

Tesis Doctoral

# Materiales compuestos para la construcción de sensores

Cortez, María Lorena

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cortez, María Lorena. (2011). Materiales compuestos para la construcción de sensores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Cortez, María Lorena. "Materiales compuestos para la construcción de sensores". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

**MATERIALES COMPUESTOS  
PARA LA CONSTRUCCIÓN DE SENSORES**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física

**María Lorena Cortez**

Directores de tesis: Fernando Battaglini  
Ana Lea Cukierman

Consejero de estudios: Martín Negri

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física  
INQUIMAE

Buenos Aires, 2011

## Materiales Compuestos para la Construcción de Sensores

En este trabajo de tesis se presenta la funcionalización de diferentes superficies con materiales compuestos formados por polielectrolitos y surfactantes para el desarrollo de sensores. Como sistema modelo se utilizó poli(alilamina) y dodecilsulfato de sodio. El sistema ha demostrado ser mecánicamente robusto y factible de ser modificado según la función que se le desee conferir. El polielectrolito se ha derivatizado primero con un complejo redox, a fin de explorar su uso como mediador en sensores amperométricos, y posteriormente con lactosa, de manera de incorporar sitios de unión a lectinas. Por otra parte, el surfactante se ha utilizado para la dispersión de nanotubos de carbono cuyas propiedades electrocatalíticas se ejemplifican en la determinación de dopamina.

A lo largo de esta tesis se estudió la inmovilización del material compuesto empleando distintas metodologías, tales como adsorción capa por capa, aplicación a partir de una suspensión o a partir de una solución en solvente orgánico, evidenciando la versatilidad de manipulación del sistema.

Los resultados alcanzados utilizando el complejo polielectrolito-surfactante y los compuestos derivados de su funcionalización muestran la posibilidad de generar robustos materiales autoensamblados con interesantes propiedades respecto a los procesos de transferencia electrónica, ya sea debido a la presencia de mediadores redox o catalizadores.

Otra de las interesantes características del complejo polielectrolito-surfactante es su capacidad de ser aplicado sobre una amplia variedad de superficies empleadas en la construcción de sensores, tales como grafito, oro y silicio. En esta tesis se presentan una descripción detallada del alcance de esta metodología, mostrando su gran versatilidad, lo que allana el camino hacia la construcción de una nueva clase de dispositivos moleculares.

**Palabras clave:** polielectrolito, surfactante, mediador redox, nanotubos de carbono, sensores electroquímicos.

## Composite Materials for Sensors Construction

This thesis introduces the functionalization of different surfaces with composite materials consisting of polyelectrolytes and surfactants for sensors development. As a model system we used poly(allylamine) and sodium dodecylsulfate. The system has proven to be mechanically robust and feasible to be modified according to the required function. The polyelectrolyte was first derivatized with a redox complex, to explore its use as a mediator in amperometric sensors, and later with lactose, to display lectins-binding sites. Moreover, the surfactant was used to disperse carbon nanotubes, which electrocatalytic properties are exemplified in the detection of dopamine.

Throughout this thesis we studied the immobilization of this material using different methodologies, such as layer by layer assembly, application from a suspension or from a solution in organic solvent, expressing the versatility of the system.

The results achieved using the polyelectrolyte-surfactant composite material and the compounds derived from its functionalization show the ability to generate robust self-assembled materials with remarkable electron transfer properties, either due to the presence of redox mediators or catalysts.

Another interesting characteristic of polyelectrolyte-surfactant complex is its faculty to be applied on a wide variety of surfaces employed to build sensors, such as graphite, gold and silicon. In this thesis, we present a detailed description of the scope of this methodology, expressing its striking versatility, which paves the route towards the construction of new class of molecular electronic devices.

**Keywords:** polyelectrolyte, surfactant, redox mediator, carbon nanotubes, electrochemical sensors.

## ***Agradecimientos***

*A la Universidad de Buenos Aires, por mi formación de grado y posgrado.*

*A las instituciones que financiaron este trabajo de tesis, ANPCyT y CONICET.*

*Al DQLAyQF-INQUIMAE por brindarme el lugar de trabajo para llevar a cabo esta tesis doctoral.*

*A mi director, Fernando Battaglini, por recibirme en su laboratorio y permitirme formar parte de su grupo de investigación, por enseñarme y guiarme durante el desarrollo de este trabajo y por estar siempre presente.*

*A Ana Lea Cukierman, por la confianza depositada, por el apoyo desde el inicio y por los consejos.*

*A Pablo Bonelli, por su inmensa predisposición, su ayuda y su bondad.*

*A Dario Zilli, por el entrenamiento en la síntesis de nanotubos.*

*A Martín Negri, por las sugerencias y recomendaciones.*

*Al Dr. Omar Azzaroni por las medidas de XRR y GISAXS.*

*A la Dra. Graciela González por las simulaciones numéricas.*

*A Vicente Povse, Adriana Martínez, Horacio Bogo, Claudia Marchi y Guillermo Contrafatti por su contribución y asistencia a lo largo de esta tesis.*

*A Eliseo, por su dedicación al trabajo de todos, la paciencia infinita y la siempre excelente predisposición.*

*A Ale y Claudia, secretarias del DQLAyQF, por la asistencia y la ayuda en todos los trámites.*

*A Adriana y Alberto por el incesante apoyo y los buenos deseos.*

*A todos los que son y fueron parte del laboratorio, por su colaboración en todo momento, por mantener un alegre ambiente de trabajo, pero por sobre todo, por las charlas y los cafés, por ser sostén y guía en los momentos difíciles, por todo el cariño, por todo lo que me enseñaron, y por todo lo que aprendí de cada uno: Graciela P., Graciela G., Diego, Jorge, Mauricio, Anita, Sofi, Leyla, Néstor y Carina.*

*A Sole y a Silvia, por cuidarme, escucharme pacientemente y aconsejarme con cariño.*

*A Graciela Priano, por su ayuda, sus consejos y su guía durante el comienzo de mi doctorado.*

*A Gra, por sus recomendaciones, sugerencias y advertencias, por su criterio, sinceridad y paciencia, por sus invaluables opiniones y por nuestras largas charlas.*

*A Diego, por su inmensa ayuda en mi trabajo, por todo el saber compartido con infinita paciencia, por la asistencia brindada y por darme dirección cuando anduve sin rumbo.*

*A Doris, por su inagotable generosidad, por encaminarme y orientarme siempre, por transmitirme su entusiasmo y ganas, por la infinita dedicación, por preocuparse y ocuparse, por enseñarme, mostrarme y demostrarme el funcionamiento de todo esto, por el inmenso cariño, pero ante todo, por la amistad.*

*A Chechu y Juli, por la fe que me tienen, de la que me alimento.*

*A mis padres, por su lucha para brindarnos posibilidades que jamás han tenido, y por haberme inculcado valores que llevaré toda la vida.*

*A mis hermanos: Tin, Jere, Ruben, Chebe, Mena, Bebo, Fede, por todo lo que me hacen reír, por todo lo que me hacen pensar, y por todo el amor y respeto hacia la hermana mayor.*

*A Carlos, por su inmenso, incondicional amor.*

*A mis padres*

*A Carlos*

---

**Capítulo 1. Introducción**


---

1.1 Sensores .....	3
1.1.1 Diseño de sensores .....	5
1.2 Métodos de construcción de sensores .....	6
1.2.1 Serigrafía .....	6
1.2.2 Fotolitografía .....	7
1.2.3 Polielectrolitos como soporte estructural para sensores .....	9
1.2.3.1 Modificación de la superficie mediante recubrimiento .....	10
1.2.3.2 Hidrogeles .....	10
1.2.3.3 Autoensamblados capa por capa .....	11
1.2.3.4 Multicapas de Polielectrolitos electroactivos .....	13
1.2.3.5 Complejos Polielectrolito-surfactante (PE-surf) .....	13
1.3 Aplicaciones de PE-surf en electroquímica .....	14
1.4 Objetivos .....	15

**Capítulo 2. Materiales y Métodos**


---

2.1 Métodos Instrumentales .....	19
2.1.1 Técnicas Electroquímicas .....	19
2.1.1.1 Conceptos generales .....	19
2.1.1.2 Celda electroquímica .....	20
2.1.1.3 Potenciostato .....	20
2.1.1.4 Voltametría cíclica .....	21
2.1.1.4.1 Especie electroquímica en solución .....	22
2.1.1.4.2 Especie electroquímica inmovilizada .....	25
2.1.1.5 Cronoamperometría .....	27
2.1.1.6 Voltametría diferencial de pulso .....	29
2.1.1.7 Instrumentación .....	32
2.1.2 Microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo .....	32
2.1.2.1 Instrumentación .....	34
2.1.3 Dispersión dinámica de luz láser .....	34
2.1.3.1 Instrumentación .....	36
2.1.4 Perfilometría .....	37
2.1.4.1 Instrumentación .....	37
2.1.5. Ángulo de contacto .....	37
2.1.5.1 Instrumentación .....	38
2.1.6 Reflectometría de rayos X y dispersión de rayos X en configuración rasante .....	39
2.1.6.1 Instrumentación .....	39
2.1.7 Microscopía SEM .....	39
2.1.7.1 Instrumentación .....	40
2.1.8 Modelo numérico .....	40
2.1.8.1 Instrumentación .....	42
2.2 Materiales .....	42
2.2.1 Soluciones y Reactivos .....	42
2.2.1.1 Mediadores redox .....	43
2.2.1.1.1 Síntesis del mediador redox soluble .....	43
2.2.1.1.2 Síntesis del polímero redox Os-PA .....	43
2.2.2 Electroodos .....	44
2.2.2.1 Contraelectrodo y Electrodo de Referencia .....	44
2.2.2.2 Electroodos de Trabajo .....	44
2.2.2.2.1 Electroodos de grafito .....	44

2.2.2.2.2 Electrodo de oro macizo . . . . .	45
2.2.2.2.3 Electrodo de oro evaporado . . . . .	45
2.2.2.3 Limpieza de electrodos . . . . .	45
2.2.3 Celdas . . . . .	46

**Capítulo 3. Sistemas Autoensamblados**

---

3.1 Introducción y Objetivos . . . . .	51
3.1.1 Características de la enzima glucosa oxidasa . . . . .	52
3.1.2 Mediadores redox . . . . .	54
3.2 Experimental . . . . .	55
3.2.1 Reactivos . . . . .	55
3.2.2 Síntesis del polímero redox Os-PA . . . . .	55
3.2.3 Construcción de los electrodos modificados . . . . .	56
3.2.3.1 Adsorción de tiol (Au/MPS) . . . . .	56
3.2.3.2 Adsorción de Os-PA (Au/MPS/Os-PA) . . . . .	56
3.2.3.3 Adsorción de SDS y otros surfactantes (Au/MPS/Os-PA/Surf) . . . . .	57
3.2.3.4 Adsorción de Os-PA (Au/MPS/Os-PA/Surf/Os-PA) . . . . .	57
3.2.3.5 Adsorción de GOx (Au/MPS/Os-PA/Surf/Os-PA/GOx) . . . . .	57
3.2.4 Medidas electroquímicas . . . . .	57
3.2.4.1 Medidas voltamétricas . . . . .	57
3.2.5 Microgravimetría . . . . .	58
3.2.6 Ángulo de contacto . . . . .	58
3.3 Resultados . . . . .	58
3.3.1 Autoensamblados a pH = 7.0 . . . . .	59
3.3.1.1 Configuración Au/MPS/(Os-PA/SDS/Os-PA/GOx) <sub>n</sub> . . . . .	59
3.3.1.2 Configuración Au/MPS/(Os-PA/GOx) <sub>n</sub> . . . . .	60
3.3.1.3 Respuesta electroquímica . . . . .	60
3.3.1.4 Microgravimetría . . . . .	62
3.3.1.5 Ángulo de contacto . . . . .	63
3.3.1.6 Otras configuraciones . . . . .	64
3.3.1.7 Otros surfactantes . . . . .	64
3.3.2 Autoensamblados a pH 8.0 . . . . .	66
3.3.2.1 Respuesta electroquímica . . . . .	66
3.3.2.2 Microgravimetría . . . . .	67
3.4 Discusión y resumen . . . . .	68

**Capítulo 4. Sistema PA + SDS**

---

4.1 Introducción y Objetivos . . . . .	73
4.1.1. Características de los nanotubos de carbono . . . . .	73
4.2 Experimental . . . . .	76
4.2.1 Reactivos . . . . .	76
4.2.2 Material compuesto PA+SDS . . . . .	77
4.2.2.1 Purificación y caracterización de PA . . . . .	77
4.2.2.2 Síntesis del material compuesto PA+SDS . . . . .	77
4.2.3 Material compuesto PA+SDS-NTCs . . . . .	77
4.2.3.1 Suspensión de NTCs en SDS . . . . .	77
4.2.3.2 Síntesis del material compuesto PA+SDS-NTCs . . . . .	77
4.2.4 Construcción de los electrodos modificados . . . . .	78
4.2.4.1 Modificación de los electrodos con el material compuesto (grafito/PA+SDS) . . . . .	78

4.2.4.1.1 Capa delgada	78
4.2.4.1.2 Capa gruesa	78
4.2.4.2 Incorporación de NTCs (grafito/PA+SDS-NTCs)	78
4.2.5 Medidas de dispersión de luz	79
4.2.6 Medidas de ángulo de contacto	79
4.2.7 Medidas de XRR y GISAXS	79
4.2.8 Micrografías	79
4.2.9 Perfilometrías	80
4.2.10 Medidas electroquímicas	80
4.2.10.1 Medidas voltamétricas	80
4.2.10.2 Análisis por voltametría diferencial de pulso	80
4.3 Resultados	81
4.3.1 Suspensión coloidal	81
4.3.2 Películas PA+SDS	81
4.3.2.1 Respuesta electroquímica de PA+SDS	83
4.3.2.1.1 Ferrocianuro y Hexaaminorutenio	83
4.3.2.1.2 Dopamina y Ácido Ascórbico	90
4.3.3 Película PA+SDS-NTCs	91
4.3.3.1 Estructura de la película PA+SDS-NTCs	91
4.3.3.2 Respuesta electroquímica de PA+SDS-NTCs	93
4.3.3.3 Aplicaciones analíticas	95
4.4 Discusión y resumen	97

## Capítulo 5. Sistema Os-PA + SDS

5.1 Introducción y Objetivos	101
5.2 Experimental	101
5.2.1 Reactivos	101
5.2.2 Material compuesto Os-PA+SDS	102
5.2.2.1 Síntesis del polímero redox Os-PA	102
5.2.2.2 Síntesis del material compuesto Os-PA+SDS	102
5.2.3 Material compuesto Os-PA+SDS-NTCs	102
5.2.3.1 Suspensión de NTCs en SDS	103
5.2.3.2 Síntesis del material compuesto Os-PA+SDS-NTCs	103
5.2.4 Construcción de los electrodos modificados	103
5.2.4.1 Electrodos de grafito	103
5.2.4.1.1 Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS)	103
5.2.4.1.2 Incorporación de NTCs (grafito/Os-PA+SDS-NTCs)	104
5.2.4.1.3 Adsorción de la enzima (grafito/Os-PA+SDS/GOx)	104
5.2.4.2 Electrodos de oro	104
5.2.4.2.1 Modificación con el material compuesto (Au/Os-PA+SDS)	104
5.2.4.2.2 Adsorción de la enzima (Au/Os-PA+SDS/GOx)	105
5.2.5 Medidas electroquímicas	105
5.2.5.1 Medidas voltamétricas	105
5.2.6 Medidas de Ángulo de contacto	106
5.2.7 Medidas de XRR y GISAXS	106
5.2.8 Micrografías	106
5.2.9 Modelado numérico	106
5.3 Resultados	106
5.3.1 Material compuesto Os-PA+SDS	106
5.3.2 Películas Os-PA+SDS	107
5.3.2.1 Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados	109
5.3.2.1.1 Electrodos de grafito	109

5.3.2.1.1.1 Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS) . . . . .	109
5.3.2.1.1.2 Adsorción de GOx (grafito/Os-PA+SDS/GOx) . . . . .	111
5.3.2.1.2 Electrodo de oro . . . . .	112
5.3.2.1.2.1 Modificación con el material compuesto (Au/Os-PA+SDS) . . . . .	112
5.3.2.1.2.2 Adsorción de GOx (Au/Os-PA+SDS/GOx) . . . . .	112
5.3.3 Material compuesto Os-PA+SDS-NTCs . . . . .	114
5.3.4 Películas Os-PA+SDS-NTCs . . . . .	115
5.3.4.1 Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados . . . . .	115
5.3.4.1.1 Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS-NTCs) . . . . .	115
5.3.4.1.2 Adsorción de GOx (grafito/Os-PA+SDS-NTCs/GOx) . . . . .	116
5.3.5 Optimización de la modificación de los electrodos de grafito . . . . .	117
5.3.5.1 Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS) . . . . .	117
5.3.5.2 Adsorción de GOx (grafito/Os-PA+SDS/GOx) . . . . .	118
5.3.6 Simulación Numérica . . . . .	119
5.3.6.1 Condiciones del modelo numérico . . . . .	119
5.3.6.2 Resultados de la simulación numérica . . . . .	121
5.3.6.2.1 Simulación para el sistema grafito/Os-PA+SDS . . . . .	121
5.3.6.2.2 Simulación para el sistema grafito/Os-PA+SDS/GOx . . . . .	123
5.4 Discusión y sumario . . . . .	124

**Capítulo 6. Sistema Os-PA-lactosa + SDS**

6.1 Introducción y Objetivos . . . . .	129
6.1.1 Características de la concaavalina A . . . . .	130
6.1.2 Características de la enzima peroxidasa de rábano picante . . . . .	130
6.2 Experimental . . . . .	133
6.2.1 Reactivos . . . . .	133
6.2.1.1 Conjugación de ConA con complejos de osmio (Os-ConA) . . . . .	133
6.2.2 Material compuesto Os-PA-lac+SDS . . . . .	134
6.2.2.1 Síntesis del glicopolielectrolito redox Os-PA-lac . . . . .	134
6.2.2.1.1 Caracterización de Os-PA-lac . . . . .	135
6.2.2.2 Síntesis del material compuesto Os-PA-lac+SDS . . . . .	135
6.2.3 Construcción de los electrodos modificados . . . . .	135
6.2.3.1 Modificación con el material compuesto (Au/Os-PA-lac+SDS) . . . . .	136
6.2.3.2 Controles . . . . .	136
6.2.3.2.1 Modificación con HRP (Au/Os-PA-lac+SDS/HRP) . . . . .	136
6.2.3.2.2 Modificación con ConA y HRP (Au/Os-PA-lac+SDS/ConA/HRP) . . . . .	136
6.2.3.3 Electrodo de trabajo . . . . .	136
6.2.3.3.1 Modificación con Os-ConA (Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA) . . . . .	137
6.2.3.3.2 Modificación con HRP (Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP) . . . . .	137
6.2.3.3.3 Modificación con Os-PA-lac (Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac) . . . . .	137
6.2.4 Medidas de XRR y GISAXS . . . . .	137
6.2.5 Medidas electroquímicas . . . . .	137
6.2.5.1 Medidas voltamétricas . . . . .	138
6.2.6 Microgravimetría . . . . .	138
6.3 Resultados . . . . .	139
6.3.1 Síntesis del glico-polielectrolito redox Os-PA-lac . . . . .	139

---

6.3.2 Material compuesto Os-PA-lac+SDS .....	141
6.3.3 Películas Os-PA-lactosa+SDS .....	141
6.3.4 Experimentos control .....	142
6.3.4.1 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/HRP .....	142
6.3.4.2 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/ConA/HRP .....	143
6.3.4.2.1 Microgravimetría .....	144
6.3.5 Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados .....	145
6.3.5.1 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP .....	146
6.3.5.1.1 Capa delgada .....	147
6.3.5.1.2 Capa gruesa .....	150
6.3.5.2 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/(Os-ConA/HRP) <sub>n</sub> .....	153
6.4 Discusión y Sumario .....	154

## Capítulo 7. Discusión y Conclusiones

---

7.1 Discusión y Conclusiones .....	161
------------------------------------	-----

<i>Referencias</i> .....	169
--------------------------	-----

---

Listado de abreviaturas utilizadas en esta tesis

AA	ácido ascórbico
Ag/AgCl	electrodo de referencia plata/cloruro de plata
CE	contraelectrodo
ConA	concanavalina A
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
CVD	deposición química en fase vapor
DA	dopamina
DLS	dispersión dinámica de luz láser
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DPV	voltametría diferencial de pulso
E	potencial
e <sup>-</sup>	electrón
EC <sup>o</sup>	mecanismo electroquímico catalítico
EQCM	microbalanza de cristal de cuarzo con control electroquímico
FAD	flavín adenin dinucleótido (forma oxidada)
FADH <sub>2</sub>	flavín adenin dinucleótido (forma reducida)
GISAXS	dispersión de rayos X en configuración rasante
GOx	glucosa oxidasa
HEPES	ácido N-hidroxietyl piperazina-N'-2-etanosulfónico
HR	humedad relativa
HRP	peroxidasa de rábano picante
MEF	método de los elementos finitos
MPS	3-mercapto-1-propanosulfonato
MWNT	nanotubo de carbono de pared múltiple
NaDC	desoxicolato de sodio
NTC	nanotubo de carbono
ODS	octadecilsulfato de sodio
Os-ConA	concanavalina A covalentemente unida a Os(bpy) <sub>2</sub> ClpyCOH
Os-PA	poli(alilamina) covalentemente unida a Os(bpy) <sub>2</sub> ClpyCOH
Os-PA-lac	poli(alilamina) covalentemente unida a Os(bpy) <sub>2</sub> ClpyCOH y lactosa
PA	poli(alilamina)
PE	polielectrolito
PEM	multicapas de polielectrolitos
PE-surf	complejo polielectrolito-surfactante
Q	carga redox adsorbida sobre un electrodo
QCM	microbalanza de cristal de cuarzo
RE	electrodo de referencia
RMN	resonancia magnética nuclear
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-NTCs	nanotubos de carbono suspendidos en SDS
SEM	microscopía electrónica de barrido
Surf	surfactante
SWNT	nanotubo de carbono de pared simple
TE	transferencia de electrones
TX-100	tritón X-100
py	piridina
bpy	bipiridina
pyCOH	piridina-4-aldehído
VC	voltametría cíclica
WE	electrodo de trabajo
XRR	reflectometría de rayos X

---

# Capítulo 1

## Introducción





## 1.1 Sensores

La demanda de la sociedad por la determinación en forma inmediata de sustancias que tienen relación con la salud o con el medio ambiente ha impulsado un fuerte desarrollo en el estudio de nuevos dispositivos capaces de realizar determinaciones en tiempo real. Estos dispositivos son denominados sensores y para algunas aplicaciones son elementos de rutina desde hace décadas.

Un *sensor* es, básicamente, un dispositivo capaz de transformar un cambio físico (*e.g.* temperatura, viscosidad) o químico (*e.g.* una oxidación) en una señal eléctrica procesable.

La IUPAC define un *sensor químico* como un dispositivo capaz de transformar la información química, que puede ir desde la concentración de un componente específico de una muestra hasta el análisis de su composición total, en una señal analíticamente útil. Dicha información puede proceder de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado.[1] Los sensores químicos contienen básicamente dos unidades funcionales: un *elemento de reconocimiento* y un *transductor*. El *elemento de reconocimiento* le otorga selectividad a una determinada especie química y la información química obtenida se convierte en una forma de energía que puede ser medida por el transductor. El elemento de reconocimiento puede estar basado en diferentes principios:

- principios físicos, donde no se lleva a cabo una reacción química. Ejemplos típicos son los sensores basados en la medición del cambio de absorbancia, el índice de refracción, la conductividad, la temperatura o la masa.
- principios químicos, en los que una reacción química con la participación del analito da lugar a la señal analítica. Como ejemplos podemos mencionar la reducción de una especie (como en el caso del sensor de oxígeno) o una reacción de reconocimiento. Cuando la reacción química involucra un proceso o una especie de origen biológico, entonces el elemento de reconocimiento se basa en un principio bioquímico. En este caso los dispositivos son llamados *biosensores*, y pueden considerarse como un subgrupo de los sensores químicos.

El elemento *transductor* permite transformar el evento físico-químico producido (luz, calor, intercambio de electrones) en una señal analítica útil. El transductor, como tal, no muestra selectividad.[1]

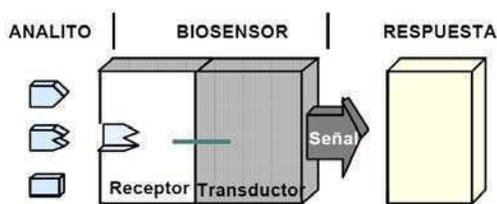
Los sensores químicos se pueden clasificar, de acuerdo con el principio de funcionamiento del transductor, en dispositivos ópticos, electroquímicos, eléctricos, magnéticos, termométricos, dispositivos sensibles a cambios de masa, etc.; dispositivos

basados en otras propiedades físicas pueden formar la base de un sensor químico en caso de que se utilicen para la determinación de la composición química.

En el marco de esta tesis son importantes los dispositivos electroquímicos, que transforman la interacción entre analito y electrodo en una señal útil. Dentro de esta clase de sensores, nos interesan en particular los sensores voltamperométricos, que abarcan a los dispositivos amperométricos. Este subgrupo puede comprender sensores basados en electrodos químicamente inertes, electrodos químicamente activos y electrodos modificados. En este grupo se incluyen sensores con y sin (sensores galvánicos) fuente de corriente externa.[2]

Los sensores basados en técnicas electroquímicas presentan la ventaja de que el cambio físico-químico que se produce genera de por sí una señal eléctrica; en el caso de los sensores potenciométricos, como los electrodos ión selectivo, se medirá una diferencia de potencial, mientras que en el caso de los sensores amperométricos, como el electrodo de oxígeno o el de glucosa, se medirá una corriente eléctrica.[3]

Como se mencionó anteriormente, los *biosensores* se presentan como un subgrupo porque el proceso en que se basan es, en general, común a los sensores químicos. La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un receptor o elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con el elemento transductor (Figura 1.1). Los biosensores pueden diferenciarse en función de los elementos biológicos de reconocimiento utilizados. Éstos pueden ser: organismos, tejidos, células, membranas, enzimas, anticuerpos, etc. Asimismo, pueden tener varios sistemas enzimáticos acoplados que sirven para la amplificación de la señal.



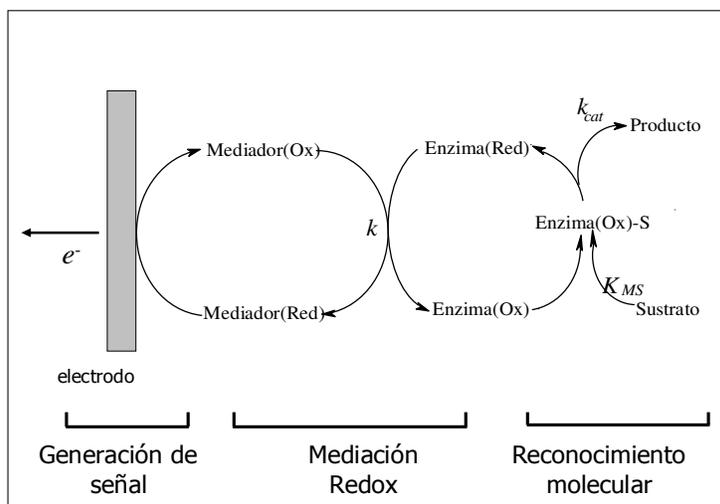
**Figura 1.1:** Esquema de un biosensor.

El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas particulares constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. La naturaleza ha

desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas o estructuras biomoleculares que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular de una determinada molécula de entre un conjunto o una mezcla de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de especies obviamente puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y construcción de sensores. Idealmente, los dispositivos de este tipo deben responder continua y reversiblemente al analito de interés sin perturbar la muestra, eliminando así la necesidad de su pretratamiento e incluso de su recolección.[4]

### 1.1.1 Diseño de sensores

Un importante aspecto a tener en cuenta en el diseño de un sensor es la elección de los materiales que lo constituyen, ya que es necesario que estos permitan su construcción y operación en forma reproducible y estable en el tiempo. En el caso de los sensores electroquímicos amperométricos, es esencial obtener un eficiente proceso de transferencia electrónica entre la especie a determinar y la superficie del electrodo. Es de destacar que tal proceso no siempre es directo; el ejemplo más representativo es el sensor para la detección de glucosa, donde el elemento de selectividad viene dado por la enzima glucosa oxidasa que oxida a la glucosa, mientras que la generación de la señal eléctrica es debida a un mediador redox que regenera la enzima y reacciona en la superficie del electrodo[3] (Figura 1.2).



**Figura 1.2:** Los tres pasos fundamentales en el funcionamiento de un biosensor enzimático amperométrico: reconocimiento molecular, mediación redox y generación de señal.

Se han utilizado diversas estrategias en la construcción de este tipo de sensores y algunos puntos clave en todas ellas son: la elección de los materiales utilizados para lograr un eficiente proceso de transferencia electrónica entre electrodo y mediador, la preservación del elemento de reconocimiento, especialmente cuando se utiliza material biológico como enzimas o anticuerpos, el acceso del analito a la zona de sensado y el rechazo de interferencias, entre otros.

## **1.2 Métodos de construcción de sensores**

Entre los modos de construcción de sensores amperométricos pueden describirse los siguientes sistemas:

### **1.2.1 Serigrafía**

La serigrafía es una técnica de impresión empleada para reproducir documentos e imágenes sobre cualquier material, y consiste en transferir una tinta a través de una malla tensada en un marco; el paso de la tinta se bloquea mediante una emulsión o barniz en las áreas donde no habrá imagen, quedando libre la zona donde pasará la tinta. En el caso de la construcción de sensores se utiliza una tinta conductora de grafito en la cual se suspenden los componentes del ensayo.

La principal ventaja de este sistema es que, una vez que el primer modelo se ha logrado, la impresión puede ser repetida cientos y hasta miles de veces sin perder definición y el costo es relativamente bajo, por lo que se convierte en uno de los métodos más sencillos de llevar a cabo.

Una de sus principales desventajas es que la tinta conductora que se utiliza contiene solventes orgánicos además del polvo de grafito. En esta tinta se suspenden los componentes del ensayo, generándose condiciones severas para algunos de ellos. Otro aspecto negativo que cabe destacar es que tales componentes no están firmemente unidos a la superficie y con el tiempo pueden ir disolviéndose en la muestra, por lo tanto no son útiles para sistemas en flujo.

El ejemplo más exitoso construido mediante esta técnica es el electrodo de glucosa, basado en el trabajo pionero de A.O.H. Hill y colaboradores[5]

### 1.2.2 Fotolitografía

En este proceso un determinado patrón se transfiere a un polímero fotosensible (*fotoresist*) por la exposición a una fuente de luz a través de una máscara óptica. La máscara óptica por lo general consta de patrones opacos (generalmente óxido de cromo o de hierro) sobre un soporte transparente (generalmente de cuarzo) que se utiliza para definir las características del diseño sobre una oblea. El patrón del *fotoresist* es entonces transferido al sustrato subyacente por disolución (*etching*) o por depósito. La combinación de una alineación precisa de una serie sucesiva de fotomáscaras con distintos patrones conduce a complejas estructuras de varias capas. Debido a su relevancia en la construcción de circuitos integrados, la fotolitografía ha madurado rápidamente mejorando continuamente la resolución de los patrones diseñados.[6]

Esta técnica tiene la ventaja de que permite producir dispositivos en el orden de los micrómetros (MEMS, *micro electro mechanical system*) de manera estándar. Como desventaja, al igual que en el caso anterior, los componentes del sistema en ocasiones deben ser expuestos a un entorno poco favorable, por ejemplo luz ultravioleta o ciertos solventes orgánicos.

Como modelo de sensor construido mediante esta técnica se puede citar el sistema *i-STAT*, un instrumento de análisis de sangre. El concepto básico del sistema, un conjunto de determinaciones que pueden realizarse en forma inmediata y junto al paciente (*point-of-care testing*), fue desarrollado por Lauks en 1985.[7] Estaba compuesto por un cartucho de un único uso, conteniendo un arreglo de sensores electroquímicos capaces de medir varios analitos en sólo unos pocos minutos y utilizando solamente unas gotas de sangre entera.

Actualmente, para la construcción de los cartuchos se utiliza una avanzada tecnología de fabricación de semiconductores mediante fotolitografía. El enfoque adoptado en el sistema *i-STAT* consistió en el desarrollo de sensores que operaban sobre principios electroquímicos establecidos (es decir, mediante la construcción de electrodos potenciométricos del tipo ión-selectivo y electrodos amperométricos). Mediante el uso de estos formatos de transducción fue posible centrarse en el reto fundamental de adaptar los procesos de microfabricación a las membranas que confieren especificidad a la respuesta del sensor.

Los procesos estándar de microfabricación desarrollados para localizar metales y materiales de pasivación sobre silicio generalmente implican el uso de polímeros fotosensibles y solventes orgánicos, pH extremos, y pasos de horneado a altas

temperaturas. Estos procedimientos son incompatibles con moléculas biológicas lábiles, por este motivo, un desarrollo exitoso en la fabricación de estos arreglos de sensores implicaría el desarrollo de procesos benignos para la colocación de las membranas que contienen estas moléculas, sobre sitios específicos de las obleas de silicio. Este objetivo se ha logrado mediante fotolitografía: en un primer paso, la oblea de silicio es calentada con una corriente de oxígeno, para producir una película aislante de dióxido de silicio. A continuación se depositan secuencialmente sobre la superficie capas de titanio y un metal noble y el polímero fotosensible es depositado mediante revestimiento por rotación (*spin-coating*) y es expuesto a la luz ultravioleta a través de una máscara que define el área activa del electrodo. Las partes expuestas a la luz producen una capa resistente, que corresponde al área que formará cada electrodo. La oblea se pone en contacto con una solución que disuelve los metales en las áreas desprotegidas y luego de un paso de lavado, el polímero fotosensible es removido con un solvente químico para exponer los patrones de electrodos deseados. El proceso se repite usando una máscara que define las líneas de conducción y los contactos eléctricos. Posteriormente, se modifica con los materiales necesarios para darle especificidad al sistema.[8]

El dispositivo se utiliza con alguno de los 13 diferentes cartuchos, requiere sólo una o dos gotas de sangre, generando resultados precisos en alrededor de dos minutos y junto al paciente. Las pruebas incluyen electrolitos, especies de interés clínico, gases en sangre, marcadores cardíacos y parámetros de coagulación. El instrumento es completamente automatizado, permite ejecutar el análisis en un analizador portátil a batería, cada cartucho es capaz de realizar hasta ocho pruebas y contiene los medios para una calibración automática. Presenta una buena relación costo-beneficio, prácticamente no hay participación del usuario y no requiere de mantenimiento.

En los dos métodos discutidos hasta aquí, existe un control laxo a nivel molecular de los componentes químicos que intervienen en una determinación. Paralelamente a estos desarrollos, que son comercialmente disponibles, el mundo académico ha pretendido tener un mejor control de la disposición de estos elementos a nivel molecular. Algunos ejemplos de las estrategias utilizadas se discutirán en las próximas secciones.

### 1.2.3 Polielectrolitos como soporte estructural para sensores

Los polímeros son moléculas de alto peso molecular (macromoléculas) compuestas por unidades estructurales denominadas monómeros. Cuando los monómeros presentan carga electrostática en solución, estamos en presencia de un polielectrolito. Una gran variedad de moléculas de interés biológico, como las proteínas y el ADN, son polielectrolitos. Existen además polielectrolitos sintéticos, ampliamente usados en aplicaciones comerciales como aditivos en productos cosméticos (agentes espesantes y modificadores reológicos), adhesivos, estabilizantes para suspensiones coloidales, tratamiento de aguas, floculantes y otros.

Los polielectrolitos se clasifican en débiles o fuertes de acuerdo a su comportamiento ácido-base. En los polielectrolitos fuertes el estado de carga de la molécula no depende del pH de la solución. En los polielectrolitos débiles, los grupos cargados se hallan en equilibrio ácido-base y por lo tanto su grado de ionización será dependiente del pH. En este caso, el  $pK_a$  o el  $pK_b$  aparentes indican el pH en el cual la mitad de los grupos se hallan disociados, pero los polielectrolitos débiles no presentan un salto abrupto de pH durante una curva de titulación como sucede para los ácidos o bases débiles.[9] Esto se debe a que el estado de carga de un monómero afecta al equilibrio ácido-base de sus vecinos, modificando sus constantes de protonación, dando origen a una distribución de  $pK_a$ s y por lo tanto, a una curva de titulación sin cambios de pH abruptos.

Los polímeros y polielectrolitos se caracterizan por ser macromoléculas versátiles capaces de adoptar un gran número de conformaciones. En ausencia de interacciones, los polielectrolitos en solución adoptan una conformación de ovillo que maximiza la entropía conformacional.[10] Por otro lado, un polielectrolito fuertemente cargado buscará disminuir las repulsiones entre cargas, dependiendo de la concentración de contraiones y por lo tanto presentará en solución una conformación estirada. En consecuencia, un aumento en la fuerza iónica o una disminución en la fracción de grupos cargados debida a cambios de pH en la solución, favorecerá las conformaciones ovilladas. La conformación de un polielectrolito real en una solución diluida estará determinada por el balance entre diversas interacciones tales como las fuerzas electrostáticas, la estadística conformacional, las fuerzas de van der Waals, las uniones hidrógeno, la condensación de contraiones,[11] los impedimentos estéricos y (para polielectrolitos débiles y/o redox) los equilibrios químicos. En el caso de polielectrolitos adsorbidos en una superficie también serán importantes las interacciones superficie-polielectrolito y polielectrolito-polielectrolito. La

presencia de un gran número de interacciones moleculares opuestas y fuertemente acopladas hace a los polielectrolitos sistemas complejos pero sensibles a su entorno y por lo tanto muy interesantes de estudiar desde el punto de vista fisicoquímico.

Analizaremos a continuación algunas de las estructuras generadas a partir de polielectrolitos y su potencial aplicación en la construcción de sensores.

### 1.2.3.1 Modificación de la superficie mediante recubrimiento

En estos sistemas, el sustrato es modificado mediante recubrimiento con un polielectrolito y luego se introduce la especie electroactiva mediante intercambio iónico.[12-14] El recubrimiento con el polielectrolito puede realizarse por diversos métodos, el más simple consiste en dejar secar una alícuota de la solución (recubrimiento por secado o *casting* o *drop coating*). Un método para obtener películas de espesor más controlado y homogéneo consiste en sumergir el sustrato en la solución del polímero, retirarlo lentamente y dejarlo secar (recubrimiento por inmersión o *dip coating*). Otra posibilidad es colocar un exceso de una solución del polímero y remover parte por centrifugación (revestimiento por rotación o *spin coating*). Los polielectrolitos catiónicos como la poli(4-vinilpiridina) (4-PVP) protonada se emplean para inmovilizar cuplas negativas, principalmente  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4-}$  y los polianiones, entre los que se destacan el poliestirensulfonato (PSS) y el Nafion, se usan para incorporar cationes tales como  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3/2+}$ ,  $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3/2+}$ ,  $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$ , metilviologen, etc. Además se han usado en menor proporción cuplas redox con un ligando lábil (ej.  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}^{2+}$ ) que se unen a polímeros exhibiendo buenos grupos ligandos (por ej. 4-PVP).[12-13] Una desventaja general de este método es que al no existir una unión covalente fuerte entre la especie redox y el electrodo, la primera es liberada gradualmente en la solución.

