disolución, posiblemente porque a los valores tan bajos de potencial a los que aparecen, la timina no se encuentra adsorbida químicamente sino más bien formando fases más o menos condensadas de moléculas adsorbidas físicamente.



**Fig. 3.24** Voltagramas cíclicos estacionarios obtenidos con electrodos de Au(111) a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  para disoluciones que contienen adenina  $0.01 \text{ mM}$  (---), timina  $1 \text{ mM}$  (- - -) y mezcla de adenina  $0.01 \text{ mM}$  y timina  $1 \text{ mM}$  (—) a los valores de pH indicados.

A los distintos valores de pH estudiados en los experimentos en los que se comienza con adenina  $0.01 \text{ mM}$  adsorbida químicamente y se le adiciona timina  $1 \text{ mM}$  a un valor de potencial en el que ambas bases están adsorbidas químicamente los efectos observados son los mismos que los que se han descrito anteriormente.

La primera conclusión que se puede deducir de los voltagramas de la figura 3.24 es que tanto la timina como la adenina están adsorbidas químicamente de forma conjunta a los mismos potenciales a los que los están de forma individual sobre electrodos de Au(111).

Por otro lado, las diferencias con el pH que se observan en los voltagramas cuando ambas bases están co-adsorbidas sobre la superficie electródica deben estar relacionadas con las diferentes formas tautoméricas de la timina adsorbidas a los diferentes valores de pH; como se ha descrito en apartados anteriores de este capítulo.

### **3.3.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de transmisión en disolución.**

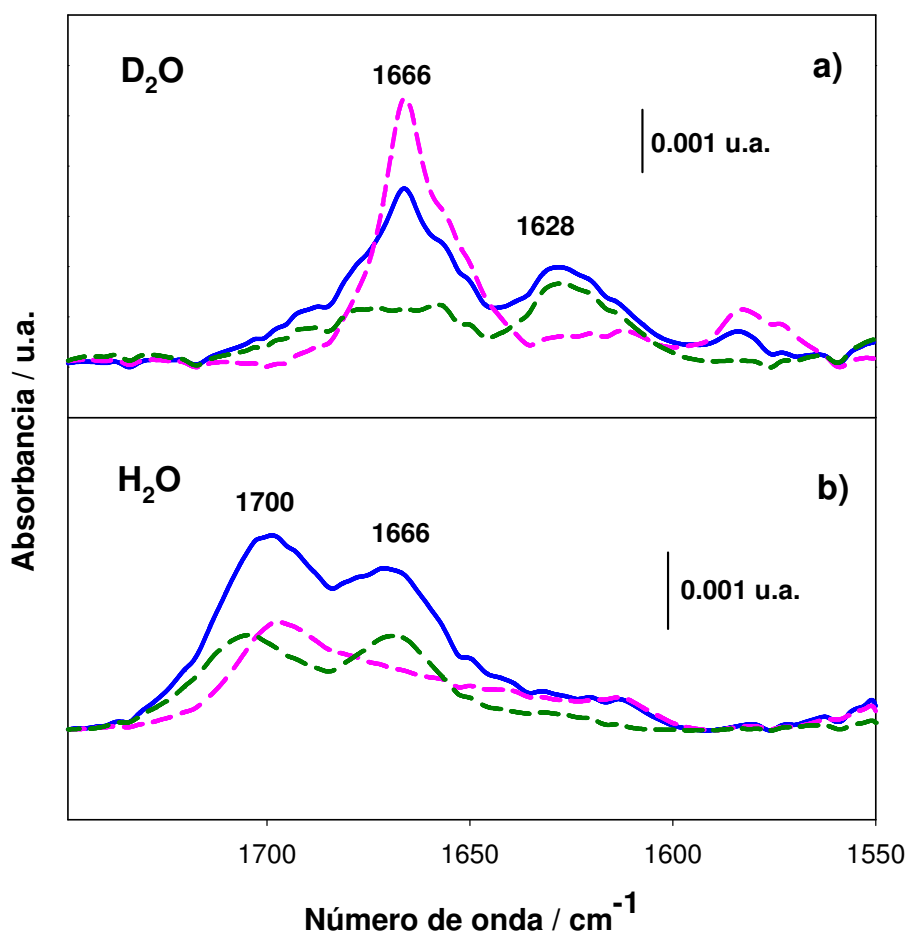
Debido a que las interacciones de tipo Watson–Crick (WC) o de Hoogsteen (HG) entre las moléculas de timina y adenina implican la formación de puentes de hidrógeno entre ambas, los efectos que causan los enlaces de hidrógeno en los espectros de infrarrojos de estas dos moléculas constituyen un tema muy estudiado. Además las moléculas de timina y adenina también pueden interactuar a través de puentes de hidrógeno con ellas mismas o con moléculas de disolvente, así los efectos que causan los puentes de hidrógeno se suelen estudiar normalmente por comparación de los espectros de las moléculas aisladas con los correspondientes espectros de las moléculas en fase líquida o sólida.<sup>21,22</sup> Estudios bibliográficos han propuesto que la timina policristalina<sup>22</sup> forma dos puentes de hidrógeno con otra molécula de timina siendo los átomos implicados  $C_2=O_8$ – $N_1H$  y  $C_2=O_8$ – $N_3H$  mientras que en fase acuosa predominan los puentes de hidrógeno con moléculas de agua ( $O_8$ – $OH$  y  $O$ – $NH$ ). Los cálculos predicen que la formación de puentes de hidrógeno desplazan a mayor número de onda las señales de la timina asociadas a los modos normales de vibración de tensión de  $C_2=O_8$  y flexión de  $NH$  (ND) en comparación con el espectro individual de la timina. Los cálculos teóricos predicen<sup>23</sup> que cuando tiene lugar la interacción aislada entre timina y adenina a través de puentes de hidrógeno de tipo WC se produce el desplazamiento hacia el rojo de las señales de la timina en la región de  $1750$ – $1550\text{ cm}^{-1}$ , sin embargo en esta misma región las señales de la adenina sufren un desplazamiento hacia el azul.

En la figura 3.25 se muestran los espectros de transmisión obtenidos en disoluciones de  $HClO_4$   $0.1M$  a pH 1 en  $H_2O$  y  $D_2O$  de mezclas de adenina  $10\text{ mM}$  y timina  $10\text{ mM}$ ,



comparados con los de las correspondientes disoluciones 10 mM de cada base por separado.

Se puede observar en la figura 3.25 que las señales en la región 1400-1800  $\text{cm}^{-1}$  de la timina y la adenina en disoluciones de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{D}_2\text{O}$  no cambian significativamente al compararlo con los espectros de transmisión que contiene ambas bases aunque en  $\text{D}_2\text{O}$  la señal de adenina debida a la vibración de tensión del anillo aromático a 1666  $\text{cm}^{-1}$  disminuye en intensidad en presencia de timina (en disoluciones acuosas los resultados son menos precisos debido a que las señales de interés solapan con los modos normales de vibración de flexión del  $\text{H}_2\text{O}$ ). Parece que en disolución acuosa la distinción de puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarios y/o entre cada una de las bases y el agua resulta prácticamente imposible.



**Fig. 3.25** Región 1400-1800  $\text{cm}^{-1}$  del espectro de transmisión en disoluciones que contienen adenina 10 mM (---), timina 1mM (- - -) y mezcla de adenina 10 mM y timina 1mM (—) a)  $\text{D}_2\text{O}$  y b)  $\text{H}_2\text{O}$  a pH 1 en disoluciones de  $\text{HClO}_4$  0.1 M.

### **3.3.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la adenina y timina co-adsorbidas sobre Electrodo de Oro.**

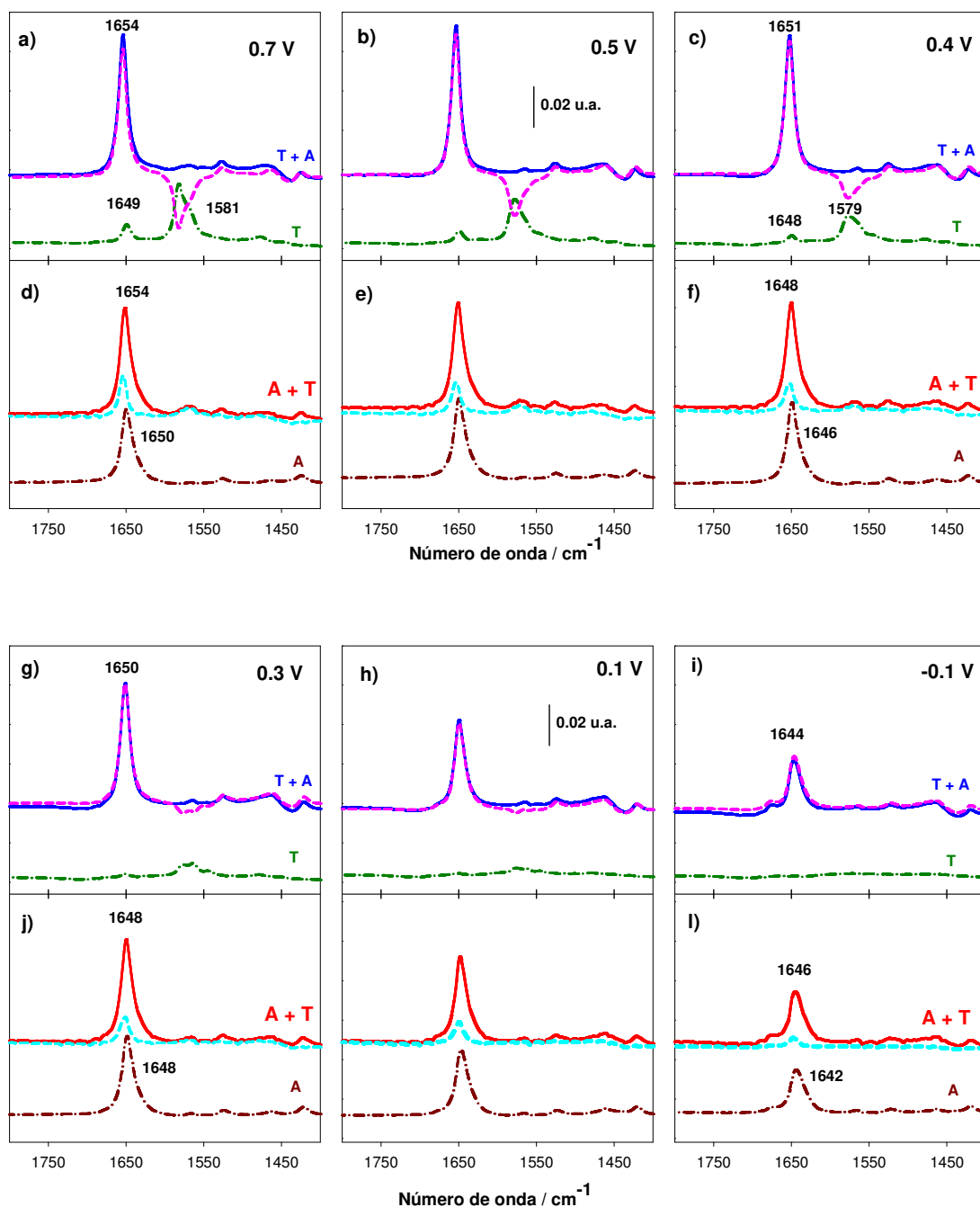
#### **3.3.5.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ .**

En los espectros de ATR-SEIRA en la región comprendida entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  las señales más importantes para la adenina y las diferentes formas tautoméricas de la timina adsorbida sobre electrodos de oro corresponden a vibraciones en el plano molecular.

En la figura 3.26 se muestran los espectros de ATR-SEIRA en disoluciones de  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 1 a distintos potenciales sobre películas nanoestructuradas de oro. A cada valor de potencial se presentan dos series de experimentos cada uno comenzando con una base diferente. De esta forma se pueden comparar los espectros de co-adsorción con el espectro individual de la base con la cual se ha comenzado el experimento.

Para la región de potenciales comprendidos entre 0.3V<sub>vs</sub> SCE y 0.6V<sub>vs</sub> SCE de acuerdo con la figura 3.26 ambas bases del ADN se encuentran químicamente adsorbidas sobre la superficie del electrodo. En la figura 3.26a-c se representan los correspondientes espectros de ATR-SEIRAS a tres potenciales en esa región y se observa como las bandas de adsorción características del tautómero desprotonado en  $\text{N}_3$  descritas en el apartado 3.3.5 de esta tesis y en la Tabla 2, desaparecen al añadir una disolución madre de adenina para obtener una concentración final en célula de 0.01mM. Este efecto es especialmente claro en la banda a 1585  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a las tensiones de los carbonilos  $\text{C}_2\text{O}$  y  $\text{C}_4\text{O}$ , ya que la banda a 1649  $\text{cm}^{-1}$  (tensión de  $\text{C}_5\text{C}_6$  y flexión CH de timina) aparece a frecuencias muy próximas a la banda de adsorción de adenina a 1654  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de tensión del anillo que implica los enlaces  $\text{C}_5\text{C}_6$  y  $\text{C}_6\text{C}_{10}$ . No obstante, al deconvolucionar la banda a 1654  $\text{cm}^{-1}$  que se obtiene en las disoluciones que contienen las dos bases se obtiene una sola banda gaussiana-lorentziana con la misma semi-anchura que en el caso de los espectros registrados en disoluciones que solo contienen adenina, lo que confirma la desaparición de la señal a 1649  $\text{cm}^{-1}$  asignada a la timina adsorbida. Además, la sustracción de los espectros registrados en disoluciones que solo contienen timina de los correspondientes espectros registrados en disoluciones de las dos bases, claramente muestra como bandas negativas la

desaparición de las señal a  $1581\text{ cm}^{-1}$  (y hombro a  $1567\text{ cm}^{-1}$ ) de los espectros registrados en disoluciones que solo contienen timina.

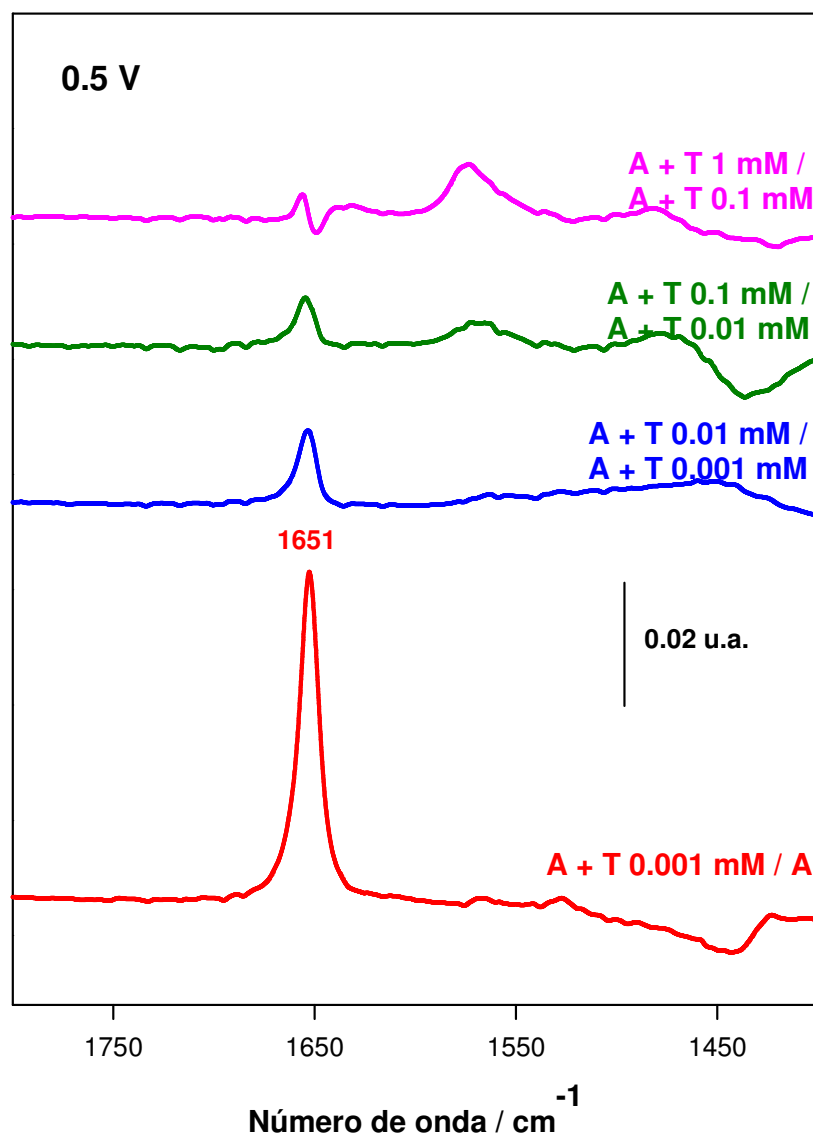


**Fig. 3.26** Espectros de ATR-SEIRA en la región de  $1300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  para disoluciones de adenina  $0.01\text{mM}$  (- · - · -), timina  $1\text{mM}$  (- · · · -), timina  $1\text{mM}$  y adenina  $0.01\text{mM}$  (—), adenina  $0.01\text{mM}$  y timina  $1\text{mM}$  (—) adsorbidas sobre películas nanoestructuradas de oro en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH1 en  $\text{HClO}_4$  y los potenciales indicados. Los espectros están referidos al electrolito soporte al mismo valor de potencial. Se incluyen también el espectro: (—) es la diferencia entre los espectros antes y después de la adicción de adenina y (- · - · -) es la diferencia entre los espectros antes y después de la adicción de timina.

En las figuras 3.26 d-f se comparan los espectros registrados en disoluciones que solo contienen adenina (0.01 mM) con los registrados en disoluciones que contienen las dos bases (0.01 mM de adenina y 1 mM de timina) a los mismos potenciales que en las figuras 25a-c, esto es, en la región de adsorción química de ambas bases. La comparación corrobora la ausencia de señales debidas a la timina adsorbida, a pesar de que los voltagramas indican dicha adsorción (los picos de desorción de la timina aparecen en los CVs a potenciales más bajos). Por otra parte, puede observarse que la señal original debida a la vibración de anillo de la adenina adsorbida (a  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) se desplaza ligeramente a frecuencias algo mayores ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ) y aumenta en intensidad. La substracción de los correspondientes espectros permite claramente detectar el aumento de intensidad de esta señal.

En las figuras 3.26 g-i y 3.26 j-l se realizan comparaciones similares entre los espectros registrados en presencia solo de timina y los registrados tras la adición de adenina a dicha disolución (Figs. 3.26g-i) o entre los registrados en presencia solo de adenina y los obtenidos tras la adición de timina (Figs. 3.26 j-l) a potenciales en los que la adenina está químicamente adsorbida pero no así la timina, que estaría formando estructuras fisisorbidas más o menos organizadas, pero con el plano molecular paralelo al electrodo.<sup>11</sup> Efectivamente, se comprueba en los espectros en disoluciones de timina la ausencia de señales IR activas (o son muy débiles) y en los espectros en disoluciones de las dos bases solo aparece la debida a la adenina. No obstante, el efecto de aumento de intensidad de la señal debida a la vibración del anillo de adenina adsorbida, cuando se agrega timina a la disolución, se puede apreciar aún a estos potenciales, solo que el aumento es menor.

El aumento de la señal a  $1651\text{ cm}^{-1}$  (y su ligero desplazamiento a frecuencias mayores) depende también de las concentraciones de las bases en disolución, además de los potenciales del electrodo. Así, en la figura 3.27 se muestra el efecto producido en los espectros de ATR-SEIRAS registrados en disolución de  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 1 y adenina 0.01 mM por las adiciones sucesivas de timina, a un potencial al que ambas bases se pueden adsorber químicamente. La adición hasta una concentración de timina de 0.01 mM produce un gran aumento de la señal a  $1651\text{ cm}^{-1}$ , sin embargo, el incremento es menor en adiciones sucesivas hasta prácticamente alcanzarse la saturación que se alcanza aproximadamente para una concentración de adenina de 0.01 mM y de timina de 1 mM.

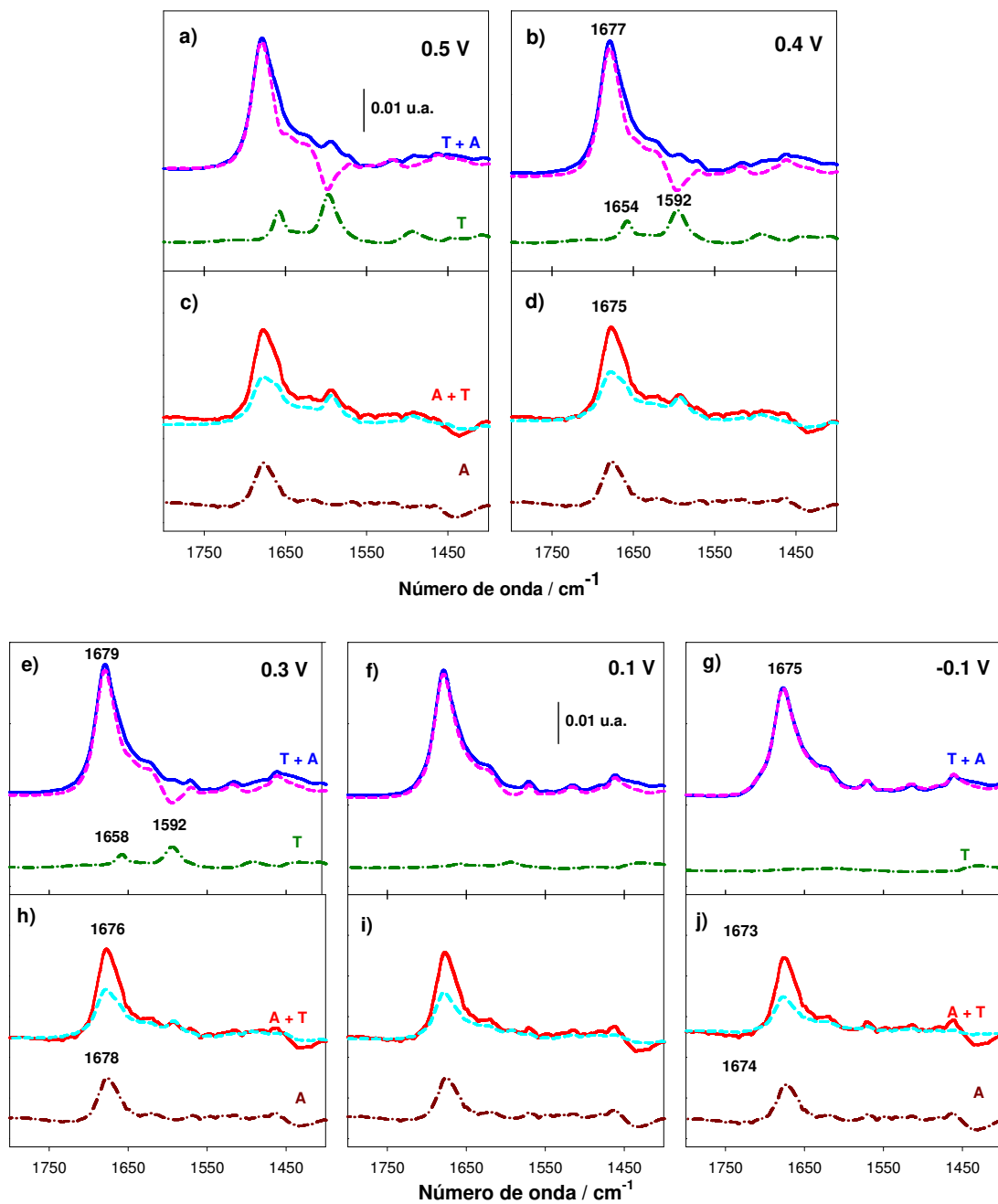


**Fig. 3.27** Espectros de ATR-SEIRA en la región  $1300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  a  $0.5\text{ V}$  vs SCE para disoluciones de adenina  $0.01\text{ mM}$  y timina desde  $0.001\text{ mM}$  hasta  $1\text{ mM}$  co-adsorbida sobre electrodos nanoestructurados de oro en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 1. Cada espectro de ATR-SEIRA está referido al correspondiente espectro con una concentración inferior de timina.

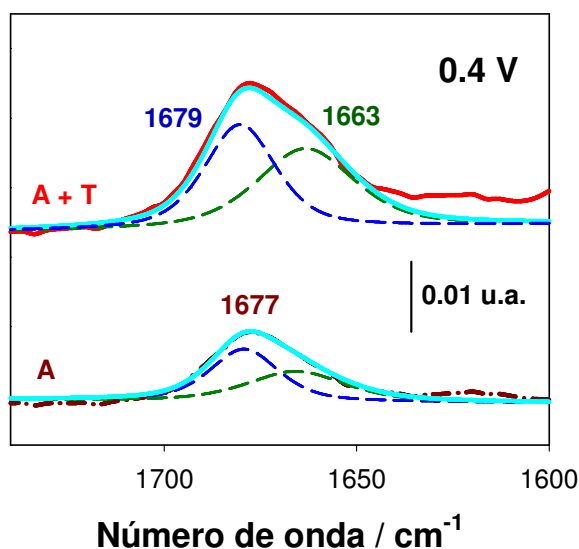
Por otro lado se ha podido comprobar que al partir de disoluciones de adenina  $0.1\text{ mM}$  adsorbida químicamente sobre la superficie del electrodo ya no se observa ningún efecto como los descritos para la figura 3.26 al adicionar timina  $1\text{ mM}$  a un potencial de quimisorción de ambas bases, sugiriendo estos resultados que con estas concentraciones la adenina ya ha alcanzado la saturación de la superficie del electrodo.

Los estudios comparativos de los espectros ATR-SEIRA de cada base con los obtenidos tras adiciones de la base complementaria se han realizado también en disoluciones

acuosas. En estos casos, se puede también analizar el efecto de la adición de timina no solo sobre la señal de vibración de anillo de la adenina sino además sobre la señal debida a la vibración de flexión del grupo amino de la adenina. En la figura 3.28 se muestran algunos ejemplos. Los espectros debidos a la adenina adsorbida químicamente muestran una señal ancha e intensa a  $1677\text{ cm}^{-1}$  que es una combinación de las vibraciones del grupo amino y las vibraciones de anillo a  $1679$  y  $1663\text{ cm}^{-1}$  respectivamente<sup>4,8,19</sup> como se observa en la deconvolución de la figura 28. El tautómero desprotonado en  $\text{N}_3$  de la timina en disolución acuosa adsorbido químicamente presenta dos señales intensas como se describió en el apartado 3.2.5 de esta tesis y en la Tabla 2. En disolución acuosa la adición de produce los mismos efectos que en disoluciones de  $\text{D}_2\text{O}$  descritas anteriormente: Las señales debidas a las vibraciones de la timina desaparecen al adicionar adenina, en tanto que las debidas a las vibraciones de la adenina adsorbida aumentan con la adición de timina a las disoluciones de la base complementaria. El aumento de la señal de adenina correspondiente a la vibración del grupo amino es algo mayor que el de la señal debida a la vibración de tensión del anillo como se observa en la deconvolución en dos bandas gaussianas-lorentzianas (Fig. 3.29) de los espectros de adenina adsorbida desde disoluciones que solo contienen adenina o desde disoluciones que contienen las dos bases, al potencial de  $0.4\text{V vs SCE}$ , al que las dos bases se encuentran químicamente adsorbidas.



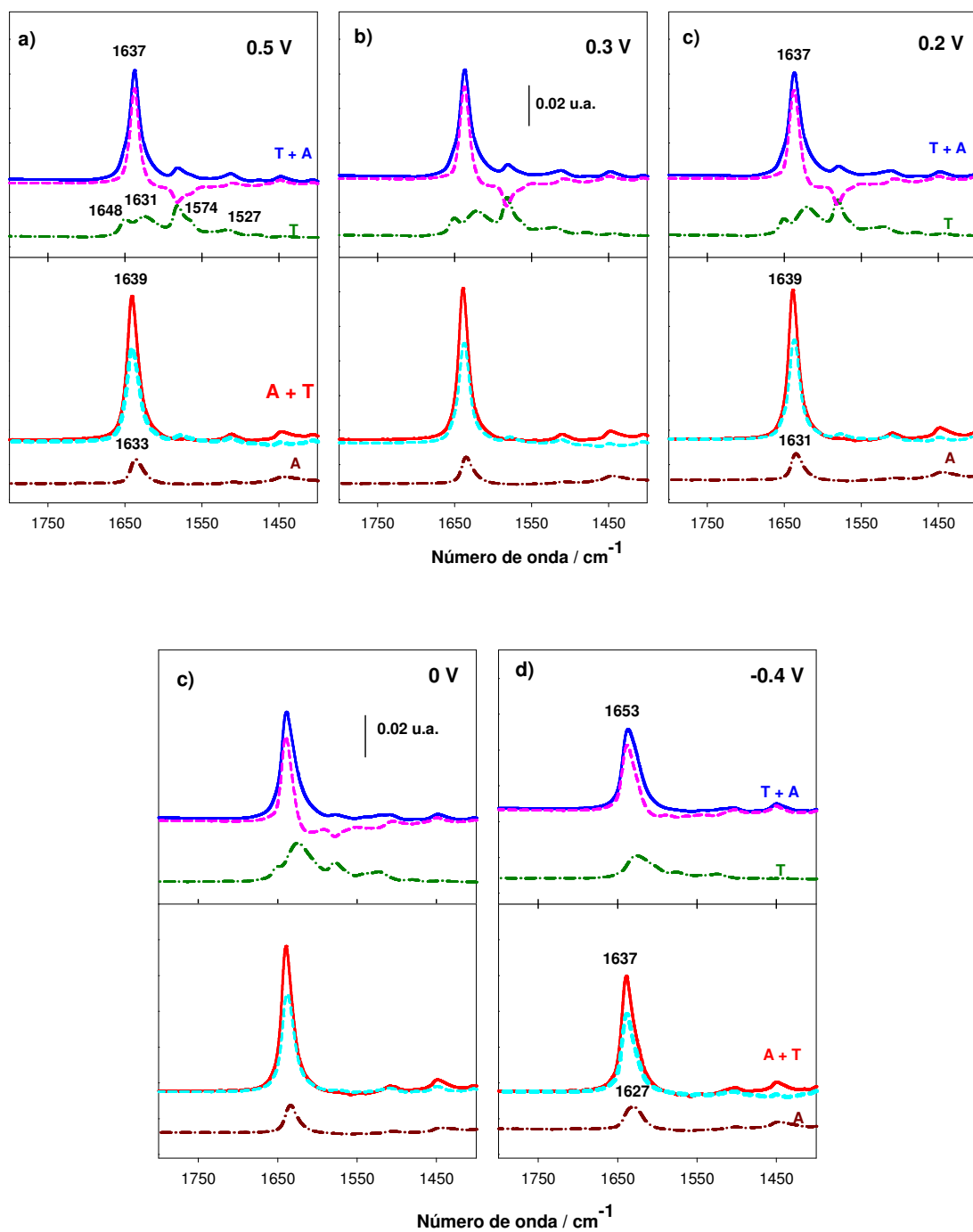
**Fig. 3.28** Espectros de ATR-SEIRA en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos en disoluciones a pH 1 en  $\text{H}_2\text{O}$  a distintos potenciales referidos al electrolito soporte al mismo potencial. Líneas como en la figura



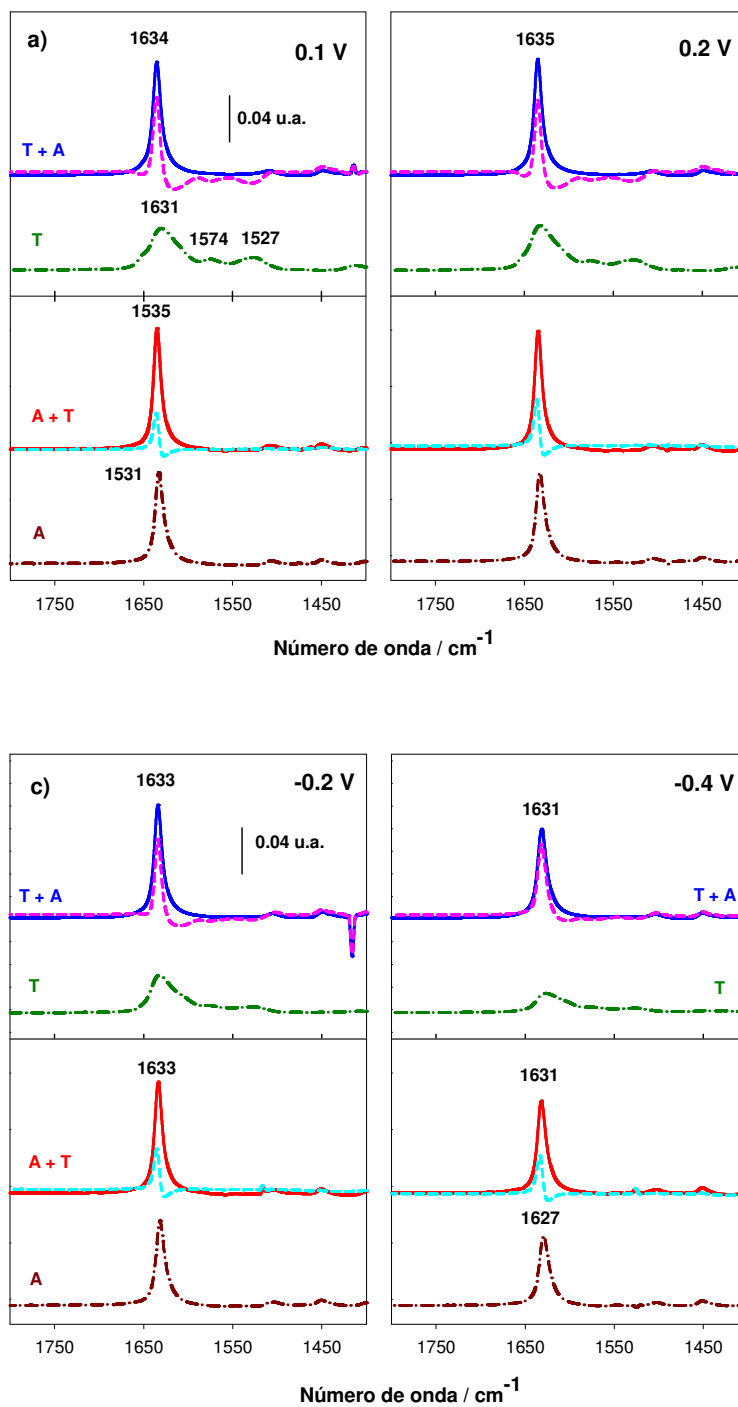
**Fig. 3.29** Deconvolución de los espectros “in-situ” de ATR-SEIRA a pH 1 en disolución acuosa a potencial de 0.4 V<sub>SCE</sub> de la figura 27 en una componente a 1663 cm<sup>-1</sup> (- - -) y otra a 1679 cm<sup>-1</sup> (- - -). Se muestra también el resultado de la combinación de las dos señales obtenidas por deconvolución (—).

Se han realizado estudios similares de co-adsorción de las dos bases complementarias a pH 7.5 y 11. En las figuras 3.30 y 3.31 se muestran algunos ejemplos. En todos los casos se observa que las señales correspondientes al tautómero adsorbido químicamente de timina desaparecen al adsorberse la adenina en tanto que las bandas de IR de adenina adsorbida aumentan su intensidad cuando se adiciona timina a la disolución. El aumento es significativo a los tres valores de pH estudiados, sin embargo, este efecto son mucho más marcado a pH 7.5 que a pH 1 y es muy pequeño a valores de pH 11.





**Fig. 3.30** Espectros de ATR-SEIRA en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos en disoluciones a pH 7.5 en  $\text{H}_2\text{O}$  a distintos potenciales referidos al electrolito soporte al mismo potencial. Líneas como en la figura

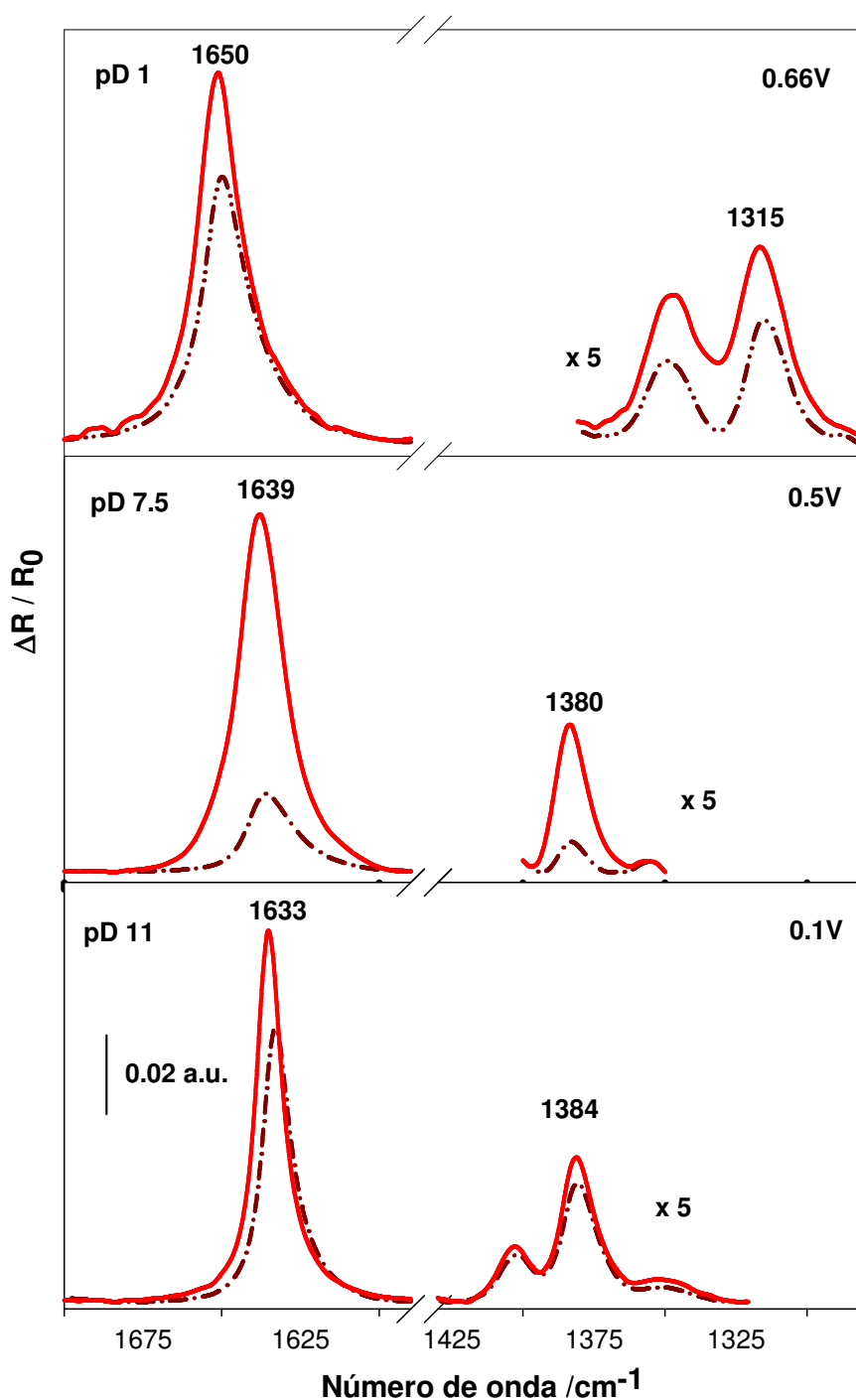


**Fig. 3.31** Espectros de ATR-SEIRA en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos en disoluciones a pH 11 en  $\text{H}_2\text{O}$  a distintos potenciales referidos al electrolito soporte al mismo potencial. Líneas como en la figura 25.

En principio, los cambios en las intensidades de las señales correspondientes a la timina y la adenina adsorbidas debidos a la presencia de su base complementaria podrían tener dos causas: un cambio en el grado de recubrimiento de la superficie y/o un cambio en la orientación del plano molecular respecto a la superficie del electrodo. Así, la

desaparición de las bandas IRRAS correspondientes a la timina adsorbida en presencia de adenina podría atribuirse bien a una reorientación de la timina adsorbida con el plano molecular paralelo a la superficie del electrodo o a su desorción total debido a la adsorción de adenina recubriendo completamente el electrodo. Sin embargo, las señales voltamétricas correspondientes a la adsorción/desorción de timina obtenidas en presencia de adenina indican que ambas bases están co-adsorbidas sobre el electrodo a los potenciales más altos de los experimentos IRRAS, por lo que debe concluirse que la co-adsorción de timina y adenina origina una reorientación del plano molecular de la timina adsorbida a una disposición paralela sobre la superficie del electrodo a todos los valores de pHs investigados. Esta orientación y la consiguiente ausencia de señales activas en el IR para la timina cuando se co-adsorbe con adenina no permiten deducir si existe algún efecto de co-adsorción de adenina sobre el equilibrio tautomérico de la timina adsorbida: Los dos tautómeros de la timina adsorbidos experimentan la reorientación molecular.

Es llamativo que el mayor aumento en la intensidad de las bandas de adsorción de adenina se ha encontrado en medios neutros como se observa en la figura 3.32 para las bandas que aparecen en las regiones del espectro entre  $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1320\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$ , que en todos los casos corresponden con modos normales de vibración en el plano molecular. A los tres valores de pH estudiados (1, 7.5 y 11) las bandas a 1650, 1639 y  $1633\text{ cm}^{-1}$  se asignan respectivamente modos normales de vibración combinados que incluyen vibración de esqueleto y las tensiones  $\text{C}_6\text{N}_{10}$  y  $\text{C}_5\text{C}_6$ .<sup>5,8,19</sup> mientras que la banda que a  $1380\text{ cm}^{-1}$  a pH se asigna a las tensiones  $\text{C}_5\text{N}_7$  y  $\text{C}_4\text{C}_5$  y la flexión CH además esta banda modifica su posición en el espectro en función del pH del medio.



**Fig. 3.32** Espectros de ATR-SEIRA en las regiones de  $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1320\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$  para disoluciones de adenina  $0.01\text{ mM}$  (- · - · -), adenina  $0.01\text{ mM}$  y timina  $1\text{ mM}$  (—) adsorbidas sobre películas nanoestructuradas de oro en  $\text{D}_2\text{O}$  a los valores de pH y potenciales indicados. Los espectros están referidos al electrolito soporte al mismo valor de potencial.

El aumento observado de las bandas IRRAS de adenina adsorbidas en presencia de timina puede cuantificarse mediante el cálculo de las intensidades integradas. Para una banda de absorción obtenida con luz polarizada-p la correspondiente intensidad

integrada,  $A_p$ , viene dada por la ecuación (3), que ya fue utilizada anteriormente en el apartado 3.2.5.3 del presente capítulo para estudiar los cambios de orientación de los tautómeros  $N_1$  y  $N_3$  de timina con el potencial.

$$A_p \propto \Gamma |\vec{\mu} \times \vec{E}_p| = \Gamma |\mu|^2 \langle E_p^2 \rangle \cos^2(\theta) \quad (3)$$

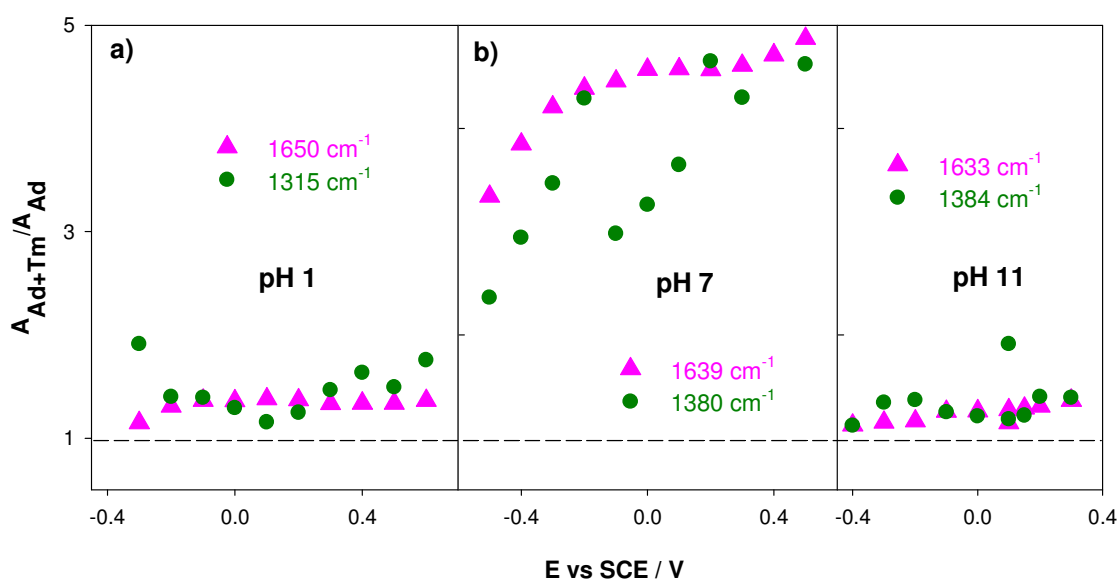
Donde, como ya se ha dicho anteriormente,  $\Gamma$  es la concentración superficial de moléculas responsables de la absorción de la radiación de luz,  $\theta$  es el ángulo entre el momento dipolar de la transición y el campo eléctrico del fotón que para la luz polarizada  $p$  tiene una dirección normal a la superficie del electrodo,  $|\mu|$  es el módulo del momento dipolar de la transición y  $\langle E_p^2 \rangle$  es la intensidad cuadrática media del campo eléctrico para un haz de luz polarizada- $p$  en la superficie de reflexión. Si se comparan las intensidades de dos señales que poseen distinta orientación de sus momentos de transición, como es el caso de las señales de la figura 3.32, se puede prescindir del efecto del potencial sobre la magnitud de la concentración superficial. Por tanto, el aumento de área de una señal  $p$  del espectro de la adenina adsorbida, como consecuencia de la coadsorción de la timina puede representarse por la relación entre las intensidades integradas correspondientes según la ecuación (4).

$$\frac{A_{p(Ad+Tm)}}{A_{p(Ad)}} = \frac{\Gamma_{(Ad+Tm)}}{\Gamma_{(Ad)}} \times \frac{\cos^2(\theta)_{(Ad+Tm)}}{\cos^2(\theta)_{(Ad)}} \quad (4)$$

Donde  $(\theta)_{(Ad)}$  y  $(\theta)_{(Ad+Tm)}$  representan el exceso superficial de adenine en ausencia y en presencia de timina respectivamente y  $(\theta)$  y  $\Gamma$  tienen los mismos significados físicos que en las ecuaciones 1. Por tanto, como ya se explicó en el apartado 3.2.5.3 el cambio en las intensidades de las bandas de adenina 0.01 mM en presencia de timina 1mM puede ser consecuencia de un aumento del exceso superficial o de un cambio en la orientación de las moléculas y, por tanto, en el ángulo entre el correspondiente momento dipolar de la transición y la dirección normal al electrodo.

Para determinar la causa del incremento de intensidad de las bandas de adenina 0.01 mM en presencia de timina 1mM se representan en la figura 3.33 las intensidades integradas correspondientes a las bandas marcadas en la figura 3.32 a los tres valores de pH. En algunos casos ha sido necesario realizar la deconvolución de las bandas en bandas gaussianas-lorentzianas para poder obtener la intensidad integrada de la señal de interés aislada del resto de bandas con las que solapan. En todas las condiciones

investigadas el aumento de las intensidades de las dos señales seleccionadas de la adenina adsorbida cuando se adiciona timina es del mismo orden, pero depende en gran medida el valor de pH de la disolución. A pH 7.5 la relación de áreas obtenidas en presencia y en ausencia de timina, para las señales a 1639 y a 1380  $\text{cm}^{-1}$  está en torno a 4.5 a los potenciales a los que las dos bases están químicamente adsorbidas. Este efecto se ve más claramente en la banda a 1640  $\text{cm}^{-1}$  ya que tiene una relación señal/ruido mayor. A pH 1 y 11 el factor de aumento es aproximadamente de 1.4 y 1.2 respectivamente.



**Fig. 3.33** Intensidades integradas en función del potencial correspondientes a la vibración en la región de 1640-1650  $\text{cm}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ) y la región de 1320-1380  $\text{cm}^{-1}$  ( $\bullet$ ) para disoluciones de adenina 0.001 mM y timina 1 mM, ambas relativas a la intensidad integrada de las mismas señales en disoluciones que contienen únicamente adenina 0.01 mM, calculadas a partir de los espectros de ATR-SEIRA en D<sub>2</sub>O a los pH indicados

Para un modo de vibración en el plano molecular el ángulo  $\theta$  entre el vector del dipolo de transición asociada al modo normal de vibración y la dirección normal al electrodo se puede descomponer como el ángulo de inclinación del plano molecular  $\alpha$  entre la dirección normal al electrodo y su proyección sobre el plano molecular y el ángulo de rotación entre el momento dipolar de la transición y la proyección de la normal al electrodo en el plano molecular,  $\varphi$ :<sup>5</sup>

$$\cos(\theta) = \cos(\alpha) \times \cos(\varphi) \quad (4)$$

El estudio cuantitativo de SNIFTIRS de la adsorción de adenina sobre electrodos de Au(111) en medio neutro, realizado previamente en el Grupo, permitió deducir que el ángulo asociado a la señal de  $1640\text{ cm}^{-1}$  ( $\theta^{1640}$ ) es de  $52^\circ$ . Por tanto, el mayor aumento posible causado solamente por una reorientación de la molécula, de acuerdo con la ecuación 4 sería aproximadamente 2.5 si la molécula cambia su orientación de tal manera que el ángulo cambia de  $52^\circ$  a  $0^\circ$ , es decir, totalmente normal al electrodo, que supondría un  $\alpha^{1640} = \varphi^{1640} = 0$ . Este aumento teórico es claramente inferior a lo observado experimentalmente en disoluciones neutras.

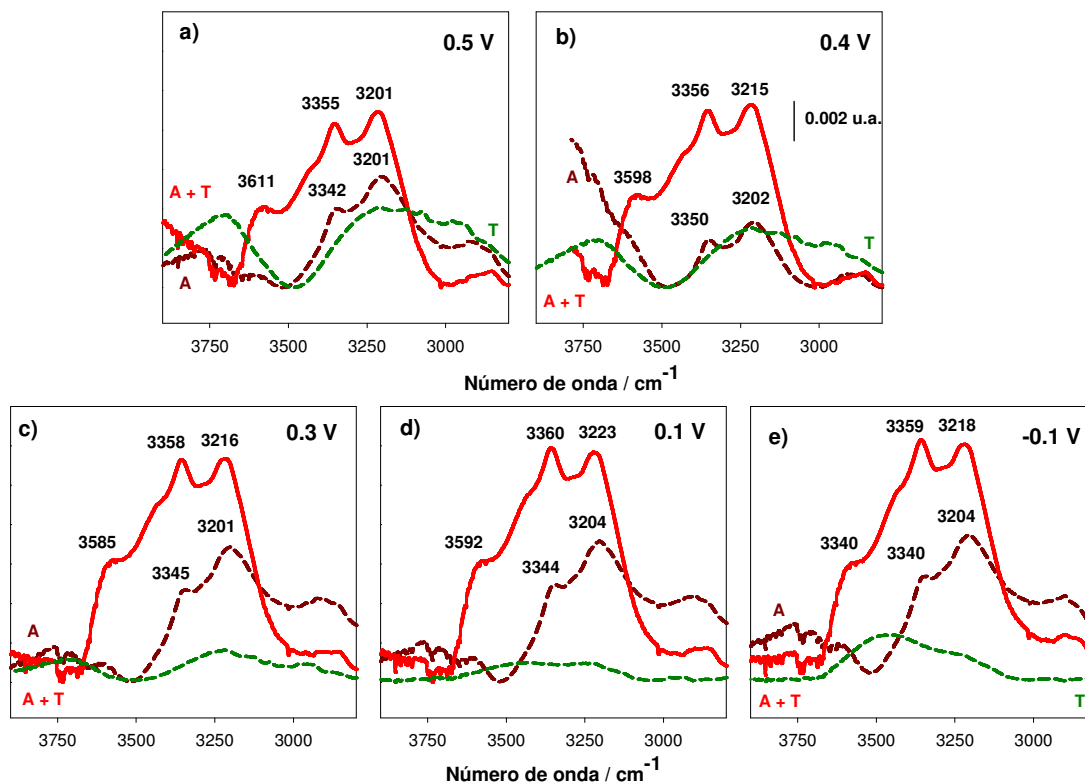
Además, los momentos dipolares de las transiciones asociadas a las bandas IRRAS analizadas de adenina en medios neutros a  $1640$  y  $1380\text{ cm}^{-1}$  están orientados dentro del plano molecular con una diferencia entre ellos de  $85^\circ$ .<sup>5</sup> Por tanto, si se supone que como consecuencia de la interacción con la timina  $\varphi^{1640}$  disminuye hasta adoptar la dirección próxima a la normal al electrodo el ángulo de rotación asociado a la otra banda de vibración,  $\varphi^{1380}$ , debe aumentar poniéndose más paralelo a la superficie del electrodo y contribuyendo negativamente al aumento de la intensidad integrada de la correspondiente banda IRRAS. Por tanto el aumento de las señales de adenina en presencia de timina en medios neutros sugiere un aumento del exceso superficial de adenina aunque no se puede descartar una reorientación de la molécula de adenina cuando está adsorbida en presencia de timina

No obstante, no se puede descartar que exista un cambio en la orientación de la adenina adsorbida sobre oro al añadirle timina. Aunque el hecho de que las dos señales ( $1640$  y  $1380\text{ cm}^{-1}$ ) sólo es compatible con un cambio en el ángulo de inclinación del plano molecular,  $\theta$ , que es común para todas las señales en el plano. Por otra parte cabe observar que el aumento de las señales a  $1640$  y  $1380\text{ cm}^{-1}$  tiene lugar no sólo a los potenciales a los que las dos bases están adsorbidas químicamente sino también a los potenciales a los que la timina está adsorbida físicamente, aunque el aumento de la intensidad es a pH ácidos y básicos es menor.