### 1.2.3.2 Hidrogeles

Los hidrogeles son redes poliméricas conteniendo solvente atrapado. Estas películas se preparan mediante un proceso de entrecruzamiento, aplicando sobre un electrodo una mezcla de un polielectrolito con un agente entrecruzante (por ejemplo un dióxido). Los sistemas de enzimas *cableadas* eléctricamente mediante hidrogeles redox fueron desarrollados por Heller y permiten llevar a cabo un proceso de transferencia electrónica eficiente entre las

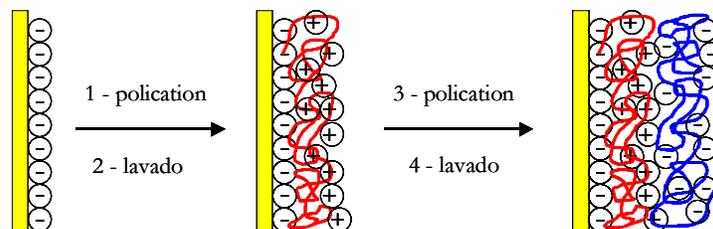
enzimas y el electrodo. Un ejemplo es el biosensor amperométrico construido mediante un hidrogel de poli(vinilpiridina) modificada con un complejo de osmio y glucosa oxidasa (GOx).[15] Los hidrogeles proporcionan una mayor estabilidad a la enzima en un ambiente con alto contenido de agua, donde analitos solubles como glucosa o lactato pueden difundir hacia ella. La respuesta del biosensor resulta de la transferencia de electrones entre el grupo prostético de la enzima redox (FAD, NAD(P), hemo, etc) y el electrodo. Ejemplos de esta estrategia analítica son los biosensores basados en glucosa oxidasa, lactato oxidasa y peroxidasa.[15-18]

### **1.2.3.3 Autoensamblados capa por capa**

El método capa por capa para la preparación de películas delgadas se basa en la adsorción alternada de macromoléculas. Este concepto fue demostrado por primera vez en 1991 por Decher y Hong, empleando dos polielectrolitos de carga opuesta.[19-20] La Figura 1.3 esquematiza el principio para la construcción de estructuras empleando adsorciones electrostáticas. Se comienza con un sustrato cargado, en este caso negativamente. Mientras ciertos sustratos presentan una carga superficial en forma natural (por ejemplo el vidrio y los óxidos metálicos en general), otros requieren un tratamiento químico; pueden emplearse tioles cargados para modificar metales nobles, silanos para ITO (óxido de estaño dopado con indio, un material conductor y transparente en el visible) y silicio y sales de diazonio para superficies de carbón y nanotubos de carbono. El sustrato sólido con una superficie con cargas fijas negativas es sumergido en una solución de un polielectrolito (PE) catiónico durante aproximadamente 10-15 minutos (paso 1). En ese lapso el polímero se adsorbe en la superficie dejando un cierto número de grupos iónicos expuestos sobre la interfase con la solución, invirtiéndose la carga electrostática superficial e impidiendo la adsorción de más moléculas de PE. Luego de remover el excedente mediante un lavado (paso 2), el sustrato (que en esta instancia se encuentra cargado positivamente) se sumerge en una solución de un polielectrolito aniónico (paso 3) observándose nuevamente la adsorción e inversión de la carga superficial. El excedente es nuevamente removido por un paso de lavado (paso 4). El proceso se repite en forma secuencial, hasta obtener una película del espesor deseado.

Alternando soluciones de polielectrolitos de carga opuesta y pasos de lavado, pueden construirse estructuras del espesor deseado. También pueden alternarse distintos componentes, a razón de un componente por paso de adsorción (y respetando las cargas

opuestas en pasos sucesivos).



**Figura 1.3:** Esquema de preparación del autoensamblado electrostático capa por capa. Los pasos 1 y 3 representan la adsorción de polielectrolitos de carga opuesta. Los pasos 2 y 4 representan los lavados. Los contraiones fueron omitidos para mayor claridad.

El método de ensamblado capa por capa se ha transformado en la actualidad en una de las herramientas más importante para la modificación de superficies. La lista de materiales ensamblados incluye enzimas,[21-22] virus,[23] nanopartículas,[24-25] macroiones inorgánicos,[26-27] y prácticamente cualquier macromolécula. La presencia de cargas electrostáticas en los bloques de construcción también ha dejado de ser un requerimiento, ya que se han preparado autoensamblados basados en la formación de uniones hidrógeno, interacciones donador-aceptor, uniones covalentes, química de coordinación, entre otros.[28]

Gran parte del éxito del método capa por capa radica en la capacidad de controlar las propiedades de las películas obtenidas mediante la elección de las variables del proceso. Estas variables se combinan con las condiciones de tratamiento post-ensamblado, permitiendo adaptar las propiedades de las películas a aplicaciones concretas. A partir del conocimiento del efecto de estas variables sobre la organización molecular mediante la caracterización experimental y el modelado teórico es posible actuar sobre los parámetros de preparación de la película para lograr la funcionalidad deseada. Siguiendo las tendencias actuales en ciencia de materiales, esta metodología permite lograr películas multifuncionales y/o adaptables. Otras ventajas importantes sobre el resto de las técnicas de preparación como el revestimiento por inmersión o por rotación, son su bajo costo, simplicidad y el uso exclusivo de soluciones acuosas.

### 1.2.3.4 Multicapas de Polielectrolitos electroactivos

El método de autoensamblado capa por capa descrito en la sección anterior permite la modificación de electrodos con polímeros electroactivos, con un control sobre el espesor, la composición interna y la carga superficial de la película. Schlenoff[29] demostró por primera vez en 1997 el uso del método capa por capa para fabricar un electrodo modificado con poli(butilviologeno) (PBV) y PSS. Hodak *et al.* prepararon ese mismo año un biosensor mediante el autoensamblado alternado de GOx y una poli(alilamina) derivatizada con ferroceno.[21] A partir de ese momento han surgido numerosos ejemplos de películas electroactivas ensambladas capa por capa. La mayor parte del trabajo experimental sobre estos sistemas se ha centrado en la preparación de biosensores enzimáticos y dispositivos electrocrómicos. En el primer caso se emplean principalmente cuplas redox estables que transfieren carga mediante un mecanismo de esfera externa y que han demostrado ser muy útiles en hidrogeles para conectar electroquímicamente (*cablear*) enzimas a electrodos,[15] tales como ferroceno y complejos de osmio con ligandos del tipo piridina. En el segundo caso se emplean materiales cuyos espectros visibles presentan bandas de absorción anchas y un importante contraste de color entre sus formas oxidadas y reducidas (polianilinas, politiofenos, nanocristales de azul de Prusia).[30-33]

### 1.2.3.5 Complejos Polielectrolito-surfactante (PE-surf)

Los surfactantes son moléculas anfífilas que contienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica, utilizados en electroquímica para mejorar las propiedades de la interfase electrodo/solución.[34-36] Han demostrado ser muy útiles en electrocatálisis mediante la formación de micelas iónicas o debido a la formación de monocapas en la superficie del electrodo y, además, son capaces de dispersar nanopartículas de manera eficiente.[37-40] Sin embargo, los surfactantes no pueden ser adsorbidos en cualquier tipo de superficie y no son fácilmente modificables, ya que generalmente están formados por una cadena alquílica y un grupo iónico.

La combinación de un polielectrolito con un surfactante iónico de carga opuesta permite generar un complejo que mantiene ciertas propiedades de los polielectrolitos, como el intercambio iónico y la resistencia mecánica, e introduce otras como el orden a partir de la formación de fases mesoscópicas.[41-42]

Debido al desplazamiento de pequeños contraiones, la asociación polielectrolito-

surfactante es impulsada entrópica y electrostáticamente con una moderada contribución de interacciones hidrofóbicas.[43-48] Debido a la interrelación de estas interacciones, las estructuras híbridas polímero-surfactante poseen frecuentemente propiedades diferentes a las de sus componentes puros. La expulsión de pequeños contraiones hacia el solvente durante la complejación de pares iónicos es la fuerza impulsora clave para muchos procesos de agregación que involucran macromoléculas. Las interacciones electrostáticas dominan las asociaciones no cooperativas entre un poli-ión y un surfactante opuestamente cargado. La porción hidrofóbica del surfactante puede favorecer la agregación por unión cooperativa con el poli-ión.[42]

La complejación de polielectrolitos con surfactantes, incluyendo moléculas anfífilas de bajo y medio peso molecular así como lípidos, ha sido investigada durante muchos años casi exclusivamente en solución.[49] Desde 1994, a partir del trabajo de Antonietti *et al.*,[50] se ha incrementado el interés en los complejos PE-surf en estado sólido.

La principal característica de los complejos PE-surf en estado sólido es que forman un gran número de estructuras mesomorfas. El mayor factor que determina el tipo de mesofase es el surfactante, mientras que el polielectrolito actúa como una especie de armazón (*scaffold*) conteniendo a las cabezas cargadas del surfactante e influyendo en mayor medida en las propiedades mecánicas de los PE-surf.[51] Sin embargo, ésta no es una regla general, ya que la densidad de carga del polielectrolito puede tener también un efecto estructural importante.[52]

### **1.3 Aplicaciones de PE-surf en electroquímica**

Como ya se ha explicado, la técnica de autoensamblado electrostático es una poderosa herramienta para la creación de nanoestructuras y materiales funcionales. Se ha prestado considerable atención a los complejos sólidos polielectrolito-surfactante de autoensamblados electrostáticos debido a sus interesantes propiedades y sencilla construcción.[50, 53-62] Numerosos estudios han demostrado que la supraestructura molecular del sólido PE-surf puede ser modificado a través de la densidad de carga, flexibilidad y la hidrofobicidad de las cadenas del polímero, así como a través de las características del surfactante, por ejemplo, la cadena alquílica, el grupo polar, y relación de volumen polar-no polar.[63] Durante los últimos años se han dedicado grandes esfuerzos al

diseño de nuevos complejos PE-surf funcionales para aplicaciones especiales. La principal ventaja del sólido PE-surf es que el autoensamblado provee un abordaje muy sencillo para ajustar las propiedades de los polímeros sin la necesidad de sintetizar nuevas especies químicas. En lo que se refiere a su aplicación en procesos de transferencia electrónica poco es lo que se ha explorado y solo pueden mencionarse los trabajos de Tong[63-64]

Teniendo en cuenta propiedades como la capacidad de formar estructuras estables, la formación espontánea de autoensamblados y la posibilidad de manipular sus propiedades a partir del ajuste fino de las características de sus componentes, estos complejos presentan un gran potencial para la construcción de interfases aplicadas a sensores.

#### **1.4 Objetivos**

El objetivo de esta tesis es estudiar materiales compuestos por un polielectrolito y un surfactante de carga opuesta, con el fin de lograr un método simple de construcción de sensores que presente mejoras en sus propiedades mecánicas, reflejadas a través de su estabilidad en medio acuoso y en su efecto en las propiedades de transferencia electrónica de distintas especies. Se pretende también facilitar la introducción de nuevos elementos al complejo a través de la derivatización del polielectrolito. A tal efecto se ha elegido como sistema modelo a la poli(alilamina) como polielectrolito, y como surfactante al dodecilsulfato de sodio. La poli(alilamina) es un polielectrolito débil que posee un grupo amino primario, cuya carga es posible regular con el pH y es susceptible a reacciones químicas a través de métodos suaves, mientras que el dodecilsulfato es un surfactante muy bien caracterizado cuya utilización en este tipo de sistemas es conocido.

A lo largo de los próximos capítulos se estudiarán distintas estrategias para la combinación de estas dos especies, ya sea a través de autoensamblados capa por capa (capítulo 3) o por formación del complejo en solución, con la posterior resuspensión o redisolución en solvente orgánico (capítulos 4 a 6), paralelamente se estudiará la introducción de otros elementos en el sensor y su efecto en los procesos de transferencia electrónica y estructura de la película.



---

# Capítulo 2

## Materiales y Métodos



## 2.1 Métodos Instrumentales

Durante el desarrollo de esta tesis se han empleado distintas técnicas experimentales que permitieron caracterizar tanto a los sistemas de detección aquí presentados, como así también a los elementos constituyentes de los mismos. A continuación se desarrollará una breve descripción del fundamento teórico de dichas técnicas, el tipo de información que brindan, sus ventajas y limitaciones y el tipo de instrumental necesario para su implementación, haciendo especial énfasis en la aplicación de las mismas a este trabajo de tesis.

### 2.1.1 Técnicas electroquímicas

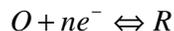
En esta tesis se utilizaron técnicas electroquímicas de potencial controlado. Estas técnicas requieren del uso de un potencióstato para fijar el potencial y medir la corriente, y de una celda electroquímica, en el caso de este trabajo de tesis, de tres electrodos.

De todas las técnicas instrumentales empleadas en la presente tesis las técnicas electroquímicas son seguramente las más antiguas, conocidas, estudiadas y versátiles. En general son de fácil implementación y el instrumental asociado a las mismas es relativamente económico. Existe a disposición de los interesados un gran número de obras que tratan sobre técnicas electroquímicas, entre las más conocidas se encuentran la de Bard y Faulkner,[65] Kissinger y Heineman,[66] y la de Sawyer[67] entre otras.

#### 2.1.1.1 Conceptos generales

Una reacción de electrodo es una reacción interfacial que necesariamente involucra un paso de transferencia de carga desde o hacia una superficie conductora. La reacción de electrodo comprende a todos los procesos (reacción química, reorganización estructural, adsorción) que acompañan el paso de transferencia de carga. Se trata de un proceso anódico si las especies son oxidadas perdiendo electrones, o bien es un proceso catódico si las especies son reducidas en la interfase, ganando electrones. Las especies electroactivas pueden ser especies disueltas en solución, el solvente, una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo en sí mismo.

Una reacción de electrodo de la forma general:



(donde  $O$  y  $R$  son las especies oxidadas y reducidas respectivamente, y  $n$  es el número de electrones,  $e^-$ ) involucra una secuencia de pasos que puede incluir el transporte de reactivos hasta la superficie del electrodo, la transferencia de electrones y la remoción del producto de la superficie del electrodo; por lo que la velocidad del proceso estará determinada por la velocidad del paso más lento de la secuencia.[65-68]

### 2.1.1.2 Celda electroquímica

La mayoría de las técnicas electroquímicas, y en particular las técnicas empleadas en esta tesis, utilizan celdas de tres electrodos. El *electrodo de trabajo (WE)* es aquel donde ocurren los procesos electroquímicos de interés. En este tipo de celdas la corriente circula desde el electrodo de trabajo por un circuito externo y luego hacia el *electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE)*; el circuito se cierra por el transporte de iones en la solución. El contraelectrodo debe tener un área mucho mayor que la del electrodo de trabajo para no limitar el flujo de carga eléctrica. El tercer electrodo es el *electrodo de referencia (RE)* por el cual no circula corriente debido a su alta impedancia y que solamente controla el potencial del electrodo de trabajo. Debido a las dimensiones de los electrodos utilizados en esta tesis, los modelos que se describen corresponden al caso de electrodo plano infinito y difusión semi-infinita. Una discusión más detallada puede encontrarse en las obras antes mencionadas.

### 2.1.1.3 Potenciostato

El potenciostato es el instrumento encargado de controlar el potencial entre el electrodo de trabajo y el electrolito. El electrodo de trabajo es normalmente conectado a tierra y el potencial del electrolito se mide mediante el electrodo de referencia. En la actualidad estos dispositivos permiten aplicar distintas funciones de potencial al electrodo de trabajo, generando distintos tipos de respuesta de corriente.

Los procesos electroquímicos generalmente no son sencillos, involucran varios pasos que incluyen desde el proceso heterogéneo de transferencia de electrones y el transporte de masa a reacciones químicas homogéneas que pueden estar acopladas, procesos superficiales tales como adsorción, etc. Un análisis completo de cualquiera de estos procesos

electroquímicos requiere conocer cada paso individual. Como mínimo es necesario conocer la constante de velocidad estándar, los coeficientes de los procesos que involucran transferencia de electrones, el número de electrones involucrados y, si hay especies en solución, los correspondientes coeficientes de difusión.

Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar los parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de las reacciones de electrodo. La técnica a utilizar dependerá del sistema químico y de la información que se quiera obtener.

En este trabajo de tesis se utilizaron principalmente tres técnicas electroquímicas básicas: voltametría cíclica, voltametría diferencial de pulso y cronoamperometría. A continuación se describirá el fundamento de cada una de estas técnicas. Para mayores detalles puede consultarse la bibliografía citada.

#### 2.1.1.4 Voltametría cíclica [69]

En la voltametría cíclica (VC) se aplica sobre el sistema una variación lineal del potencial, a partir de un potencial inicial  $E_1$ . En cada momento, el potencial aplicado,  $E$ , responde a la ecuación:

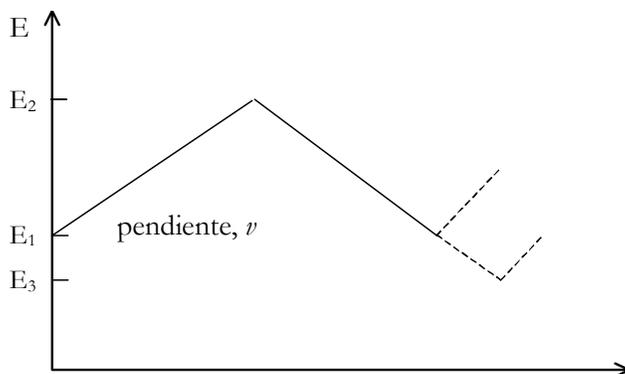
$$E = E_1 + \nu t \quad (2.1)$$

donde  $\nu$  es la velocidad de variación del potencial con el tiempo,  $dE/dt$ .

En la Figura 2.1 se muestra la forma en la que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo, en función del tiempo. El potencial se varía linealmente con el tiempo (a una dada velocidad de barrido,  $\nu$ ) desde un valor  $E_1$  a un valor  $E_2$ , luego se puede regresar al mismo valor inicial  $E_1$  u otro valor  $E_3$  y así sucesivamente. La velocidad de barrido usada generalmente se encuentra entre los pocos  $\text{mV s}^{-1}$  hasta  $100 \text{ V s}^{-1}$ .

Se grafica entonces la respuesta de corriente del sistema en función del potencial aplicado (el eje de potencial es también un eje de tiempo), obteniéndose la curva intensidad-potencial o curva voltamétrica.

La forma exacta de esta curva depende del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo. Los límites de potencial definen las reacciones electródicas que se permite que se produzcan, y la velocidad de barrido de potencial define la escala de tiempo en la que se examina el proceso electroquímico.



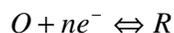
**Figura 2.1:** Perfil de potencial en función del tiempo para voltametría cíclica.

Esta técnica suele utilizarse como técnica previa en cualquier estudio electroquímico pues da una primera información acerca del proceso de electrodo en estudio, ya que dependiendo de la forma de la curva voltamétrica se podrá conocer la reversibilidad del mismo, es decir, si la velocidad de transferencia electrónica de la reacción es tan rápida que el potencial del electrodo de trabajo cumple la ecuación de Nernst, y las etapas en las que se desarrolla. El análisis de las curvas voltamétricas también permite observar si existen procesos acoplados a los de oxidación y reducción, por ejemplo procesos de adsorción o desorción de una especie electroquímicamente activa, o reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga.

Puesto que en esta tesis se trabajó con especies electroquímicas tanto en solución como inmovilizadas en la superficie del electrodo, se explicará la técnica para ambas situaciones.

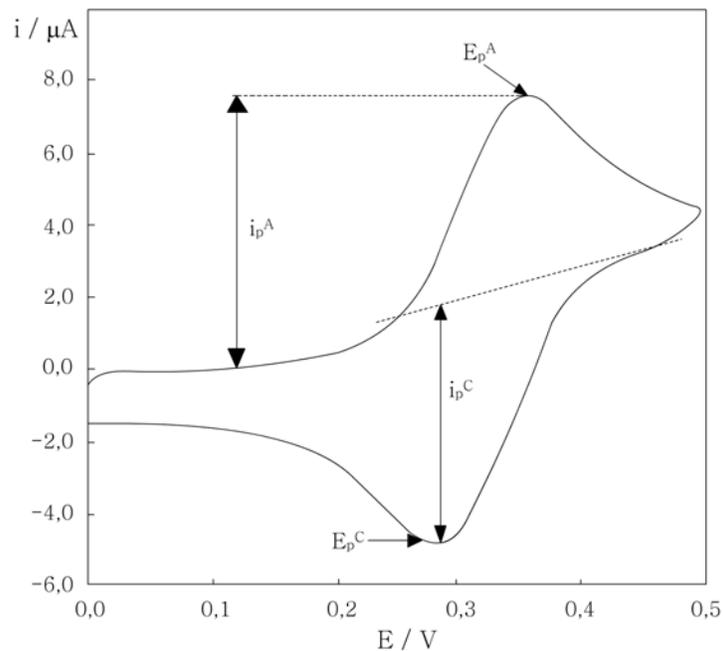
#### 2.1.1.4.1 Especie electroquímica en solución

Nuevamente, para el proceso:



donde  $O$  y  $R$  son las especies oxidada y reducida solubles, en el marco del análisis de la curva  $i$  vs.  $E$ , la corriente depende del control cinético y difusional, observándose un crecimiento de la misma a medida que el sobrepotencial de la cupla aumenta, llegando a una corriente pico cuando la reacción comienza a estar controlada por difusión. Esta corriente pico es un parámetro característico de la voltametría.

En la Figura 2.2 se observa el voltagrama cíclico obtenido para una **reacción reversible** de transferencia de  $1 e^-$ , donde la especie electroquímica se encuentra en la solución. Si el potencial se barre a través del intervalo donde se produce la reacción de oxidación ( $R \rightarrow O$ ), inicialmente y como consecuencia del cambio en el potencial aplicado, la oxidación de  $R$  en la superficie se ve favorecida y por lo tanto la densidad de corriente anódica aumenta. Esta densidad de corriente continúa aumentando hasta que la concentración superficial llega a ser cero y por lo tanto la reacción pasa a estar controlada por difusión. Como la concentración superficial se mantiene en cero, y con el tiempo el flujo hacia la superficie disminuye, la densidad de corriente disminuye, y por consiguiente la respuesta presenta un pico. Para el barrido de retorno, la reacción de transferencia electrónica en el electrodo es  $O \rightarrow R$ , por lo tanto la corriente cambiará su signo. La corriente catódica pasará de nuevo a través de un pico, en un proceso similar como el descrito anteriormente.



**Figura 2.2:** Voltametría cíclica típica para un proceso reversible.  $E_p^C$  y  $E_p^A$  corresponden a los potenciales de pico catódico y anódico respectivamente.  $i_p^C$  e  $i_p^A$  son las corrientes de pico catódico y anódico.

La respuesta de la voltametría cíclica para una reacción de transferencia electrónica de una especie en solución puede modelarse teniendo en cuenta la velocidad de reacción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, su difusión y las posibles reacciones acopladas en el seno de la solución.[70] El modelo predice que la forma de la curva es

independiente de la velocidad de barrido de potencial para una especie reversible. El análisis de la voltametría cíclica puede conducir a obtener parámetros termodinámicos y el coeficiente de difusión.

Para el caso de una especie que reacciona muy rápido con la superficie de un electrodo (caso reversible), el potencial formal para la cupla se encuentra a partir de:

$$E^{\circ'}_{O/R} = \frac{(E_p^A + E_p^C)}{2} \quad (2.2)$$

donde  $E_p$  representa el potencial de la corriente pico y los supraíndices  $A$  y  $C$  a los procesos anódicos y catódicos, respectivamente.

Mientras que el coeficiente de difusión se puede determinar a partir de graficar la corriente pico,  $i_p$ , versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido,  $\nu$ , utilizando la ecuación de Randles-Sevcik, escrita a 298K,

$$i_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A D_R^{1/2} \nu^{1/2} C_R^* \quad (2.3)$$

donde la corriente de pico  $i_p$  tiene la unidad Ampere (A), el área del electrodo,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ), la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución,  $C_R^*$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ), el coeficiente de difusión,  $D_R$  ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) y la velocidad de barrido de potencial,  $\nu$  ( $\text{V s}^{-1}$ ).

A partir de la forma del voltograma experimental se puede comprobar la reversibilidad del sistema. Para una cupla reversible, se cumple que:

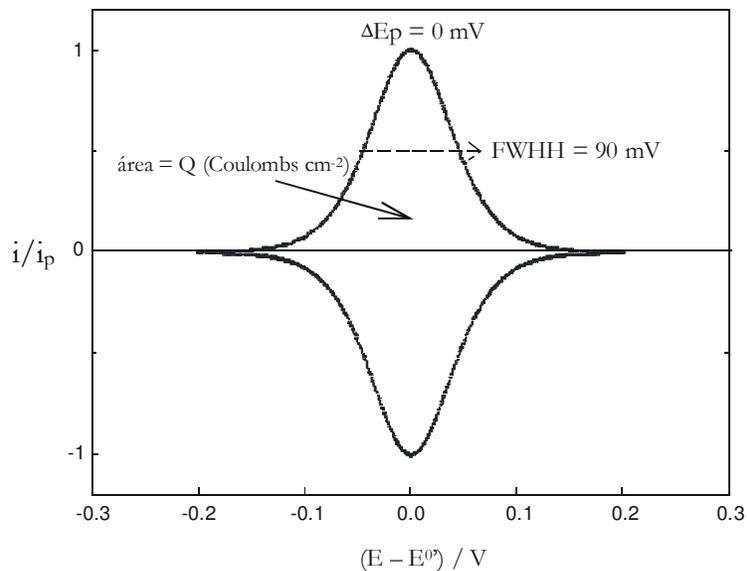
- $\Delta E_p = E_p^A - E_p^C = 59/n \text{ mV}$
- $-j_p^C = j_p^A$
- $j_p$  proporcional a  $\nu^{1/2}$
- $E_p$  independiente de  $\nu$

En los **procesos irreversibles**, la velocidad de transferencia de electrones es insuficiente para mantener las especies en equilibrio en la interfase electrodo/solución, entonces, la forma de la voltametría cíclica es distinta. A baja velocidad de barrido el sistema se comporta reversiblemente ya que el cambio de potencial es lento y el sistema tiene tiempo como para que el material adyacente a la superficie del electrodo se equilibre según el potencial aplicado. Sin embargo a medida que la velocidad de barrido se

incrementa, la velocidad de transferencia electrónica no se equipara y las concentraciones superficiales del sistema redox no alcanzan a equilibrarse. Esto se evidencia en un retraso en la aparición de la corriente pico y la consecuente separación de los picos de potencial anódico y catódico. Si el proceso es completamente irreversible se observa la ausencia de pico cuando se invierte el barrido de potencial. Además el potencial de pico,  $E_p$ , depende de la velocidad de barrido.

#### 2.1.1.4.2 Especie electroquímica inmovilizada

Las propiedades del voltagrama de especies adsorbidas están determinadas por el número de sitios sobre la superficie electródica donde se produce la adsorción. Consideremos el caso mas simple en el cual solamente las formas  $O$  y  $R$  se encuentran adsorbidas sobre el electrodo y son electroquímicamente activas en el intervalo de potencial de trabajo. Podemos despreciar los efectos de transporte de masa ya que las especies están confinadas en la interfase. En la Figura 2.3 se muestra la forma de la VC si se tratara de un **proceso reversible**.



**Figura 2.3:** Voltametría cíclica teórica para una especie adsorbida sobre el electrodo, comportamiento reversible ( $n = 1$ ). FWHH: ancho del pico a mitad de altura.

La principal diferencia entre la VC de especies adsorbidas y la de especies en solución es que los picos son simétricos y más agudos, las cargas asociadas con los

procesos anódicos y catódicos son iguales. La simetría de los picos ocurre porque solamente puede ser reducida la cantidad de reactante ( $O$ ) presente sobre la superficie del electrodo. La corriente aumenta desde cero hasta la corriente de pico y cae nuevamente a cero después del pico cuando el reactivo se consume totalmente, la densidad de corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido del potencial, la carga requerida para oxidar la capa adsorbida (es decir el área bajo el pico, ya que el eje de potenciales es también de tiempo) es independiente de la velocidad de barrido de potencial y además la separación entre los picos de oxidación y reducción es 0 mV para un par con transferencia electrónica rápida, ya que la difusión no interviene en el proceso.

Nuevamente, existen criterios de diagnóstico para voltagramas cíclicos para la transferencia electrónica de  $1e^-$  en una cupla reversible, donde  $O$  ó  $R$  se encuentran adsorbidos sobre la superficie del electrodo, ellos son:

- $\Delta E_p = 0 \text{ mV}$
- $j_p^C = j_p^A$
- $j_p$  proporcional a  $v^2$
- $E_p$  independiente de  $v$
- $q_A = q_C$

Teniendo en cuenta que el rango de potencial donde se observa una corriente faradaica corresponde a un determinado período de tiempo (el eje de potenciales se convierte en un eje de tiempo al considerarse la velocidad de barrido), la carga total intercambiada puede obtenerse por integración de la corriente en función del tiempo. En virtud de la ley de Faraday, es posible determinar la cantidad adsorbida de la especie electroactiva por simple integración del voltamograma. ( $Q/nF = \text{moles de sustancia electroactiva depositada}$ ).

En el caso de un **sistema irreversible**, el pico de ida no es simétrico y no se observa pico para el proceso inverso. Si el sistema fuera cuasirreversible, existe un pico de vuelta, pero los picos no son simétricos y no coinciden los potenciales de pico.

Cuando una especie electroquímica se encuentra unida químicamente al electrodo, éste recibe el nombre de electrodo químicamente modificado. Este tipo de electrodos han sido extensamente estudiados por su aplicación en catálisis. Su comportamiento es similar

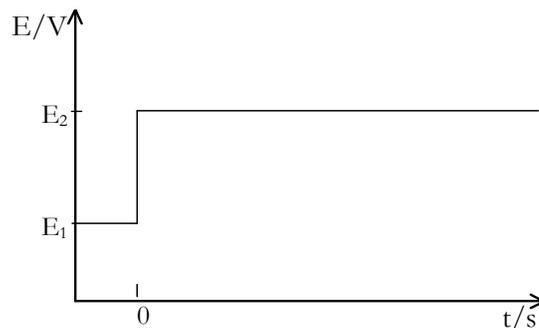
al mencionado anteriormente y su voltametría cíclica puede ser analizada de la misma manera.

Los procesos superficiales debidos a especies adsorbidas pueden estar combinados con procesos debidos a especies que difunden desde la solución.

Los procesos de recubrimiento tienen también una voltametría cíclica característica donde se observa entrecruzamiento de los picos y el pico de vuelta es agudo y simétrico debido a que el material electroactivo esta siendo depositado sobre el electrodo.

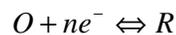
### 2.1.1.5 Cronoamperometría [71]

La cronoamperometría es una técnica en la cual el potencial del electrodo de trabajo se cambia instantáneamente y se mide la corriente en función del tiempo. En la Figura 2.4 se muestra esquemáticamente la perturbación de potencial aplicada al electrodo de trabajo en función del tiempo.



**Figura 2.4:** Potencial en función del tiempo para un experimento de cronoamperometría.

Para una reacción donde  $O$  y  $R$  son las especies oxidadas y reducidas respectivamente, ambas solubles en la solución:



y  $E_2$  es tal que la reducción de  $O$  transcurre a una velocidad controlada por difusión, el proceso queda caracterizado por las leyes de Fick. Imponiendo las condiciones de contorno adecuadas:

- A  $t=0$ ,  $C_o(x,0) = C_o^*$
  - Para  $t > 0$ ,  $\lim_{x \rightarrow \infty} C_o(x,t) = C_o^*$
- $$C_o(0,t) = 0$$

donde  $C_o^*$  es la concentración de  $O$  en el seno de la solución. Inicialmente ( $t=0$ ) la concentración de  $O$  es uniforme ( $C_o = C_o^*$ ), luego de aplicada la perturbación, la concentración de  $O$  se agota sobre la superficie del electrodo y en todo momento  $C_o = C_o^*$  lejos del electrodo (difusión lineal semi-infinita). Las ecuaciones pueden ser resueltas aplicando la transformada de Laplace a la expresión correspondiente a la segunda ley de Fick, permitiendo obtener las expresiones para el perfil de concentración de la especie  $O$  en función del tiempo y de la distancia. La dependencia de la corriente con el tiempo viene dada por:

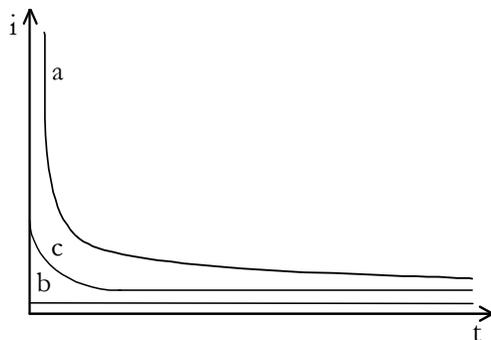
$$i = nFAD_o \left[ \frac{\partial C_o}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (2.4)$$

que lleva a la respuesta cronoamperométrica conocida como la ecuación de Cottrell:

$$i = \frac{nFAD_o^{1/2} C_o^*}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.5)$$

donde  $i$  es la intensidad de corriente,  $n$  el número de electrones intercambiados en la reacción,  $A$  es el área del electrodo,  $D_o$  es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, en este caso  $O$ ,  $F$  la constante de Faraday y  $t$  el tiempo. Esta ecuación relaciona la corriente  $i$  con  $t^{-1/2}$ . A partir de un gráfico de  $i$  vs.  $t^{-1/2}$  puede obtenerse el coeficiente de difusión de la especie  $O$ . Para obtener datos confiables es recomendable analizar los datos de corriente en un amplio intervalo de tiempo. Teniendo en cuenta que a tiempos cortos aquellos están dominados por los procesos de carga de la doble capa electroquímica y, a tiempos largos están determinados por convección natural y posibles vibraciones.

La forma del transitorio de corriente depende del tipo de proceso que esté controlando la velocidad de la reacción de electrodo. En la Figura 2.5 se muestran distintos tipos de transitorios posibles.



**Figura 2.5:** Corriente vs. Tiempo para experimentos de salto de potencial. a) control difusional, b) control cinético, c) control mixto.

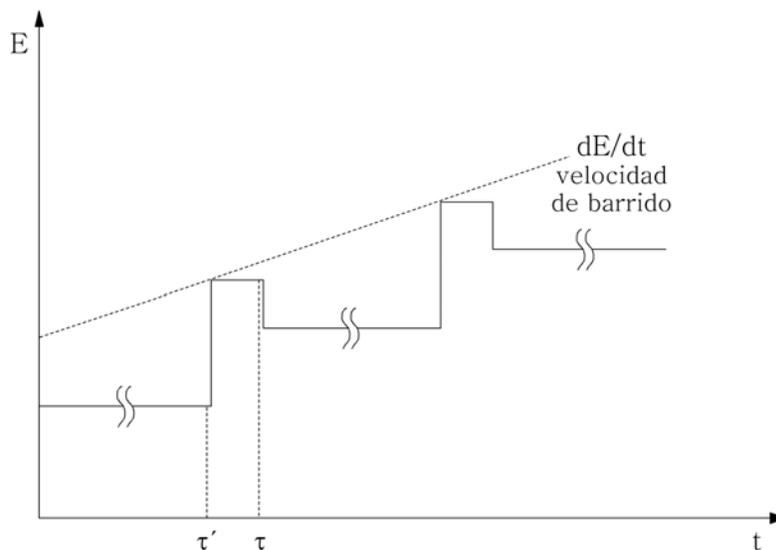
Cuando la reacción está controlada por difusión, se tiene una respuesta corriente-tiempo según la curva *a*. Cuando la reacción está controlada cinéticamente la respuesta de corriente es del tipo representado en la curva *b*, esto ocurre cuando la constante de la velocidad de la reacción es pequeña (o cuando el valor de  $E_2$  impone un sobrepotencial muy bajo para la reacción), entonces la concentración de la especie *O* no cambia de manera significativa ya que el potencial aplicado no es muy grande y por lo tanto la difusión no juega un rol muy importante para determinar la velocidad de la reacción. En una situación intermedia entre los casos *a* y *b* tenemos el transitorio correspondiente a la curva *c* en la cual la velocidad de transferencia de carga y la velocidad de difusión son comparables y la corriente cae en el tiempo, pero de una manera más suave, se dice que el sistema se encuentra bajo control mixto.

#### 2.1.1.6 Voltametría diferencial de pulso [72]

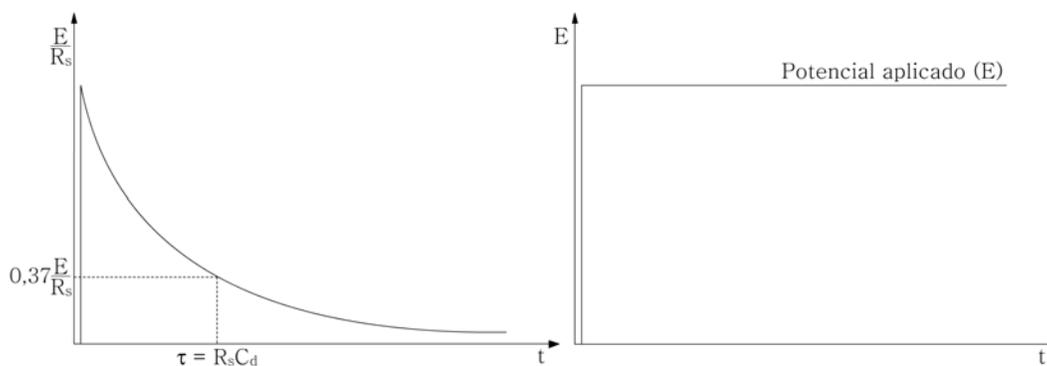
En la voltametría diferencial de pulso (DPV) el barrido de potencial no se realiza de forma lineal como se ha descrito para la voltametría cíclica, sino que se aplica un perfil caracterizado por pulsos de potencial de baja amplitud como lo muestra la Figura 2.6.

En esta técnica se toman dos medidas de corriente por cada pulso de potencial aplicado. Uno a tiempo  $\tau'$ , inmediatamente antes del pulso, y el segundo a tiempo  $\tau$ , justo antes de la finalización del pulso. En esta última medición, la corriente capacitiva, correspondiente a la carga de la doble capa, ya habrá caído esencialmente a cero (Figura 2.7), haciendo que la corriente medida sea netamente faradaica. De esta forma, la técnica gana sensibilidad respecto de las técnicas no pulsadas. El registro del experimento

corresponde a un gráfico de la diferencia de corriente,  $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$ , versus el potencial base,  $E$ .



**Figura 2.6:** Programa de potencial en un experimento de voltametría diferencial de pulso.



**Figura 2.7:** Decaimiento de la corriente de carga de la doble capa tras la aplicación de un pulso de potencial.

La forma de la función respuesta y la altura del pico pueden tratarse cuantitativamente. Desde  $t = 0$  hasta la aplicación del pulso de potencial a  $t = \tau'$ , el potencial corresponde al potencial base  $E$ . A mayores tiempos, el potencial es  $E + \Delta E$ , donde  $\Delta E$  corresponde a la altura del pulso. El período de preelectrólisis  $\tau'$  típicamente es entre 20 y 100 veces mayor que la duración del pulso  $\tau - \tau'$ . De esta forma, la preelectrólisis establece una capa difusional gruesa, y el pulso solo es capaz de modificar una pequeña parte de este. De hecho, el experimento puede aproximarse asumiendo que el pulso no

distingue el perfil de concentración al inicio de aquel correspondiente a la concentración del seno de la solución. En consecuencia, el rol de la preelectrólisis es establecer la condición de “concentración aparente del seno de la solución” en la cercanía del electrodo.

Considerando el proceso ( $O \rightarrow R$ ) un sistema nernstiano, donde  $R$  inicialmente no existe, las concentraciones superficiales durante la preelectrólisis, a un potencial  $E$ , están dadas por:

$$C_O(0,t) = C_O^* \left[ \frac{\varepsilon\theta}{1 + \varepsilon\theta} \right] \quad C_R(0,t) = C_O^* \left[ \frac{\varepsilon}{1 + \varepsilon\theta} \right] \quad (2.6)$$

donde  $\theta = \exp[nF/RT(E - E^0)]$ . Se consideran a estos valores como las concentraciones aparentes en el seno de la solución  $(C_O^*)_{ap}$  y  $(C_R^*)_{ap}$  para el pulso. Dado que el sistema es nernstiano, y  $(C_O^*)_{ap}$  y  $(C_R^*)_{ap}$  están en equilibrio con  $E$ , puede hallarse la corriente faradaica luego de un pulso desde el equilibrio a  $E + \Delta E$  en un medio homogéneo de concentraciones  $(C_O^*)_{ap}$  y  $(C_R^*)_{ap}$ .

Mediante un tratamiento similar al aplicado en la obtención de la ecuación 2.5 puede hallarse la siguiente expresión para la corriente:

$$i = \frac{nFAD_O^{1/2}C_O^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \left[ \frac{P_A(1 - \sigma^2)}{(\sigma + P_A)(1 + P_A\sigma)} \right] \quad (2.7)$$

donde:

$$P_A = \xi \exp \left[ \frac{nF}{RT} \left( E + \frac{\Delta E}{2} - E^0 \right) \right] \quad (2.8)$$

$$\sigma = \exp \left[ \frac{nF}{RT} \frac{\Delta E}{2} \right] \quad (2.9)$$

a partir de esta expresión, el diferencial de corriente faradaica  $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$  queda determinado por:

$$\delta i = \frac{nFAD_O^{1/2}C_O^*}{\pi^{1/2}(\tau - \tau')^{1/2}} \left[ \frac{P_A(1 - \sigma^2)}{(\sigma + P_A)(1 + P_A\sigma)} \right] \quad (2.10)$$

El factor entre barras describe  $\delta i$  como una función del potencial. Cuando  $E$  es mucho más positivo que  $E^0$ ,  $P_A$  es grande y  $\delta i$  es prácticamente cero. Cuando  $E$  es mucho más negativo que  $E^0$ ,  $P_A$  se aproxima a cero, y así lo hace  $\delta i$ . De la derivada  $d(\delta i)/dP_A$  puede

demostrarse que  $\delta i$  se maximiza para  $P_A = 1$ , lo que implica que:

$$E_{m\acute{a}x} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{D_R}{D_O} \right]^{1/2} - \frac{\Delta E}{2} = E^{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (2.11)$$

La altura de pico está dada por:

$$(\delta i)_{m\acute{a}x} = \frac{nFAD_o^{1/2}C_o^*}{\pi^{1/2}(\tau - \tau')^{1/2}} \left[ \frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right] \quad (2.12)$$

donde el cociente  $(1-\sigma)/(1+\sigma)$  disminuye monotonaemente con la disminución de  $|\Delta E|$  y alcanza el valor cero para  $\Delta E = 0$ . Cuando  $\Delta E$  es negativo  $\delta i$  es positivo (o catódico), y viceversa.