### **3.3.5.2. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 2800 a 3900 $\text{cm}^{-1}$ .**

Con el fin de completar el estudio espectroelectroquímico de la co-adsorción de adenina y timina se ha estudiado el comportamiento de las señales asociadas a las vibraciones de tensiones simétricas y asimétricas de  $\text{NH}_2$  de adenina en presencia de la base complementaria timina, así como la co-adsorción con el agua. En la figura 3.34 se

representa los espectros de ATR-SEIRA en disoluciones de H<sub>2</sub>O a pH 1 a distintos potenciales sobre películas nanoestructuradas de oro para el experimento comenzando por Adenina 0.01mM sobre la que se añade una concentración de Timina 1mM. Se incluyen también los espectros de ATR-SEIRA en disoluciones de timina 1 mM adsorbidas sobre electrodos de oro al mismo valor de pH aunque obtenidos en otro experimento.



**Fig. 3.34** Espectros de ATR-SEIRA en las regiones de 2800-3900 cm<sup>-1</sup> para disoluciones de adenina 0.01mM (- · - · -), adenina 0.01 mM y timina 1mM (—) adsorbidas sobre películas nanoestructuradas de oro en H<sub>2</sub>O a pH 1 y a los potenciales indicados. Los espectros están referidos al electrolito soporte al mismo valor de potencial.

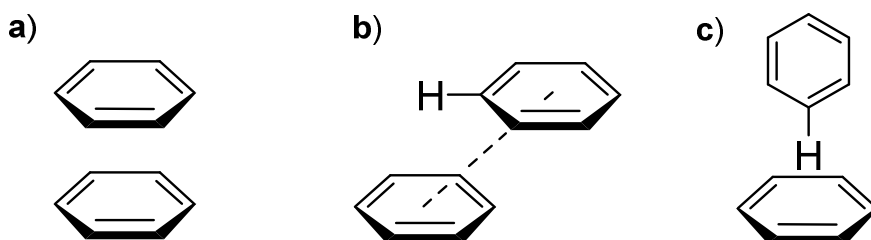
A pH 1 se observa cómo se describió en apartado 3.2.5.2 de este capítulo que la timina al adsorberse química mente desplaza a las moléculas de agua de la superficie.

Los espectros de ATR-SEIRAS de la adenina 0.01 mM de la figura 3.34 a pH presentan dos señales positivas en todo rango de potenciales a c.a 3345 y 3204 cm<sup>-1</sup> que se asignan a los modos normales de vibración asimétricos y simétricos del grupo amino.<sup>8,24</sup> Al adicionar timina 1mM a disoluciones que contenían adenina 0.01 mM adsorbida químicamente las señales asociadas con los modos normales de vibración simétricos y



asimétricos del grupo amino se desplazan hacia el azul c.a 13 y 15  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente y aparece una nueva señal como un hombro a 3590  $\text{cm}^{-1}$ . Esta señal es característica de  $\nu\text{OH}$  libre, de moléculas de agua co-adsorbidas.<sup>25,26</sup> Por tanto, como consecuencia del proceso de co-adsorción parece que la interfase se reorganiza permitiendo la entrada de más moléculas de agua. Finalmente el leve desplazamiento hacia el azul descarta la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno entre la timina y el grupo amino de la adenina, ya que, tal y como se ha descrito en la bibliografía, este tipo de interacción origina un desplazamiento hacia el rojo y en una extensión de aproximadamente 200  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>27</sup>

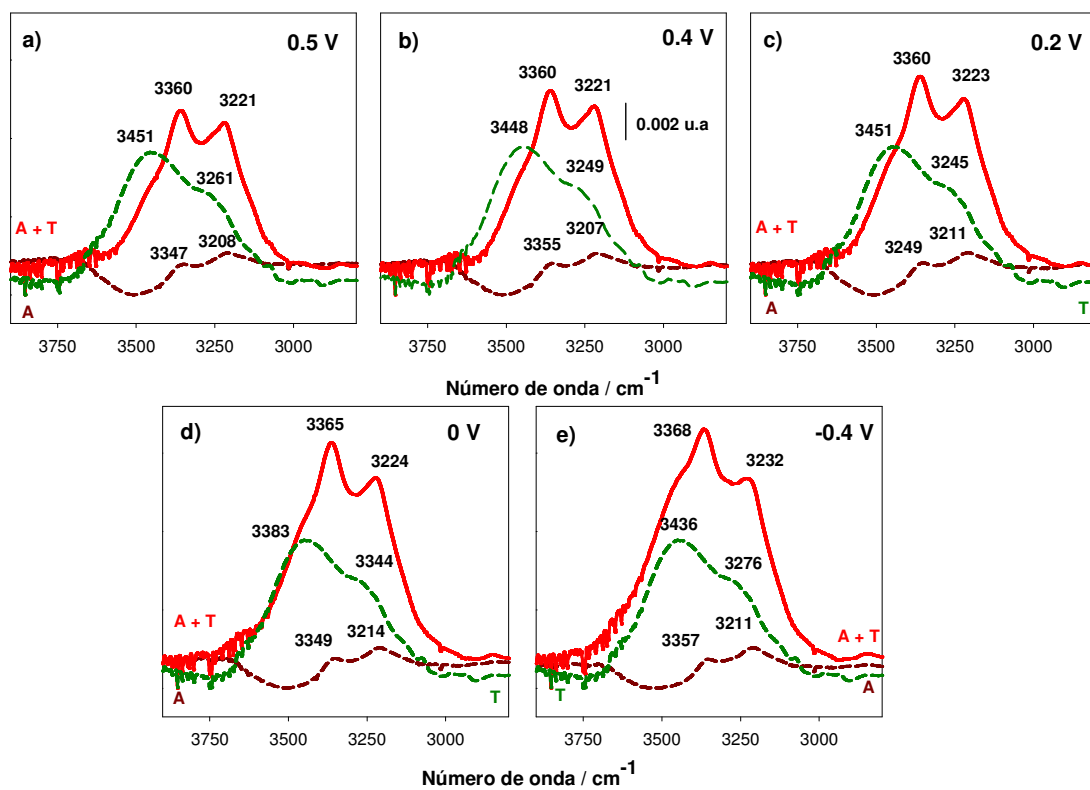
La asociación de las bases complementarias en la interfase puede deberse en gran medida al apilamiento de los anillos aromáticos ( $\pi$ -stacking) al igual que ocurre en el ADN.<sup>28-30</sup> Existen fundamentalmente tres tipos de interacción de tipo  $\pi$ -stacking (Fig. 34)<sup>31</sup> en función de la disposición relativa de los anillos aromáticos: eclipsados desplazados (a) la geometría face-to-face o de tipo sándwich; (b) desplazamiento paralelo y (c) edge-to-face o en forma de T



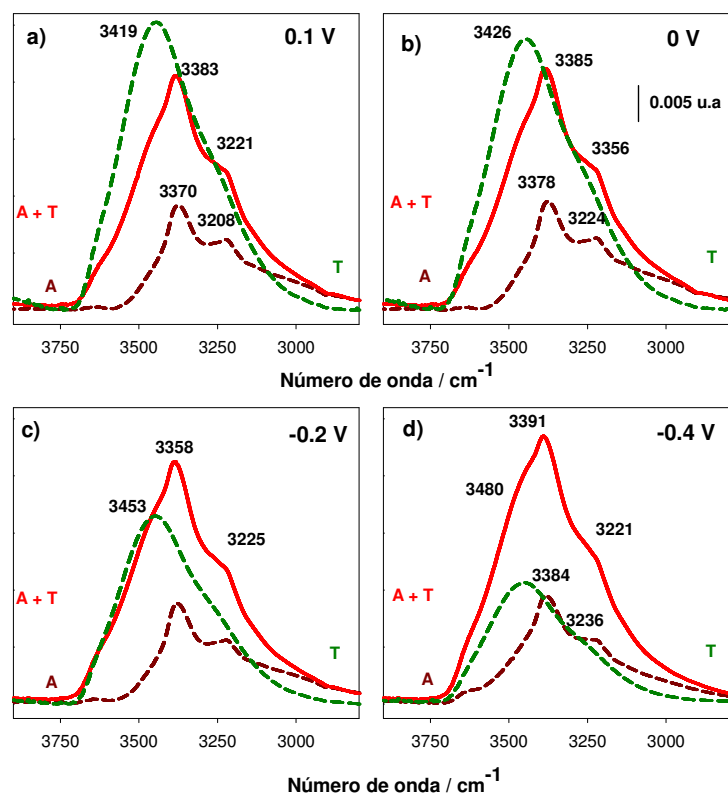
**Fig. 3.35** Posibles interacciones de tipo  $\pi$ -stacking entre anillos aromáticos

De acuerdo con los resultados espectroelectroquímicos obtenidos cuando ambas bases están en la interfase a pH 1 la timina parece adoptar una disposición paralela a la superficie del electrodo mientras que la adenina se sitúa perpendicularmente. Estos resultados sugieren la posibilidad de interacciones de tipo T-edge to face entre bases complementarias.

Se han realizado estudios similares a pH 7.5 y 11 que se muestran en las figuras 3.36 y 3.37. A ambos valores de pH se observan efectos similares en las señales de la región 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$  cuando las dos bases están co-adsorbidas a los observados a pH 1.



**Fig. 3.36** Espectros de ATR-SEIRA en las regiones de 2800-3900 cm<sup>-1</sup> para disoluciones de adenina 0.01mM (- · - · -), adenina 0.01 mM y timina 1mM (—) adsorbidas sobre películas nanoestructuradas de oro en H<sub>2</sub>O a pH 7.5 y a los potenciales indicados. Los espectros están referidos al electrolito soporte al mismo valor de potencial.



**Fig. 3.37** Espectros de ATR-SEIRA en las regiones de 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$  para disoluciones de adenina 0.01mM (- · - · -), adenina 0.01 mM y timina 1mM (—) adsorbidas sobre películas nanoestructuradas de oro en  $\text{H}_2\text{O}$  a pH 11 y a los potenciales indicados. Los espectros están referidos al electrolito soporte al mismo valor de potencial.

### 3.3.6. Conclusiones

Los resultados de transmisión de timina 10mM y adenina 10mM en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 1 en comparación con los espectros de las bases individuales han permitido concluir que en disoluciones acuosas la distinción de los puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias y/o entre cada una de las bases con el agua parece que resulta prácticamente imposible.

Sin embargo se han podido estudiar las interacciones entre la timina y la adenina adsorbidas sobre superficies de oro nanoestructuradas a pH 1, 7.5 y 11 por comparación de los espectros de ATR-SEIRAS de las bases co-adsorbidas con los espectros de las bases individuales en las mismas condiciones. El aumento de la intensidad de las señales de adenina 0.01mM en presencia de timina 1 mM parecen implicar cambios en la organización de las dos bases respecto a la superficie del electrodo. Además en medio neutro se ha encontrado que este aumento puede estar relacionado con un aumento un

aumento del exceso superficial de adenina aunque no se puede descartar un aumento de la inclinación del plano molecular de la adenina cuando está adsorbida en presencia de timina. Por otro lado la pérdida de las señales de timina 1 mM en presencia de adenina 0.01 mM se ha explicado como una reorientación de la molécula de timina en la que esta adopta una disposición más paralela respecto al electrodo. Esta disposición además podría favorecer la formación de puentes de hidrógeno ya que los átomos de timina implicados en esta interacción quedarían libres al no estar interaccionando con la superficie electródica. Sin embargo el análisis de las señales en la región 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  ha permitido confirmar que no existe interacción por puentes de hidrógeno entre el grupo amino de la adenina y la timina ya que las señales asociadas a los modos de vibración de  $\text{NH}_2$  mantienen su posición en presencia de timina.

Pero el hecho de que cantidades muy pequeñas de cada base (en el nivel de la submonocapa) induzca cambios significativos en los espectros de su base complementaria, incluso al adsorberse a partir de disoluciones a mayor concentración de la base complementaria sugiere que la co-adsorción de adenina y timina es un proceso cooperativo en el que se pueden ver implicados mecanismos de interacción de tipo dipolo-dipolo o  $\pi$ -stacking.

### 3.4 Bibliografía

1. Broomhead, J. M. The structures of pyrimidines and purines. IV. The crystal structure of guanine hydrochloride and its relation to that of adenine hydrochloride. *Acta Crystallogr.* **4**, 92–100 (1951).
2. Prado, C., Prieto, F., Rueda, M., Feliu, J. & Aldaz, A. Adenine adsorption on Au(1 1 1) and Au(1 0 0) electrodes: Characterisation, surface reconstruction effects and thermodynamic study. *Electrochim. Acta* **52**, 3168–3180 (2007).
3. Vaz-Domínguez, C. *et al.* Electrochemical STM study of the adsorption of adenine on Au(111) electrodes. *Electrochem. commun.* **35**, 61–64 (2013).
4. Rueda, M., Prieto, F., Rodes, A. & Delgado, J. M. In situ infrared study of adenine adsorption on gold electrodes in acid media. *Electrochim. Acta* **82**, 534–542 (2012).
5. Prieto, F., Su, Z., Leitch, J. J., Rueda, M. & Lipkowski, J. Quantitative Subtractively Normalized Interfacial Fourier Transform Infrared Reflection Spectroscopy Study of the Adsorption of Adenine on Au(111) Electrodes. *Langmuir* **32**, 3827–3835 (2016).
6. Álvarez-Malmagro, J., Prieto, F., Rueda, M. & Rodes, A. In situ Fourier transform infrared reflection absorption spectroscopy study of adenine adsorption on gold

- electrodes in basic media. *Electrochim. Acta* **140**, 476–481 (2014).
7. Prado, C., Navarro, I., Rueda, M. & Franc, H. Kinetics of condensation of adenine at the mercury electrolyte interface. *J. Electroanal. Chem.* **500**, 356–364 (2001).
  8. Giese, B. & McNaughton, D. Surface-enhanced Raman spectroscopic and density functional theory study of adenine adsorption to silver surfaces. *J. Phys. Chem. B* **106**, 101–112 (2002).
  9. Wierzchowski, K. L., Litońska, E. & Shugar, D. Infrared and ultraviolet studies on the tautomeric equilibria in aqueous medium between monoanionic species of uracil, thymine, 5-fluorouracil, and other 2,4-diketopyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4621–4629 (1965).
  10. Roelfs, B. *et al.* Adsorption of thymine on gold single-crystal electrodes. *J. Phys. Chem. B* **101**, 754–765 (1997).
  11. Haiss, W. *et al.* In-situ infrared spectroscopic studies of thymine adsorption on a Au(111) electrode. *J. Electroanal. Chem.* **454**, 107–113 (1998).
  12. Prieto, F., Alvarez-Malmagro, J., Rueda, M. & Orts, J. M. M. Tautomerism of adsorbed Thymine on gold electrodes: an in situ surface-enhanced infrared spectroscopy study. *Electrochim. Acta* **201**, 300–310 (2016).
  13. Irikura, K. K., Johnson, R. D. & Kacker, R. N. Uncertainties in scaling factors for ab initio vibrational frequencies. *J. Phys. Chem. A* **109**, 8430–8437 (2005).
  14. Chandra, A. K., Nguyen, M. T., Uchamaru, T. & Zeegers-Huyskens, T. Protonation and deprotonation enthalpies of guanine and adenine and implications for the structure and energy of their complexes with water: comparison with uracil, and Cytosine. *J. Phys. Chem. A* **103**, 8853–8860 (1999).
  15. Leś, A., Adamowicz, L., Nowak, M. J. & Lapinski, L. The infrared spectra of matrix isolated uracil and thymine: An assignment based on new theoretical calculations. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **48**, 1385–1395 (1992).
  16. Chandra, A. K., Nguyen, M. T. & Zeegers-Huyskens, T. Theoretical Study of the Interaction between Thymine and Water. Protonation and Deprotonation Enthalpies and Comparison with Uracil. *J. Phys. Chem. A F. Full J. TitleJournal Phys. Chem. A* **102**, 6010–6016 (1998).
  17. Zamlynyy, V. & Lipkowski, J. in *Advances in Electrochemical Science and Engineering* (eds. Alkire, R. C., Kolb, D. M., Lipkowski, J. & Ross, P.) 315–376 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006). doi:10.1002/9783527616817.ch9
  18. Rueda, M., Prieto, F., Álvarez-malmagro, J. & Rodes, A. Electrochemistry Communications Evidences of adenine – thymine Interactions at gold electrodes interfaces as provided by in-situ infrared spectroscopy. *Electrochem. commun.* **35**, 53–56 (2013).

19. Rueda, M., Prieto, F., Rodes, A. & Manuel, J. The Influence of pH on the Adsorption of Adenine on Gold Electrodes : An In Situ Infrared Spectroscopy Study. **111**, 41012 (2009).
20. Camargo, a. P. M., Baumgärtel, H. & Donner, C. Coadsorption of the DNA bases thymine and adenine at the Au(111) electrode. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**, 1657–1664 (2003).
21. Aamouche, A. *et al.* Neutron Inelastic Scattering, Optical Spectroscopies, and Scaled Quantum Mechanical Force Fields for Analyzing the Vibrational Dynamics of Pyrimidine Nucleic Acid Bases. 2. Thymine. *J. Phys. Chem. A* **101**, 1808–1817 (1997).
22. Ten, G. N., Burova, T. G. & Baranov, V. I. Analysis of hydrogen bonds by the IR spectra of thymine and N1,N3-deuteriothymine. *J. Appl. Spectrosc.* **72**, 104–110 (2005).
23. Granatum, P. U. & Unicaceae, P. ( P , P ) 1. **92**, 1935–1941 (2005).
24. Higuchi, S. & Tsuboi, M. Infra-red absorption spectra of the single crystals of 1-methylthymine , 9-methyladenine and their 1 : 1 complex Preparation of the single crystals P2x / c P21 / c The thin sections used for the infra-red absorption measurements were prepared. **23**, (1967).
25. Ataka, K., Yotsuyanagi, T. & Osawa, M. Potential-Dependent Reorientation of Water Molecules at an Electrode/Electrolyte Interface Studied by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **100**, 10664–10672 (1996).
26. Ataka, K. & Osawa, M. In Situ Infrared Study of Water–Sulfate Coadsorption on Gold(111) in Sulfuric Acid Solutions. *Langmuir* **14**, 951–959 (1998).
27. Srinivasadesikan, V., Sahu, P. K. & Lee, S.-L. Spectroscopic probe on N–H□N, N–H□O and controversial C–H□O contact in A–T base pair: A DFT study. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **120**, 542–547 (2014).
28. Lamoureux, J. S., Maynes, J. T. & Glover, J. N. Recognition of 5'-YpG-3' sequences by coupled stacking/hydrogen bonding interactions with amino acid residues. *J Mol Biol.* **335**, 399–408 (2004).
29. Wintjens, R., Liévin, J., Rooman, M. & Buisine, E. Contribution of cation-pi interactions to the stability of protein-DNA complexes. *J. Mol. Biol.* **302**, 395–410 (2000).
30. Buisine, E., Rooman, M. & Lie, J. Cation – p / H-bond Stair Motifs at Protein – DNA Interfaces. *Online* **2836**, 67–76 (2002).
31. Salonen, L. M., Ellermann, M. & Diederich, F. F. Aromatic rings in chemical and biological recognition: Energetics and structures. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 4808–4842 (2011).

---

**Capítulo 4**

**Estudio Cinético de la Adsorción de la Adenina sobre  
Electrodos de Au(111) mediante Espectroscopía  
Electroquímica de Impedancias**

---

## 4.1 Introducción

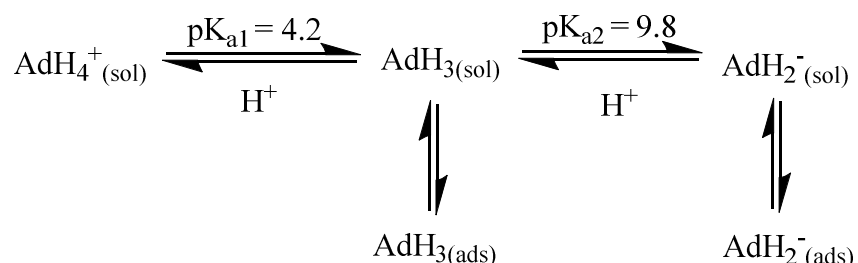
En trabajos previos a esta Tesis se abordó el estudio de la cinética de adsorción de adenina sobre electrodos monocristalinos de oro Au(111) en disoluciones de NaF 0.5 M, mediante la aplicación de la Espectroscopía Electroquímica de Impedancias (EIS).<sup>1</sup> Mediante esta técnica es posible estudiar procesos en la superficie de los electrodos que suceden en escalas de tiempo cortas, como es el caso de los procesos de adsorción/desorción, mediante la selección adecuada de las frecuencias de la perturbación. Además, la naturaleza compleja de la impedancia permite separar distintas contribuciones a la impedancia del electrodo mediante el análisis de las componentes real e imaginaria de la impedancia o de la admitancia.<sup>2</sup> Para el estudio previo de la adsorción de adenina sobre Au(111) en medio neutro se empleó un procedimiento experimental diseñado para evitar la influencia de la reconstrucción/pérdida de la reconstrucción superficial inducida por el potencial en la dispersión de la impedancia con la frecuencia. Los resultados se analizaron conforme a un modelo basado en el que originalmente desarrollaron Frumkin y Melik-Gaykazyan<sup>3</sup>, que sólo era aplicable en los dos casos límite de control puro por difusión o por activación y, además, suponiendo una dependencia con el potencial del tipo Butler-Volmer para la constante de velocidad de adsorción y una isoterma de adsorción de Langmuir. Este modelo original fue ampliado, primero por Berzins y Delahay<sup>4</sup> y posteriormente por Pajkossy<sup>5</sup>, de forma que permite analizar situaciones con control cinético mixto y, además, no es necesario realizar ninguna suposición “a priori” sobre la dependencia de las constantes de velocidad con el potencial o sobre la isoterma de adsorción aplicable.

El análisis de los datos de EIS conforme al citado modelo permitió explicar la dependencia con la frecuencia a cada potencial. De los parámetros obtenidos del análisis con la frecuencia se calcularon los tiempos de relajación de las etapas de difusión y de adsorción, además de la velocidad específica del proceso de adsorción. Con estos datos se concluyó que el control cinético en las condiciones experimentales estudiadas era mixto, aunque con una mayor contribución de la difusión. Además, se pudo calcular la velocidad específica de la etapa de adsorción en función del potencial.

Los estudios espectro-electroquímicos posteriores, algunos de ellos incluidos anteriormente en este manuscrito,<sup>6,7</sup> permitieron deducir, como se muestra en la figura 4.1, que en medio neutro la especie adsorbida es la adenina neutra ( $AdH_3$ ), la misma



que está presente en disolución, mientras que en medio ácido la especie presente en disolución es la forma protonada ( $AdH_4^+$ ) pero la especie que se adsorbe es la neutra. Por otra parte, en disoluciones básicas la forma aniónica de la adenina ( $AdH_2^-$ ) es la forma presente, tanto en disolución como en estado adsorbido.



**Fig. 4.1** Adsorción de la adenina con distintos grados de protonación sobre electrodos de Au(111)

Esta influencia del pH en el equilibrio de adsorción de la adenina sobre electrodos de oro debe verse reflejada en cambios importantes en los aspectos cinéticos del proceso. Por una parte, en medio básico es una especie distinta, con carga negativa, la que se adsorbe químicamente en comparación con el medio neutro. Por otra parte, en medio ácido la adsorción química de la adenina debe ir acompañada de la desprotonación de la adenina catiónica, que es la especie presente en disolución, lo que supone la existencia de una etapa adicional al proceso de adsorción considerado en medio neutro.

En este capítulo se describe el estudio realizado mediante EIS de la cinética de adsorción de adenina sobre electrodos monocristalinos de Au(111) en disoluciones ácidas y básicas, y su comparación con los resultados previamente obtenidos en medio neutro. Las medidas se han realizado siguiendo el procedimiento empleado anteriormente para evitar la interferencia de los fenómenos de reconstrucción/pérdida de reconstrucción superficial inducidos por el potencial.<sup>1</sup> Para el análisis de los resultados en medio ácido se han deducido las ecuaciones de impedancia correspondientes a un proceso de adsorción con una etapa química previa acoplada, para dar cuenta de la etapa de desprotonación de la adenina catiónica  $AdH_4^+$ . Las ecuaciones de la impedancia electroquímica muestran, en principio, una dependencia con la frecuencia diferente a las ecuaciones correspondientes a un proceso de adsorción elemental, sin etapas químicas acopladas, empleadas para el análisis de los datos obtenidos en medio neutro y básico.<sup>1</sup> Se encuentran dos casos límite, de altas y de bajas frecuencias respectivamente, en los que la dependencia con la frecuencia es la misma que para un proceso de adsorción elemental, pero el significado de los parámetros independientes de la frecuencia es

diferente en el caso límite de bajas frecuencias. Los datos obtenidos en medio ácido se analizan conforme a este caso límite, y los resultados se comparan a los tres valores de pH. Los resultados obtenidos han dado lugar a dos publicaciones.<sup>8,9</sup>

## 4.2. Teoría: Espectroscopía Electroquímica de Impedancias para un Proceso de Adsorción con una Etapa Química Previa Acoplada.

El proceso de adsorción de una especie química “A”, que se forma por transformación previa de una especie B, presente en disolución pero que no es susceptible de adsorberse, puede representarse como:

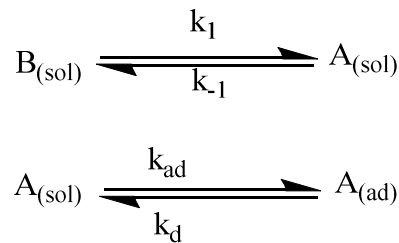


Fig. 4.2 Representación de un proceso de adsorción con una etapa química previa.

Donde  $k_1$  y  $k_{-1}$  son las constantes de velocidad en sentido directo e inverso de la etapa química previa, y  $k_{ad}$  y  $k_d$  las constantes de velocidad de adsorción y de desorción de A, respectivamente. La velocidad de la etapa de adsorción se puede formular de la misma manera que en el caso de una adsorción elemental, sin etapa previa:<sup>10,11</sup>

$$v_{ad} = \frac{d\Gamma_A}{dt} = k_{ad}f_{ad}(\Gamma_A)c_{A,x=0} - k_d f_d(\Gamma_A) \quad (1)$$

donde  $c_{A,x=0}$  es la concentración volumétrica de la especie A, justo en la superficie del electrodo,  $\Gamma_A$  es el exceso superficial de A, y  $f_{ad}(\Gamma_A)$  y  $f_d(\Gamma_A)$  son dos funciones monótonas del exceso superficial. Cuando el recubrimiento tiende a la unidad,  $f_{ad}$  y  $f_d$  tienden a 0 y a 1, respectivamente, y a la inversa cuando el recubrimiento tiende a 0.

La impedancia de adsorción,  $Z_{ad}$ , se define como la relación entre los cambios del potencial,  $\Delta E$ , y de la densidad de corriente,  $\Delta I_{ad}$ , debida a la adsorción, expresado en el dominio de Laplace:

$$Z_{ad} = \frac{\overline{\Delta E}}{\Delta I_{ad}} \quad (2)$$

donde la densidad de corriente se define como:

$$I_{ad} = \left( \frac{\partial \sigma^M}{\partial \Gamma_A} \right)_E \frac{d\Gamma_A}{dt} = \left( \frac{\partial \sigma^M}{\partial \Gamma_A} \right) v_{ad} \quad (3)$$

Con  $\sigma^M$  siendo la densidad de carga sobre el metal.

La velocidad de adsorción,  $v_{ad} = v_{ad}(\Gamma_A, c_A, E)$ , es una función de tres variables independientes: el exceso superficial, la concentración de la especie A (en  $x=0$ ) y el potencial aplicado. Por tanto, el cambio en la velocidad de adsorción,  $\Delta v_{ad}$ , ante una perturbación de pequeña amplitud se puede expresar en función de los cambios de tres variables,  $\Delta E$ ,  $\Delta \Gamma$  y  $\Delta c_{A,x=0}$ , que en el dominio de Laplace se expresa como:

$$\mathcal{L}(\Delta v_{ad}) = \overline{\Delta \partial v_{ad}} = \left( \frac{v_{ad}}{\partial E} \right)_{\Gamma_A, c_A} \overline{\Delta E} + \left( \frac{v_{ad}}{\partial \Gamma_A} \right)_{E, c_A} \overline{\Delta \Gamma_A} + \left( \frac{v_{ad}}{\partial c_A} \right)_{\Gamma_A, c_A} \overline{\Delta c_A} \quad (4)$$

$\Delta c_{A,x=0}$  se ve afectado por la presencia de la etapa química previa. Esta situación es similar a la que se encuentra frecuentemente en procesos de transferencia electrónica faradaica con etapas químicas previas acopladas, denominados como mecanismos CE. La aplicación de la segunda ley de Fick para las especies A y B incluye el balance debido a la etapa química. En el caso de considerar difusión lineal:

$$\frac{\partial c_B}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_B}{\partial x^2} - k_1 c_B + k_{-1} c_A \quad (5a)$$

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_A}{\partial x^2} - k_1 c_B - k_{-1} c_A \quad (5b)$$

D es el coeficiente de difusión común para A y B. Las ecuaciones (5) se pueden transformar con los cambios de variables:

$$c_P = c_B + c_A \quad (6a)$$

$$c_Q = k_C c_B - c_A \quad (6b)$$

Así que:

$$\frac{\partial c_P}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_P}{\partial x^2} \quad (7a)$$

$$\frac{\partial c_Q}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_Q}{\partial x^2} - k_C c_Q \quad (7b)$$

Que en el dominio de Laplace se convierten en:

$$s\bar{c}_P - c_{P,t=0} = \frac{\partial^2 \bar{c}_P}{\partial x^2} \quad (8a)$$

$$s\bar{c}_Q - c_{Q,t=0} = \frac{\partial^2 \bar{c}_Q}{\partial x^2} - k_C \bar{c}_Q \quad (8b)$$

Donde  $s = i \cdot \omega$  es la variable transformada,  $i = (-1)^{\frac{1}{2}}$  es la unidad compleja y  $\omega$  es la frecuencia angular.

Las condiciones de contorno iniciales para las ecuaciones anteriores son:

$$c_{P,t=0} = c_P^* \text{ (concentración total de } c_A^* + c_B^* \text{ en el seno de la disolución y } c_{Q,t=0} = 0.$$

Teniendo en cuenta estas condiciones iniciales es posible obtener las soluciones generales para las ecuaciones (8a) y (8b):

$$\bar{c}_P = P_1 \exp \left[ \left( \frac{s}{D} \right)^{\frac{1}{2}} x \right] + P_2 \exp \left[ - \left( \frac{s}{D} \right)^{\frac{1}{2}} x \right] + \frac{c_P^*}{s} \quad (9a)$$

$$\bar{c}_Q = Q_1 \exp \left[ \left( \frac{s+k_C}{D} \right)^{\frac{1}{2}} x \right] + Q_2 \exp \left[ - \left( \frac{s+k_C}{D} \right)^{\frac{1}{2}} x \right] \quad (9b)$$

Las constantes de integración  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $Q_1$  y  $Q_2$  se obtienen de las condiciones en el seno de la disolución (suponiendo difusión semiinfinita) y en la superficie:

$$x = \infty \left\{ \begin{array}{l} c_P = c_P^* \rightarrow P_1 = 0 \\ c_Q = 0 \rightarrow Q_1 = 0 \end{array} \right\}$$

$$x = 0 \left\{ \begin{array}{l} \left( \frac{\partial \bar{c}_P}{\partial x} \right)_{x=0} = \left( \frac{\partial \bar{c}_A}{\partial x} \right)_{x=0} = \bar{v}_{ad} \rightarrow P_2 = -\bar{v}_{ad} \left( \frac{s}{D} \right)^{-\frac{1}{2}} \\ \left( \frac{\partial \bar{c}_Q}{\partial x} \right)_{x=0} - \left( \frac{\partial \bar{c}_A}{\partial x} \right)_{x=0} = -\bar{v}_{ad} \rightarrow Q_2 = \bar{v}_{ad} \left( \frac{s+k_C}{D} \right)^{-\frac{1}{2}} \end{array} \right\}$$

Por tanto, las soluciones particulares se convierten en:

$$\bar{c}_{P(x=0)} = -\bar{v}_{ad} \left( \frac{s}{D} \right)^{-\frac{1}{2}} + c_P^* \quad (10a)$$

$$\bar{c}_{Q(x=0)} = \bar{v}_{ad} \left( \frac{s+k_C}{D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (10b)$$

Deshaciendo el cambio de variables es posible obtener la expresión para  $\overline{\Delta c_{A,x=0}}$ :

$$\overline{\Delta c_{A(x=0)}} = -\overline{\Delta v_{ad}} \left[ \frac{K_1}{K_1+1} \left( \frac{s}{D} \right)^{-\frac{1}{2}} + \frac{1}{K_1+1} \left( \frac{s+k_c}{D} \right)^{-\frac{1}{2}} \right] \quad (11)$$

con  $K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}}$  siendo la constante de equilibrio de la etapa química.

Por otro lado, la transformación de Laplace de la ecuación (1) proporciona la relación entre  $\overline{\Delta \Gamma_A}$  y  $\Delta v_{ad}$ :

$$\overline{\Delta \Gamma_A} = s^{-1} \overline{\Delta v_{ad}} \quad (12)$$

Así la sustitución de las ecuaciones (11) y (12) en la ecuación (4) permite derivar la expresión para la impedancia de adsorción de la ecuación (2), como:

$$Z_{ad} = R_{ad} + \sigma_{ad} G(s) + (C_{ad}s)^{-1} \quad (13)$$

Donde  $R_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  y  $C_{ad}$  son parámetros independientes de la frecuencia, denominados resistencia de adsorción, coeficiente de Warburg de adsorción y capacidad de adsorción, respectivamente, y cuyo significado viene expresado por las siguientes ecuaciones:

$$R_{ad}^{-1} = \left( \frac{\partial \sigma^M}{\partial \Gamma_A} \right)_E \left( \frac{\partial v_{ad}}{\partial E} \right)_{\Gamma_A, C_A} \quad (14a)$$

$$\sigma_{ad} = R_{ad} \left( \frac{\partial v_{ad}}{\partial c_A} \right)_{\Gamma_A, E} \quad (14b)$$

$$C_{ad}^{-1} = R_{ad} \left( \frac{\partial v_{ad}}{\partial \Gamma_A} \right)_{C_A, E} \quad (14c)$$

La función G(s) viene dada por la ecuación:

$$G(s) = \left[ \frac{K_1}{K_1+1} s^{-\frac{1}{2}} + \frac{1}{K_1+1} (s + k_c)^{-\frac{1}{2}} \right] \quad (15)$$

Esta expresión para  $G(s)$  tiene la misma dependencia con la frecuencia que la denominada impedancia Gerischer,<sup>12,13</sup> deducida para el proceso de transferencia de un electrón acoplado con una etapa química previa homogénea. La variación de G(s) con la frecuencia depende del valor relativo de  $k_c$  en comparación con los valores de la frecuencia (incluida en s). En el caso de un proceso de adsorción sin etapa química previa, G(s) es directamente proporcional a  $s^{1/2}$ .

La impedancia interfacial incluye, además, la impedancia correspondiente al proceso de la carga de la doble capa, a exceso superficial constante, caracterizado por una corriente capacitativa,  $I_{dl}$ , dada por:

$$I_{dl} = \left( \frac{\partial \sigma^M}{\partial E} \right)_{\Gamma_A} \frac{dE}{dt} = C_{dl, \Gamma_A} \frac{dE}{dt} \quad (16)$$

La densidad de corriente de la doble capa es aditiva a la densidad de corriente de adsorción, así que la impedancia de la doble capa  $Z_{dl}$ , se puede deducir fácilmente de la ecuación (16):

$$Z_{dl} = (C_{dl, \Gamma_A} s)^{-1} \quad (17)$$

La combinación en paralelo de las impedancias de adsorción y de doble capa proporciona la impedancia electródica o interfacial:

$$Z_{el} = \{ [R_{ad} + \sigma_{ad} G(s) + (C_{ad} s)^{-1}]^{-1} + C_{dl, \Gamma_A} s \}^{-1} \quad (18)$$

La ecuación (18) es la expresión general para la impedancia interfacial de un proceso de adsorción acoplado a una etapa química previa.

La ecuación deducida para el proceso de adsorción en ausencia de etapa química acoplada se puede obtener de la expresión general haciendo  $G(s) = s^{-1/2}$ :

$$Z_{el} = \{ [R_{ad} + \sigma_{ad} s^{-1/2} + (C_{ad} s)^{-1}]^{-1} + C_{dl, \Gamma_A} s \}^{-1} \quad (19)$$

Esta situación se puede obtener a partir de la más general, ecuación (18), en el caso de que la constante de equilibrio de la etapa química es muy alta  $K_1 \gg 1$ . Naturalmente se trata de un caso trivial en el que el equilibrio químico previo estaría desplazado hacia la obtención de A en disolución.

A parte de este caso trivial se pueden distinguir dos casos límites dependiendo de los valores relativos de  $s$  y de  $k_c$  en los que la influencia de la frecuencia en la impedancia de adsorción es idéntica a la influencia de la frecuencia para la impedancia de adsorción de un proceso de adsorción sin etapa química previa.

En el límite de altas frecuencias que se aplica si  $s \gg k_c$  la función  $G(s)$  se simplifica a  $s^{-\frac{1}{2}}$ . Por tanto, la impedancia de adsorción tiene la misma dependencia con la frecuencia que presente en ausencia de la etapa química previa:

$$(Z_{ad})^{HF} = R_{ad} + \sigma_{ad}s^{-\frac{1}{2}} + (C_{ad}s)^{-1} \quad (20)$$

En el límite de bajas frecuencias, cuando  $s \ll k_c$ , es posible simplificar la expresión de  $G(s)$ , de forma que la expresión de la impedancia de adsorción queda como:

$$(Z_{ad})^{LF} = R_{ad} + \sigma_{ad} \frac{k_c^{-\frac{1}{2}}}{K_1+1} + \sigma_{ad} \frac{K_1}{K_1+1} + (C_{ad}s)^{-1} \quad (21)$$

Esta ecuación proporciona la misma dependencia con la frecuencia que la ecuación 20 pero con valores aparentes para el coeficiente de Warburg y la resistencia de adsorción. El coeficiente de Warburg aparente incluye el coeficiente de Warburg verdadero y la constante de equilibrio de la etapa química:

$$\sigma_{ad}^{app} = \sigma_{ad} \frac{K_1}{K_1 + 1} \quad (22a)$$

La resistencia de adsorción aparente incluye, además de la resistencia de adsorción verdadera, las constantes de equilibrio y de velocidad de la etapa química de acuerdo con:

$$R_{ad}^{app} = R_{ad} + \sigma_{ad} \frac{k_c^{-\frac{1}{2}}}{K_1+1} \quad (22b)$$

## 4.3 Experimental

### 4.3.1 Reactivos células y electrodos

Se prepararon disoluciones de electrolito a distintos valores de pH utilizando como reactivos  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{NaF}$  y  $\text{NaOH}$  (ultrapura) y como disolvente agua ultrapura obtenida mediante un sistema purificador (Elgastat y MilliQ).

Se han realizado medidas de impedancia en función de la frecuencia y del potencial de continua usando un electrodo de  $\text{Au}(111)$  en disoluciones de adenina (Sigma-Aldrich®) de concentración 1 mM en los diferentes electrolitos soporte. La concentración de trabajo de adenina se consiguió por adición de la cantidad adecuada de

una disolución stock 10 mM. Las disoluciones se desoxigenaron con argón de alta pureza durante 20 minutos y después se mantuvo la presión de gas por encima de la disolución mientras se realizaban las medidas.

Las demás condiciones de pureza de las disoluciones, de tratamiento del electrodo de trabajo, electrodo auxiliar y electrodo de referencia (Hg/Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) fueron las mismas que las descritas en el capítulo 2.

#### **4.3.1 Procedimiento experimental**

Las medidas electroquímicas se realizaron con un sistema electroquímico multifuncional (IviumStat), de Ivium Technologies equipado con un analizador de respuesta de frecuencia. Como la adsorción de la adenina induce la pérdida de la reconstrucción de la superficie del electrodo de Au(111) obtenida durante el tratamiento a la llama<sup>14</sup> antes de cada media de impedancia se realizó un barrido anódico a 10 mV/s hasta un potencial mayor que el correspondiente a la adsorción química de la adenina a cada valor de pH ( $E_{cto}$ ) y se mantuvo a ese valor de potencial durante un tiempo largo (5 minutos) para garantizar la pérdida de la reconstrucción de la superficie electródica. La impedancia a cada potencial se midió a frecuencias que varían desde 20 a 7500 Hz por aplicación de una sola perturbación de corriente alterna con una amplitud de 10mV. El tiempo de equilibrio a cada uno de los potenciales fue de 1s, que como ya se había estudiado en el Grupo al realizar el análisis termodinámico de la adsorción en medio neutro<sup>14</sup> era tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de adsorción pero insuficiente para que a los potenciales más negativos tenga lugar la formación de dominios reconstruidos de la superficie del electrodo de oro de forma significativa. Los valores de impedancia en función de la frecuencia a cada potencial se obtuvieron por dos procedimientos diferentes en relación a la secuencia de perturbaciones de potencial aplicada sobre el electrodo, esquematizados en la figura 3.

1. Procedimiento acumulado: Este procedimiento se basa en medir la impedancia de la célula a potenciales de continua que se modifican en dos series secuenciales en direcciones opuestas. Así primero se realizó el barrido hacia potenciales inferiores y a continuación hacia potenciales más altos intercalando los potenciales. Este procedimiento permite comprobar si la reconstrucción



electroquímica de la superficie electródica de Au(111) que tiene lugar a bajos valores de potenciales afecta en las medidas de impedancia. (Fig. 1a), dado que el posible efecto se iría acumulando durante las medidas realizadas a potenciales bajos.

2. Procedimiento de *punto a punto*: la impedancia se mide igualmente en dos series intercaladas de potencial a lo largo de la onda de adsorción de la adenina a cada valor de pH, salvo que antes de aplicar cada potencial de medida ( $E_{\text{medida}}$ ), se le aplica al electrodo un pre-tatamiento, en el que se mantiene durante 60s un potencial alto, al cual la adenina se adsorbe químicamente y en el que se garantiza la naturaleza no reconstruida de la superficie del electrodo (Potencial de contacto,  $E_{\text{cto}}$ ). El ciclo de pasos  $E_{\text{medida}}/E_{\text{cto}}$  se repite para cada frecuencia hasta que se ha medido el espectro total de impedancia a cada potencial de medida. (Fig. 4.3b)

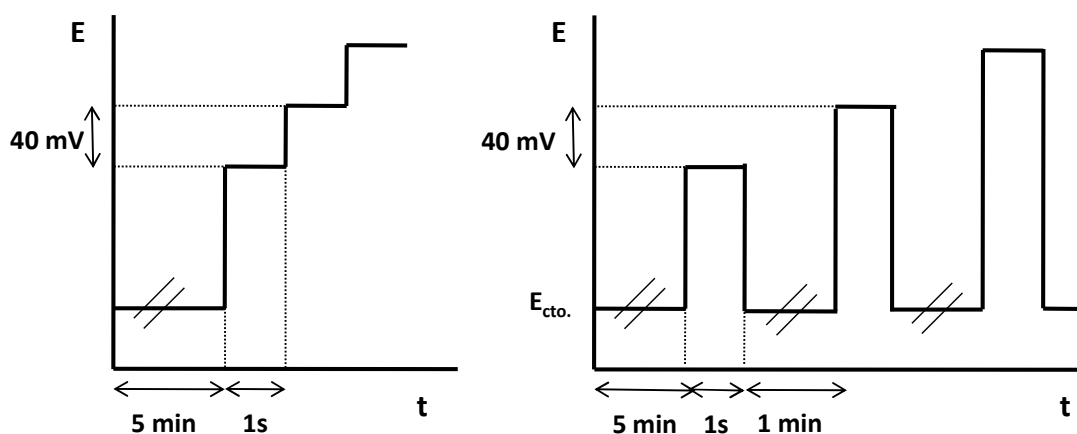


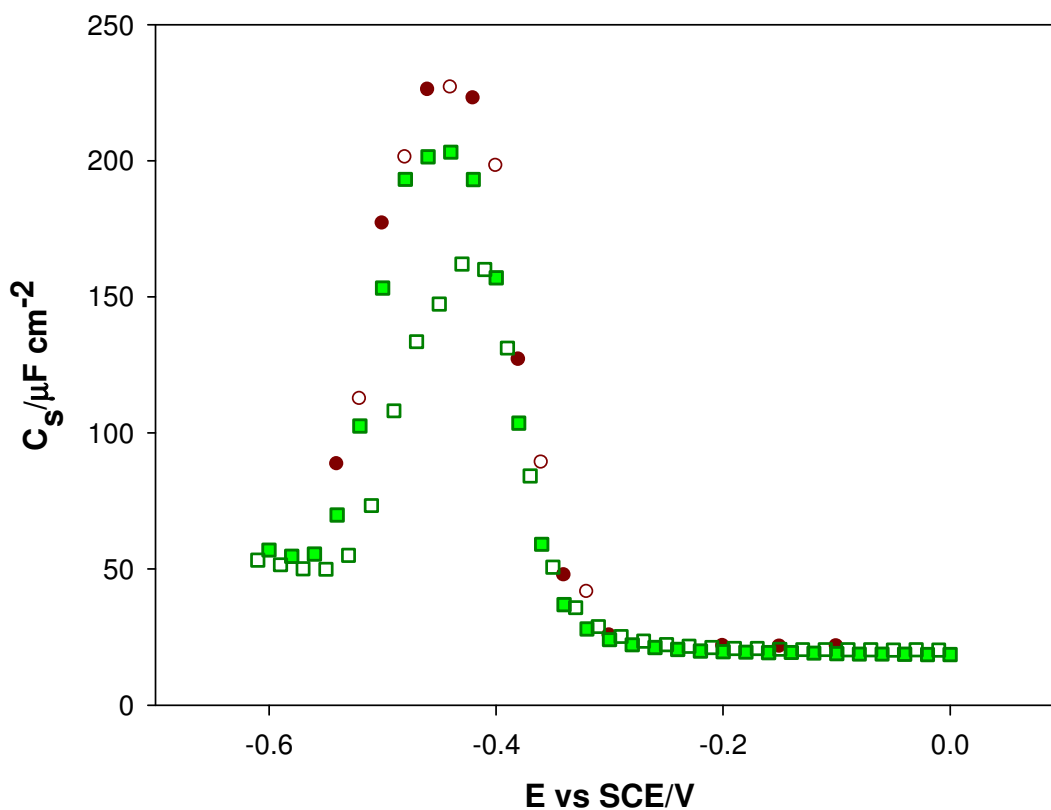
Fig. 4.3 Perturbaciones de potencial de continua en función del tiempo empleados en las medidas de EIS según los procedimientos: a) acumulado y b) *punto a punto*

## 4.4 Resultados

### 4.4.1. Curvas de pseudocapacidad frente al potencial

La figura 4 representa los valores de pseudocapacidad,  $C_s = (\omega Z'' )^{-1}$  a 30Hz, frente al potencial obtenidos experimentalmente para la adosrción de adenina 1mM en medio básico utilizando el procedimiento de potenciales acumulados y el de *punto a punto*.

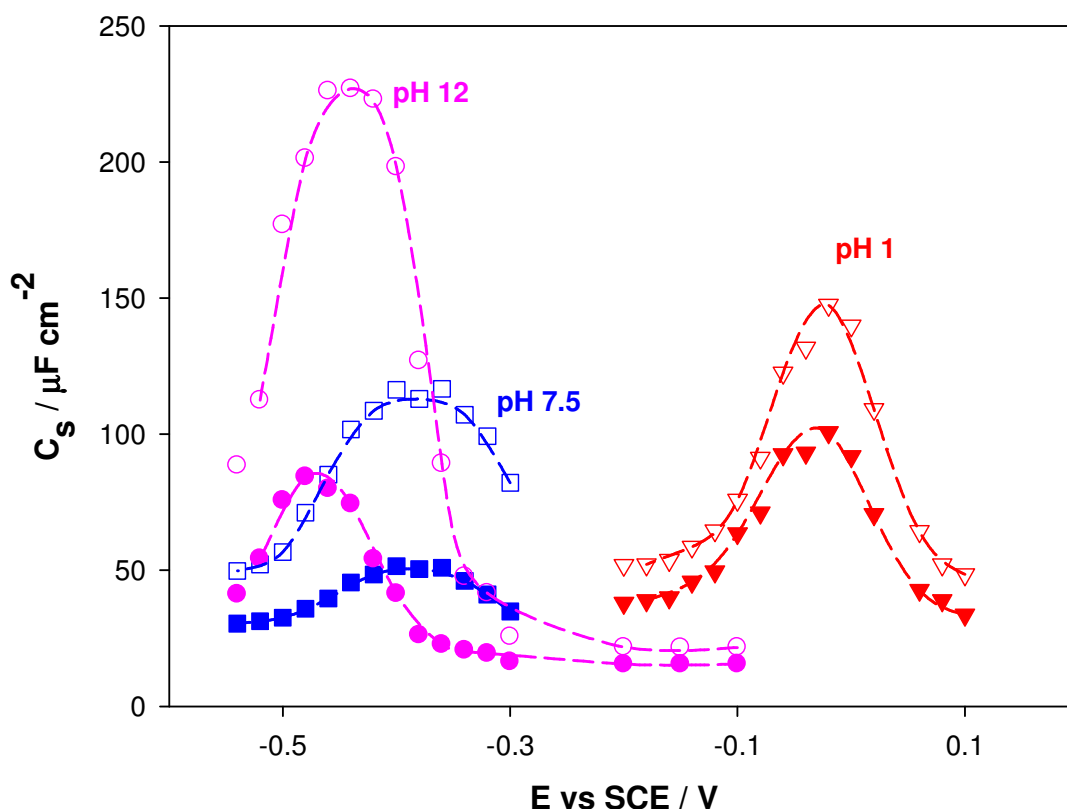
Las curvas  $C_s$  frente a  $E$  en la figura 4.4 son coincidentes a potenciales mayores de  $-0.4\text{V}_{\text{vs SCE}}$ , sin embargo presentan diferencias marcadas a potenciales menores dependiendo del procedimiento de medida que se utilice. El procedimiento de *punto a punto* proporciona una excelente intercalación entre los datos obtenidos en dos barridos consecutivos en direcciones opuestas, confirmando que el pre-tratamiento al potencial de contacto,  $E_{\text{cto}}$ , garantiza la superficie no-reconstruida del electrodo, antes de cada medida de impedancia. Sin embargo, los valores de  $C_s$  obtenidos con el procedimiento acumulado claramente se desvían de las gráficas obtenidas con el procedimiento de *punto a punto* a los potenciales alrededor del máximo de la curva y muestra una clara histéresis entre los barridos en el sentido de los potenciales altos y en el sentido de los potenciales bajos.



**Fig. 4.4** Curvas  $C_s$  vs  $E$  medidas a 30 Hz para un electrodo de Au(111) en contacto con una disolución de Adenina 1mM en NaOH/ NaF 0.3 M a pH 12 empleando diferentes procedimientos de medidas; *punto a punto* desde  $-0.1\text{ V}$  hasta  $-0.54\text{V}_{\text{vs SCE}}$  con  $E_{\text{cto}} = 0\text{V}_{\text{vs SCE}}$  (círculos rellenos) y la vuelta desde  $-0.52\text{ V}_{\text{vs SCE}}$  hasta  $-0.32\text{ V}_{\text{vs SCE}}$  (círculos huecos). Procedimientos de acumulados desde  $0\text{V}_{\text{vs SCE}}$  hasta  $-0.6\text{V}$  (cuadros rellenos) y la vuelta desde  $-0.58\text{V}_{\text{vs SCE}}$  hasta  $-0.02\text{V}_{\text{vs SCE}}$  (cuadros huecos)

Esto sugiere que la reconstrucción electroquímica tiene lugar mientras se barre hacia la región de potenciales negativos durante la medida. El mismo efecto se ha encontrado a los otros valores de pH investigados. Por lo tanto, todos los resultados mostrados de aquí en adelante han sido realizados por el método de *punto a punto*.

La influencia del pH en las curvas de pseudocapacidad frente al potencial obtenido a dos valores de frecuencias (30 y 938 Hz) se muestra en la figura 5 para una concentración de adenina 1mM en disolución. Se observa que el máximo de pseudocapacidad se desplaza desde -0.02 V hasta -0.38 V<sub>vs</sub> SCE cuando el pH se modifica desde 1 hasta 7.5. A pH 12 el máximo de  $C_s$  se desplaza solamente 0.06 V<sub>vs</sub> SCE, con respecto al de pH 7,5 (hasta -0.44 V<sub>vs</sub> SCE).



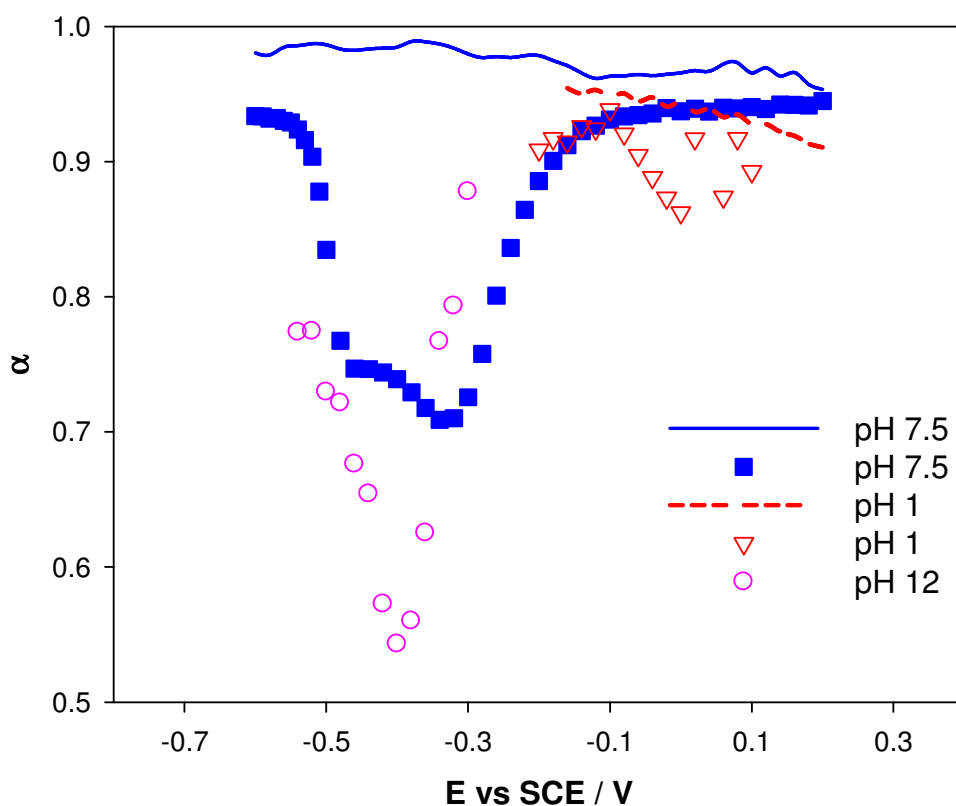
**Fig. 4.5** Curvas  $C_s$  vs  $E$  medidas a 30 Hz (símbolos huecos) y 998 Hz (símbolos rellenos) con el procedimiento *punto a punto* en dos series intercaladas de potenciales para la adsorción de adenina 1mM sobre electrodos de Au(111) en disoluciones a pH 1 (triángulos), pH= 7.5 (cuadrados) y pH=12 (círculos)

En la figura 4.5 también se puede observar una clara dependencia de  $C_s$  con la frecuencia a los potenciales alrededor del máximo. Al aumentar la frecuencia los valores de capacidad del pico disminuyen y el máximo se desplaza ligeramente hacia

potenciales menores. Sin embargo a valores de potencial mayores que el inicio de la adsorción de la adenina la dependencia de la pseudocapacidad con la frecuencia es insignificante.

Esta dispersión de la pseudocapacidad con la frecuencia, que implica una desviación del comportamiento de un circuito RC, se puede cuantificar utilizando un elemento constante de fase (CPE), que tiene un valor de impedancia de  $Z_{CPE} = (Qi\omega)^{-\alpha}$  donde  $Q$  y  $\alpha$  (que toma valores de 0 a 1) son parámetros independientes de la frecuencia. Para un comportamiento del tipo RC ideal el parámetro  $\alpha$  del CPE toma un valor de 1. El CPE tradicionalmente se atribuye a las rugosidades superficiales, heterogeneidades o los procesos faradaicos debidos a las impurezas.

En la figura 4.6 se representan los valores de  $\alpha$  obtenidos a diferentes valores de pH frente al potencial. Se puede observar que  $\alpha$  claramente se desvía del valor de 1 en la región de potenciales correspondientes al pico de capacidad. El valor más bajo de  $\alpha$  se obtiene a pH 12.



**Fig. 4.6** Representación gráfica de los valores del parámetro  $\alpha$  del CPE en función del potencial para la adsorción de adenina 1mM sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a los valores de pH indicados (símbolos). Los resultados para el electrolito soporte (líneas) se incluye para la comparación.

Por el contrario a potenciales menores a los del pico de capacidad o a cualquier potencial en ausencia de adenina los valores que se obtienen para  $\alpha$  están próximos a 1, por lo que la dispersión de la capacidad con la frecuencia en estas condiciones se puede despreciar. Solamente los valores de  $\alpha$  obtenidos en ausencia de adenina en medio ácido son algo más bajos (alrededor de 0.9) a los potenciales superiores a los del pico de adsorción de la adenina, probablemente debido a la adsorción específica de los aniones del electrolito soporte a los potenciales altos, pero las diferencias en los valores de  $\alpha$  son aún significativas en presencia de adenina. Estos hechos y la homogeneidad de la superficie del electrodo de Au(111) permite descartar que la dispersión de la frecuencia esté causada por rugosidad o heterogeneidad. Por otra parte, el procedimiento *punto a punto* evita las interferencias debidas a los fenómenos de reconstrucción / pérdida de la reconstrucción inducidos por el potencial. Además, debido a las estrictas condiciones de limpieza no debe ocurrir ningún proceso faradaico en las condiciones experimentales. Por lo tanto, la dispersión de la capacidad con la frecuencia debe ser atribuida a los efectos cinéticos del proceso de adsorción de adenina, así que se han analizado los datos de impedancia para el proceso de adsorción de la adenina en concordancia con el modelo cinético de adsorción.

#### 4.4.2 Análisis en función de la frecuencia

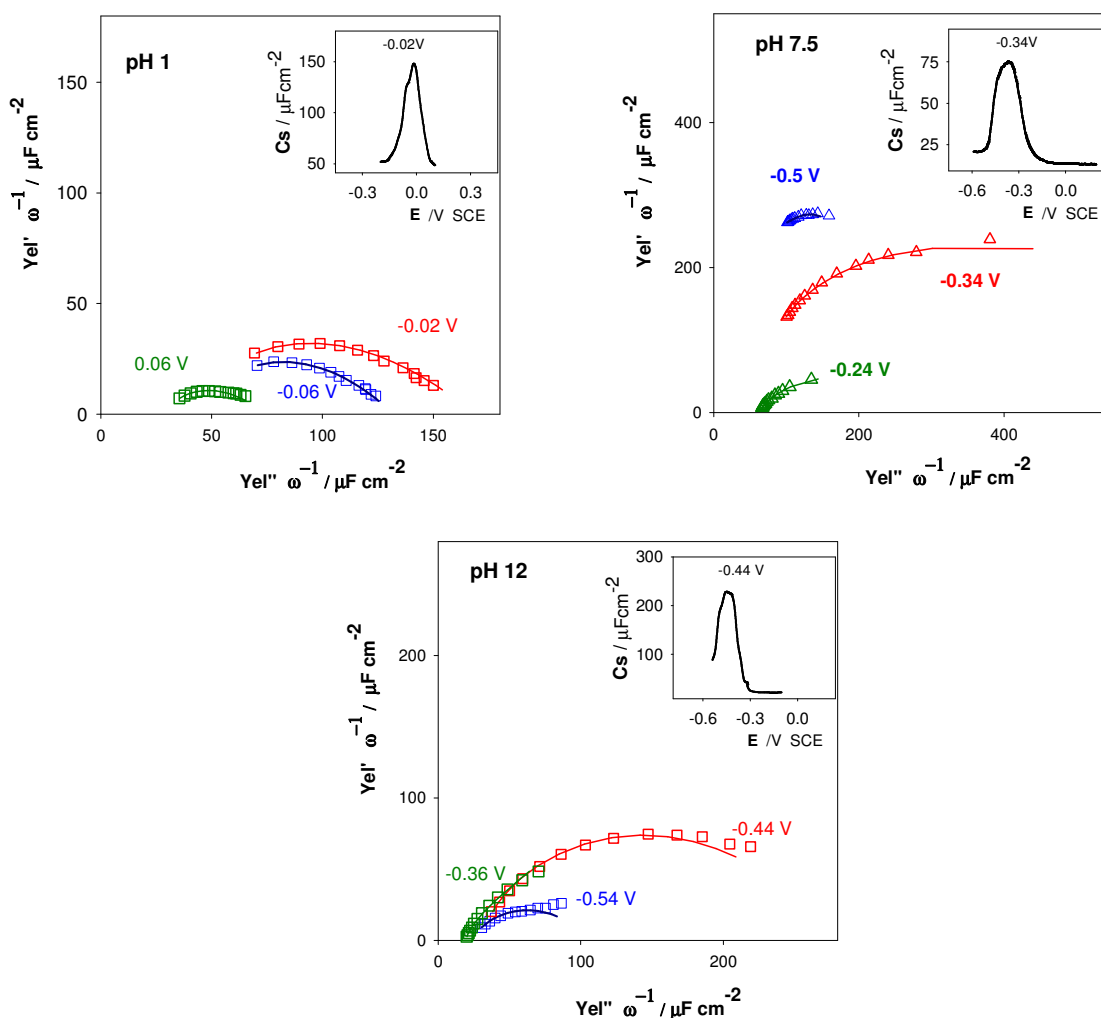
La impedancia interfacial se puede obtener restando a la impedancia de la célula medida experimentalmente,  $Z_{cel}$ , el valor de la resistencia óhmica del electrolito,  $R_s$ , que se obtiene a cada potencial del valor de la componente real de la impedancia de la célula a altas frecuencias. El comportamiento de la admitancia interfacial,  $Y_{el}$ , con la frecuencia es más sensible que el comportamiento de la impedancia a los valores de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la adsorción.

$$Y_{el} = \frac{1}{Z_{cel} - R_s} = C_{dl,r} i\omega + \left[ R_{ad} + \sigma_{ad} (i\omega)^{-\frac{1}{2}} + (C_{ad} i\omega)^{-1} \right]^{-1} \quad (23)$$

Los diagramas de Nyquist de las componentes real e imaginaria de la admitancia normalizada frente a la frecuencia,  $\frac{Y'_{el}}{\omega}$  vs  $\frac{Y''_{el}}{\omega}$ , donde  $Y'_{el}$  e  $Y''_{el}$  son las componentes real e imaginaria de la admitancia, respectivamente, proporcionan una visión global sobre el

control cinético del proceso de adsorción: para un control puramente cinético por activación de la adsorción este diagrama es un arco de semicírculo perfecto con el centro situado sobre el eje de abscisas. Si el control es puramente por el proceso de difusión el arco de semicírculo esta achatado, con su centro por debajo del eje de abscisas. Finalmente para un control mixto, por adsorción y difusión, se obtiene un arco de semicírculo deformado.<sup>1,15,16</sup>

En la figura 4.7 se representan los diagramas de Nyquist a tres valores de pH diferentes para la adsorción de adenina sobre electrodos de Au(111).



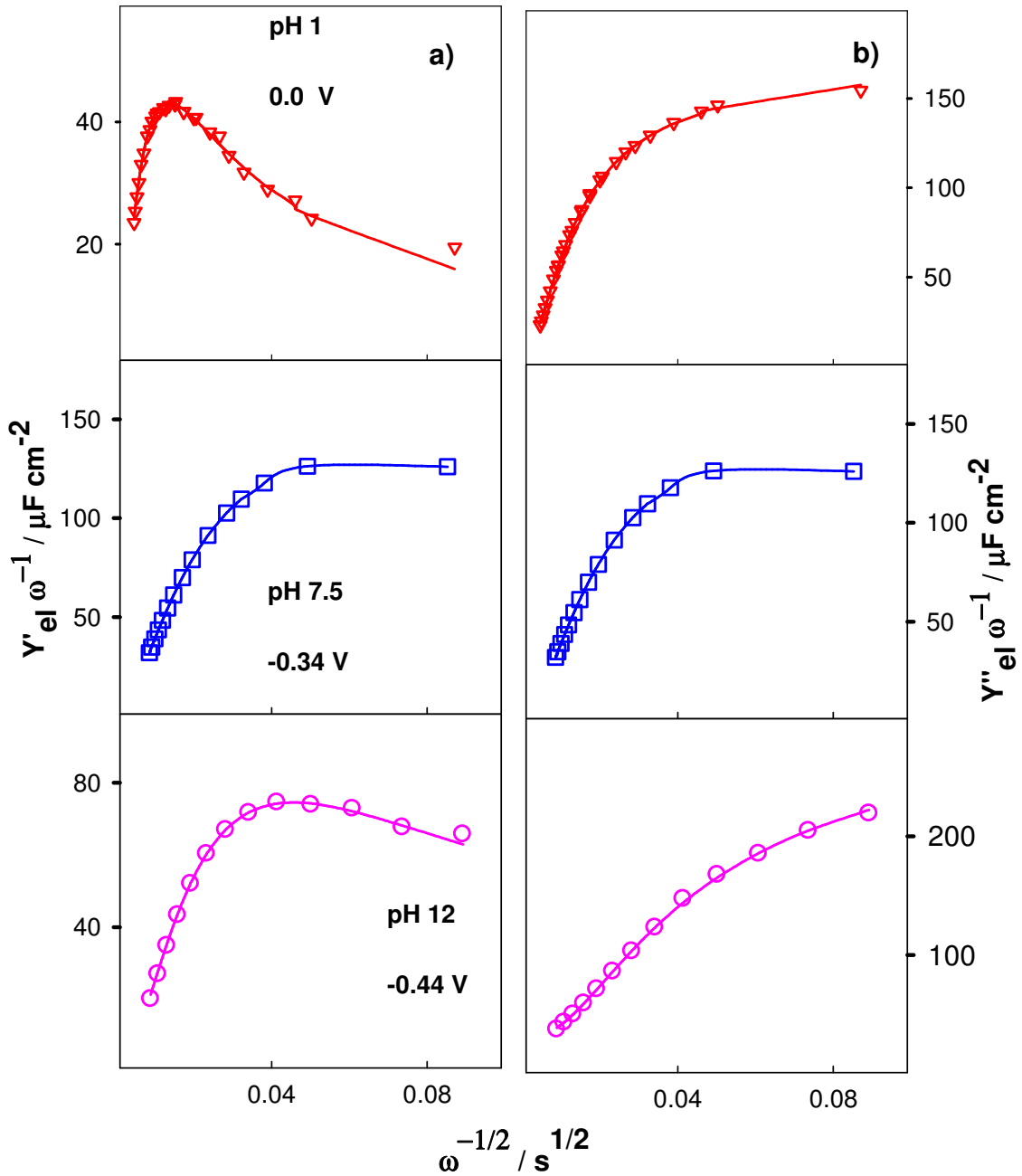
**Fig. 4.7.-** Diagramas de Nyquist para la adsorción de adenina 1mM sobre electrodos de Au(111) a los valores de pH y potenciales indicados. Se incluyen también a cada pH las correspondientes curvas de pseudo-capacidad a 30 Hz frente al potencial obtenidas en las mismas condiciones. Las líneas continuas corresponden con los datos teóricos calculados a partir del análisis con la frecuencia.

Los arcos en la figura 4.7 son achatados, aunque parcialmente deformados. Esto sugiere que el control cinético por difusión domina el proceso en lugar del proceso de adsorción por activación. Además, la longitud de los arcos para el mismo rango de frecuencia aumenta cuando el potencial del espectro está más cerca del pico de capacidad.

El análisis con la frecuencia de la impedancia experimental (o admitancia) de acuerdo con la ecuación (23) debe proporcionar los valores de cuatro parámetros independientes de la frecuencia,  $C_{dl,\Gamma}$ ,  $R_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  y  $C_{ad}$ . Una de las ventajas de usar la admitancia electródica normalizada de la frecuencia en lugar de la impedancia es que la componente real de la admitancia electródica no depende del parámetro  $C_{dl,\Gamma}$ . Se ha comprobado que la dependencia con la frecuencia de la componente real de la función  $\frac{Y_{el}'}{\omega}$  proporciona mayor información cinética que  $\frac{Y_{el}''}{\omega}$ . Por ejemplo las gráficas de  $\frac{Y_{el}'}{\omega}$  frente a  $\omega^{1/2}$ , como las mostradas en la figura 4.8, son muy sensibles a las variaciones de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la adsorción, incluyendo la posible etapa química previa.<sup>9</sup> Además la correspondiente función imaginaria,  $\frac{Y_{el}''}{\omega}$ , proporciona el valor de  $C_{dl,\Gamma}$  por extrapolación a altas frecuencias y el valor de  $C_{dl,\Gamma} + C_{ad}$  a las frecuencias más bajas. Por lo tanto, la combinación de ambos límites de frecuencias proporciona un buen valor inicial de  $C_{ad}$  para ser utilizado en el ajuste de la parte real de la admitancia electródica normalizada. Por tanto, el ajuste por regresión de las curvas experimentales  $\frac{Y_{el}'}{\omega}$  vs  $\omega^{1/2}$  conforme a las ecuaciones teóricas suele proporcionar con precisión los tres parámetros de adsorción,  $R_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  y  $C_{ad}$ .

Los valores de estos tres parámetros obtenidos se utilizan como valores iniciales para el ajuste de la componente imaginaria de la función  $\frac{Y_{el}''}{\omega}$  vs  $\omega^{1/2}$  con las correspondientes ecuaciones teóricas para obtener también el valor del parámetro  $C_{dl,\Gamma}$ , además de los otros tres parámetros. Las diferencias entre los valores de los tres parámetros que se obtienen de los ajustes de las componentes reales e imaginarias de las funciones están dentro de la desviación estándar para cada parámetro obtenido. Finalmente, el análisis simultáneo de cuatro parámetros ajustables para las dos componentes de la admitancia electródica normalizada de la frecuencia, usando como valores iniciales los valores obtenidos previamente en el análisis por separado para cada componente, proporciona una excelente concordancia entre las curvas experimentales y las curvas generadas

usando los parámetros obtenidos del análisis con la frecuencia, como se puede comprobar en las figuras 4.8.

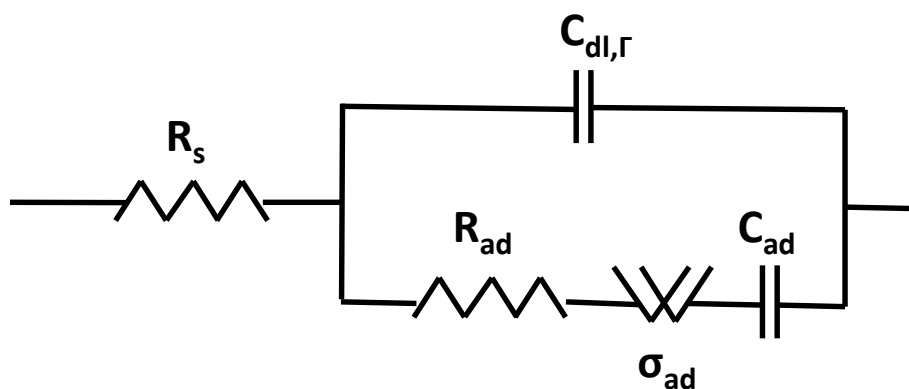


**Fig. 4.8.-** Representación de a)  $\frac{Y''_{el}}{\omega}$  vs  $\omega^{1/2}$  y b)  $\frac{Y''_{el}}{\omega}$  vs  $\omega^{1/2}$  a los valores de pH y potenciales indicados.

Los símbolos representan las gráficas experimentales y las líneas las teóricas generadas con los parámetros obtenidos del análisis con la frecuencia.

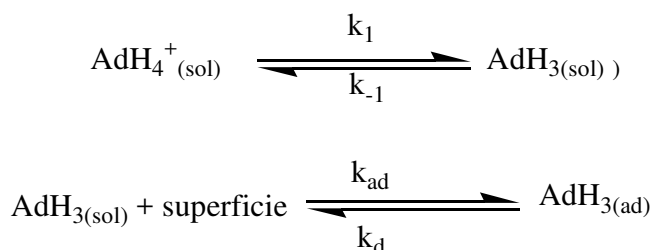


Cabe destacar que los espectros de impedancia obtenidos a todos los valores de pH, incluido pH 1, se han podido explicar con las ecuaciones correspondientes a un proceso de adsorción en ausencia de etapa química previa, que implican una dependencia con la frecuencia idéntica a la del circuito representado en la figura 4.9.



**Fig. 4.9** Circuito eléctrico equivalente de una célula electroquímica en el que tiene lugar un proceso de adsorción sin etapa química previa.

Las ecuaciones generales de impedancia o admitancia para un modelo que incluye una reacción de desprotonación que precede a la etapa de adsorción no proporcionan la misma dependencia con la frecuencia que la del circuito anterior.<sup>9</sup> Sin embargo, los resultados espectro-electroquímicos previos<sup>6</sup> sugieren la existencia de una desprotonación previa, como se representa en el figura 4.10.



**Fig. 4.10** Proceso de adsorción de la adenina sobre electrodos de Au(111) en medio ácido.

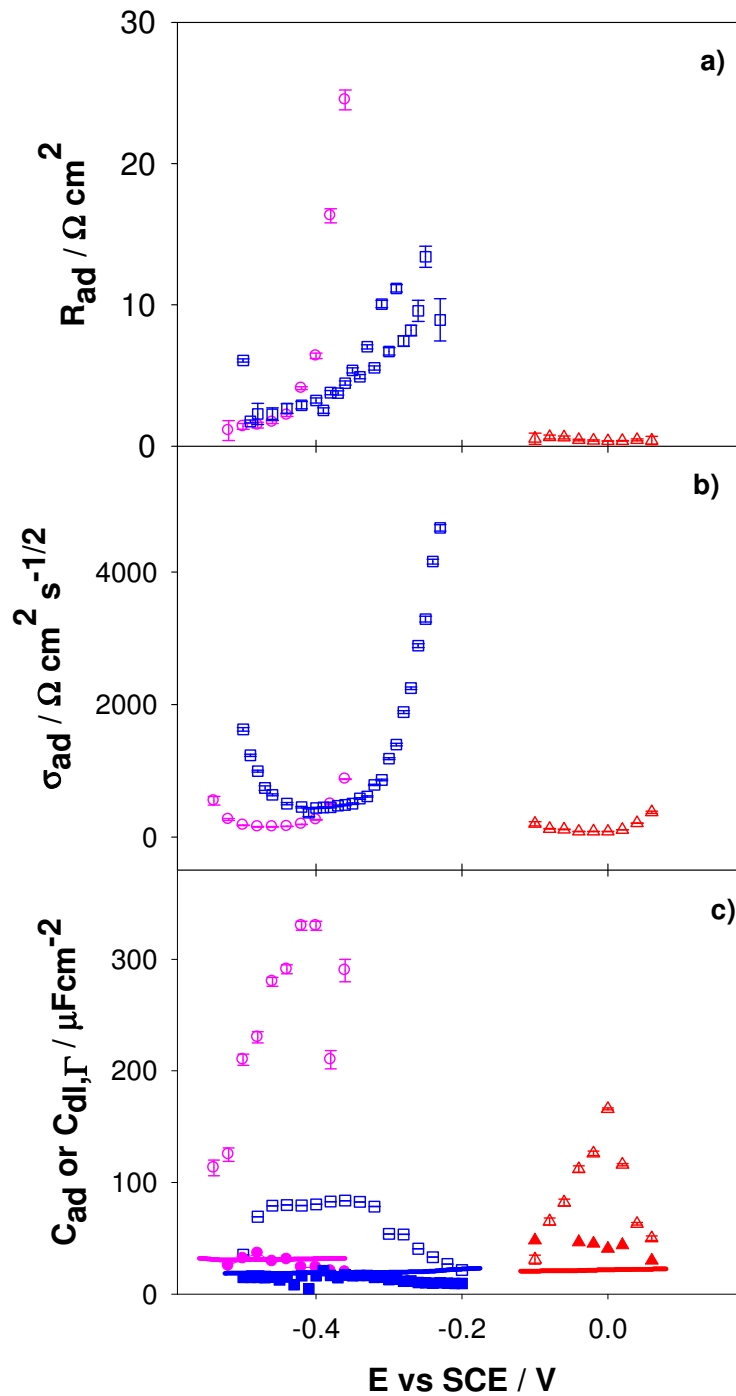
Es necesario indicar que la constante de velocidad inversa de la etapa química,  $k_{-1}$ , incluye en su expresión la concentración de protones, que a pH 1 se puede suponer constante dado que es mucho mayor que la concentración de adenina. De esta forma serán aplicables las ecuaciones de impedancia deducidas anteriormente para un proceso de adsorción con una etapa química previa de primer orden en ambos sentidos, sustituyendo las constantes de velocidad total y de equilibrio verdaderas,  $k_c$  y  $K_1$ , por

sus correspondientes valores aparentes,  $k'_c$  y  $K'_1$ , que incluyen la concentraciones de iones  $H^+$ . Teniendo en cuenta que la dependencia de los resultados de impedancia electródica con la frecuencia es del mismo tipo que el correspondiente a un proceso de adsorción sin etapa química previa, ecuación (19), se plantea la hipótesis de que el sistema se encuentre en alguno de los dos casos límite incluidos en el modelo general de la ecuación (18). Cabe esperar que el paso de protonación/desprotonación sea rápido, con valores de constante de velocidad en el orden de las frecuencias de las vibraciones moleculares ( $10^{12}$ - $10^{14}$  s<sup>-1</sup>), por lo que dado el rango de frecuencias utilizado en nuestras medidas es razonable suponer que el límite de bajas frecuencias de la ecuación de impedancia sea aplicable la adsorción de adenina sobre Au(111) en medio ácido. De esta forma el coeficiente de Warburg de adsorción obtenido del análisis de los datos a pH 1 debe considerarse como un coeficiente de Warburg “aparente”, puesto que incluye la constante de equilibrio de la etapa química de acuerdo con la ecuación (22a). Por otra parte, el valor aparente de  $R_{ad}$  obtenido puede considerarse coincidente con el verdadero, pues el segundo sumando de la ecuación (22b) debe ser despreciable, dado el alto valor esperable para la constante de velocidad total,  $k_c$ .

## 4.5 Discusión

Los valores para los cuatro parámetros independientes de la frecuencia ( $R_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  o  $\sigma_{ad}^{ap}$ ,  $C_{ad}$  y  $C_{dl,\Gamma}$ ) obtenidos del análisis con la frecuencia se representan en función del potencial en las figuras 4.9 a-c. Se observa como  $R_{ad}$  y  $\sigma_{ad}$  presentan un mínimo mientras que  $C_{ad}$  presenta un máximo a potenciales alrededor del máximo de adsorción de la adenina.

Las representaciones gráficas de  $C_{dl,\Gamma}$  frente al potencial en medio neutro y básico a los potenciales inferiores a los del pico de adsorción de adenina son casi coincidentes con las del electrolito soporte en las mismas condiciones y se hacen ligeramente inferiores a potenciales superiores, donde la adenina se encuentra adsorbida. En medio ácido las diferencias con el electrolito en ausencia de adenina son algo mayores, pero no son significativas en vista de la menor precisión del análisis con la frecuencia (la dispersión de la frecuencia de los datos de impedancia es menor). Por lo que los valores calculados de  $C_{dl,\Gamma}$  pueden considerarse próximos a la pseudocapacidad del electrolito soporte.



**Fig. 4.11** Representación de a)  $R_{ad}$  vs  $E$  b)  $\sigma_{ad}$  vs  $E$  y c)  $C_{ad}$  (símbolos huecos) y  $C_{dl,\Gamma}$  (símbolos rellenos) vs  $E$  obtenidos del análisis con la frecuencia de acuerdo con la ecuación 4 para la adsorción de adenina 1mM sobre Au(111) en disoluciones a pH 1 (triángulos), pH 7.5 (cuadrados) y pH 12 (círculos). En la gráfica c) se incluye la pseudocapacidad obtenida para el electrolito soporte (líneas). En la figura 11b los valores representados a pH 1 corresponden a  $\sigma_{ad}^{ap}$ . Las barras de error se han estimado de la desviación estándar obtenida del proceso de ajuste.

La comparación de las representaciones de  $R_{ad}$ ,  $C_{ad}$  y  $\sigma_{ad}$  en función del potencial a pH 12 y 7.5 muestran un ligero desplazamiento a pH 12 hacia potenciales inferiores de aproximadamente 60 mV para 4.5 unidades de pH. Esta variación con el pH podría atribuirse en principio a una naturaleza diferente de las especies adsorbidas a cada valor de pH, siendo la forma neutra la predominante a pH 7.5 y la aniónica desprotonada la predominante a pH 12. En ambas condiciones se obtienen valores mínimos de  $R_{ad}$  similares, lo que sugiere contribuciones cinéticas parecidas. Por el contrario, se observan diferencias significativas en los valores del mínimo de  $\sigma_{ad}$  y del máximo de  $C_{ad}$ . A pH 12  $\sigma_{ad}$  es menor mientras que  $C_{ad}$  es mayor que a pH 7.5. De acuerdo con sus definiciones en las ecuaciones (14b) y (14c) ambos parámetros incluyen las derivadas parciales  $\left(\frac{\partial \sigma^M}{\partial \Gamma}\right)_E$  y  $\left(\frac{\partial \Gamma}{\partial E}\right)_c$  o sus inversas en el caso de  $\sigma_{ad}$ . Se puede esperar que ambos factores dependan de la naturaleza de la molécula de adsorbato, especialmente si las diferencias entre los adsorbatos a pH 12 y pH 7.5 implican o no un cambio en la carga neta de la molécula. En consecuencia, estas diferencias en los parámetros obtenidos a pH 12 y pH 7.5 están en concordancia con los resultados espectroelectroquímicos previos descritos en el capítulo 3 de esta tesis, que sugerían que a pH 12 se adsorbe la especie aniónica mientras que a pH 7.5 lo hace la forma neutra.

Respecto a los datos a pH 1 las representaciones de  $R_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  y  $C_{ad}$  frente al potencial se desplazan aproximadamente 350mV hacia potenciales mayores, al compararlo con las mismas representaciones a pH 7.5. Este desplazamiento está de acuerdo con que el proceso de adsorción implica la desprotonación de la especie catiónica,  $AH_4^+$ , en disolución. Por otro lado los valores de  $R_{ad}$  y  $\sigma_{ad}^{ap}$  obtenidos a pH 1 son menores que los obtenidos a pH 7.5.

Teniendo en cuenta que a ambos valores de pH la especie que se adsorbe es la forma neutra, como muestran los experimentos IRRAS,<sup>6</sup> se esperaría que los parámetros termodinámicos de adsorción/desorción fueran equivalentes. Por tanto el valor mínimo para el coeficiente de Warburg verdadero definido en la ecuación (14b) se puede considerar igual a ambos valores de pH. Con esta suposición y a partir de los valores del mínimo para  $\sigma_{ad}$  y  $\sigma_{ad}^{ap}$  obtenidos a pH 7.5 y 1 respectivamente es posible estimar el valor de la constante aparente de equilibrio  $K_1'$  utilizando la ecuación 22a. Un valor de  $0.3 \pm 0.1$  se obtiene de esta estimación a pH 1, lo que corresponde con una constante de disociación para la adenina protonada en la interfase de  $0.03 \pm 0.01$ . Estos valores de la

constante de equilibrio no pueden explicar los valores más bajos de  $R_{ad}^{app}$  obtenidos a pH 1 comparados con los valores de  $R_{ad}$  obtenidos a pH 7.5 porque, de acuerdo con la ecuación (22b) y el alto valor de la constante de velocidad para las reacciones de desprotonación/protonación, los valores de resistencia de adsorción obtenidos a pH 1 deben ser la resistencia de adsorción verdadera y ser coincidentes con los valores obtenidos a pH 7.5. Las diferencias serán discutidas más abajo en base a la dependencia con el potencial de la velocidad de adsorción y el desplazamiento del potencial de adsorción debido a la etapa de desprotonación.

De esta forma el valor de la constante aparente de disociación en la interfase electrodo/electrolito es tres órdenes de magnitud mayor que la constante de disociación para la adenina protonada en el seno de la disolución acuosa. Los estudios de la orientación de la adenina adsorbida sobre electrodos de Au(111) utilizando la metodología de FT-IRRAS cuantitativa<sup>17</sup> permiten concluir que la adenina neutra se adsorbe sobre el electrodo de oro con los átomos de nitrógeno N<sub>10</sub> del grupo amino y N<sub>1</sub> del anillo pirimidínico dirigidos hacia el electrodo. Por lo tanto, la interacción del campo eléctrico en las proximidades del electrodo sobre el fragmento molecular involucrado en el equilibrio de disociación, N<sub>1</sub>Y con los protones puede ser lo bastante alto como para explicar el valor obtenido para la constante de disociación de  $AdH_4^+$  en las proximidades de la superficie del electrodo. Delgado y colaboradores<sup>18</sup> demostraron que el valor del segundo pK<sub>a</sub> de los ácidos dicarboxílicos adsorbidos sobre electrodos de oro disminuye a medida que el grupo carboxílico no-coordinado está más próximo a la superficie del electrodo. Este comportamiento puede explicarse como consecuencia de una interacción entre el resto ácido y la superficie del electrodo cargada positivamente.

La combinación de los parámetros  $R_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  y  $C_{ad}$  proporciona los valores de los tiempos de relajación de difusión,  $\tau_D$ , y de adsorción,  $\tau_H$ .<sup>15</sup>

$$\tau_D^{\frac{1}{2}} = -\frac{\left(\frac{\partial \Gamma}{\partial c}\right)_E}{(2D)^{\frac{1}{2}}} = 2^{-\frac{1}{2}} \sigma_{ad} C_{ad} \quad (24a)$$

$$\tau_H = -\left(\frac{\partial \Gamma}{\partial v}\right)_{E,c} = R_{ad} C_{ad} \quad (24b)$$

Los valores estimados de  $\tau_D$  y  $\tau_H$  a diferentes potenciales se resumen en la Tabla 1 para la adenina adsorbida a los tres valores de pH.

**Tabla 1** Valores de los tiempos de relajación en milisegundos, de difusión y de adsorción obtenidos de acuerdo con la ecuación(24) para la adsorción de adenina sobre electrodos de Au(111) a partir de disoluciones de adenina 1 mM a los valores de pH indicados.  $\tau_D$  y  $\tau_H$  a pH 1 se han calculado corrigiendo el coeficiente de Warburg de acuerdo con la ecuación(22a).

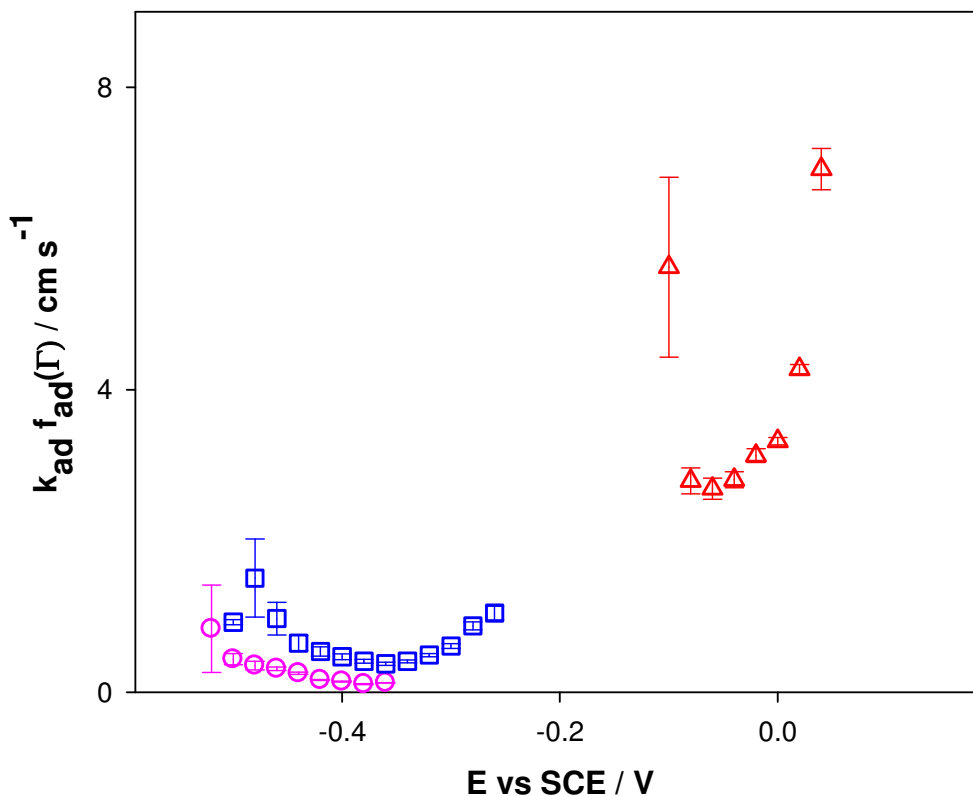
pH 1			pH 7.5			pH 12		
E/V	$\tau_D$ /ms	$\tau_H$ /ms	E/V	$\tau_D$ /ms	$\tau_H$ /ms	E/V	$\tau_D$ /ms	$\tau_H$ /ms
0.06	3.4	2.7	-0.24	18.9		-0.36	5.9	2.7
0.02	1.3	1.0	-0.26	13.7	0.4	-0.38	6.3	2.9
0.00	1.6	1.3	-0.28	10.2	0.4	-0.4	2.8	1.6
-0.02	1.3	1.0	-0.3	4.0	0.4	-0.42	2.8	1.3
-0.04	1.1	0.9	-0.32	3.8	0.4	-0.44	0.7	0.6
-0.06			-0.34	2.3	0.4	-0.46	0.7	0.5
-0.08	5.3		-0.36	1.6	0.4	-0.48	0.3	0.4
-0.10	0.9	0.7	-0.38	1.4	0.3	-0.5	0.4	0.4
			-0.40	1.2	0.3	-0.52	0.3	0.3
			-0.42	1.3	0.2	-0.54	0.1	0.1
			-0.44	1.6	0.2			

Se observa que ambos tiempos de relajación están dentro de un mismo orden de magnitud (datos a pH 1 y a pH 12) o son aproximadamente un orden de magnitud mayor para  $\tau_D$  (en el caso de los datos a pH 7.5). Esto confirma el control cinético mixto del proceso por difusión y por activación de la adsorción en el caso de la adsorción a pH 1 y 12 y el control principalmente por difusión en el caso de la adsorción a pH 7.5 que se concluía de los diagramas de Nyquist de la admitancia electródica en la figura 4.5.

Se puede tener información más cuantitativa de la cinética de adsorción a partir de los valores de la velocidad específica de adsorción,  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$ , que se puede obtener a partir de los valores de  $R_{ad}$  y  $\sigma_{ad}$  de acuerdo con la ecuaciones (14a) y (14b).

$$k_{ad}f_{ad}(\Gamma) = D^{\frac{1}{2}} \frac{\sigma_{ad}}{R_{ad}} \quad (25)$$

Las representaciones gráficas de  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  en función del potencial a los tres valores de pHs estudiados se muestran en la figura 4.12.



**Fig. 4.12** Representación de  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  frente al potencial, calculados a partir de los parámetros obtenidos del análisis con la frecuencia y la ecuación (25) a pH 1 (triángulos), 7.5 (cuadrados) y 12 (círculos). Los valores de  $\sigma_{ad}^{app}$  obtenidos a pH 1 se han corregido de acuerdo con la ecuación (22a).

A pH 7.5 se observan dos comportamientos diferentes de la velocidad específica de adsorción dependiendo del potencial. A valores bajos de potencial  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  disminuye con el potencial alcanzando un mínimo y luego vuelve a aumentar cuando los valores de potencial aplicado son mayores. A pH 12 la ventana disponible de potenciales es más pequeña observándose solamente la primera tendencia. A pH 1, la constante específica de velocidad es mayor que a pH 7.5, y se puede apreciar una tendencia creciente con el potencial.

La dependencia con el potencial de la velocidad específica será la resultante de las contribuciones de  $k_{ad}$  y  $f_{ad}(\Gamma)$ . Para  $k_{ad}$ , Szuborska y Baranski han propuesto<sup>19,20</sup> una dependencia con el potencial creciente, de tipo Butler-Volmer. Por su parte  $f_{ad}(\Gamma)$  es una función monótona decreciente del exceso superficial con una expresión explícita que depende de la isoterma de adsorción que se aplica al sistema. La forma más simple posible de  $f_{ad}(\Gamma)$ , corresponde con una isoterma de Langmuir, tiene como expresión:

$$f_{ad}(\Gamma) = \frac{k_{ad}}{k_{ad}c + k_{ad}} \quad (\text{Isoterma de Langmuir}) \quad (26)$$

La ecuación 26 supone que  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  aumenta con  $k_{ad}$ , por lo que debe mostrar la misma dependencia con el potencial, bien sea creciente o decreciente. Sin embargo, los resultados obtenidos a pH 12 y a bajos potenciales a pH 7.5 muestran un comportamiento decreciente de  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  con el potencial, mientras que cabe esperar el comportamiento opuesto para  $k_{ad}$ . Por lo tanto, los resultados cinéticos no pueden explicarse con una isoterma de Langmuir para la adsorción de adenina.

El estudio termodinámico de la adsorción de la adenina en medio neutro concluye que la adsorción obedece a una isoterma de tipo Frumkin, con un parámetro de interacción atractivo.<sup>14</sup> Por tanto, las interacciones laterales entre las moléculas de adsorbato en el estado de transición de la etapa de adsorción y en el estado fundamental final deben tenerse en cuenta en la expresión cinética, como sugirieron Szulborska y Baranski<sup>20</sup> para la adsorción de tioglicol sobre electrodos de mercurio.

$$f_{ad}(\Gamma) = \frac{\Gamma_{max} - \Gamma}{\Gamma_{max}} \exp\left(\frac{2g^\ddagger\theta}{RT}\right) \quad (\text{Isoterma de Frumkin}) \quad (27)$$

donde  $g^\ddagger$  es el parámetro de interacción entre el complejo activado de la etapa de adsorción y el adsorbado en el estado fundamental y  $\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_{max}}$  es el recubrimiento superficial.  $g^\ddagger$  afecta tanto a la barrera de energía del paso de adsorción como a la del de desorción y debe estar relacionada con el parámetro de interacción termodinámico,  $g$ :

$$\frac{g^\ddagger}{g} = \frac{\left(\frac{\partial \Delta G_{ads}^\ddagger}{\partial \theta}\right)_E}{\left(\frac{\partial \Delta G_{ads}^0}{\partial \theta}\right)_E} = \left(\frac{\partial \Delta G_{ads}^\ddagger}{\partial \Delta G_{ads}^0}\right)_E \quad (28)$$

De la ecuación 28 se entiende que la relación  $g^\ddagger/g$  es algún tipo de factor de simetría y puede ser considerado como una especie de coeficiente de transferencia de carga, así que este valor debe, en principio, estar entre 0 y 1.

Un valor de  $g^\ddagger/g$  cercano a 1 proporciona una explicación de la dependencia con el potencial de la constante específica de velocidad de la adsorción de adenina sobre Au(111) en disoluciones a pH neutro<sup>1</sup> asumiendo una dependencia de tipo Butler-Volmer de  $k_{ad}$  con el potencial.



A potenciales mayores, si la concentración de adsorbato en el seno de la disolución es menor que el valor requerido para saturar la superficie, de acuerdo con la ecuación 27 la función  $f_{ad}(\Gamma)$  debe alcanzar un valor mínimo. A partir del potencial del mínimo de  $f_{ad}(\Gamma)$  toda la dependencia con el potencial de la constante de velocidad específica obedece la dependencia de  $k_{ad}$ , explicando el incremento exponencial de  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  con el potencial a potenciales altos observado a pH 7.5 en la figura 12.

Para la adsorción de adenina desde disoluciones básicas, teniendo en cuenta que la especie que se adsorbe es aniónica,  $AdH_2^-$ , la interacción electrostática entre el estado de adsorción de transición y las moléculas de adsorbato en su estado fundamental deben originar un parámetro de interacción menor que en medio neutro. De acuerdo con la ecuación (27) esto podría explicar el valor más bajo de la constante específica de velocidad obtenido a pH 12.

Por otra parte, el valor mayor de la constante específica de velocidad obtenida a pH 1 comparada con los valores a pH 7.5 también puede explicarse por la dependencia de  $k_{ad}$  con el potencial. El desplazamiento en los potenciales de equilibrio de adsorción/desorción originados por la etapa de desprotonación origina también un desplazamiento de los potenciales de adsorción hacia valores mayores a los cuales la constante de velocidad para el paso de adsorción,  $k_{ad}$ , está en crecimiento exponencial con el potencial.

## 4.6 Conclusiones

La dispersión con la frecuencia obtenida para los datos de pseudocapacidad de la adsorción de adenina a los tres valores de pH sobre electrodos de oro (111) puede explicarse en base al modelo cinético de adsorción de acuerdo con los trabajos de Melik-Gaikazayan. Este modelo no implica ninguna suposición sobre el tipo de isoterma que aplica o sobre la dependencia con el potencial de la constante de velocidad de adsorción. En la adsorción de adenina a partir de disoluciones muy ácidas se ha considerado una etapa previa de desprotonación en el modelo cinético.

Se han deducido las ecuaciones de la impedancia de la célula para un proceso de adsorción que incluye una etapa química previa. Estas ecuaciones muestran una dependencia con la frecuencia que en principio es diferente del caso de la adsorción pura. Sin embargo, incluso para valores bajos de  $K_1$ , existen dos casos límites que

proporcionan la misma dependencia con la frecuencia que el proceso de adsorción pura: los límites de altas y de bajas frecuencias que se pueden obtener con bajos o altos valores respectivamente de la constante de velocidad total de la etapa química,  $k_c$ . El límite de altas frecuencias no proporciona información sobre la etapa química, pero el límite de bajas frecuencias incluye  $K_1$  y  $k_c$  en el coeficiente aparente de Warburg y en la resistencia de adsorción aparente.

La dependencia de la impedancia con la frecuencia de los resultados a pH 1 se explica conforme al caso límite de bajas frecuencias. El análisis de la componentes reales e imaginarias de la admitancias electródicas ha proporcionado los valores de los parámetros de adsorción:  $R_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  y  $C_{ad}$  en función del potencial. De las gráficas de  $\sigma_{ad}$  en función del potencial se ha obtenido a pH 1 una constante de equilibrio tres órdenes de magnitud mayor que la del seno de la disolución. Los parámetros independientes de la frecuencia han permitido calcular los tiempos de relajación de adsorción y de difusión y la constante específica de velocidad del proceso de adsorción. A partir de los tiempos de relajación se ha propuesto un control cinético mixto por la activación de la adsorción y por difusión en disoluciones a pH 1 y 12 y un control cinético por difusión para disoluciones a pH 7.5. La dependencia con el potencial de la velocidad específica de adsorción se explica como resultado de la dependencia potencial combinada de una función de  $f_{ad}(\Gamma)$  de tipo Frumkin con un parámetro atractivo de interacción y una dependencia con el potencial de tipo Butle-Volmer para  $k_{ad}$ . Esta dependencia con el potencial justifica los valores más altos para  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  obtenidos a pH 1 comparado con los valores obtenidos a pH 7.5, ya que el equilibrio de la etapa química previa desplaza el proceso de adsorción a potenciales mayores. Los menores valores de  $k_{ad}f_{ad}(\Gamma)$  obtenidos a pH 12 sugieren un valor menor para el parámetro de interacción de la correspondiente isoterma de Frumkin para la adsorción de la adenina aniónica comparada con la forma neutra.

## 4.7 Bibliografía

1. Prieto, F., Rueda, M., Prado, C., Feliu, J. M. & Aldaz, A. Kinetics of adenine adsorption on Au(1 1 1) electrodes: An impedance study. *Electrochim. Acta* **55**, 3301–3306 (2010).
2. Rueda Rueda, M. & Prieto Dapena, F. Application of electrochemical impedance

- spectroscopy to the study of surface processes. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **76**, 1825–1854 (2011).
3. Frumkin, A. & Melik-Gaykazyan, V. Determination of the Kinetics of Adsorption of Organic Substances by a.c. Measurements of the Capacity and the Conductivity at the Boundary: Electrode-Solution. *Dokl. Acad. Nauk* **77**, 855–858 (1951).
  4. Berzins, T. & Delahay, P. Electrochemical Method for the Kinetic Study of Fast Adsorption Processes. *J. Phys. Chem.* **59**, 906–909 (1955).
  5. Pajkossy, T., Wandlowski, T. & Kolb, D. M. Impedance aspects of anion adsorption on gold single crystal electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **414**, 209–220 (1996).
  6. Rueda, M., Prieto, F., Rodes, A. & Delgado, J. M. In situ infrared study of adenine adsorption on gold electrodes in acid media. *Electrochim. Acta* **82**, 534–542 (2012).
  7. Álvarez-Malmagro, J., Prieto, F., Rueda, M. & Rodes, A. In situ Fourier transform infrared reflection absorption spectroscopy study of adenine adsorption on gold electrodes in basic media. *Electrochim. Acta* **140**, 476–481 (2014).
  8. Prieto, F., Álvarez-Malmagro, J. & Rueda, M. Electrochemical Impedance Spectroscopy study of the adsorption of adenine on Au(111) electrodes as a function of the pH. *J. Electroanal. Chem.* **submitted**, (2017).
  9. Prieto, F., Rueda, M. & Álvarez-Malmagro, J. Electrochemical Impedance Spectroscopy analysis of an adsorption process with a coupled preceding chemical step. *Electrochim. Acta* **232**, 164–173 (2017).
  10. Pajkossy, T. Capacitance dispersion on solid electrodes: anion adsorption studies on gold single crystal electrodes. *Solid State Ionics* **94**, 123–129 (1997).
  11. Sluyters-Rehbach, M. Impedance of electrochemical systems: Terminology, nomenclature and representation. Part I: Cells with metal electrodes and liquid solutions. *Pure Appl. Chem.* **66**, 1831–1891 (1994).
  12. Lasia, A. *Impedance Spectroscopy and its Applications*. (Springer, 2014).

doi:10.1007/978-1-4614-8933-7

13. Sluyters-Rehbach, M. Impedances of electrochemical systems: Terminology, nomenclature and representation - Part I: Cells with metal electrodes and liquid solutions (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.* **66**, 1831–1891 (1994).
14. Prado, C., Prieto, F., Rueda, M., Feliu, J. & Aldaz, A. Adenine adsorption on Au(1 1 1) and Au(1 0 0) electrodes: Characterisation, surface reconstruction effects and thermodynamic study. *Electrochim. Acta* **52**, 3168–3180 (2007).
15. Sluyters & Renbach. Impedances of Electrochemical Systems: Terminology, Nomenclature and Representation. *Pure Appl. Chem* **66**, 1831–1891 (1994).
16. Kerner, Z. & Pajkossy, T. Measurement of adsorption rates of anions on Au(111) electrodes by impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* **47**, 2055–2063 (2002).
17. Prieto, F., Su, Z., Leitch, J. J., Rueda, M. & Lipkowski, J. Quantitative Subtractively Normalized Interfacial Fourier Transform Infrared Reflection Spectroscopy Study of the Adsorption of Adenine on Au(111) Electrodes. *Langmuir* **32**, 3827–3835 (2016).
18. Delgado, J. M., Berná, A., Orts, J. M., Rodes, A. & Feliu, J. M. In Situ Infrared Study of the Adsorption and Surface Acid–Base Properties of the Anions of Dicarboxylic Acids at Gold Single Crystal and Thin-Film Electrodes. *J. Phys. Chem. C* **111**, 9943–9952 (2007).
19. Szulborska, A. & Baranski, A. Numerical simulation of kinetically controlled electroadsorption processes under cyclic voltammetric conditions. *J. Electroanal. Chem.* **377**, 23–31 (1994).
20. Szulborska, A. & Baranski, A. Kinetics and thermodynamics of thioglycol adsorption on mercury ultramicroelectrodes. *J. Electroanal. Chem.* **377**, 269–281 (1994).

---

**Capítulo 5**

**Adsorción y co-Adsorción de Citosina y Guanina en  
función del pH**

---

## 5.1 Adsorción de Citosina sobre Electrodo de Oro. Influencia del pH

### 5.1.1. Introducción

En disolución acuosa la citosina presenta dos equilibrios ácido-base, con valores de  $pK_a$  4.5 y 12.2, respectivamente.

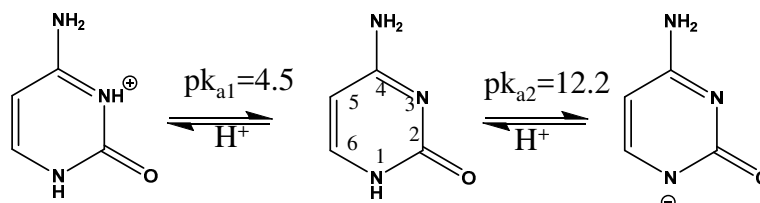


Fig. 5.1 Comportamiento ácido-base de la citosina

Como ya se ha descrito en la introducción de la tesis puede presentar en fase gaseosa varias formas tautoméricas de las cuales la más estable es la C2b, seguida por las C1 y C3a (Fig. 2).

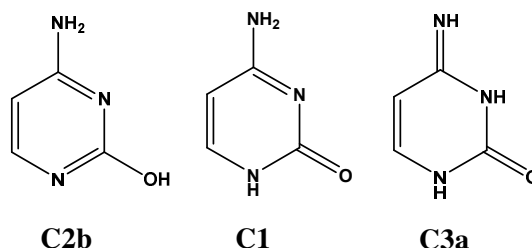


Fig. 5.2 Tautómeros más estables de la citosina

La adsorción de la citosina sobre electrodos de Au(111) ha sido estudiada utilizando medidas de STM, espectroscopía de reflexión absorción infrarroja por transformada de Fourier (FT-IRRAS) en conformación de reflexión externa<sup>1,2</sup> y se ha podido confirmar la existencia de una fase fisisorbida a potenciales bajos y una quimisorbida a potenciales altos y se ha propuesto un modelo de adsorción en el que la molécula de citosina interacciona con la superficie del electrodo a través del oxígeno del grupo carbonilo en posición 2, del nitrógeno del grupo amino y del N<sub>3</sub> del anillo pirimidínico.