### 2.1.1.7 Instrumentación

Las técnicas electroquímicas se llevaron a cabo utilizando distinta instrumentación de acuerdo a los requerimientos de cada procedimiento y a los sistemas en cuestión. Se utilizaron dos equipos comerciales, un potenciostato  $\mu$ AUTOLAB type III, y potenciostato TEQ 02.

### 2.1.2 Microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo

La Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés: *Quartz Crystal Microbalance*) permite detectar la masa adsorbida sobre una superficie. Este método está basado en el efecto piezoeléctrico que presentan algunos materiales y que involucra la deformación de los mismos al aplicarles una diferencia de potencial.[73] En QCM se emplea un cristal delgado de cuarzo con un electrodo metálico en cada uno de sus caras (Figura 2.8 A). Las propiedades piezoeléctricas del cuarzo son la base de su empleo como sensor gravimétrico, ya que la aplicación de una tensión eléctrica oscilante sobre un cristal de este material produce una deformación periódica en su estructura cristalina. Como cualquier otro oscilador, los cristales de cuarzo presentan una frecuencia de oscilación característica, es decir una frecuencia de resonancia. Al depositar cualquier material sobre la superficie de un cristal de cuarzo, esta frecuencia de resonancia varía, y la magnitud de esta

variación es la señal que se utiliza para detectar cambios de masa. En el caso de una película acoplada rígidamente, existe una relación lineal entre su masa y la frecuencia de resonancia del cristal.[74]

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{\sqrt{\mu_q \rho_q} A} \quad (2.13)$$

donde  $\Delta f$  es el cambio de frecuencia medido,  $f_0$  la frecuencia resonante fundamental del cristal de cuarzo,  $\Delta m$  la masa de la película,  $A$  el área activa piezoeléctrica,  $\rho_q$  la densidad de cuarzo ( $2.648 \text{ g cm}^{-3}$ ) y  $\mu_q$  el módulo de corte del cuarzo de corte AT ( $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$ ). Esta ecuación (ecuación 2.13), conocida como ecuación de Sauerbrey, relaciona los cambios en la frecuencia resonante  $\Delta f$  con los cambios de masa adsorbida  $\Delta m$ , por unidad de área  $A$ , y vale si  $\Delta f \ll f_0$  y si la capa está acoplada rígidamente al cristal, es decir si la onda acústica se propaga a igual velocidad en ambos medios.[73] En caso de no cumplirse la última condición, es necesario considerar el espesor y las propiedades viscoelásticas de la película.

Las propiedades eléctricas de un cristal de cuarzo sin carga pueden modelarse mediante un circuito equivalente conocido como circuito de Butterworth-Van Dyke (BVD),[73] representado en la Figura 2.8(B). Este circuito equivalente está formado por dos ramas, una variable,  $RLC$ , en paralelo con una rama estática formada por una capacidad  $C_0$ . Se puede trazar una equivalencia entre este modelo eléctrico y el mecánico. Los componentes de este circuito están asociados con propiedades mecánicas de la película: la inductancia  $L$  está asociada con la masa del oscilador, la capacidad  $C$  con la respuesta elástica, y la resistencia  $R$  con las pérdidas por fricción. La capacidad  $C_0$  depende de la capacidad eléctrica del capacitor de placas paralelas formadas por los electrodos en ambas caras del cristal, de la capacitancia parásita de pérdida debida a los conectores y de la capacidad de la doble capa cuando uno de los electrodos se halla en contacto con el metal. Al analizar la adsorción de un analito, el análisis de impedancia electroacústico permite descomponer la variación de la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo en dos componentes:  $\Delta R$  y  $\Delta X_L$  ( $X_L = 2\pi/L$ ).[75] Considerando que la película adsorbida se comporta de manera rígida podemos emplear la ecuación 2.13 para obtener la masa.

En este trabajo de tesis se realizaron además experimentos de microbalanza de cristal de cuarzo con control electroquímico (EQCM) que permiten determinar la masa de

la película al ser sometida a una perturbación electroquímica.[73] Para ello, se emplea una celda que expone a la solución una de las caras del cristal. El contacto metálico en esa cara actúa como electrodo de trabajo.

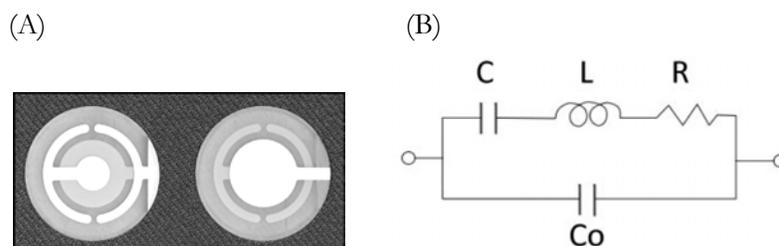


Figura 2.8: (A) cristal de cuarzo, (B) circuito de Butterworth-Van Dyke (BVD)

### 2.1.2.1 Instrumentación

El sistema empleado consistió en una balanza de 5 MHz, modelo QCM200 (*Stanford Research Systems*). Este equipo se basa en aplicar un voltaje sinusoidal generado por un oscilador de control de tensión. Se miden los voltajes de entrada y salida en función de la frecuencia y el cociente entre ambos (función de transferencia) se ajusta mediante una regresión no lineal para obtener los componentes del circuito de BVD. La adquisición y análisis de los datos se realizó empleando un *software* con que es provisto el instrumento.

Se emplearon cristales de cuarzo de corte AT, de 5 MHz de frecuencia de resonancia y 25.4 mm de diámetro (*Stanford Research Systems*). El área geométrica del electrodo de trabajo es de 1.33 cm<sup>2</sup>. Los experimentos fueron realizados en una celda de Teflón®, que expone una cara del cristal a la solución. La otra cara del cristal se expone al aire. Los cambios de masa se calculan utilizando la ecuación 2.13

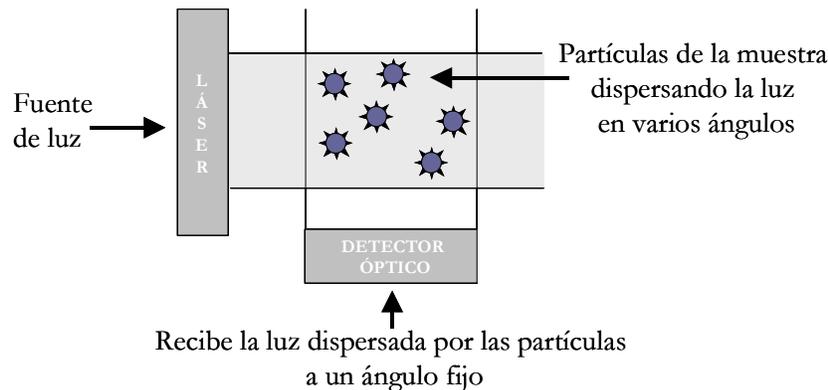
### 2.1.3 Dispersión dinámica de luz láser [76-78]

La técnica de dispersión dinámica de luz láser (*DLS*, por sus siglas en inglés: *Dynamic Light Scattering*) es una técnica que puede ser utilizada para determinar el perfil de distribución del tamaño de pequeñas partículas en suspensión o polímeros en solución. También puede usarse para estudiar el comportamiento de los fluidos complejos, tales como soluciones concentradas de polímero, y las interacciones entre partículas en solución.

Debido a la dependencia del tamaño de partícula con la intensidad de dispersión de

luz, la agregación de partículas o la asociación de diferentes biopolímeros se pueden monitorear fácilmente por medio de instrumentos de dispersión de luz. La intensidad de dispersión de luz de una molécula es proporcional al cuadrado del peso molecular, por lo tanto, esta técnica es muy sensible a la aparición de formas asociadas o agregadas de las partículas; por la misma razón esta técnica es muy sensible también a las impurezas, aún a bajas concentraciones, por ello la preparación de la muestra por filtración o centrifugación es fundamental para eliminar el polvo y otros interferentes de la solución. *DLS* también permite determinar las poblaciones existentes en una muestra con múltiples tamaños de partículas.

En la Figura 2.9 se muestra un esquema del mecanismo del equipo de *DLS*. La fuente de luz láser incide sobre las partículas de la muestra que dispersan la luz en diferentes direcciones y esta luz dispersada es registrada por un detector óptico. La intensidad de dispersión fluctúa de acuerdo al movimiento Browniano, el movimiento aleatorio de las partículas en el solvente.



**Figura 2.9:** Representación esquemática del equipo de dispersión dinámica de luz.

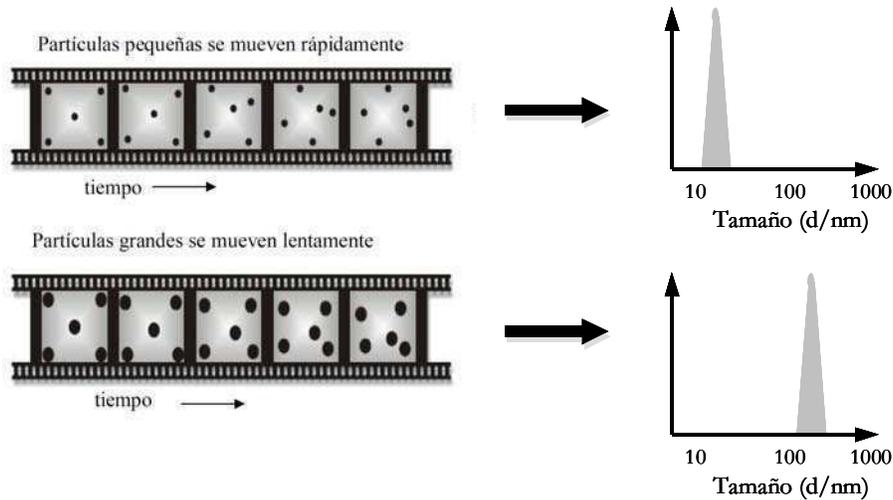
El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite estimar el coeficiente de difusión translacional ( $D$ ) de la partícula que se relaciona con el tamaño de la misma mediante la ecuación de Stokes–Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d} \quad (2.14)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión translacional ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ );  $k_B$  es la constante de Boltzmann ( $1.38 \times 10^{-23} \text{ N m K}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura absoluta (K), y  $\eta$  la viscosidad del líquido ( $\text{N s m}^{-2}$ )

en el que se mueve la partícula y  $d$  es el diámetro hidrodinámico (m).

Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes se mueven más lentamente. A partir de dicha relación se obtienen los gráficos de distribución de tamaño de partícula como se muestra en la Figura 2.10.



**Figura 2.10:** Representación esquemática de las distribuciones a las que dan origen partículas de diferentes tamaños.

Cuando la luz choca con las partículas, si estas son pequeñas comparadas con la longitud de onda (por debajo de 250 nm), la luz se dispersa en todas direcciones (dispersión de Rayleigh). Si la fuente de luz es un láser, y por lo tanto es monocromático y coherente, entonces se observa una fluctuación en función del tiempo en la intensidad de dispersión. Estas fluctuaciones se deben al hecho de que las pequeñas moléculas en solución están experimentando el movimiento browniano y por lo tanto la distancia entre los elementos dispersores de la solución está en constante cambio con el tiempo. Esta luz dispersada luego se somete a la interferencia constructiva o destructiva de las partículas de los alrededores y esta fluctuación de la intensidad proporciona información sobre la escala de tiempo del movimiento de los dispersores a partir de los cuales se puede obtener información sobre su tamaño.

### 2.1.3.1 Instrumentación

Las medidas de *DLS* se llevaron a cabo en un equipo analizador de tamaño de partícula Brookhaven modelo 90plus, con un láser de 28 mW (657 nm). Las medidas se

realizaron en un ángulo de dispersión fijo de 90°. Se utilizaron celdas de poliestireno descartables.

#### **2.1.4 Perfilometría**

Esta técnica permite determinar espesores de capas delgadas, variaciones en el espesor y cualquier otra característica o detalle topográfico de interés en una superficie. Además el perfilómetro es capaz de determinar y calcular la rugosidad, parámetro que se emplea para determinar el acabado de una superficie dada. El perfilómetro consta de un cabezal que posee una punta móvil de diamante que se pone en contacto con la muestra. El cabezal baja lentamente la punta hasta alcanzar la superficie de la muestra y el portamuestras motorizado se desplaza lentamente de manera de permitir que la punta recorra la superficie de interés, aplicando sobre ella una fuerza constante (la longitud de barrido y la magnitud de la fuerza pueden variarse en función de las características de la muestra). El movimiento vertical de la punta (las variaciones de altura) se convierte en señales eléctricas que se registran o grafican.

Un parámetro importante en estos equipos es la forma y tamaño de la punta, ya que esta influye de manera importante en la resolución lateral de las mediciones. Aunque la resolución vertical es generalmente menor que el radio de las puntas, no pueden detectarse con alta precisión valores de rugosidad menores a dicho radio. Típicamente un perfilómetro permite longitudes de muestreo de hasta algunos centímetros con resolución micrométrica.

##### **2.1.4.1 Instrumentación**

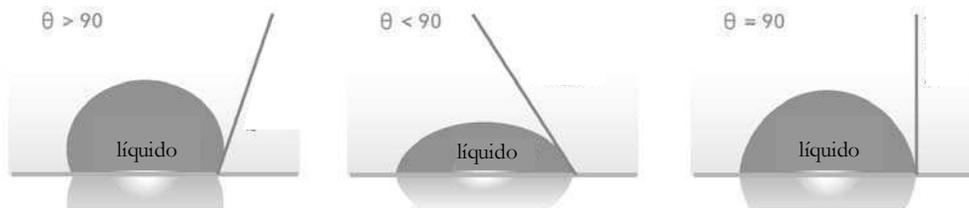
Se empleó un equipo Dektak 150 Stylus Surface Profiler. Las medidas se realizaron utilizando una punta de 12.5  $\mu\text{m}$ . La fuerza ejercida sobre la punta se puede ajustar entre 3 y 10 mg, la fuerza utilizada fue de 3 mg a menos que se indique lo contrario.

#### **2.1.5. Ángulo de contacto**

El ángulo de contacto o ángulo de humectancia se refiere al ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido. Es una medida cuantitativa de la humectación de un sólido por un líquido y define la afinidad entre ambos. El ángulo de

contacto se define geoméricamente dibujando la tangente al punto en el que coexisten las tres fases (líquido, sólido, aire) (Figura 2.11).

El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido. Cuando las fuerzas adhesivas con la superficie del sólido son muy grandes en relación a las fuerzas cohesivas, el ángulo de contacto es menor de 90 grados sexagesimales, teniendo como resultado que el líquido moja la superficie, ya que si el líquido es atraído fuertemente por la superficie sólida (por ejemplo agua sobre un sólido hidrofílico) la gota se extenderá completamente por el sólido y el ángulo de contacto será aproximadamente  $0^\circ$ . Para los sólidos que sean menos hidrófilos el ángulo de contacto puede variar entre  $0^\circ$  y  $30^\circ$ . Si la superficie del sólido es hidrofóbica el ángulo de contacto será mayor que  $90^\circ$ . En superficies muy hidrofobas el ángulo puede ser mayor a  $150^\circ$  e incluso cercano a  $180^\circ$ . En estos casos el agua reposa sobre la superficie pero no la moja ni tampoco se extiende sobre ella.



**Figura 2.11:** Ángulos de contacto para distintos tipos de sólidos.

En este trabajo los resultados obtenidos mediante esta técnica se utilizan como una guía cuantitativa del carácter hidrofílico o hidrofóbico que adquiere la superficie modificada. Una descripción más completa de esta técnica puede encontrarse en la referencia [79].

### 2.1.5.1 Instrumentación

Los experimentos de ángulo de contacto se llevaron a cabo en un equipo KSV Cam200. El líquido de ensayo utilizado fue agua destilada. Como muestras se utilizaron los electrodos modificados.

### 2.1.6 Reflectometría de rayos X (XRR) y dispersión de rayos X en configuración rasante (GISAXS)

La reflectometría de rayos X (*X-ray reflectivity*, XRR) permite determinar el espesor de una capa, su rugosidad y su densidad, mientras que la dispersión de rayos X de incidencia rasante (*Grazing Incidence Small Angle X-ray Scattering*, GISAXS) permite determinar el tamaño, la forma, la distribución, la orientación y la correlación de nanopartículas en sólidos y soluciones.

#### 2.1.6.1 Instrumentación

Las medidas de XRR y GISAXS fueron llevadas a cabo por el Dr. Azzaroni, en la línea de D10A-XRD2 del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil). Para realizar los experimentos se utilizó un haz monocromático de 7709 eV ( $\lambda = 1.608 \text{ \AA}$ ). Como sustrato de apoyo se utilizaron obleas de Si(100); las mismas fueron lavadas con acetona y secadas con argón, y luego se realizó el depósito de películas delgadas de material compuesto (se detalla en cada capítulo) mediante la técnica de recubrimiento por rotación (*spin-coating*), con un equipo comercial (Laurell WS-400B).

### 2.1.7 Microscopía SEM

La utilidad de la microscopía óptica en nanotecnología está severamente limitada por su resolución dada por el límite de difracción de la luz.[80] La microscopía electrónica no presenta este problema porque la longitud de onda de los electrones (del orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  nm) es mucho menor que la luz visible o ultravioleta. Los microscopios electrónicos pueden resolver detalles del orden de nanómetros o incluso Ångströms.

Existen básicamente dos tipos de microscopios electrónicos: el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) y el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). En ambas técnicas se incide sobre la muestra con electrones, pero mientras que en el TEM se observan los electrones que atraviesan la muestra, en el SEM se detectan los electrones reflejados. Estos últimos se clasifican en electrones retrodispersados elásticamente y electrones secundarios. Los electrones secundarios se forman por la interacción del haz primario con la muestra y poseen energías mucho menores que éste ( $< 50 \text{ eV}$ ).[81] A diferencia del TEM, donde todos los electrones atraviesan la muestra en paralelo, en el

SEM se barre la muestra con un haz de electrones y se detectan aquellos reflejados en cada punto. La intensidad medida en cada punto se emplea para reconstruir una imagen de la muestra.

Los microscopios SEM cuentan con una fuente o cañón que emite los electrones, un cátodo que los acelera, un sistema de lentes electromagnéticas que enfoca el haz de electrones sobre la muestra y uno o más detectores que recogen los electrones reflejados por la misma. Todos estos componentes y la muestra deben ubicarse en un sistema de alto vacío ( $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  Pa). Existen dos tipos de cañones de electrones, los termoiónicos y los de emisión de campo, que emplean respectivamente un filamento de tungsteno calentado a 2700 K o campos eléctricos muy elevados ( $> 10^9$  V/m) para producir los electrones que forman el haz. Los cañones de emisión de campo producen corrientes mayores, más estables y haces más monocromáticos que los termoiónicos y por lo tanto presentan mejor resolución, llegando en la actualidad a 0.5 nm.[81]

Para evitar que la muestra se cargue electrostáticamente al irradiarla con el haz de electrones, esta debe ser conductora o debe ser recubierta con una fina capa metálica (debe metalizarse).

### **2.1.7.1 Instrumentación**

Las imágenes SEM fueron adquiridas con un microscopio Zeiss DSM 982 GEMINI (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) perteneciente al Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la FCEN-UBA. Este microscopio emplea un cañón de emisión de campo (FEG) y un detector de electrones secundarios (SE). Las muestras empleadas en el Capítulo 4 (electrodos de grafito) se colocaron sobre cinta bifaz de carbono para su observación. Se empleó un voltaje de aceleración de 10 kV para favorecer el contraste de los NTCs sobre el grafito.

### **2.1.8 Modelo numérico [82-84]**

El método de los elementos finitos (MEF) es un método general para la aproximación de soluciones de ecuaciones diferenciales parciales asociadas a un problema físico sobre geometrías complicadas. El MEF puede ser usado en la simulación de sistemas físicos y biológicos complejos.

El método se basa en dividir el cuerpo, estructura o dominio (medio continuo), sobre

el que están definidas ciertas ecuaciones integrales que caracterizan el comportamiento físico del problema, en una serie de subdominios no intersectantes entre sí, denominados “elementos finitos”. El conjunto de elementos finitos forma una partición del dominio también denominada discretización. Dentro de cada elemento se distinguen una serie de puntos representativos llamados “nodos”. Dos nodos son adyacentes si pertenecen al mismo elemento finito; además, un nodo sobre la frontera de un elemento finito puede pertenecer a varios elementos. El conjunto de nodos considerando sus relaciones de adyacencia se denomina “malla”.

Los cálculos se realizan sobre una malla o discretización creada a partir del dominio con programas especiales llamados generadores de mallas, en una etapa previa a los cálculos, que se denomina pre-proceso. De acuerdo con estas relaciones de adyacencia o conectividad se relaciona el valor de un conjunto de variables incógnitas definidas en cada nodo y denominadas grados de libertad. El conjunto de relaciones entre el valor de una determinada variable entre los nodos se puede escribir en forma de sistema de ecuaciones lineales (o linealizadas). La matriz de dicho sistema de ecuaciones se llama matriz de rigidez del sistema. El número de ecuaciones de dicho sistema es proporcional al número de nodos.

Típicamente el método de los elementos finitos se programa computacionalmente para calcular el campo de desplazamientos y, posteriormente, a través de relaciones cinéticas y constitutivas, las deformaciones y tensiones respectivamente, cuando se trata de un problema de mecánica de sólidos deformables o más generalmente un problema de mecánica de medios continuos. El método de los elementos finitos es muy usado debido a su generalidad y a la facilidad de introducir dominios de cálculo complejos (en dos o tres dimensiones).

Una importante propiedad del método es la convergencia; si se consideran particiones de elementos finitos sucesivamente más finas, la solución numérica calculada converge rápidamente hacia la solución exacta del sistema de ecuaciones.

Desde el punto de vista de la programación algorítmica modular las tareas necesarias para llevar a cabo un cálculo mediante un programa MEF se dividen en:

- Preproceso: que consiste en la definición de geometría, generación de la malla, las condiciones de contorno y asignación de propiedades a los materiales y otras condiciones. En ocasiones existen operaciones cosméticas de regularización de la malla y preconditionamiento para garantizar una mejor aproximación o una mejor convergencia del cálculo.

- Cálculo: el resultado del preproceso, en un problema simple no-dependiente del tiempo, permite generar un conjunto de  $n$  ecuaciones y  $n$  incógnitas, que puede ser resuelto con cualquier algoritmo para la resolución de sistemas de ecuaciones lineales. Cuando el problema a tratar es un problema no-lineal o un problema dependiente del tiempo a veces el cálculo consiste en una sucesión finita de sistemas de  $n$  ecuaciones y  $n$  incógnitas que deben resolverse uno a continuación de otro, y cuya entrada depende del resultado del paso anterior.

- Postproceso, el cálculo proporciona valores de cierto conjunto de funciones en los nodos de la malla que define la discretización, en el postproceso se calculan magnitudes derivadas de los valores obtenidos para los nodos, y en ocasiones se aplican operaciones de suavizado, interpolación e incluso determinación de errores de aproximación.

### **2.1.8.1 Instrumentación**

Se utilizó un software comercial para el método de elementos finitos (COMSOL Multiphysics 3.4) para simular los experimentos de voltametría cíclica y los perfiles de concentración. El software fue ejecutado en una PC Intel Corel Duo, 4 GB de RAM, con sistema operativo Windows XP; resolución del modelo con 10600 grados de libertad y ca. 3000 nodos, la malla se refinó cerca del electrodo. Los experimentos de simulación numérica fueron realizados por la Dra. Graciela González.

## **2.2 Materiales**

### **2.2.1 Soluciones y Reactivos**

Todas las soluciones fueron preparadas empleando agua de calidad Milli-Q<sup>®</sup> (sistema Millipore). Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica y se utilizaron como fueron recibidos, sin pasos extra de purificación, salvo que se especifique lo contrario.

Los experimentos que involucran a la enzima glucosa oxidasa (GOx) fueron llevados a cabo utilizando dos lotes diferentes de GOx, extraída de *Aspergillus Níger*. En el Capítulo 3 se utilizó un lote provisto por Biozyme, mientras que en el Capítulo 5 se utilizó un lote provisto por Calzyme. En ambos casos  $PM = 186$  KDa. Un punto importante a

tener en cuenta respecto a GOx es que su actividad enzimática varía con el tiempo, y por otro lado, distintos lotes de enzima poseen distinta actividad. Se determinó la actividad enzimática en cada caso, obteniéndose valores comparables. Por otro lado, siempre que se realizaron ensayos en los que se midió catálisis enzimática, los electrodos fueron medidos inmediatamente luego de su modificación.

### 2.2.1.1 Mediadores redox

En este trabajo de tesis se utilizaron dos mediadores redox, ambos sintetizados en nuestro laboratorio:

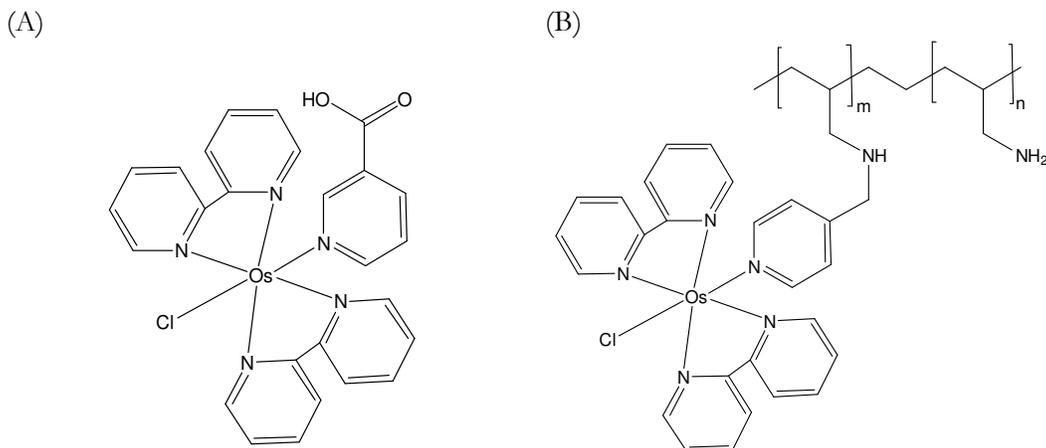
#### 2.2.1.1.1 Síntesis del mediador redox soluble

El mediador redox soluble  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$  (donde bpy = bipyridina y pyCOOH = ácido nicotínico) fue sintetizado en nuestro laboratorio siguiendo los procedimientos sugeridos en la referencia [85], pero utilizando  $[\text{PF}_6]^-$  como ión precipitante. En la Figura 2.12(A) se muestra la estructura del complejo.

#### 2.2.1.1.2 Síntesis del polímero redox Os-PA

El polímero redox (Os-PA) fue sintetizado según se describe en la literatura.[86] Brevemente, se sintetiza por unión del complejo  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOH}]^+$  (donde pyCOH = piridina-4-aldehído) a los grupos amino de la poli(alilamina) mediante la formación de una imina y posterior reducción. El complejo de osmio anclado al polímero tiene la suficiente movilidad como para mediar la oxidación de GOx.[87] Como resultado, Os-PA actúa como un mediador redox. Tal como se muestran en la figura, en ambos compuestos el Os se encuentra en estado de oxidación +2. Este centro de Os, puede oxidarse a estado +3.

Respecto a este procedimiento de síntesis, es importante destacar que el grado de sustitución del polímero (relación de complejos de osmio a grupos alilamina, relación m:n, ver Figura 2.12 B) puede variar de una síntesis a otra. Durante este trabajo de tesis se trabajó con dos lotes de polímero distintos. El primero se utilizó únicamente para los experimentos presentados en el Capítulo 3, mientras que el segundo lote se utilizó para los capítulos 5 y 6. El grado de sustitución en cada caso fue evaluado mediante  $^1\text{H}$  RMN, y se detalla en el capítulo correspondiente.



**Figura 2.12:** (A) Estructura del mediador redox soluble  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$ ; (B) Estructura de Os-PA.

## 2.2.2 Electroodos

### 2.2.2.1 Contraelectrodo y Electrodo de Referencia

El contraelectrodo utilizado en todos los casos consistió en una malla de Pt, unida a un alambre del mismo material como conexión eléctrica.

Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de Ag/AgCl. Este consiste en un alambre de Ag, recubierto con AgCl, inmerso en una solución 3M de KCl saturada en AgCl dentro de un tubo delgado de vidrio separado de la solución de la celda por un cerámico poroso. Todos los potenciales utilizados en esta tesis se hallan referidos a esta referencia.

### 2.2.2.2 Electroodos de Trabajo

A lo largo de esta tesis se utilizaron distintos tipos de electrodos de trabajo, de acuerdo a los requerimientos de cada procedimiento y a los sistemas en cuestión.

#### 2.2.2.2.1 Electroodos de grafito

Se utilizaron electrodos de grafito de dos tamaños. Éstos electrodos fueron contruidos mediante serigrafía (*screen-printing*) como fuera previamente detallado.[88] Brevemente, sobre placas de *mylar* de 350  $\mu\text{m}$  de espesor, se realizó una primer impresión

con pintura de plata (Ercon Inc. Cat. N° E1660-136) a fin de mejorar la conductividad de las pistas, y luego se realizó un cubrimiento con pintura de grafito (Ercon Inc. Cat. N° E3456). Posteriormente los electrodos fueron pulidos, utilizando una pulidora metalográfica PRAXIS PUL-01, sobre paños embebidos en soluciones de alúmina 0.3 y 0.05  $\mu\text{m}$  en agua y finalmente fueron recubiertos con pintura aislante, dejando expuesta un área de 0.38  $\text{cm}^2$  (en el caso de los electrodos mas grandes) y 0.07  $\text{cm}^2$  (en el caso de los electrodos mas pequeños). Estos electrodos son descartables.

#### **2.2.2.2.2 Electrodo de oro macizo**

Se utilizaron láminas planas de oro de 0.5 cm de ancho x 1 cm de largo (1  $\text{cm}^2$  de área geométrica) y 0.5 mm de espesor. A los mismos se soldó un alambre de oro de aproximadamente 5 cm de largo para realizar la conexión eléctrica. Estos electrodos son reutilizables.

#### **2.2.2.2.3 Electrodo de oro evaporado**

Se utilizaron láminas planas de silicio recubiertas con oro, preparadas por evaporación de Au sobre obleas de Si. Las obleas fueron tratadas en un equipo de limpieza Soxhlet con acetona durante un día; luego fueron sumergidas en HF 10% para quitar todo resto de  $\text{SiO}_2$ , fueron enjuagadas con agua, isopropanol y finalmente secadas con  $\text{N}_2$ . Luego fueron introducidas en una evaporadora BOC Edwards Auto 306 donde se depositaron en forma sucesiva Ti (15 nm), Pd (20 nm) y Au (200 nm). El espesor de metal es controlado por una microbalanza de cristal de cuarzo acoplada a la evaporadora. Estos electrodos fueron utilizados una única vez.

#### **2.2.2.3 Limpieza de electrodos**

El contraelectrodo y el electrodo de referencia se enjuagan exhaustivamente con agua calidad Milli-Q<sup>®</sup> luego de cada experiencia. Ocasionalmente, se aplicó al contraelectrodo el mismo tratamiento de limpieza que a los electrodos de Au macizo.

Previamente a su utilización, los electrodos de grafito fueron pulidos utilizando soluciones de alúmina de 0.3 y 0.05  $\mu\text{m}$ . Luego de cada paso de pulido, los electrodos

fueron sonicados durante 1 minuto. Finalmente se enjuagaron con agua Milli-Q y se sometieron a voltametría cíclica en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, 0.2 M KNO<sub>3</sub>, a 10 mV s<sup>-1</sup> desde -200 a 800 mV versus Ag/AgCl, a fin de comprobar su limpieza.

Las láminas planas de oro previo a su utilización fueron sometidas a limpieza sumergiéndolas durante 3 horas en solución piraña (30% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98 % p/v 1:3). **Esta solución es extremadamente corrosiva y reacciona violentamente con material orgánico, por lo que deben tomarse precauciones en su manipulación.** Luego se enjuagaron con agua Milli-Q y se comprobó su limpieza sometiéndolos a voltametría cíclica en solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8 M a 50 mV s<sup>-1</sup> desde 0 a 1600 mV versus Ag/AgCl. El área electroquímicamente activa fue calculada a partir de la carga obtenida por integración del pico de reducción del óxido de oro.[89-90] En caso de observar trazas de otras especies, se cicló el electrodo entre 1 y 10 V s<sup>-1</sup> por un mínimo de 50 ciclos y hasta observar la ausencia de contaminantes superficiales.

Luego de la modificación de estos electrodos, y dado que los mismos son reutilizables, se requiere un procedimiento más exhaustivo de limpieza. En este caso, los electrodos fueron tratados en solución saturada de permanganato de potasio en medio alcalino (KMnO<sub>4</sub> en 1M NaOH) a 60°C durante 5 horas, y luego 3 horas en solución piraña. Finalmente se enjuagaron con agua Milli-Q.

Las láminas planas de oro evaporado sobre Si se enjuagaron, previo a su uso, con etanol. Se comprobó la limpieza de los mismos sometiéndolos a voltametría cíclica en solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8 M a 50 mV s<sup>-1</sup> desde 0 a 1600 mV versus Ag/AgCl. El área electroquímicamente activa fue calculada a partir de la carga obtenida por integración del pico de reducción del óxido de oro.[89-90]

### 2.2.3 Celdas

A lo largo de este trabajo de tesis se utilizaron distintos tipos de celdas electroquímicas, de acuerdo al requerimiento de los electrodos utilizados en cada caso.

Para aquellos experimentos que involucraron electrodos de grafito como electrodos de trabajo, se utilizó una celda de acrílico de tres electrodos, provista con entrada y salida de gases, diseñada para exponer toda la superficie del electrodo a la solución.

Para los experimentos con láminas de oro macizo como electrodos de trabajo, se

utilizó una celda convencional de vidrio de tres electrodos. Esta celda expone ambas caras del electrodo (toda su área geométrica) a la solución.

Para los procedimientos que involucraron láminas planas de oro evaporado sobre silicio como electrodos de trabajo, se utilizó una celda de teflón de tres electrodos, provista con entrada y salida de gases, y diseñada para exponer  $0.196 \text{ cm}^2$  de la superficie del electrodo a la solución.



---

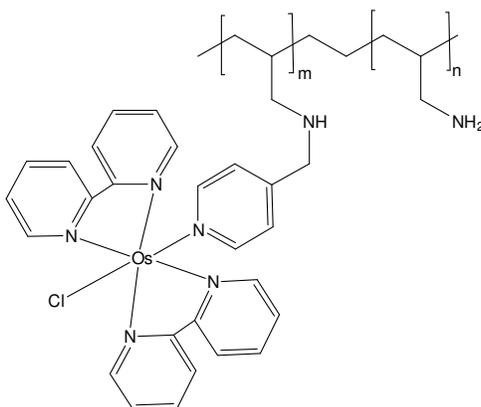
# Capítulo 3

## Autoensamblados



### 3.1 Introducción y Objetivos

Calvo y colaboradores han llevado a cabo un amplio trabajo dedicado al estudio del proceso de transferencia electrónica entre un polielectrolito redox, formado por un complejo de osmio unido a poli(alilamina) (Os-PA) (Figura 3.1) y enzimas redox en sistemas autoensamblados.[21, 87, 91-96] Estos sistemas presentan dependencia con el pH en el proceso de transferencia electrónica, con un pronunciado incremento en la corriente ensamblando el polielectrolito a pH 8 o mayor. Este efecto se explica teniendo en cuenta que la poli(alilamina) (PA) es un polielectrolito débil que pierde gran parte de su carga a pH 8 y, entonces, el sistema adopta un arreglo conformacional de ovillos (*loops*) y colas, permitiendo una mayor captación de Os-PA y de la enzima; por otra parte, a bajos pH se observa una severa disminución de corriente. Este resultado se correlaciona con un aumento en la densidad de carga de la Os-PA, dado que los grupos amino primarios están cada vez más protonados, por lo tanto el polielectrolito se extiende sobre la superficie.[95]



**Figura 3.1:** Estructura del polielectrolito redox Os-PA

Como ya se ha discutido en el primer capítulo de este trabajo los sistemas autoensamblados pueden construirse a partir de un polielectrolito y un surfactante como contraíón, sobre la base de la fuerte interacción electrostática de las especies, generando una superficie neutra con carácter hidrofóbico. Particularmente la introducción de un grupo redox activo en el polielectrolito o en el surfactante abre mayores oportunidades en el ámbito de la electrocatálisis y la química analítica, debido a la posibilidad de introducir elementos de reconocimiento en el sistema, como por ejemplo enzimas.

En este capítulo se estudiará la construcción de autoensamblados capa por capa de poli(alilamina) derivatizada con un complejo de osmio (Figura 3.1) con distintos surfactantes,

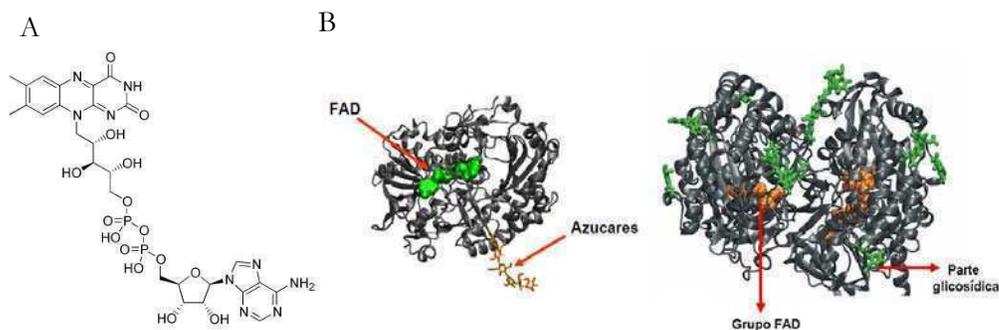
en especial dodecilsulfato, y glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4) como enzima modelo para el desarrollo de sensores. Las principales razones del empleo de esta enzima son, entre otras, su relevancia en el diagnóstico clínico, su alta especificidad, su alta estabilidad, particularmente a temperatura ambiente y en un amplio intervalo de pH, alta velocidad de reacción y alta solubilidad en agua. Los resultados obtenidos se compararán con construcciones similares en ausencia de surfactantes.

### 3.1.1 Características de la enzima glucosa oxidasa

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de reacciones biológicas. Se encuentran entre las más notables de las biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad para un determinado sustrato y a su poder catalítico. La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan además uno o más componentes no proteicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ión metálico o bien una molécula orgánica llamada coenzima; algunas enzimas necesitan de ambos. Las coenzimas actúan, por lo general, como transportadores intermediarios de grupos funcionales, de átomos específicos o de electrones, los que son transferidos en la reacción enzimática global. Cuando la coenzima se halla unida fuertemente a la molécula de la enzima recibe el nombre de grupo prostético.[97]

Un grupo muy importante de enzimas son las denominadas *enzimas redox*, u *óxido-reductasas*; éstas son enzimas que catalizan reacciones redox, donde una molécula se oxida o se reduce. Luego de la reacción, la enzima permanece con un exceso o defecto de electrones del que debe liberarse para reconvertirse a su estado inicial y poder reaccionar con otra molécula. Para este fin se necesita una segunda especie, conocida como mediador. El mediador también es una especie redox, que tomará o cederá electrones de la enzima para reconvertirla a su estado de oxidación original. Un ejemplo de enzima redox es la Glucosa oxidasa (GOx) y su grupo prostético es el flavín adenín dinucleótido (forma oxidada: FAD; forma reducida: FADH<sub>2</sub>).