En esta parte del capítulo se utiliza la espectroscopía de ATR-SEIRA (descrita en detalle en el capítulo 2) para estudiar la adsorción de citosina sobre electrodos de oro a distintos valores de pH. El rango de pH se ha seleccionado para conseguir las condiciones adecuadas para los posteriores estudios de la co-adsorción con guanina

(Capítulo 5.2). En estos experimentos no se ha superado el valor de pH del  $pK_{a2}$  ya que en esta tesis no se han realizado intentos de estudiar la forma aniónica de la citosina debido a la dificultad que presenta trabajar en medios fuertemente básicos con películas nanoestructuradas de oro. Los resultados espectroscópicos se han interpretado haciendo uso de cálculos DFT de la molécula de citosina neutra aislada y adsorbida sobre electrodos de oro, y por comparación con los espectros de transmisión en las mismas disoluciones de estudio, realizados en esta tesis, o los de la bibliografía. El estudio de la influencia del potencial se ha llevado a cabo a partir del estudio de las intensidades integradas de las bandas de adsorción en función del potencial. Finalmente se incluye el estudio de la coadsorción del agua con los tautómeros desprotonados en  $N_1$  y  $N_3$  a partir del análisis de la región espectral  $2800-3900\text{ cm}^{-1}$ .

## **5.1.2. Experimental**

### **5.1.2.1. Reactivos**

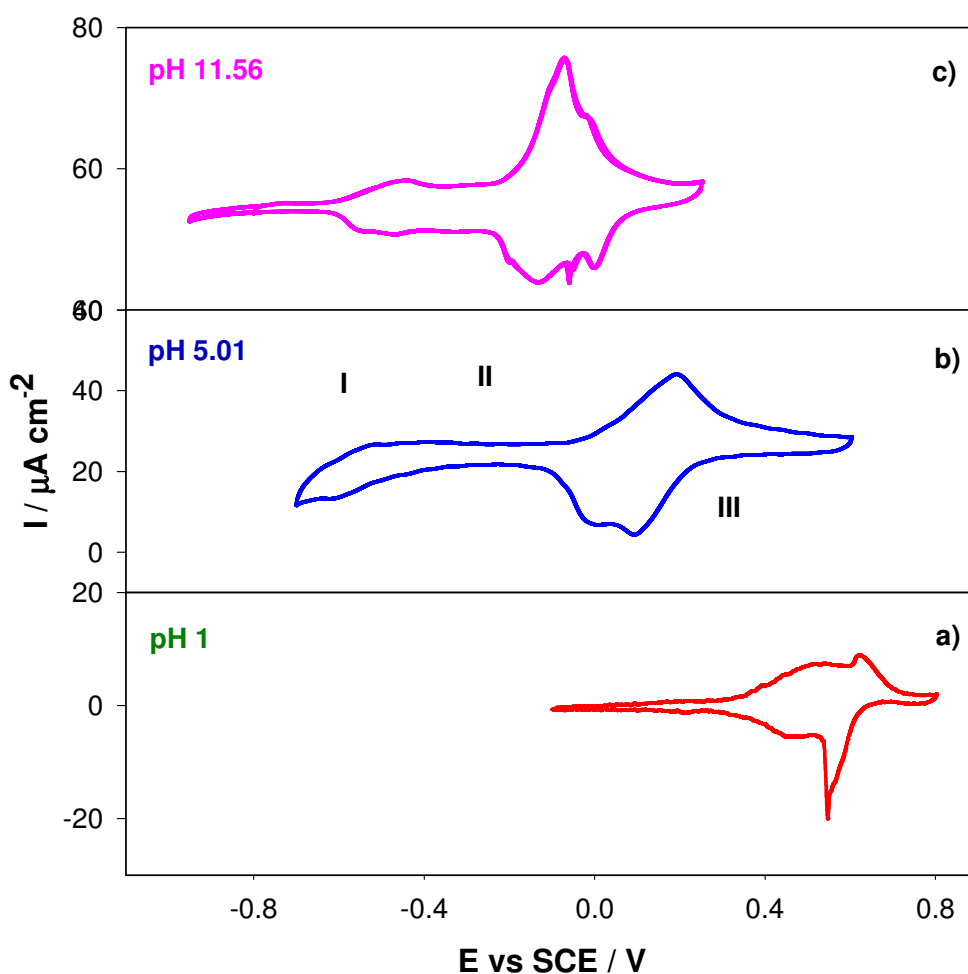
Se utilizó  $H_2O$  ultrapura y  $D_2O$  (Sigma-Aldrich®) para preparar las disoluciones de electrolito soporte ( $HClO_4$  0.1 M,  $KClO_4$  0.1 M, NaF 0.1 M y NaF 0.1 M + NaOH) y la disolución de stock de citosina (Sigma-Aldrich® sin más purificación) de concentración 10 mM. Los experimentos de infrarrojos obtenidos en configuración de reflexión interna se realizaron tanto en  $H_2O$  como en  $D_2O$  en los mismos electrolitos soportes ( $HClO_4$  0.1 M a pH 1,  $KClO_4$  0.1 M a pH 7, NaF 0.1 M a pH 8 y NaF 0.1 M + NaOH a pH 11.6). En este capítulo a diferencia de capítulos previos de esta tesis se ha trabajado con disoluciones de NaF 0.1 M a pH 8 y NaF 0.1M + NaOH a pH 11, con objeto de estudiar un rango más amplio de medios básicos

La concentración de citosina en estos experimentos fue 1 mM. Los experimentos de transmisión se realizaron en agua y en medio deuterado con una concentración de citosina de 10 mM. En este capítulo en particular para realizar estos experimentos no se ha utilizado la configuración de transmisión definida en el capítulo 2 si no que se han llevado a cabo utilizando una cámara de ZnSe.

### 5.1.3. Resultados de Voltametría Cíclica

En la figura 5.3 se muestran los voltagramas cíclicos estacionarios obtenidos en disoluciones de citosina 1 mM a valores de pH por debajo del  $pK_{a2}$ , sobre electrodos monocristalinos de Au(111).

A los tres valores de pH estudiados se distinguen las tres regiones en función del potencial descritas previamente por medidas de STM por Wandlowski y col<sup>1</sup>. Por analogía, podríamos asociarlas a distintas regiones que en orden creciente de potenciales serían una fase fisisorbida diluida desordenada (I), una fase fisisorbida ordenada (II), y a los potenciales más altos una fase quimisorbida de moléculas de citosina ordenada (III). Sin embargo los picos de transición de fase que delimitan cada una de estas regiones no se distinguen como en el caso de la adsorción de la timina descrito en el capítulo 3.2.3.



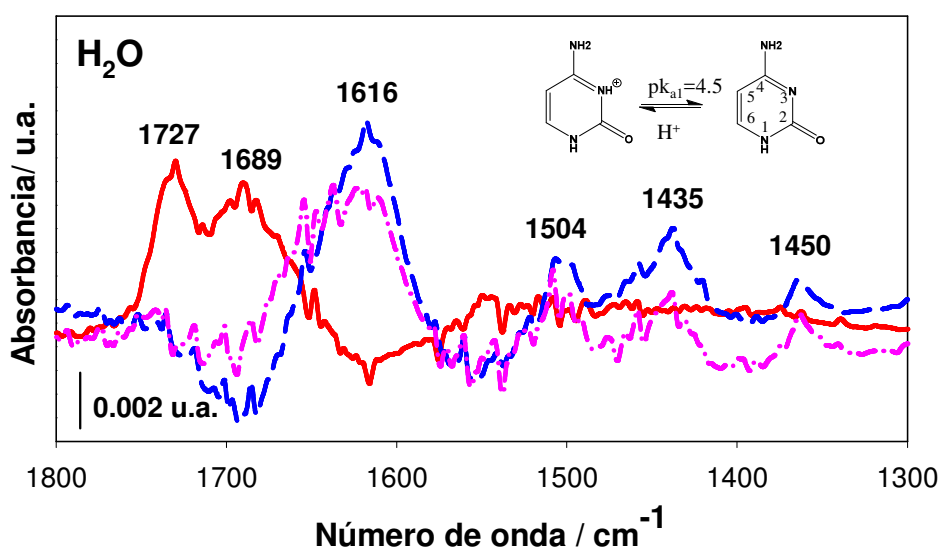
**Fig. 5.3.-** Voltagramas estacionarios de electrodos Au(111) obtenidos en disoluciones de citosina 1mM a los valores de pH indicados. Velocidad de barrido 50 mV/s.



Al aumentar el pH se desplazan las señales de la quimisorción hacia potenciales menores, lo que está de acuerdo con que la citosina catiónica se tiene que desprotonar para adsorberse químicamente, como propusieron Wandlowski y col.<sup>1</sup>. En todos los casos el límite inferior de potencial de la región (I) está limitado por el inicio de la reducción de los protones del medio, que está catalizada por la presencia de citosina.<sup>1</sup>

#### 5.1.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IR de Transmisión en Disolución

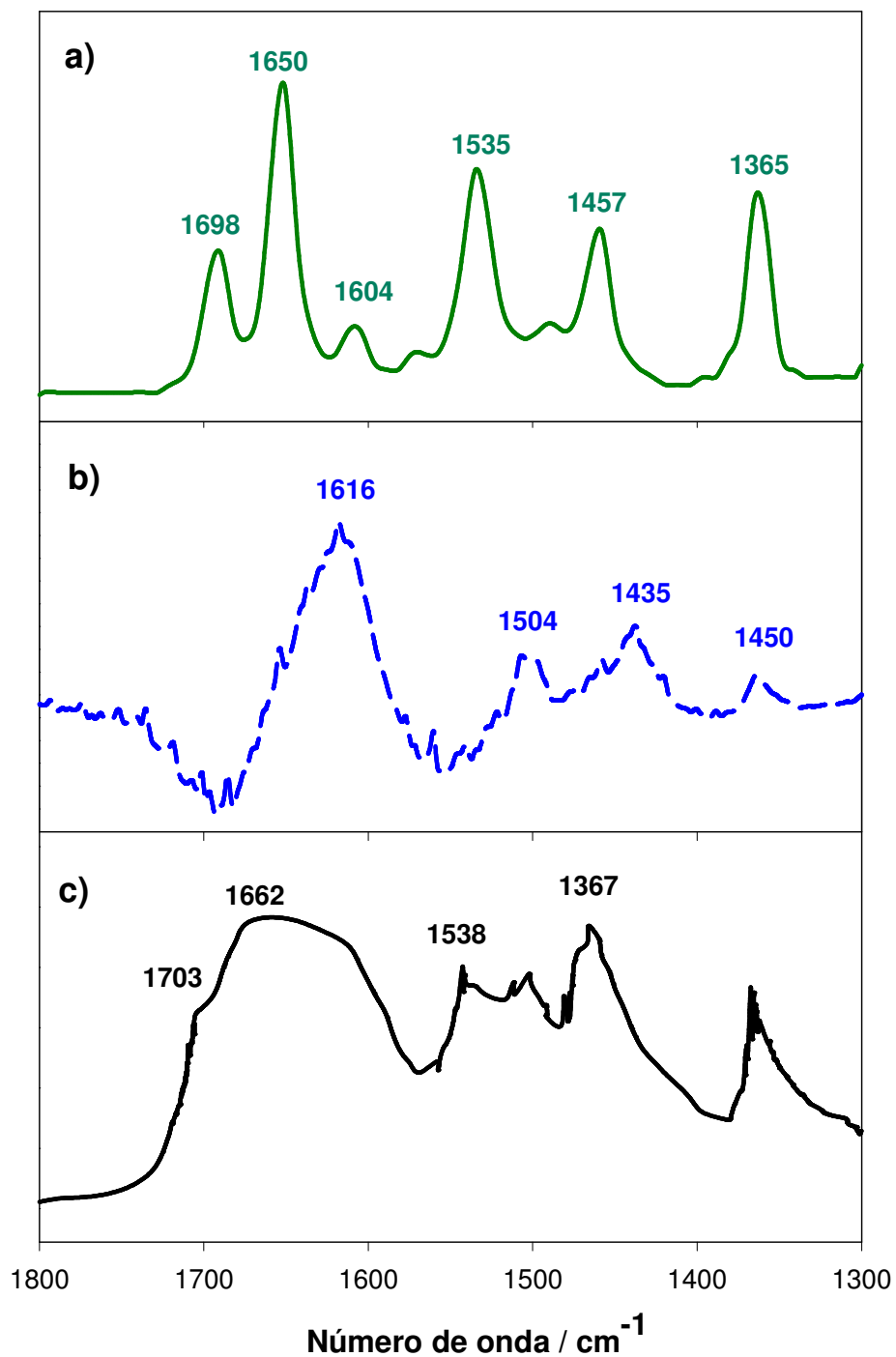
En la figura 5.4 se muestran los espectros de transmisión en la región entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos en  $\text{H}_2\text{O}$  para disoluciones de citosina 10 mM a tres valores de pH. En dichos espectros se observan bandas intensas y solapadas, que se desplazan a números de ondas menores al aumentar el potencial. Cabe destacar la gran coincidencia de los espectros a pH 8 y 11.6, y su diferencia con los espectros obtenidos a pH 1, lo que sugiere que a pH 1 el espectro se debe a la forma protonada de la citosina, mientras que a los otros dos valores de pH el espectro esta origina por la forma neutra de la citosina dado que es la forma predominante a ambos valores de pH.



**Fig. 5.4.-** Espectros de transmisión IR para disoluciones de Citosina 10 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  a distintos valores de pH; pH 1 (—), pH 8 (- - -) y pH 11.6 (- · - · -).

Para asignarlas se han utilizado los datos que existen en la bibliografía en estado sólido monohidrato policristalino<sup>3</sup> y en matrices de argón (obtenida de la base de datos Ohmic) (Fig. 5.3). Además se han realizado cálculos de DFT de la molécula aislada utilizando

un nivel de teoría B3LYP / 6-31++G(d,p) que se comparan en la Tabla 1 con los espectros de transmisión para la citosina 10 mM en medio acuoso obtenido a los tres valores de pH.



**Fig. 5.5** Espectros de transmisión en el infrarrojos de citosina a) en fase gaseosa obtenida de la base de datos Omnic, b) a pH 8 en disoluciones 10 mM de citosina y c) policristalina monohidratada no deuterada.<sup>3</sup>

Las señales más intensas de los espectros de transmisión para la citosina sólida sin deuterar obtenidas por Susi y col.<sup>3</sup> en la región 1300-1800 cm<sup>-1</sup> son anchas y se han asignado a las vibraciones de tensión del grupo C<sub>2</sub>O, CC y las flexiones NH<sub>2</sub>.

En este capítulo la asignación de las bandas principales se da en la Tabla 1 y están basadas en nuestros cálculos DFT de la molécula neutra gaseosa aislada (ver espectro en Fig. 5.6) en comparación con los espectros experimentales obtenidos en los medios acuosos a los tres valores de pH. Las frecuencias de las señales de los espectros teóricos en la región entre 1300-1800 cm<sup>-1</sup> obtenidos para la citosina neutra son comparables (teniendo en cuenta las diferencias en los factores de escala correspondientes)<sup>4</sup> con los valores y la asignación aportada por Ian y col.<sup>5</sup> obtenida a partir de cálculos DFT usando como nivel de teoría un *HF/6-31G\*\**.<sup>6</sup> En fase gaseosa existe una buena concordancia entre los datos teóricos y experimentales. Las bandas a mayor número de onda, 1705 cm<sup>-1</sup>, 1622 cm<sup>-1</sup> y 1563 cm<sup>-1</sup>, se asignan a los modos normales de vibración de tensión de C<sub>2</sub>O, tensión de C<sub>5</sub>C<sub>6</sub> (con contribución de las flexiones de NH<sub>2</sub>) y las flexiones de NH<sub>2</sub>. Sin embargo en disolución a pH 8 y 11.6 la banda más intensa es una banda ancha con contribuciones de las tensiones C<sub>2</sub>O y C<sub>5</sub>C<sub>6</sub> y las flexiones NH<sub>2</sub>.

**Tabla 1.** Frecuencias de vibración de los espectros experimentales y teóricos para la citosina en las condiciones indicadas

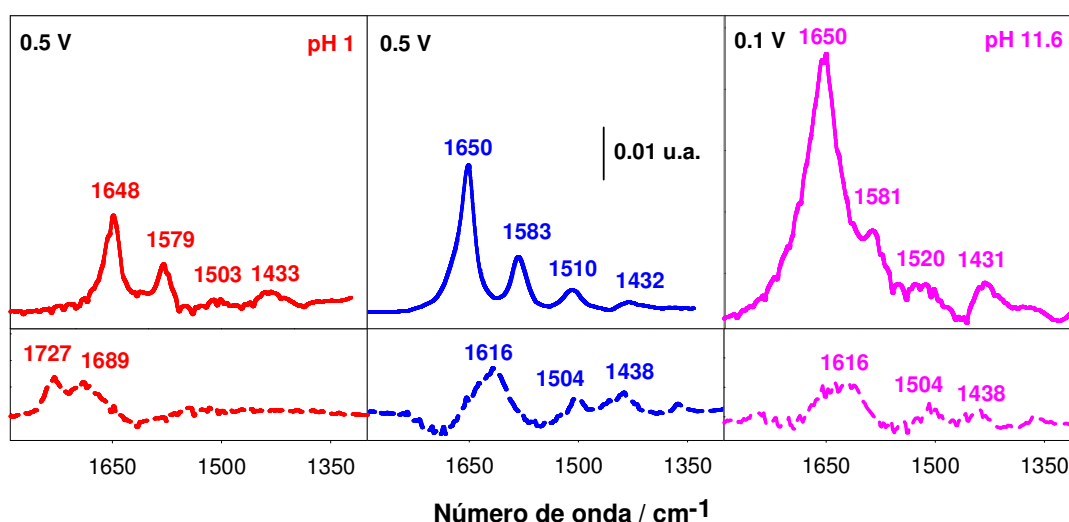
Espectros en matriz de Ar		Espectros de ATR-SEIRAS		
<u>Calculado</u>	<u>Experimental</u>	<u>pH 1</u>	<u>pH 8</u>	<u>pH 11.6</u>
s-1705 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> O	1698 cm <sup>-1</sup>	1727 cm <sup>-1</sup>		
s-1622 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub> + bend NH <sub>2</sub>	1650 cm <sup>-1</sup>	1689 cm <sup>-1</sup>	1616 cm <sup>-1</sup>	1616 cm <sup>-1</sup>
w-1563 cm <sup>-1</sup> ; bend NH <sub>2</sub>	1604 cm <sup>-1</sup>			
w-1504 cm <sup>-1</sup> ; str ring	1535 cm <sup>-1</sup>		1504 cm <sup>-1</sup>	1504 cm <sup>-1</sup>
w-1445 cm <sup>-1</sup> ; str CN <sub>H2</sub> + bend CH	1457 cm <sup>-1</sup>		1438 cm <sup>-1</sup>	1438 cm <sup>-1</sup>
w-1386 cm <sup>-1</sup> ; str CN <sub>H2</sub> + str N <sub>3</sub> C <sub>4</sub>	1365 cm <sup>-1</sup>		1358 cm <sup>-1</sup>	1370 cm <sup>-1</sup>

(w-débil, s-fuerte, str- tensión , bend- flexión)

## 5.1.5. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la Citosina Adsorbida sobre Electrodo de Oro.

### 5.1.5.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ .

En la figura 5.6 se representan los espectros de ATR-SEIRAS en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos en  $\text{H}_2\text{O}$  a tres valores de pH para la citosina adsorbida sobre películas de Au a potenciales a los cuales la citosina se debe encontrar adsorbida químicamente, según indican los voltagramas correspondientes (Fig. 5.1). En la parte inferior de las figuras se han incluido también los correspondientes espectros de transmisión obtenidos en disolución para citosina 10 mM en las mismas condiciones de pH, para su comparación con los de las especies adsorbidas. En esta región todas las vibraciones corresponden a modos normales de vibración en el plano molecular. Por tanto, al ser activas en el espectro de reflexión-absorción IR, según las reglas de selección superficial el plano molecular de la citosina debe estar inclinado o perpendicular respecto a la superficie del electrodo pero no paralelo.

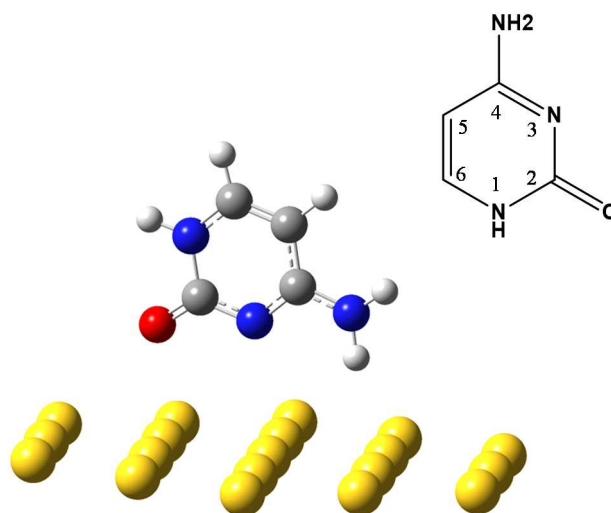


**Fig. 5.6.-** Espectros de ATR-SEIRA, en la región entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$ , para la citosina adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones 1 mM de citosina en  $\text{H}_2\text{O}$ , a los valores de pH y a los potenciales indicados. Los espectros están referidos a las señales obtenidas en el electrolito soporte al mismo potencial. Espectros de transmisión en disolución de la citosina en las mismas condiciones de pH (líneas discontinuas en la parte inferior de cada figura).

Puede observarse que los espectros de ATR-SEIRA son bastante coincidentes al menos en cuanto a las posiciones de las bandas a los tres valores de pH en la figura 5.6 Sin embargo se producen diferencias en las intensidades relativas fundamentalmente en el espectro en medio básico, probablemente debido que en estas condiciones la contribución de la vibración de flexión de OH es mayor y resulta complicado eliminar completamente la contribución del disolvente. Por lo tanto, puede pensarse que la especie que se adsorbe a los tres valores de pH posee el mismo grado de protonación. Los espectros de ATR-SEIRA de la citosina adsorbida, obtenidos en disoluciones acuosas de pH neutro y básico son más parecidos a los correspondientes espectros de transmisión para la citosina disuelta en el mismo medio, salvo en ligeros desplazamientos de las frecuencias de las señales, que podrían entenderse debidas del proceso de adsorción. Sin embargo, en medio ácido los espectros de ATR-SEIRA de la citosina adsorbida sobre oro difieren bastante de los espectros en disolución. Dado que a pH 8 y 11.6 la forma de la citosina presente en disolución es la forma neutra, mientras que a pH 1 la forma mayoritaria es la forma catiónica, los espectros de la figura 5.4 sugieren que la forma adsorbida a los tres valores de pH considerados es la forma neutra de la citosina, de acuerdo con los resultados voltamétricos y tal y como propusieron Osawa et al. <sup>2</sup>

Para confirmar nuestras hipótesis se han realizado cálculos DFT de la molécula neutra de citosina deuterada y sin deuterar adsorbida sobre un clúster de 19 átomos de oro. En primer lugar se han considerado los diferentes tautómeros de la citosina descritos en la bibliografía<sup>7</sup> (ver Fig. 5.2). Se ha encontrado que, sobre la base de los cálculos DFT, la forma adsorbida más estable es la canónica, C1 en la figura 1, con una energía de 5 kcal mol<sup>-1</sup> inferior al siguiente tautómero más estable, el C2b.

La geometría optimizada se representa en la figura 5.5 de tal forma que una vez optimizada la molécula queda orientada en la dirección normal a la superficie con el grupo carbonilo, CO, el grupo amino, NH<sub>2</sub> y el nitrógeno N<sub>3</sub> dirigidos directamente hacia el electrodo.



**Fig. 5.7.-** Geometrías optimizadas para la molécula de citosina neutra deuterada y sin deuterar adsorbida sobre un clúster de 19 átomos de oro

Para la citosina sin deuterar las frecuencias de vibración en la región alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  calculadas para la geometría optimizada de la molécula neutra adsorbida sobre electrodos de oro vienen dadas en la Tabla 2 en comparación con los datos experimentales en todo rango de pH en  $\text{H}_2\text{O}$  y a pD 8 en  $\text{D}_2\text{O}$ . Al igual que en el caso de la timina la mayoría de las señales calculadas en la región muestran contribución de diferentes modos normales de vibración individuales.

**Tabla 2.** Frecuencias experimentales de ATR-SEIRAS de la timina químicamente adsorbida sobre electrodos de oro en a)  $\text{H}_2\text{O}$  y b)  $\text{D}_2\text{O}$  y las frecuencias teóricas obtenidas por cálculos DFT para la citosina químicamente adsorbida sobre un clúster de 19 átomos de oro, optimizando previamente la geometría

**Tabla 2a**

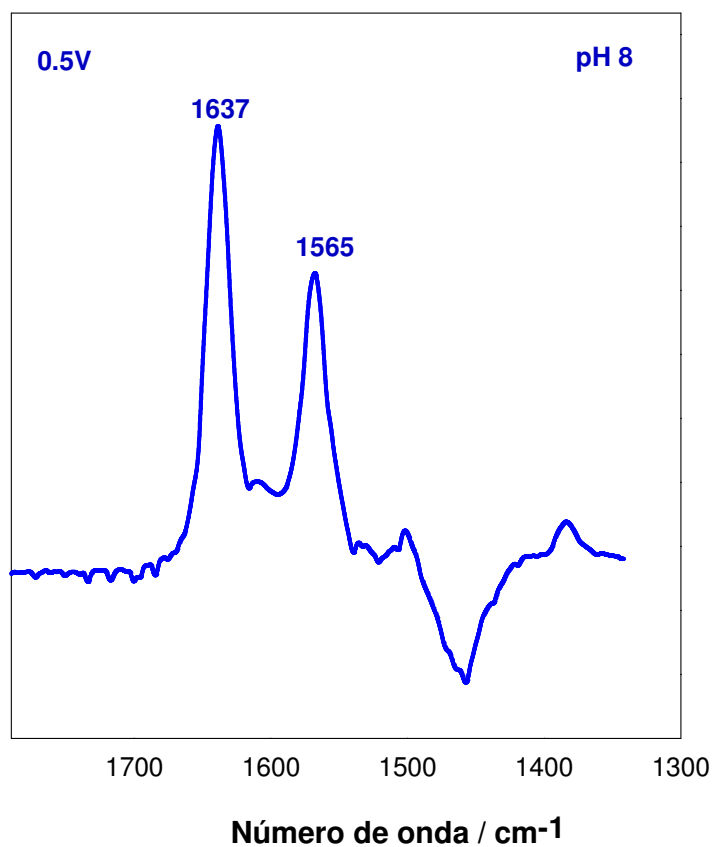
<b>H<sub>2</sub>O</b>			
<u>Calculado</u>	<u>pH 1</u>	<u>pH 8</u>	<u>pH 11.6</u>
s-1615 $\text{cm}^{-1}$ ; bend $\text{NH}_2$ + str $\text{C}_2\text{O}$	1648 $\text{cm}^{-1}$	1650 $\text{cm}^{-1}$	1650 $\text{cm}^{-1}$
s-1610 $\text{cm}^{-1}$ ; str $\text{C}_2\text{O}$ + bend $\text{NH}_2$			
1594 $\text{cm}^{-1}$ ; bend $\text{NH}_2$ + str $\text{C}_2\text{O}$ + bend $\text{NH}$	1579 $\text{cm}^{-1}$	1583 $\text{cm}^{-1}$	1581 $\text{cm}^{-1}$
1499 $\text{cm}^{-1}$ ; str $\text{C}_4\text{C}_5$ + str $\text{C}_4\text{N}_3$ + bend $\text{NH}$ + bend $\text{CH}$	1503 $\text{cm}^{-1}$	1510 $\text{cm}^{-1}$	1520 $\text{cm}^{-1}$
w-1459 $\text{cm}^{-1}$ ; str $\text{C}_4\text{NH}_2$ + bend $\text{NH}$ + bend $\text{CH}$	1433 $\text{cm}^{-1}$	1432 $\text{cm}^{-1}$	1431 $\text{cm}^{-1}$

**Tabla 2b**

<b>D<sub>2</sub>O</b>	
<u>Calculado</u>	<u>pD 8</u>
w-1616 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>	1637 cm <sup>-1</sup>
s-1592 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> O; str. ring	1598 cm <sup>-1</sup>
w-1487 cm <sup>-1</sup> ; str ring; str	
s-1467 cm <sup>-1</sup> ; bend CH	

(w-débil, s-fuerte, str- tensión , bend- flexión)

En D<sub>2</sub>O el espectro teórico muestra dos bandas intensas de adsorción; una a 1640 cm<sup>-1</sup> debido a la vibración de tensión de C<sub>5</sub>C<sub>6</sub> y otra a 1586 cm<sup>-1</sup> asignadas a las vibraciones de flexión de CH que pueden asignarse con las bandas experimentales a de la figura 5.8



**Fig. 5.8.-** Espectros de ATR-SEIRA, en la región entre 1300-1800 cm<sup>-1</sup>, para la citosina adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones 1 mM de citosina en D<sub>2</sub>O, a pD 8 y 0.5V vs SCE. El espectro está referido a las señales obtenidas en el electrolito soporte al mismo potencial.

En H<sub>2</sub>O el espectro teórico para la molécula de citosina neutra adsorbida sobre electrodos de oro muestra dos bandas intensas de adsorción a 1629 y 1610 cm<sup>-1</sup> con

contribuciones tanto de flexión de  $\text{NH}_2$  como de tensión de grupo carbonilo. Estas señales pueden correlacionarse con la banda experimental del espectro de ATR-SEIRA a mayor número de onda (en torno a  $1648 \text{ cm}^{-1}$  a pH 1 y  $1650 \text{ cm}^{-1}$  a pH 8 y 11.6) a todos los valores de pH. Los cálculos DFT proporcionan otras tres bandas de absorción a  $1594$ ,  $1499$  y  $1459 \text{ cm}^{-1}$  que son bandas de combinación debidas fundamentalmente a los modos vibracionales de flexiones de NH, CH y  $\text{NH}_2$  y tensiones de CO y doble enlace CC, que pueden asociarse con las bandas experimentales, tal como se señalan en la Tabla 2. La correlación entre los datos experimentales y teóricos resulta algo más deficiente para la citosina deuterada. Sin embargo, la banda más intensa del espectro de ATR-SEIRA a  $1637 \text{ cm}^{-1}$  podría correlacionarse con la banda teórica a  $1616 \text{ cm}^{-1}$ , asignada a las vibraciones de tensión  $\text{C}_5\text{C}_6$  y flexión CH. Mientras que las bandas experimentales a  $1598$ ,  $1565$  y  $1498 \text{ cm}^{-1}$  podrían correlacionarse con las bandas teóricas a  $1593$ ,  $1488$  y  $1467 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente tal y como se muestra en la Tabla 3.

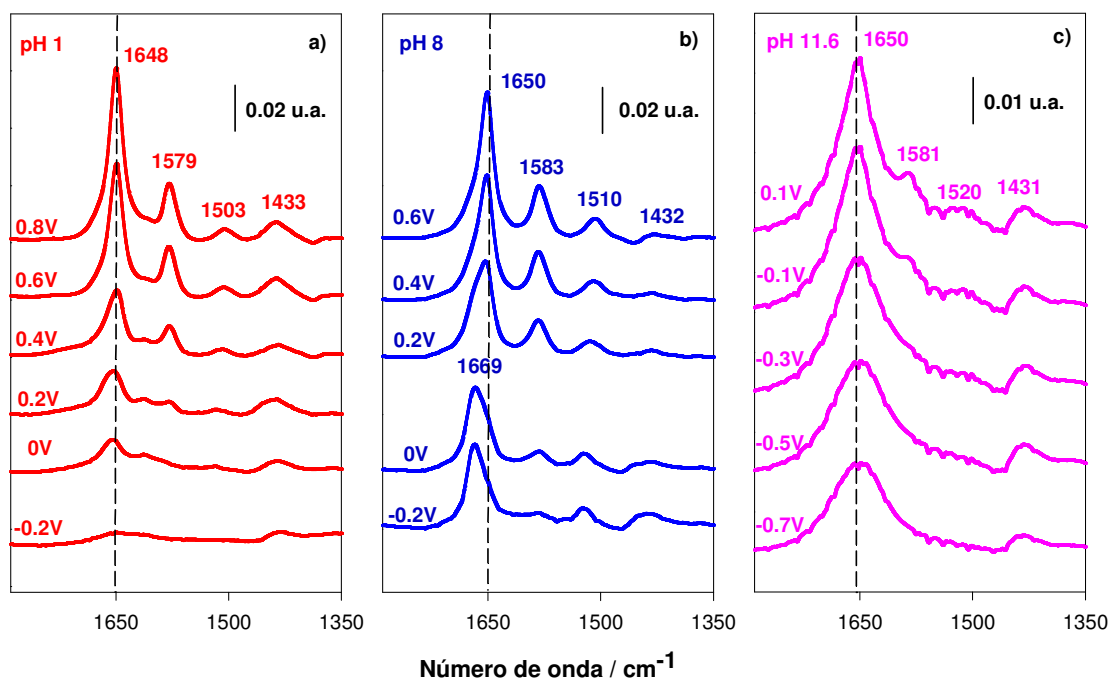
#### **5.1.5.2. Influencia del potencial en la adsorción de citosina adsorbida sobre electrodos de oro**

Se han realizado espectros de ATR-SEIRA en  $\text{H}_2\text{O}$  para electrodos nanoestructurados de oro en disoluciones de citosina  $1 \text{ mM}$ , a distintos potenciales, y referidos a las señales recogidas en el electrolito soporte a los mismos valores de potencial, a valores de pH 1, 8 y 11.6 mostrados en la figura 5.9.

A pH 1, a los potenciales más negativos, correspondientes a la región de fisisorción de la citosina, no se observan las bandas características de vibraciones en el plano molecular de la misma en la región de  $1300\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$ , indicando que la citosina fisisorbida está orientada con el plano molecular paralelo a la superficie del electrodo. Sin embargo empiezan a observarse cuatro bandas a aproximadamente  $1648$ ,  $1579$ ,  $1503$  y  $1433 \text{ cm}^{-1}$  a potenciales algo mayores, que aumentan su intensidad a medida que aumenta el potencial.

A pH 8 y 11.6 el comportamiento es ligeramente diferente, ya que las señales asociadas a vibraciones en el plano de la citosina están presentes a los potenciales bajos, alejados de los correspondientes a la quimisorción, y sus intensidades aumentan con el potencial en menor proporción que en medio ácido. Esto sugiere que el plano molecular de la citosina presenta cierta inclinación respecto a la superficie electródica en todo el rango de potenciales.

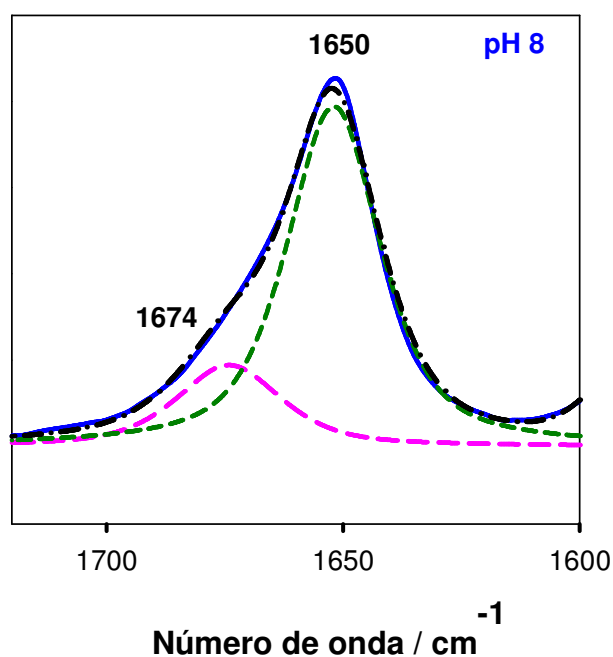




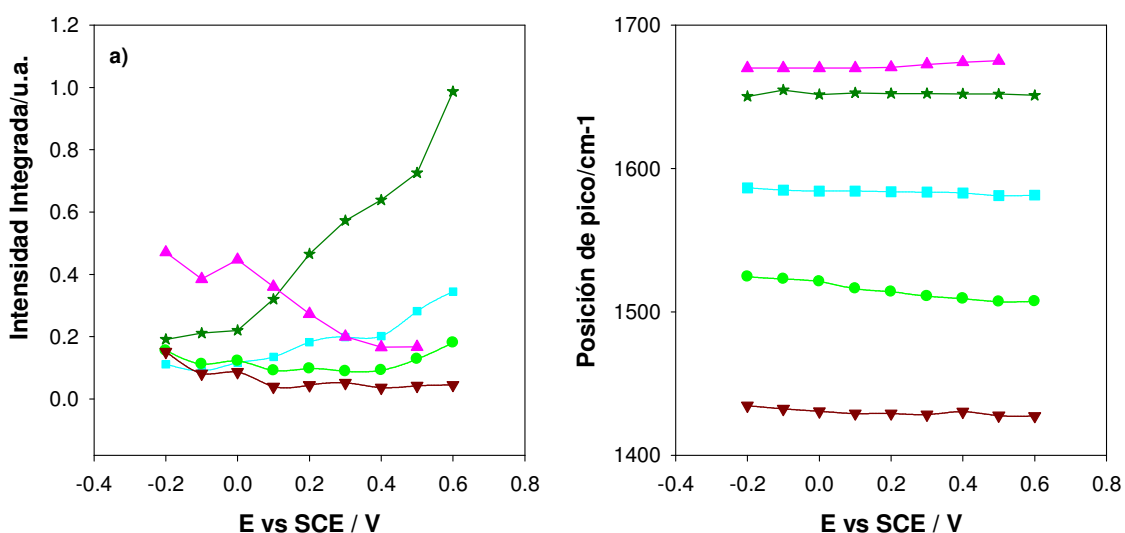
**Fig. 5.9.-** Espectros de ATR-SEIRAS para la citosina adsorbida sobre electrodos de oro en H<sub>2</sub>O a los potenciales indicados a a) pH1 y b) pH8 y c) pH 11.6. Referidos al electrolito soporte al mismo potencial.

Además a pH 8 se observa un desplazamiento con el potencial del máximo de la banda aproximadamente a 1650 cm<sup>-1</sup> a la vez que aumenta su intensidad a valores de potenciales más bajos, lo que hace suponer la posibilidad de que existan dos señales. En la figura 9 se puede ver como la banda a aproximadamente 1650 cm<sup>-1</sup> se puede deconvolucionar como suma de otras dos bandas gaussianas-lorentzianas que a 0.4V vs SCE están centradas a 1674 cm<sup>-1</sup> y 1650 cm<sup>-1</sup> como se observa en la figura 10.

Con objeto de explicar la presencia de esta nueva señal y realizar una comparación directa de los resultados obtenidos en los espectros de ATR-SEIRA con los voltagramas, en la figura 5.10 a y b se representan las intensidades integradas y las frecuencias de pico de las bandas obtenidas al deconvolucionar en función del potencial a pH 11.



**Fig. 5.10.-** Espectros ATR-SEIRA para la citosina adsorbida sobre películas de oro desde disoluciones 1 mM de adenina en H<sub>2</sub>O a pH 8 y a un potencial de adsorción de 0.4 V vs SCE. Los espectros están referenciados frente al electrolito soporte al mismo potencial (0.4 V vs SCE). Se incluye la deconvolución de la banda experimental aproximadamente a 1650 cm<sup>-1</sup> en una componente a 1674 cm<sup>-1</sup> (- - -), y otra a 1650 cm<sup>-1</sup> (- - -). El resultado de la combinación de las dos señales deconvolucionadas se muestra también (- - -).

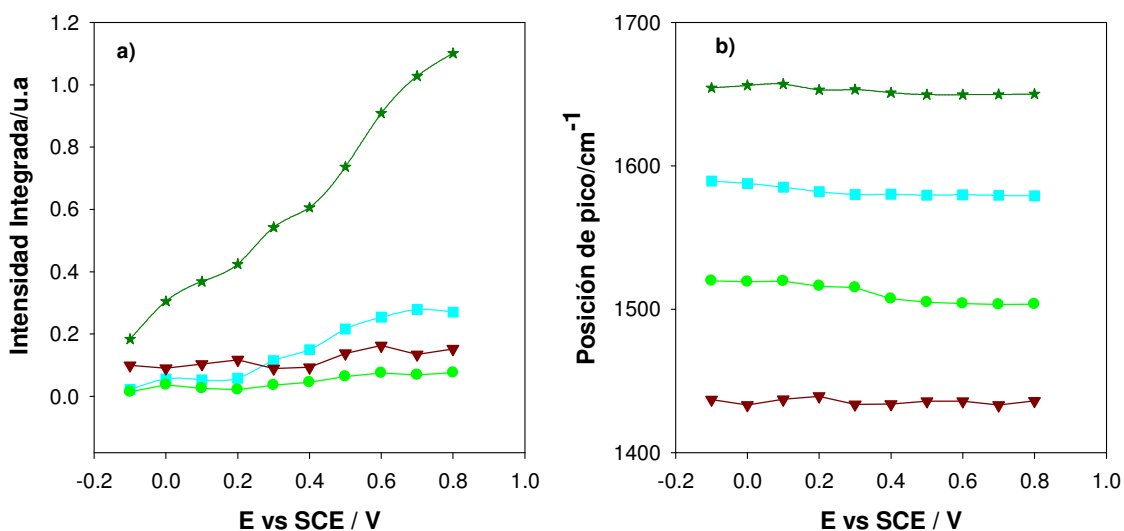


**Fig. 5.11.** a) Representación de las intensidades integradas en función del potencial de las bandas a 1674 cm<sup>-1</sup> (▲), 1648 cm<sup>-1</sup> (\*), 1579 cm<sup>-1</sup> (■), 1503 cm<sup>-1</sup> (●) y 1433 cm<sup>-1</sup> (▼) y b) sus correspondientes posiciones de pico con la misma notación obtenidas al deconvolucionar los espectros de ATR-SEIRA a pH 8 en función del potencial

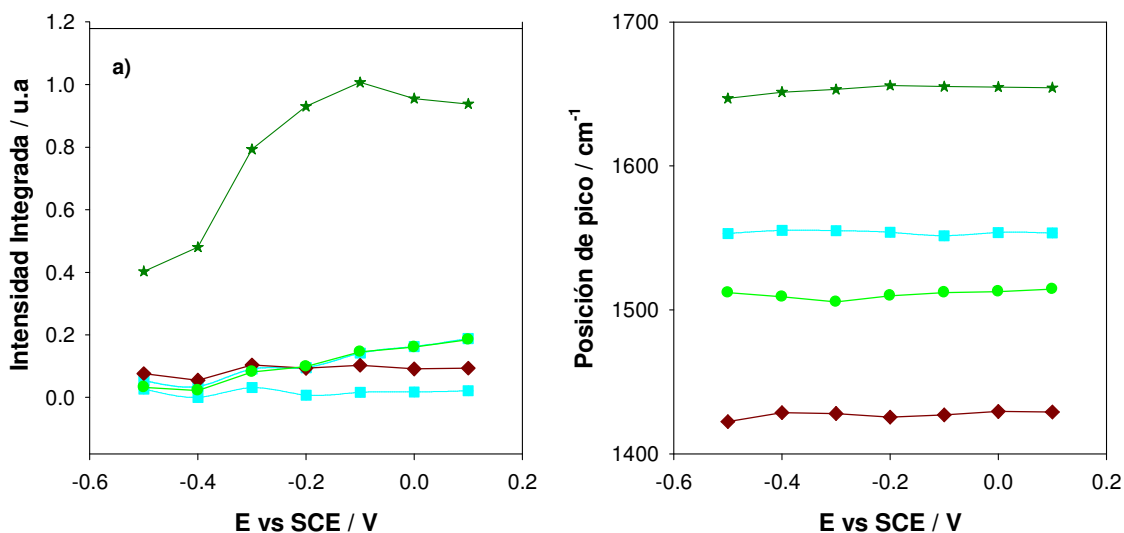
En la figura 5.11 se observa como la componente de frecuencia más alta,  $1674\text{ cm}^{-1}$ , de las dos en las que se deconvoluciona la banda a mayor número de onda disminuye su intensidad a los potenciales más positivos mientras que la componente a menor frecuencia,  $1650\text{ cm}^{-1}$ , obtenida en la misma deconvolución aumenta fuertemente en intensidad con el potencial, especialmente a los potenciales a los que aparece la señal voltamétrica correspondiente a la desorción química de la citosina. Osawa y col., que ya habían observado este comportamiento, asociaron ambas bandas al modo de vibración de tensión de CO de la molécula de citosina, explicando el desplazamiento hacia frecuencias menores con el potencial como un cambio en el estado de adsorción de la molécula con el potencial desde una fase fisisorbida a potenciales bajos hasta una fase quimisorbida cuando aumenta el potencial. Si esta interpretación es correcta, las frecuencias de las bandas en los espectros de adsorción de ATR-SEIRAS a potenciales bajos deberían ser muy parecidas a las que aparecen en el espectro de transmisión de la figura 5.7, o al menos más parecidas que a potenciales altos. Sin embargo ocurre lo contrario, por lo que cabe pensar que el comportamiento observado no se debe solo a la diferencia de fuerza de adsorción (física o química) sino que es posible que esté originado por la adsorción de una especie distinta a los potenciales bajos (posiblemente interaccionando por fuerzas físicas), a la que correspondería la señal a  $1674\text{ cm}^{-1}$ . Cabría pensar entonces que la especie que se adsorbe a bajos potenciales se trata de la molécula de citosina con un distinto grado de protonación o bien un tautómero diferente de la citosina neutra. La primera opción, suponiendo que el campo eléctrico a bajos potenciales estabilizase la citosina protonada podría explicar el desplazamiento al azul de la señal en torno a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , al igual que ocurre al comparar los espectros de transmisión de la citosina neutra y protonada en disoluciones de pH 8 y 1, respectivamente. Sin embargo, ese efecto debería ser más claro a valores menores de pH, en contra de lo observado. Esta opción, no obstante no se puede descartar pues la adsorción química en medio ácido se desplaza a potenciales mucho más altos que a pH neutro, por lo que los potenciales bajos a los que se puede realizar el estudio espectroscópico son relativamente altos como para facilitar la adsorción física. En cuanto a la opción de adsorción de un tautómero diferente a los potenciales bajos y altos, tampoco se puede descartar. Según los cálculos DFT de la bibliografía el tautómero más estable en disolución acuosa es el C2b y veremos después en este capítulo que nuestros datos espectro-electroquímicos sugieren que el tautómero que se adsorbe químicamente a los potenciales altos es el C1. Cabría la posibilidad que a

potenciales bajos tuviera lugar la adsorción de los dos tautómeros: el C2b, por ser el predominante en disolución por fuerzas físicas, y el C1 a medida que se va aumentando el potencial para favorecer la adsorción química<sup>8</sup>.

Se ha realizado el análisis de las intensidades integradas y de las frecuencias de las bandas deconvolucionadas obtenidas a pH 1 y 11.6 que se muestran en las figuras 5.12 y 5.13, respectivamente. A pH 11.6 en la región espectral comprendida entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  la contribución de la tensión OH del medio es muy elevada, por lo que eliminar los efectos del disolvente corrigiendo frente al electrolito soporte en estas condiciones resulta complicado. Para poder realizar un análisis en medio básico los espectros se han corregido, previamente a la deconvolución, frente al espectro registrado en las mismas condiciones al potencial más bajo de -0.8 V vs SCE.



**Fig. 5.12.-** a) Representación de las intensidades integradas en función del potencial de las bandas a 1650  $\text{cm}^{-1}$  (\*), 1583  $\text{cm}^{-1}$  (■), 1510  $\text{cm}^{-1}$  (●) y 1432  $\text{cm}^{-1}$  (▼) y b) sus correspondientes posiciones de pico con la misma notación obtenidas al deconvolucionar los espectros de ATR-SEIRA a pH 1 en función del potencial



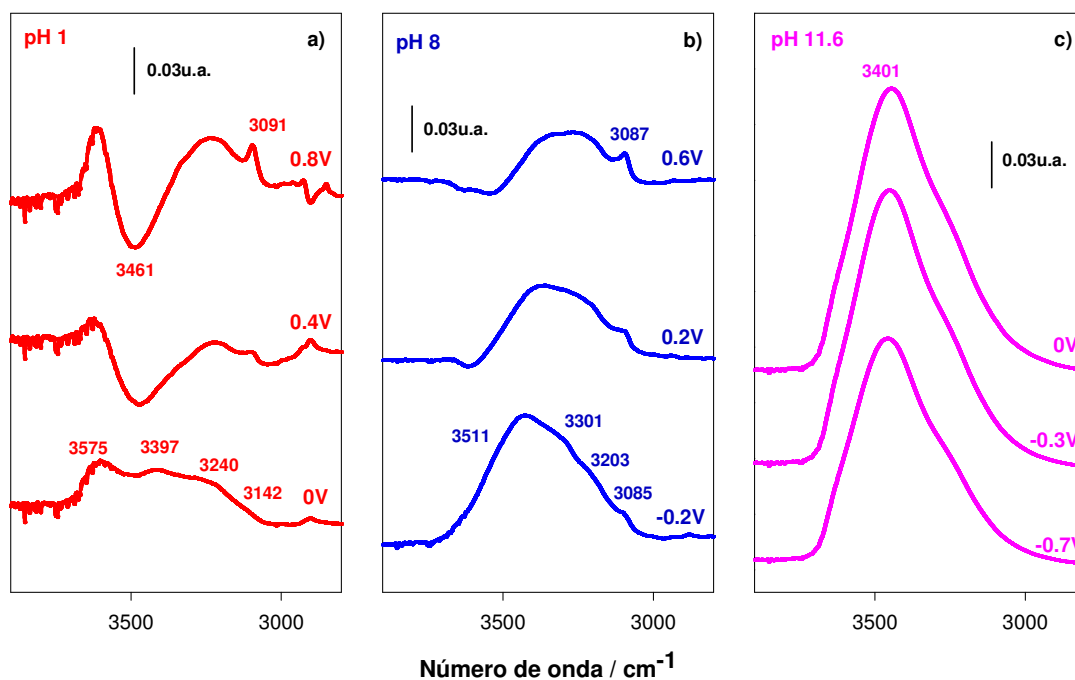
**Fig. 5.13.-** a) Representación de las intensidades integradas en función del potencial de las bandas a  $1650\text{ cm}^{-1}$  (\*),  $1583\text{ cm}^{-1}$  (■),  $1510\text{ cm}^{-1}$  (●) y  $1432\text{ cm}^{-1}$  (▼) y b) sus correspondientes posiciones de pico con la misma notación obtenidas al deconvolucionar los espectros de ATR-SEIRA a pH 11.6 en función del potencial

A valores de pH 8 y 11.6 (Figs. 5.12 y 5.13) solamente se ve una señal a  $1650\text{ cm}^{-1}$  que aumenta con el potencial.

### 5.2.5.3. Región espectral $2800\text{-}3900\text{ cm}^{-1}$

En esta región de los espectros de ATR-SEIRA aparecen las señales correspondientes a las tensiones de NH y  $\text{NH}_2$  además de las señales de tensión de OH del disolvente presente en la interfase. Los espectros de ATR-SEIRA en agua que se muestran en la figura 5.14 proporcionan información de la posible co-adsorción de moléculas de agua en presencia de citosina a los diferentes valores de pH estudiados.

A pH 1 y a potenciales bajos ( $0\text{V vs SCE}$ ) en esta región espectral se observan cuatro señales positivas. Las tres a frecuencias altas a  $3397\text{ cm}^{-1}$ ,  $3240\text{ cm}^{-1}$  y  $3142\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos normales de vibración de tensión simétrica de  $\text{NH}_2$ , tensión de NH y tensión asimétrica de  $\text{NH}_2$  respectivamente mientras que la banda positiva a  $3575\text{ cm}^{-1}$  se asigna a modos normales de tensión de OH de moléculas adsorbidas sobre la superficie electródica, concretamente moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  que están unidas por enlaces de hidrógeno.<sup>9</sup> Más interesante es el hecho de que desaparezca la banda a  $3461\text{ cm}^{-1}$ , asignada a las tensiones de OH formando puentes de H que sugiere que esta se desplaza de la superficie del electrodo al adsorberse la citosina.



**Fig. 5.14.-.** Espectros de ATR-SEIRA en H<sub>2</sub>O de la citosina 1 mM adsorbida sobre electrodos nanoestructurados de oro a los potenciales indicados a a) pH = 1, b) pH = 8 y c) pH = 11.6. Referidos frente al electrolito soporte al mismo potencial.

Siguiendo estas mismas asignaciones a pH 8 (Fig. 5.14b) en todo rango de potenciales se observan cuatro señales asignadas a 3511 cm<sup>-1</sup>, 3301 cm<sup>-1</sup>, 3203 cm<sup>-1</sup> y 3085 cm<sup>-1</sup> que se asignan igual que a pH 1 con los modos de tensión de OH del agua, tensión simétrica de NH<sub>2</sub>, tensión de NH y tensión asimétrica de NH<sub>2</sub>. La adsorción de citosina implica también la co-adsorción del disolvente además aumenta la intensidad de la señal asociada a la vibración de tensión de NH.

A pH 11.6 resulta más complicado ver las señales asociadas a las vibraciones de tensión de NH y NH<sub>2</sub> y el efecto de la co-adsorción de la citosina con el agua debido al gran solapamiento de las tensiones de OH de H<sub>2</sub>O en esta región espectral haciendo complicado observar las modificaciones como consecuencia de la adsorción de la citosina. Sin embargo, el efecto los espectros de la figura 14 en estas condiciones parecen mostrar el mismo comportamiento que a pH 8.

### 5.1.6. Conclusiones

Los resultados espectroelectroquímicos de ATR-SEIRAS in-situ para la citosina 1 mM adsorbida sobre electrodos de oro a pH 1, 8 y 11.6 en H<sub>2</sub>O han permitido analizar su

adsorción en función del pH. La comparación de los espectros en la región de quimisorción con los respectivos espectros de transmisión a todos los valores de pH indica que la especie que se adsorbe es la forma neutra de la citosina en todo el rango de pH estudiado, incluso a valores de pH inferiores del  $pK_{a1}$  a los que la forma mayoritaria es la forma catiónica protonada.