La GOx es una proteína dimérica (Figura 3.2). El peso molecular reportado fluctúa entre 151 y 186 KDa. Contiene un grupo FAD por subunidad, fuertemente unido ( $K_a 10^{-10}$ ) como cofactor (dos sitios totales por enzima). El FAD no se encuentra covalentemente unido y puede perderse por desnaturalización parcial de la proteína. La enzima está glicosilada con un contenido de hidrocarburos de aproximadamente el 16%, de los cuales aproximadamente un 80% está constituido por manosa.[98]



**Figura 3.2:** A) estructura del grupo FAD; B) estructuras del monómero y del dímero de GOx.

Los dos monómeros son idénticos, y están unidos no covalentemente por 120 puntos de contacto. Cada monómero es un esferoide compacto, de dimensiones aproximadas 60 Å x 52 Å x 37 Å. Las dimensiones correspondientes al dímero son 70 Å x 55 Å x 80 Å, mostrando una geometría elipsoidal con un alto contenido de estructura secundaria (28%  $\alpha$  hélices, 15% hojas  $\beta$ ). La estructura terciaria está caracterizada por dos sistemas diferenciados de hojas  $\beta$ , uno de ellos forma parte del sistema que mantiene unido al FAD.[98]

La mínima distancia entre el FAD y la superficie de la enzima es de 13 Å. Las dos unidades de isoaloxazina (parte activa del FAD) están separadas por aproximadamente 40 Å, lo que impide la comunicación eléctrica entre las mismas. Además este grupo prostético se encuentra cerca del fondo de una cavidad profunda.[98]

GOx tiene un coeficiente de difusión de  $4.97 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  a 20 °C y un coeficiente de sedimentación de 8.0 S a pH 5.5. Su espectro de absorción posee máximos en 278, 382 y 452 nm, con relación de absorbancia 12.7:0.92:1.0. El coeficiente de extinción molar a 450 nm es de  $1.41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . [98] Su punto isoelectrónico es 4.2.

GOx cataliza únicamente la oxidación del anómero  $\beta$ -D-glucosa. En solución, la D-glucosa puede encontrarse en cualquiera de cinco formas: 2 anillos de 6 centros,  $\alpha$ -D-glucopiranososa, y  $\beta$ -D-glucopiranososa; 2 anillos de 5 centros,  $\alpha$ -D-glucofuranosa, y  $\beta$ -D-glucofuranosa y la forma abierta, D-glucosa aldehído. Una solución acuosa de D-glucosa alcanzará una composición estable de las distintas formas después de aproximadamente un día, dependiendo la temperatura. Las formas más abundantes son las piranosas, con abundancias aproximadas del 63% y 36% para las formas  $\beta$  y  $\alpha$  respectivamente. Las otras

tres formas en conjunto no superan el 1% del total.[98]

Los electrodos modificados con enzimas facilitan la detección electroquímica de sustancias que no se oxidan o reducen fácilmente sobre superficies de electrodos limpios. Los ensayos electroquímicos de este tipo de electrodos modificados combinan la especificidad de la reacción de reconocimiento con la sensibilidad de la detección electroquímica. La detección puede llevarse a cabo mediante el monitoreo del consumo de un cosustrato electroactivo de la enzima, como el oxígeno,[99-100] o la formación de un producto electroactivo, como el peróxido de hidrógeno.[100-102] La cupla  $O_2/H_2O_2$  puede ser considerada como el mediador natural para GOx. Sin embargo, está lejos de ser el mediador óptimo de la electro-oxidación de GOx, debido a la baja ( $\sim 0.2$  mM) solubilidad del  $O_2$  en soluciones fisiológicas a temperatura ambiente.[103] Por otro lado, la detección amperométrica de  $H_2O_2$  requiere potenciales bastante elevados, aproximadamente 850 mV (vs. Ag/AgCl), lo que puede resultar un problema cuando se trabaja con muestras biológicas (sangre, orina, etc), que pueden contener gran cantidad de sustancias interferentes, además del analito que se quiere determinar.

Por otra parte, en enzimas de gran tamaño como la GOx ( $186000$  g mol<sup>-1</sup>), la transferencia directa de electrones desde la superficie del electrodo hasta el grupo prostético, FADH<sub>2</sub>, inmerso dentro de la estructura de la proteína, se ve obstaculizada. En este caso, la transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo puede ser lograda mediante mediadores redox.[104-106]

### 3.1.2 Mediadores redox

Hemos mencionado que las enzimas son altamente específicas para sus sustratos. En contraste, las enzimas no son específicas para con un mediador, lo que permite que puedan utilizarse *in vitro* muchas otras especies redox alternativas en reemplazo del mediador natural.

Los *mediadores difusionales* o *mediadores redox solubles* son moléculas que pueden transportar y transferir a los electrones producidos o consumidos por la acción enzimática entre el electrodo y el sitio redox de la enzima. Se puede revelar, de esta manera, la actividad enzimática a través de la señal del mediador. Un gran número de sustancias pueden ser utilizadas como mediadores en la construcción de electrodos enzimáticos, entre ellos los más utilizados han sido los mediadores basados en complejos metálicos (Os, Fe, Ru) y las quinonas. Si se utiliza un mediador artificial, se puede operar el sistema a

potenciales inferiores, lograr solubilidades mucho más altas, se evitan las interferencias y los efectos deletéreos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. [107]

Se han propuesto también sensores amperométricos basados en el uso de *mediadores redox inmovilizados*, involucrando el uso de polímeros redox que comunican eficientemente a la enzima y propagan la carga hacia el electrodo. El término “*enzima cableada*” ha sido aplicado al caso donde el mediador redox es incorporado dentro de la estructura de entrecruzamiento de un polímero. El entrecruzamiento de polímero forma un hidrogel que atrapa y contiene a la enzima y además media la transferencia electrónica entre las enzimas y el electrodo. Es importante que las enzimas atrapadas permanezcan en su estado enzimáticamente activo, de otro modo, la selectividad y sensibilidad del sensor podría verse comprometida. [108]

## 3.2 Experimental

### 3.2.1 Reactivos

Dodecilsulfato de sodio (SDS) fue provisto por Kodak. Octadecilsulfato de sodio (ODS) y 3-mercapto-1-propanosulfonato (MPS), desoxicolato de sodio (NaDC), Tritón X-100 (TX100), Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), ácido N-hidroxietil piperazina-N<sup>2</sup>-2-etanosulfónico (HEPES) fueron provistos por Sigma Aldrich. Glucosa oxidasa (GOx, extraída de *Aspergillus niger*) fue provista por Biozyme. D(+)-Glucosa se obtuvo de Carlo Erba. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Las soluciones stock de glucosa se prepararon en concentración 0.55 M. En todos los casos, estas soluciones fueron preparadas al menos 24 horas antes de su uso y mantenidas entre 2 y 8 °C para permitir que se alcance el equilibrio entre los distintos anómeros.

### 3.2.2 Síntesis del polímero redox Os-PA

En este Capítulo se utilizó un lote de Os-PA sintetizado como se describe en el Capítulo 2, sección 2.2.1.1.2 de esta tesis. Como se indicara en dicha sección, el grado de sustitución del polímero (relación de complejos de osmio a grupos alilamina) puede variar de una síntesis a otra, motivo por el cual el polielectrolito redox obtenido fue caracterizado

por espectroscopía RMN  $^1\text{H}$  empleando un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz. Las señales presentes entre 6.75 y 8.75 ppm corresponden a los ligandos piridínicos del complejo de osmio, mientras que las señales en la región entre 0.75 y 3.25 ppm corresponden al esqueleto del polielectrolito. Por integración de las señales, promediando tres muestras de RMN  $^1\text{H}$ , pudo calcularse una relación de complejo de osmio:alilamina igual a 1:15 (1 complejo de osmio por cada 15 monómeros).

### 3.2.3 Construcción de los electrodos modificados

Se emplearon como electrodos de trabajo láminas planas de oro macizo de  $1\text{ cm}^2$  de área geométrica, construidos como fuera descrito en la sección 2.2.2.2.2. Las superficies de oro se trataron según el protocolo detallado en la sección 2.2.2.3 y se verificó su limpieza mediante voltametría cíclica en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.8 M.

Posteriormente los electrodos fueron lavados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ , antes de ser sometidos a modificación.

Los autoensamblados se llevaron a cabo sumergiendo el electrodo de oro, secuencialmente, en la solución correspondiente a cada paso de ensamblado. Luego de cada paso de inmersión, se realiza un paso de lavado del electrodo, enjuagando el mismo minuciosamente con agua Milli-Q.

#### 3.2.3.1 Adsorción de tiol (Au/MPS)

El primer paso de modificación de los electrodos consistió siempre en la adsorción de una monocapa de MPS. Para ello, los electrodos de oro limpios fueron sumergidos en una solución 20 mM de MPS en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 mM durante 30 minutos. Las soluciones de MPS fueron siempre preparadas al momento de su utilización, a fin de evitar la oxidación del tiol en aire.

#### 3.2.3.2 Adsorción de Os-PA (Au/MPS/Os-PA)

Los electrodos modificados con el tiol fueron inmediatamente sumergidos en una solución de Os-PA 0.06 mM en buffer Tris 50 mM (pH 7.0 o pH 8.0, según se indica en cada caso), durante 10 minutos.

### 3.2.3.3 Adsorción de SDS y otros surfactantes (Au/MPS/Os-PA/Surf)

Los electrodos modificados con el polímero de osmio fueron sumergidos en una solución acuosa de SDS 1% durante 10 minutos. Se procedió en forma similar para otros surfactantes.

### 3.2.3.4 Adsorción de Os-PA (Au/MPS/Os-PA/Surf/Os-PA)

Los electrodos modificados con el surfactante fueron sumergidos nuevamente en la solución de Os-PA 0.06 mM en buffer Tris 50 mM (pH 7.0 o pH 8.0, según se indica en cada caso) durante 10 minutos.

### 3.2.3.5 Adsorción de GOx (Au/MPS/Os-PA/Surf/Os-PA/GOx)

La adsorción de GOx se llevó a cabo sumergiendo los electrodos en una solución 1  $\mu$ M de la enzima en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, durante 10 minutos.

La repetición de los pasos 3.2.3.2 a 3.2.3.5 permite generar el ensamblado Au/MPS/(Os-PA/Surf/Os-PA/GOx)<sub>n</sub>.

## 3.2.4 Medidas electroquímicas

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo utilizando un potenciostato TEQ-02. Se empleó una celda de vidrio convencional de tres electrodos utilizando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y una malla de platino como contraelectrodo (Figura 3.3). Los electrodos de trabajo se prepararon el mismo día de su implementación. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente, en una celda de vidrio que expone la superficie total del electrodo a la solución.

### 3.2.4.1 Medidas voltamétricas

Los electrodos funcionalizados fueron medidos inmediatamente luego de su preparación. Para todos los ensayos descritos, los electrodos se enjuagaron con agua Milli-Q y se introdujeron en la celda electroquímica. Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo KNO<sub>3</sub> 0.2 M. El electrodo modificado

se conectó al potenciostato, dejando equilibrar con la solución. Se realizó una primer voltametría en buffer y luego en glucosa 50 mM.



**Figura 3.3:** Imagen de la celda y sistema de electrodos empleados en las medidas electroquímicas.

### 3.2.5 Microgravimetría

Para estudiar las masas incorporadas al electrodo en cada paso de ensamblado se realizaron mediciones en microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). El sistema empleado consistió en una balanza de 5MHz, modelo QCM200 (Standford Research Systems) y, como electrodo de trabajo, un cristal de cuarzo de corte AT, de 5 MHz de frecuencia de resonancia, 25.4 mm de diámetro y 1.33 cm<sup>2</sup> de área geométrica (Standford Research Systems). El experimento se realizó utilizando una celda fabricada en Teflón.

### 3.2.6 Ángulo de contacto

Los experimentos de ángulo de contacto se llevaron a cabo en un equipo KSV Cam200.

## 3.3 Resultados

El primer paso de modificación de los electrodos consistió en la adsorción de una monocapa de MPS sobre la superficie de oro de manera de proveer una superficie con cargas negativas, adecuada para la adsorción del polímero redox en un segundo paso de adsorción.

Este segundo paso revierte el exceso de cargas negativas sobre la superficie en un exceso de cargas positivas generado por los grupos  $\text{NH}_3^+$  en la PA. La presencia del polímero de osmio en la estructura cumple las funciones de facilitar la adsorción de la enzima mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, propagar la carga conectando la enzima al electrodo y mediar la reducción de la enzima en un proceso bimolecular entre los sitios del Os(II) en el polímero y el grupo prostético de la enzima.

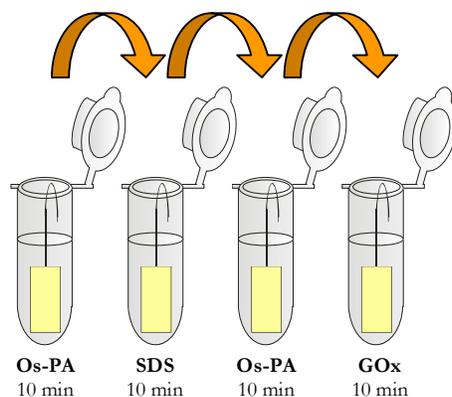
El sistema ternario es ensamblado en la siguiente secuencia: MPS/Os-PA/Surfactante/Os-PA/GOx a fin de explorar si esta configuración permite mejorar la interacción entre el complejo de osmio y la enzima, con respecto a las configuraciones previamente reportadas.

### 3.3.1 Autoensamblados a pH 7.0

La incorporación de Os-PA y GOx se realizó a partir de soluciones reguladas a pH 7.0, mientras que el SDS fue adsorbido desde una solución a pH 6.5.

#### 3.3.1.1 Configuración Au/MPS/(Os-PA/SDS/Os-PA/GOx)<sub>n</sub>

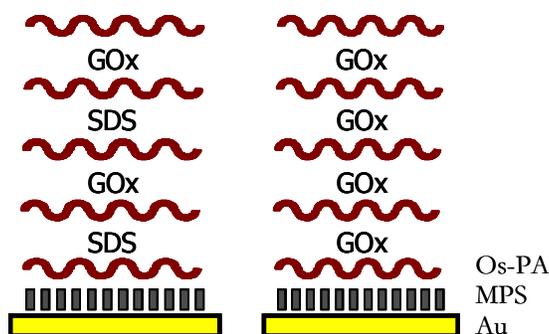
Se llevo a cabo la modificación de un electrodo de oro mediante los pasos descritos en 3.2.3.1 a 3.2.3.5; posteriormente se repitieron los pasos 3.2.3.2 a 3.2.3.5 generándose de esta manera el ensamblado Au/MPS/(Os-PA/SDS/Os-PA/GOx)<sub>n</sub> con n=5. En la Figura 3.4 se muestran de manera esquemática los pasos de autoensamblado para esta construcción.



**Figura 3.4:** Representación esquemática del proceso de autoensamblado electrostático capa por capa. Las soluciones de Os-PA y GOx están reguladas a pH 7.0.

### 3.3.1.2 Configuración Au/MPS/(Os-PA/GOx)<sub>n</sub>

A fin de comprender mejor los cambios producidos por esta nueva estrategia de ensamblado, los experimentos se compararon siempre con el sistema autoensamblado Au/MPS/(Os-PA/GOx)<sub>n</sub> construido simultáneamente (Figura 3.5). De esta manera se evitan las posibles diferencias debidas a la variabilidad en la actividad de GOx. Para ello se llevo a cabo la modificación de un electrodo de oro mediante los pasos descritos en 3.2.3.1, 3.2.3.2 y 3.2.3.5; posteriormente se repitieron los pasos 3.2.3.2 y 3.2.3.5 generándose de esta manera el ensamblado Au/MPS/(Os-PA/GOx)<sub>n</sub>, con n=5.



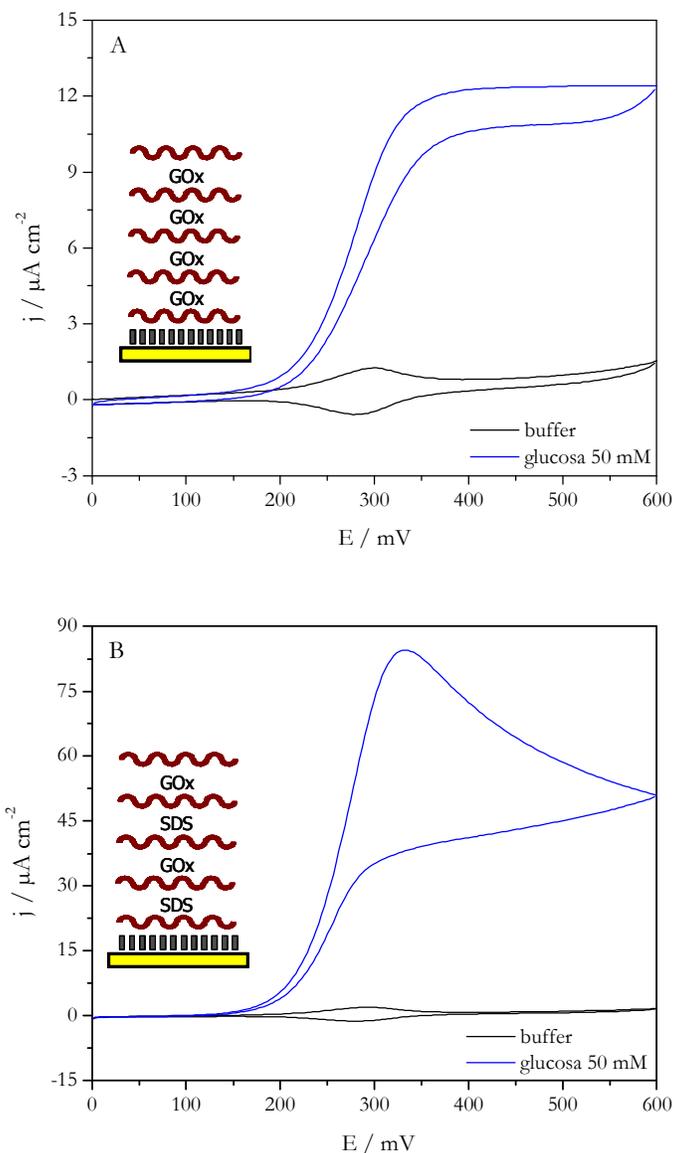
**Figura 3.5:** Representación esquemática de las capas construidas mediante el proceso de autoensamblado electrostático capa por capa, para los sistemas Au/MPS/(Os-PA/SDS/Os-PA/GOx)<sub>n</sub> (izquierda) y Au/MPS/(Os-PA/GOx)<sub>n</sub> (derecha).

### 3.3.1.3 Respuesta electroquímica

Con el objeto de evaluar la respuesta electroquímica de estos sistemas, durante el proceso de autoensamblado el comportamiento electroactivo de Os-PA y la respuesta electrocatalítica en presencia de glucosa fueron seguidos mediante voltametría cíclica. Para el ensamblado Au/MPS/(Os-PA/GOx)<sub>5</sub> se observa que al aumentar el número de capas, la corriente se incrementa en un modo semejante al informado anteriormente en sistemas similares, sin embargo, para el ensamblado que contiene SDS se observan corrientes catalíticas mayores a partir de la segunda capa de GOx.

La Figura 3.6 muestra la respuesta electroquímica típica observada para ambos ensamblados hasta n=5. El voltagrama en ausencia de glucosa (negro) es prácticamente el mismo en forma, y la corriente se duplica para el sistema que contiene SDS. Sin embargo, en presencia de glucosa 50 mM (azul) las magnitudes de corriente son muy diferentes; para

el sistema que contiene SDS (Figura 3.6 B) la corriente catalítica máxima es de más de 6 veces superior a la del sistema sin SDS (Figura 3.6 A).



**Figura 3.6:** Voltametrías cíclicas correspondientes a los sistemas: A)  $(\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$ ; B)  $(\text{Os-PA}/\text{SDS}/\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$ . En ambos casos,  $n=5$ . Las voltametrías en negro corresponden a las medidas en ausencia de glucosa, y las voltametrías en azul corresponden a las medidas en presencia de glucosa 50 mM. Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

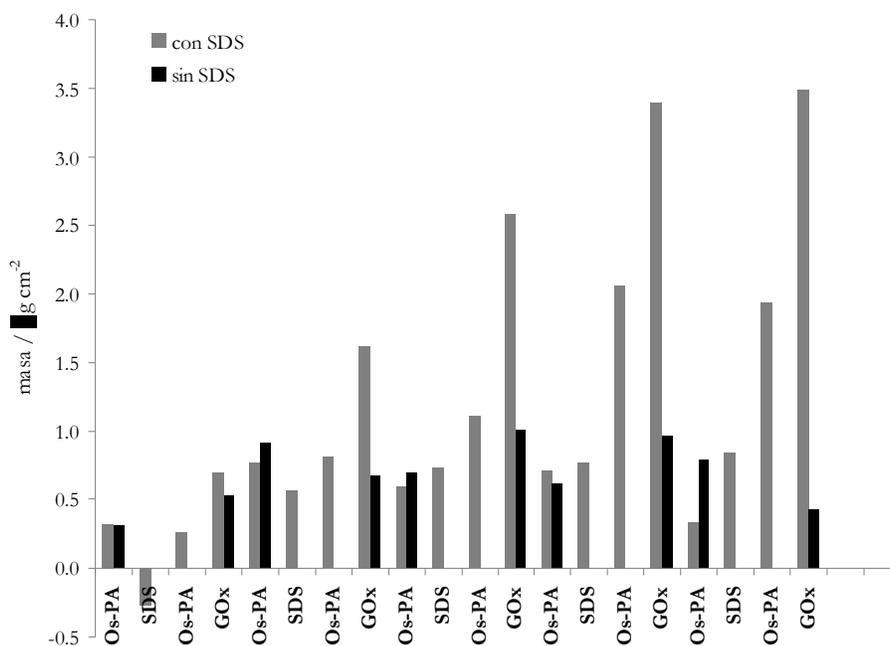
Por otra parte, las formas de las curvas voltamperométricas son distintas. Mientras que el sistema sin SDS presenta un voltagrama típico para un mecanismo electroquímico-catalítico ( $\text{EC}'$ ), el sistema  $(\text{Os-PA}/\text{SDS}/\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$  muestra un

comportamiento más complejo que puede atribuirse a un alto consumo de sustrato en las cercanías del electrodo, lo que produce una caída de corriente sin poder alcanzar un estado estacionario.

La reproducibilidad de respuesta del sistema de autoensamblado es muy buena, si se tiene cuidado respecto a la calidad de los reactivos, especialmente utilizando GOx con la misma actividad y MPS bien conservado, ya que este producto químico se descompone con el tiempo. En estas condiciones tres experimentos independientes llevados a cabo en distintos días muestran una diferencia de 16% para un sistema de 5 capas de GOx.

### 3.3.1.4 Microgravimetría

Dado que la construcción de estos electrodos modificados fue seguida mediante microbalanza de cristal de cuarzo, es posible obtener una idea de la diferencia en la composición de ambos sistemas. La Figura 3.7 muestra los cambios de masa después de la exposición del cristal de cuarzo a las distintas especies, en orden cronológico.



**Figura 3.7:** Incorporación de masa luego de la inmersión del electrodo en la solución indicada en la abscisa. Las barras negras corresponden al sistema Au/MPS/(Os-PA/GOx)<sub>n</sub>; las barras grises corresponden a Au/MPS/(Os-PA/SDS/Os-PA/GOx)<sub>n</sub>.

Las barras grises corresponden al sistema  $(\text{Os-PA/SDS/Os-PA/GOx})_n$ , mientras que las barras negras corresponden al sistema  $(\text{Os-PA/GOx})_n$ . Se puede observar que la captación de masa para el sistema que contiene SDS es mayor; después de la formación de 5 capas de GOx, la incorporación de GOx y Os-PA son *ca.* 3.3 y 2.7 veces mayores. Otro elemento importante a tener en cuenta es el hecho de que si el número de capas crece, la incorporación de ambas especies (Os-PA y GOx) aumenta, lo que sugiere un mecanismo de cooperación en el proceso de adsorción. También es interesante destacar las diferencias en la masa de Os-PA que se incorpora después de la exposición a GOx o SDS. Después de la capa de GOx, la adsorción de Os-PA es similar al sistema sin SDS, mientras que después de las capas de SDS se observa un aumento importante en la incorporación de Os-PA.

### 3.3.1.5 Ángulo de contacto

Para comprender mejor el papel de las interacciones de carga y las fuerzas hidrofóbicas, los dos sistemas se analizaron también por medio de mediciones del ángulo de contacto después de la adición de la cuarta capa de GOx. Los resultados se exponen en la Tabla 3.1. En el caso de  $(\text{Os-PA/GOx})_n$ , después de la adsorción de GOx el ángulo de contacto es de  $41^\circ$  mientras que luego de modificar la superficie con Os-PA, el ángulo es de  $57^\circ$ . En el sistema  $(\text{Os-PA/SDS/Os-PA/GOx})_n$ , después de la adsorción de GOx el ángulo de contacto es de  $42^\circ$ , prácticamente el mismo que antes. Sin embargo, el ángulo de contacto después de la adsorción de Os-PA es de  $93^\circ$ ,  $114^\circ$  después de la adsorción de SDS, y  $104^\circ$  para la nueva capa de Os-PA; para la capa siguiente de GOx, el ángulo de contacto disminuye a  $67^\circ$ .

$(\text{Os-PA/GOx})_n$		$(\text{Os-PA/SDS/Os-PA/GOx})_n$	
capa	ángulo	capa	ángulo
GOx	$41^\circ$	GOx	$42^\circ$
Os-PA	$57^\circ$	Os-PA	$93^\circ$
GOx	$42^\circ$	SDS	$114^\circ$
Os-PA	$63^\circ$	Os-PA	$104^\circ$
		GOx	$67^\circ$

**Tabla 3.1:** Ángulos de contacto medidos luego del ensamblado de la capa indicada (capa inicial  $n = 4$ ).

### 3.3.1.6 Otras configuraciones

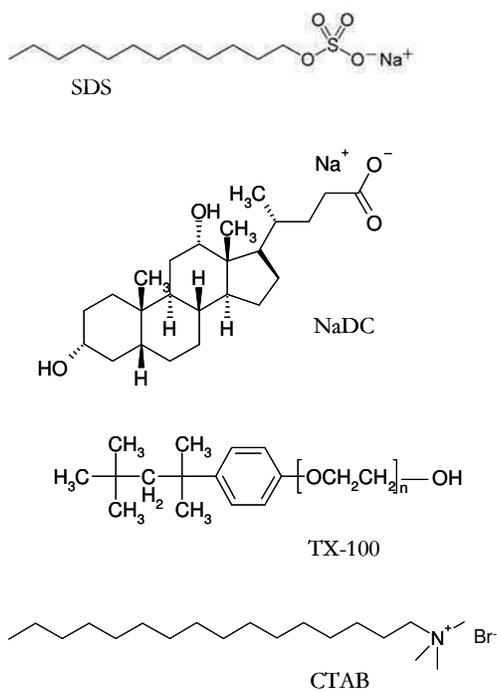
Si el ensamblado de Os-PA con SDS se realiza sin GOx ( $(\text{Os-PA/SDS})_n$ ), una vez que la primera capa de Os-PA se forma, la exposición posterior a SDS reduce la corriente observada debido al complejo de osmio. En este caso, el SDS actúa como una solución de lavado. Este efecto también puede ser observado en el experimento de QCM después de la formación de la primera capa de Os-PA (ver Figura 3.7). La exposición a SDS produce una disminución de la masa del sistema, que se recupera después de una nueva exposición a Os-PA. Además, tras la adsorción de GOx y una nueva capa de Os-PA, también el SDS se incorpora al sistema y ayuda a aumentar la incorporación de GOx y Os-PA.

Otra posible configuración del ensamblado sería  $(\text{Os-PA/SDS/GOx})_n$ , evitando la capa de Os-PA entre SDS y GOx. Cuando esta configuración fue probada, no se observó ningún aumento de la respuesta de corriente después de la primera capa, lo que indica que la adsorción directa de GOx sobre la capa de SDS no es un método eficiente para el ensamblado, e impide la incorporación de Os-PA.

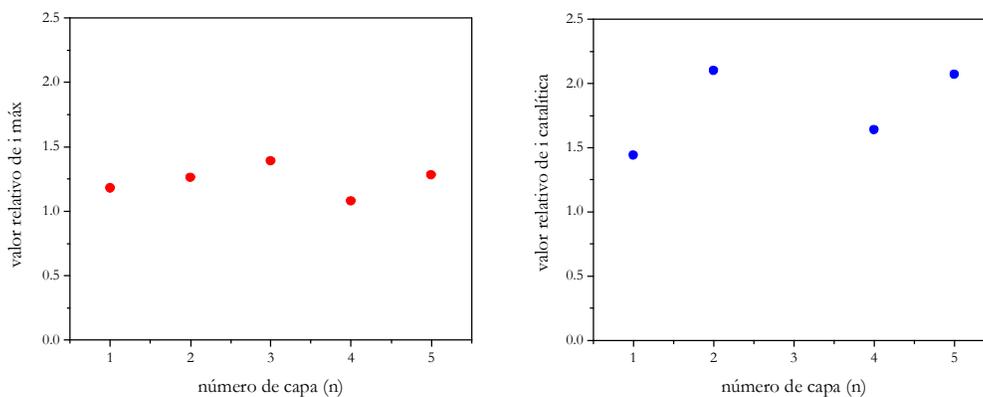
### 3.3.1.7 Otros surfactantes

Además de probar distintas configuraciones para el sistema conteniendo SDS, se realizaron ensamblados reemplazando el SDS por otros surfactantes, entre ellos desoxicolato de sodio (NaDC), un surfactante aniónico débil, Tritón X-100 (TX100), un surfactante no iónico, y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), un surfactante de carga positiva (Figura 3.8). Ninguno de ellos muestra importantes mejoras respecto al sistema sin surfactante. Es particularmente importante el caso de NaDC, ya que a pH 7.0 presenta un grupo cargado negativamente y una cola hidrofóbica, sin embargo, su comportamiento está lejos de ser similar al sistema que contiene SDS.

Para obtener una mejor visión del papel de los surfactantes se llevó a cabo el mismo esquema de autoensamblado, utilizando octadecilsulfato de sodio (ODS) en lugar de SDS. Los resultados muestran un comportamiento similar al descrito para SDS, aunque la carga observada en la oxidación del polielectrolito redox es un 20 % mayor que con SDS, mientras que la corriente catalítica observada es entre 1.4 y 2.1 veces mayor con respecto a SDS (Figura 3.9).



**Figura 3.8:** Estructura química de los surfactantes utilizados: dodecilsulfato de sodio (SDS), desoxicolato de sodio (NaDC), tritón X-100 (TX-100) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).



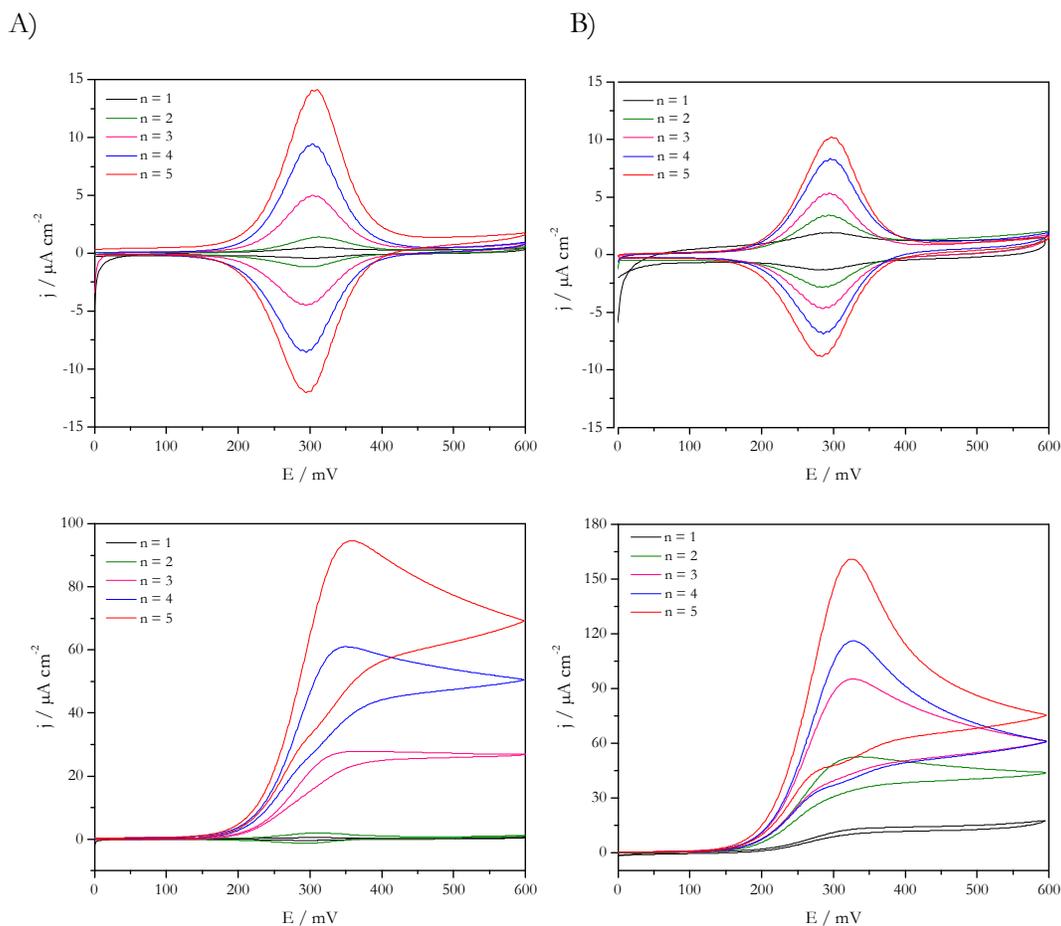
**Figura 3.9:** Relación de corrientes máximas ODS/SDS vs número de capas de GOx ( $n$ ), en autoensamblados ( $\text{Os-PA/Surfactante/Os-PA/GOx}$ ) $_n$ .

### 3.3.2 Autoensamblados a pH 8.0

La construcción de los electrodos modificados se llevó a cabo de la misma manera que en el apartado 3.3.1, pero la incorporación de Os-PA se realizó en este caso a partir de una solución regulada a pH 8.0.

#### 3.3.2.1 Respuesta electroquímica

Si se analizan los valores de corriente obtenidos para este nuevo ensamblado a pH 8.0 (Figura 3.10), se observa que en los ensamblados que no contienen surfactante ( $\text{Os-PA/GOx}_n$ ), la incorporación de Os-PA y GOx presenta un importante crecimiento, tal como fuera descrito por Flexer y col.[95]

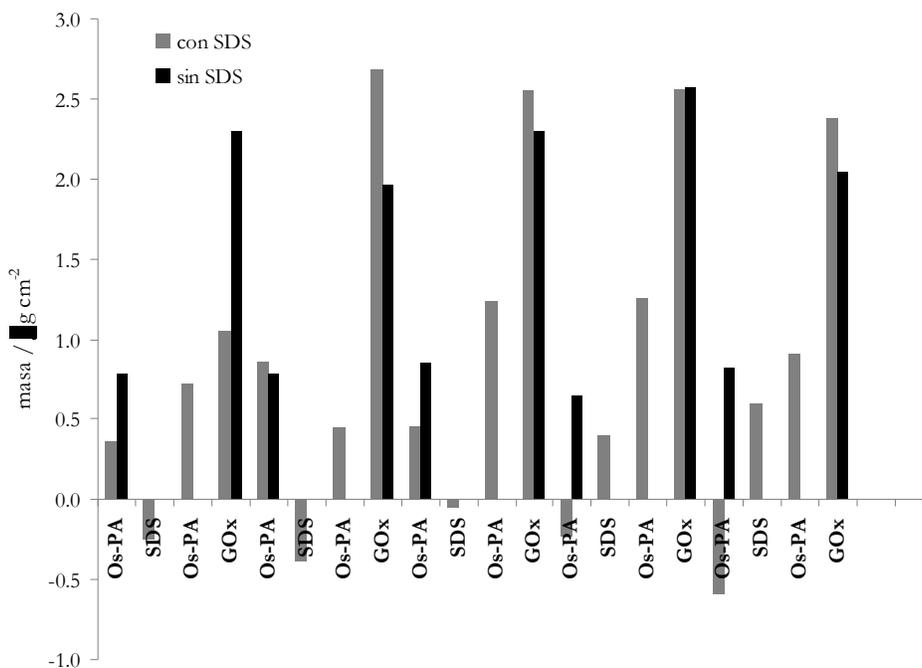


**Figura 3.10:** Voltametrías cíclicas correspondientes a los sistemas: A)  $(\text{Os-PA/GOx})_n$ ; B)  $(\text{Os-PA/SDS/Os-PA/GOx})_n$ , ensamblados a pH 8.0. Arriba, medidas en ausencia de glucosa; abajo, medidas en presencia de glucosa 50 mM. Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Sin embargo, al comparar los valores de corriente catalítica obtenidos en presencia de glucosa 50 mM, puede verse que la corriente catalítica observada para  $(\text{Os-PA}/\text{SDS}/\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$  es el doble de la observada para  $(\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$ . La forma de las curvas voltamétricas en presencia de glucosa conserva el comportamiento observado a pH 7.0.

### 3.3.2.2 Microgravimetría

La construcción de los electrodos fue seguida también por microbalanza de cristal de cuarzo, lo que permite obtener una idea de la diferencia en la composición de ambos sistemas. La Figura 3.11 muestra los cambios de masa después de la exposición del cristal de cuarzo a las distintas especies. Las barras grises corresponden al sistema  $(\text{Os-PA}/\text{SDS}/\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$ , mientras que las barras negras corresponden al sistema  $(\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$ .



**Figura 3.11:** Incorporación de masa luego de la inmersión del electrodo en la solución indicada en la abscisa, para los sistemas a pH 8.0. Las barras negras corresponden al sistema  $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$ ; las barras grises corresponden a  $\text{Au}/\text{MPS}/(\text{Os-PA}/\text{SDS}/\text{Os-PA}/\text{GOx})_n$

### 3.4 Discusión y resumen

La interacción de surfactantes con hemo-proteínas ha sido descrita previamente en la literatura.[109-110] En esos casos se coloca sobre el electrodo una capa de surfactante y, debido a las fuerzas hidrofóbicas, la proteína es adsorbida mejorando el grado de transferencia electrónica directa. En nuestro caso tiene lugar un fenómeno más complejo. El dodecilsulfato es un anión con una cabeza con carga negativa y una cola hidrofóbica con un peso molecular de 265 Da. El experimento de balanza de cuarzo (Figura 3.7) muestra que en una primera instancia el SDS desorbe el polielectrolito de la superficie, a pesar de que una mezcla de estas especies en solución produce un precipitado. Por otro lado, a partir de que GOx es adsorbida, la cantidad de Os-PA y SDS incorporada a la superficie crece notablemente y, hasta el cuarto ciclo de inmersiones, la cantidad de GOx incorporada en cada inmersión aumenta de manera apreciable. Otro punto a tener en cuenta a partir de la incorporación de la segunda capa de GOx, es que la incorporación de Os-PA inmediatamente posterior a la adsorción de GOx es relativamente pequeña respecto a la que se produce luego de la adsorción de SDS, haciéndose este fenómeno cada vez más evidente a medida que el número de capas aumenta. Esto puede deberse a la existencia de un efecto sinérgico entre GOx y SDS. Se sabe que, por encima de pH 6.0, la incubación de GOx con SDS produce una unión cooperativa (hidrofóbica) con retención de la actividad enzimática.[111] Considerando todos estos aspectos, la incorporación efectiva de SDS en el sistema de autoensamblado sólo después de la formación de una capa de GOx/Os-PA se puede explicar teniendo en cuenta que el SDS es atraído hacia la superficie por la capa exterior positiva de Os-PA, seguido de su anclaje a las regiones hidrofóbicas de GOx.

El aumento en la medida del ángulo de contacto de Os-PA se puede atribuir al hecho de que la presencia de SDS también cambia la orientación de los grupos amino cargados hacia el interior de la capa de GOx, exponiendo su estructura hidrofóbica a la solución. De esta manera se pueden explicar los cambios importantes observados en las mediciones de ángulo de contacto.

La introducción de un surfactante con carga negativa en la construcción de estructuras autoensambladas que comprenden un electrolito redox activo y GOx permite la incorporación de mayores cantidades de cada especie. Sin embargo, las voltametrías cíclicas para el sistema en ausencia de glucosa son prácticamente iguales que para el sistema sin SDS. El modelado de estos resultados es complejo, ya que han de tenerse en cuenta diferentes factores, tales como la difusión de las diferentes especies a través de la película, la

difusión de electrones y el espesor de la película. En base a los resultados presentados, se puede sugerir que la cantidad de centros redox que participan en el proceso de transferencia electrónica son los mismos en ambos casos y que la mejora en la corriente catalítica puede atribuirse principalmente a una mayor adsorción de GOx y una mejor interacción entre la enzima y el polielectrolito debido a la presencia de SDS.