La asignación del espectro experimental en la región  $1300-1800\text{ cm}^{-1}$  de la citosina adsorbida se ha realizado sobre la base de cálculos teóricos de DFT para las moléculas deuteradas y no deuteradas adsorbidas sobre superficies electródicas de oro

A pH 8 la alta resolución y sensibilidad de los experimentos ATR-SEIRAS han permitido deconvolucionar las bandas en torno a  $1650\text{ cm}^{-1}$  en dos bandas gaussianas-lorentzianas. El análisis del comportamiento de las intensidades integradas de estas señales ha permitido estudiar el comportamiento con el potencial de ambas bandas sugiriendo la existencia a potenciales bajos de una forma distinta de citosina adsorbida; bien con distinto grado de protonación o un tautómero diferente.

Los resultados espectro-electroquímicos de ATR-SEIRAS en la región  $2800-3900\text{ cm}^{-1}$  han permitido concluir que la citosina al adsorberse químicamente sobre electrodos nano-estructurados de oro desplaza a moléculas de agua de la superficie que estaban adsorbidas.

## 5.2 Adsorción de Guanina sobre Electrodo de Oro.

### 5.2.1. Introducción

En disolución acuosa la guanina presenta dos equilibrios ácido-base, con valores de  $pK_a$  4.2 y 9.5, respectivamente (Fig. 5.15). En medios deuterados los protones de los grupos aminos primarios y secundarios se intercambian por deuterio dando lugar a la guanina deuterada en mayor o menor proporción en función del pD del medio.

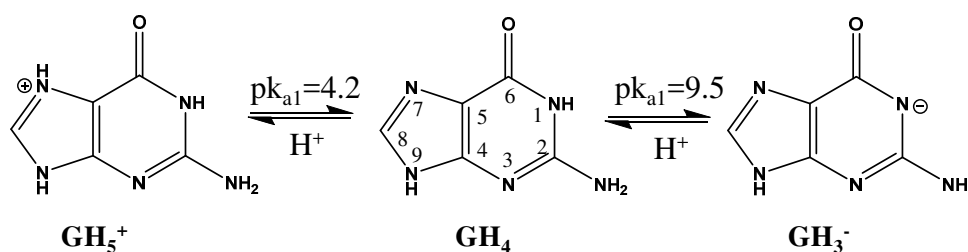


Fig. 5.15 Comportamiento ácido-base de la guanina

Entre los pocos estudios realizados acerca de la adsorción de la guanina sobre electrodos de oro se han llevado a cabo medidas de STM<sup>10</sup> que confirman la formación de matrices poliméricas de moléculas de guanina sobre la superficie electródica.. Actualmente la mayor parte de los estudios de guanina se centran en el proceso de oxidación electroquímica de la guanina, que implica dos protones y dos electrones, que como han descrito E. Ferapontova y col.<sup>11</sup>

Por otro lado, en la bibliografía existen pocos estudios que incluyan los espectros IR de la guanina, debido a las dificultades experimentales que presentan: por una parte, su baja solubilidad en agua dificulta la obtención de los espectros de transmisión en disolución acuosa. Por otro lado, la guanina posee una alta capacidad de formar enlaces de hidrógeno, por lo que tiene el calor de sublimación más alto de todas las bases del ADN<sup>12,13</sup>, lo que hace difícil obtener los espectros de transmisión experimentales en estado gaseoso. Además, en disolución y en estado sólido las moléculas de guanina pueden participar en numerosas interacciones intermoleculares que causan una considerable distorsión de todas las propiedades fisicoquímicas en comparación con las moléculas libres, entre ellas en sus espectros de IR.

En esta parte del capítulo se utiliza la espectroscopía ATR-SEIRA (descrita en detalle en el capítulo 2) para estudiar la adsorción de guanina sobre electrodos de oro a



distintos valores de pH. El rango de pH se ha seleccionado de forma que cubra ambos valores de  $pK_a$  de la guanina con el objetivo de estudiar la posible adsorción de la guanina en diferentes estados de protonación en función del pH del medio. Para poder estudiar la adsorción de la guanina sin la interferencia de otras especies, como la formada en el proceso de oxidación, ha sido necesario limitar el rango de potenciales con objeto de evitar la oxidación de la guanina, dependiente del pH.

Los resultados espectroscópicos se han interpretado haciendo uso de los espectros en estado sólido de la bibliográfica, además de los cálculos DFT de las moléculas de guanina neutra y aniónica aisladas. Los espectros de transmisión no se han podido obtener debido a que la baja solubilidad que presenta la guanina en medio acuoso hace imposible obtener una relación señal/ruido aceptable.

Además se ha determinado la influencia del campo eléctrico en la orientación del plano molecular y los sitios de interacción con el metal de la guanina a los diferentes pH estudiando la orientación de los modos normales de vibración en la región espectral entre  $1600-1800\text{ cm}^{-1}$  que comprende fundamentalmente las tensiones de CO, CN, CC y las de flexión de  $\text{NH}_2$ . Los resultados se han explicado sobre la base de la interacción del momento dipolar permanente de la molécula con el campo eléctrico.

Finalmente se incluye el estudio de la coadsorción del agua con la guanina partir del análisis de la región espectral  $2800-3900\text{ cm}^{-1}$ ).

## **5.2.2. Experimental**

### **5.2.2.1. Reactivos**

Se utilizó  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura y  $\text{D}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich®) para preparar la disolución de electrolito soporte ( $\text{HClO}_4$  0.1 M,  $\text{KClO}_4$  0.1 M  $\text{NaF}$  0.1 M y  $\text{NaF}$  0.1 M +  $\text{NaOH}$ ) y la disolución de stock de guanina (Sigma-Aldrich® sin más purificación) de la máxima concentración que se han podido preparar a cada valor de pH (1 mM a pH 1 y 11.5 y 0.025 mM a pH 8). Los experimentos de infrarrojos obtenidos en configuración de reflexión interna se realizaron tanto en  $\text{H}_2\text{O}$  en todo rango de pH y en  $\text{D}_2\text{O}$  solamente a pD 8 en los mismos electrolitos soportes ( $\text{HClO}_4$  0.1 M a pH 1,  $\text{KClO}_4$  0.1 M a pH 5  $\text{NaF}$  0.1 M a pH 8 y  $\text{NaF}$  0.1 M +  $\text{NaOH}$  a pH 11.6). La concentración de guanina en estos experimentos fue 0.01 mM a pH 8 y 0.02 mM a pH 1 y a pH 11.56.

Para evitar la oxidación de la guanina se ha modificado ligeramente el procedimiento que se ha utilizado en los capítulos previos de la tesis. Por un lado se han realizado las adiciones a un potencial suficientemente bajo, y para obtener los espectros de ATR-SEIRA a distintos potenciales se han realizado barridos lentos (2mV/s) se han acumulado 100 interferogramas por espectro. En todo momento el potencial aplicado ha sido inferior al potencial de oxidación de la guanina.

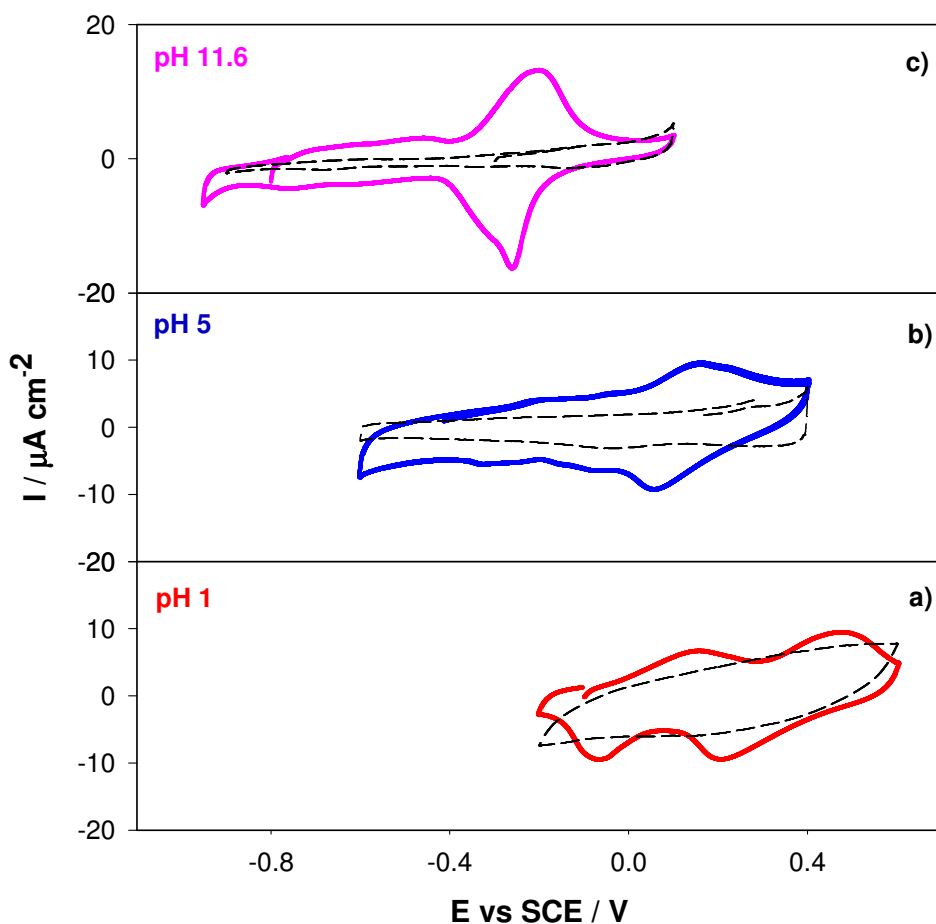
### **5.2.3. Resultados de Voltametría cíclica**

En la figura 5.16 se muestran los voltagramas cíclicos obtenidos a diferentes valores de pH para disoluciones de guanina sobre electrodos monocristalinos de Au(111) que incluyen la región de adsorción química y de oxidación.

A pH 5 se observan dos señales voltamétricas una primera a -0.2 V vs SCE que se asocia con el proceso de adsorción/desorción químico de la guanina sobre la superficie del oro y la segunda a potenciales más altos (0.2 V vs SCE), que puede relacionarse con la oxidación electroquímica de la guanina, que implica dos protones y dos electrones, descrita por E. Ferapontova y col.<sup>11</sup> Así, como consecuencia de este proceso han descrito que se origina una nueva especie electroactiva, la oxoguanina. Se ha comprobado que si no se alcanzan los potenciales altos de oxidación se recuperan las condiciones iniciales mientras que si se llega a los valores de potenciales de oxidación de la guanina no se recupera el voltagrama inicial.

A pH 1 se puede distinguir claramente que la primera onda de oxidación de la guanina igual a la descrita por E. Ferapontova y col.<sup>11</sup> aparece en el barrido anódico a 0.1V vs SCE y se desplaza hacia potenciales más bajos al aumentar el valor del pH.

Finalmente a pH 11.6 cabría la duda de que la señal que aparece a -0.1V vs SCE corresponda al proceso de oxidación/reducción al igual que en los otros pH o que corresponda con un proceso de adsorción/desorción. El estudio de la influencia de la velocidad de barrido en voltametría cíclica a este valor de pH ha permitido confirmar que estos picos corresponden a un proceso de oxidación/reducción.

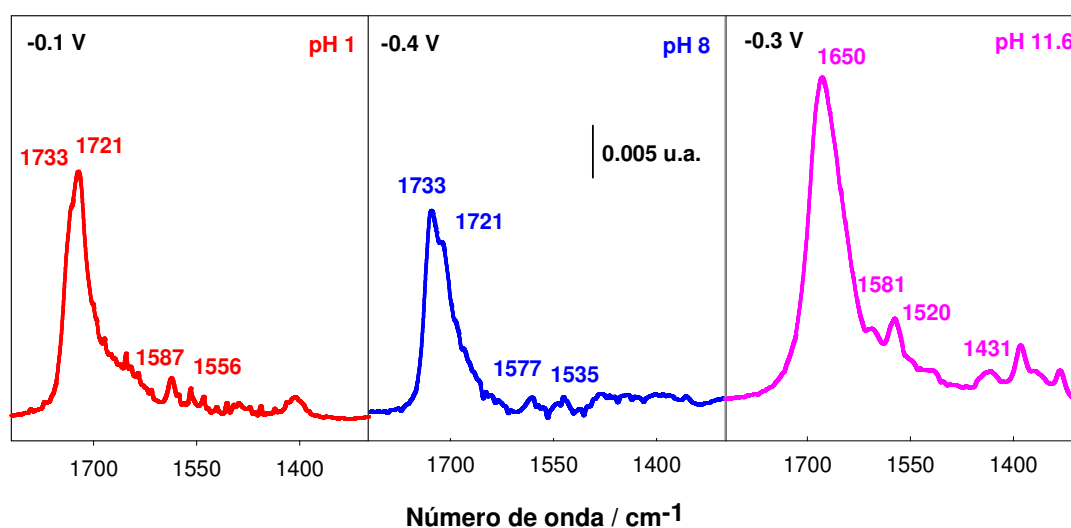


**Fig. 5.16.-** Voltagramas estacionarios obtenidos con electrodos de Au(111) en disoluciones de guanina a) 0.04 mM, b) 0.025mM y c) 0.05mM a los valores de pH indicados. Velocidad de barrido 50mV/s. Se incluyen en línea discontinuas negras los voltagramas del electrolito soporte a 50 mV/s.

## 5.2.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la Guanina Adsorbida sobre Electrodo de Oro

### 5.2.4.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1300 a 1800 $\text{cm}^{-1}$

Se han realizado los espectros de ATR-SEIRA sobre electrodos de oro en contacto con disoluciones de guanina 0.02 mM a pH 1 y 11.6 y 0.01 mM a pH 8. Algunos resultados, obtenidos a potenciales de la adsorción química se muestran en la figura 5.17.



**Fig. 5.17.-** Espectros de ATR-SEIRA, en la región entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$ , para la guanina adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones 0.02 mM (pH 1 y 11.6) y 0.01 mM (pH 8) en  $\text{H}_2\text{O}$ , a los valores de pH y a los potenciales indicados. Los espectros están referidos a las señales obtenidas en el electrolito soporte al mismo potencial.

Como ocurre con el resto de las bases estudiadas anteriormente los espectros de ATR-SEIRA en  $\text{H}_2\text{O}$  muestran una clara dependencia con el pH. A pH 1 y 8 presentan las mismas características; una banda doble e intensa de absorción a 1733 y 1712  $\text{cm}^{-1}$ . Además en medio ácido entre 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$  se pueden distinguir dos señales débiles a 1587 y 1556  $\text{cm}^{-1}$ . Por el contrario, en medio básico se observan tres señales a 1676, 1606 y 1570  $\text{cm}^{-1}$  siendo la primera la de mayor intensidad. El hecho de que los espectros obtenidos para la guanina adsorbida sobre oro desde disoluciones ácidas y neutras sean muy parecidos sugiere que la especie adsorbida en medio ácido y en medio neutro es la misma, independientemente de que la especie mayoritaria en disolución tenga distinto grado de protonación en cada caso. Por el contrario, en medio básico, a pH superior al  $\text{pK}_{a2}$  de la guanina, las diferencias en el espectro ATR-SEIRA respecto de los espectros en medio neutro y ácido indican que la especie química adsorbida es diferente, probablemente la forma aniónica de la guanina ( $\text{GH}_3^-$ ).

Las señales principales de los espectros en medio ácido y neutro son muy parecidas a las obtenidas en estado sólido por Lopes y col.<sup>14</sup> para la guanina anhidra. Estos últimos autores realizaron cálculos DFT de moléculas de guanina aisladas y de patrones cristalinos periódicos, incluyendo las interacciones intermoleculares por tres puentes de hidrógeno entre moléculas de guanina. Estos últimos cálculos suministraron frecuencias

teóricas de vibración muy similares a las de los espectros experimentales mostrados en la figura 5.17. En la Tabla 3 se comparan los las bandas principales de los espectros de ATR-SEIRA de la guanina adsorbida sobre oro en medios neutros y ácidos con las experimentales del estado sólido<sup>15</sup> y con las calculadas de la bibliografía <sup>14</sup> para la molécula cristalina sobre la base de cálculos DFT periódicos que incluían interacciones intermoleculares.

**Tabla 3.** Frecuencias de vibración de los espectros experimentales y teóricos para la guanina policristalina no deuterada en comparación con las frecuencias de vibración experimentales a pH 1 y 8 para los espectros de ATR-SEIRA para la guanina adosrbida sobre electrodos nanoestructurados de oro

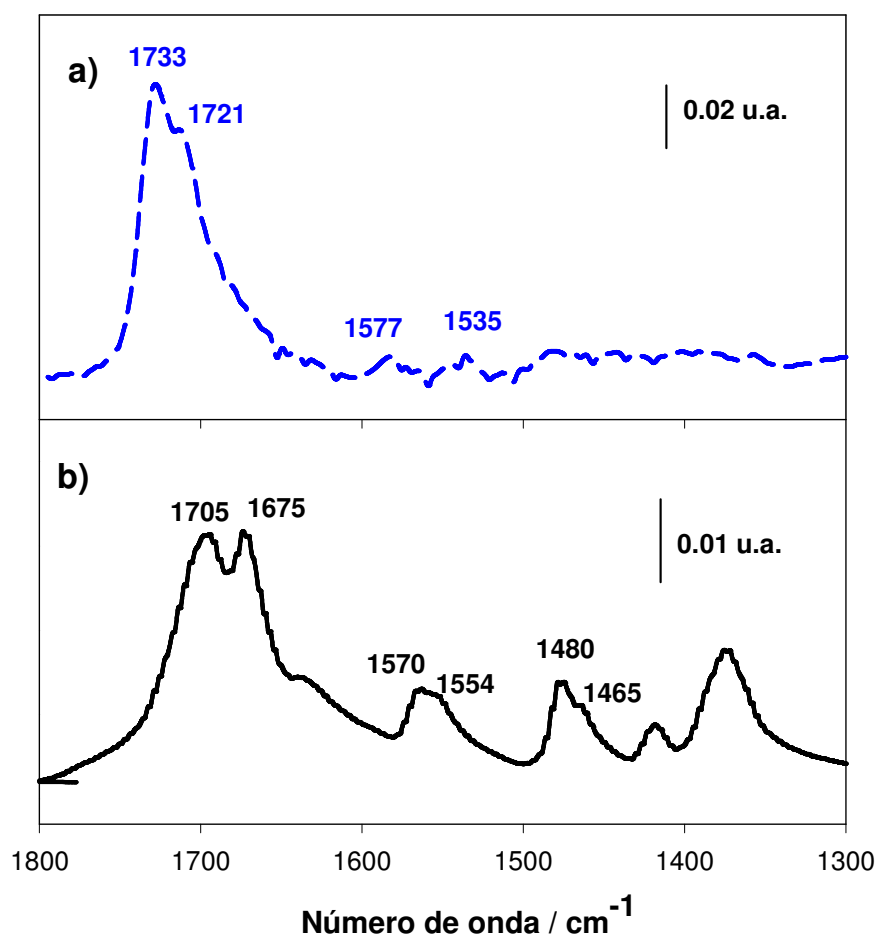
Espectros en estado sólido		Espectros ATR-SEIRA	
<u>Calculado</u> <sup>14</sup>	<u>Exp.</u> <sup>15</sup>	<u>pH 1</u>	<u>pH 8</u>
1706 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub> + str C <sub>6</sub> O+str C <sub>2</sub> N <sub>2</sub> +bend N <sub>1</sub> H	1700 cm <sup>-1</sup>	1733 cm <sup>-1</sup>	1733 cm <sup>-1</sup>
1670 cm <sup>-1</sup> ; str NN <sub>2</sub> + str C <sub>2</sub> N <sub>1</sub> + str C <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	1675 cm <sup>-1</sup>	1721 cm <sup>-1</sup>	1721 cm <sup>-1</sup>
1567 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> N <sub>2</sub> +s tr C <sub>4</sub> N <sub>3</sub> str C <sub>4</sub> C <sub>5</sub> + str C <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	1566 cm <sup>-1</sup>	1587 cm <sup>-1</sup>	1577 cm <sup>-1</sup>
1549 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>8</sub> N <sub>9</sub> + str C <sub>4</sub> N <sub>9</sub>	1554 cm <sup>-1</sup>	1556 cm <sup>-1</sup>	1535 cm <sup>-1</sup>

(w-débil, m-medio, vs-muy fuerte, s-fuerte, str- tensión , bend- flexión)

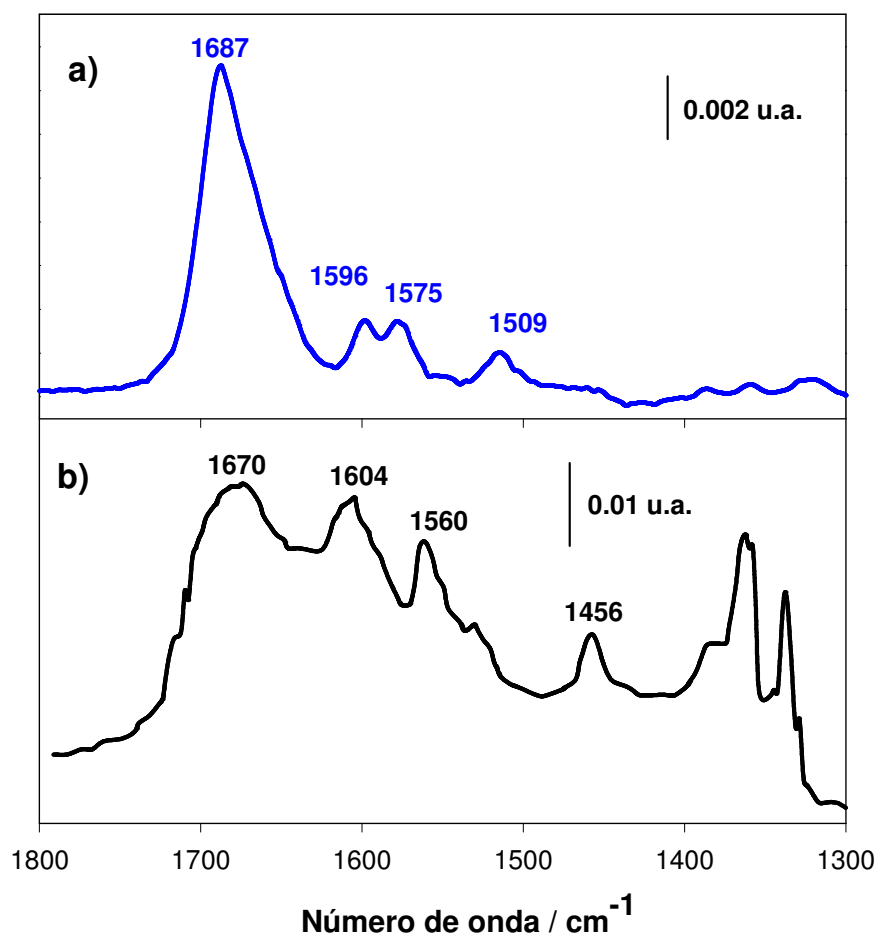
Las dos bandas intensas a 1733 y 1721 cm<sup>-1</sup> para la guanina adsorbida a pH < pK<sub>a2</sub> pueden describirse como bandas de combinación que contienen contribuciones de las vibraciones de tensión de CO y flexiones de NH<sub>2</sub>. Estas bandas se desplazan 33 y 46 cm<sup>-1</sup> hacia número de onda mayor cuando la molécula de guanina se adsorbe sobre la superficie electródica de Au(111). El resto de las señales que aparecían en estado sólido relacionadas fundamentalmente con tensión CC y CN y flexiones NH y CH disminuyen en intensidad. Esta comparación permite proponer que la especie adsorbida a valores de pH inferiores al pK<sub>a2</sub> es la forma neutra de la guanina. Por el contrario el espectro de la guanina en medio fuertemente básico no puede explicarse con el espectro del estado sólido.

A pH 8 en medio deuterado se han registrado los espectros de ATR-SEIRA de la guanina adsorbida sobre electrodos de oro. En la figura 5.19 se observa como al igual que ocurría en medio no deuterado, las frecuencias del espectro de la adenina neutra en D<sub>2</sub>O en la región de 1300-1800 cm<sup>-1</sup> son muy similares a las del espectro en estado sólido, aunque la intensidad relativa de las señales es claramente diferente: se mantiene una banda intensa de absorción a 1676 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a la tensión de CO,

mientras que disminuyen bastante las intensidades de las señales a frecuencias menores: a  $1610\text{ cm}^{-1}$ , debido a que la vibración del grupo amino se desplaza a frecuencias más bajas como consecuencia de su deuteración. El resto de las señales ( $1564$ ,  $1579$  y  $1509\text{ cm}^{-1}$ ) corresponden con tensiones CC y CN al igual que en el estado sólido.



**Fig. 5.18.-** Espectros de absorción de infrarrojos guanina a) espectro de ATR-SEIRA en  $\text{H}_2\text{O}$  para la guanina adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones 0.01 mM a pH 8 y -0.04V vs SCE y b) policristalina monohidratada no deuterada<sup>15</sup>



**Fig. 5.19.-** Espectros de absorción de infrarrojos guanina a) de ATR-SEIRA en D<sub>2</sub>O para la guanina 0.01 mM adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones 0.01 mM a pD 8 y -0.1 V vs SCE y c) policristalina monohidratada deuterada.<sup>16</sup>

Para proponer una orientación de la molécula de guanina respecto al electrodo a los diferentes valores de pH se han realizado cálculos DFT de las moléculas de guanina neutra y aniónica aisladas, deuterada y sin deuterar. Los valores de las frecuencias de vibración en la región alrededor de 1600 cm<sup>-1</sup> calculadas para las geometrías optimizadas vienen dadas en la Tabla 4, en comparación con los valores experimentales

**Tabla 3.** Frecuencias de vibración de los espectros experimentales para la guanina en H<sub>2</sub>O y las frecuencias de vibración teóricas obtenidas por cálculos DFT para la guanina neutra y desprotonada comparados con los espectros experimentales y teóricos para la guanina policristalina y gaseosa.

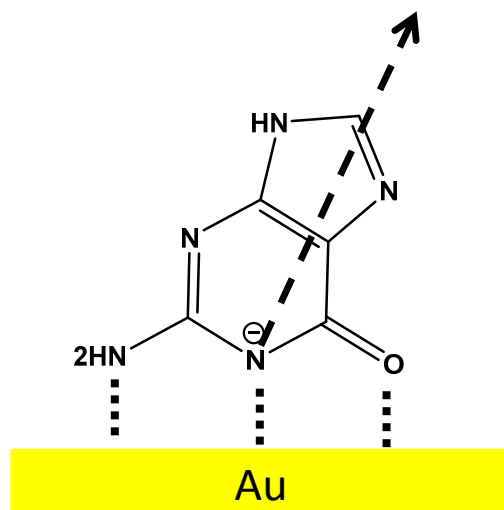
<u>Calculado GH<sub>4</sub></u>	<u>Expe. GH<sub>4</sub></u>	<u>Calculado GH<sub>3</sub><sup>-</sup></u>	<u>pH 1 v 8</u>	<u>pH 11.6</u>	<u>Calculado GD<sub>4</sub></u>	<u>Exp.<sup>15</sup></u>
vs-1729* cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>6</sub> O+bendNH <sub>2</sub>	1733cm <sup>-1</sup>		1733 cm <sup>-1</sup>			
			1721 cm <sup>-1</sup>			
	1721cm <sup>-1</sup>	vs-1603* cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>6</sub> O+ bend NH <sub>2</sub>		1676 cm <sup>-1</sup>	vs-1721* cm <sup>-1</sup> ; str CO	1687 cm <sup>-1</sup> ;
		m-1563 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> N <sub>3</sub>		1606 cm <sup>-1</sup>	vs-1547 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	
s-1593 cm <sup>-1</sup> ; bend NH <sub>2</sub>			1587 cm <sup>-1</sup>			
		m-1548* cm <sup>-1</sup> ; str NH <sub>2</sub>		1570 cm <sup>-1</sup>	w-1527* cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> N <sub>3</sub>	1596 cm <sup>-1</sup> ;
m-1551 cm <sup>-1</sup> ; bend NH <sub>2</sub> + str C <sub>4</sub> N <sub>3</sub>			1556 cm <sup>-1</sup>		m-1499* cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> + str C <sub>5</sub> C <sub>6</sub>	1575 cm <sup>-1</sup> ;
w-1540 cm <sup>-1</sup> ; bend NH <sub>2</sub> + str C <sub>4</sub> C <sub>5</sub>						
		m1476 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>2</sub> N <sub>3</sub>		1433 cm <sup>-1</sup>		
		1437 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>8</sub> N <sub>7</sub>		1389 cm <sup>-1</sup>		
		1437 cm <sup>-1</sup> ; str C <sub>4</sub> C <sub>5</sub> +str C <sub>8</sub> N <sub>7</sub>		1333 cm <sup>-1</sup>		

(w-débil, m-medio, vs-muy fuerte, s-fuerte, str- tensión , bend- flexión)



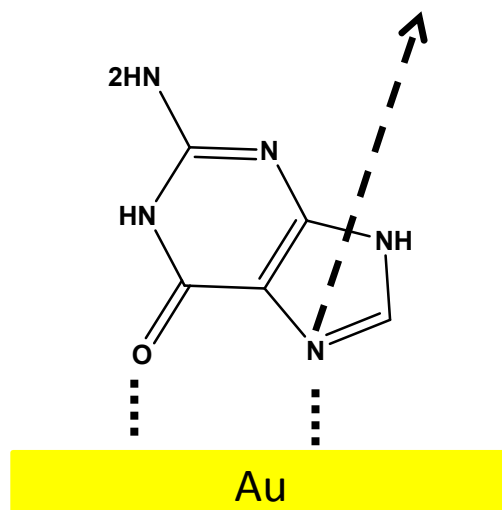
El espectro teórico de la guanina aniónica presenta una banda intensa a  $1603\text{ cm}^{-1}$  debido fundamentalmente a la vibración de tensión de CO y con contribución flexión de  $\text{NH}_2$ , seguida de dos señales a  $1563$  y  $1548\text{ cm}^{-1}$  asignadas a la vibración de tensión  $\text{C}_4\text{N}_3$  y a la vibración de tensión del grupo amino secundario respectivamente. El resto de las vibraciones a menores números de onda se asignan a tensiones CN y CC. La comparación de las frecuencias teóricas correspondientes a la guanina aislada y las experimentales correspondientes a la molécula adsorbida no es muy satisfactoria. No obstante, los cálculos teóricos permiten clasificar las señales de vibración en la región de  $1300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  entre aquellas con un momento de transición preferentemente alineado a lo largo del enlace del grupo carbonilo, señaladas con asterisco en la Tabla 4, y las señales que tienen el momento de transición preferentemente alineado en la dirección perpendicular a la anterior. Así, por ejemplo para la guanina aniónica, el primer grupo estaría constituido por la señal a  $1676\text{ cm}^{-1}$  que tiene una vibración alineada con el grupo CO de la molécula y la señal a  $1570\text{ cm}^{-1}$  asignada a la flexión del grupo amino, mientras el resto de las señales constituirían el segundo grupo que poseen direcciones perpendiculares al grupo carbonilo.

Todas estas señales corresponden a vibraciones en el plano molecular de la guanina, por lo que de acuerdo con la regla de selección superficial la guanina aniónica a  $-0.3\text{V}$  vs SCE debe adsorberse sobre la superficie del electrodo con su plano molecular perpendicular, o al menos parcialmente inclinado respecto a la superficie del electrodo. Por otro lado, el hecho de que la intensidad relativa de las bandas de a  $1676\text{ cm}^{-1}$  y  $1570\text{ cm}^{-1}$  sea superior en el espectro experimental que las correspondientes señales teóricas, sugiere que la molécula se orienta de tal forma que dichas vibraciones se encuentren en una dirección más perpendicular al electrodo la molécula de guanina aniónica podría coordinarse a la superficie electródica a través de sus grupos carbonilos y el  $\text{N}_1$  desprotonado (Fig. 5.20).



**Fig. 5.20.-** Modelo de adsorción propuesto para la guanina aniónica a pH 11.6. Está representado en la molécula el momento dipolar permanente (flecha negra discontinua).

Para la guanina neutra el espectro teórico muestra dos señales a  $1729$  y  $1593\text{ cm}^{-1}$  que corresponden con las señales experimentales a  $1733 / 1721\text{ cm}^{-1}$  y  $1587\text{ cm}^{-1}$ , que se asignan a los modos normales de vibración de tensión de CO y flexión de  $\text{NH}_2$ . Las dos señales a números de onda menores se asignan de nuevo a modos normales de tensión CC y CN. Es posible de nuevo realizar un análisis similar al anterior y clasificar las señales en dos grupos igual que en el caso de la citosina aniónica. En esta ocasión las dos señales más intensas del espectro corresponden a la que tiene la dirección paralela al grupo CO y al grupo  $\text{NH}_2$ . De acuerdo con la regla de selección superficial la molécula de guanina debe orientarse con sus grupos amino y/o carbonilo de manera que las vibraciones asociadas tengan una componente normal respecto a la superficie del electrodo. Por otro lado, en medio ácido cuando la especie mayoritaria es la guanina protonada, la molécula de guanina debía desprotonarse en  $\text{N}_7$  antes de adsorberse lo que sugiere, de forma análoga a lo encontrado en la adsorción de adenina sobre oro, que la molécula de guanina podría orientarse con el nitrógeno  $\text{N}_7$  hacia el electrodo que participa en el primer equilibrio ácido base. Esa orientación, representada en la figura 21, de la molécula, con el grupo carbonilo y el nitrógeno  $\text{N}_7$  dirigidos hacia la superficie del electrodo también está favorecida por las interacciones entre el campo eléctrico y el momento dipolar permanente de la molécula.

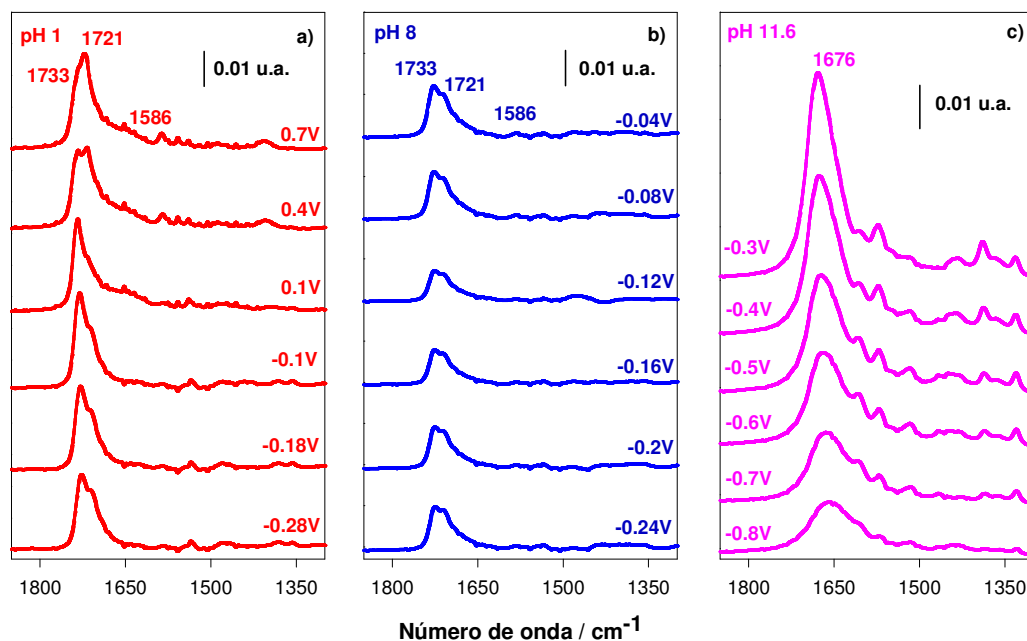


**Fig. 21.** Modelo de adsorción propuesto para la guanina neutra a pH 1 y 8. Está representado en la molécula el momento dipolar permanente (flecha negra discontinua).

Esta orientación puede confirmarse mucho mejor con los resultados en D<sub>2</sub>O ya que las dos señales a 1670 y 1610 cm<sup>-1</sup> tienen direcciones muy diferentes mientras que la primera es paralela al grupo carbonilo la segunda es perpendicular al mismo. Al ser la primera banda mucho más intensa en el espectro experimental se confirma la hipótesis de que el grupo carbonilo debe estar orientado en una dirección próxima a la perpendicular respecto a la superficie del electrodo

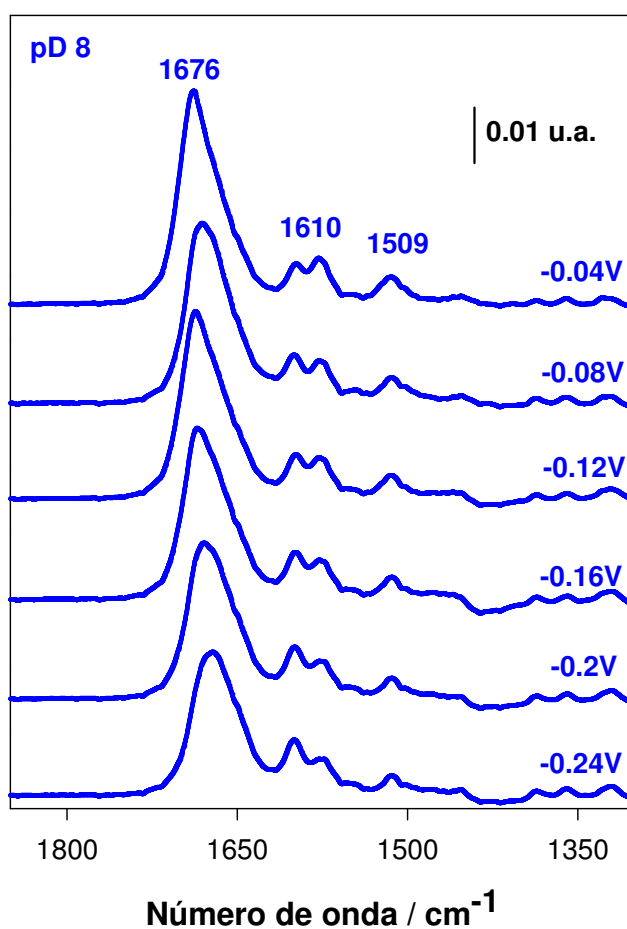
#### **5.2.4.2. Influencia del potencial en la adsorción de guanina adsorbida sobre electrodos de oro**

En la figura 5.22 se muestran los espectros de ATR-SEIRA a diferentes valores de potencial inferiores a la oxidación de la guanina, a los tres valores de pH.



**Fig. 5.22.-** Espectros de ATR-SEIRAS para la guanina adsorbida sobre electrodos de oro en H<sub>2</sub>O a los potenciales indicados a a) pH 1 y b) pH 8 y c) pH 11.6. Referidos al electrolito soporte al mismo potencial.

A pH 1 y 8 no se observa prácticamente influencia del potencial en las señales correspondientes a la guanina adsorbida. Hay señales activas en todo el rango de potenciales estudiado se puede observar que las señales aumentan muy poco en intensidad y no se desplazan al aumentar el potencial. Sus intensidades relativas permanecen prácticamente inalteradas Por tanto la molécula de guanina neutra debe estar adsorbida en este rango de potencial, con los mismos excesos superficiales y orientación. Este mismo efecto se puede observar en los espectros ATR-SEIRA registrados desde disoluciones de D<sub>2</sub>O a pD 8.

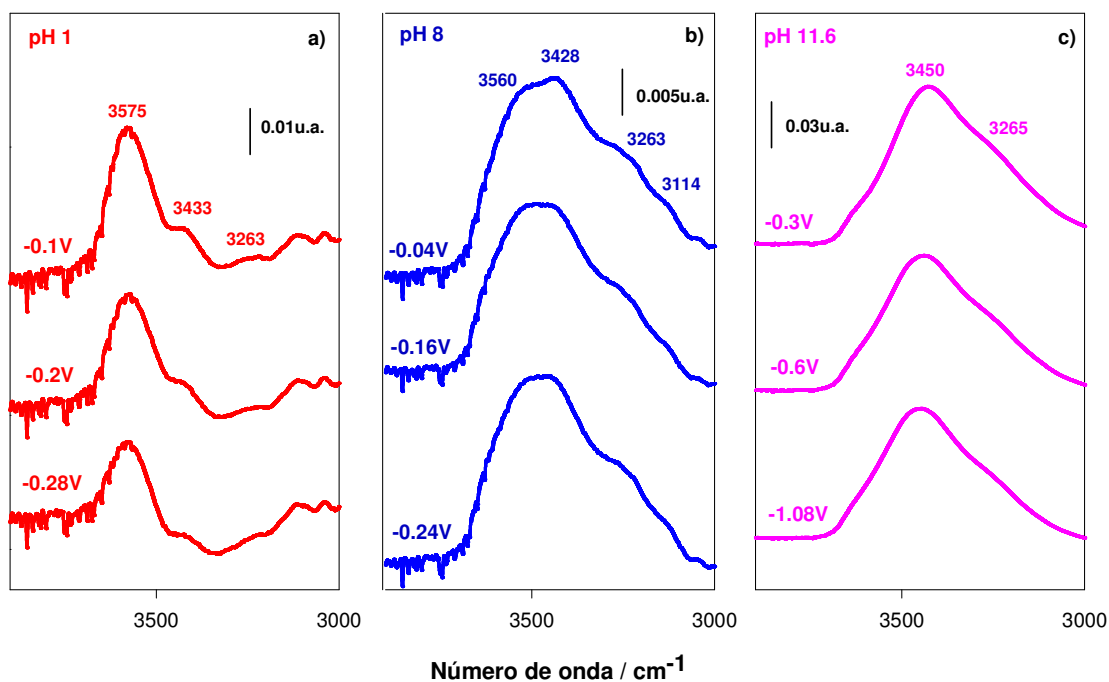


**Fig. 5.23** Espectros de ATR-SEIRAS para la guanina adsorbida sobre electrodos de oro en D<sub>2</sub>O a los potenciales indicados a pD 8. Referidos al electrolito soporte al mismo potencial.

A pH 11.6 el rango de potenciales que se han podido estudiar es más amplio y permite comprobar cómo las señales correspondientes a la guanina aniónica adsorbida aumentan con el potencial, aunque las intensidades relativas no muestran cambios significativos, por lo que no parece que la orientación de la molécula adsorbida cambie apreciablemente con el potencial

#### 5.2.4.3. Región espectral 2800-3900 cm<sup>-1</sup>

Los espectros en esta región, en la que deben aparecer las señales correspondientes a las tensiones de NH y OH para la guanina adsorbida, se muestran en la figura 5.24 a los tres valores de pH investigados.



**Fig. 5.24.-.** Espectros de ATR-SEIRA en H<sub>2</sub>O de la guanina 0.02 mM (pH 1 y 11.56) y 0.01 mM (pH 8) adsorbida sobre electrodos nanoestructurados de oro a los potenciales indicados a a) pH = 1, b) pH = 8 y c) pH = 11.6. Referidos frente al electrolito soporte al mismo potencial

A los tres valores de pH estudiados se pueden observar las señales a aproximadamente 3260 y 3430 cm<sup>-1</sup> correspondientes a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica de NH<sub>2</sub>, solapadas con la banda positiva a 3575 cm<sup>-1</sup> se asigna a modos normales característica de la tensión de OH libre, de moléculas de H<sub>2</sub>O que no están unidas por enlaces de hidrógeno.<sup>9</sup> Esta señal de OH es especialmente intensa en medio ácido, lo que indica que, en estas condiciones, la coadsorción de agua con la guanina es más importante que a pH 8 y 11.56.

### 5.2.5. Conclusiones

El estudio espectro-electroquímico por ATR-SEIRAS de la adsorción de guanina sobre electrodos de oro nanoestructurados ha permitido comprobar que en medios neutros y ácidos se adsorbe la guanina neutra mientras que en medios fuertemente básicos lo hace la forma aniónica.

Las intensidades relativas de las señales de los espectros vibracionales de la guanina adsorbida en comparación con lo observado en los espectros de transmisión y los cálculos teóricos, han permitido sugerir que la guanina neutra se adsorbe con el grupo

carbonilo,  $C_6=O$  y el  $N_7$  desprotonado orientados hacia la superficie del electrodo, a potenciales inferiores al de oxidación de la molécula, tanto a pH 1 como 8. En medios más básicos, la guanina aniónica se adsorbe con los fragmentos de  $C_6=O$ ,  $NH_2$  y  $N_1$  orientados hacia la superficie del electrodo. En ambos casos el momento dipolar permanente de la molécula presenta una alineación favorable con el campo eléctrico.

Finalmente los espectros de ATR-SEIRAS en la región  $3600-3000\text{ cm}^{-1}$  ponen de manifiesto la co-adsorción de guanina y agua.

## 5.3 Co-Adsorción de Guanina y Citosina sobre Electrodo de oro

### 5.3.1. Introducción

La guanina y la citosina pueden interactuar entre sí a través de puentes de hidrógeno de tipo Watson–Crick (WC) o Hoogsteen (HG) como se ha descrito previamente en esta tesis. El estudio de la co-adsorción de este par de bases complementarias, al igual que ocurría en el caso de la timina y la adenina, muestra especial interés ya que la interfase electrodo disolución permite mimetizar las interfaces biológicas en las que tienen lugar la mayor parte de los procesos en los que están implicadas la citosina y la guanina. De esta forma el estudio su la co-adsorción en interfaces electrodo | disolución puede ayudar a entender a nivel fundamental algunos de los procesos que tienen lugar en las interfaces biológicas reales.

Debido a las dificultades experimentales en los estudios de adsorción individual de guanina, que en el caso particular del electrodo de oro se ha descrito que está próximo a la oxidación.<sup>11</sup>, los estudios de co-adsorción de citosina y guanina son aún más escasos que los de adenina y timina como se describió en capítulo 1.

En esta última parte del capítulo se utiliza la espectroscopia de ATR-SEIRA para estudiar la co-adsorción de citosina y guanina sobre electrodos de oro en el mismo rango de pH que están estudiadas las adsorciones individuales de dichas bases. Los resultados se analizan sobre la base de la adsorción de dos formas de guanina en principio una forma de citosina aunque no se puede descartar la existencia de alguna otra forma tautomérica de la citosina. La comparación de los espectros de ATR-SEIRA de la co-adsorción con los correspondientes espectros para la adsorción de las bases individuales a los distintos valores de pH ha permitido decidir sobre las interacciones de la citosina y la guanina sobre la superficie del electrodo. El rango de potenciales para estudiar la co-adsorción ha tenido que limitarse para evitar tener interferencias de otras especies, como la formada en el proceso de oxidación, igual que en el apartado anterior de la tesis.



## **5.3.2. Experimental**

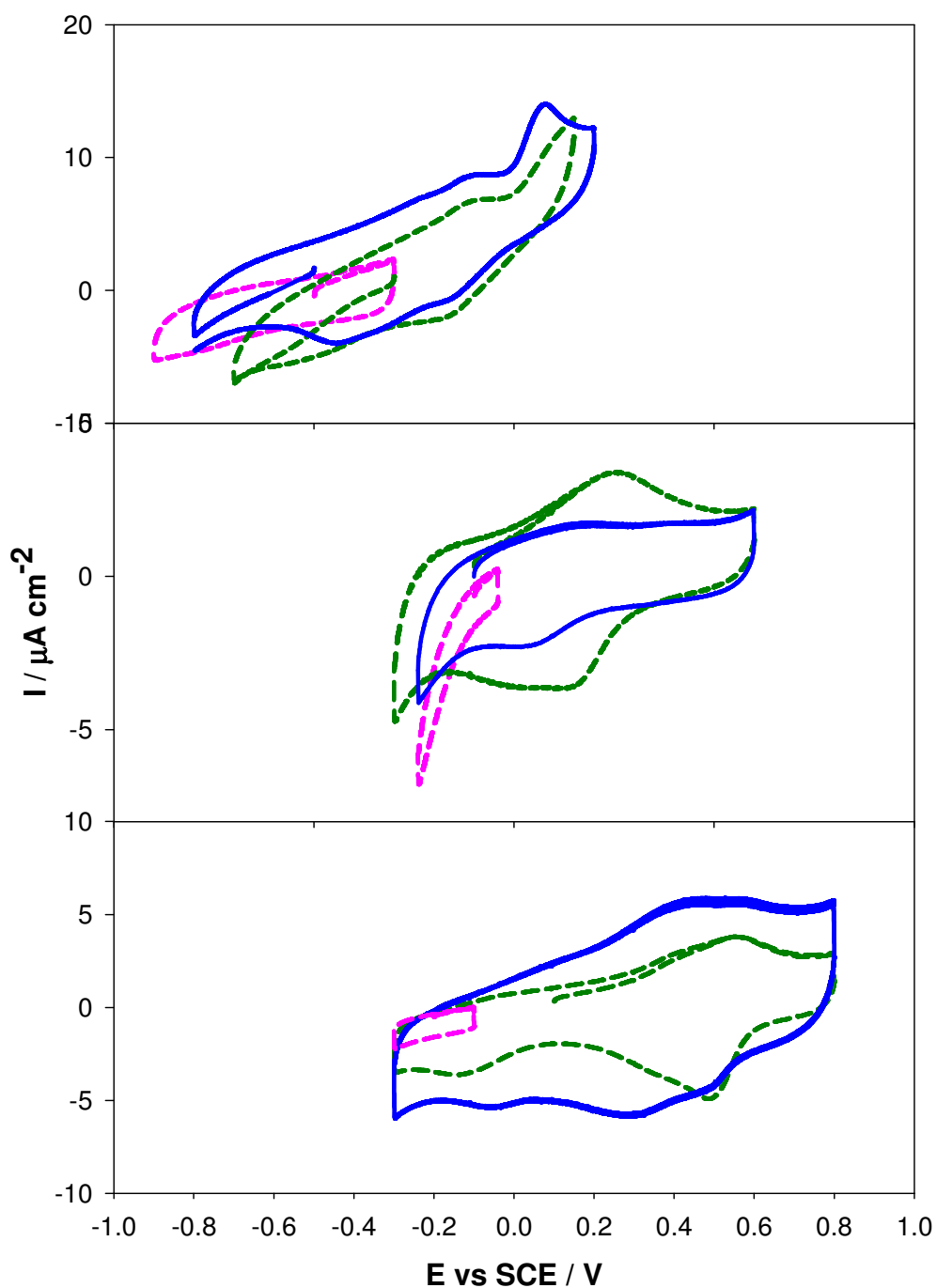
### **5.3.2.1. Reactivos**

Se utilizó H<sub>2</sub>O ultrapura y D<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®) para preparar la disolución de electrolito soporte (HClO<sub>4</sub> 0.1 M, KClO<sub>4</sub> 0.1 M NaF 0.1 M y NaF 0.1 M + NaOH) y la disoluciones de stock de citosina y guanina (Sigma-Aldrich® sin más purificación) con las mismas concentraciones de los apartados 5.3.1 y 5.3.2 de este capítulo (1 mM a pH 1 y 11.5 y 0.025 mM a pH 8). Los experimentos de infrarrojos obtenidos en configuración de reflexión interna se realizaron en H<sub>2</sub>O en todo rango de pH y en D<sub>2</sub>O solamente a pD 8 en los mismos electrolitos soportes (HClO<sub>4</sub> 0.1 M a pH 1, KClO<sub>4</sub> 0.1 M a pH 5 NaF 0.1 M a pH 8 y NaF 0.1 M + NaOH a pH 11.6). La concentración de guanina fue 1 mM y la de guanina 0.01 mM a pH 8 y 0.02 mM a pH 1 y a pH 11.56 que se consiguieron por adición de las correspondientes disoluciones stock en la célula electroquímica.

Se han realizado las mismas modificaciones que en el apartado 5.3 para evitar la oxidación de la guanina

### **5.3.3. Voltametría cíclica**

En la figura 5.25 se muestran los voltagramas cíclicos a diferentes valores de pH obtenidos con electros de oro nano estructurados en disoluciones que contienen guanina 0.02 mM a pH 1 y 11.6 y 0.01 a pH 8 y citosina 1mM y se comparan con los obtenidos cuando ambas bases están presentes en la disolución a las mismas concentraciones. Las medidas electroquímicas se han centrado en la región de adsorción química de la guanina para evitar la interferencia de otras especies, como la formada en el proceso de oxidación de guanina.



**Fig. 5.25.-** Voltogramas cíclicos estacionarios obtenidos con electrodos nanoestructurados de oro a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  para disoluciones que contienen guanina  $0.01 \text{ mM}$  a pH 8 y  $0.02$  a pH 1 y 11.6 (---), citosina  $1 \text{ mM}$  (-.-) y mezcla de guanina y citosina en las proporciones anteriores (—) a los valores de pH indicados

En los voltogramas de la figura 5.25 se puede observar a los tres valores de pH en la zona de adsorción química de la guanina la citosina esta adsorbida físicamente. Siendo en medio básico el que presenta el mayor rango de potenciales en el que ambas bases

están co-adsorbidas. Además cada una de las bases parece que queda adsorbida químicamente en presencia de su base complementaria a los mismos valores a los que se adsorbe cuando está sola. Resulta complicado en esta ocasión estudiar los cambios cualitativos observados en los espectros en las señales voltamétricas de la citosina ya que aparecen solapadas en la región de las señales de oxidación/reducción de la guanina. De esta forma parece que resultaría más interesante estudiar los cambios que produce la citosina en las señales voltamétricas de la guanina. Sin embargo la voltametría aporta poca información en este aspecto ya que como se describió en el apartado 5.2.3 de este capítulo de la tesis, la guanina no muestra señales de adsorción/desorción en los voltagramas si no que esta quimisorbida desde los potenciales negativos.

### **5.3.4. Resultados y Discusión de los Espectros FT-IRRA para la guanina y citosina co-adsorbida sobre Electrodo de Oro**

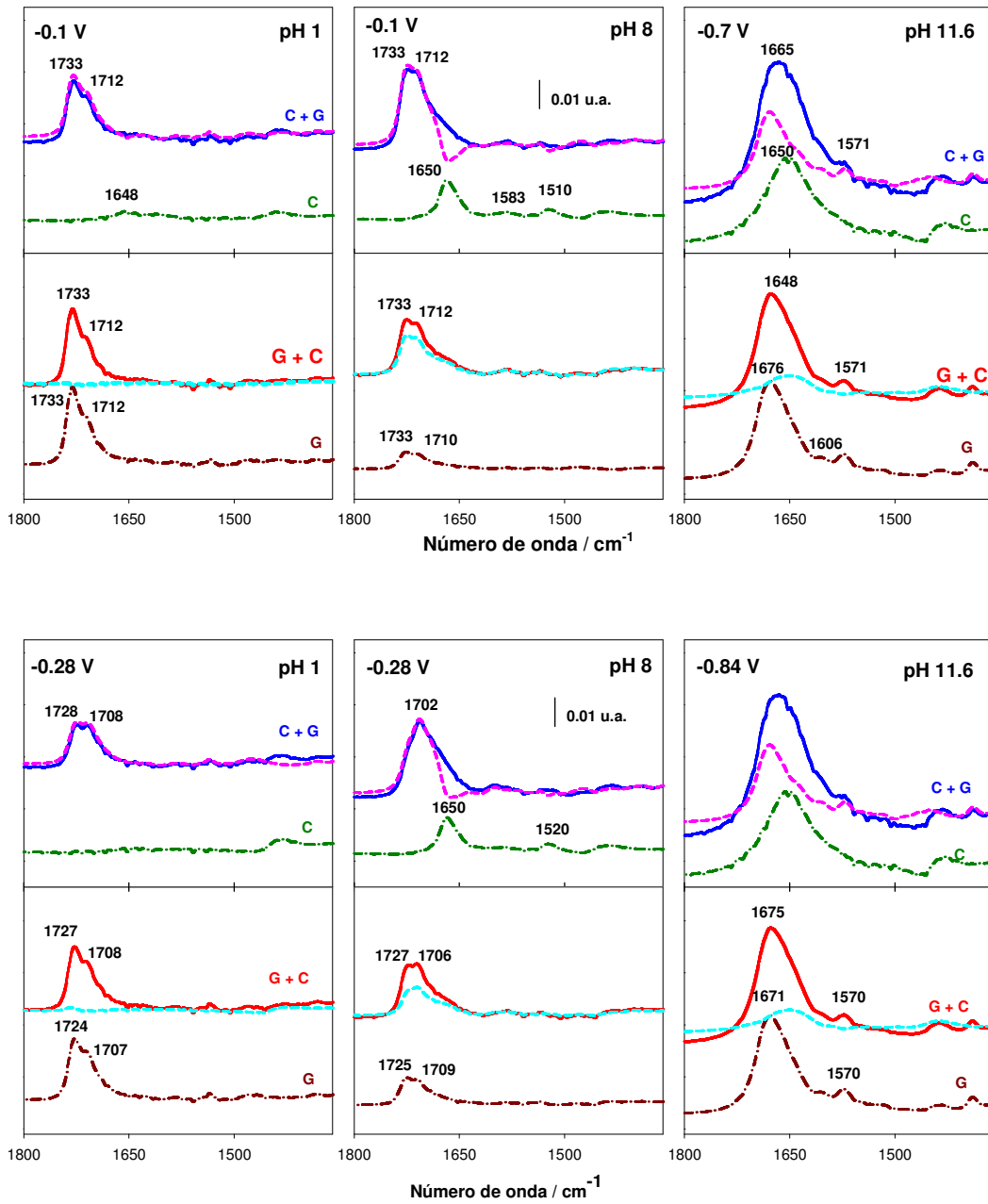
#### **5.3.4.1. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 1400 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ .**

En la figura 5.26 se muestran los espectros de ATR-SEIRA en disoluciones de  $\text{H}_2\text{O}$  a pH 1, 8 y 11.6 a dos potenciales en los que ambas bases están adsorbidas sobre películas nanoestructuradas de oro. A cada valor de potencial se presentan dos series de experimentos cada uno comenzando con una base diferente para poder comparar los espectros de co-adsorción con el espectro individual de la base con la cual se ha comenzado el experimento.

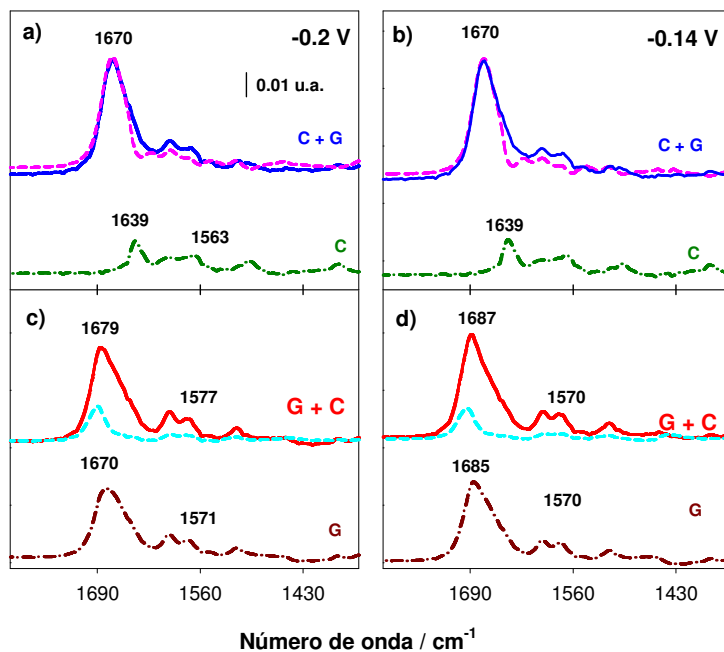
A pH 1 para la región de potencial a los cuales la guanina se encuentra adsorbida químicamente sobre la superficie del electrodo pero no se han alcanzado los potenciales de adsorción química de la citosina no se observan señales activas para la citosina, la citosina está completamente desorbida. Por tanto esto parece indicar que a este valor de pH no hay un rango de potenciales común donde se pueda estudiar la co-adsorción de ambas bases sin estar influenciada fuertemente por la oxidación de guanina.

A pH 8 y 11.6 se observan señales activas de la citosina en la región de adsorción química de guanina aunque, en ambos casos en un rango muy pequeño de potenciales como también indicaban los resultados voltamétricos. En disoluciones acuosas como se viene discutiendo a lo largo del presente capítulo a valores de pH fuertemente básicos no se corrige bien la señal de fondo del electrolito debido a que en esa región aparecen

las flexiones de OH. Esto hace que los efectos de co-adsorción en disoluciones acuosas son más complicados de estudiar. Sin embargo, a pH 8 se observa como al adicionar guanina a la disolución que contiene citosina, las bandas características de la citosina desaparecen. Este efecto es especialmente claro en las bandas a 1725 y 1709  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a bandas de combinación que contienen contribuciones de las vibraciones de tensión de CO y flexiones de  $\text{NH}_2$ . Por otro lado en los experimentos empezando por guanina 0.01 mM adsorbida, se observan inicialmente las dos señales características de la adenina a 1725 y 1709  $\text{cm}^{-1}$  sin embargo, no se pueden distinguir señales activas de citosina adsorbida en esta región de potenciales. Además se puede distinguir una mejora de las señales correspondientes a la guanina. Al igual que ocurría con la citosina y la adenina los cambios en las intensidades de las señales correspondientes a la citosina y la guanina adsorbidas en presencia de su base complementaria podrían tener dos causas; un cambio en la cobertura de la superficie y/o un cambio en la orientación del plano molecular respecto a la superficie del electrodo. De esta forma la desaparición de las señales de IR correspondientes a la citosina en presencia de guanina podría atribuirse bien a una reorientación de la citosina adsorbida con el plano molecular paralelo a la superficie del electrodo o a su desorción total. Sin embargo las señales voltamétricas correspondientes a la adsorción/desorción de citosina obtenidas en presencia de guanina indican que ambas están co-adsorbidas sobre el electrodo. Esto sugiere que al co-adsorberse ambas moléculas cambian su orientación de forma que la citosina parece adoptar una orientación más paralela a la superficie mientras que la guanina se orienta más perpendicular en presencia de su base complementaria. Los estudios comparativos de los espectros ATR-SEIRA de cada base con los obtenidos tras adiciones de la base complementaria se han realizado también en disoluciones de óxido de deuterio a pH 8. En estos casos, se puede también analizar el efecto de la adición de citosina solamente sobre la señal de tensión de carbonilo ya que como consecuencia del proceso de deuteración la banda correspondiente a la vibración de flexión del grupo amino se desplaza a frecuencias más bajas ( $<1200 \text{ cm}^{-1}$ ). En la figura 5.27 se observa que el comportamiento de las señales de guanina y citosina en presencia de la base complementaria es el mismo que el descrito para medios acuoso, las señales de citosina se pierden en presencia de guanina y ésta parece aumentar su intensidad



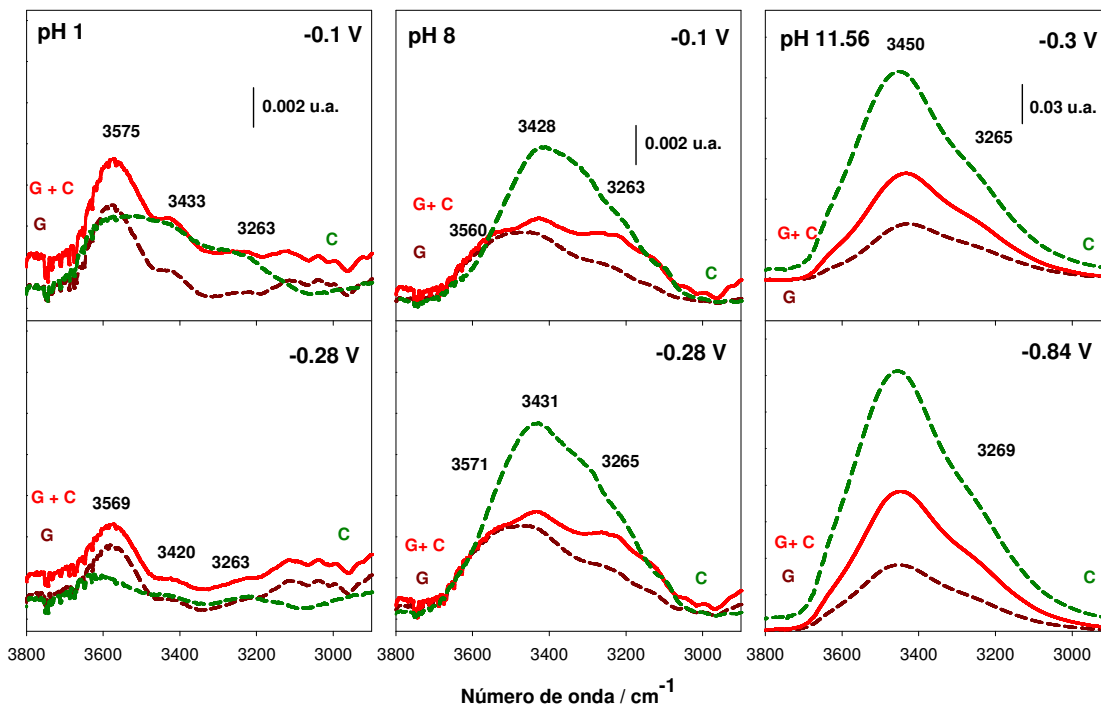
**Fig. 5.26.-** Espectros “in-situ” de ATR-SEIRA en la región 1300-1800 cm<sup>-1</sup> a los valores de pH indicados para disoluciones de guanina 0.01 mM a pH 1 y 11.6 y 0.02 mM a pH 8 (- · - · -), citosina 1mM (- · - · -), citosina 1 mM y guanina 0.01 mM o 0.02 mM en función del pH (—), guanina 0.01 mM o 0.02 mM en función el pH y citosina 1mM (—)



**Fig. 5.27** Espectros “in-situ” de ATR-SEIRA en la región 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  a pD 8 para disoluciones de 0.02 mM a pH 8 (-.-.-), citosina 1mM (-.-.-), citosina 1 mM y guanina 0.02mM (—), guanina 0.02 mM y citosina 1mM (—)

### 5.3.4.2. Espectros ATR-SEIRA en la Región Espectral 2800 a 3900 $\text{cm}^{-1}$ .

Se han analizado los espectros de ATR-SEIRAS sobre electrodos de oro en contacto con disoluciones de guanina sobre las que se adiciona citosina en la región del espectro entre 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$  para poder estudiar el efecto que la citosina tiene en las señales asociadas a las vibraciones de tensiones simétricas y asimétricas de  $\text{NH}_2$  de guanina.



**Fig. 5. 28.-** Espectros de ATR-SEIRA en las regiones de 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$  para disoluciones de citosina 1mM (- · - · -), guanina 0.01mM a pH 1 y 11.6 y 0.2 mM a pH 8(- · - · -), adenina 0.01mM a pH 1 y 11.6 y 0.02 mM a pH y timina 1mM (—) adsorbidas sobre películas nanoestructuradas de oro en  $\text{H}_2\text{O}$  a pH 1 y a los potenciales indicados. Los espectros están referidos al electrolito soporte al mismo valor de potencial.

En la figura 5.28 se observa la coadsorción de guanina con agua en función del pH y como en la región de adsorción física de citosina hay agua adsorbida en la interfase como se ha explicado en apartados previos de este capítulo.

Para la guanina en la figura se observan las señales asociadas a las vibraciones de tensión simétrica y antisimétrica de  $\text{NH}_2$  (c.a 3431 y 3263  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente) y a los tres valores de pH y en el rango de potenciales de co-adsorción. Estas señales no se desplazan al añadir una disolución 1 mM de citosina lo que sugiere que como consecuencia del proceso de co-adsorción la interfase se reorganiza pero esta reorganización parece no implicar la interacción entre bases complementarias a través de puentes de hidrógeno. Ya que si hubieran tenido lugar interacciones por puentes de hidrógeno se hubieran esperado desplazamientos hacia el rojo de estas señales tal y como se describe en la bibliografía.<sup>17</sup> Sin embargo los resultados voltamétricos y de IR en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  sugieren que la co-adsorción de ambas bases parece originar una reorganización de la interfase en la que ambas bases están presentes. Al

igual que se describió en el caso de la timina y la adenina en el capítulo 3 este tipo de interacción podría ser una interacción  $\pi$ -stacking de tipo T-edge to face.

### **5.3.5. Conclusiones**

Los resultados espectroelectroquímicos de ATR-SEIRAS in situ para la co-adsorción de citosina y guanina sobre electrodos de oro a pH 1, 7.5 y 11.6 en comparación con los espectros de las bases aisladas han permitido determinar a qué valores de pH ambas bases se encuentran adsorbidas sobre la superficie electródica y analizar las interacciones entre bases complementarias resultando que cuando ambas están presentes inducen una reorganización de la otra respecto a la superficie electródica.

La desaparición de las señales de citosina ha sugerido que adopta una disposición más paralela respecto al electrodo en presencia de adenina. Por el contrario en presencia de citosina adsorbida se ha encontrado un incremento de las señales guanina que puede deberse bien a un aumento del exceso superficial de esta base sobre el electrodo y/o a una inclinación de su plano molecular.

La asignación del espectro en la región 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$  ha permitido confirmar que no existe interacción por puentes de hidrógeno entre ambas bases complementarias, sin embargo, debe existir algún tipo de interacción a largo alcance que por la orientación que estas bases presentan en la interfase puede ser de tipo T-edge to face.



## 5. 4 Bibliografía

1. Wandlowski, T., Lampner, D. & Lindsay, S. M. Structure and stability of cytosine adlayers on Au(111): An in-situ STM study. *J. Electroanal. Chem.* **404**, 215–226 (1996).
2. Ataka, K. & Osawa, M. In situ infrared study of cytosine adsorption on gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **460**, 188–196 (1999).
3. Susi, H., Ard, J. S. & Purcell, J. M. Vibrational spectra of nucleic acid constituents-II. Planar vibrations of cytosine. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **29**, 725–733 (1973).
4. Irikura, K. K., Johnson, R. D. & Kacker, R. N. Uncertainties in scaling factors for ab initio vibrational frequencies. *J. Phys. Chem. A* **109**, 8430–8437 (2005).
5. Chandra, A. K., Nguyen, M. T., Uchamaru, T. & Zeegers-Huyskens, T. Protonation and deprotonation enthalpies of guanine and adenine and implications for the structure and energy of their complexes with water: comparison with uracil, and Cytosine. *J. Phys. Chem. A* **103**, 8853–8860 (1999).
6. Gould, I. R., Vincent, M. A., Hillier, I., Lapinski, L. & Nowak, M. J. A new theoretical prediction of the infrared spectra of cytosine tautomers. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **48**, 811–818 (1992).
7. Bazso, G., Tarczay, G., Fogarasi, G. & Szalay, P. G. Tautomers of cytosine and their excited electronic states: a matrix isolation spectroscopic and quantum chemical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 6799–6807 (2011).
8. Rueda, M., Prieto, F., Rodes, A. & Delgado, J. M. In situ infrared study of adenine adsorption on gold electrodes in acid media. *Electrochim. Acta* **82**, 534–542 (2012).
9. Ataka, K., Yotsuyanagi, T. & Osawa, M. Potential-Dependent Reorientation of Water Molecules at an Electrode/Electrolyte Interface Studied by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **100**, 10664–10672 (1996).
10. Tao, N. J., DeRose, J. a. & Lindsay, S. M. Self-Assembly of Molecular Superstructures Studied by in situ Scanning Tunneling Microscopy: DNA bases on Au(111). *J Phys Chem Phys Chem* **97**, 910–919 (1993).
11. Ferapontova, E. E. Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes. *Electrochim. Acta* **49**, 1751–1759 (2004).
12. Clark, L. B., Peschel, G. G. & Tinoco, I. Vapor Spectra and Heats of Vaporization of Some Purine and Pyrimidine Bases 1. *J. Phys. Chem.* **69**, 3615–3618 (1965).
13. Yanson, I. K., Teplitsky, A. B. & Sukhodub, L. F. Experimental studies of molecular interactions between nitrogen bases of nucleic acids. *Biopolymers* **18**, 1149–1170 (1979).
14. Lopes, R. P., Marques, M. P. M., Valero, R., Tomkinson, J. & de Carvalho, L. A. E. B. Guanine: A Combined Study Using Vibrational Spectroscopy and Theoretical Methods. *Spectrosc. An Int. J.* **27**, 273–292 (2012).
15. Mathloljthi, M. & Koenig, J. L. Research, 146 (1986) 15–27 Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam - Printed in The Netherlands. **146**, 15–27 (1986).

16. Delabar, J. M. & Majoube, M. Infrared and Raman spectroscopic study of <sup>15</sup>N and D-substituted guanines. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **34**, 129–140 (1978).
17. Greve, C. & Elsaesser, T. Ultrafast Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of Guanine – Cytosine Base Pairs in DNA Oligomers. *J. Phys. Chem. B* **117**, 14009–14017 (2013).

# Parte II

---

## Capítulo 6

### **Estudio Espectro-Electroquímico Mediante PM-IRRAS de Películas de Nucleolípido de Citidina Adsorbidas Sobre Electrodo de Au(111).**

---

## 6.1. Introducción

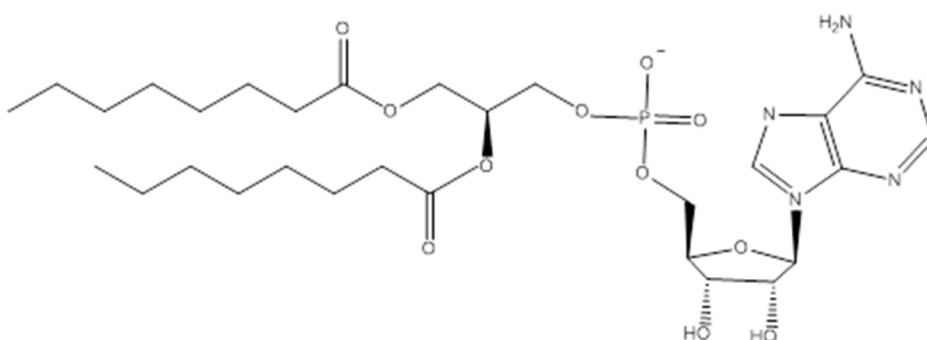
Como ya se ha explicado los estudios de adsorción y co-adsorción de las bases del ADN en la interfase electrodo disolución ha suscitado un gran interés por su facilidad para mimetizar las interfases biológicas ya que permite obtener información estructural y de la influencia del campo eléctrico. Sin embargo estas interfases no acaban de mimetizar completamente las interfases biológicas ya que no incluyen un entorno lipídico.

Las primeras interfases electrodos/disolución que eran capaces de proporcionar situaciones más próximas a las condiciones fisiológicas estaban formadas por un electrodo de mercurio recubierto de fosfolípido de tal forma que el fosfolípido se organizan formando monocapas organizadas, es de decir, la mitad de una bicapa en la que el fosfolípido expone a la disolución sus cabezas polares. De esta forma los fosfolípidos exponen a la disolución sus cabezas polares. Así los fosfolípidos en la monocapa presentan interacciones similares con el electrodo que las que experimentan los lípidos en las membranas biológicas. La idea inicial del diseño de este tipo de electrodos fue de Miller<sup>1</sup> sin embargo el impulso definitivo lo proporcionó Nelson<sup>2,3</sup> a finales de los años 80 introduciendo una metodología que permitía caracterizar electroquímicamente la película formada sobre el electrodo. En este campo cabe destacar a los grupos de Guidelli y Moncelli (66-68) que han estudiado termodinámicas de las películas de fosfolípidos y al grupo de Lipkowski<sup>4-6</sup> que ha realizado algunos estudios con monocapas de fosfolípidos sobre electrodos de oro formados mediante la técnica de Langmuir-Schaeffer. La formación de bicapas y monocapas insolubles sobre electrodos sólidos hizo difícil el uso de técnicas convencionales para su caracterización estructural tales como la espectroscopía in-situ convencionales, ya que las especies que conforman las películas no se desorben a ningún potencial. Sin embargo el problema se solucionó con la introducción de la metodología PM-IRRAS (*Polarization Modulated InfraRed Reflection Absortion Spectroscopy*)

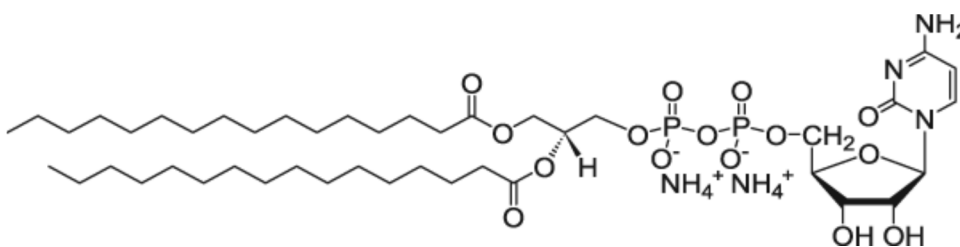
Con el objetivo de conseguir interfases electrodo/disolución, que al igual que las de fosfolípidos mimeticen las interfases biológicas, pero en las que además se pueda estudiar la interacción y el reconocimiento moléculas entre bases complementarias del ADN se hace uso de los nucleolípidos, que poseen una de las cuatro bases del ADN en la cabeza hidrofílica y, además presentan una extraordinaria capacidad para auto-organizarse formando estructuras complejas.

Desde un punto de vista químico los nucleolípidos pueden definirse como moléculas orgánicas híbridas que forman parte de las células. En general están constituidos por una parte hidrofílica que puede ser una nucleobase, un nucleósido, un nucleótido o un oligonucleótido (que contienen en su estructura una de las cuatro bases del ADN o el ARN) y un resto lipofílico que puede ser una cadena alquílica (de alquilo o de alqueno) o bien un hidrocarburo carboáclico.<sup>7</sup>

a)



b)



**Fig. 6.1** Representación a modo de ejemplo de dos nucleolípidos a) dioctanoilfosfatidiladenosina, b) 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina

La fracción lipídica juega un papel fundamental en la autoorganización, dado que su longitud, el número de insaturaciones o su posición relativa a la base pueden tener un gran impacto en la estructura del apilamiento, originando diferentes conformaciones como vesículas, fases laminares, cintas, filamentos helicoidales o micelas esféricas entre otras.<sup>8,9,10</sup> Además, poseen una cabeza polar derivada bien de una base púrica (adenina o guanina) o pirimidínica (citosina, timina o uracilo) que pueden interactuar a través de puentes de hidrógeno o por interacciones de tipo  $\pi$ -stacking. Los conceptos de reconocimiento molecular utilizando nucleolípidos se aplicaron inicialmente a una película supramolecular en la interface aire /disolución.<sup>11,12,13</sup> Más recientemente, se han realizado estudios en interfaces mesoscópicas, tales como las que se encuentran en los

sistemas vesiculares y micelares, concluyendo que los nucleolípidos simples en los agregados micelares o vesiculares, o adsorbidos sobre una superficie, podrían tener propiedades de reconocimiento molecular entre las bases complementarias.<sup>14</sup> Además, se ha encontrado que por debajo de la concentración micelar crítica (cmc) no existe reconocimiento molecular entre nucleolípidos que portan bases complementarias, sin embargo se encontraron interacciones por puentes de hidrógeno o de tipo  $\pi$ -stacking en la superficie de la estructura supramolecular formada.

Con el fin de estudiar el reconocimiento molecular entre pares de bases complementarias en interfases electrificadas más próximas a las membranas biológicas se pueden depositar monocapas de estos nucleolípidos sobre electrodos sólidos y estudiar la interacción con la base complementaria. Actualmente la mayoría de los trabajos de reconocimiento molecular entre los pares de bases complementarias se centran fundamentalmente en las interacciones entre la adenina y el uracilo.<sup>11,12,15-17</sup> Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre el reconocimiento molecular entre guanina y citosina. La mayoría de ellos se limitan a estudiar la variación de las isothermas de adsorción y en consecuencia la variación que experimenta la presión superficial ( $\pi$ ) cuando está presente la base complementaria.<sup>15,18</sup> Miao y col.<sup>19</sup> sintetizaron el nucleolípido 1-(2-octadeciloxycarboniletil)citosina y estudiaron el reconocimiento molecular con su base complementaria guanina por comparación de las isothermas de adsorción ( $\pi$ -A) de las monocapas de Langmuir del nucleolípido en ausencia y en presencia de la base complementaria en la subfase. Mediante estudios de ultravioleta visible (UV-vis), reflexión-adsorción en el infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y Raman (SERS) han podido demostrar que tiene lugar el reconocimiento molecular entre la citosina y la guanina a través de tres enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick.

En este capítulo se presenta un estudio espectro-electroquímico combinando las técnicas electroquímicas convencionales con la espectroscopía de PM-IRRAS para caracterizar monocapas y bicapas insolubles de Langmuir en las que participa el nucleolípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina para interaccionar con la base complementaria, guanina cuando esta esté presente en la disolución. En el apartado 6.2 se presenta la formación de monocapas del nucleolípido en la balanza de Langmuir, su transferencia al electrodo Au(111), su caracterización electroquímica y finalmente sus propiedades espectroscópicas en el IR, mediante la técnica de PM-IRRAS “in situ” de la célula electroquímica. La modificación de estas propiedades espectroscópicas cuando la

monocapa se prepara agregando guanina a la disolución de trabajo en la balanza de Langmuir, se utilizará para decidir acerca de las posibilidades de reconocimiento molecular del sistema electródico modificado con la monocapa de nucleolípido. El apartado 6.3 está dedicado a la preparación, caracterización y análisis de las posibilidades de reconocimiento molecular de bicapas que contienen la estructura del nucleolípido, soportadas en electrodos Au(111).



## **6.2. Formación y caracterización de monocapas de nucleolípido de citidina adsorbidas sobre electrodos de oro**

### **6.2.1. Experimental**

#### **6.2.1.1 Reactivos y electrodos**

Se disolvió 1-hexadecanotiol en metanol para conseguir una concentración de la disolución stock de 1 mg/ml. Igualmente el 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina (Avanti Polar Lipids) se disolvió en cloroformo para conseguir disoluciones stock de concentración 1mg/ml.

El electrodo monocristalino de Au(111) se preparó por el método de Clavilier. Antes de los experimentos se limpió a la llama mediante recocido, después se dejó secar al aire durante dos minutos antes de realizar el depósito de la película lipídica.

Todos los experimentos electroquímicos se han llevado a cabo en disoluciones de NaF 0.1M. Previamente a la preparación de la disolución el NaF se colocó durante 15 minutos en una cámara de ozono (UVO cleaner, Jelight, Irvine, CA) para eliminar la materia orgánica.

#### **6.2.1.2 Isotermas en la interfase aire/agua**

Se registraron las isotermas de compresión en las distintas interfaces aire | disolución, conteniendo o no la subfase guanina (0.025mM), utilizando una balanza de Langmuir (NIMA technology Ltd., U.K.) equipada con dos barreras móviles y una placa de Wilhelmy . Las películas se comprimieron utilizando una velocidad de barreras de 5 cm<sup>2</sup> / min hasta que se alcanzó la presión de colapso en cada uno de los casos. La presión superficial se midió utilizando el método de Wilhelmy utilizando un tensiómetro de superficial Nima controlado por un ordenador. La placa Wilhelmy se elaboró con un papel de filtro Whatman, que se cambiaba después de cada isoterma. Los experimentos se llevaron a cabo a  $44 \pm 1$  °C.

### **6.2.1.3 Formación de monocapas de Langmuir**

Se prepararon monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en la interfase aire / disolución mediante la balanza de Langmuir citada arriba. La cuba de la balanza se llenó con la subfase acuosa que podía contener o no disuelta guanina (0.025mM). La monocapa se formó primeramente en la interfase aire/disolución de la subfase mediante aplicación en la superficie de la cuba de unos pocos microlitros de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina de concentración 1mg/ml disuelto en cloroformo. Se esperó 15 minutos hasta que se evaporó todo el disolvente en el que iba disuelto el nucleolípido y se llevó a cabo la compresión con las barreras hasta conseguir una presión superficial de 30mN/m. La temperatura de la subfase se mantuvo constante a  $44 \pm 1$  °C. A continuación se realizó la transferencia Langmuir-Schaeffer sobre el electrodo de Au(111). Esta transferencia tiene lugar por lo general sin que se modifique la organización de la película en la interfase aire/agua. Por lo tanto, las cadenas acílicas del nucleolípido deben tener la misma inclinación que en la interfase aire / disolución.<sup>20</sup> Además, es de esperar que el nucleolípido oriente su grupo citosina hacia la disolución para interactuar con la base complementaria, guanina, cuando esta estuviera presente en el medio. Cabe destacar que debido a que el nucleolípido en este tipo de monocapas queda unido físicamente a la superficie del electrodo, estos ensamblajes-pueden ser inestables ante cambios bruscos de temperatura, contaminación o incluso pueden destruirse fácilmente por algunos disolventes.

### **6.2.1.4 Caracterización electroquímica**

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en una célula de tres electrodos utilizando la configuración de menisco colgante. El electrodo de trabajo consistió en un monocristal de Au(111), mientras que un hilo de oro sirvió como contra electrodo. Como electrodo de referencia se utilizó el electrodo saturado de calomelanos (SCE) conectado a la célula electroquímica a través de un puente salino. Todos los potenciales se refieren a este electrodo a menos que se indique lo contrario. La pureza del electrolito se comprobó in-situ con medidas de voltametría cíclica y capacidad diferencial utilizando los procedimientos experimentales previamente descritos en la bibliografía.<sup>21</sup> Para realizar los experimentos electroquímicos se utilizó un sistema controlado por ordenador formado por un potenciostato /galvanostato HEKA PG 590 y un amplificador lock-in (EG & G Instruments 7265 DSP). Todos los datos se adquirieron utilizando una tarjeta de

adquisición de plug-in (Nacional Instruments NI-DAQBNC-2090) usando un software diseñado a medida.

La cronoculumbimetría se utilizó para determinar la densidad de carga en la superficie del electrodo. El electrodo de oro se llevó a un potencial base ( $E_b$ ), coincidente con el mínimo de capacidad diferencial, durante 600s entonces se aplicaron saltos de potenciales ( $E_i$ ) con una diferencia entre ellos de 0.1V. En cada salto se mantiene el potencial  $E_i$  durante 30s y se realizan las medidas de intensidad y después de cada salto se recupera la superficie del electrodo por aplicación del potencial base durante 600s, antes del siguiente salto. Finalmente se aplicó el potencial de desorción ( $E_{des}$ ) de -1.2V durante 0.15 s. La integración de los transitorios de corriente proporciona la diferencia entre las cargas a los potenciales  $E_i$  y  $E_{des}$ . Se realizaron experimentos similares con el electrodo monocristalino desnudo y con la película adsorbida en el electrodo, que se introducen en la misma disolución de electrolito.

#### **6.2.1.5 Recolección de espectros y procesamiento**

Para realizar las medidas de PM-IRRAS se utilizó un espectrofotómetro Nicolet Nexus 8700 (Madison, WI) equipado con una mesa de montaje óptica externa, un detector de conductividad térmica (MCT), un modulador fotoelástico (Hinds Instruments PM-90 con una cabeza óptica de 50kHz, Hillsboro, OR) y un demodulador (GW Instruments Synchronous Sampling demodulator, Madison, WI). Los espectros se adquirieron utilizando un software propio, un macro Omnic y un convertidor de digital a analógico (Omega, Stamford, CT) para controlar el potencióstato (EG & GPAR362, Princeton, NJ). Como ventana óptica en el IR se utilizó un prisma triangular equilátero de  $BaF_2$  (Janos Technology, Townshend, VT), que se lavó antes de cada experimento con metanol y agua. Antes de cada experimento la célula espectro-electroquímica se limpió durante 1 hora en un baño caliente que contenía una mezcla de ácidos (1: 3  $HNO_3$  /  $H_2SO_4$ ). Dejándose enfriar luego durante 2 horas en ese mismo baño. Las piezas de teflón se lavan durante toda la noche en disolución piraña. Finalmente todo el material se enjuaga muy bien con agua Milli-Q UV-Plus (resistencia >18.2  $M\Omega/cm$ ). El electrodo recubierto con la película de nucleolípido se inserta en la célula espectro-electroquímica vacía y posteriormente la célula se llena con una disolución 0.1 M de NaF (VWR Scientific) disuelto en  $D_2O$ . El potencial inicial que se aplica al electrodo es 0.4V vs SCE y se va variando hacia valores negativos con un intervalo de 100 mV hasta que se alcanza el valor

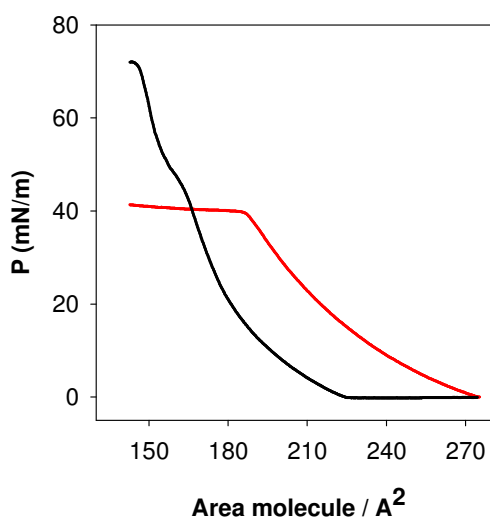
de -1.2 V vs SCE. Para cada escalón de potencial se recogieron 6000 interferogramas que se promediaron para obtener el espectro. La resolución del equipo fue de  $2 \text{ cm}^{-1}$  y la temperatura se mantuvo constante a  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Los espectros corregidos,  $\Delta S$ , son proporcionales a la absorbancia ( $Abs$ ) de las moléculas adsorbidas, A según la ecuación (1) de acuerdo a lo descrito en la metodología.

$$Abs = \frac{\Delta R}{\langle R \rangle} = \frac{|R_s - R_p|}{\langle R_s + R_p \rangle / 2} \quad (1)$$

### 6.2.2. Isotermas del nucleolípido en la interfase aire/disolución

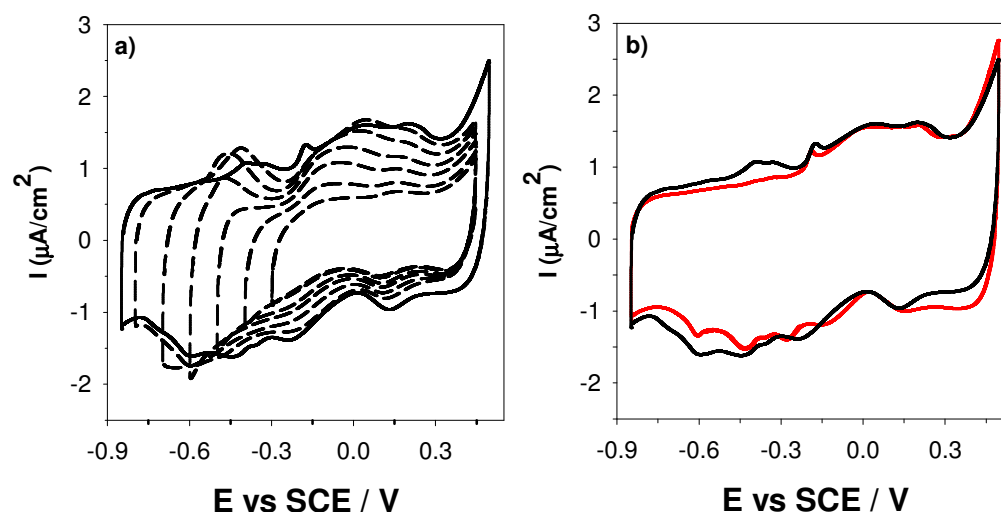
Las isotermas de compresión a  $44 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , en presencia y en ausencia de guanina en la subfase, se muestran en la figura 6.1. Los resultados muestran que ambas isotermas no son superponibles dentro del error experimental. En ausencia de guanina en la subfase, se observa que las monocapas del nucleolípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina muestran polimorfismo comenzando con una estructura líquido condensada (LC) que se transforma en sólido (S) al disminuir el área disponible para las moléculas que constituyen la monocapa hasta alcanzar una presión máxima de colapso de  $72 \text{ mN/m}$ . Cuando la guanina está presente en la interfase la isoterma de compresión muestra una monocapa predominantemente líquida alcanzándose la presión de colapso antes, a los  $38 \text{ mN/m}$ . Además el valor del área por molécula aumenta desde  $175$  a  $240 \text{ \AA}^2$ . Todos estos cambios se pueden atribuir a las interacciones que podrían establecerse entre la guanina y el grupo citosina del 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina.



**Fig. 6.2** Isotherma de compresión para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en la interfase aire / disolución en presencia (—) y en ausencia (—) de guanina 0.025 mM. Subfase NaF 0.1M. Temperatura  $44 \pm 1$  °C.

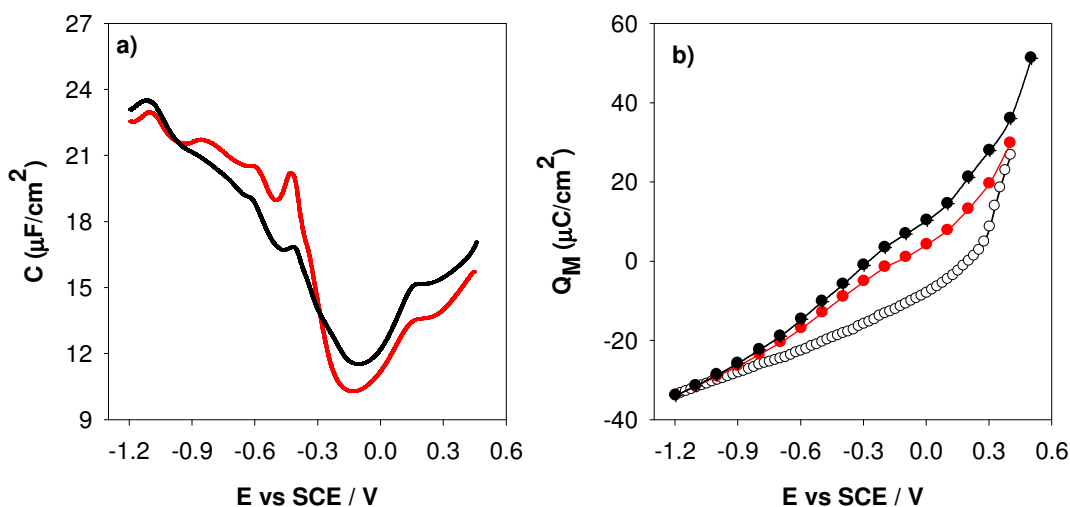
### 6.2.3. Caracterización electroquímica de Monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina Adsorbidas sobre Electrodo de Au(111)

Se han realizado medidas de voltametría cíclica, capacidad diferencial y densidad de carga en función del potencial para estudiar el comportamiento electroquímico del electrodo Au(111) recubierto de una monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina preparado por una transferencia de Langmuir-Schaeffer en presencia y en ausencia de guanina. En la figura 6.3a se muestran los resultados de voltametría cíclica en ausencia de guanina. En el barrido inicial hasta -0.3V vs SCE, se observa una región capacitativa característica de una monocapa en la que el nucleolípido estaría unido al electrodo por la cola hidrofóbica. Sin embargo, al ampliar el potencial hacia potenciales más negativos empiezan a aparecer picos voltamétricos. Caben dos posibilidades transiciones de fase en la película lipídica o reorientación de la misma y adsorción del fragmento de citosina, que daría entonces los picos característicos.



**Fig. 6.3** a) Voltagramas de la región capacitativa del Au(111) en presencia una monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbido, extendiendo en sucesivos ciclos el límite inferior hacia potenciales menores (---). b) Voltagramas de la región capacitativa del Au(111) en presencia una monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbido en presencia (—) y ausencia (—) de guanina. Velocidad de barrido 20 mV/s.

El voltagrama estacionario obtenido en presencia de guanina sigue mostrando estos picos voltamétricos (figura 6.3b). Los resultados electroquímicos ponen de manifiesto que ambas monocapas son estables en la región de potenciales entre 0.45V vs SCE y -1V vs SCE cuando éstas se adsorben sobre superficies de Au(111), como puede comprobarse de los resultados electroquímicos presentados en las figuras 6.3 y 6.4. Sin embargo a potenciales más negativos de -1V vs SCE la monocapa comienza a desorberse sobre la superficie como se observa en la curva de densidad de carga (figura 6.4b) que se fusiona con la del electrodo desnudo.



**Fig. 6.4a)** Curvas de capacidad diferencial obtenidas por barridos de potencial entre  $E_i$  y  $E_f$  a 5 mV/s y b) densidad de carga del electrodo Au(111) recubierto de una monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en presencia (—) y en ausencia (—) de guanina. Se adjunta también la curva de densidad de carga para el electrodo sin recubrir (círculos abiertos)

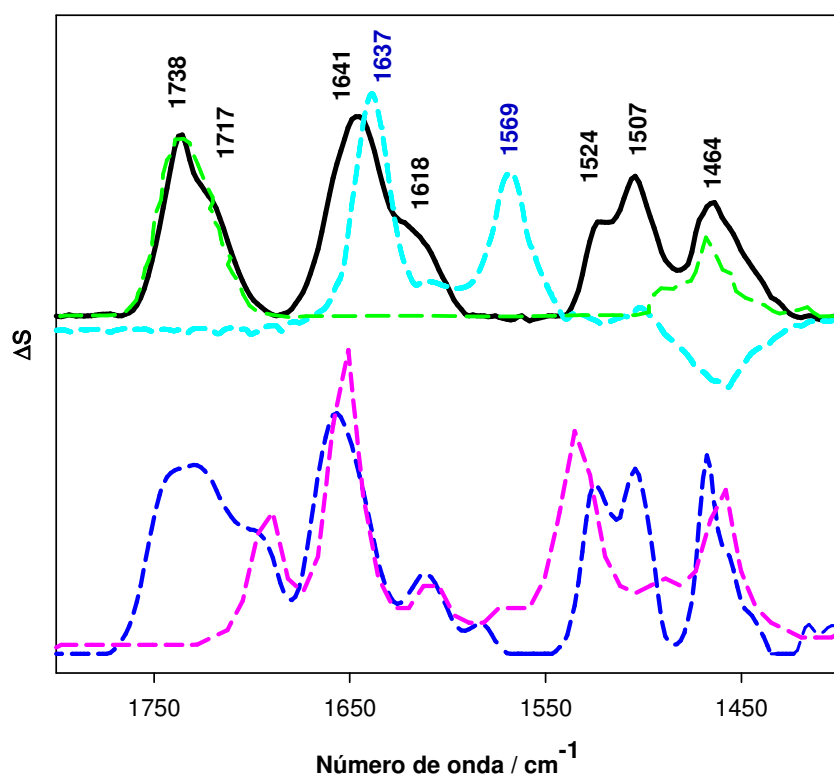
Finalmente en ambos casos se obtienen altos valores de mínimos de capacidad diferencial; 11.5  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  en ausencia de guanina y 10.13  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  cuando la guanina está presente (figura 6.4a). Estos valores son mucho más altos que el valor esperado para las membranas biológicas, aproximadamente de 1  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Estos resultados indican que las monocapas presentan defectos, lo que estaría de acuerdo con la rotación inicial de algunas moléculas de nucleolípidos para cambiar su unión al electrodo aumentando así el número de defectos de la monocapa.

## **6.2.4. Espectros PM-IRRAS de los electrodos recubiertos de la monocapa-nucleolípida**

Las señales espectroscópicas características en el IR de los electrodos recubiertos por monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina, preparadas en presencia y ausencia de guanina, se presentarán en dos subapartados distintos que comprenden la región de 1400-1800  $\text{cm}^{-1}$  y la región de 2800-3100  $\text{cm}^{-1}$  en función de las posiciones de las bandas asociadas al lípido y al grupo citosina del nucleolípido. Asimismo, se distinguirá entre las monocapas formadas en ausencia y en presencia de guanina, para poder discutir el efecto de la guanina en la organización de la película y decidir acerca de las posibilidades de reconocimiento molecular de los electrodos recubiertos del nucleolípido

### **6.2.4.1. Región 1400-1800 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de monocapas preparadas en ausencia de guanina**

En la figura 6.5 se muestra el espectro de PM-IRRAS en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  para electrodos monocristalinos de oro recubiertos con monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina a 0.055V y se compara con el espectro ATR-SEIRA de la citosina adsorbida sobre electrodos de oro nanoestructurados, ambos espectros obtenidos en medio  $\text{D}_2\text{O}$ , así como con el espectro de una película de Langmuir del fosfolípido que contiene las mismas cadenas acílicas que el nucleolípido, DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine). Se han incluido también el espectro de transmisión del nucleolípido, obtenido como se describió en el apartado experimental, y el de la citosina en fase gas, tomado de la bibliografía (Base de datos del programa Omhmic).



**Fig.6.5** Espectros de PM-IRRAS en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  NaF 0.1M /  $\text{D}_2\text{O}$  para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-citidina (—) adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a 0.055V vs SCE, Espectro de transmisión de la citosina (- - -), espectro de transmisión de 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-citidina (- - -). Y espectro PM-IRRAS del DMPC tomado de la bibliografía.<sup>20</sup> Espectro de ATR-SEIRA, en la región entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$ , para la citosina adsorbida sobre películas nanoestructuradas de oro desde disoluciones 1 mM de citosina en  $\text{H}_2\text{O}$ , a 0.5V vs SCE (- - -)

Esta región espectral incluye fundamentalmente en el caso de medios deuterados las vibraciones de tensión de C=O, las vibraciones de tensión C-C y las vibraciones de tensión de C-N. En los espectros de transmisión del nucleolípido se pueden identificar las señales que corresponden a modos de vibración de enlaces del fragmento de citosina, por comparación con el espectro de transmisión de la citosina en fase gas. Estas señales aparecen prácticamente a los mismos números de onda en los espectros de transmisión del nucleolípido y de la citosina. Solo la señal a 1535  $\text{cm}^{-1}$  del espectro de la citosina neutra, aparece a un número de onda más bajo en el nucleolípido (1524  $\text{cm}^{-1}$ ), lo que se puede explicar porque en el modo de vibración correspondiente participa la vibración N1-C<sub>6</sub>, que en el nucleolípido debe estar afectada por la unión de la citosina al fragmento de carbohidrato a través del átomo N<sub>1</sub>. Las señales intensas y de frecuencias más altas del espectro de transmisión del nucleolípido deben corresponder a los modos de vibración de



los carbonilos de los ésteres de las cadenas lipídicas, como se deduce al comparar con el espectro del fosfolípido DMPC. Las señales a 1450-1460  $\text{cm}^{-1}$  coinciden con vibraciones de flexión CH que se encuentran tanto en el espectro de la citosina como en el del fosfolípido.

En el espectro PM-IRRA de la monocapa de nucleolípido sobre el electrodo de oro, las señales correspondientes a las vibraciones de las cadenas acílicas se modifican muy poco con respecto al espectro de transmisión del nucleolípido, sin embargo, las de los modos de vibración del fragmento de citosina se modifican más, en particular las de las vibraciones a 1654 y 1610  $\text{cm}^{-1}$  del espectro de transmisión que se desplazan ligeramente (1641 y 1618  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente) en el espectro PM-IRRA. Estas señales están relacionadas con las tensiones del carbonilo y del anillo de citosina, lo que sugiere que existe interacción entre la superficie del electrodo y el grupo carbonilo y átomos de nitrógeno del anillo. En el espectro ATR-SEIRA de la citosina adsorbida sobre electrodos de oro nanoestructurados (Fig. 6.5), la señal de tensión del carbonilo también aparece a frecuencias algo menores (1637  $\text{cm}^{-1}$ ) que en el espectro de transmisión y muestra también una señal intensa a 1569  $\text{cm}^{-1}$ , que se asignó a uno de los modos de tensión del anillo de citosina, que no está presente a dicha frecuencia en el espectro de PM-IRRA del nucleolípido, posiblemente debido a la unión del anillo de la base a los fragmentos de carbohidrato. En cualquier caso, la interacción debe implicar la inclinación del plano del fragmento de citosina respecto a la superficie del electrodo, dado que las señales de los modos de vibración en el plano son ópticamente activas. Las cadenas acílicas quedarían hacia el lado de la disolución también con cierta inclinación con respecto a la superficie electródica.

La asignación de las bandas características para el espectro de transmisión del nucleolípido y de PM-IRRAS de la monocapa sobre el electrodo en  $\text{D}_2\text{O}$  se recoge en la Tabla 1.

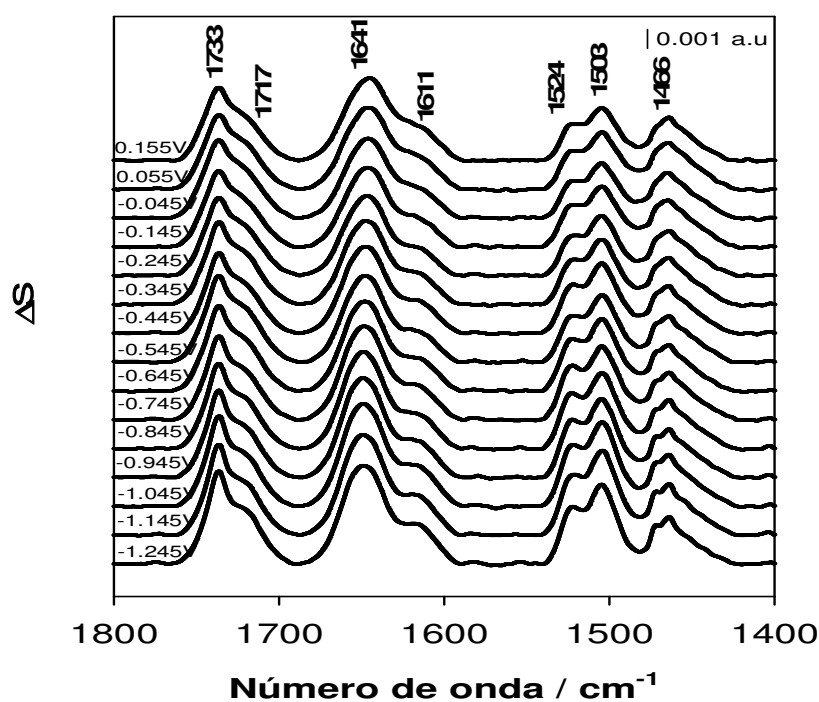
**Tabla. 1** Frecuencias experimentales en NaF 0.1M /  $\text{D}_2\text{O}$  para el espectro de PM-IRRAS de una monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a 0.055Vvs SCE y para los espectros de transmisión

<u>Asignación</u>	<u>Numero de onda</u> <u>transmisión</u>	<u>Numero de onda</u> <u>PM-IRRAS a 0.055Vvs SCE</u>
strC=O (éster)	1738 $\text{cm}^{-1}$	1738 $\text{cm}^{-1}$
str $\text{C}_2\text{O}$ + str. ring (citosina)	1698 $\text{cm}^{-1}$	1717 $\text{cm}^{-1}$

bend CH+ str ring	1654 cm <sup>-1</sup>	1641 cm <sup>-1</sup>
strC <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> + strCN citosina	1610 cm <sup>-1</sup>	1618 cm <sup>-1</sup>
strC <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> + strN <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> citosina	1535 cm <sup>-1</sup>	1524 cm <sup>-1</sup>
δCH <sub>2</sub> + strN <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> + citidina	1507 cm <sup>-1</sup>	1507 cm <sup>-1</sup>
νC <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> + νC <sub>5</sub> =C <sub>6</sub> + δNH <sub>2</sub> citosina	1464 cm <sup>-1</sup>	1464 cm <sup>-1</sup>

(str- tensión , bend- flexión)

En la figura 6.6 se presentan los espectros de PM-IRRAS en esta misma región espectral a los distintos potenciales. Las señales no sufren desplazamiento ni cambian su intensidad de manera significativa al modificar el potencial, indicando que la monocapa no sufre ninguna reorientación al modificar el potencial aplicado.