A pH 8.0, como el polímero Os-PA se vuelve menos cargado, se observa una interacción hidrofóbica más fuerte con GOx.[95] En consecuencia, la adición de SDS es un proceso que compite con Os-PA por las regiones hidrofóbicas de GOx, ya que la interacción de carga disminuye. De todas maneras, a partir de los experimentos de balanza de cuarzo, se puede observar que con el agregado de SDS se produce un proceso de desorción y posteriores incorporaciones de material; el hecho de que la corriente debida a la oxidación de osmio en ausencia de glucosa es inferior para el sistema que contiene SDS, mientras que en presencia de glucosa lo duplica, sugiere que el surfactante ayuda a producir cierto ordenamiento en el autoensamblado mejorando el proceso de transferencia de carga entre el polielectrolito redox y la enzima. Rahim *et al.* observaron un proceso similar de adsorción y desorción para autoensamblados de poli(alilamina) y poliestirensulfonato, donde utilizando SDS pueden cambiar la morfología de las películas formadas a partir de estos dos polielectrolitos.[112]

Desde el punto de vista del surfactante, el efecto que se observa en el proceso de transferencia electrónica entre el polielectrolito redox y la enzima a pH 7.0 depende fuertemente de su carga y estructura. Los experimentos realizados con surfactantes que poseen carga positiva o nula no muestran mejoras en el sistema. Por otra parte, el uso de un surfactante como desoxicolato, que tiene carga negativa pero que presenta una estructura hidrofóbica diferente, tampoco mejora la respuesta catalítica del sistema. Por último, octadecilsulfato (que presenta características muy similares a dodecilsulfato) mejora aun más el proceso catalítico, sugiriendo que la estructura linear alquílica combinada con una carga negativa es relevante en la construcción de estos autoensamblados.

La introducción de una tercera molécula en el proceso de autoensamblado de estas dos macromoléculas abre rutas sintéticas más flexibles para la construcción de dispositivos moleculares: por ejemplo, la modificación de SDS con una cupla redox podría conducir a una nueva mejora del proceso de transferencia electrónica entre Os-PA y GOx.

Nuestros resultados muestran que la introducción de dodecilsulfato de sodio como surfactante permite la captación de mayores cantidades de enzima y de polielectrolito, mejorando la corriente catalítica en presencia de glucosa en comparación con sistemas de

autoensamblado presentados anteriormente. Pese a las mejoras observadas, la construcción del sistema esta basada en una previa modificación de la superficie de oro con un tiol cargado negativamente y el sistema requiere de múltiples pasos de inmersión y lavado.

---

# Capítulo 4

## Sistema PA+SDS



## 4.1 Introducción y Objetivos

Como se ha discutido en el Capítulo 1, los complejos polielectrolito-surfactante (PE-surf) son un tipo de complejos de cadenas poliméricas cargadas (polielectrolito) y moléculas anfífilas pequeñas con cargas opuestas (surfactante), que combinan de manera única las propiedades de ambos componentes.

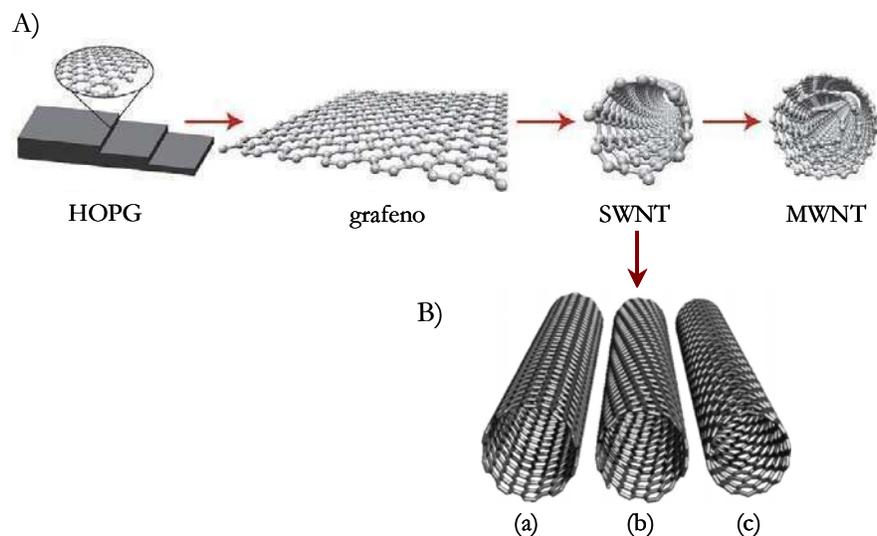
Partiendo de estos antecedentes, en este capítulo se exploran las características de un complejo polielectrolito-surfactante formado por poli(alilamina) y dodecilsulfato de sodio. Se estudia el comportamiento de esta matriz tridimensional aplicada sobre electrodos de grafito construidos por serigrafía. El grafito presenta diversas ventajas, como su bajo costo, una amplia ventana de potencial y una electroquímica relativamente inerte, por lo que es un sustrato ideal para la construcción de sensores. Con el propósito de evaluar la respuesta de este tipo de construcciones, los electrodos de grafito modificados con esta matriz polielectrolito-surfactante se prueban con cuatro sondas consideradas de referencia en procesos de transporte de carga interfacial: ferrocianuro, hexaaminorutenio, ácido ascórbico y dopamina, a fin de comprender su influencia en diferentes procesos de transferencia electrónica.[113]

Por otra parte, también se prueba la incorporación y dispersión de nanotubos de carbono en la matriz compleja y se estudian sus propiedades electrocatalíticas. La estructura de las películas se caracteriza por reflectometría de rayos  $X$  (XRR), dispersión de rayos  $X$  en configuración rasante (GISAXS) y ángulo de contacto.

### 4.1.1. Características de los nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (NTCs) forman parte de la familia de carbonos con hibridación  $sp^2$ , junto con el grafeno (una estructura en dos dimensiones) y el grafito pirolítico altamente orientado (HOPG), que comprende capas compuestas por hojas de grafeno (Figura 4.1, A). Estructuralmente los NTCs están compuestos por una o más láminas de grafeno enrolladas sobre sí mismas formando cilindros de diámetro nanométrico y longitud micrométrica que les confieren propiedades electrónicas, físicas, químicas y mecánicas excepcionales.[114] Las paredes laterales de los tubos están formadas por átomos de carbono dispuestos en un arreglo hexagonal mientras que en los extremos terminales se alternan con arreglos heptagonales y pentagonales, cerrando los tubos por una hemiesfera tipo fullereno. Los NTCs pueden ser divididos en dos grupos: los

nanotubos de carbono de pared simple (SWNTs) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTs) (Figura 4.1). Los SWNTs consisten en un único tubo hueco con un diámetro entre 0.4 y 2 nm, mientras que los MWNTs están compuesto de múltiples nanotubos concéntricos separados por distancias de aproximadamente 0.34 nm,[115-116] donde el MWNT final tiene un diámetro de 2-100 nm.[117-118]



**Figura 4.1:** A) Conexión estructural entre HOPG, grafeno, SWNT y MWNT. B) representación idealizada de las tres diferentes clases de SWNT, con los extremos abiertos: (a) *armchair*, (b) quiral, (c) zigzag.

Desde el descubrimiento de los MWNTs por Iijima[119] en 1991 y los SWNTs en 1993[120] estos materiales han atraído un gran interés debido a su singular estructura y a sus propiedades mecánicas y electrónicas. Entre estas propiedades se pueden mencionar su alta estabilidad química y térmica, alta elasticidad, alta resistencia a la tracción y en algunos casos, conductividad metálica.[119] La primera aplicación de los NTCs en electroquímica fue reportada por Britto *et al.*[121] Este estudio demostró por primera vez que la lista de características únicas de los NTCs podría ser ampliada para incluir las propiedades electrocatalíticas de los electrodos modificados con nanotubos.[117]

La conductividad de los NTCs, como consecuencia de sus características electrónicas, es de suma importancia para su papel en electroquímica. Los MWNTs son considerados como conductores metálicos, una característica altamente atractiva para su aplicación en un electrodo, mientras que los SWNTs pueden ser metálicos o semiconductores dependiendo de su diámetro y quiralidad.[115-116, 122] La quiralidad es

una medida del arreglo de los hexágonos de carbono sobre la superficie del tubo. Hay tres enrollamientos básicos que conducen a las tres configuraciones estructurales de los SWNTs: *zigzag*, *armchair* y quirales (Figura 4.1, B) Los nanotubos *armchair* son metálicos, mientras que sólo uno de cada tres lo es en el caso de estructuras *zigzag* o quirales. Los otros dos tercios en estas estructuras son semiconductores.

Como sucede con otras clases de materiales de carbono frecuentemente usados en electroquímica (carbono vítreo, grafito y diamante), los NTCs son electroquímicamente inertes y no exhiben respuesta voltamétrica en la ventana de potenciales comúnmente usada. Sin embargo, muchos trabajos han establecido que su electroactividad se debe a la presencia de grupos reactivos en su superficie.[123-125] Los métodos más utilizados para su síntesis son: descarga eléctrica por arco, vaporización por láser (ablación láser) y deposición química catalítica en fase vapor. Es importante conocer el método de síntesis a utilizar porque éste define varias características de los NTCs, como su diámetro, longitud, defectos estructurales, entre otras. Asimismo, cada método presenta distinto rendimiento y diferente tipo y porcentaje de impurezas, lo que determina el método necesario de purificación a aplicar. En general se requiere purificar los NTCs debido a que prácticamente todos los métodos de síntesis conducen a impurezas indeseables, tales como partículas gráficas, carbono amorfo y/o nanopartículas metálicas, que pueden interferir en sus aplicaciones ulteriores.[126] Los tratamientos involucrados en la purificación, que incluyen, entre otros, oxidación con ácidos minerales fuertes, oxidación con gases y técnicas electroquímicas, introducen en la mayoría de los casos grupos funcionales.[127-129] El tratamiento de purificación acorta los NTCs y produce su oxidación parcial, generando grupos funcionales oxigenados en los extremos abiertos y en los defectos de las paredes, con una modificación drástica de las propiedades estructurales y electrónicas. Como consecuencia, los NTCs generalmente portan grupos funcionales oxigenados, algunos de los cuales son electroactivos, y su presencia previene la aglomeración de los NTCs y favorece su dispersión.

Dado que la reactividad y la conductividad de los NTCs se relaciona al tratamiento aplicado antes del ensamblado a la superficie del electrodo, la manera de preparar los electrodos modificados con NTCs desempeñará un papel considerable en el funcionamiento electroquímico de los mismos. En la mayoría de los casos los NTCs se purifican utilizando ácidos como  $\text{HNO}_3$  o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . El tratamiento con ácido causa que los extremos altamente tensos sean removidos dejando tubos abiertos en los extremos.[117] Estos extremos terminados en especies oxigenadas son altamente hidrofílicos pero las

paredes, que abarcan la mayor extensión del tubo, son altamente hidrofóbicas. Esta hidrofobicidad presenta un desafío importante cuando se quiere lograr la dispersión y manipulación de los NTCs para lograr una modificación controlada de la superficie del electrodo. En soluciones acuosas o en solventes polares, los NTCs tienen una tendencia a coagular rápidamente, aunque su acortamiento por tratamiento ácido puede prolongar el tiempo en que se hallan suspendidos. Por consiguiente, su dispersión se realiza generalmente en solventes orgánicos no polares, por ejemplo en dimetilformamida (DMF), o con ayuda de surfactantes, como SDS, o polímeros.[130] Rubianes y Rivas propusieron una dispersión altamente eficiente de MWNTs en el polielectrolito policationico polietilenimina (PEI), y su aplicación sobre electrodos de carbono vítreo.[131-132]

## 4.2 Experimental

### 4.2.1 Reactivos

Dodecilsulfato de sodio (SDS) fue provisto por Kodak, poli(alilamina) (PA) solución 20% p/p fue provista por Sigma Aldrich (MW: 65000), buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico), cloruro de hexaaminorutenio (III) y dopamina fueron provistos por Sigma. Ferrocianuro de potasio y ácido L(+) ascórbico fueron provistos por Carlo Erba. Nanotubos de carbono multipared (NTCs) fueron provistos por Timesnano (diámetro externo: 10-20 nm, longitud: ~30  $\mu\text{m}$ , contenido de -COOH: 2% en peso, pureza: > 95% en peso), y fueron utilizados como se recibieron. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Las soluciones stock de ferrocianuro ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) y hexaaminorutenio ( $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ) se prepararon, inmediatamente antes de ser usadas, en concentración 1 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo 0.2 M  $\text{KNO}_3$ . Las soluciones stock de dopamina (DA) y ácido ascórbico (AA) se prepararon, inmediatamente antes de ser usadas, en concentración 5 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo 0.2 M  $\text{KNO}_3$ .

Las membranas de diálisis de celulosa regenerada (RC Spectra/Por) de corte molecular 3500 se obtuvieron de Spectrum® Laboratories.

## **4.2.2 Material compuesto PA+SDS**

### **4.2.2.1 Purificación y caracterización de PA**

Una fracción de PA 20% p/p se dializó contra agua Milli-Q durante 72 horas, a temperatura ambiente, utilizando membranas de corte molecular 12000, con 5 cambios de líquido de 1 litro cada vez. Posteriormente la solución se liofilizó, y el sólido obtenido se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **4.2.2.2 Síntesis del material compuesto PA+SDS**

La síntesis del material compuesto PA+SDS se llevó a cabo mediante la realización de una mezcla, en proporción 1:2, de una solución 0.2 mM de PA en agua Milli-Q (acidificada con HCl) con una solución 35 mM de SDS en agua Milli-Q. Al poner en contacto ambas soluciones acuosas se forma, de manera inmediata, una dispersión blanca de carácter coloidal, que es estable en el tiempo y fácilmente manipulable.

## **4.2.3 Material compuesto PA+SDS-NTCs**

### **4.2.3.1 Suspensión de NTCs en SDS**

5 mg de NTCs fueron suspendidos en 5 mL de una solución acuosa 35 mM de SDS (pH 7.0). La mezcla se sonicó durante 2 horas con el objeto de lograr una adecuada dispersión de los NTCs. La dispersión obtenida resultó ser estable en el tiempo, ya que mantuvo a los NTCs suspendidos de manera eficiente durante 6 meses.

### **4.2.3.2 Síntesis del material compuesto PA+SDS-NTCs**

La síntesis del material compuesto PA+SDS conteniendo NTCs se llevó a cabo realizando una mezcla en proporción 1:2, de una solución 0.2 mM de PA en agua Milli-Q (acidificada con HCl) con la dispersión de NTCs en SDS descrita en 4.2.3.1. El producto final fue sonicado durante 2 horas. La dispersión obtenida resultó estable en el tiempo, ya que mantuvo a los NTCs suspendidos de manera eficiente durante 6 meses.

#### **4.2.4 Construcción de los electrodos modificados**

Se emplearon, como electrodos de trabajo, electrodos de grafito de  $0.38 \text{ cm}^2$  de área geométrica, contruidos por serigrafía, como se detalla en la sección 2.2.2.2.1 La superficie de grafito se trató previamente según el protocolo descrito en la sección 2.2.2.3 y se verificó su limpieza por voltametría cíclica en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo 0.2 M  $\text{KNO}_3$ . Posteriormente los electrodos fueron lavados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ , antes de ser sometidos a modificación.

##### **4.2.4.1 Modificación de los electrodos con el material compuesto (grafito/PA+SDS)**

La modificación de los electrodos de grafito consistió en el recubrimiento con una capa del complejo polielectrolito+SDS, mediante la aplicación de diferentes volúmenes de la dispersión (recubrimiento por secado o *casting*).

###### **4.2.4.1.1 Capa delgada**

5  $\mu\text{L}$  de la dispersión de PA+SDS descrita en 4.2.2.2 se colocaron y distribuyeron sobre la superficie de grafito limpia. Los electrodos se dejaron 2 horas a temperatura ambiente, a fin de permitir la completa evaporación del solvente, y finalmente fueron enjuagados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ .

###### **4.2.4.1.2 Capa gruesa**

Se preparó una solución similar a la descrita en 4.2.2.2, pero utilizando PA 3.0 mM en lugar de PA 0.2 mM. 5  $\mu\text{L}$  de esta solución de PA+SDS se colocaron y distribuyeron sobre la superficie de grafito limpia. Los electrodos se dejaron 2 horas a temperatura ambiente, a fin de permitir la completa evaporación del solvente, y finalmente fueron enjuagados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ .

##### **4.2.4.2 Incorporación de NTCs (grafito/PA+SDS-NTCs)**

5  $\mu\text{L}$  de la solución de PA+SDS-NTCs descrita en 4.2.3.2 se colocaron y distribuyeron sobre la superficie de grafito limpia. Los electrodos se dejaron 2 horas a

temperatura ambiente, a fin de permitir la completa evaporación del solvente, y finalmente fueron enjuagados con agua Milli-Q y secados con N<sub>2</sub>.

#### **4.2.5 Medidas de dispersión de luz**

Las medidas de dispersión dinámica de luz láser (DLS, *Dinamic Light Scattering*) se llevaron a cabo en un equipo analizador de tamaño de partícula Brookhaven modelo 90plus, con un láser de 28 mW (657 nm). Las medidas se realizaron en un ángulo de dispersión fijo de 90°. Se utilizaron celdas de poliestireno descartables.

#### **4.2.6 Medidas de ángulo de contacto**

Los experimentos de ángulo de contacto se llevaron a cabo en un equipo KSV Cam200.

#### **4.2.7 Medidas de XRR y GISAXS**

Las medidas de reflectometría de rayos X (*X-Ray reflectivity*, XRR) y dispersión de rayos X de incidencia rasante (*Grazing Incidence Small Angle X-ray Scattering*, GISAXS) fueron llevadas a cabo por el Dr. Azzaroni, como se describe en la sección 2.1.6.1. Como sustratos de apoyo se utilizaron obleas de Si(100); las mismas fueron lavadas con acetona y secadas con argón, y luego se realizó el depósito de películas delgadas de material compuesto mediante la técnica de recubrimiento por rotación (*spin-coating*) con un *spin-coater* comercial (Laurell WS-400B). Para ello 50 µL de la dispersión PA+SDS o PA+SDS-NTCs se colocaron sobre la superficie limpia, la cual se rotó de manera de distribuir el material homogéneamente.

#### **4.2.8 Micrografías**

Las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) Zeiss DSM 982 Gemini en el Centro Avanzado de Microscopías (CMA, Universidad de Buenos Aires).

#### 4.2.9 Perfilometrías

Las perfilometrías se llevaron a cabo en un equipo Veeco-Dektak 150 Stylus Surface Profiler. Las medidas se realizaron utilizando una punta de 12.5  $\mu\text{m}$ . La fuerza ejercida sobre la punta fue de 3 mg.

#### 4.2.10 Medidas electroquímicas

Las medidas electroquímicas se realizaron empleando un sistema estándar de tres electrodos junto con un potenciostato (TEQ-02). El sistema consistió en un electrodo de trabajo, una malla de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia. Los electrodos de trabajo se prepararon el mismo día de su implementación. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente, en una celda de acrílico diseñada para exponer toda la superficie del electrodo a la solución.

Los electrodos funcionalizados fueron medidos inmediatamente luego de su preparación. Para todos los ensayos descritos, los electrodos se enjuagaron e introdujeron en la celda electroquímica. Las soluciones fueron desoxigenadas con  $\text{N}_2$  durante 2 minutos antes de realizar las medidas voltamétricas. Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.2 M. Los electrodos modificados se conectaron al potenciostato, dejando equilibrar con la solución.

##### 4.2.10.1 Medidas voltamétricas

El potencial fue ciclado entre  $-0.1$  y  $+0.6$  V para  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , entre  $-0.5$  y  $+0.3$  V para  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ , entre  $0.0$  y  $+0.4$  V para dopamina y entre  $-0.2$  y  $+0.2$  V para ascorbato, versus Ag/AgCl a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  en todos los casos.

En todos los casos se realizó una voltametría en el buffer de medida como blanco.

##### 4.2.10.2 Análisis por voltametría diferencial de pulso

Las medidas de voltametría diferencial de pulso se llevaron a cabo a una velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $50 \text{ mV}$  de amplitud de pulso, ancho de pulso de  $25 \text{ ms}$  y un periodo de  $500 \text{ ms}$ .

## 4.3 Resultados

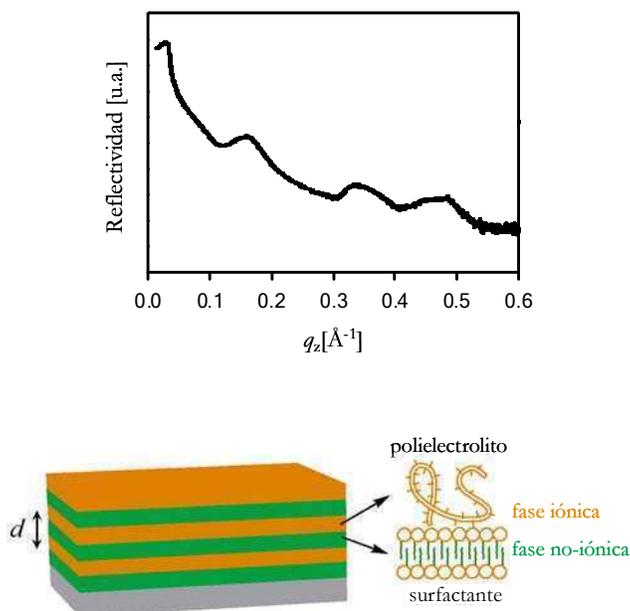
### 4.3.1 Suspensión coloidal

Poli(alilamina) (PA) es un polielectrolito catiónico débil de carácter básico, con un pKa de 9.7.[133] Es capaz de solubilizarse fácilmente a un pH neutro dando un polímero de carga completamente positiva. Cuando esta solución se mezcla con SDS, se produce una dispersión de partículas estables, con un diámetro efectivo de  $281 \pm 11$  nm, determinado a través de experimentos de DLS. Una característica interesante de este sistema coloidal es la simplicidad de la preparación de las partículas, dado que la adición de SDS produce la formación de un sistema coloidal estable, en la medida que el pH de la PA esté por debajo de 10; teniendo en cuenta el pKa de la PA, al menos la mitad de los grupos amino tienen que estar protonados para inducir la formación de una suspensión coloidal. A partir de estas observaciones es evidente que la formación del material compuesto PA+SDS es impulsada por las fuerzas electrostáticas de atracción entre las cargas positivas sobre las cadenas de PA y los iones sulfonato cargados negativamente en las moléculas de SDS, ya que a pH menor que 10 tanto los residuos amino de PA como los grupos sulfonato del SDS están cargados.

### 4.3.2 Película PA+SDS

La dispersión puede ser fácilmente manipulada y aplicada sobre una superficie de grafito, generando una capa estable después de la evaporación del solvente. La exposición del sistema a una gota de agua da un ángulo de contacto de  $(85 \pm 5)^\circ$  mostrando un comportamiento más hidrofóbico que el observado cuando PA está formando la capa más externa de estructuras capa por capa construidas en combinación con poli(estireno sulfonato),[134] para las que se informó un valor de  $(46 \pm 1)^\circ$ , lo que sugiere una fuerte interacción entre los grupos de carga opuesta, dejando expuestos a la solución los restos alquilo del material compuesto.

La estructura de la película se caracterizó además por reflectometría de rayos X (XRR). Estas medidas se llevaron a cabo con fuentes de radiación sincrotrón para investigar la organización mesoestructural de la película PA+SDS formada en la superficie de Si(100). La Figura 4.2 muestra los datos de XRR para una película delgada de PA+SDS, medida en condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa.



**Figura 4.2:** Datos de reflectometría de rayos X para la película PA+SDS medida en condiciones ambientales ( $T = 298$  K y HR = 29%). La película se depositó mediante *spin-coating* sobre sustrato de Si(100). En la parte inferior se muestra un esquema del ensamblado lamelar polielectrolito-surfactante, donde  $d$  se refiere a la separación lamelar.

La presencia de marcados picos de Bragg hasta el tercer orden indica una estructura lamelar altamente orientada, y de las posiciones de los picos de Bragg se puede deducir un espaciamiento lamelar de  $3.96 \pm 0.06$  nm para este sistema. La nanoestructura lamelar más sencilla de un complejo de polielectrolito-surfactante es un modelo de microfases separadas, que consta de una fase iónica y una fase no-iónica, donde la fase iónica contiene las cadenas del polielectrolito y la cabeza cargada del surfactante iónico y la fase no-iónica contiene los residuos hidrofóbicos del surfactante, como la cadena alquílica (Figura 4.2, abajo).[53] La unidad de repetición de un sistema lamelar está dada por la suma de las microfases.

Considerando que la longitud de la cadena del SDS es de 1.54 nm,[50, 64] el polielectrolito más el grupo de la cabeza iónica del surfactante contribuyen con un espesor de 2.42 nm, lo que corresponde a una capa relativamente gruesa, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el sistema auto-ensamblado de poli(acrilato)-poli(alilamina) a pH neutro, donde se reportaron capas muy finas (0.3 a 0.5 nm) para ambos polielectrolitos.[135]

#### 4.3.2.1 Respuesta electroquímica de PA+SDS

A fin de evaluar la respuesta electroquímica de este material, se llevo a cabo la modificación de un electrodo de grafito como se describe en la sección 4.2.4.1.1, generándose de esta manera una capa del complejo PA+SDS.

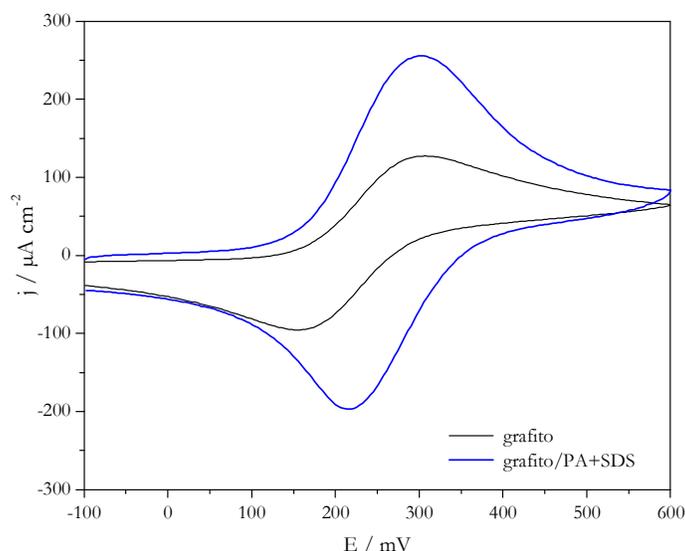
Con el fin de comprender su influencia en los procesos de transferencia electrónica, el electrodo modificado con esta nueva matriz se probó con cuatro sondas redox, con diferentes características: ferrocianuro, hexaaminorutenio, dopamina y ascorbato. Estas sondas se estudiaron teniendo en cuenta la superficie del electrodo y las características químicas y electrostáticas del complejo polielectrolito-surfactante. Desde el punto de vista de la superficie de grafito, se pueden considerar las siguientes características: ferrocianuro es un ión negativo y un sistema redox en el que la transferencia de electrones (TE) es un proceso sensible a la superficie; hexaaminorutenio es un ión positivo y un sistema redox en que el proceso de TE se lleva a cabo mediante un mecanismo de esfera externa, sin ningún paso electrocatalítico o de adsorción y con una baja energía de reorganización; dopamina, una especie de carga positiva a pH neutro y un sistema redox en la que el proceso de TE depende de los procesos de adsorción y de la concentración de protones; y ácido ascórbico, un ión cargado negativamente a pH neutro y un sistema redox en el que el proceso de TE es también sensible a la superficie y depende de la concentración de protones.[113]

##### 4.3.2.1.1 Ferrocianuro y Hexaaminorutenio

Es interesante estudiar las propiedades electroquímicas de los iones  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  confinados en estas películas debido a su capacidad electrocatalítica para actuar como mediadores de transferencia electrónica en biosensores. En este contexto, las películas de polielectrolito compuestas de poli(amina) modificadas con ferroceno y poli(alilamina) y poli(vinilpiridina) modificadas con complejos de osmio se han utilizado para la construcción de biosensores que utilizan un mediador redox.[17, 136-140] En estos sistemas, debido a que los compuestos redox suelen ser solubles en agua, los mediadores redox están unidos a las cadenas de polímeros a fin de inmovilizar el centro redox en las películas de polielectrolito. Para dichas aplicaciones, sería conveniente que iones redox tales como  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  puedan ser retenidos en las películas, a fin de ser utilizados como mediadores.

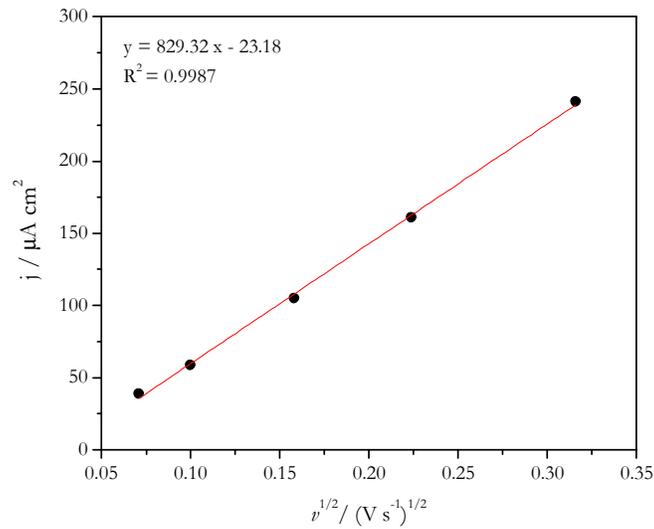
La Figura 4.3 muestra la respuesta electroquímica al ión  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  de un electrodo

de grafito limpio y de un electrodo modificado con el complejo PA+SDS.



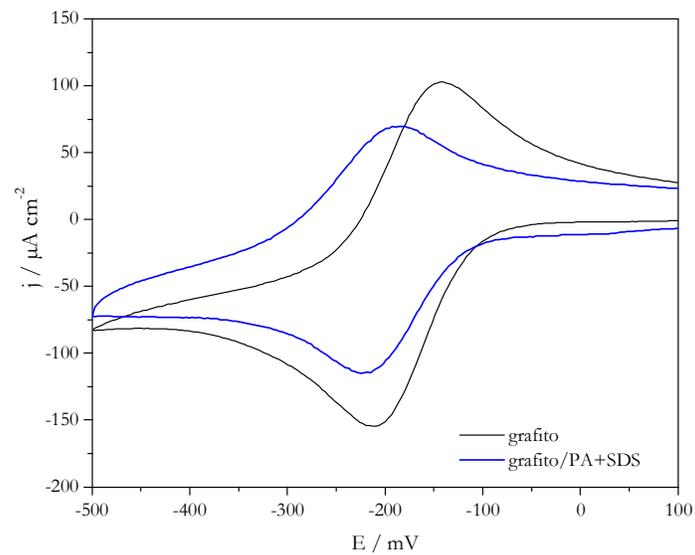
**Figura 4.3:** Voltametría cíclica para un electrodo de grafito limpio y un electrodo modificado, en solución  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  1 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M. Velocidad de barrido: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

El electrodo de grafito limpio exhibe un comportamiento típico para esta cupla mostrando una separación entre los picos de oxidación y reducción,  $\Delta E_p$ , de 160 mV, mientras que para el electrodo modificado con PA+SDS se evidencian importantes diferencias: por un lado, un incremento casi al doble en la corriente y, por otro lado, una disminución de la separación entre picos, pasando de 160 a 90 mV. El aumento de la corriente refleja la incorporación del ión  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  a la capa de polielectrolito-surfactante, un comportamiento que fue también observado por Anzai con películas multicapa de polielectrolitos, conteniendo poli(alilamina) y polisacáridos con carga negativa [141]. Por otra parte, si se grafican las densidades de corriente pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 4.4), se observa que esta especie redox presenta un comportamiento difusional dentro de la película y, por lo tanto, la reducción de la separación de picos puede ser atribuida a una mejora en la velocidad del proceso de transferencia electrónica entre ferrocianuro y la superficie de grafito. El potencial redox aparente (determinado como la media entre los picos de oxidación y reducción) cambia después de la modificación de 225 a 260 mV; esto está de acuerdo con el comportamiento observado para los sistemas multicapa de PA [141-142].



**Figura 4.4:** Densidad de corriente pico para  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  1 mM en función de  $v^{1/2}$ .

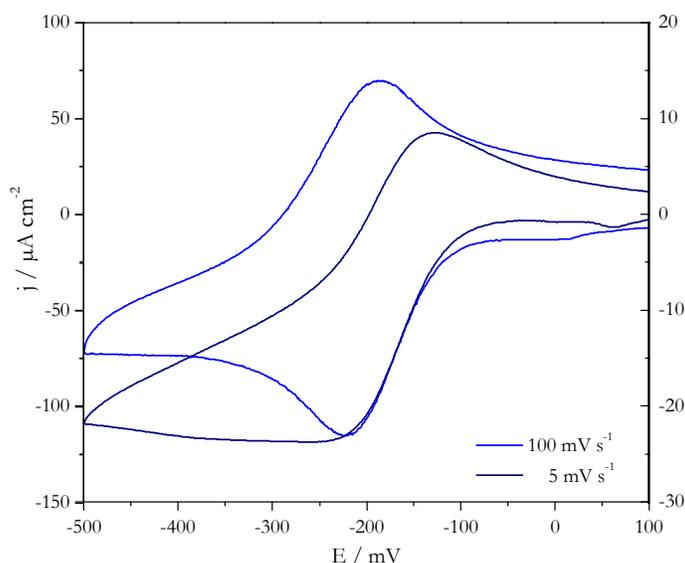
La Figura 4.5 muestra la respuesta electroquímica al ión  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  de un electrodo de grafito limpio y de un electrodo modificado con el complejo PA+SDS.



**Figura 4.5:** Voltametría cíclica para un electrodo de grafito limpio y un electrodo modificado, en solución  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  1 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M. Velocidad de barrido: 100 mV s<sup>-1</sup>.

El electrodo de grafito limpio nuevamente refleja el comportamiento típico de esta cupla exhibiendo un comportamiento prácticamente reversible, con un  $\Delta E_p$  de 75 mV, para una voltametría cíclica efectuada a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , mientras que para el caso del electrodo modificado se observa una disminución de la corriente, y una separación de picos de 40 mV. Este último valor y el cambio en la forma de las curvas voltamperométricas, que cambia de un comportamiento de especies bajo el régimen de difusión semi-infinita a un comportamiento que corresponde a un régimen de capa delgada, indican un importante efecto de la superficie modificada sobre especies redox positivas altamente cargadas.

Además de estudiar la respuesta del electrodo modificado a los iones  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ , se estudió cómo es afectada dicha respuesta por la velocidad de barrido aplicada. La Figura 4.6 muestra las voltametrías cíclicas en  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  para el electrodo modificado, a dos velocidades de barrido. A  $5 \text{ mV s}^{-1}$  se observa una separación de picos de 88 mV, mientras que para el voltagrama a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  la separación de picos es de 23 mV.

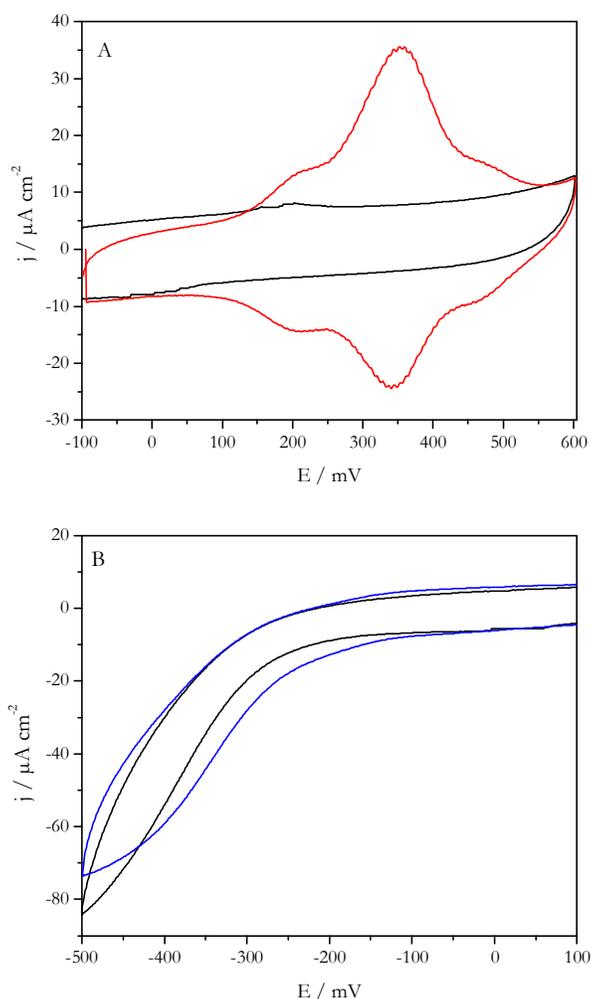


**Figura 4.6:** Voltametrías cíclicas para un electrodo modificado a dos velocidades de barrido:  $5 \text{ mV s}^{-1}$  (escala derecha) y  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (escala izquierda), en  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  1 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M.

Esta tendencia de disminución de la separación de picos con el aumento de la velocidad de barrido sugiere que la penetración y posterior difusión de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  a través de esta película es un proceso lento restringido por el polielectrolito cargado positivamente. En el primer caso, una lenta velocidad de barrido permite detectar tanto los

iones presentes en la película, como aquellos que difunden desde la solución y a través de la película, mientras que a una velocidad de barrido más rápida el electrodo sólo es capaz de detectar las especies confinadas en dicha película, cercanas al electrodo.

Estos resultados estarían indicando que el ión  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  es capaz de incorporarse dentro de la matriz de PA+SDS. Para confirmar este comportamiento y con el fin de evaluar la penetración del ión en la película, el electrodo modificado se expone a una solución 1 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  durante 15 minutos, luego se enjuaga exhaustivamente y finalmente se lo sumerge en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.2 M y se realiza una nueva voltametría cíclica (Figura 4.7).



**Figura 4.7:** Voltametrías cíclicas para el electrodo modificado: (A) medidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M, antes (negro) y después (rojo) de exponerlo 15 minutos a solución de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  1 mM. (B) medidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M, antes (negro) y después (azul) de exponerlo 15 minutos a solución de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  1 mM. Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la Figura 4.7(A) se puede observar que  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  permanece confinado en la matriz después de varios ciclos (voltametría en rojo). Si se realiza el mismo experimento exponiendo el electrodo a una solución 1 mM de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  no se observa ninguna señal (Figura 4.7 B); el complejo de rutenio se pierde inmediatamente, lo que muestra que no existe un mecanismo eficaz para mantener un ión positivo altamente cargado dentro esta película.

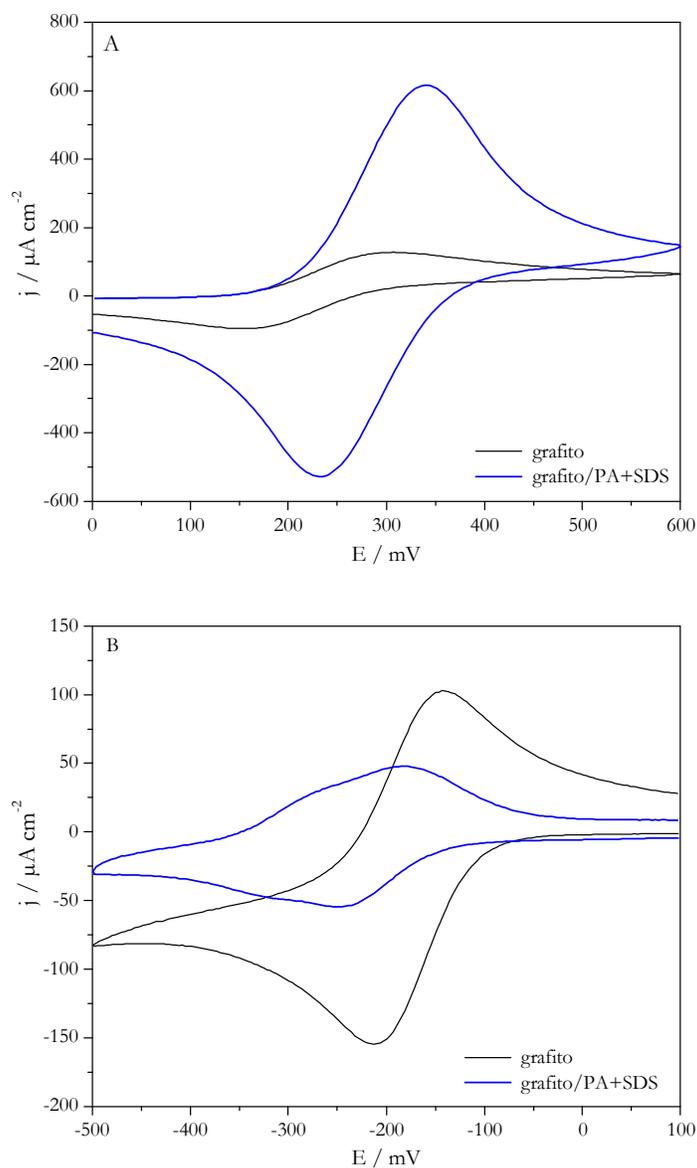
El comportamiento observado hasta aquí sugiere una película formada por cargas positivas fijas que se mantienen estables debido a la interacción con pequeños iones anfífilos de carga negativa, que en parte pueden someterse a un intercambio iónico con un ión negativo altamente cargado como el ferrocianuro y desfavorecer la incorporación de aquellos iones positivamente cargados.