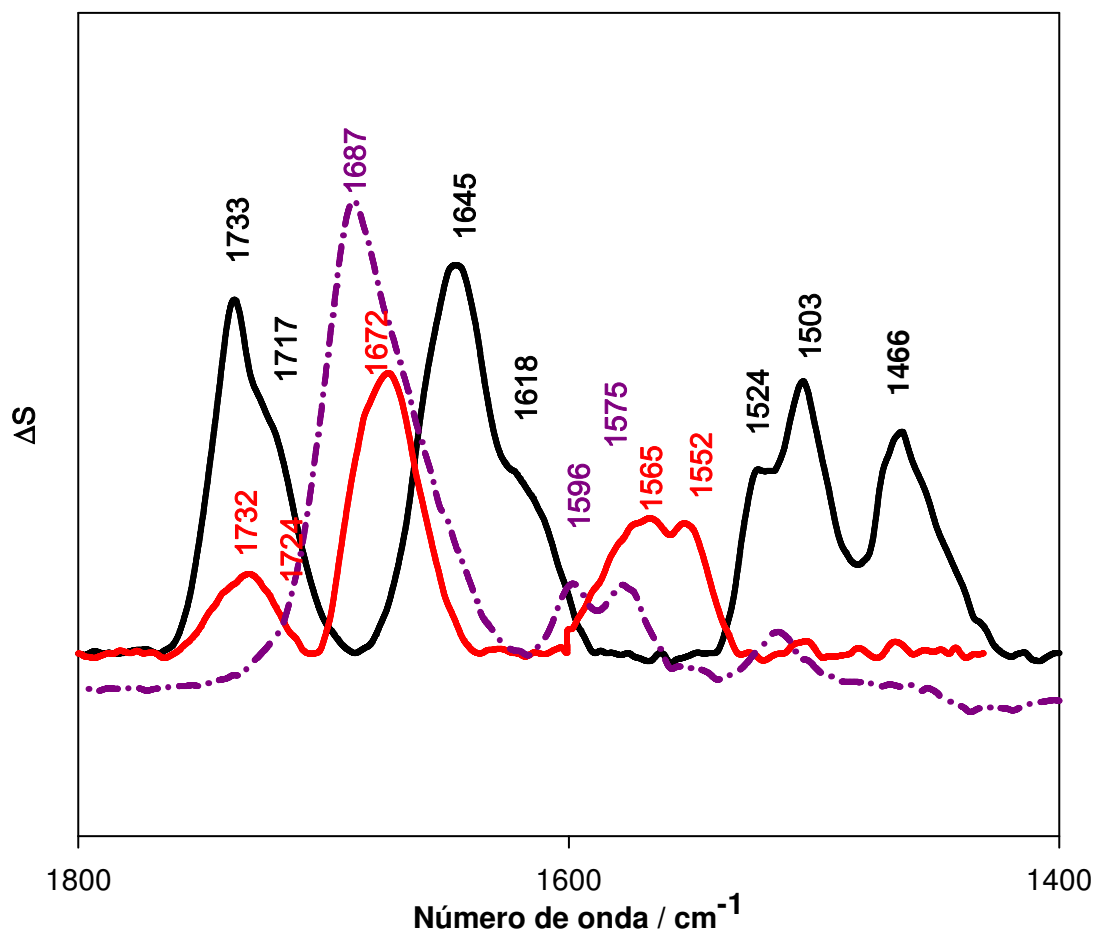


**Fig.6.6** Espectros de PM-IRRAS en la región de 1300-1800 cm<sup>-1</sup> en NaF 0.1M / D<sub>2</sub>O para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a los potenciales indicados referidos al electrodo saturado de calomelanos.

#### 6.2.4.2. Región 1400-1800 cm<sup>-1</sup> de los espectros de monocapas preparadas en presencia de guanina

En la figura 6.7 se presenta el espectro de PM-IRRA de la monocapa preparada en presencia de guanina en comparación con el de la monocapa preparada en ausencia de guanina, a 0.055V<sub>SCE</sub>. En la figura se ha incluido también el espectro ATR-SEIRA de la

guanina adsorbida sobre electrodos nanoestructurados de oro a un potencial alto 0.15  $V_{SCE}$ .

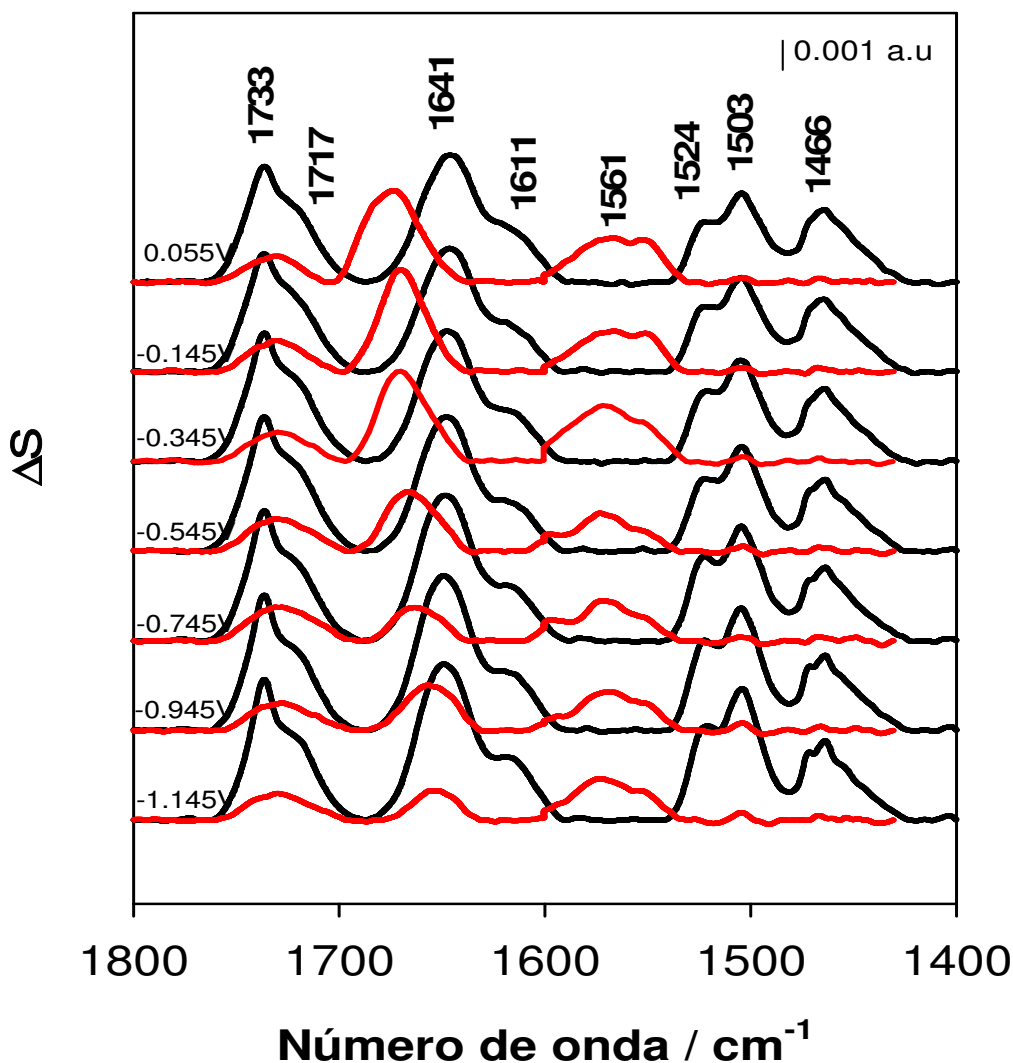


**Fig.6.7** Espectros de PM-IRRAS en la región de 1300-1800  $cm^{-1}$  NaF 0.1M / D<sub>2</sub>O para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a 0.055V vs SCE en presencia (—) y ausencia (—) de guanina, Espectro de ATR-SEIRA, para la guanina adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones 0.01 mM de citosina en H<sub>2</sub>O, a 0.1V vs SCE (-.-.-).

En el espectro de PM-IRRAS para la monocapa preparada en presencia de guanina se observan diferencias significativas con el de la monocapa preparada en ausencia de guanina. Así, desaparecen las señales de los modos de vibración del fragmento de citosina en tanto que aparecen dos señales o grupos de señales intensas que se corresponden en cuanto a sus perfiles con las señales de ATR-SEIRA de la guanina adsorbida sobre electrodos de oro, consistente en una señal intensa a 1672  $cm^{-1}$ , que se puede asignar a

la vibración de tensión del carbonilo y dos señales de intensidad media a 1565 y 1552  $\text{cm}^{-1}$ , asignables a las tensiones de anillo que implican preferentemente las tensiones  $\text{C}_2\text{N}_3$  y  $\text{C}_4\text{N}_3$ , respectivamente, conforme a la Tabla 1 del apartado 5.2. Estas señales, asignables por lo tanto a guanina adsorbida sobre el electrodo, sin embargo presentan frecuencias significativamente menores que las correspondientes señales de la guanina adsorbida, tal como se ha señalado en la Fig. 6.7. Esto sugiere, que las interacciones de la guanina en la monocapa no son completamente idénticas a las de la guanina adsorbida sobre oro, pero debe seguramente implicar al grupo carbonilo y alguno de los nitrógenos del anillo, pues las frecuencias de las señales están desplazadas respecto a las calculadas para la molécula aislada (Tabla 3 del apartado 5.2) en el mismo sentido que las señales de la guanina adsorbida sobre oro, sólo que en menor grado. Es muy posible que la guanina en la monocapa esté también interaccionando con la citosina del nucleolípido, lo que podría dar lugar a una orientación diferente a la propuesta en el capítulo 5, para la adsorción de la guanina sola. En cualquier caso, se puede concluir sin ambigüedad la inclinación del plano molecular de guanina respecto a la superficie electródica y, por otra parte, que el grupo carbonilo y algún nitrógeno de la guanina participan en interacciones con el electrodo y/o con el fragmento de citosina del nucleolípido. A pesar de no observarse las señales de vibración del fragmento de citosina, no se puede descartar la adsorción de dicho fragmento sobre el electrodo, sólo que adoptaría una orientación paralela a la superficie del electrodo, tal como se propuso para la coadsorción de las dos bases complementarias sobre electrodos de oro, en el capítulo 3. En cuanto a las señales asignadas a los carbonilos de los ésteres de las cadenas acíclicas se observa una disminución de sus intensidades, que podría estar relacionada con una disminución del ángulo de inclinación de las cadenas respecto a la superficie del electrodo. Este aspecto se discutirá más abajo en relación con las señales en la región de altas frecuencias.

En la figura 6.8 se muestran los espectros PM-IRRAS de las monocapas de nucleolípido en presencia y en ausencia de guanina a distintos potenciales electródicos.



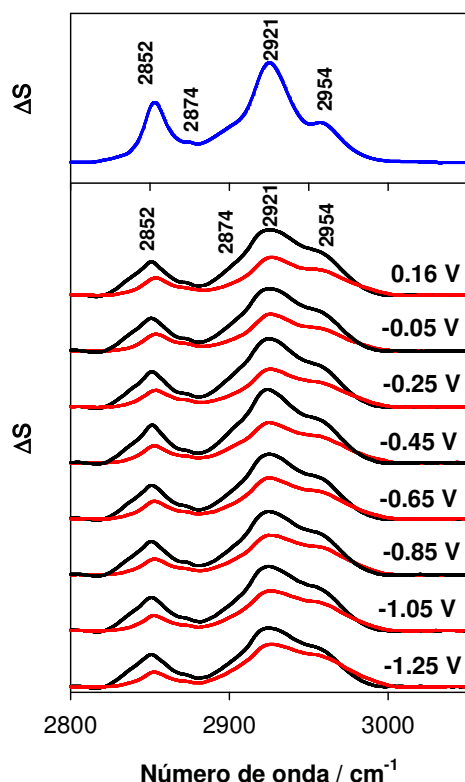
**Fig.6.8** Espectros de PM-IRRAS en la región de 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  en NaF 0.1M /  $\text{D}_2\text{O}$  para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a los potenciales indicados en presencia (—) y ausencia (—) de guanina.

A todos los potenciales se observan los fenómenos ya comentados más arriba. El principal efecto significativo se encuentra en el aumento de la señal de carbonilo de la guanina al aumentar el potencial y su desplazamiento a mayores números de onda, mientras que el resto de señales en presencia de guanina no muestra una dependencia significativa con el potencial.

### 6.2.4.3. Región 2800-3300 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de monocapas preparadas en ausencia y en presencia de guanina

Los espectros PM-IRRA en esta región en la que se localizan las tensiones CH de las cadenas del fosfolípido proporcionan información sobre los ángulos de inclinación y la conformación de las cadenas acílicas. Se presentan en este apartado los resultados y el análisis de los mismos, tanto para las monocapas preparadas con el nucleolípido en ausencia de guanina como para las preparadas en presencia de guanina.

La figura 6.9 se muestran los espectros PM-IRRA de las monocapas 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbida sobre electrodos monocristalinos de Au(111), preparadas en ausencia y en presencia de guanina, a distintos potenciales. La línea superior continua en azul representa el espectro teórico en la región de tensión de CH, calculado a partir de las constantes ópticas, para una monocapa 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina formada por moléculas distribuidas al azar en una película de 30 Å de espesor.



**Fig. 6.9** Espectros de PM-IRRAS en la región de 2800-3300  $\text{cm}^{-1}$  en NaF 0.1M /  $\text{D}_2\text{O}$  para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au (111) a los potenciales indicados en presencia (—) y ausencia (—) de guanina. Espectro teórico, calculado

utilizando las constantes ópticas, para una monocapa de 30 Å de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina formada por moléculas orientadas al azar (—).

Los espectros experimentales a los distintos potenciales son similares al espectro teórico. Ambos están formados por cuatro señales cuya frecuencia y asignación se recoge en la Tabla 2. Debido a la baja intensidad de las señales su posición y su anchura fueron bastante sensibles al procedimiento de corrección del fondo, resultando las barras de error bastante grandes, en consecuencia los cambios en las posiciones y anchuras de las bandas con el potencial del electrodo están dentro del error experimental.

**Tabla. 2** Frecuencias experimentales y teóricas en NaF 0.1M / D<sub>2</sub>O para el espectro de PM-IRRAS de una monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a 0.055V<sub>SCE</sub>.

<u>Asignación</u>	<u>Numero de onda</u>	
	<u>Espectro teórico</u>	<u>PM-IRRAS a 0.155V vs SCE</u>
str <sub>s</sub> CH <sub>2</sub>	2852 cm <sup>-1</sup>	2851 cm <sup>-1</sup>
str <sub>s</sub> CH <sub>3</sub>	2874 cm <sup>-1</sup>	2872 cm <sup>-1</sup>
str <sub>a</sub> CH <sub>2</sub>	2921 cm <sup>-1</sup>	2925 cm <sup>-1</sup>
str <sub>a</sub> CH <sub>3</sub>	2954 cm <sup>-1</sup>	2954 cm <sup>-1</sup>

(str- tensión , bend- flexión s-simétrica, a-asimétrica)

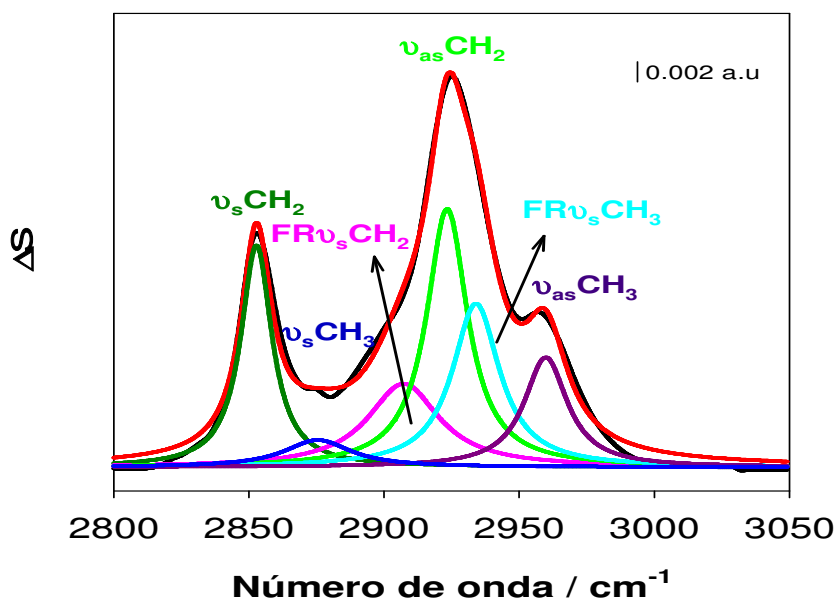
Los espectros que se obtienen para la monocapa preparada en presencia de guanina se pueden asignar de la misma manera, conforme a los datos de la tabla, pues proporcionan señales a las mismas frecuencias (Fig. 6.9). Sin embargo, las intensidades de estas señales son menores, en todo rango de potenciales, a las obtenidas con la monocapa que no contiene guanina.

Esta variación de la intensidad de las señales con el potencial y con la presencia de guanina debe estar relacionada con cambios en la orientación de las cadenas acílicas. Para cuantificar la orientación de la bicapa se determinaron las intensidades integradas de las bandas asociadas a los modos normales de tensión simétricos y asimétricos de CH<sub>2</sub>. La intensidad integrada de una banda de IR depende del ángulo entre las direcciones del momento dipolar de la transición de una vibración dada y el campo eléctrico del fotón. El vector campo eléctrico de un fotón de luz polarizada-p es perpendicular a la superficie

del metal. Por tanto el ángulo,  $\theta$ , entre la normal a la superficie y la dirección del momento dipolar de transición puede calcularse utilizando la siguiente ecuación:<sup>22,23</sup>

$$\cos^2\theta = \frac{1}{3} \frac{A(E)}{A(T)} \quad (1)$$

donde  $A(E)$  es la intensidad integrada de la banda experimental a un potencial determinado mientras que  $A(T)$  es la intensidad integrada de la banda teórica calculada suponiendo una  $30\text{\AA}$  de moléculas orientadas al azar. El espectro teórico representado en la figura 6.9 en azul, como se mencionó anteriormente, puede calcularse utilizando las constantes ópticas del 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina utilizando el método matricial.<sup>5,22</sup> La deconvolución del espectro permite obtener las bandas correspondientes a cada modo de vibración por separado, lo que permite calcular las intensidades integradas teóricas. El resultado de esta deconvolución para el espectro teórico se muestra en la figura 6.10.

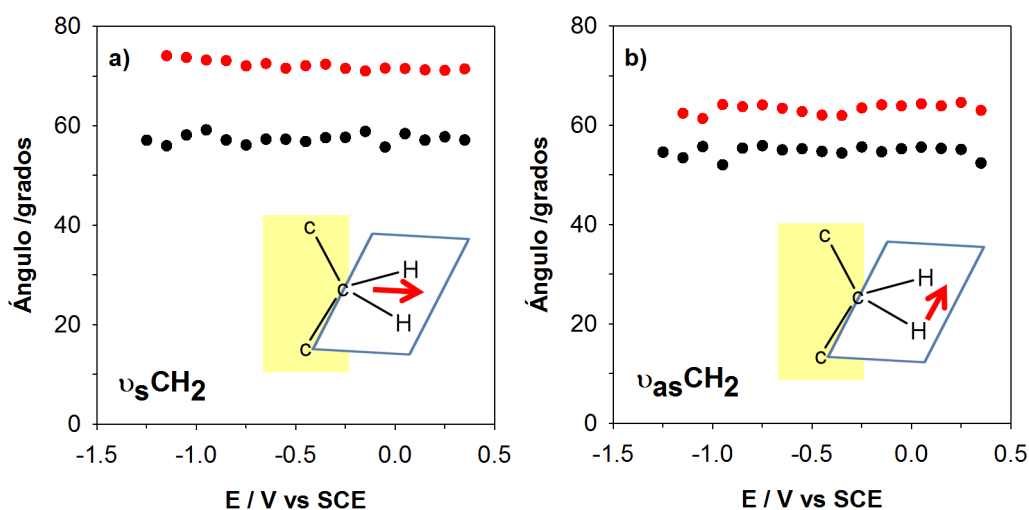


**Fig. 6.10** Ejemplo de una deconvolución de la región de tensión de CH en cuatro bandas correspondientes a las vibraciones simétricas,  $\nu_s$ , y asimétricas,  $\nu_{as}$ , de  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  mas dos resonancias de Fermi entre los armónicos de los monos de vibración de flexión simétricos de metilo  $\text{FR}\nu_s\text{CH}_2$   $\text{FR}\nu_s\text{CH}_3$  son las resonancias de Fermi para el espectro de una monocapa de  $30\text{\AA}$  de espesor de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina orientados al azar sobre la superficie de Au(111).

En la figura 6.11a se representa gráficamente el ángulo entre el momento dipolar de la transición asociado a  $\nu_s\text{CH}_2$  y la normal a la superficie en función del potencial aplicado al electrodo mientras que la figura 6.11b se representa el ángulo que forma el momento dipolar de la transición asociado a  $\nu_{as}\text{CH}_2$ . En ambos casos los círculos en rojo representan



los resultados de la monocapa que contiene guanina y los negros corresponden a los de la monocapa en ausencia de guanina. En ningún caso se observa dependencia con el potencial. Los valores de los ángulos asociados a ambas vibraciones son prácticamente iguales dentro de los límites de las incertidumbres experimentales. Sin embargo ambos aumentan en presencia de guanina siendo el aumento más acusado en el caso de la vibración de tensión simétrica de CH<sub>2</sub> donde el aumento es de unos 20° mientras que para la vibración de tensión asimétrica solamente es de unos 10°. Este comportamiento de las monocapas respecto al potencial sugiere que en ambas situaciones, con o sin guanina, la orientación de las cadenas acílicas es independiente del potencial sin embargo la presencia de guanina afecta claramente en su disposición respecto a la superficie electrodródica



**Fig. 6.11** Representación del ángulo entre el momento dipolar de la transición y la normal al electrodo en función del potencial para a) ν<sub>s</sub>CH<sub>2</sub> y b) ν<sub>as</sub>CH<sub>2</sub> para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre de Au(111) en (círculos rellenos rojos) presencia y (círculos rellenos negros) ausencia de guanina. Se incluyen en la figura las representaciones esquemáticas de las direcciones de los momentos dipolares de la transición asociados a ν<sub>s</sub>CH<sub>2</sub> y ν<sub>as</sub>CH<sub>2</sub> respectivamente

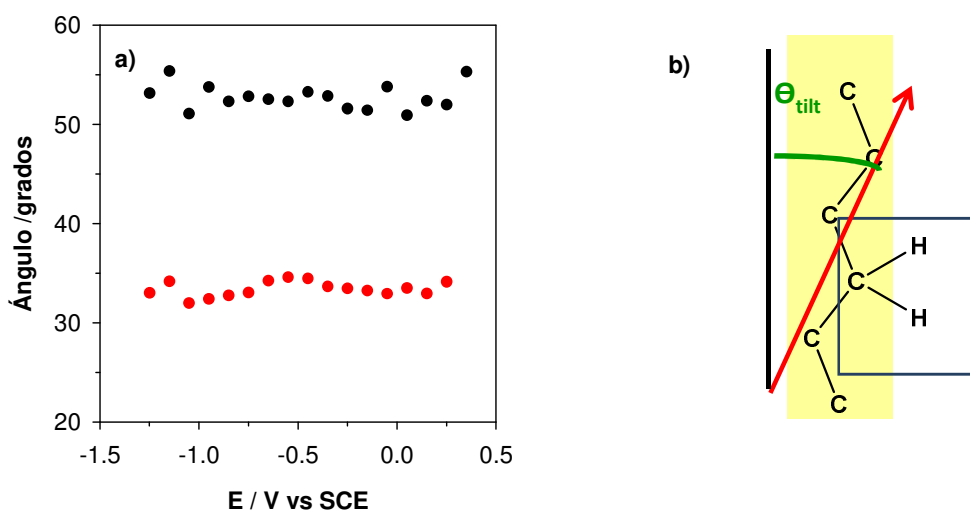
En ambas figuras se incluye también la representación gráfica de las direcciones de los momentos dipolares de la transición asociados a dichas vibraciones. Puede observarse que en el caso de la vibración de tensión simétrica el momento dipolar de la transición se dirige a través de la bisectriz del ángulo que contiene al grupo metileno, mientras que la simétrica se encuentra a lo largo de la línea que une sus dos átomos de hidrógeno. Ambos vectores son perpendiculares entre sí y, también perpendiculares a la línea que une la cadena de hidrocarburos de fragmentos trans de la molécula completamente extendida. Dado que estas tres direcciones son perpendiculares entre sí, el conocimiento de los

ángulos  $\theta_{vs}$  y  $\theta_{vas}$  permite calcular de una forma sencilla la inclinación de las cadenas de hidrocarburos de la monocapa,  $\theta_{tilt}$ , utilizando la siguiente expresión:

$$\cos^2\theta_{tilt} + \cos^2\theta_{vs} + \cos^2\theta_{vas} = 1 \quad (2)$$

La ecuación (2) da un promedio de la orientación de los fragmentos *trans* de la cadena. En principio sólo podría utilizarse cuando las cadenas hidrocarbonadas estén totalmente extendidas como ocurre en la configuración *trans*. Sin embargo, la mayoría de las veces este método resulta útil si se tiene en cuenta que se puede producir la fusión de la cadena de hidrocarburos.<sup>24</sup>

En la figura 6.12a se representa el ángulo de inclinación en función del potencial del electrodo para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre de Au(111) que contienen guanina, representado por círculos rojos, y que no la contienen, por círculos negros.



**Fig. 6.12** a) Representación del ángulo de inclinación de la cadena alquílica respecto a la dirección normal al electrodo en función del potencial para monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre de Au(111) en presencia (círculos rellenos rojos) y ausencia de guanina (círculos rellenos negros). Se incluye en la figura la representación esquemática de este ángulo.

Los resultados muestran que en ausencia de guanina el valor del ángulo de inclinación es el mismo a todos los valores de potencial. Lo mismo ocurre cuando la guanina está presente. Esto confirma que las estructuras de las monocapa en ambas condiciones son independientes del potencial. Sin embargo se observa como la presencia de guanina provoca una disminución en el ángulo de inclinación de unos 20° a todos los potenciales. Esta disminución de la inclinación de las cadenas puede interpretarse como un aumento

del desorden de la monocapa por la presencia de guanina, o como resultado de la adopción de una orientación distinta del nucleolípido originada por la posible reorientación del fragmento de citosina para poder interactuar con la guanina. Por otra parte, en los cálculos anteriores se ha supuesto el mismo recubrimiento de la superficie electródica por parte del nucleolípido, pero podría pensarse que cuando la monocapa se prepara en presencia de guanina, se adsorben menos moléculas de nucleolípido, al estar la superficie parcialmente ocupada por la fuerte tendencia de la guanina a adsorberse. La disminución del ángulo de inclinación por la presencia de guanina se correlaciona con la disminución de la intensidad de la señal de tensión de los carbonilos de los ésteres del fragmento lipídico del nucleolípido en la región de frecuencias menores, ya comentado. Sin embargo, no es posible solo con los resultados espectro-electroquímicos poder decidir entre las opciones apuntadas. Se requeriría el uso de técnicas nanoscópicas y cálculos teóricos que nos permitieran proponer modelos más detallados de la organización molecular en la superficie.

### **6.3. Formación y caracterización de bicapas de 1-hexanodecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos de Au(111)**

#### **6.3.1. Introducción**

Se concluyó en el apartado anterior la posible adsorción del fragmento de citosina del nucleolípido sobre el electrodo cuando se preparan las monocapas en la balanza de Langmuir por el procedimiento de transferencia Schaeffer, a pesar de que en la interfase aire/disolución las cadenas lipídicas deben estar dirigidas hacia la fase exterior gaseosa. La mayor tendencia a adsorberse sobre oro de la guanina, así como su tendencia a interaccionar con su base complementaria hace que en las monocapas preparadas en presencia de guanina, ésta se adsorba también sobre el electrodo.

Con el fin de impedir que el nucleolípido se adsorba a la superficie electródica por su grupo citosina, se ha optado por preparar bicapas mediante el uso de un derivado lipídico que se pueda anclar químicamente al metal electródico y presentar su parte hidrofóbica hacia la interfase aire/disolución en el momento de la transferencia del nucleolípido al electrodo. Se ha elegido, a este fin el compuesto lipo-tiólico, 1-hexadecanotiol, por poseer una cadena de longitud análoga a la del nucleolípido en estudio. Inicialmente se protege la superficie de Au(111) con una monocapa de 1-hexanodecanotiol, mediante la formación de un enlace Au-S ( $45 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), antes de unir la segunda capa consistente en el 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina por transferencia desde la interfase de la balanza de Langmuir. Como en el caso de las monocapas, se preparan dos tipos de bicapas, según que en la subfase de la balanza no exista guanina o se haya agregado dicha base complementaria de la del nucleolípido. En la siguiente sección se presentan los resultados electroquímicos y espectro-electroquímicos que se han obtenido con ambos tipos de bicapas.

#### **6.3.2. Experimental**

##### **6.3.2.1 Formación de bicapas insolubles**

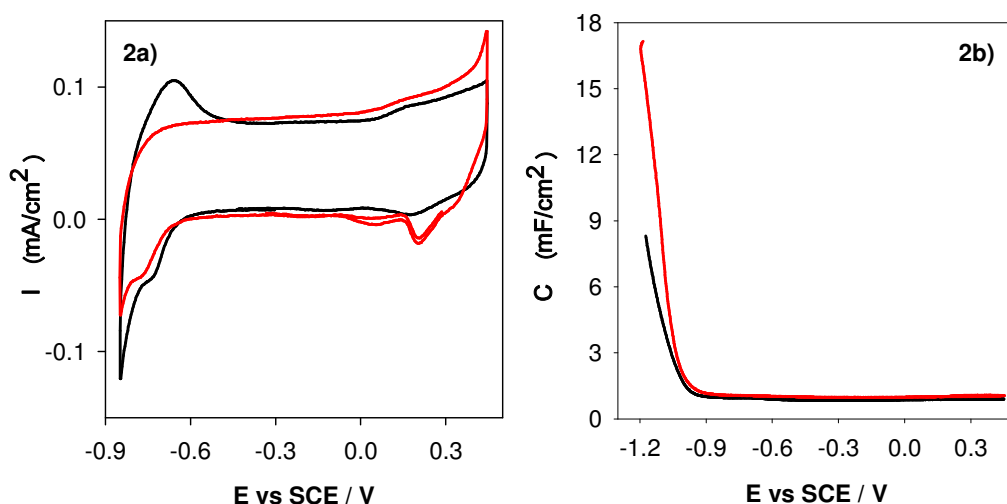
Las bicapas se prepararon formando inicialmente una primera monocapa de 1-hexadecanotiol sumergiendo el electrodo de Au(111) en una disolución etanólica 1mg / ml del tiol al menos durante 12 horas a  $60 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  para asegurar el recubrimiento total de

la superficie. Para quitar cualquier material fisisorbido las muestras se aclararon primero con etanol anhidro y después con agua y finalmente se secaron bajo una corriente de nitrógeno. De esta forma las moléculas de tiol quedan quimisorbidas a la superficie del electrodo de oro. Este tipo de autoensamblado aporta mayor resistencia química que las monocapas formadas por transferencia Langmuir-Schaeffer. Finalmente, para acoplar la segunda monocapa, formada por el nucleolípido, se llevó a cabo una transferencia de Langmuir-Schaeffer, como la explicada más arriba, desde una balanza en la que se ha formado la monocapa de nucleolípido en la interfase aire/disolución.

El resto de las condiciones y procedimientos experimentales se han descrito en el apartado 6.2.1 de este capítulo

### **6.3.3. Caracterización electroquímica de las bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos de Au(111)**

Se han realizado medidas de voltametría cíclica, y capacidad diferencial para describir las características de las bicapas preparadas en diferentes condiciones experimentales (ausencia y presencia de guanina) sobre electrodos monocristalinos de Au(111) y poder determinar su estabilidad en función del potencial. En la figura 6.13a se muestra la voltametría cíclica de los dos tipos de bicapas (preparadas en presencia y en ausencia de guanina) mientras que en la figura 6.13b se muestran los resultados correspondientes a las curvas de capacidad diferencial. Se observa que en ambos casos las bicapas son estables en la región de potenciales entre 0.45V vs SCE y -1V vs SCE. A potenciales más negativos que -1V vs SCE la capacidad empieza a aumentar exponencialmente indicando que a este valor de potencial la bicapa se desorbe quedando el electrodo sin recubrir. Finalmente en ambos casos se obtienen buenos valores del mínimo de capacidad diferencial; 0.85  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  en ausencia de guanina y 0.98  $\mu\text{Fcm}^{-2}$  cuando la guanina está presente. Estos resultados indican que las bicapas son estables y sin muchos defectos, aproximándose además su valor al de las membranas biológicas  $\sim 1 \mu\text{Fcm}^{-2}$ .



**Fig. 6.13** a) Voltagramas de la región capacitativa y b) curvas de capacidad diferencial del Au(111) en presencia una bicapa de bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina presencia (—) y ausencia (—) de guanina potenciales bajos (---). Velocidad de barrido 20 mV/s.

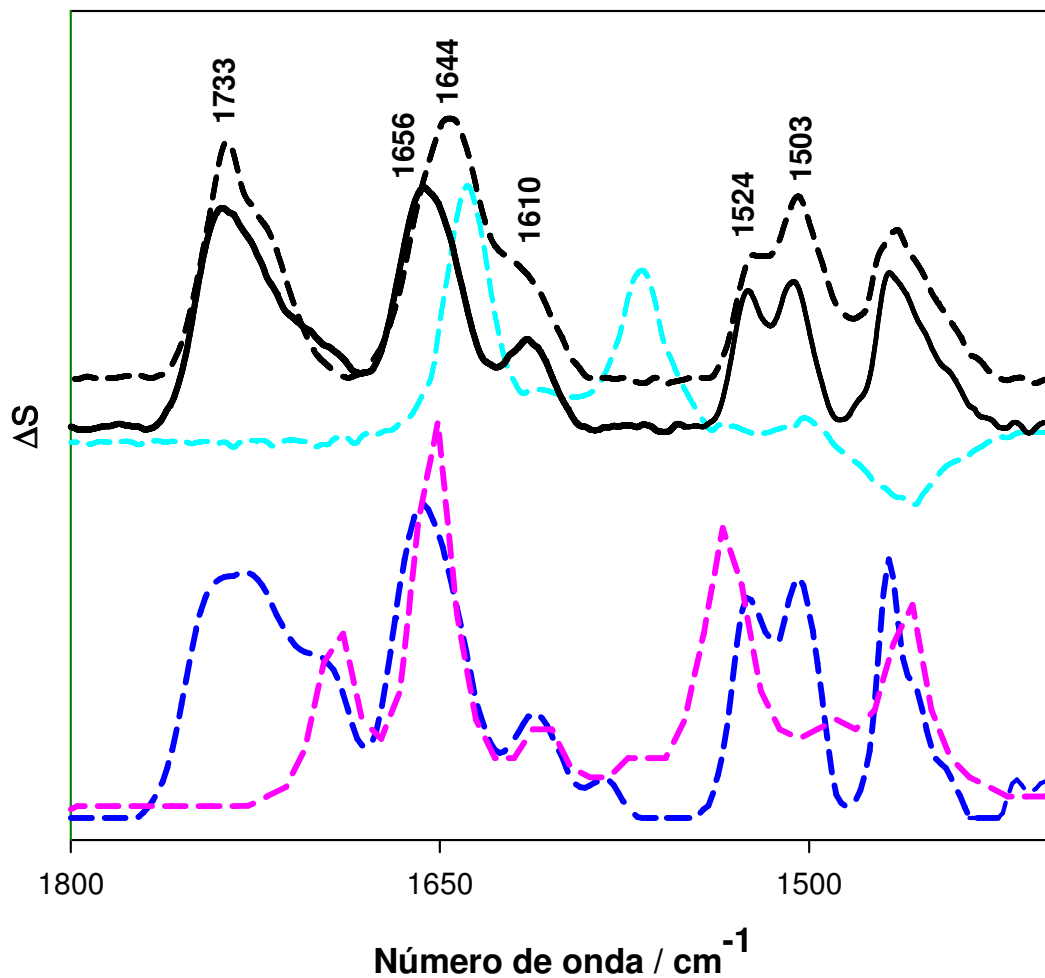
#### 6.3.4. Espectros PM-IRRA de los electrodos recubiertos de bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos de Au(111)

Las señales características de la absorción-reflexión en el IR de una bicapa de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina, en presencia y ausencia de guanina, adsorbida sobre electrodos monocristalinos de Au(111) pueden discutirse en dos partes en función de las posiciones de las bandas asociadas al lípido y al grupo citosina del nucleolípido.

##### 6.3.4.1. Región 1300-1800 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros PM-IRRA de las bicapas

En la figura 6.14 se muestra el espectro de PM-IRRAS entre 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  para electrodos monocristalinos de oro recubiertos con bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina a 0.055V vs SCE y se compara con los espectros de transmisión del nucleolípido y de la citosina y con el espectro de la monocapa. Puede observarse como las señales correspondientes a modos de vibración del fragmento de citosina son en el caso de la bicapa coincidentes con el espectro de transmisión del nucleolípido. Así, la señal intensa a 1656  $\text{cm}^{-1}$  y la de 1615  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones de tensión del carbonilo y de anillo del fragmento de citosina (Tabla 3), aparece a la misma frecuencia que en el espectro de transmisión del nucleolípido,

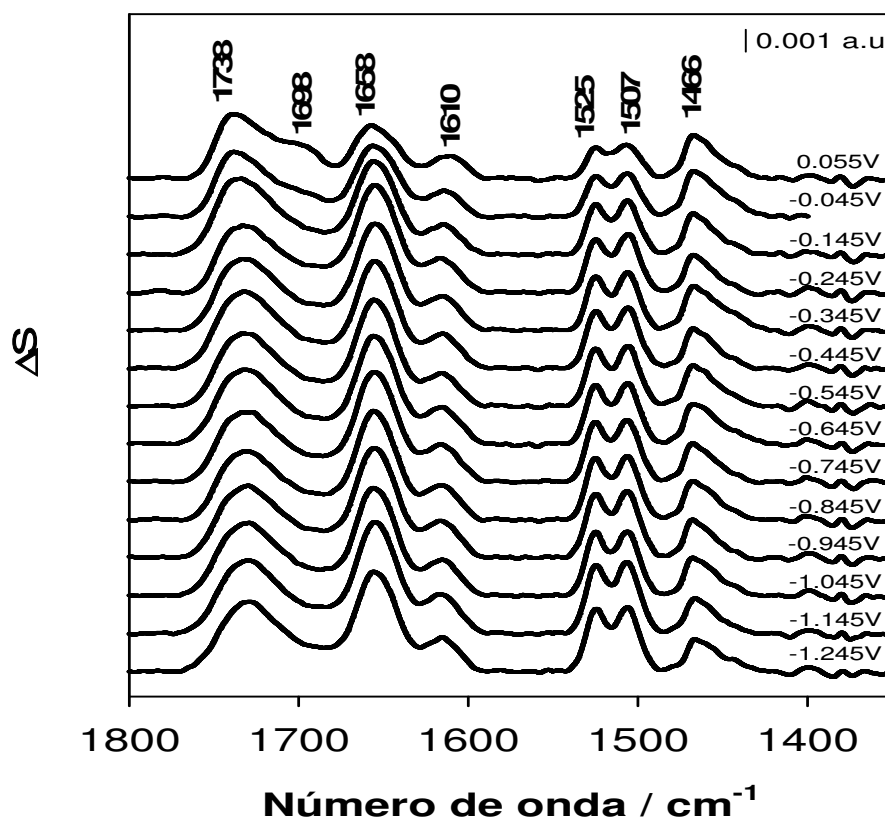
contrariamente a lo observado en el caso de la monocapa de nucleolípido, que se desplazan hacia frecuencias más bajas. Lo mismo puede decirse de la señal a  $1506\text{ cm}^{-1}$ , que en el espectro de la monocapa aparece desplazada hacia el rojo y en el de la bicapa aparece a la misma frecuencia que en el espectro de transmisión. Se puede, por tanto concluir que el fragmento de citosina no participa en la interacción con el electrodo.



**Fig. 6.14** Espectros PM-IRRA en la región de  $1300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  NaF  $0.1\text{M}$  /  $\text{D}_2\text{O}$  de bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina (—) adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a  $0.055\text{V}$  vs SCE, y de una monocapa de / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina (- - -). Espectros de ATR-SEIRA, en la región entre  $1300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ , para la citosina adsorbida sobre películas nano-estructuradas de oro desde disoluciones  $1\text{ mM}$  de citosina en  $\text{H}_2\text{O}$ , a  $0.5\text{V}$  vs SCE (- - -)

En la figura 6.15 se presentan los espectros PM-IRRA en esta misma región espectral a los distintos potenciales. La mayoría de las señales no sufren desplazamientos significativos al modificar el potencial. Sin embargo las intensidades de las señales a  $1658\text{ cm}^{-1}$  y las de  $1535\text{-}1507\text{ cm}^{-1}$  relacionadas con vibraciones del fragmento citidínico

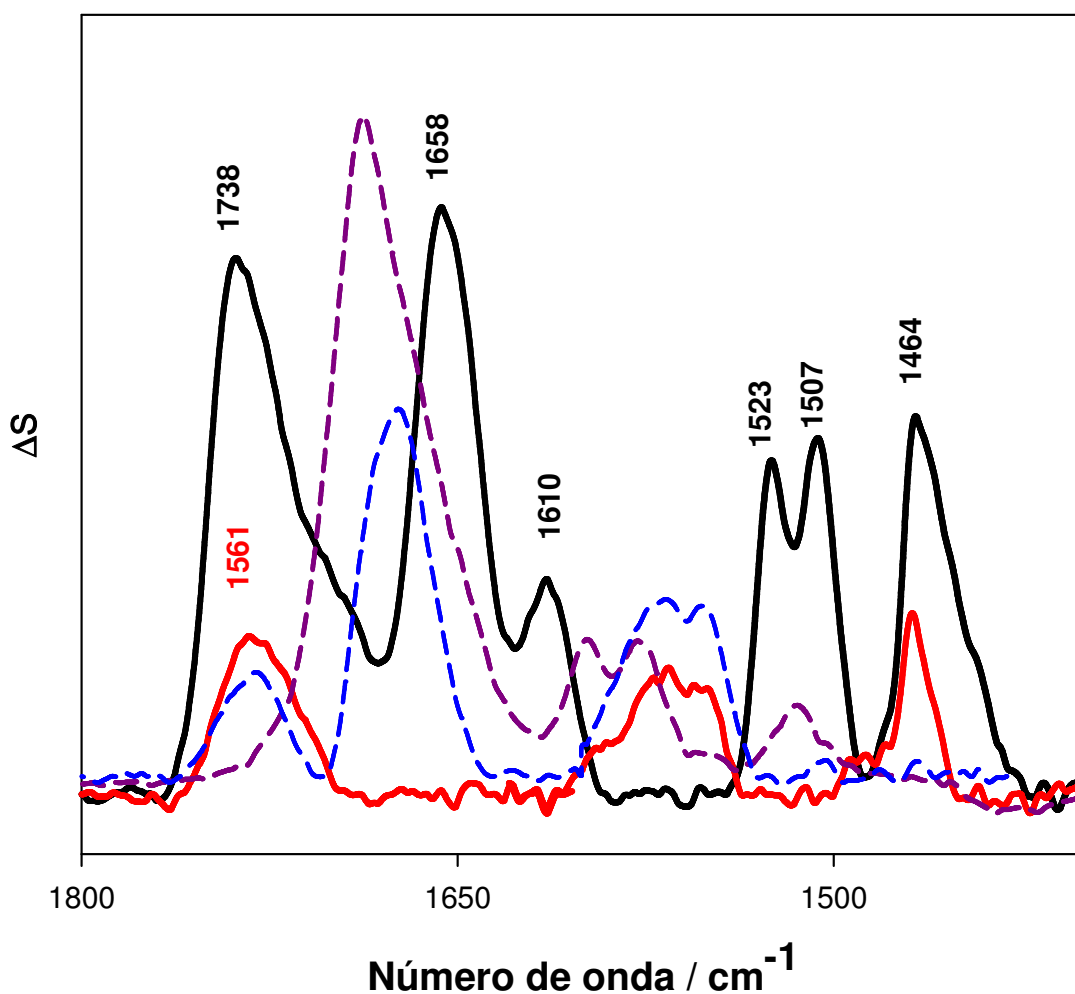
disminuyen ligeramente su intensidad a medida que aumenta el potencial lo que podría indicar la adopción de una inclinación distinta respecto a la superficie del electrodo del fragmento de citosina a los potenciales más altos.



**Fig. 6.15** Espectros de PM-IRRA en la región de tensión de 2800-300  $\text{cm}^{-1}$  en NaF 0.1M /  $\text{D}_2\text{O}$  de monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a los potenciales indicados.

En la figura 6.16 se comparan los espectros de PM-IRRA en la región 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina preparadas en ausencia y en presencia de guanina a 0.055V vs SCE. Se ha incluido también el espectro ATR-SEIRA de la guanina adsorbida sobre electrodos de oro, así como el espectro PM-IRRAS de la monocapa preparada en presencia de guanina.



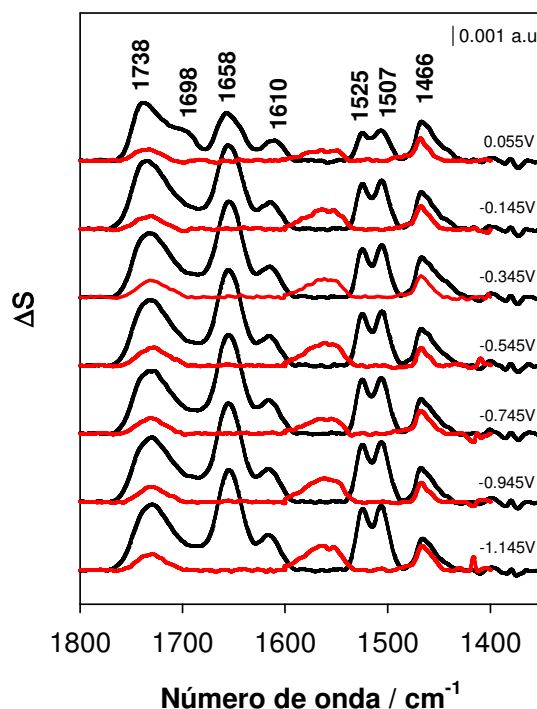


**Fig. 6.16** Espectros de PM-IRRA de la región 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  en NaF 0.1M /  $\text{D}_2\text{O}$  para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en presencia (línea continua roja) y en ausencia (línea continua negra) de guanina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a 0.055  $\text{V}_{\text{SCE}}$ . Se incluye el espectro PM-IRRA correspondiente a la monocapa en presencia de guanina (línea azul discontinua) y el espectro ATR\_SEIRA de la guanina adsorbida sobre oro (línea rosa discontinua).

La comparación en esta región espectral de los espectros de las bicapas preparadas en ausencia y en presencia de guanina permite observar los mismos cambios ya comentados en el caso de las monocapas de desaparición de las señales de los modos de vibración del fragmento de citosina y la disminución de intensidad de la señal de los carbonilos de los fragmentos lipídicos del nucleolípido. Al igual que en el caso de las monocapas, se puede pensar en que el fragmento de citosina adopta una orientación más plana respecto al electrodo, probablemente para interactuar con la guanina.

Por otra parte, la comparación entre los espectros de las bicapas y los de las monocapas preparadas ambas en presencia de guanina, permite observar un cambio significativo en el caso de las bicapas, consistente en la desaparición de la señal intensa de tensión del carbonilo de la guanina, aunque sí están presentes las señales algo más débiles en torno a  $1560\text{ cm}^{-1}$ , que se asignaron a vibraciones CN del anillo de guanina. Estos hechos sugieren que la guanina no se adsorbe sobre el electrodo, sino que estaría interaccionando con la citosina de la parte exterior (hacia la disolución) de la bicapa, interaccionando por puentes de hidrógeno en los que participa su grupo carbonilo. La interacción con la citosina, debe propiciar la adopción de una orientación plana de la citosina y cierta inclinación del plano molecular de la guanina, respecto a la superficie del electrodo.

En la figura 6.17 se comparan los espectros de PM-IRRAS a algunos potenciales desde  $-1.245\text{V}_{\text{SCE}}$  hasta  $0.055\text{V}_{\text{SCE}}$  para la bicapa 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en presencia y en ausencia de guanina.

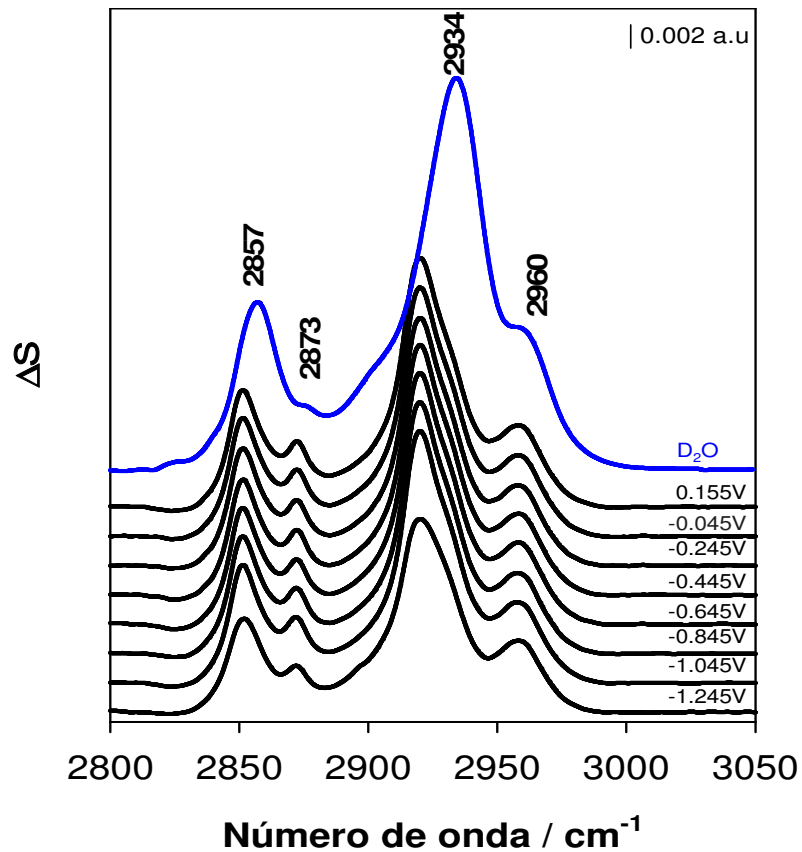


**Fig. 6.17** Espectros de PM-IRRAS en  $\text{NaF } 0.1\text{M} / \text{D}_2\text{O}$  para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en presencia (—) y en ausencia (—) de guanina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de  $\text{Au}(111)$  a los potenciales indicados referidos al electrodo saturado de calomelanos. Región del espectro comprendida entre  $1800\text{-}1450\text{cm}^{-1}$ .

Las señales observadas a todos los potenciales son las mismas esperándose por tanto que las interacciones sean independientes del potencial. No se observan además aumentos ni desplazamientos significativos de las señales con el potencial por tanto la orientación de la bicapa en presencia de guanina respecto al electrodo no se ve afectada por cambios en el potencial manteniéndose siempre constante. Sin embargo a todos los potenciales las señales son de menor intensidad que las obtenidas en el caso de la bicapa en ausencia de guanina por lo que se espera que la guanina provoque que los grupos asociados a estos modos normales de vibración adquieran una disposición más paralela respecto al electrodo en toda la región de potenciales, tal y como se discutió previamente para el potencial de 0.055V vs CE.

#### **6.3.4.2 Región 2800-3300 cm<sup>-1</sup> de los espectros de las bicapas preparadas en ausencia y en presencia de guanina**

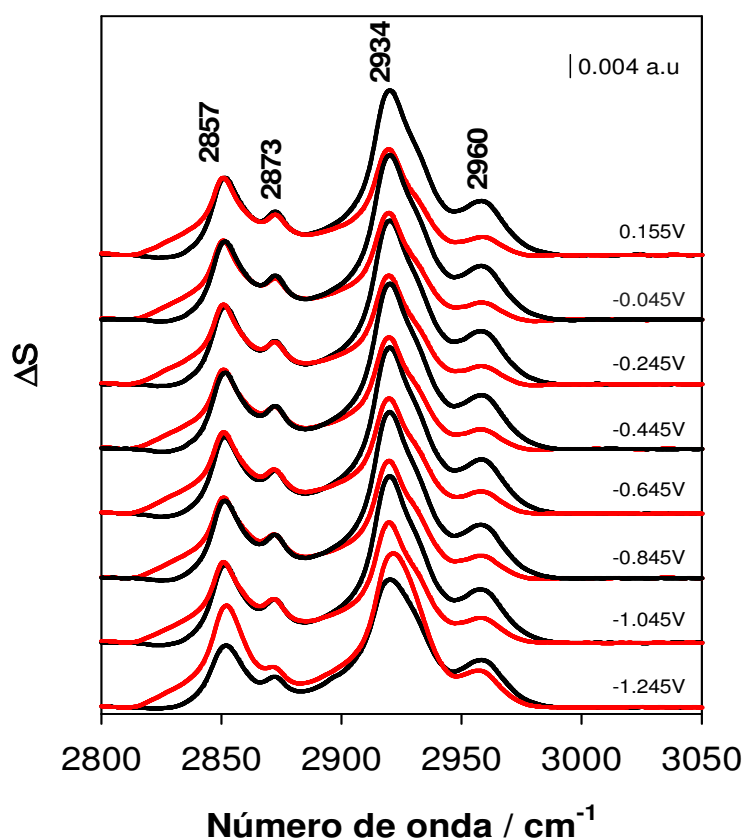
La figura 6.18 muestra los espectros en la región de 2800-3300 cm<sup>-1</sup> de bicapas 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111). La línea superior continua en azul representa el espectro teórico en la región de tensión de CH, calculado a partir de las constantes ópticas, para una bicapa de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina formada por moléculas distribuidas al azar en una película de 55 Å de espesor. Las curvas restantes en la figura 6.18 representan los espectros de PM-IRRAS para una bicapa experimental de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbida sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a los potenciales indicados.