En películas multicapa de polielectrolitos, el espesor de la película afecta el comportamiento de las especies redox[141, 143] y dicho espesor puede ser regulado modificando la cantidad de pasos de inmersión durante el proceso de construcción. En la película aquí presentada, el espesor puede ser modificado simplemente variando la cantidad de complejo depositado sobre el electrodo. Como ejemplo y a fin de corroborar el comportamiento mencionado anteriormente, se fabrican electrodos modificados con películas PA+SDS gruesas, construidas como se describe en 4.2.4.1.2. La Figura 4.8 muestra voltametrías cíclicas de electrodos que contienen 25 veces más PA+SDS que los electrodos presentados anteriormente.

La masa de complejo PE-surf retenida sobre la superficie de este electrodo puede compararse con la masa depositada sobre el electrodo de capa delgada mediante medidas del espesor de las películas realizadas por perfilometría. Para el electrodo presentado anteriormente (capa delgada), se observó un espesor de la película de 2  $\mu\text{m}$ , mientras que la película gruesa adopta una forma cóncava, con una altura de 20  $\mu\text{m}$  en el centro y 60  $\mu\text{m}$  en el borde, reflejando una importante diferencia en la cantidad de complejo depositada sobre la superficie de grafito.

El voltagrama para  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  de este electrodo de capa gruesa (Figura 4.8 A) muestra varias diferencias: la corriente es alrededor de 5 veces mayor que para el electrodo de grafito limpio, la separación entre picos es prácticamente la misma (120 mV) y el potencial redox aparente se desplaza de 225 a 285 mV vs Ag/AgCl. A pesar de que la señal se debe fundamentalmente a los iones confinados en la superficie de la película, la forma del voltagrama corresponde a un comportamiento difusional. El mismo tipo de electrodos modificados expuestos a  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  muestra un mecanismo más complejo (Figura 4.8 B).

La corriente observada es menor que sobre el electrodo de grafito limpio; en este caso los dos procesos antes mencionados se hacen evidentes, uno relacionado con la difusión de los iones a través de la película, con un potencial redox aparente a  $-200$  mV, similar al observado en electrodos de grafito limpio, y un segundo proceso correspondiente a iones confinados en la superficie, a  $-300$  mV.



**Figura 4.8:** Voltametrías cíclicas para un electrodo de grafito limpio y un electrodo modificado: (A) en solución  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  1 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M. (B) en solución  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  1 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M. Velocidad de barrido:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

La diferencia observada en el comportamiento para los electrodos de capa delgada y de capa gruesa son similares a los observados por Wang y Anzai para películas multicapa de polielectrolitos (PEM),[143] quienes estudiaron el comportamiento de ferrocianuro como sonda redox y mostraron que a medida que las películas PEM se van haciendo mas gruesas, pueden observarse dos procesos redox: uno de los procesos corresponde a la difusión del ión redox a través de la película, mientras que el otro proceso se debe al ión redox confinado dentro de la película.

Todos estos resultados permiten comprobar que la película polielectrolito-surfactante generada es muy estable y tiene la capacidad de retener iones negativos altamente cargados, mientras que en relación con iones de carga positiva, la película rechaza parcialmente su difusión. Sin embargo, fuerzas de interacción débiles permiten a los iones ser confinados en pequeñas cantidades dentro de la película; la debilidad de esta interacción se manifiesta por la pérdida inmediata de la señal cuando el electrodo modificado se sumerge en una solución buffer. Esta característica puede ser empleada para construir electrodos modificados conteniendo especies negativamente cargadas, que podrían actuar como catalizadores.[141]

#### **4.3.2.1.2 Dopamina y Ácido Ascórbico**

Los electrodos de grafito modificados fueron también ensayados con dos sondas de gran interés en las ciencias biomédicas, el ácido ascórbico y la dopamina. Para ambas cuplas la oxidación sobre electrodos de grafito es un proceso superficie-sensible;[113] sin embargo, McCreery ha establecido una diferenciación: mientras que la dopamina requiere de un paso de adsorción para mostrar un proceso eficaz de transferencia electrónica, el ascorbato no necesita de este paso previo.[113] A pH neutro, ascorbato y dopamina existen en formas iónicas diferentes, el ascorbato está en su forma aniónica ( $pK_a = 4.10$ ), mientras que la dopamina está en su forma catiónica ( $pK_a = 8.87$ ).[144] Es bien sabido que estas especies se oxidan a altos sobrepotenciales en electrodos de grafito desnudo y se han implementado diferentes métodos para disminuir tales sobrepotenciales. Un modo de lograrlo es mediante la modificación de la superficie, de tal manera de que la especie sea oxidada por un mediador[145-146]; otra forma es inducir la adsorción o la orientación adecuada para favorecer el proceso de transferencia electrónica.[36, 144]

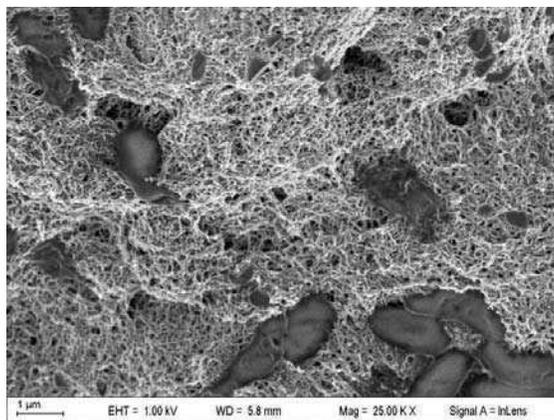
Electrodos modificados con una capa delgada de PA+SDS expuestos a soluciones de ascorbato o dopamina en buffer pH 7.0 no muestran un importante mejora en la

oxidación de dichas cuplas.

#### 4.3.3 Película PA+SDS-NTCs

Dado que el SDS se utiliza con frecuencia para dispersar a los nanotubos de carbono (NTCs) en soluciones acuosas[147-148] y que, a su vez, los NTCs han sido ampliamente utilizados en la construcción de sensores debido a que muestran excelentes propiedades electrocatalíticas,[118] decidimos investigar la utilidad de la matriz polielectrolito-surfactante para dispersar y retener a los NTCs en la superficie del electrodo.

Para ello se modificó un electrodo de grafito como se describe en la sección 4.2.4.2. En la Figura 4.9 se muestra una micrografía SEM de este electrodo modificado. Se puede observar que los NTCs se distribuyen uniformemente sobre la superficie, mostrando que éstos son eficientemente atrapados dentro de la red polimérica.

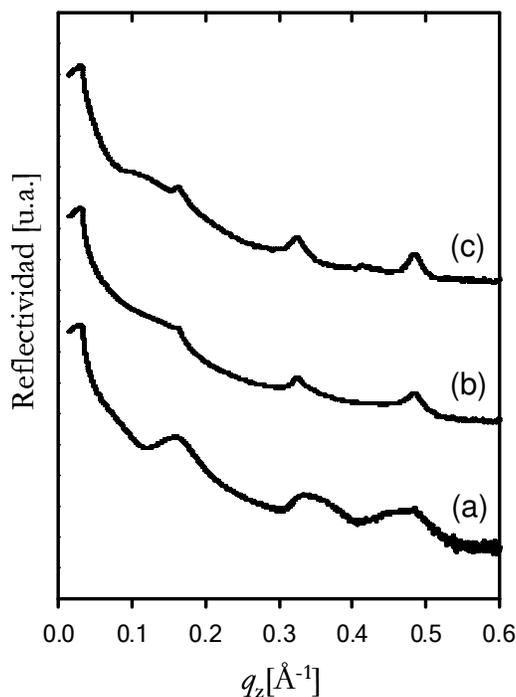


**Figura 4.9:** Micrografía SEM de un electrodo de grafito modificado con PA+SDS-NTCs.

##### 4.3.3.1 Estructura de la película PA+SDS-NTCs

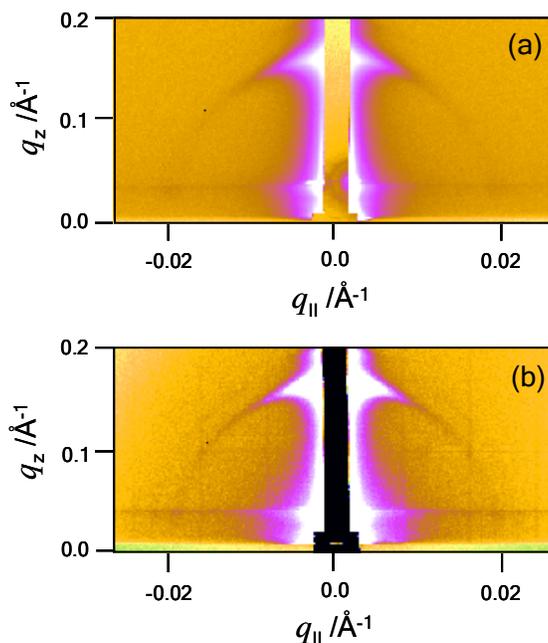
La estructura de la película fue estudiada por reflectometría de rayos X (XRR). Los resultados muestran que la presencia de los nanotubos de carbono dispersos en la película de PA+SDS no perturban la presencia de estructuras lamelares, ni la separación lamelar (Figura 4.10 b). Para investigar más a fondo las características estructurales de las películas delgadas de PA+SDS-NTCs se realizaron medidas de XRR en condiciones controladas de humedad. El objetivo de estos experimentos fue corroborar si la presencia de humedad o un ambiente acuoso promueve cambios drásticos en la mesoestructura de la película,

debido al hinchamiento de los dominios de polielectrolito. Cuando se realizó la medida bajo condiciones de humedad relativa del 89% se pudo comprobar que dichas condiciones no alteran la estructura lamelar de la película (Figura 4.10 c).



**Figura 4.10:** Datos de reflectometría de rayos X para: (a) película PA+SDS medida en condiciones ambientales, (b) película PA+SDS-NTCs medida en condiciones ambientales, (c) película PA+SDS-NTCs medida a 89% HR. Las condiciones ambientales se refieren a  $T = 298 \text{ K}$  y  $\text{HR} = 29\%$ . Las películas se construyeron mediante *spin-coating* sobre sustratos de Si(100).

Posteriormente se realizaron medidas de dispersión de rayos X en configuración rasante (GISAXS) con un ángulo de incidencia de  $0.27^\circ$ . Se observó un patrón similar de dispersión para las películas lamelares PA+SDS y PA+SDS-NTCs (Figura 4.11). El pronunciado pico de Bragg observado para las dos películas en la dirección normal al sustrato describe el mismo espaciado lamelar observado en las medidas de XRR. Estos resultados sugieren que la película de PA+SDS-NTCs consiste en microdominios ligeramente desalineados, que poseen estructuras lamelares bien orientadas en sus propios microdominios. La falta de alineación en la dirección vertical conduce a patrones GISAXS consistentes con los perfiles de reflectividad de rayos X medidos previamente.



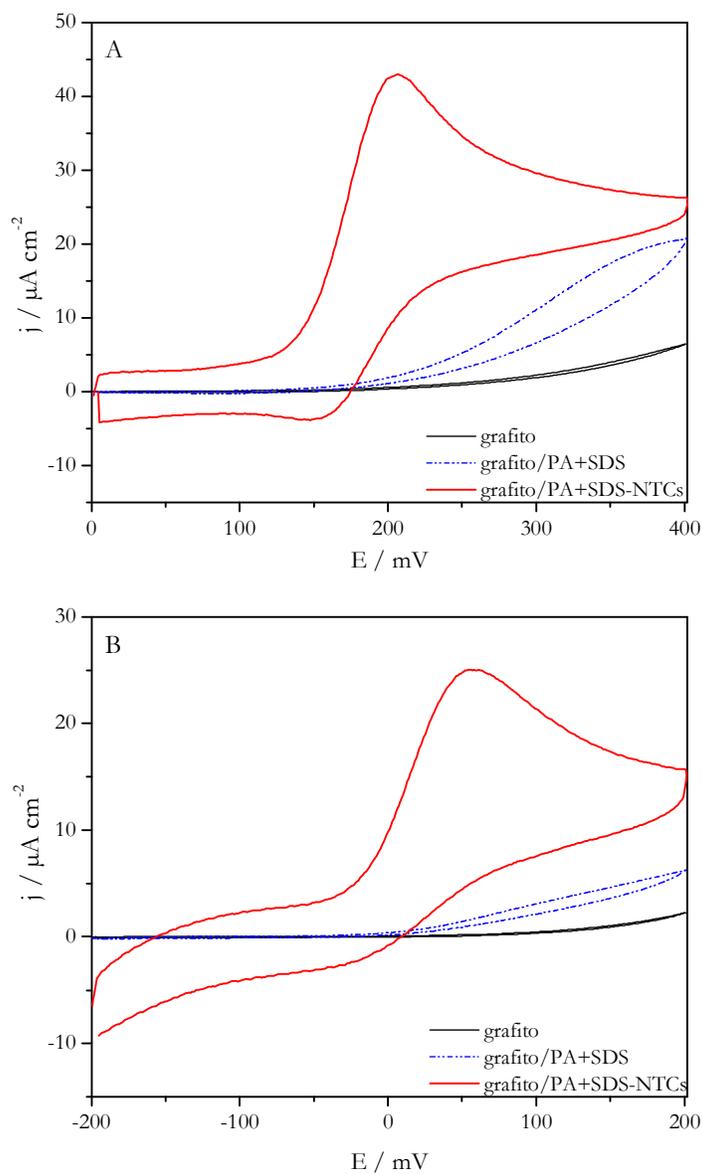
**Figura 4.11:** Patrón GISAXS obtenido para películas PA+SDS (a) y PA+SDS-NTCs (b) medidos con un ángulo de incidencia de  $0.27^\circ$  bajo condiciones ambientales. Las películas fueron construidas por *spin-coating* sobre sustratos de Si(100).

#### 4.3.3.2 Respuesta electroquímica de PA+SDS-NTCs

Se llevo a cabo la modificación de un electrodo de grafito como se describe en la sección 4.2.4.2, generándose de esta manera una capa del complejo PA+SDS-NTCs.

La respuesta amperométrica a dopamina sobre electrodos modificados con NTCs muestra una corriente mayor a la esperada para un electrodo plano, y un pico bien definido a pH neutro (Figura 4.12 A, voltametría en rojo), que no puede ser observado en el electrodo sin NTCs (Figura 4.12 A, voltametría en azul). Estas mejoras pueden estar relacionadas con un aumento en el área efectiva de la superficie del electrodo (aumento de la corriente) y con la introducción de sitios electrocatalíticos para la oxidación de dopamina (pico de oxidación bien definido).

En el caso de ascorbato, también se observan mejoras. En la Figura 4.12(B) se muestra la respuesta voltamétrica del electrodo modificado en presencia de ascorbato 0.2 mM (voltametría en rojo), observándose un pico bien formado cerca del potencial formal.[145]



**Figura 4.12:** Voltametrías cíclicas para dopamina 0.2 mM (A) y ascorbato 0.2 mM (B) en un electrodo de grafito limpio (línea negra), un electrodo de grafito modificado con PA+SDS (línea azul), y un electrodo de grafito modificado con PA+SDS-NTCs (línea roja). Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$

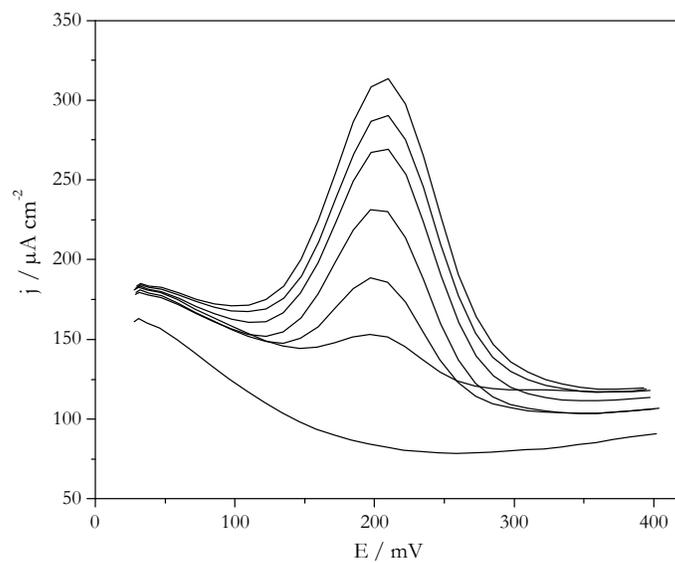
Las mejoras observadas respecto del electrodo de grafito desnudo y del electrodo modificado con PA-SDS, son un reflejo de la buena dispersión y conectividad de los NTCs en la matriz de polielectrolito-surfactante.

#### 4.3.3.3 Aplicaciones analíticas

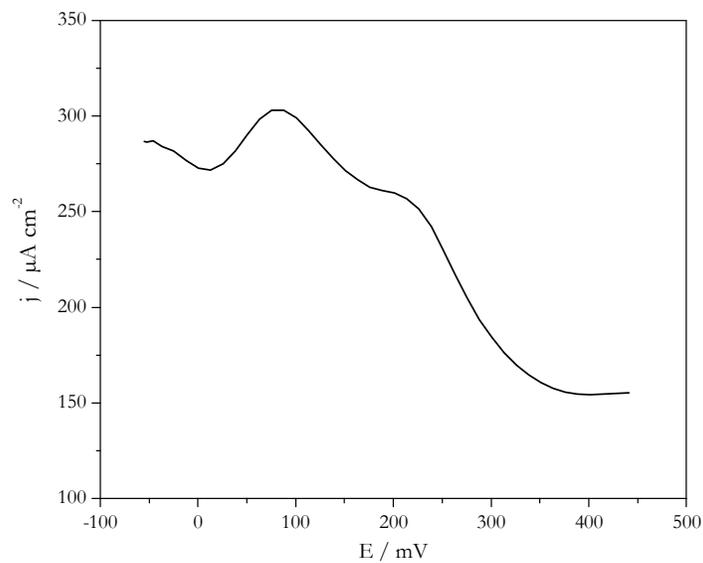
La cuantificación de dopamina y ascorbato puede llevarse a cabo utilizando voltametría cíclica o voltametría diferencial de pulso. Utilizando voltametría cíclica a una velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , ambas especies presentan una respuesta amperométrica lineal con el aumento de la concentración. Para dopamina, la curva de calibración presenta un intervalo lineal de 10 a  $200 \mu\text{M}$  con una sensibilidad del  $71 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ , con un límite de detección de  $6 \mu\text{M}$ , calculado sobre la base de  $3\sigma$  ( $\sigma$  es la desviación estándar residual de la ordenada de origen). Usando el mismo método, el ascorbato muestra un intervalo lineal entre 25 y  $200 \mu\text{M}$ , con una sensibilidad del  $40 \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ , prácticamente la mitad de la sensibilidad de la dopamina. La diferencia en la sensibilidad se puede atribuir al diferente número de electrones que participan en el proceso de oxidación; recientemente, Bartlett ha observado en electrodos modificados con poli(anilina) con diferentes polielectrolitos aniónicos, que el número de electrones que participan en la oxidación del ascorbato puede ser uno o dos.[149]

La diferencia en el mecanismo de oxidación es aún más evidente cuando se utiliza una técnica más rápida, por ejemplo, voltametría diferencial de pulso. En este caso, la dopamina muestra una señal en forma típica de campana, lo que permite su clara detección a una concentración de  $2.5 \mu\text{M}$  (Figura 4.13). La curva de calibración tiene un comportamiento lineal a bajas concentraciones y luego tiende a un valor constante. McCreery[150] ha propuesto como mecanismo para la oxidación de la dopamina en las superficies de carbono, un paso catalítico en el que la dopamina se puede adsorber en la superficie para permitir la "auto-catálisis" por enlaces de hidrógeno a otras moléculas de dopamina en solución sometidas a oxidación, catalizando uno o más de los pasos en el esquema de reducción (HeHe), acelerando así el proceso redox en general. Este proceso de adsorción puede explicar la tendencia de la señal amperométrica a alcanzar un valor constante a concentraciones relativamente bajas.

Por otro lado, el ascorbato muestra una señal muy pobre, incluso en concentraciones de  $1 \text{ mM}$ , lo que hace posible detectar dopamina a una concentración 100 veces más pequeña, como se muestra en la Figura 4.14.



**Figura 4.13:** Voltametría diferencial de pulso para dopamina en diferentes concentraciones: 0, 2.5, 10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{M}$ , en buffer HEPES 50 mM pH 7.0.



**Figura 4.14:** Voltametrías diferencial de pulso para una mezcla conteniendo dopamina 10  $\mu\text{M}$  y ascorbato 1 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.0.

#### 4.4 Discusión y sumario

La difusión de sondas cargadas como  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$  y  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  ha sido ampliamente estudiada para caracterizar la estructura de películas multicapa de polielectrolitos. Estas películas, construidas por el método de autoensamblado capa por capa, pueden crecer linealmente dando una película compacta, o de manera exponencial, produciendo una película menos compacta, denominada en la jerga como “*scrambled eggs*” (“huevos revueltos”) ya que no existen capas bien definidas de cada polielectrolito. Estas películas muestran importantes diferencias con respecto a la unión y a la difusión de iones cargados; mientras que la penetración de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$  en las películas compactas depende de la carga de la capa externa, la película de crecimiento exponencial permite su difusión, independientemente de la capa exterior.[141]

La difusión de estos iones en las películas de polielectrolito-surfactante muestra un comportamiento más cercano a una película compacta; aquí la incorporación o rechazo de un ión está dado por la carga del polielectrolito, que trabaja como andamiaje del sistema, una hipótesis apoyada por los resultados obtenidos por XRR y GISAXS. Además, el experimento de XRR llevado a cabo en un ambiente húmedo (humedad relativa 89%), no muestra cambios con respecto a la estructura lamelar, confirmando la formación de un sistema estable.

En nuestro caso, la PA positivamente cargada muestra una importante capacidad de concentrar ferrocianuro (Figura 4.3) y un rechazo hacia  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  (Figura 4.5); estos resultados se hacen más evidentes cuando el electrodo modificado, después de estar expuesto a las soluciones de los iones, se sumerge en buffer pH 7.0, obteniéndose una respuesta estable en el caso del electrodo modificado con  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$ , con una carga que depende del espesor de la película, mientras que en los electrodos modificados con  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ , el ión es inmediatamente eliminado. El confinamiento de una sonda redox en la matriz puede tener aplicaciones en electrocatálisis o en el desarrollo de sensores químicos y biosensores.[141]

Los resultados obtenidos utilizando como sondas a dopamina y ascorbato no muestran una mejora importante en la cinética del proceso de oxidación, a pesar de que el SDS, como parte de electrodos de pasta de carbono, ha mostrado interesantes propiedades para la oxidación catalítica de dopamina y el rechazo de ascorbato.[36]

De los resultados que se muestran aquí se desprende que debe existir una estrecha interacción entre el surfactante y la superficie de carbono para observar un proceso

electrocatalítico eficiente.

Por otro lado, la capacidad del SDS para dispersar a los nanotubos de carbono permite la introducción de un tipo de material con buenas propiedades electrocatalíticas. La introducción de NTCs en el sistema no perturba la estructura lamelar del complejo, a pesar de que disminuye la intensidad de los picos de Bragg (Figura 4.10 b), lo que indica que la propagación de los dominios lamelares es algo menor. La buena dispersión observada mediante SEM (Figura 4.9) es una clara evidencia de que el complejo polielectrolito-surfactante funciona como un adhesivo supramolecular que mantiene a los NTCs conectados al electrodo de grafito. La introducción de NTCs tiene un efecto catalítico en la respuesta electroquímica de dopamina y ascorbato, a pesar de que se observan algunas diferencias en relación con el proceso de oxidación cuando se aplica una técnica rápida como la voltametría diferencial de pulso.

En este capítulo se presentó un nuevo material compuesto que puede ser fácilmente manipulado y aplicado en superficies de grafito, con la habilidad de formar espontáneamente mesoestructuras lamelares sobre una superficie. La combinación de un polielectrolito débil que lleva un grupo amino primario y un agente surfactante abre la posibilidad de desarrollar estructuras más sofisticadas en el futuro. En este caso, se presentó con éxito la explotación de la capacidad de SDS para dispersar NTCs y resultados preliminares muestran que se puede hacer lo mismo con nanopartículas de oro.

Este nuevo material compuesto dota a los electrodos con propiedades electroquímicas distintas de las de los electrodos desnudos. El hecho de que la PA presenta un grupo funcional fácilmente modificable permite diseñar distintos tipos de arquitecturas para el ensamblado de moléculas, como se ejemplificará en los próximos capítulos.

---

# Capítulo 5

Sistema Os-PA+SDS



## 5.1 Introducción y Objetivos

En el capítulo anterior se presentó un nuevo complejo polielectrolito-surfactante formado por PA y SDS. Se ha mostrado que este material compuesto puede ser fácilmente manipulado y aplicado sobre electrodos de grafito, con la habilidad de formar espontáneamente mesoestructuras lamelares sobre una superficie. Se presentó con éxito la explotación de la capacidad de SDS para dispersar NTCs, y de esta manera incorporarlos a la matriz. Este nuevo material compuesto dota a los electrodos de características distintas a las de los electrodos de grafito limpios, y el hecho de que la PA presente un grupo funcional fácilmente modificable permite diseñar distintos tipos de arquitecturas para el ensamblado de moléculas, como ya hemos visto en el Capítulo 3 de este trabajo.

En este capítulo se estudia el efecto de introducir una especie redox al sistema presentado en el capítulo anterior. Para ello se hará uso de la experiencia del grupo en la derivatización de PA con un complejo de osmio.

Se estudiará la interacción de este nuevo material compuesto con la enzima glucosa oxidasa, utilizándola nuevamente como sistema modelo, y se compararán los resultados obtenidos con los presentados en el Capítulo 3 de esta tesis y con resultados de otros autores obtenidos a partir de hidrogeles o de sistemas capa por capa.

## 5.2 Experimental

### 5.2.1 Reactivos

Dodecilsulfato de sodio (SDS) fue provisto por Kodak. Glucosa oxidasa (GOx, extraída de *Aspergillus niger*) fue provista por Calzyme. D(+)-Glucosa y Dimetilformamida (DMF) se obtuvieron de Carlo Erba. Ácido N-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) fue provisto por Sigma. Nanotubos de carbono multipared (NTCs) fueron provistos por Timesnano (diámetro externo: 10-20 nm, longitud: ~30  $\mu$ m, contenido de COOH: 2% en peso, pureza: > 95% en peso) y fueron utilizados como se recibieron. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Las soluciones stock de glucosa se prepararon en concentración 0.55 M, en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo 0.2 M KNO<sub>3</sub>. En todos los casos, estas soluciones fueron preparadas al menos 24 horas antes de su uso y mantenidas entre 2 y 8 °C para permitir que se alcance el equilibrio entre los distintos anómeros.

## **5.2.2 Material compuesto Os-PA+SDS**

### **5.2.2.1 Síntesis del polímero redox Os-PA**

En este Capítulo se utilizó un nuevo lote de Os-PA, sintetizado como se describe en el Capítulo 2, sección 2.2.1.1.2 de esta tesis. Como se indicara en dicha sección, el grado de sustitución del polielectrolito (relación de complejos de osmio a grupos alilamina) puede variar de una síntesis a otra, motivo por el cual debe realizarse una caracterización de este nuevo lote de Os-PA. El polielectrolito redox obtenido fue caracterizado mediante espectroscopía RMN <sup>1</sup>H empleando un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz. Las señales presentes entre 6.75 y 8.75 ppm corresponden a los ligandos piridínicos del complejo de osmio, mientras que las señales en la región entre 0.75 y 3.25 ppm corresponden al esqueleto del polielectrolito. Por integración de las señales, promediando tres muestras de RMN <sup>1</sup>H, pudo calcularse una relación de complejo de osmio:alilamina igual a 1:35 (1 complejo de osmio por cada 35 monómeros).

### **5.2.2.2 Síntesis del material compuesto Os-PA+SDS**

200 µL de la solución acuosa de Os-PA 0.18 mM se mezclaron con 400 µL de solución acuosa 35 mM de SDS; la mezcla generó de manera inmediata un precipitado, que fue separado fácilmente mediante centrifugación. El producto de la precipitación (Os-PA+SDS) fue caracterizado por análisis elemental de CHNS empleando un equipo Carlo Erba EA 1108. Cálculos estequiométricos a partir de los resultados de análisis elemental permitieron obtener una relación de 1:1 entre monómero de alilamina y el dodecilsulfato.

Se añadieron 500 µL de DMF a 4 mg del precipitado, y se sonicó durante 2 minutos para favorecer la total disolución.

## **5.2.3 Material compuesto Os-PA+SDS-NTCs**

### 5.2.3.1 Suspensión de NTCs en SDS

5 mg de NTCs fueron suspendidos en 5 mL de una solución acuosa 35 mM de SDS (pH 7.0). La mezcla se sonicó durante 2 horas con el objeto de lograr una adecuada dispersión de los NTCs. La dispersión obtenida resultó estable en el tiempo, ya que mantuvo a los NTCs suspendidos de manera eficiente durante seis meses.

### 5.2.3.2 Síntesis del material compuesto Os-PA+SDS-NTCs

La síntesis del material compuesto Os-PA+SDS conteniendo NTCs se llevó a cabo realizando una mezcla en proporción 1:2, de una solución acuosa 0.18 mM de Os-PA con la dispersión de NTCs en SDS descrita en 5.2.3.1. La mezcla generó de manera inmediata un precipitado, que fue separado fácilmente mediante centrifugación.

Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de DMF, y el producto final fue sonicado durante 2 horas. La dispersión obtenida resultó estable en el tiempo, ya que mantuvo a los NTCs suspendidos de manera eficiente durante seis meses.

## 5.2.4 Construcción de los electrodos modificados

Se emplearon electrodos de grafito y electrodos de oro como electrodos de trabajo.

### 5.2.4.1 Electrodos de grafito

Se utilizaron electrodos de grafito de 0.07  $\text{cm}^2$  y 0.38  $\text{cm}^2$  de área geométrica contruidos mediante serigrafía como se detalla en la sección 2.2.2.2.1. La superficie de grafito se trató previamente según el protocolo descrito en la sección 2.2.2.3 y se verificó su limpieza mediante voltametría cíclica en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo 0.2 M  $\text{KNO}_3$ . Posteriormente los electrodos fueron lavados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ , antes de ser sometidos a modificación.

#### 5.2.4.1.1 Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS)

5  $\mu\text{L}$  de la solución Os-PA+SDS descrita en 5.2.2.2 se colocaron y distribuyeron sobre la superficie limpia de un electrodo de grafito de área 0.38  $\text{cm}^2$  y se dejó evaporar

durante 1 hora. En el caso de los electrodos de grafito de área  $0.07 \text{ cm}^2$  se aplicó  $1 \mu\text{L}$  de la solución Os-PA+SDS y se dejó evaporar durante 1 hora.

#### **5.2.4.1.2 Incorporación de NTCs (grafito/Os-PA+SDS-NTCs)**

$5 \mu\text{L}$  de la solución Os-PA+SDS-NTCs descrita en 5.2.3.2 se colocaron y distribuyeron sobre la superficie limpia de un electrodo de grafito de área  $0.38 \text{ cm}^2$  y se dejó evaporar durante 1 hora. En el caso de los electrodos de grafito de área  $0.07 \text{ cm}^2$  se aplicó  $1 \mu\text{L}$  de la solución Os-PA+SDS-NTCs y se dejó evaporar durante 1 hora.

#### **5.2.4.1.3 Adsorción de la enzima (grafito/Os-PA+SDS/GOx)**

La adsorción de GOx se llevó a cabo colocando el electrodo en contacto con una solución  $2 \mu\text{M}$  de la enzima en buffer HEPES  $50 \text{ mM}$  pH 7.0, conteniendo  $\text{KNO}_3$   $0.2 \text{ M}$ , durante 30 minutos; el mismo buffer se utilizó para enjuagar el electrodo una vez finalizado el tiempo de incubación.

#### **5.2.4.2 Electrodo de oro**

Se emplearon láminas planas de oro macizo de  $1 \text{ cm}^2$  de área geométrica, construidos como fuera descrito en la sección 2.2.2.2. Las superficies de oro se trataron según el protocolo detallado en la sección 2.2.2.3 y se verificó su limpieza mediante voltametría cíclica en  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1.8 \text{ M}$ .

Posteriormente los electrodos fueron lavados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ , antes de ser sometidos a modificación.

#### **5.2.4.2.1 Modificación con el material compuesto (Au/Os-PA+SDS)**

Se realizó el depósito del material compuesto mediante la técnica de recubrimiento por rotación (*spin-coating*). Para ello,  $10 \mu\text{L}$  de la solución de Os-PA+SDS en DMF se colocaron sobre la superficie de oro limpia, la cual se rotó de manera de distribuir el material homogéneamente. Los electrodos se dejaron 1 hora a temperatura ambiente, a fin de permitir la completa evaporación del solvente y, finalmente, fueron enjuagados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ .

#### 5.2.4.2.2 Adsorción de la enzima (Au/Os-PA+SDS/GOx)

La adsorción GOx se llevó a cabo colocando el electrodo en contacto con una solución 2  $\mu\text{M}$  de la enzima en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.2 M, durante 30 minutos; el mismo buffer se utilizó para enjuagar el electrodo una vez finalizado el tiempo de incubación.

#### 5.2.5 Medidas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas se llevaron a cabo utilizando distinta instrumentación de acuerdo a los requerimientos de cada procedimiento y los sistemas en cuestión. Para aquellos procedimientos que involucraron láminas de oro de 1  $\text{cm}^2$  de área geométrica como electrodos de trabajo se empleó un potenciostato TEQ-02. En estos casos se empleó una celda de vidrio convencional de tres electrodos utilizando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y una malla de platino como contraelectrodo. Para los experimentos que involucraron electrodos de grafito como electrodos de trabajo se empleó un potenciostato TEQ-02 o un potenciostato  $\mu\text{AUTOLAB}$  type III. En estos casos se empleó una celda de acrílico de tres electrodos utilizando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y una malla de platino como contraelectrodo. Ambas celdas fueron diseñadas para exponer toda la superficie del electrodo a la solución.

Los electrodos de trabajo se prepararon el mismo día de su implementación. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente.

##### 5.2.5.1 Medidas voltamétricas

Los electrodos funcionalizados fueron medidos inmediatamente luego de su modificación. Para todos los ensayos descritos, los electrodos se enjuagaron e introdujeron en la celda electroquímica. Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.2 M. Los electrodos modificados se conectaron al potenciostato, dejando equilibrar con la solución. Se realizó una primer voltametría en buffer y luego se realizaron los correspondientes agregados de glucosa a partir de una solución stock de glucosa 50 mM.

### **5.2.6 Medidas de ángulo de contacto**

Los experimentos de ángulo de contacto se llevaron a cabo en un equipo KSV Cam200, como se detalla en la sección 2.1.5.1.

### **5.2.7 Medidas de XRR y GISAXS**

Las medidas XRR y GISAXS fueron llevadas a cabo por el Dr. Azzaroni, como se describe en la sección 2.1.6.1. Como sustrato de apoyo se utilizaron obleas de Si(100); 50  $\mu\text{L}$  de la solución Os-PA+SDS u Os-PA+SDS-NTCs se colocaron sobre la superficie limpia, la cual se rotó de manera de distribuir el material homogéneamente.

### **5.2.8 Micrografías**

Las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) Zeiss DSM 982 Gemini en el Centro Avanzado de Microscopías (CMA, Universidad de Buenos Aires).

### **5.2.9 Modelado numérico**

Las simulaciones numéricas fueron llevadas a cabo por la Dra. González. Se utilizó un software de elementos finitos (COMSOL Multiphysics 3.4) para simular los experimentos de voltametría cíclica y los perfiles de concentración. El software fue ejecutado en una PC Intel Corel Duo, 4 GB de RAM, con sistema operativo Windows XP; se resolvió el modelo con 10600 grados de libertad y *ca.* 3000 nodos, y la malla se refinó en las proximidades del electrodo.

## **5.3 Resultados**

### **5.3.1 Material compuesto Os-PA+SDS**

En este capítulo se introduce una modificación realizada sobre la matriz PA+SDS que fuera presentada en el capítulo anterior. Dicha modificación consiste en la introducción

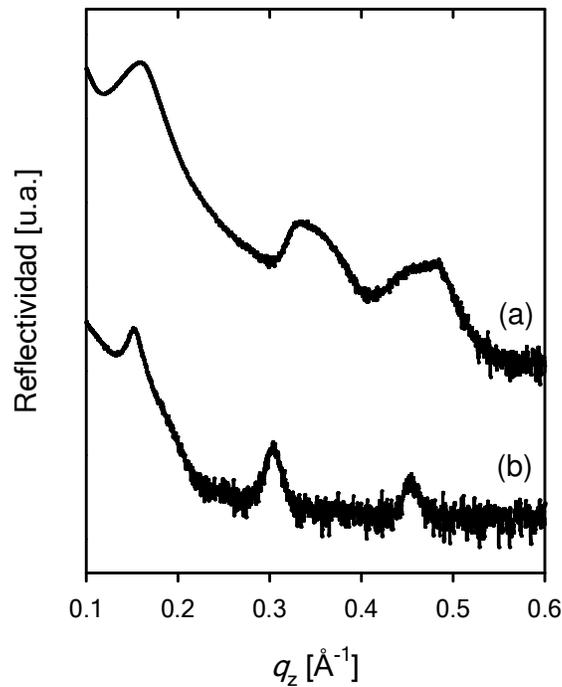
de un elemento electroactivo en el polielectrolito, en este caso un complejo de osmio, con el objetivo de obtener una superficie electroactiva. La relación complejo de osmio:monómero del polielectrolito es 1:35. Para la obtención del nuevo complejo polielectrolito-surfactante, la solución de Os-PA se pone en contacto con la solución de SDS; se observa la inmediata formación de un precipitado. Este precipitado puede ser fácilmente redisoluto en metanol o en dimetilformamida (DMF), permitiendo depositar pequeños volúmenes sobre electrodos de grafito u oro y lograr una rápida evaporación del solvente.

El producto de la precipitación (Os-PA+SDS) fue caracterizado por análisis elemental de CHNS. Cálculos estequiométricos a partir de los resultados obtenidos arrojan una relación de 1:1 entre monómero de alilamina y el dodecilsulfato.

### 5.3.2 Películas Os-PA+SDS

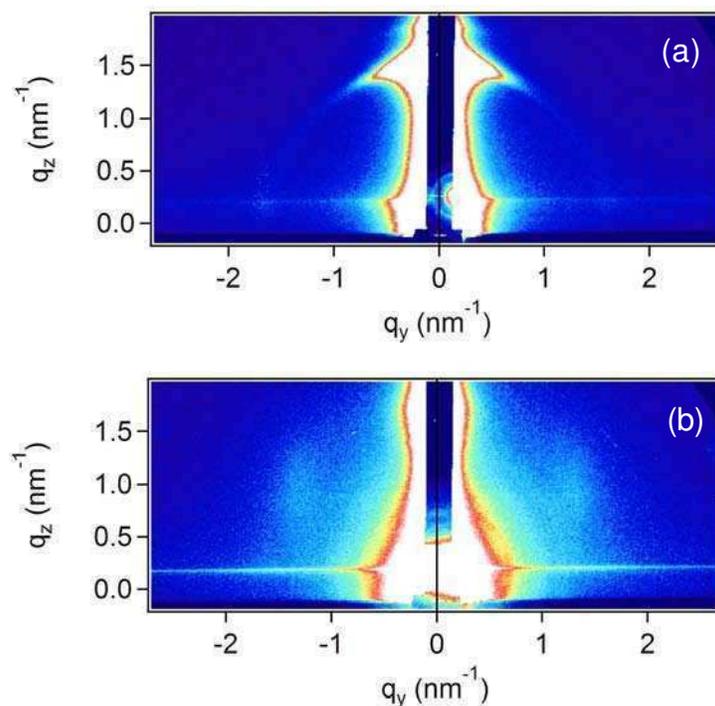
La solución del material compuesto puede ser fácilmente manipulada y aplicada sobre una superficie de grafito, produciendo una capa estable después de la evaporación del solvente. La exposición del sistema a una gota de agua genera un ángulo de contacto de  $(82\pm 3)^\circ$  mostrando un comportamiento más hidrofóbico que la superficie de grafito limpia, y similar a las películas PA+SDS presentadas en el capítulo anterior (ver Capítulo 4, sección 4.3.2), lo que sugiere una interacción entre los grupos de carga opuesta, dejando expuestos a la solución los restos alquilo del material compuesto.