**Fig. 6.18** Espectros de PM-IRRA en la región de tensión de CH en NaF 0.1M / D<sub>2</sub>O para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a los potenciales indicados referidos al electrodo de calomelanos. La línea superior azul representa el espectro teórico, calculado utilizando las constantes ópticas, para una bicapa de 55 Å de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina formada por moléculas orientadas al azar.

Se puede observar que los espectros experimentales son similares al teórico. Se observan cuatro señales correspondientes a los modos normales de vibración de tensión simétricos y asimétricos de CH<sub>2</sub> a 2857 y 2934 cm<sup>-1</sup> respectivamente mientras que las otras dos señales a 2873 y 2960 cm<sup>-1</sup> se asocian con los modos normales de vibración simétrico y asimétrico respectivamente del grupo metilo. Las señales a 2857 y a 2934, no obstante están desplazados algo hacia el rojo en los espectros de las bicapas experimentales. No obstante hay que destacar que debido a la baja intensidad de las señales su posición y su anchura fueron bastante sensibles al procedimiento de corrección del fondo, resultando las barras de error bastante grandes, en consecuencia los cambios en las posiciones y anchuras de las bandas con el potencial del electrodo están dentro del error experimental.

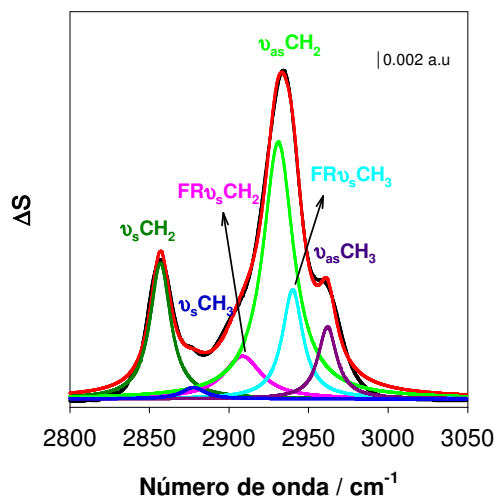
En la figura 6.19 se observa que al añadir guanina al medio las señales asociadas a los modos normales de vibración de tensión simétricos para los grupos metilo y metileno no sufren modificaciones apreciables respecto a la situación sin guanina. Sin embargo las señales asociadas a los modos normales de vibración asimétricos de estos grupos disminuyen su intensidad en presencia de guanina en todo rango de potenciales cuando la bicapa esta adsorbida lo que sugiere que la cadena acílica se dispone más paralela al electrodo en presencia de guanina.



**Fig. 6.19** Espectros de PM-IRRA en la región de tensión de CH en NaF 0.1M / D<sub>2</sub>O para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en presencia (línea roja) y en ausencia (línea negra) de guanina adsorbidas sobre electrodos monocristalinos de Au(111) a los potenciales indicados.

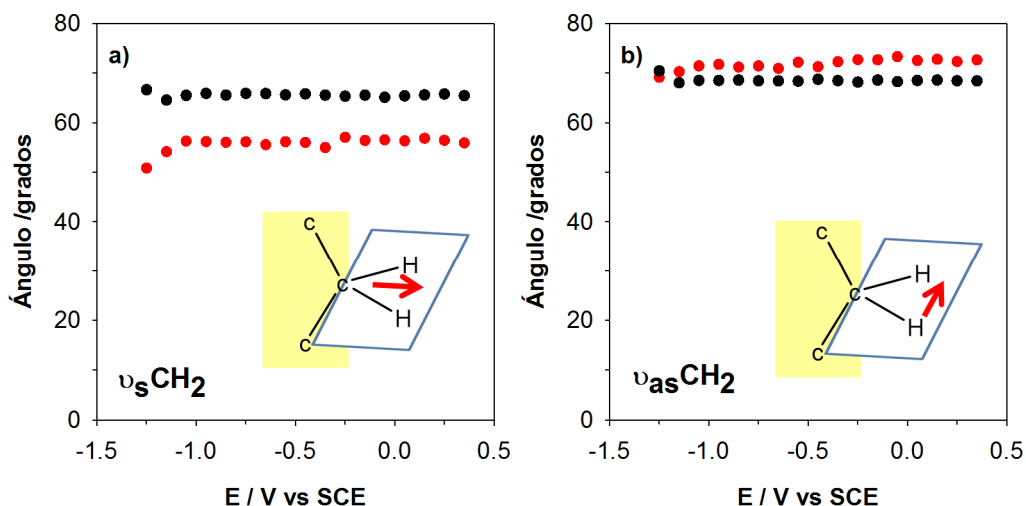
De nuevo para cuantificar la orientación de las cadenas acílicas en la bicapa se determinaron las intensidades integradas de las bandas asociadas a los modos normales de tensión simétricos y asimétricos de CH<sub>2</sub>, tal como se realizó en el caso de las monocapas. En la figura 6.20 se muestra la deconvolución del espectro teórico obtenido a partir de las constantes ópticas del 1-hexadecanotiol y del 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina utilizando el método matricial. Los valores de las intensidades integrados de las

señales asociadas a los modos normales de vibración de tensión simétrica y asimétrica de  $\text{CH}_2$  proporcionan los datos teóricos a los que se hace referencia en la ecuación (1).



**Fig. 6.20 Ejemplo** de una deconvolución de la región de tensión de CH en cuatro bandas correspondientes a las vibraciones simétricas,  $\nu_s$ , y asimétricas,  $\nu_{as}$ , de  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  mas dos resonancias de Fermi entre los armónicos de los modos de vibración de flexión simétricos de metilo  $\text{FR}\delta_s\text{CH}_3$  y los de tensión de metileno  $\text{FR}\nu_s\text{CH}_2$  para el espectro de una bicapa de 55 Å de espesor de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina orientados al azar sobre la superficie de Au(111).

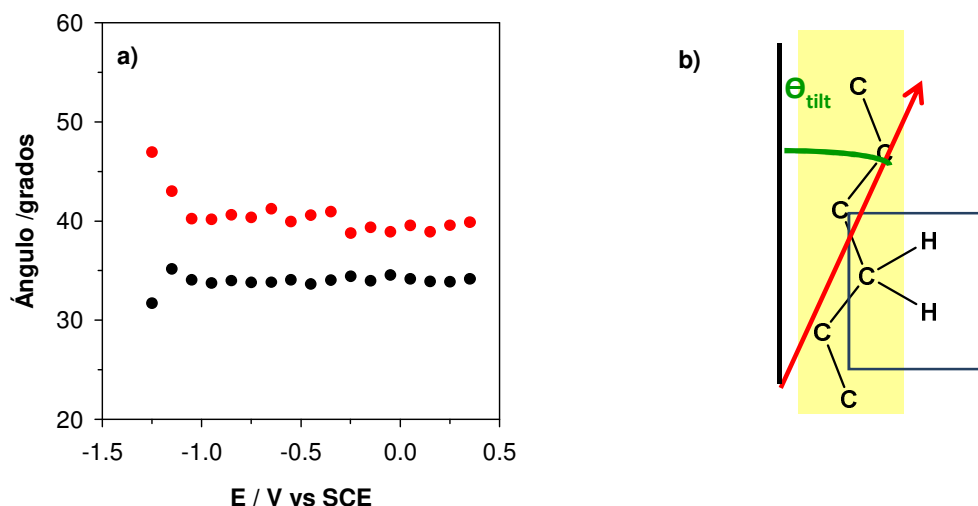
Los ángulos del momento de la transición  $\nu_s\text{CH}_2$  y el del momento de la transición a  $\nu_s\text{CH}_2$  frente a la normal a la superficie, se han representado en las figuras 6.21a y 6.21b, respectivamente, en función del potencial. En ambos casos los círculos rojos representan los resultados en presencia de guanina y los negros en ausencia de guanina. No se observa en ninguno de los casos dependencia de los ángulos con el potencial, dentro de los límites de las incertidumbres experimentales (son mayores en el caso de la vibración de tensión simétrica). Se observa, además que en las bicapas preparadas en presencia de guanina aumenta levemente el ángulo asociado con el modo de vibración de tensión asimétrico de metileno mientras que disminuye en mayor medida el ángulo relacionado con el modo normal de vibración simétrico. Estos cambios indican que en ambos casos, en ausencia o presencia de guanina, la orientación de las cadenas acílicas de la bicapa es independiente del potencial, pero que la presencia de guanina en la bicapa afecta en cierta medida a la disposición de las cadenas acílicas.



**Fig. 6.21** Representación del ángulo entre el momento dipolar de la transición y la normal al electrodo en función del potencial para a)  $\nu_sCH_2$  y b)  $\nu_{as}CH_2$  para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre de Au(111) en (círculos rellenos rojos) presencia y (círculos rellenos negros) ausencia de guanina. Se incluyen en la figura las representaciones esquemáticas de las direcciones de los momentos dipolares de la transición asociados a  $\nu_sCH_2$  y  $\nu_{as}CH_2$  respectivamente

En ambas figuras se incluye también la representación gráfica de las direcciones de los momentos dipolares de la transición asociados a dichas vibraciones, que de nuevo son perpendiculares entre si y, a su vez, perpendiculares a la línea que une la cadena de hidrocarburos de fragmentos trans de la molécula completamente extendida. Por tanto para calcular la inclinación de la cadena acílica de la monocapa,  $\Theta_{\text{tilt}}$ , se utiliza la ecuación (2).

En la figura 6.22a se representa el ángulo de inclinación en función del potencial del electrodo para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre de Au(111) en presencia de guanina representado por círculos rojos y sin guanina por círculos negros.



**Fig. 6.22** a) Representación del ángulo de inclinación de la cadena bicapa respecto al plano normal al electrodo en función del potencial para bicapas de 1-hexadecanotiol / 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre de Au(111) en (círculos rellenos rojos) presencia y (círculos rellenos negros) ausencia de guanina. Se incluyen en la figura las representaciones esquemáticas de este ángulo

Los resultados muestran que efectivamente en el caso de los dos tipos de bicapas el ángulo de inclinación de las cadenas es independiente del potencial, con valores entre 35 y 40° para las bicapas sin guanina y con guanina, respectivamente. La presencia de guanina en las bicapas provoca un ligero aumento en el ángulo de inclinación de unos 5° a todos los potenciales, que podría estar relacionado con un ligero cambio en la orientación de las cadenas que faciliten las interacciones guanina-citosina en la parte exterior de la bicapa. Sin embargo, ambos valores están en torno a los valores habituales encontrados en el caso de estructuras lipídicas autoorganizadas.



## 6.4 Conclusiones

Se ha utilizado un método espectro electroquímico combinando las técnicas electroquímicas convencionales con la técnica de infrarrojos de modalidad PM-IRRAS para estudiar la estabilidad de monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina adsorbidas sobre electrodos Au(111), preparadas en la balanza de Langmuir.

- Las medidas electroquímicas confirmaron que se obtenían monocapas estables de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en un rango relativamente amplio de potenciales, pero con valores de capacidad diferencial altos en comparación con los valores esperados para una monocapa del espesor, lo que indica cierto grado de desorden en las condiciones de las medidas electroquímicas.

- Los datos espectroscópicos de PM-IRRAS en la región  $1400-1800\text{ cm}^{-1}$  permitieron concluir que el nucleolípido se une a la superficie electródica a través del fragmento de citosina, ya que muestran señales activas de los modos correspondientes a este fragmento, a frecuencias desplazadas con respecto al espectro de transmisión del nucleolípido. Por otra parte, se concluye la presencia de guanina adsorbida sobre el electrodo en las monocapas preparadas en presencia de guanina, debido a que los espectros de las monocapas adsorbidas sobre oro muestran las señales de tensión de características en esta región de la guanina adsorbida. Por el contrario, la desaparición de las señales de los modos de tensión de la citosina en el caso de las monocapas preparadas en presencia de guanina, no se ha interpretado como debida a la desorción de la citosina, sino más bien como una reorientación hacia una disposición más plana respecto a la superficie del electrodo, como en el caso de las coadsorciones guanina-citosina de las bases sobre electrodos de oro, estudiadas en el capítulo 5. La reorientación del fragmento de la citosina del nucleolípido lleva asociado un cambio también en la inclinación de las cadenas lipídicas del mismo, lo que se manifiesta en la disminución de las intensidades de las señales de tensión de los carbonilos de los ésteres de las cadenas acílicas.

- El análisis de las señales en la región de altas frecuencias de los espectros PM-IRRAS de las monocapas permitió calcular los ángulos de inclinación de las cadenas acílicas en el caso de los dos tipos de monocapas y confirmar así el cambio en la organización de la parte lipídica del nucleolípido que origina la presencia de guanina adsorbida sobre el

electrodo, ya que induce un aumento del ángulo de inclinación de las cadenas en torno a unos 20°.

- El estudio de las características espectroscópicas de ambas regiones en función del potencial aplicado al electrodo, permiten concluir que los dos tipos de monocapas presentan características prácticamente independientes del potencial en el rango de potenciales en los que son estables.

- Con el fin de exponer el fragmento de citosina del nucleolípido hacia la disolución, se prepararon bicapas, de manera que inicialmente se protege la superficie del electrodo con una monocapa de 1-hexadecanotiol, por inmersión, y después se prepara la segunda capa de nucleolípido en la balanza de Langmuir en ausencia y en presencia de guanina. Las bicapas así preparadas se caracterizaron electroquímicamente y se estableció el rango de potenciales en los que el electrodo de oro modificado con ellas era estable. Los valores de capacidad diferencial que se obtuvieron concordaron con los esperados para una bicapa lipídica, lo que indica una mejor organización que en el caso de las monocapas.

- El estudio comparativo de los espectros PM-IRRAS en la región de bajas frecuencias ha permitido concluir que el fragmento de citosina no se adsorbe sobre el electrodo, sino que por el contrario está dirigido hacia la parte externa de la bicapa. No obstante, los espectros de las bicapas preparadas en ausencia de guanina presentan señales activas, características de las vibraciones de la citosina en esta región, coincidentes en frecuencia con las de los espectros de transmisión del nucleolípido, que indican una orientación inclinada del fragmento de citosina, con respecto a la superficie electródica.

- Los espectros PM-IRRAS en la región de bajas frecuencias, de las bicapas preparadas en presencia de guanina, muestran la inclusión de la guanina en la estructura de la bicapa, pero sin interactuar con el metal. Se concluye, por el contrario la interacción con la citosina de la parte externa de la bicapa, al menos a través del carbonilo de la guanina, que resulta inactivo en el espectro como consecuencia. La interacción de la guanina con el fragmento de citosina de la capa de nucleolípido induce, igualmente una reorganización de la misma hacia una disposición más plana de la citosina, lo que lleva a la desaparición de las señales de las vibraciones características de la citosina en esta región del espectro.

- Los espectros PM-IRRAS en la región de altas frecuencias han confirmado dicha reorganización. El análisis de las intensidades de las señales características de tensión CH

de las cadenas acílicas en esta región ha permitido calcular los ángulos de inclinación de dichas cadenas en el caso de los dos tipos de bicapas. Se han encontrado valores unos 10° mayores en las bicapas que contienen guanina, pero ambos valores están próximos a los que se obtienen en las estructuras lipídicas autoorganizadas sobre electrodos.

- Se concluye por todo ello las posibilidades de reconocimiento molecular tanto de las monocapas como de las bicapas. La presencia de guanina induce cambios significativos en los espectros IR, con la desaparición o aparición de señales intensas a frecuencias características. Sin embargo, las posibilidades para el reconocimiento de la presencia de guanina en una disolución deben ser mayores para el caso de las bicapas, debido a la orientación del fragmento de citosina en la parte exterior de la película adsorbida.

## 6.5 Bibliografía

1. Water, S. Transport of Ions across Lipid Monolayers II . Reduction of Polarographic Currents of Cu ( II ) by Decylammonium Monolayers. **0**, (1968).
2. A. Nelson, A. B. Phospholipid monolayers at the mercury/water interface. *J. Electroanal. Chem* **202**, 253 (1986).
3. Aufret, A. N. N. Phospholipid monolayers of di-oleoyl lecithin at the mercury/water interface. *J. Electroanal. Chem* **244**, 99 (1988).
4. Zamlynyy, V. & Lipkowski, J. in *Advances in Electrochemical Science and Engineering* (eds. Alkire, R. C., Kolb, D. M., Lipkowski, J. & Ross, P.) 315–376 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006). doi:10.1002/9783527616817.ch9
5. Zamlynyy, V., Zawisza, I. & Lipkowski, J. PM FTIRRAS studies of potential-controlled transformations of a monolayer and a bilayer of 4-pentadecylpyridine, a model surfactant, adsorbed on a Au(111) electrode surface. *Langmuir* **19**, 132–145 (2003).
6. Zawisza, I., Bin, X. & Lipkowski, J. Potential-driven structural changes in Langmuir-Blodgett DMPC bilayers determined by in situ spectroelectrochemical PM IRRAS. *Langmuir* **23**, 5180–5194 (2007).
7. Rosemeyer, H. Nucleolipids: Natural occurrence, synthesis, molecular recognition, and supramolecular assemblies as potential precursors of life and bioorganic materials. *Chem. Biodivers.* **2**, 977–1062 (2005).
8. Barthélemy, P. & Barthelemy, P. Nucleoside-based lipids at work: From supramolecular assemblies to biological applications. *Comptes Rendus Chim.* **12**, 171–179 (2009).
9. Gissot, A., Camplo, M., Grinstaff, M. W. & Barthelemy, P. Nucleoside, nucleotide and oligonucleotide based amphiphiles: a successful marriage of nucleic acids with lipids. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 1324–1333 (2008).
10. Yanagawa, H., Ogawa, Y., Furuta, H. & Tsuno, K. Spontaneous formation of superhelical strands. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4567–4570 (1989).
11. M. Ahlersl, H. Ringsdorfl, H. Rosemeyer, and F. S. Orientation, recognition, and photoreaction of nucleolipids in model membranes. *Colloid Polym Sc* **142**, 132–142 (1990).
12. Ariga, K. & Kunitake, T. Molecular Recognition at Air–Water and Related Interfaces: Complementary Hydrogen Bonding and Multisite Interaction. *Acc. Chem. Res.* **31**, 371–378 (1998).
13. Paleos, C. M. & Tsiourvas, D. Molecular Recognition of Organized Assemblies via Hydrogen Bonding in Aqueous Media. *Adv. Mater.* **9**, 695–710 (1997).

14. Berti, D., Pini, F., Baglioni, P. & Teixeira, J. Micellar Aggregates from Short-Chain Phospholiponucleosides: A SANS Study. *J. Phys. Chem. B* **103**, 1738–1745 (1999).
15. Radler, U., Heiz, C., Luisi, P. L. & Tampe, R. Base-pair formation of self-organizing RNA amphiphiles within two dimensions. *Langmuir* **14**, 6620–6624 (1998).
16. Huang, J. G., Li, C. & Liang, Y. Q. FT-SERS studies on molecular recognition capabilities of monolayers of novel nucleolipid amphiphiles. *Langmuir* **16**, 3937–3940 (2000).
17. Li, C., Huang, J. & Liang, Y. Structure control on photodimerization of uracil and thymine moieties in nucleolipid Langmuir-Blodgett films by the molecular recognition effect at the air/water interface. *Langmuir* **17**, 2228–2234 (2001).
18. Shimomura, M. *et al.* Two-dimensional DNA-mimetic molecular organizations at the air-water interface. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2341–2342 (1997).
19. Miao, W. G., Du, X. Z. & Liang, Y. Q. Molecular recognition of nucleolipid monolayers of 1-(2-octadecyloxycarbonyl)ethyl)cytosine to guanosine at the air-water interface and Langmuir-Blodgett films. *Langmuir* **19**, 5389–5396 (2003).
20. Garcia-Araez, N., Brosseau, C. L., Rodriguez, P. & Lipkowski, J. Layer-by-layer PMIRRAS characterization of DMPC bilayers deposited on a Au(111) electrode surface. *Langmuir* **22**, 10365–10371 (2006).
21. Richer, J. Measurement of Physical Adsorption of Neutral Organic Species at Solid Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* **133**, 121 (1986).
22. Allara, D. L. & Swaien, J. D. An Infrared Reflection Spectroscopy Study of Oriented Cadmium Arachidate Monolayer Films on Evaporated Silver. *J. Phys. Chem.* **86**, 2700–2704 (1982).
23. Allara, D. L. & Nuzzo, R. G. Spontaneously organized molecular assemblies. 2. Quantitative infrared spectroscopic determination of equilibrium structures of solution-adsorbed n-alkanoic acids on an oxidized aluminum surface. *Langmuir* **1**, 52–66 (1985).
24. Annia H. Kycia, ZhangFei Su, Christa L. Brosseau\*, and J. L. *In Situ PM-IRRAS Studies of Biomimetic Membranes Supported at Gold Electrode Surfaces your proof. Many thanks for your assistance. ‘Vibrational Spectroscopy at Electrified Interfaces’.* (2013).

---

**Capítulo 7**

**Conclusions/ Conclusiones**

---

## 7.1 Conclusions

The first part of this thesis has covered the study of the individual adsorption of DNA bases on gold electrodes and the co-adsorption of complementary bases by a combination of electrochemical and “in situ” spectroscopic methods with the support of DFT calculations. The main conclusions obtained are:

### **Regarding to the adsorption of adenine on gold electrodes from basic solutions**

- The in-situ FT-IRRAS experiments in basic D<sub>2</sub>O solutions, at pH values significantly higher than the pK<sub>a2</sub> of adenine, have revealed the adsorption of the anionic adenine form, AdD<sub>2</sub><sup>-</sup>, with somewhat different spectral characteristics than those of the uncharged adenine form, AdD<sub>3</sub>. The intense ring-stretching band in the spectral region 1600-1650 cm<sup>-1</sup> for the anionic form is red-shifted with respect to the corresponding signal for AdD<sub>3</sub> and is more intense and narrower.
- The high resolution and sensitivity of the ATR-SEIRAS experiments allows the deconvolution of the mixed bands due to the ring stretching signals of the two co-adsorbed adenine forms from solutions with pH values ranging from 8 to 11. From the relative normalized area of the two signals resulting from the deconvolution the pK<sub>a2</sub> value of adsorbed adenine was determined. The obtained value of 9.8 is the same as that reported for adenine in solution, independently of the adsorption potential. This result confirms the model previously proposed for adenine adsorption on gold electrodes, in which the atoms involved in the bonding with the metal are the nitrogen of the amino group, N<sub>10</sub>, and the nitrogen N<sub>1</sub> (or N<sub>7</sub>) of the ring, but not the nitrogen N<sub>9</sub> of the ring, which is involved in the second acid-base equilibrium of adenine.
- The comparison of the spectra obtained in H<sub>2</sub>O solutions at pH values ranging from 1 to 11 shows that co-adsorption of water molecules of the supporting electrolyte take place only in acid media.

### **Regarding to the adsorption of thymine on gold electrodes**

- -ATR-SEIRA in situ spectroelectrochemical experiments of adsorbed thymine at pH 1, 7 and 12 in D<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O media have allowed us to analyse the tautomerism of the adsorbed thymine anionic forms as a function of pH. The

comparison of the spectra recorded at high potentials in the chemisorption regions with the respective spectra of thymine in solution at different pHs indicates that the species adsorbed from acid and neutral media are others than the neutral thymine form existing in solution at pH below the  $pK_a$  value. Deprotonation of thymine coupled to the adsorption process is then concluded, based also on experimental electrochemical evidences even at pH values very much below the  $pK_a$  value. The resulting anionic thymine forms can be the  $N_1$  and/or the  $N_3$  tautomers.

- -The assignment of the signals in the  $1300-1800\text{ cm}^{-1}$  spectral region in the light of DFT calculations for the individual deuterated and non-deuterated molecules and for the same adsorbed molecules on gold surfaces indicate that the  $N_3$  tautomer is the predominant adsorbed species in acid media while the adsorbed  $N_1$  tautomer predominates in the adsorption from basic media, but both species can be distinguished in the adsorption at pH 7.
- -The influence of the electric field on the orientations and interaction sites of the adsorbed molecules with the metal have been inferred from the analysis of the relative intensities of the characteristic CH stretching signals in the  $2800-3300\text{ cm}^{-1}$  spectral region. It is concluded that the  $N_3$  tautomer molecule probably rotates modifying the interaction sites from only the  $C_2O$  group at low potentials in the chemisorption region to include also the  $N_3$  atom and the  $C_4O$  group as the potential is increased to finally adopt the chemically more stable configuration and the most favourable alignment of the permanent dipole moment of the molecule with the electric field. However, the  $N_1$  tautomer molecule probably interacts with the metal in all the adsorption potential region by the  $N_1$  atom and the  $C_4O$  group, in accordance with the most stable configuration provided by the calculations and also with the electrostatic interactions with the electric field, as the permanent dipole moment of the molecules is almost aligned with the electric field in this configuration. Only slight rotations of the molecular plane with the electric potential are proposed.

#### **Regarding the co-adsorption of adenine and thymine on gold electrodes**

- -The effects of the presence of the complementary base on the adsorption of adenine and thymine has been studied at three pH values, 1, 7 and 11.6, by voltammetric and in situ ATR-SEIRAS measurements.



- The analysis of the voltammetric results and the “in situ” ATR-SEIRA spectra of adsorbed thymine in the absence and in the presence of adenine permits to conclude that the adsorbed thymine changes its orientation relative to the electrode, from normal to parallel, when a small concentration of adenine is present in solution.
- The ATR-SEIRAS bands of adsorbed adenine exhibit an enhancement in the presence of co-adsorbed thymine. This amplification suggests that adenine adopts a more upright orientation of the molecular plane. However, to explain quantitatively the enhancement of the signals of adsorbed adenine it is necessary to consider that the surface excess of adenine increases when thymine is co-adsorbed.
- These effects on the spectra of both bases when they are co-adsorbed are similar at the three pHs investigated. However the enhancement of the ATR-SEIRAS signals of adsorbed adenine in the presence of thymine is clearly higher at neutral pH values.
- The comparison of the NH stretching spectral bands of adsorbed adenine, in the 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$  spectral region in non-deuterated media, before and after the addition of thymine, permitted to conclude that the amine group of adsorbed adenine does not participate in the interactions with co-adsorbed thymine. On the contrary, a  $\pi$ -stacking (of the type edge-to-face) and/or a dipole-dipole interactions between co-adsorbed adenine and thymine are proposed to explain the long range organisation induced by the co-adsorption of both bases.

#### **Regarding the kinetics of adenine adsorption on gold Au(111) electrodes by EIS.**

- The Electrochemical Impedance Spectroscopy has been applied to the study of the adsorption kinetics of adenine on gold Au(111) electrodes at pH values of 1, 7 and 11.6. The analysis of the impedance behaviour with the frequency has been performed on the bases of the modified model of Frumkin and Melik-Gaikazyan, without any “a priori” assumption about the isotherm that applies to the adsorption process or about the potential dependence of the adsorption rate constant. The analysis with the frequency according to this model provides as a function of the dc potential the values of four frequency independent parameters,  $R_{ad}$ ,  $C_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$ ,  $C_{ad}$  and  $C_{dl}$ , that contain the kinetic and thermodynamic information of the process.

- To analyse the results in acid media, where the adsorption of neutral adenine ( $\text{AH}_3$ ) involves a previous deprotonation of the cationic adenine ( $\text{AdH}_4^+$ ), the impedance equations for an adsorption process that includes a preceding chemical step have been deduced. These equations imply in many situations a frequency dependence that differs from the case of the pure adsorption process. The differences depend on the value of the equilibrium constant of the chemical step,  $K_c$ . This value should be lower than 100 in order to detect the different behaviours. For low  $K_c$  values, two limiting cases provide the same frequency dependence than the pure adsorption process: the high frequency and the low frequency limits that can be obtained with low or high values for the rate constant of the chemical step,  $k_c$ , respectively. The high frequency limit does not provide any information concerning the chemical step, but the low frequency limit includes  $K_c$  and  $k_c$  in apparent Warburg and adsorption resistance parameters.
- The Nyquist plots are very useful in order to detect the presence of the chemical step as they may change from the expected semicircles, "depressed" semicircles or "distorted" semicircles for the pure adsorption process.
- The Nyquist plot obtained at a representative potential for adenine adsorption on Au(111) electrodes from 0.1M  $\text{HClO}_4$  0.1M solutions shows a frequency behaviour identical to the case of a pure adsorption process. The real interfacial capacitance component data can be fitted to the low frequency case providing apparent Warburg coefficient. The comparison of these values to the corresponding Warburg coefficient obtained for the adsorption from neutral solutions where the chemical step is absent, allows us to obtain the equilibrium constant for the chemical step in acid solutions.
- The frequency independent parameters allow us to calculate the relaxation times of adsorption and diffusion, and the specific rate of the adsorption process. From the relaxation times a mixed kinetic control by diffusion and by adsorption activation is inferred for the adsorption from solutions of pH 1 and 12, but a somewhat higher kinetic control by diffusion in the case of the adsorption from solutions of pH 7.5. The potential dependence of the specific adsorption rate is explained as the result of the combined potential dependence of a Frumkin type

adsorption isotherm with an attractive interaction parameter and a Butler-Volmer potential dependence type for adsorption rate constant. This potential dependence justifies the higher values obtained for the specific rate of adsorption at pH 1 as compared to the values obtained at pH 7.5, as the equilibrium of the preceding chemical step shifts the adsorption process to higher potentials. The lower values obtained for the specific rate of adsorption at pH 12 suggest a lower value for the interaction parameter of the corresponding Frumkin isotherm for the adsorption of anionic adenine as compared to neutral adenine form.

### **Regarding the adsorption of cytosine and guanine and their co-adsorption on gold electrodes.**

Cyclic voltammetry and ATR-SEIRA spectroscopy have been combined to study the individual adsorption of cytosine and guanine on gold electrodes and their co-adsorption at three different pH values: 1, 6-8 and 11.6. For the analysis of the experimental results some DFT calculations have been performed.

- -The ATR-SEIRAS results of the adsorption of cytosine on gold, and their comparison to the transmission spectra in the same conditions, permit to conclude that the neutral cytosine adsorbs on gold with the molecular plane inclined or normal relative to the electrode at the three pHs investigated.
- -The assignment of the spectral bands of adsorbed cytosine in the 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  spectral region has been performed in the basis of DFT calculations of the adsorbed molecule over a 19 gold atoms cluster.
- -At pH 8 the ATR-SEIRAS band at c.a. 1650  $\text{cm}^{-1}$  can be deconvoluted in two individual bands, that exhibit each other opposite behavior with the potential. This fact suggests that at low potentials a different form cytosine is adsorbed on the electrode than at high potentials. This form may be a different tautomer of neutral cytosine or the cytosine with a different protonation degree.
- -The “in-situ” ATR-SEIRAS in the 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$  region show that the adsorption of cytosine on gold electrodes involves the desorption of water molecules previously adsorbed.
- -Electrochemical ATR-SEIRAS results of adsorbed guanine on gold electrodes showed that the neutral molecule is adsorbed at acid and neutral pHs, but the

anionic deprotonated species is adsorbed from solutions with pHs higher than  $pK_{a2}$  (9.6).

- -The comparison of the adsorbed ATR-SEIRA signals with the transmission spectra indicate that neutral guanine adsorbs with the  $C_6O$  and the nitrogen  $N_7$  towards the electrode surface (pH 1 and pH 8). However the anionic guanine adsorbs oriented with  $C_6O$ ,  $NH_2$  and  $N_7$  towards the electrode. Both orientations involve a stabilizing interaction between the permanent dipole of the molecule and the electric field close to the electrode.
- -The ATR-SEIRAS of adsorbed guanine in the  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$  region show the presence of OH signals originated by the coadsorbed water.
- -The ATR-SEIRAS of co-adsorbed cytosine and guanine on gold electrodes indicate that the coadsorption originates changes in the orientation of both bases as compared with the individual adsorption at pH values of 1, 7.5 and 11.6. The presence of guanine originates the elimination of the adsorbed cytosine bands, indicating that this molecule adopts a planar orientation relative to the electrode. On the contrary, the signals corresponding to adsorbed guanine exhibit an enhancement in the presence of co-adsorbed cytosine, that can be caused by an increase in the surface excess and/or the inclination angle of the molecular plane.
- -The analysis of the ATR-SEIRAS signals of co-adsorbed cytosine and guanine in the  $2800-3900\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the NH and  $NH_2$  stretching vibrations of guanine, and the comparison with the same region for adsorbed guanine in the absence of cytosine permit to discard the participation of these molecular fragments in hydrogen bonding interactions between coadsorbed complementary bases. As in the case of co-adsorbed adenine and thymine another kind of interaction must be involved. According to the reorientation of the bases, an “edge to face”  $\pi$ -interaction is proposed.

**Regarding the electrochemical and PM-IRRAS study of the Au(111) electrodes modified with monolayers of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-cytidine in the presence and in the absence of guanine.**

- Electrochemical measurements with monolayers of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-cytidine confirmed that the films are stable in a wide range of potentials, although with a moderate degree of disorder.

- The PM-IRRRA spectroscopic data in the 1400-1800  $\text{cm}^{-1}$  region suggest that the nucleolipid interacts with the gold electrode surface by the cytidine fragment, as the characteristic bands of adsorbed cytosine can be observed, with different wavenumber as compared to the nucleolipid transmission spectrum.
- In the presence of guanine the nucleolipid monolayer supported on gold does not show the adsorbed cytosine signals, and the signals characteristic of adsorbed guanine on gold can be observed, indicating that guanine is adsorbed on the electrode.
- The analysis of the  $\text{CH}_2$  stretching signals of the alkyl chain of the nucleolipid provided the tilt angle of the chains relative to the normal direction to the electrode. Within the stability region, the electrode potential does not affect the tilt angle, but the presence of guanine in the monolayer assembly originates an increase of  $20^\circ$  in the inclination of the alkyl chains.

**Regarding the electrochemical and PM-IRRAS study of the Au(111) electrodes modified with bilayers of hexadecanethiol / 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-cytidine in the presence and in the absence of guanine.**

- Tethered bilayers of hexadecanethiol / 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-cytidine were prepared on Au(111) electrodes by the self-assembly of a hexadecanethiol monolayer on clean Au(111), followed by the Langmuir-Schaeffer transfer of a 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-cytidine monolayer, in the absence and in the presence of guanine.
- The electrochemical characterization of the bilayers provided the potential window at which the bilayer is stable and the minimum pseudocapacitance value, close to the expected for a compact bilayer.
- The comparison of the PM-IRRRA spectra of the bilayer in the absence of guanine in the 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  region with the transmission spectrum of the nucleolipid and the ATR-SEIRA spectrum of adsorbed cytosine on gold, permitted to conclude that the cytidine fragment of the nucleolipid is not oriented towards the electrode, but it is oriented towards the electrolyte solution, with some degree of inclination relative to the electrode surface.

- The PM-IRRRA spectra of the bilayer in the presence of guanine in the 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  region show the presence of guanine in the bilayer, but without the interaction with the electrode surface. The signals of the cytosine fragment of the nucleolipid disappear, indicating that the interaction with guanine originates a planar orientation of the fragment. The characteristic CO band of guanine is not present in the spectrum, so it must be involved in the guanine-cytosine fragment interactions.
- The analysis of the  $\text{CH}_2$  stretching signals provided the tilt angles of the alkyl chains. In the presence of guanine an increase of c.a. 10 degrees is found as compared to the angles in the absence of guanine.
- The potential capability of the bilayers for molecular recognition is higher than the monolayers, because of the surface protection effect of the thiol layer.

## 7.2 Conclusiones

La primera parte de esta tesis abarca el estudio de la adsorción de las bases del ADN y la co-adsorción de las bases complementarias combinando la electroquímica y métodos espectroscópicos con cálculos teóricos DFT. Se han obtenido las siguientes conclusiones:

### **Respecto a la adsorción de adenina sobre electrodos de oro a partir de soluciones básicas**

- Los experimentos de FT-IRRAS in-situ en disoluciones básicas de D<sub>2</sub>O a valores de pH significativamente superiores al pK<sub>a2</sub> de la adenina han puesto de manifiesto la adsorción de la forma aniónica de la adenina AdD<sub>2</sub><sup>-</sup>, que presenta características espectrales algo diferentes a las de la forma neutra, AdD<sub>3</sub>. Para la forma aniónica la intensidad de la banda correspondiente a la vibración de anillo en la región 1600-1650 cm<sup>-1</sup> se desplaza hacia el rojo aumenta su intensidad y se hace más estrecha
- La alta resolución y la sensibilidad de los experimentos de ATR-SEIRAS permite deconvolucionar las bandas mixtas debido a las señales de vibración de anillo de las dos formas de adenina co-adsorbidas a partir de soluciones con valores de pH comprendidos entre 8 y 11. El valor obtenido de 9.8 es el mismo que el indicado para la adenina en disolución independientemente del potencial de adsorción. Este resultado confirma el modelo previamente propuesto para la adsorción de adenina sobre electrodos de oro, en el que los átomos involucrados en la unión con el metal son el nitrógeno del grupo amino N<sub>10</sub> y el nitrógeno N<sub>1</sub> (o N<sub>7</sub>), pero no el nitrógeno N<sub>9</sub> del anillo que está implicado en el segundo equilibrio ácido base de la adenina.
- La comparación de los espectros obtenidos en disolución de H<sub>2</sub>O a valores de pH comprendidos entre 1 y 11 muestran que la co-adsorción de las moléculas de agua del electrolito soporte tiene lugar solo en medio ácido

### **Respecto a la adsorción de timina sobre electrodos de oro**

- Los experimentos electroquímicos de ATR-SEIRAS para la citosina adsorbida a pH 1, 7 y 12 en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O nos han permitido analizar en función del pH la estabilidad de los tautómeros de la timina desprotonada en estado

adsorbido. La comparación de los espectros a potenciales altos en la región de quimisorción con los respectivos espectros de transmisión en disolución a los tres valores de pH indica que las especies en medios ácidos y neutros son otras que la timina neutra que existe en disolución a valores de pH por debajo del  $pK_a$ . Se concluye que la timina debe desprotonarse para adsorberse también en base a evidencias electroquímicas incluso a valores de pH muy por debajo del valor de  $pK$ . Las formas de timina aniónicas resultantes pueden ser los tautómeros  $N_1$  y/o  $N_3$ .

- La asignación de los espectros en la región  $1300-1800\text{ cm}^{-1}$  se ha realizado sobre la base de cálculos teóricos DFT para las moléculas deuteradas y no deuteradas en disolución y para las mismas moléculas adsorbidas sobre superficies electródicas de oro, indican que el tautómero desprotonado en  $N_3$  de la timina se adsorbe en medio ácido, mientras que el desprotonado en  $N_1$  se adsorbe en medio básico. Y ambos coexisten adsorbidos a pH 7
- Se ha estudiado la influencia del campo eléctrico en la orientación y los sitios de interacción de las moléculas adsorbidas con el metal analizando las intensidades relativas de las vibraciones de tensión de CH y  $CH_3$  en la región espectral de  $2800-3300\text{ cm}^{-1}$ . Se ha concluido que el tautómero en  $N_3$  probablemente rota modificando los sitios de interacción con el electrodo pasando de estar coordinado sólo a través del grupo  $C_2O$  a los potenciales menores de la región de quimisorción a coordinarse también a través de  $N_3$  y el grupo  $C_4O$  a potenciales altos. Sin embargo el tautómero desprotonado en  $N_1$  interacciona con el electrodo a través de  $N_1$  y  $C_2O$  en todo el rango de potenciales de acuerdo con la geometría más estable y también
- En medio básico el tautómero desprotonado en  $N_1$  interacciona con el electrodo a través de  $N_1$  y  $C_2O$  en todo el rango de potenciales de quimisorción, y sólo experimenta pequeñas rotaciones del plano molecular y también con las interacciones electrostáticas con el campo eléctrico, ya que el momento dipolar permanente de las moléculas casi está alineado con el campo eléctrico en esta configuración.



### **Respecto a la co-adsorción de adenina y timina sobre electrodos de oro**

- Se han estudiado los efectos de la presencia de la base complementaria sobre la adsorción de adenina y timina a tres valores de pH, 1, 7 y 11.6 mediante medidas de voltametría e ATR-SEIRAS in-situ.
- El análisis de los resultados voltamétricos y de ATR-SEIRAS de timina adsorbida en ausencia y en presencia de adenina permiten concluir que la timina adsorbida cambia de orientación respecto al electrodo, de normal a paralelo, cuando una pequeña cantidad de adenina está presente en solución.
- Las bandas de ATR-SEIRAS correspondientes a la adenina adsorbida aumentan su intensidad en presencia de timina co-adsorbida. Este aumento sugiere que la adenina adopta una orientación más vertical del plano molecular. Sin embargo, para explicar cuantitativamente el aumento de intensidad de las señales de adenina adsorbida es necesario considerar el exceso superficial de adenina aumenta cuando la timina está co-adsorbida.
- Estos efectos en los espectros de ambas bases cuando están co-adsorbidas son similares a los tres valores de pH estudiados. Sin embargo el aumento de la señales de ATR-SEIRAS de la adenina adsorbida en presencia de timina es claramente superior a valores de pH neutros.
- La comparación de las vibraciones de tensión del NH de la adenina adsorbida en la región espectral de  $2800-3900\text{ cm}^{-1}$  en medio no deuterado antes y después de la adición de timina permitió concluir que el grupo amino de la adenina adsorbida no participa en las interacciones con la timina coadsorbida. Por el contrario, se proponen interacciones de tipo  $\pi$ -stacking (del tipo edge-to-face) y/o dipolo-dipolo entre la adenina co-adsorbida y la timina para explicar la organización largo alcance inducida por la co-adsorción de ambas bases.

### **Respecto al estudio cinético de la adsorción de la adenina sobre electrodos de Au(111) mediante EIS.**

- Se ha aplicado la Impedancia Electroquímica (EIS) al estudio de la cinética de adsorción de adenina sobre electrodos de oro Au(111) a valores de pH 1, 7 y 11.6. El análisis del comportamiento de la impedancia con la frecuencia se ha realizado utilizando el modelo modificado de Frumkin y Melik-Gaikazyzan sin suponer a "priori" nada sobre la isoterma que se aplica al proceso de adsorción o

sobre la dependencia con el potencial de la constante de velocidad de adsorción. El análisis con la frecuencia, de acuerdo a este modelo proporciona los valores en función del potencial de corriente continua de cuatro parámetros independientes de la frecuencia ( $R_{ad}$ ,  $C_{ad}$ ,  $\sigma_{ad}$  y  $C_{dl}$ ) que contienen la información cinética y termodinámica del proceso

- En análisis de los resultados en medio ácido, donde la adsorción de la forma neutra de la adenina ( $AH_3$ ) implica una etapa previa de desprotonación de la adenina catiónica ( $AdH_4^+$ ), se han deducido las ecuaciones de la impedancia para un proceso de adsorción que implica una etapa previa química. Estas ecuaciones en muchas ocasiones implican una dependencia con la frecuencia diferente que la del proceso de adsorción pura. Las diferencias dependen de los valores de la constante de equilibrio de la etapa química  $K_c$ . Este valor debe ser menor de 100 para poder detectar diferentes comportamientos. Para bajos valores de  $K_c$  dos casos límites muestran la misma dependencia con la frecuencia que el proceso de adsorción puro, los límites de alta frecuencia y de baja frecuencia que pueden obtenerse con valores bajos o altos respectivamente para la constante de velocidad de la etapa química,  $K_c$ . El límite de alta frecuencia no proporciona ninguna información relativa a la etapa química, pero el límite de baja frecuencia incluye  $K_c$  y  $K_c$  en parámetro de resistencia de Warburg y de adsorción aparentes
- Las representaciones de Nyquist resultan muy útiles para detectar la etapa química ya que cambian los semicírculos esperados. Se han obtenido semicírculos “deprimidos” si existe etapa química previa y semicírculos “distorsionados” para el proceso de adsorción pura.
- Las representaciones de Nyquist obtenidas a potenciales representativos para la adsorción de adenina sobre electrodos de Au(111) desde disoluciones de  $HClO_4$  0.1 M muestran el mismo comportamiento con la frecuencia que para el proceso de adsorción puro. El ajuste de la componente real de la capacitancia a bajos valores de frecuencias proporciona el valor del coeficiente de Warburg aparente. La comparación de estos datos con los correspondientes coeficientes de Warburg obtenidos para la adsorción desde disoluciones neutras, donde no hay etapa química, nos permite obtener la constante de equilibrio para el paso químico en soluciones ácidas.

- Los parámetros independientes de la frecuencia nos han permitido calcular los tiempos de relajación de adsorción y difusión y las velocidades específicas del proceso de adsorción. A partir de los tiempos de relajación se deduce un control cinético mixto por difusión y por activación y por adsorción para la adsorción a partir de disoluciones a pH 1 y 12, pero un control cinético algo mayor por difusión en el caso de la adsorción a partir de disoluciones de pH 7,5. La dependencia potencial de la velocidad específica de adsorción se explica como el resultado de la dependencia potencial combinada de una isoterma de adsorción tipo Frumkin con un parámetro de interacción atractivo y un tipo de dependencia potencial de Butler-Volmer para la constante de velocidad de adsorción. Esta dependencia con el potencial justifica los valores más altos obtenidos para la velocidad específica de adsorción a pH 1 en comparación con los valores obtenidos a pH 7,5, ya que el equilibrio de la etapa química previa desplaza el proceso de adsorción a mayores potenciales. Los valores más bajos obtenidos para la velocidad específica de adsorción a pH 12 sugieren un valor más bajo para el parámetro de interacción de la isoterma de Frumkin correspondiente para la adsorción de adenina aniónica en comparación con la forma de adenina neutra.

### **Respecto a la adsorción de citosina y guanina y su coadsorción sobre electrodos de oro**

- Se ha combinado la voltametría cíclica con la espectroscopía de ATR-SEIRAS para estudiar la adsorción individual de citosina y guanina en electrodos de oro y su co-adsorción a tres valores de pH diferentes; 1, 6-8 y 11.6. Para el análisis de los resultados se han realizado algunos cálculos DFT.
- Los resultados de ATR-SEIRAS de adsorción de citosina sobre oro y su comparación con los espectros de transmisión en las mismas condiciones permiten concluir que la citosina neutra se adsorbe sobre oro con el plano molecular inclinado o normal con relación al electrodo a los tres pH investigados.
- La asignación de las bandas espectrales de la citosina adsorbida en la región espectral de  $1300-1800\text{ cm}^{-1}$  se ha realizado en base a cálculos de DFT de la molécula adsorbida sobre un clúster de 19 átomos de oro

- A pH 8 la banda de ATR-SEIRAS a c.a.  $1650\text{ cm}^{-1}$  se puede deconvolucionar en dos bandas individuales, que exhiben mutuamente un comportamiento opuesto con el potencial. Este hecho sugiere que a bajos potenciales puede adsorberse una forma diferente de citosina
- -A pH 8, la banda ATR-SEIRAS a c.a.  $1650\text{ cm}^{-1}$  puede ser deconvolutada en dos bandas individuales, que exhiben mutuamente comportamiento opuesto con el potencial. Este hecho sugiere que a bajos potenciales una forma diferente de citosina es adsorbida en el electrodo a altos potenciales. Esta forma puede ser un tautómero diferente de citosina neutra o la citosina con un grado de protonación diferente de citosina que no lo hace a potenciales altos. Esta forma podría ser un tautómero neutro diferente de citosina o la citosina con otro estado de protonación.
- -Los espectros de ATR-SEIRA in-situ en la región de  $2800\text{-}3900\text{ cm}^{-1}$  muestran que la adsorción de citosina sobre electrodos de oro implica la desorción de moléculas de agua previamente adsorbidas.
- Los resultados electroquímicos de ATR-SEIRAS de guanina adsorbida sobre electrodos de oro mostraron que la molécula neutra se adsorbe a pH ácido y neutro mientras que la especie aniónica se adsorbe a valores de pH superiores a  $\text{pK}_{a2}$  (9.6).
- -Electrochemical ATR-SEIRAS results of adsorbed guanine on gold electrodes showed that the neutral molecule is adsorbed at acid and neutral pHs, but the anionic deprotonated species is adsorbed from solutions with pHs higher than  $\text{pK}_{a2}$  (9.6).
- La comparación de las señales de ATR-SEIRA de las moléculas adsorbidas en comparación con los espectros de transmisión indica que la guanina neutra se adsorbe con el C<sub>6</sub>O y el N<sub>7</sub> hacia la superficie del electrodo a pH 1 y 8. Sin embargo la guanina aniónica se adsorbe con los grupos C<sub>6</sub>O, NH<sub>2</sub> y N<sub>7</sub> orientados hacia el electrodo. Ambas orientaciones implican una interacción estabilizadora entre el dipolo permanente de la molécula y el campo eléctrico cerca del electrodo.
- Los espectros de ATR-SEIRAS de la guanina adsorbida en la región  $2800\text{-}3900\text{ cm}^{-1}$  muestran la presencia de señales de OH originadas por el agua co-adsorbida.

- Los espectros de ATR-SEIRAS de citosina y guanina co-adsorbidas sobre electrodos de oro indican que la co-adsorción origina cambios en la orientación de ambas bases en comparación con la adsorción individual a valores de pH de 1, 7.5 y 11.6. La presencia de guanina provoca la pérdida de las señales de citosina adsorbida, lo que indica que esta molécula adopta una orientación plana con relación al electrodo. Por el contrario, las señales correspondientes a la guanina adsorbidas aumenten su intensidad en presencia de citosina co-adsorbida, que puede ser causada por un aumento del exceso superficial y/o del ángulo de inclinación del plano molecular.
- El análisis de las señales de ATR-SEIRAS de citosina y guanina co-adsorbidas en la región 2800-3900  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a las vibraciones de tensión de NH y  $\text{NH}_2$  de guanina y la comparación con la misma región de guanina adsorbida en ausencia de citosina permite descartar la participación de citosina y guanina en puentes de hidrógeno entre bases complementarias cuando están co-adsorbidas. Como en el caso de la co-adsorción de timina y adenina debe estar implicado otro tipo de interacción. De acuerdo con la interacción de las bases se propone una interacción de tipo edge-to-face.

**Respecto el estudio electroquímico y por PM-IRRAS de electrodos de Au(111) modificados con monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en presencia y en ausencia de guanina**

- Las medidas electroquímicas con monocapas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina confirmaron la formación de monocapas estables en una amplia gama de potenciales, aunque con un grado moderado de desorden
- Los resultados de PM-IRRAS en la región 1300-1800  $\text{cm}^{-1}$  sugieren que el nucleolípido interacciona con la superficie del oro por el fragmento de citidina, ya que pueden observarse las bandas características de la citosina adsorbida con diferentes números de onda en comparación con el espectro de transmisión del nucleolípido.
- En presencia de guanina, la monocapa de nucleolípido soportada sobre oro no muestra las señales adsorbidas de citosina, y se pueden observar las señales características de la guanina adsorbida sobre el oro, lo que indica que la guanina está adsorbida sobre el electrodo de oro.

- El análisis de las señales correspondientes a las vibraciones de tensión de CH<sub>2</sub> de la cadena alquílica del nucleolípido proporciono el valor del ángulo de inclinación de las cadenas con respecto a la dirección normal al electrodo. Atendiendo a la estabilidad se ha encontrado que el potencial no afecta al ángulo de inclinación sin embargo la presencia de guanina en el conjunto de la monocapa provoca un aumento de 20° en la inclinación de las cadenas alquílicas.

**Respecto el estudio electroquímico y por PM-IRRAS de electrodos de Au(111) modificados con bicapas de hexadecanotiol/1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-citidina en presencia y en ausencia de guanina**

- -Se prepararon bicapas de hexadecanotiol/1,2-dipalmitoil-sn-glicero-citidina sobre electrodos de Au(111) por autoensamblaje de una monocapa de hexadecanotiol sobre electrodos de Au(111) limpios seguido de la transferencia de Langmuir-Schaeffer de una monocapa de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-citidina, en ausencia y en presencia de guanina.
- La comparación de los espectros de PM-IRRAS de la bicapa en ausencia de guanina en la región 1300-1800 cm<sup>-1</sup> con el espectro de transmisión del nucleolípido y el espectro de ATR-SEIRA de citosina adsorbido sobre el oro permitió concluir que la citidina del nucleolípido está orientada hacia el electrodo, si no que se orienta hacia la disolución de electrolito, con un cierto grado de inclinación con respecto a la superficie del electrodo.
- -Los espectros de PM-IRRAS de la bicapa en presencia y ausencia de guanina en la región de 1300-1800 cm<sup>-1</sup> muestran la presencia de guanina en la bicapa, pero sin interactuar con el electrodo. La desaparición de las señales de los fragmentos de citosina del nucleolípido indican que la interacción con guanina provoca una orientación paralela del fragmento de citosina. No se observa la banda característica asociada a las vibraciones de tensión de CO de guanina, lo que sugiere que este grupo está involucrado en las interacciones de los fragmentos guanina-citosina.
- El análisis de las señales asociadas a las vibraciones de tensión de CH<sub>2</sub> proporcionó los ángulos de inclinación de las cadenas alquílicas obteniéndose un aumento de 10° en presencia de guanina en el valor del ángulo al compararlo con los resultados obtenidos en ausencia de ésta.

- La capacidad potencial para el reconocimiento molecular de las bicapas es mayor que la de las monocapas debido al efecto de protección superficial de la capa de tiol
- La capacidad potencial de las bicapas para el reconocimiento molecular es mayor que las monocapas, debido al efecto de protección superficial de la capa de tiol