La estructura de la película se caracterizó también por reflectometría de rayos X (XRR). Estas medidas se llevaron a cabo con fuentes de radiación sincrotrón para investigar la organización mesoestructural de la película Os-PA+SDS formada en la superficie de Si(100). La Figura 5.1 muestra los datos de reflectometría correspondientes al sistema Os-PA+SDS y PA+SDS, con fines comparativos. La presencia de picos de Bragg de tercer orden para ambas películas indica la existencia de estructuras lamerales orientadas en ambos sistemas. De la posición de los picos de Bragg se puede deducir un espaciado lamelar ( $d$ ) de 3.96 nm y 4.15 nm para los sistemas PA+SDS y Os-PA+SDS, respectivamente.



**Figura 5.1:** Reflectogramas de rayos X correspondientes a las películas: (a) PA+SDS y (b) Os-PA+SDS.

Se realizaron además medidas de dispersión de rayos X a bajo ángulo en configuración rasante (GISAXS) con la finalidad de elucidar la orientación de estos dominios lamelares con respecto al sustrato (Figura 5.2). Como ya se presentó en el capítulo anterior, el patrón de GISAXS para el sistema PA+SDS muestra la presencia de un halo circular muy tenue y una región brillante muy intensa en la dirección  $q_z$  (para  $q_y \rightarrow 0$ ) (Figura 5.2.a). Esto indicaría que las estructuras lamelares de PA+SDS se encontrarían orientadas mayoritariamente en una dirección paralela al sustrato. Los resultados obtenidos para Os-PA+SDS (Figura 5.2.b) muestran cambios interesantes. A diferencia del PA+SDS, las películas en las cuales el polielectrolito ha sido modificado con el complejo de osmio muestran que la región brillante en la dirección  $q_z$  se hace más pequeña, pero se evidencia la aparición de regiones brillantes (*spots*) en la dirección  $q_y$ . Estos cambios en los patrones de GISAXS sugieren que las películas de Os-PA+SDS poseen una fracción de sus dominios lamelares que se encuentran orientados en dirección perpendicular al sustrato. Esto indicaría que la presencia de los complejos de osmio altera la orientación de su mesoestructura.



**Figura 5.2:** Patrones GISAXS obtenidos para películas: (a) PA+SDS y (b) Os-PA+SDS

### 5.3.2.1 Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados

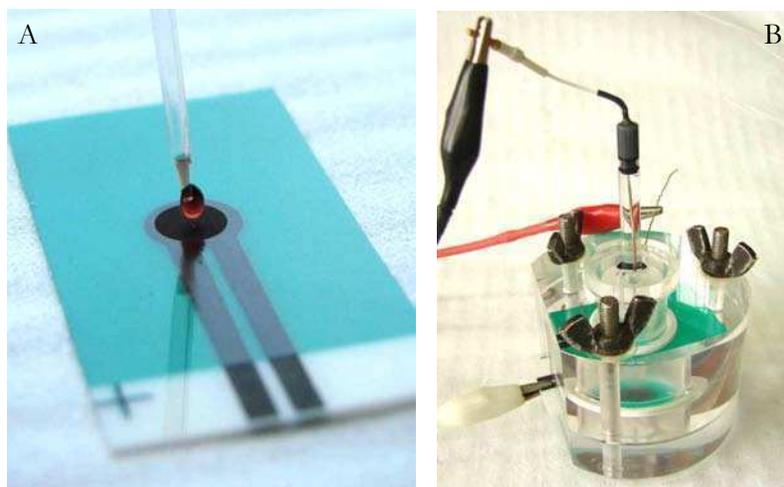
El primer paso de modificación de los electrodos consistió siempre en la aplicación de una capa del material compuesto Os-PA+SDS sobre superficies de grafito (mediante recubrimiento con un volumen determinado y posterior secado) u oro (mediante *spin-coating*).

#### 5.3.2.1.1 Electrodos de grafito

##### 5.3.2.1.1.1 Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS)

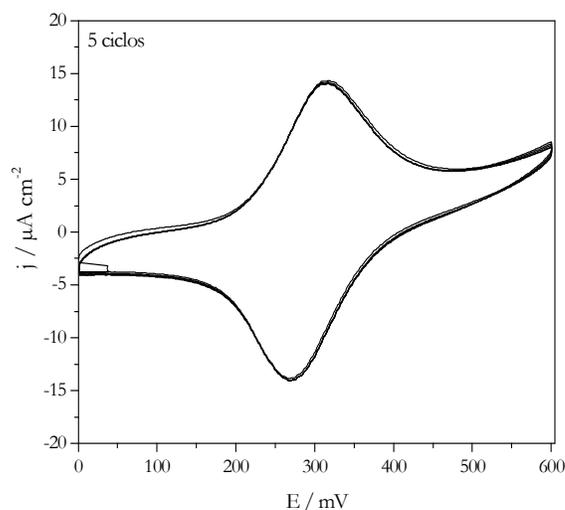
Se llevó a cabo la modificación de electrodos de grafito como se describe en 5.2.4.1.1, generándose de esta manera una capa del complejo Os-PA+SDS.

La Figura 5.3(A) muestra el paso de modificación de los electrodos mediante el recubrimiento con un volumen determinado de solución Os-PA+SDS; una vez evaporado el solvente, el electrodo es lavado, colocado en la celda y conectado al potenciostato (Figura 5.3 B).



**Figura 5.3:** Imágenes de (A) modificación del electrodo de grafito mediante recubrimiento con una gota de Os-PA+SDS; (B) celda y sistema de electrodos empleados en las medidas electroquímicas.

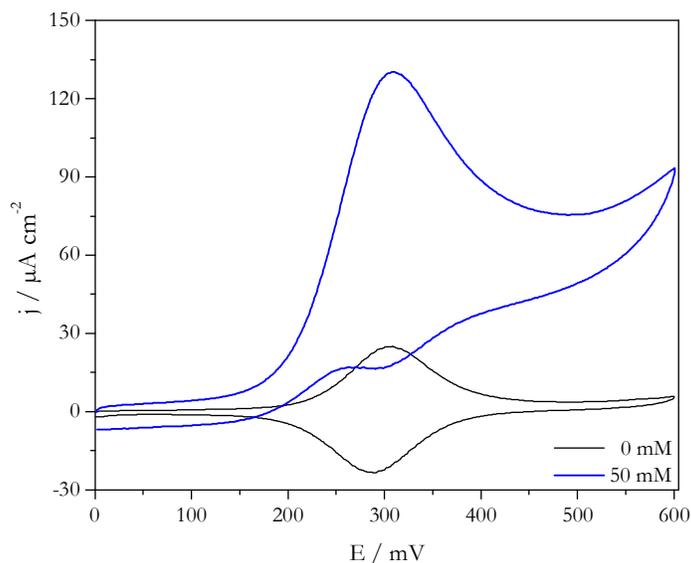
Si se realizan varias voltametrías consecutivas del electrodo modificado, se observa que el material se encuentra adherido de forma muy estable. En la Figura 5.4 se muestran 5 voltametrías consecutivas, realizadas en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.2 M, aplicando una velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . La carga observada es de  $18 \mu\text{C}$ , considerando la masa depositada sobre la superficie del electrodo y asumiendo que nada de ella es perdida por lavados, el 30% de los moles de osmio presentes en el electrodo se encuentran conectados.



**Figura 5.4:** Voltametrías cíclicas consecutivas para el sistema grafito/Os-PA+SDS, obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M. Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 5.3.2.1.1.2 Adsorción de GOx (grafito/Os-PA+SDS/GOx)

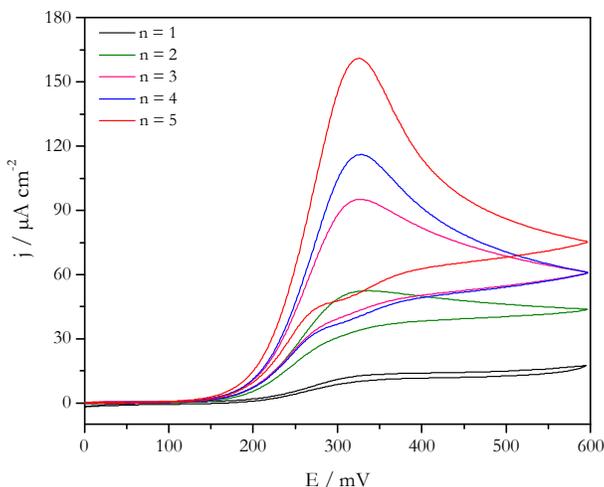
Esta película electroactiva fue expuesta a una solución de GOx a fin de estudiar su capacidad de autoensamblar enzimas redox y de llevar a cabo procesos de transferencia electrónica entre el electrodo de grafito y la enzima. Para ello, sobre la capa inicial del material compuesto Os-PA+SDS se llevó a cabo el paso de adsorción de GOx, como se describe en 5.2.4.1.3, obteniéndose de esta manera el sistema grafito/Os-PA+SDS/GOx. El comportamiento catalítico del electrodo modificado fue evaluado mediante voltametría cíclica en presencia de glucosa 50 mM (Figura 5.5). La actividad catalítica del ensamblado demuestra la presencia de la enzima. Este resultado permite corroborar no sólo que el material complejo Os-PA+SDS suministra una plataforma de afinidad que permite anclar a la GOx de una manera muy sencilla, sino que además permite la transferencia electrónica desde los centros redox de la enzima hasta la superficie del electrodo obteniéndose una corriente catalítica máxima de  $113 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .



**Figura 5.5:** Voltametrías cíclicas para el sistema grafito/Os-PA+SDS/GOx, en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M (voltageograma en negro), y en presencia de glucosa 50 mM (voltageograma en azul). Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Resulta aún más interesante destacar este resultado en comparación con los resultados expuestos en el Capítulo 3, donde se presentaron autoensamblados construidos sobre sustratos de oro; en esos casos se obtenían corrientes de  $115 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  recién luego de

ensamblar cuatro capas de la enzima, es decir luego de 16 pasos de autoensamblado (se muestra en la Figura 5.6, a fines comparativos), y ensamblando el polielectrolito a pH 8.0 para obtener la máxima corriente catalítica, mientras que aquí sólo es necesario depositar 1  $\mu\text{L}$  del material, seguido de un único paso de adsorción de GOx, para llegar a valores similares de densidad de corriente.



**Figura 5.6:** Voltametrías cíclicas correspondientes al sistema Au/MPS/(Os-PA/SDS/Os-PA/GOx) $_n$ , ensamblado a pH 8.0. Medidas correspondientes a las capas  $n=1$  a  $n=5$ , en presencia de glucosa 50 mM. Velocidad de barrido: 10  $\text{mV s}^{-1}$ . (Figura presentada en el Capítulo 3, sección 3.3.2.1).

### 5.3.2.1.2 Electrodo de oro

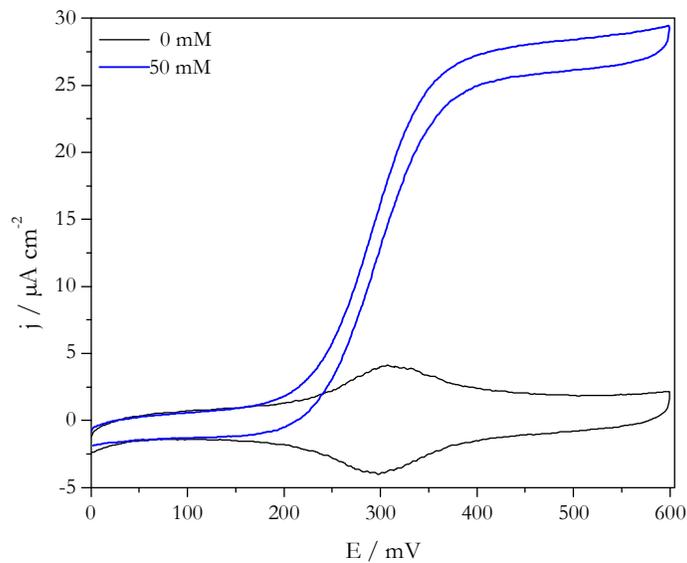
#### 5.3.2.1.2.1 Modificación con el material compuesto (Au/Os-PA+SDS)

A fin de solucionar el problema del exceso de mediador y con el objeto de mejorar la señal, se estudió el recubrimiento con una película más delgada del material compuesto. Para ello se modificó un electrodo de oro con Os-PA+SDS mediante la técnica de *spin-coating*, como se describe en 5.2.4.2.1. La voltametría cíclica en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.2 M (Figura 5.7, voltagrama en negro) muestra una  $i_p$  de  $2.8 \mu\text{A cm}^{-2}$ .

#### 5.3.2.1.2.2 Adsorción de GOx (Au/Os-PA+SDS/GOx)

Sobre esta capa inicial del material compuesto Os-PA+SDS se lleva a cabo el paso

de adsorción de GOx, como se describe en 5.2.4.2.2, obteniéndose la construcción Au/Os-PA+SDS/GOx. La Figura 5.7 (voltagrama en azul) muestra la respuesta voltamétrica obtenida en presencia de glucosa 50 mM. Esta voltametría muestra una mayor eficiencia en el proceso de transferencia electrónica entre la enzima y el mediador, ya que la corriente llega a un valor constante debido a que el sistema alcanza el estado estacionario.[151] A pesar que las corrientes obtenidas son mucho menores a las observadas para el electrodo de grafito se observa un comportamiento correspondiente a una cupla reversible, el potencial de la corriente pico anódica es igual al de la catódica.



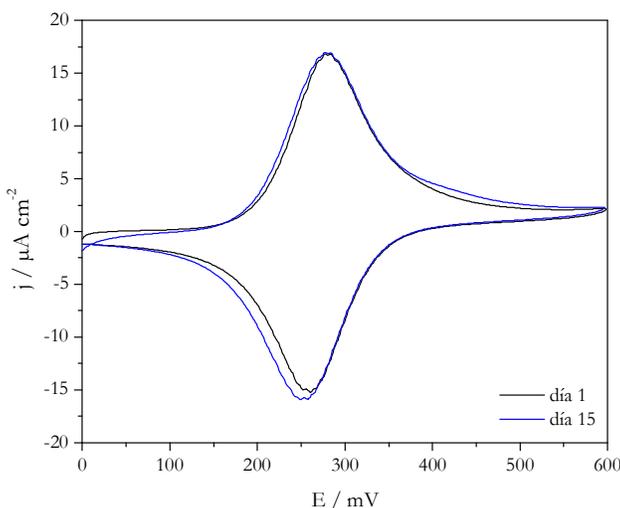
**Figura 5.7:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA+SDS/GOx, en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 + KNO<sub>3</sub> 0.2 M (voltagrama en negro), y en presencia de glucosa 50 mM (voltagrama en azul). Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>.

Si se comparan estos resultados con los resultados obtenidos para los electrodos de grafito, se observa que depositando la capa inicial de Os-PA mediante *spin-coating* se pueden construir películas con menor cantidad de osmio, y más eficientes en el proceso de transferencia electrónica con la glucosa oxidasa, ya que si bien la respuesta en corriente es menor, el aumento relativo de la corriente debido al proceso catalítico en presencia de 50 mM de glucosa es mayor ( $J_{cat}/J_{dif} = 4.6$  en el caso de gota depositada;  $J_{cat}/J_{dif} = 9.4$  en el caso de *spin-coating*).

Electrodos de oro modificados con la misma cantidad de solución de polielectrolito por unidad de superficie presentan voltagramas similares a los obtenidos en grafito (Figura

5.8) mostrando una vez más que el proceso de transferencia electrónica para estos complejos de osmio es independiente de la superficie.[18]

Utilizando electrodos de grafito se comprobó la estabilidad del material depositado a varios ciclos de oxidación y reducción (sección 5.3.2.1.1.1), sin embargo los electrodos fabricados a partir de tintas de grafito se desmenuzan luego de varias horas de estar sumergidos en un solvente acuoso. Utilizando electrodos de oro pudo estudiarse la estabilidad del complejo polielectrolito redox-surfactante en el tiempo, realizando una medida del electrodo de oro modificado inmediatamente luego de la modificación y una segunda medida luego de transcurridos 15 días de permanecer sumergido en un solución acuosa. La Figura 5.8 muestra las voltametrías cíclicas obtenidas en ambos casos: se observa que la corriente permanece constante.



**Figura 5.8:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA+SDS (capa gruesa) en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 + KNO<sub>3</sub> 0.2 M, medido el mismo día de su construcción (voltagrama en negro), y medido a los 15 días de su construcción (voltagrama en azul). Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>.

### 5.3.3 Material compuesto Os-PA+SDS-NTCs

Dado que, como se mostró en el Capítulo 4, el SDS puede ser utilizado para dispersar a los nanotubos de carbono (NTCs) y que la matriz polielectrolito-surfactante (PA+SDS) fue capaz de dispersar y retener a los NTCs en la superficie del electrodo, decidimos investigar en este caso si la nueva matriz Os-PA+SDS es capaz de incorporar también a los NTCs.

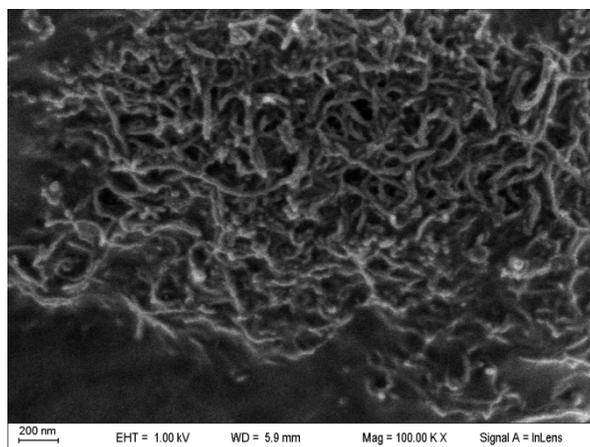
Para ello, se puso en contacto el polímero redox (Os-PA) con una dispersión de NTCs en SDS, como se describe en 5.2.3.2. Inmediatamente se formó un precipitado; este precipitado fue fácilmente redissuelto en DMF. La suspensión de NTCs obtenida resultó ser estable en el tiempo, mostrando estabilidad durante 6 meses.

### 5.3.4 Películas Os-PA+SDS-NTCs

#### 5.3.4.1 Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados

##### 5.3.4.1.1. Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS-NTCs)

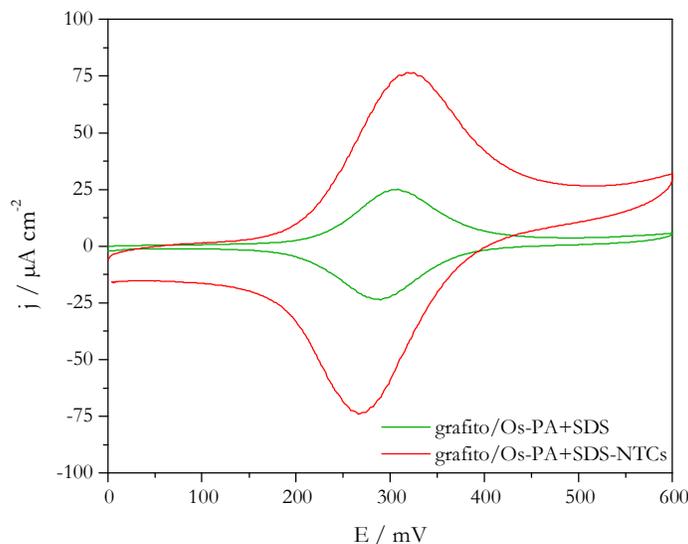
Se llevó a cabo la modificación de electrodos de grafito como se describe en 5.2.4.1.2, generándose de esta manera una capa del material compuesto Os-PA+SDS-NTCs. En la Figura 5.9 se muestran micrografías SEM del electrodo modificado. Se puede observar que los NTCs se distribuyen uniformemente sobre la superficie, mostrando una vez más que éstos son eficientemente contenidos dentro de la red polimérica.



**Figura 5.9:** Micrografía SEM de un electrodo de grafito modificado con Os-PA+SDS-NTCs.

Si comparamos la respuesta voltamétrica en buffer para el electrodo que incorpora NTCs (Figura 5.10, voltograma rojo) con el electrodo sin NTCs (voltograma verde), vemos que para el electrodo que contiene NTCs aumenta la señal debida al osmio, tomando cierto carácter difusional. La corriente obtenida es prácticamente el triple que la observada

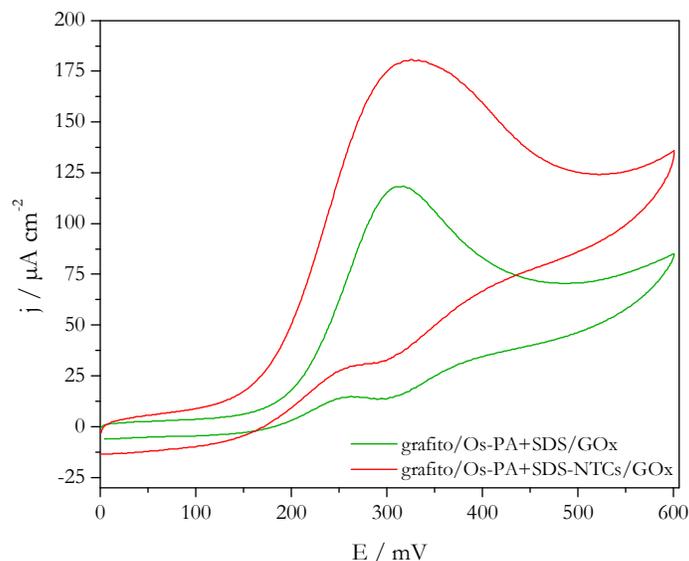
cuando el sistema no contiene NTC. Esto podría atribuirse a que, debido a la presencia de los NTCs, prácticamente toda la masa de Os-PA depositada está conectada.



**Figura 5.10:** Voltametrías cíclicas para los sistemas: grafito/Os-PA+SDS (voltagrama en verde), y grafito/Os-PA+SDS-NTCs (voltagrama en rojo), en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 + KNO<sub>3</sub> 0.2 M. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>.

#### 5.3.4.1.2 Adsorción de GOx (grafito/Os-PA+SDS-NTCs/GOx)

Sobre una capa inicial del material compuesto se lleva a cabo el paso de adsorción de GOx, como se describe en 5.2.4.1.3, obteniéndose la construcción grafito/Os-PA+SDS-NTCs/GOx. La Figura 5.11 muestra la respuesta voltamétrica obtenida en presencia de glucosa 50 mM (línea roja) comparada con la respuesta, en las mismas condiciones, del electrodo sin NTCs (línea verde). Si comparamos la respuesta de ambos electrodos, si bien hay un aumento de la señal para el electrodo con NTCs, este aumento no es tan significativo como sería de esperar a partir del resultado anterior. Es decir, se observa mejora de la conexión del osmio con grafito pero no se pudo mejorar de manera apreciable la catálisis. Esto puede deberse a que este entorno no mejora la adsorción de GOx o su conexión al polielectrolito.



**Figura 5.11:** Voltametrías cíclicas para los sistemas: grafito/Os-PA+SDS/GOx (voltagrama en verde), y grafito/Os-PA+SDS-NTCs/GOx (voltagrama en rojo), en presencia de glucosa 50 mM. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>.

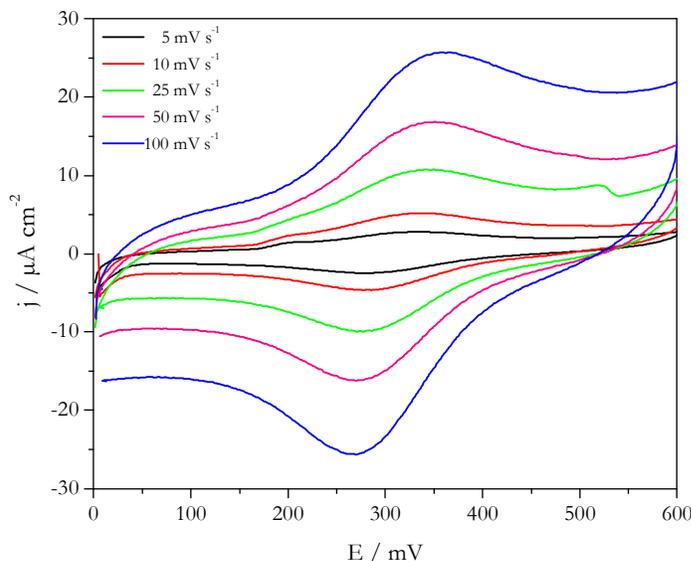
### 5.3.5 Optimización de la modificación de los electrodos de grafito

En base a todos los resultados anteriores obtenidos para electrodos de grafito, teniendo en cuenta los problemas de difusión y habiendo visto además que sobre electrodos de oro, a través del depósito de la capa inicial mediante *spin-coating* (capa delgada), se logra una mayor eficiencia en el proceso de transferencia electrónica entre la enzima y el mediador, se decidió buscar las condiciones necesarias para optimizar la construcción sobre grafito. Este objetivo fue logrado aplicando una capa más delgada del material inicial, como se muestra a continuación.

#### 5.3.5.1 Modificación con el material compuesto (grafito/Os-PA+SDS)

Se llevó a cabo la modificación de un electrodo de grafito de 0.38 cm<sup>2</sup> de área geométrica, como se describe en 5.2.4.1.1, pero utilizando en este caso 2 μL del material compuesto (en lugar de 5 μL), generándose de esta manera una capa del complejo Os-PA+SDS más delgada. Luego, el electrodo fue enjuagado y se realizaron voltametrías cíclicas, a distintas velocidades de barrido, en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, conteniendo KNO<sub>3</sub> 0.2 M (Figura 5.12). Se puede observar que a medida que la velocidad de barrido es

mayor, la forma de los voltagramas cambia de un voltagrama correspondiente a una especie adsorbida a uno correspondiente a una especie que difunde. A partir de la voltametría de  $5 \text{ mV s}^{-1}$  puede calcularse una carga de  $20 \text{ } \mu\text{C}$ . Teniendo en cuenta la superficie de este electrodo y de los presentados en la sección 5.3.2.1.1.1, la disminución de la carga por unidad de superficie es de 5 veces.



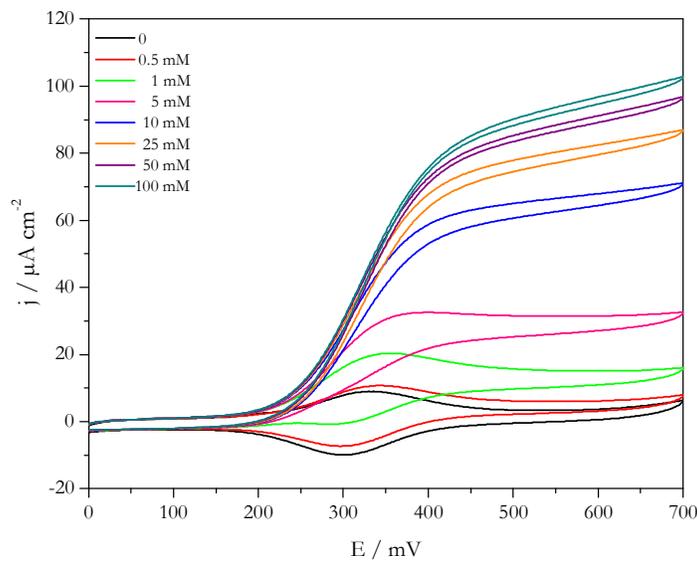
**Figura 5.12:** Voltametrías cíclicas para el sistema grafito/Os-PA+SDS (capa delgada), en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M, a distintas velocidades de barrido.

Este comportamiento puede explicarse a partir del espesor de la película y la velocidad de propagación de carga observada para este nuevo material compuesto. Esta es una importante diferencia con los sistemas autoensamblados, donde el sistema se comporta como una especie adsorbida para todas las velocidades de barrido. Es interesante analizar si este comportamiento se debe únicamente al espesor de la película o a la eficiencia del transporte de electrones en este nuevo material.

### 5.3.5.2 Adsorción de GOx (grafito/Os-PA+SDS/GOx)

Sobre esta capa inicial del material compuesto Os-PA+SDS se lleva a cabo el paso de adsorción de GOx, como se describe en 5.2.4.1.3, obteniéndose la construcción grafito/Os-PA+SDS/GOx. La Figura 5.13 muestra la respuesta del electrodo a diferentes concentraciones de glucosa. A altas concentraciones de glucosa se observa una densidad de

corriente cercana a  $100 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Para esta nueva construcción optimizada se observa que el sistema entra en un estado estacionario en forma inmediata. A diferencia de lo que se observa en el capítulo 3, y en trabajos presentados por otros autores,[95-96] la corriente no satura a 50 mM o concentraciones menores.



**Figura 5.13:** Voltametrías cíclicas para el sistema grafito/Os-PA+SDS (capa delgada), en concentraciones crecientes de glucosa. Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 5.3.6 Simulación Numérica

Con el fin de comprender mejor el proceso cinético-difusional involucrado en el proceso de sensado de glucosa y las diferencias observadas con los sistemas de autoensamblado, se procedió a analizar los experimentos de optimización realizados utilizando un modelo numérico. Un importante antecedente sobre este tipo de tratamiento es la tesis de Victoria Flexer[152] y las referencias allí citadas.

#### 5.3.6.1 Condiciones del modelo numérico

Como condiciones iniciales para el modelado numérico se utilizaron las mismas condiciones experimentales utilizadas en los apartados anteriores; la concentración del complejo de osmio se obtuvo a partir de la carga y del espesor de la película. La concentración de GOx se determinó usando los resultados experimentales en condiciones

de saturación.

El sistema experimental se modeló resolviendo las ecuaciones de *Poisson* y *Fick* con un software de elementos finitos descrito anteriormente.[153] La dimensión espacial se estableció en 2D, las condiciones de contorno fueron las de difusión lineal para un electrodo plano infinito y especies electroactivas contenidas en una capa de 1  $\mu\text{m}$ . La corriente generada se calcula mediante la ecuación de *Butler-Volmer*.

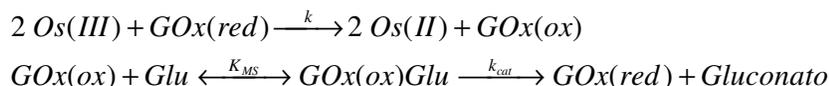
$$\frac{j}{F} = k_0 \left[ C_O \exp\left(\frac{-\alpha F}{RT} (E - E_{eq})\right) - C_R \exp\left(\frac{(1-\alpha)F}{RT} (E - E_{eq})\right) \right]$$

donde  $C_R$  y el  $C_O$  son las concentraciones, en la superficie del electrodo de trabajo, de las especies reducida y oxidada del osmio, respectivamente;  $k_0$  es la constante de velocidad de transferencia electrónica estándar;  $\eta = E - E_{eq}$  es el sobrepotencial aplicado y  $E_{eq}$  es el potencial de equilibrio del electrodo. Se empleó un valor de  $k_0 = 0.1 \text{ m s}^{-1}$ . Este valor surge del ajuste del modelo a las voltametrías cíclicas experimentales realizadas en ausencia de catálisis. Utilizando este valor, el modelo es capaz de reproducir las alturas de los picos y la separación entre picos de las voltametrías cíclicas realizadas a diferentes velocidades de barrido.

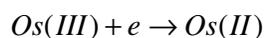
El modelo describe la situación general de un mediador redox inmovilizado en la superficie del electrodo. Se relacionaron los valores experimentales de concentración de osmio total, igual a  $3.3 \times 10^{-10} \text{ mol}$ , con la concentración molar de osmio conectado, igual a 8 mM, para un electrodo de área de  $0.38 \text{ cm}^2$  y para una película de espesor de 1  $\mu\text{m}$ . La velocidad del proceso de transferencia electrónica entre centros redox se estableció teniendo en cuenta los valores reportados en literatura y encontrándose que en nuestro caso es equivalente a un coeficiente de difusión de  $1.2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [92] y la velocidad de barrido se seleccionó según las condiciones experimentales.

El modelo introduce el siguiente sistema catalítico:

En la película:



En el electrodo:

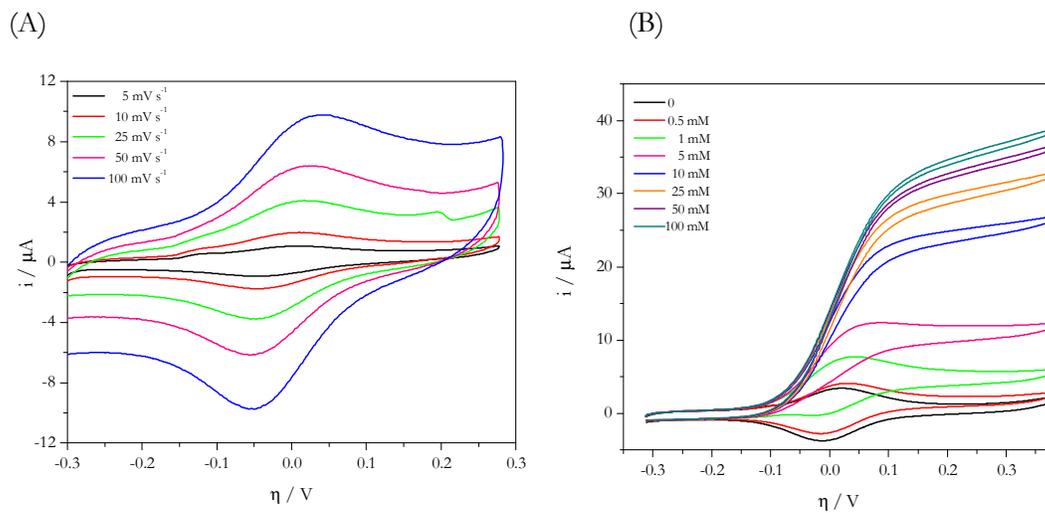


donde  $Glu$  = glucosa y las constantes cinéticas de velocidad referidas a la regeneración de la enzima y a la catálisis son, respectivamente,  $k = 1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{\text{cat}} = 700 \text{ s}^{-1}$ . Los valores de coeficientes de difusión  $D_{\text{GOx}} = 0$ ,  $D_{\text{Glu}} = 6.72 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  se tomaron de la referencia [96]. La constante de *Michaelis-Menten* en este medio y la concentración de la enzima conectada derivan del ajuste del modelo a la voltametría cíclica experimental.

### 5.3.6.2 Resultados de la simulación numérica

#### 5.3.6.2.1 Simulación para el sistema grafito/Os-PA+SDS

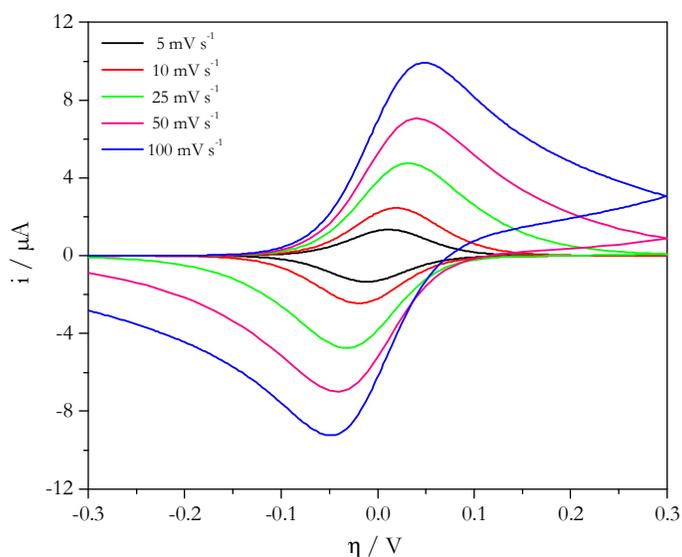
A partir de los resultados experimentales obtenidos en la sección 5.3.5.1 y 5.3.5.2, se grafican nuevamente los voltagramas, esta vez en función de  $\eta$  (Figura 5.14) a fin de compararlos con los gráficos obtenidos mediante simulación.



**Figura 5.14:** Voltametrías cíclicas experimentales para el sistema grafito/Os-PA+SDS (capa delgada), en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 +  $\text{KNO}_3$  0.2 M: (A) a distintas velocidades de barrido; (B) en concentraciones crecientes de glucosa. Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

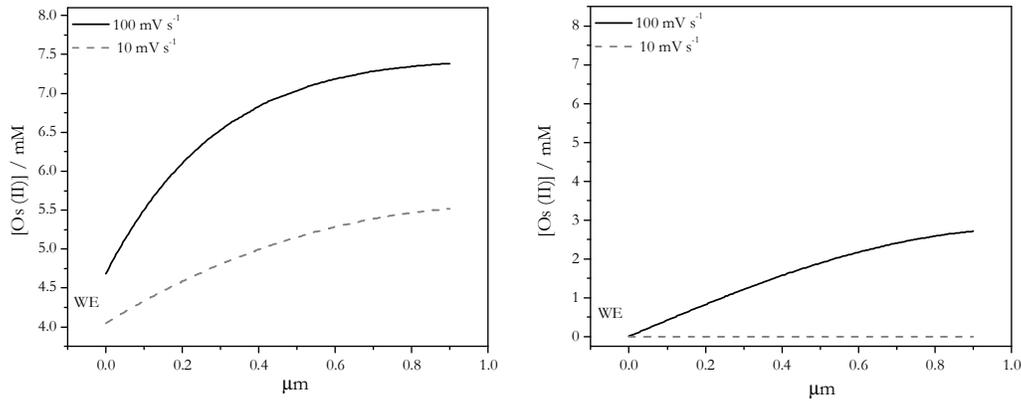
Se desarrolló un modelo numérico, basado en un software de elementos finitos[153] en el que se asume que el mediador está confinado en el interior de la película; la propagación de carga dentro de la película se produce por libre intercambio de electrones (*electron hopping*) entre las formas reducida y oxidada del mediador, descrito por un coeficiente de difusión  $D_{\text{ch}}$ . La electroquímica de electrodos modificados con una capa

gruesa, similares al presentado en este trabajo, muestra un coeficiente  $D_{\text{eh}}$  en el orden de  $10^{11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , [154] mientras que para el caso de películas delgadas este valor está en el orden de  $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . [11, 14] Teniendo en cuenta estas dos situaciones, se encontró que usando el coeficiente de difusión obtenido por Calvo y colaboradores. [92] para un polielectrolito de características similares, es posible simular con gran precisión los resultados experimentales (Figura 5.15), mostrando que esta película construida en tan solo dos pasos de ensamblado presenta un eficiente proceso de transferencia electrónica, y que el comportamiento observado es una consecuencia del espesor de la película autoensamblada.



**Figura 5.15:** Simulación digital de las voltametrías cíclicas presentadas en la Figura 5.14(A) teniendo en cuenta el coeficiente de difusión electrónica ( $D_{\text{eh}}$ ) de  $1.2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

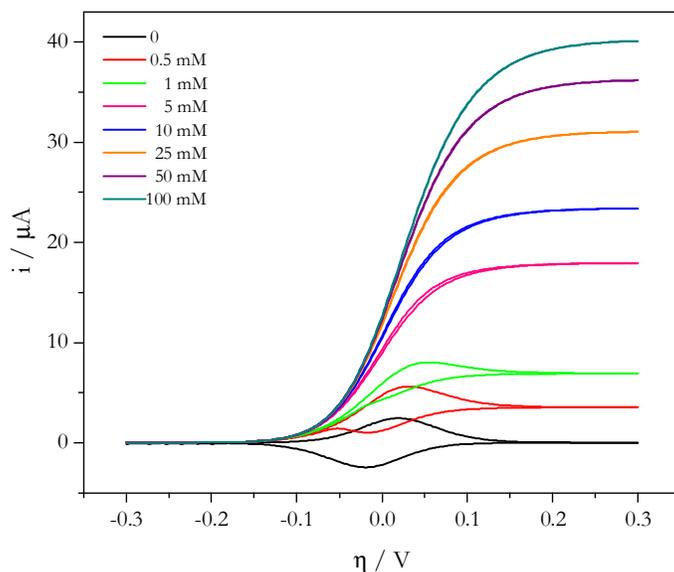
El modelo numérico permite también describir el perfil de concentración a diferentes potenciales. La Figura 5.16 muestra el perfil de concentración de Os(II) a dos velocidades de barrido diferentes ( $10$  y  $100 \text{ mV s}^{-1}$ ) cuando el electrodo está en  $\eta = 0$  y  $0.3 \text{ V}$ . Cuando se barre a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , la especie reducida está totalmente consumida a altos sobrepotenciales; mientras que para un barrido a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  se observa un perfil de concentración correspondiente a un proceso de difusión.



**Figura 5.16:** Simulación digital de concentración de Os(II) a través de la película. Izquierda: a  $\eta = 0$  V. Derecha, a  $\eta = 0.3$  V.

### 5.3.6.2.2 Simulación para el sistema grafito/Os-PA+SDS/GOx

Como ya se indicó, a altas concentraciones de glucosa se observa una densidad de corriente cercana a  $100 \mu\text{A cm}^{-2}$ , y se observa que el sistema entra en un estado estacionario en forma inmediata. Otra característica del sistema es el rango dinámico para glucosa; como puede verse en la Figura 5.14, la corriente catalítica aún aumenta a una concentración de glucosa de 100 mM. Este comportamiento fue analizado por el modelo numérico propuesto utilizando valores de coeficientes de velocidad obtenidos por Flexer *et al.*[96] para sistemas autoensamblados. Con el propósito de ajustar los valores simulados con los experimentales se ha modificado  $K_{MS}$ . El valor utilizado fue de 200 mM, un valor alto en comparación con los reportados en literatura, que van desde 50 hasta 120 mM;[17, 155] sin embargo, esto tiene sentido para los resultados experimentales obtenidos, ya que en nuestro caso no se observa saturación de la respuesta, mientras que en muchos trabajos presentados en la literatura la enzima se encuentra saturada a concentraciones inferiores a 50 mM (Figura 5.17).



**Figura 5.17:** Simulación digital de la respuesta a la adición de glucosa, presentada en la Figura 5.14(B).

#### 5.4 Discusión y resumen

A diferencia del sistema PA+SDS mostrado en el capítulo anterior, el polielectrolito redox no forma una dispersión coloidal en presencia de SDS, sino que genera un precipitado. Mediante microanálisis elemental del sólido obtenido se concluye que la estequiometría entre el monómero de alilamina y el dodecilsulfato es 1:1. El sólido se solubiliza fácilmente en DMF o metanol y esta solución puede aplicarse indistintamente sobre superficies de grafito o de oro. La evaporación de esta solución genera una película extremadamente estable y resistente, que presenta una estructura lamelar con un espaciado de 4.15 nm y a diferencia de lo observado en el capítulo anterior el sistema presenta una orientación perpendicular a la superficie y muestra un comportamiento electroquímico cuasi reversible aun en películas relativamente gruesas. Sobre esta película se adsorbe una enzima redox. En estas condiciones el complejo de osmio actúa como un eficiente mediador redox entre la superficie del electrodo y la enzima.

Este nuevo sistema presenta dos ventajas muy importantes: en primer lugar se simplifica extremadamente la construcción del sensor, ya que el método de autoensamblados capa por capa requiere de numerosos pasos y de una considerable cantidad de tiempo, mientras que en este caso sólo es necesario llevar a cabo dos pasos

extremadamente sencillos, reduciendo los tiempos de manera notable. En segundo lugar, este tipo de construcción permite suprimir el uso de tioles como primer paso de modificación del electrodo, lo que constituye una gran ventaja dado que los tioles deben prepararse en el momento de ser usados y no son estables en el tiempo una vez adsorbidos. Por otra parte, el uso de tioles requiere de una superficie de oro, mientras que en este caso puede elegirse libremente la superficie conductora a utilizar.

Sin embargo, la forma de la voltametría mostrada en la Figura 5.5 (voltagrama en azul) indica la presencia de un exceso de mediador, lo cual constituía un aspecto a mejorar. Este problema fue exitosamente resuelto para superficies de oro utilizando la técnica de *spin-coating*, como se muestra en la Figura 5.7, mientras que en el caso de superficies de grafito se resolvió optimizando la cantidad de material depositado, como se muestra en la Figura 5.13.

Dependiendo de la velocidad de barrido, la respuesta electroquímica del sistema cambia su comportamiento de una especie adsorbida a una que difunde. En cuanto a la respuesta a glucosa, las características de la película también producen un cambio importante en el rango dinámico de la corriente catalítica, incrementando la concentración a la que se satura la enzima. Este cambio en el rango dinámico puede atribuirse a que la reacción de glucosa con la enzima es más lenta en el entorno que se encuentra en este sistema, y por eso el aumento en el valor de  $K_{MS}$ , aunque para confirmar esta hipótesis es necesaria mayor información experimental.



---

## Capítulo 6

Sistema Os-PA-lactosa+SDS



## 6.1 Introducción y Objetivos

El funcionamiento de los biosensores enzimáticos amperométricos depende fuertemente de las características de la arquitectura interfacial y de la calidad de la asociación entre la enzima redox y la superficie del electrodo. Como consecuencia, la enzima es generalmente inmovilizada en medios artificiales, sometidos a interacciones diferentes a las encontradas en su medio natural. Por ello, además de mantener la conformación y retener la actividad biológica de la enzima, el procedimiento de inmovilización debe garantizar la accesibilidad del analito y de otras moléculas involucradas en el evento de bioreconocimiento a su sitio activo. Así, la elección de la técnica de construcción del electrodo debe contemplar varios parámetros, incluyendo la estabilidad enzimática, reproducibilidad y aspectos cinéticos, entre otros.[156]

Es sabido que muchas metodologías de inmovilización pueden inducir cambios conformacionales en la enzima, que pueden ser acompañados por una significativa pérdida de actividad.[157-158] En este marco, el ensamblado biosupramolecular por reconocimiento directo surge como una interesante y atractiva alternativa debido a su simplicidad y versatilidad, sin introducir modificaciones químicas a la enzima. Este enfoque no covalente se basa en la notable selectividad de la interacción entre los bloques de construcción constitutivos,[159-164] sin el requerimiento de pasos de modificaciones químicas.[165] En el caso de glicoenzimas, ha sido demostrado que esta metodología permite la rápida inmovilización de considerables cantidades de proteínas sobre superficies modificadas con lectinas.[166] Otra ventaja clave de esta estrategia es que al inmovilizar una glicoenzima a través de su molécula de carbohidrato, no se afecta su sitio prostético, ya que la región de carbohidrato está generalmente localizada en áreas que no están involucradas en la actividad enzimática, y entonces la enzima puede retener la mayoría de sus funciones biológicas aún cuando sus regiones carbohidratadas están conjugadas o bloqueadas.[159-160, 165-170]

En capítulos anteriores se ha mostrado que la formación del complejo polielectrolito-surfactante presenta interesantes propiedades para el desarrollo de nuevos materiales dedicados a la construcción de sensores y dispositivos bioelectrónicos. El polielectrolito puede aportar al complejo estabilidad mecánica y térmica, mientras que el surfactante introduce cierto ordenamiento formando estructuras estratificadas. En el Capítulo 5 hemos demostrado que al introducir un complejo de osmio en la estructura PA y combinar ese polielectrolito redox con SDS se produce un material muy estable y con una notable capacidad de propagación de cargas cuando es aplicado sobre distintas superficies

conductoras, especialmente grafito y oro.

En este capítulo presentamos la incorporación del disacárido lactosa al polielectrolito redox con el objeto de introducir un residuo glicosídico (glucosa) capaz de anclar proteínas lectínicas, las cuales reconocen específicamente ciertos azúcares. Mediante esta estrategia se pretende desarrollar un método universal para generar autoensamblados independientemente de la superficie conductora con la que se desee trabajar y utilizando más de un modo de reconocimiento molecular. El concepto se ilustrará empleando concanavalina A modificada con un complejo de osmio (Os-ConA) autoensamblada con la glicoenzima HRP. Este procedimiento posibilitará la inmovilización de HRP por un método suave, permitiendo una eficiente transferencia electrónica entre el electrodo y la enzima redox, los resultados obtenidos se comparan con los recientemente publicados por Pallarola *et al.*, [171] trabajo en el cual se ha podido autoensamblar HRP-C a electrodos de oro mediante el uso de tioles y Os-ConA.

### 6.1.1 Características de la concanavalina A

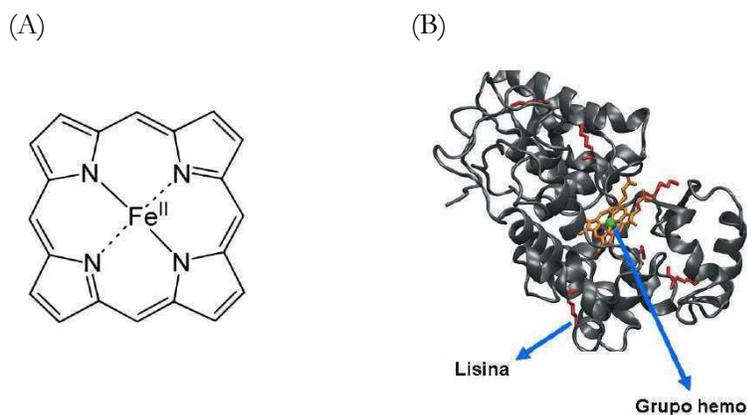
La concanavalina A (ConA) es la más estudiada de las proteínas lectínicas, debido a su presencia en alta concentración en el poroto *Canavalia ensiformis* y a la simplicidad de su purificación. Además de su uso en el aislamiento y caracterización de varios glicoconjugados, ha sido empleada como ligando efectivo en la inmovilización de glicoenzimas. La ConA ha sido secuenciada, y su estructura tridimensional detallada se encuentra resuelta; existe como tetrámero de masa molecular de 104 kDa a pH neutro, [172-175] y cada monómero de ConA contiene un sitio de unión de ion calcio, un sitio de unión de un metal de transición y un sitio de unión de carbohidrato (específico para  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa), también conocido como sitio de combinación. [176-177] El sitio de unión de carbohidrato está cerca del sitio de unión del metal, pero ambos centros no se solapan. [178-179] Estas propiedades permiten a la ConA actuar como un puente de bioafinidad entre una superficie modificada con un azúcar y una glicoproteína. Esta clase de inmovilización orientada provee buena accesibilidad estérica, ya que los residuos carbohidrato están usualmente localizados lejos del sitio activo.

### 6.1.2 Características de la enzima peroxidasa de rábano picante

La peroxidasa de rábano picante (*Horseradish peroxidase*, HRP) es una glicoproteína muy utilizada en ensayos clínicos. Alrededor de 40 isoenzimas han sido detectadas a partir

de preparaciones comerciales impuras. En términos prácticos, la mayor parte de los trabajos experimentales se centran en solo tres isoenzimas: isoenzima A (ácida); isoenzima C (neutra o ligeramente básica), y una HRP fuertemente básica. De estas tres isoenzimas, la más estudiada es la isoenzima C.[180] El hecho de que esta isoenzima sea prácticamente neutra y altamente soluble debido a la presencia de residuos glicosídicos en su parte externa representa un desafío para su incorporación en sistemas autoensamblados. Recientemente Pallarola *et al.*[171] han podido autoensamblar HRP-C a electrodos de oro mediante el uso de tioles conteniendo residuos manosa y lectinas modificadas con complejos de osmio explotando la existencia de ocho cadenas laterales neutras de carbohidratos, observando un eficiente proceso de transferencia de carga.

La HRP-C contiene 308 residuos de aminoácidos. El extremo N-terminal está bloqueado por un residuo de pirrolidín carboxílico. El extremo C-terminal corresponde a un residuo de serina. El grupo prostético hemo (hierro-porfirina) (Figura 6.1) está unido a través de la posición de coordinación 5 del Fe(III) a la cadena lateral de imidazol de la histidina 70. Ambos, la histidina proximal y un residuo histidina distal situado dentro del entorno del enlace puente de H del ligando  $H_2O$ , cumplen un rol fundamental en la actividad catalítica.

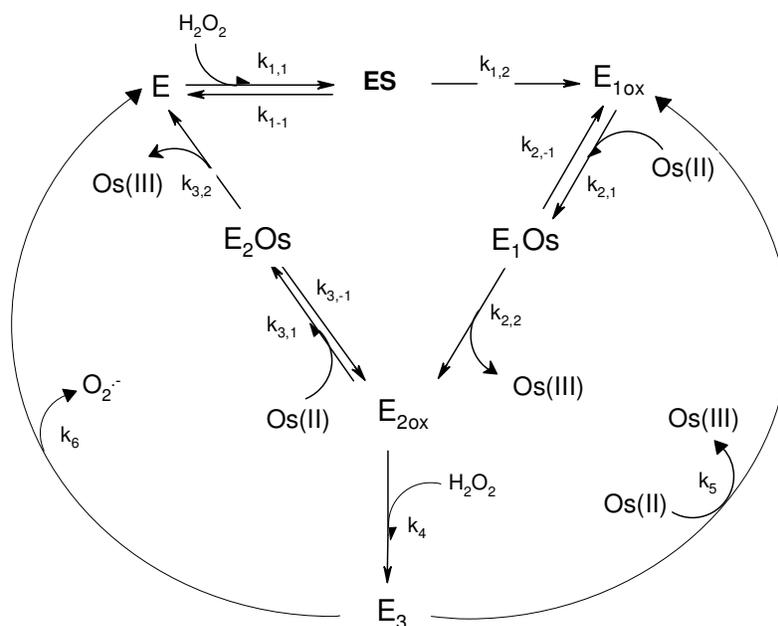


**Figura 6.1:** (A) estructura del grupo hemo; (B) estructura tridimensional del monómero de HRP.

La enzima posee dos iones  $Ca^{2+}$  por molécula, que contribuyen a la estabilidad estructural en la región del sitio activo,[181] y si bien no participan en el mecanismo catalítico, su remoción causa una perturbación en la vecindad del hemo, lo cual produce una disminución de la actividad enzimática. Los residuos de aminoácidos poseen una masa

de 33890 Da, el grupo hemo 550.5 Da, y los dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  80 Da, resultando en una masa molecular de 34520 Da. La región oligosacárida corresponde al 18% de la enzima, resultando en una masa molecular total para la HRP-C de 42100 Da.[180] La enzima es estable a temperatura ambiente en un intervalo de pH entre 5 y 10.

Las peroxidasa catalizan la oxidación de un extenso número de sustratos orgánicos por peróxido de hidrógeno y por peróxidos orgánicos. El ciclo catalítico de la HRP se muestra en la Figura 6.2.



**Figura 6.2:** a) Estructuras del centro redox de la enzima en sus distintos estados de oxidación,  $E$ ,  $E_{1ox}$  y  $E_{2ox}$ ; b) Ciclo catalítico para HRP, donde  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el sustrato de la enzima,  $Q$  (donor de  $e^-$ ) es el cosustrato y  $P$  es el producto.

$E_{1ox}$  y  $E_{2ox}$  son los estados oxidados de la ferriperoxidasa nativa ( $E$ ), usualmente denominados compuestos I y II, respectivamente.  $Q$  es el sustrato reductor y  $P$  es la contraparte oxidada. El primer paso de la catálisis corresponde a una rápida transferencia de un átomo de oxígeno del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , sustrato de la enzima) a la porfirina férrica ( $\text{Fe}^{III}$ ) de la HRP, formalmente una oxidación que involucra  $2e^-$ , para formar el intermediario catión  $\pi$  radical hemo oxiferril ( $[\text{Fe}^{IV}=\text{O}]^{++}$ )  $E_{1ox}$  (con un estado de oxidación formal del hierro: +V) y agua. En ausencia de donores de  $e^-$  adecuados,  $E_{1ox}$  se descompone lentamente. En el segundo paso, el catión radical de la porfirina del compuesto I se reduce

por  $Q$  (proceso de  $1e^-$ ) para dar el intermediario oxiferril  $E_{2OX}$  (estado de oxidación formal del hierro: +IV) y el producto  $P$ . En el último paso, la enzima vuelve a su forma nativa ( $E$ ) mediante un proceso que involucra  $1e^-$  y  $2H^+$ .  $E_{2OX}$  se reduce por una segunda molécula  $Q$  para dar un segundo equivalente de  $P$  y agua. Una concentración relativamente elevada de  $H_2O_2$  puede inhibir a la enzima a partir de la reacción de  $E_{2OX}$  con  $H_2O_2$ . Una discusión más completa puede encontrarse en la referencia [182].

## 6.2 Experimental

### 6.2.1 Reactivos

Dodecilsulfato de sodio (SDS) fue provisto por Kodak. Concanavalina A (ConA, extraída del poroto *Canavalia ensiformis*), peroxidasa de rábano picante (HRP, tipo VI; RZ = 3.1), lactosa, galactosa oxidasa (obtenida de *Dactylium dendroides*) y buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) fueron provistos por Sigma. Peróxido de hidrógeno 30% ( $H_2O_2$ ) fue provisto por Carlo Erba y su concentración fue determinada mediante titulación con permanganato de potasio. Las membranas de diálisis de celulosa regenerada (RC Spectra/Por) de corte molecular 3500 se obtuvieron de Spectrum® Laboratories. Dimetilsulfóxido (DMSO) fue provisto por Mallinckrodt y dimetilformamida (DMF) fue provista por Carlo Erba. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Las soluciones *stock* de  $H_2O_2$  se prepararon, inmediatamente antes de ser utilizadas, en concentración 13 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo  $KNO_3$  0.1 M.

#### 6.2.1.1 Conjugación de ConA con complejos de osmio (Os-ConA)

La concanavalina A modificada con un complejo de Osmio (Os-ConA) fue previamente sintetizada en nuestro laboratorio por el Dr. D. Pallarola.[183] Brevemente, la ConA fue marcada con  $[Os(bpy)_2ClpyCHO]^+$  mediante el uso de un espaciador de polietilenglicol (PEG) de 336 Da conteniendo un grupo amino y un grupo carboxilato como grupos funcionales terminales; la elección de este *linker* se basa en su habilidad para exponer los centros redox a la solución circundante, facilitando su conexión a la enzima y para inhibir interacciones inespecíficas con el medio biológico debido a su carácter hidrofílico. Se incorporaron 12 sondas redox.

## 6.2.2 Material compuesto Os-PA-lac+SDS

Como se mencionó anteriormente, en este capítulo presentamos la incorporación del disacárido lactosa al polielectrolito redox, y su posterior combinación con SDS, para obtener este nuevo material compuesto que en adelante será denominado Os-PA-lac+SDS.

### 6.2.2.1 Síntesis del glicopolielectrolito redox Os-PA-lac

36 mg de lactosa fueron disueltos en 2 mL de buffer HEPES 100 mM, pH 6.5; la solución se saturó con oxígeno y se mantuvo bajo agitación. Se agregaron 200 U de galactosa oxidasa. La mezcla de reacción se incubó por 48 horas a 37 °C con agitación y bajo atmósfera de oxígeno.[184] Finalizada la reacción, se enfrió la solución a temperatura ambiente y la mezcla fue centrifugada con el fin de separar las impurezas que acompañan a la enzima. La lactosa modificada presente en el sobrenadante fue purificada cromatográficamente a temperatura ambiente utilizando dos columnas de desalado Hitrap en serie (GE Healthcare de 5 mL de capacidad cada una). A tal efecto se empleó un sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) Modelo ÄKTA Explorer 10 (GE Amersham). El buffer de elución empleado fue buffer HEPES 15 mM pH 7.4, conteniendo NaCl 15 mM. La columna fue equilibrada con al menos 2 volúmenes de columna de buffer de elución. La muestra fue inyectada y eluída isocráticamente a un flujo de 5 mL min<sup>-1</sup>, colectando fracciones de 3 mL. El seguimiento de la corrida cromatográfica se realizó registrando cambios de conductividad respecto al valor que presenta el buffer de elución. Finalmente, las fracciones fueron agrupadas y liofilizadas. La lactosa modificada, purificada y liofilizada se conservó a -20 °C hasta su utilización.

La fracción de lactosa modificada y liofilizada, fue disuelta en 1.5 mL de buffer HEPES 50 mM pH 7.4.

Por otro lado, a 2 mL de solución de Os-PA 0.2 mM en agua Milli-Q se les agregó un exceso de cianoborohidruro de sodio y sobre esta solución se adicionó la solución de lactosa en buffer HEPES. La mezcla resultante se dejó reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación, y finalmente, bajo constante agitación, se le adicionó una solución de borohidruro de sodio en agua y se dejó reaccionar 1 hora a temperatura ambiente.

El producto fue dializado contra agua Milli-Q durante 48 horas usando tubos de corte molecular 3500 Da, y liofilizado.

### 6.2.2.1.1 Caracterización de Os-PA-lac

El glicopolielectrolito redox obtenido, Os-PA-lac, fue caracterizado mediante espectroscopía RMN  $^1\text{H}$  empleando un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz. Las señales presentes entre 6.75 y 8.75 ppm corresponden a los ligandos piridínicos del complejo de osmio, mientras que las señales en la región entre 0.75 y 3.25 ppm corresponden al esqueleto del polielectrolito. Entre 3.25 y 4.65 ppm se observan las señales correspondientes a la lactosa, indicando la introducción del fragmento glicosídico en la estructura del polielectrolito. Por integración de las señales pudo calcularse una relación de lactosa:alilamina de 1:10 (una lactosa por cada 10 monómeros) y complejo de osmio:alilamina igual a 1:35.

El producto de la reacción también fue caracterizado por análisis elemental de CHNS empleando un equipo Carlo Erba EA 1108. Cálculos estequiométricos a partir de los resultados de análisis elemental permitieron obtener una relación lactosa:alilamina de 1:10, confirmando el resultado anterior.

### 6.2.2.2 Síntesis del material compuesto Os-PA-lac+SDS

A partir de Os-PA-lac liofilizado se preparó una solución 0.2 mM en agua Milli-Q. 200  $\mu\text{L}$  de dicha solución se mezclaron con 400  $\mu\text{L}$  de una solución 1% de SDS en agua; la mezcla generó de manera inmediata un precipitado, que fue separado fácilmente mediante centrifugación. Este precipitado es parcialmente soluble en dimetilformamida (DMF), por tal motivo se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de DMSO y se sonicó durante 15 minutos para favorecer la total disolución. El DMSO fue parcialmente evaporado y se completó el volumen de 500  $\mu\text{L}$  con DMF, a fin de permitir una más rápida evaporación del solvente durante la modificación de los electrodos.

### 6.2.3 Construcción de los electrodos modificados

Se emplearon como electrodos de trabajo láminas planas de silicio recubiertas con oro, construidas como se detalla en la sección 2.2.2.2.3. La superficie de oro se trató previamente según el protocolo descrito en la sección 2.2.2.3 y se verificó su limpieza por voltametría cíclica en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.8 M. Posteriormente, los electrodos fueron sometidos a modificación.

### 6.2.3.1 Modificación con el material compuesto (Au/Os-PA-lac+SDS)

El primer paso de modificación de los electrodos consistió siempre en la aplicación de una capa de espesor uniforme, mediante la técnica de *spin-coating*, de la solución de Os-PA-lac+SDS en DMSO/DMF. Para ello, 10  $\mu\text{L}$  de la solución se colocaron sobre la superficie de oro limpia, la cual se rotó de manera de distribuir el material homogéneamente. Los electrodos se dejaron 1 hora a temperatura ambiente, a fin de permitir la completa evaporación del solvente y finalmente fueron enjuagados con agua Milli-Q y secados con  $\text{N}_2$ .

### 6.2.3.2 Controles

Para los experimentos control, sobre electrodos modificados como se describe en 6.2.3.1 se realizaron los siguientes pasos de modificación:

#### 6.2.3.2.1 Modificación con HRP (Au/Os-PA-lac+SDS/HRP)

Un electrodo modificado se incubó en una solución de HRP 1  $\mu\text{M}$  en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM) y  $\text{MnCl}_2$  (0.5 mM) durante 1 hora. El mismo buffer se utilizó para enjuagar el electrodo, una vez finalizado el tiempo de incubación.

#### 6.2.3.2.2 Modificación con ConA y HRP (Au/Os-PA-lac+SDS/ConA/HRP)

Para el segundo experimento control, otro electrodo modificado según 6.2.3.1 se incubó en una solución de ConA 1  $\mu\text{M}$  en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM) y  $\text{MnCl}_2$  (0.5 mM) durante 1 hora. El mismo buffer se utilizó para enjuagar el electrodo, una vez finalizado el tiempo de incubación. La modificación con una capa de HRP sobre la capa de ConA se llevó a cabo repitiendo el paso 6.2.3.2.1.

### 6.2.3.3 Electrodo de trabajo

Sobre electrodos modificados según lo descrito en 6.2.3.1, se realizaron los siguientes pasos de modificación:

#### **6.2.3.3.1 Modificación con Os-ConA (Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA)**

El electrodo modificado se incubó en una solución de Os-ConA 1  $\mu\text{M}$  en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM) y  $\text{MnCl}_2$  (0.5 mM) durante 1 hora. El mismo buffer se utilizó para enjuagar el electrodo, una vez finalizado el tiempo de incubación.

#### **6.2.3.3.2 Modificación con HRP (Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP)**

El electrodo modificado se incubó en una solución de HRP 1  $\mu\text{M}$  en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM) y  $\text{MnCl}_2$  (0.5 mM) durante 1 hora. El mismo buffer se utilizó para enjuagar el electrodo, una vez finalizado el tiempo de incubación.

#### **6.2.3.3.3 Modificación (Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac)**

Una nueva capa de glicopolielectrolito fue ensamblada sobre el electrodo modificado incubándolo durante 1 hora en una solución de Os-PA-lac 0.2 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.4. El mismo buffer se utilizó para enjuagar el electrodo, una vez finalizado el tiempo de incubación.

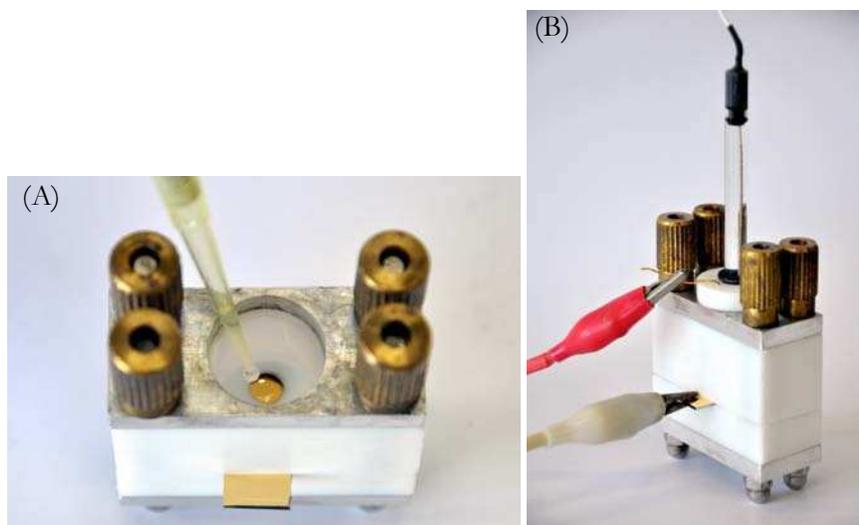
### **6.2.4 Medidas de XRR y GISAXS**

Las medidas de XRR y GISAXS fueron llevadas a cabo por el Dr. Azzaroni, como se describe en la sección 2.1.6.3. Como sustrato de apoyo se utilizaron obleas de Si(100); 50  $\mu\text{L}$  de la solución Os-PA-lac+SDS se colocaron sobre la superficie limpia, la cual se rotó de manera de distribuir el material homogéneamente.

### **6.2.5 Medidas electroquímicas**

Las medidas electroquímicas se realizaron empleando un sistema estándar de tres electrodos junto con un potencióstato (TEQ-02). El sistema consistió en un electrodo de trabajo, una malla de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia (Figura 6.3). Los electrodos de trabajo se prepararon el mismo día de su implementación. Todos los experimentos electroquímicos se realizaron a temperatura

ambiente, en una celda de teflón diseñada para exponer  $0.196 \text{ cm}^2$  de la superficie del electrodo a la solución.



**Figura 6.3:** Imágenes de (A) modificación del electrodo de oro (para los pasos de incubación); (B) celda y sistema de electrodos empleados en las medidas electroquímicas.

### 6.2.5.1 Medidas voltamétricas

Los electrodos funcionalizados fueron medidos inmediatamente luego de su preparación. Para todos los ensayos descritos, los electrodos se enjuagaron e introdujeron en la celda electroquímica. Las soluciones fueron desoxigenadas con  $\text{N}_2$  puro durante 2 minutos antes de realizar las medidas voltamétricas. Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.1 M. Los electrodos modificados se conectaron al potencióstato, dejando equilibrar con la solución. Se realizó una primera voltametría en buffer y luego se agregaron cantidades crecientes de la solución *stock* de peróxido de hidrógeno descrita en 6.2.1, de tal manera de obtener concentraciones de 0.01 mM hasta 10 mM.

### 6.2.6 Microgravimetría

Para estudiar las masas de ConA y HRP incorporadas al electrodo se realizaron mediciones en Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM), mediante la instrumentación descrita en la sección 2.1.2.1. El área geométrica del electrodo de trabajo es de  $1.33 \text{ cm}^2$ . La

superficie de oro del electrodo fue modificada con Os-PA-lac+SDS mediante *spin-coating*, tal como se describió para los electrodos de oro en la sección 6.2.3.1.

El experimento se realizó utilizando una celda de flujo de 150  $\mu\text{L}$  de volumen fabricada en teflón, conectada a una válvula selectora, la cual permitía el cambio de soluciones durante el experimento. Se trabajó a un flujo de 3  $\text{mL h}^{-1}$  durante todo el experimento. Como buffer de corrida se utilizó buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM) y  $\text{MnCl}_2$  (0.5 mM). Las soluciones de ConA y HRP fueron preparadas en el mismo buffer. En primer lugar se hizo circular por la celda un flujo del buffer. Una vez estabilizado el sistema se cambió la posición de la válvula permitiendo el paso de una solución 1  $\mu\text{M}$  de ConA y se registraron las variaciones de frecuencia y resistencia. A fin de definir de manera precisa la masa de ConA firmemente unida sobre el polielectrolito, se hizo circular nuevamente un flujo del buffer, con el objeto de lavar exhaustivamente el electrodo. A continuación, se pasó un flujo de solución 1  $\mu\text{M}$  de HRP y finalmente se repitió el paso de lavado.

## 6.3 Resultados

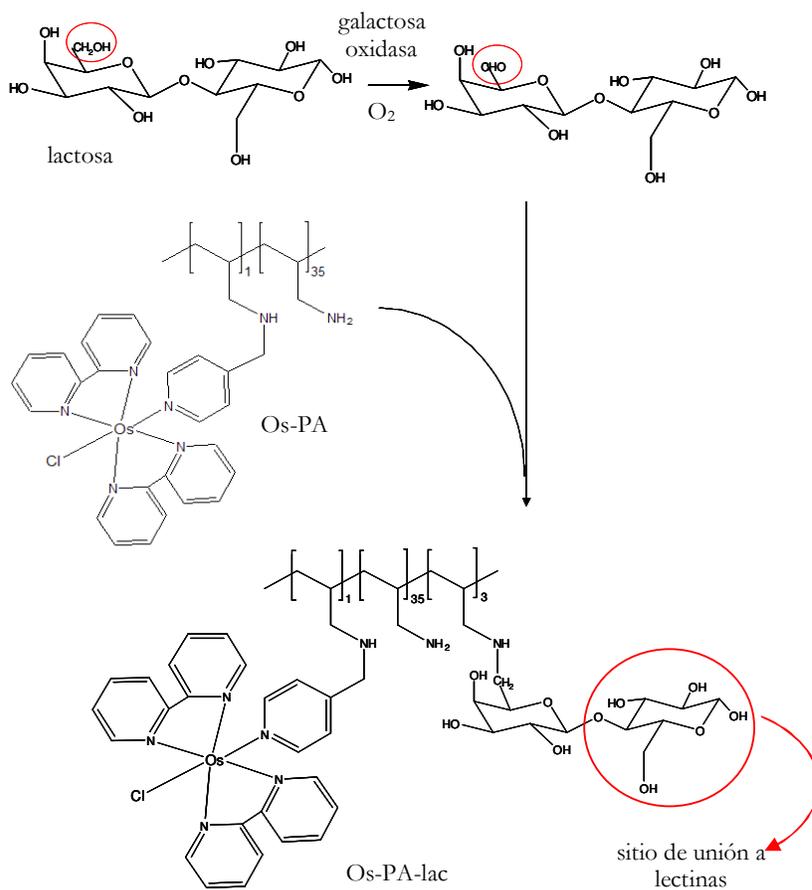
### 6.3.1 Síntesis del glicopolielectrolito redox Os-PA-lac

En la literatura se encuentra extensamente reportada la interacción electrostática entre polielectrolitos de distintas cargas[185] o con moléculas de carga contraria como enzimas[87, 186] o surfactantes.[50] También es conocida la modificación de polielectrolitos con centros redox para generar una respuesta electroactiva;[17] pero en nuestra experiencia, la síntesis de un polielectrolito redox capaz de presentar dos tipos diferentes de interacciones para la construcción de sistemas autoensamblados no ha sido previamente reportada.

La estrategia utilizada en este trabajo fue la introducción de moléculas de glucosa al polielectrolito redox de manera de permitir su posterior unión a proteínas del tipo lectina. Para llevar a cabo esta tarea se eligió la lactosa; este hidrato de carbono es un dímero formado por una galactosa y una glucosa encadenados a través de una unión glicosídica  $\beta$  1-4.

La introducción de lactosa al polielectrolito redox se logró mediante la oxidación previa del alcohol primario perteneciente al residuo galactosa, generándose un grupo aldehído que reacciona fácilmente con los aminos primarios presentes en el polielectrolito redox. Para ello se oxidó el fragmento galactosa con oxígeno y galactosa oxidasa (Figura 6.4).

El producto se incubó con el polielectrolito redox en presencia de cianoborohidruro de sodio durante toda la noche. El producto de la reacción se purificó, se liofilizó y fue analizado por RMN protónico.



**Figura 6.4:** Pasos involucrados en la síntesis del glicopolielectrolito redox Os-PA-lac.

La Figura 6.5 corresponde al espectro de  $^1H$  RMN de Os-PA-lac realizado en agua deuterada. La señales presentes entre 6.75 y 8.75 ppm corresponden a los ligandos piridínicos del complejo de osmio, mientras que las señales en la región entre 0.75 y 3.25 ppm corresponden al esqueleto del polielectrolito. Entre 3.25 y 4.65 ppm se observan las señales correspondientes a la lactosa, indicando la introducción del fragmento glicosídico en la estructura del polielectrolito. Por integración de las señales pudo calcularse una relación de lactosa:alilamina de 1:10 (una lactosa por cada 10 monómeros) y complejo de osmio:alilamina igual a 1:35.

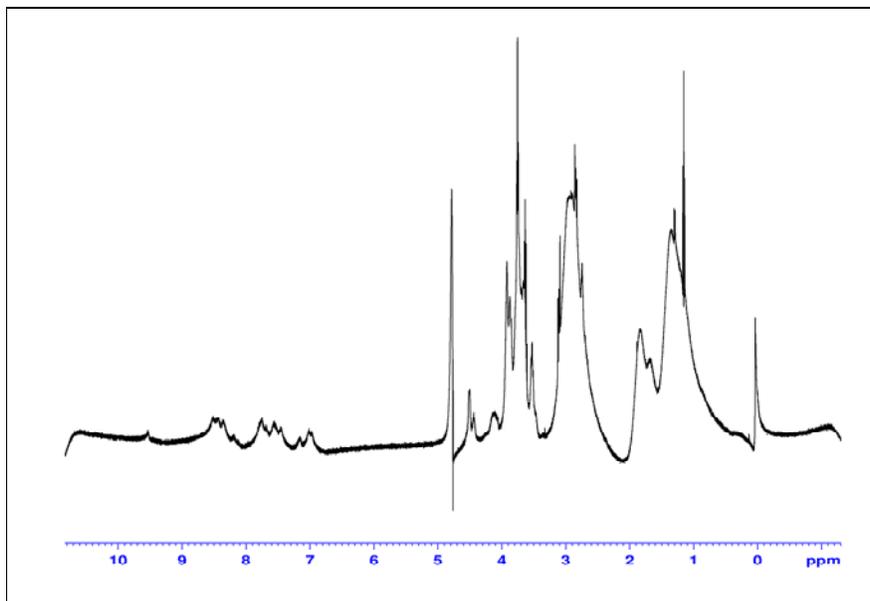


Figura 6.5: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de Os-PA-lac en  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 6.3.2 Material compuesto Os-PA-lac+SDS

La combinación de Os-PA-lac con SDS produce un precipitado que no puede solubilizarse en metanol o DMF. Evidentemente la incorporación del residuo glicosídico produce cambios en las características del complejo formado y para lograr solubilizarlo se utilizó una mezcla de DMSO-DMF. Este material se aplicó sobre las diferentes superficies de estudio mediante *spin-coating*.

### 6.3.3. Película Os-PA-lac+SDS

La solución del material compuesto puede ser fácilmente manipulada y aplicada sobre superficies de oro o silicio, produciendo una capa estable luego de la evaporación del solvente. Estudios de GISAXS para esta película muestran una región brillante (de mayor intensidad) en la dirección  $q_z$  (para  $q_y \rightarrow 0$ ) y la presencia de un halo de intensidad apreciable (Figura 6.6). Esto indicaría que si bien existen dominios lamelares ( $d = 3.67$  nm) orientados en dirección paralela al sustrato existe una fuerte contribución de dominios lamelares multi-orientados (dominios pequeños orientados aleatoriamente), lo que implica que la presencia de lactosa en el polielectrolito introduce cierto desorden en la estructura del sistema.

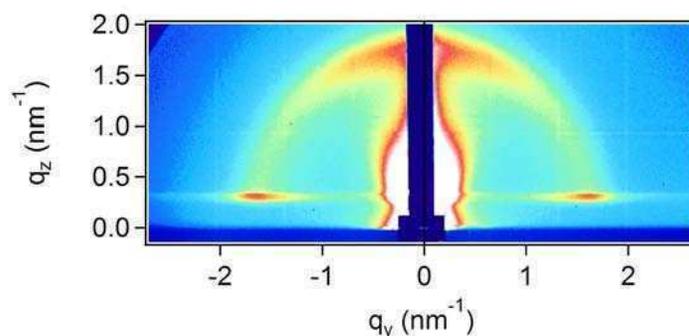


Figura 6.6: Patrón de GISAXS correspondiente a Os-PA-lac+SDS

### 6.3.4 Experimentos control

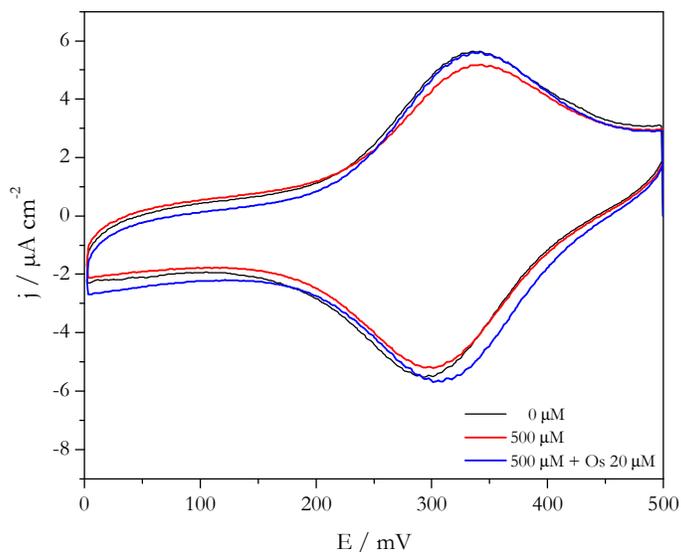
Como se discutió en el capítulo anterior, una de las ventajas del material compuesto polielectrolito-surfactante es la facilidad con la que permite modificar una superficie independientemente de su composición química. Con el objeto de comprobar que no es viable una construcción más sencilla, se realizaron dos experimentos control. Para ello, sobre electrodos de oro como los descritos en el ítem 6.2.3, se realizaron las siguientes modificaciones:

#### 6.3.4.1 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/HRP

El intercambio de electrones entre HRP y Os-PA ha sido previamente reportado.[187] En ese caso, el polielectrolito y la enzima se mantienen unidos a la superficie del electrodo mediante entrecruzamiento con polietilendiglicidiléter. Por otro lado, el autoensamblado de esta enzima con el polielectrolito no es posible y lo que se informa en la literatura es el autoensamblado de este polielectrolito con peroxidasa proveniente de poroto de soja.[91]

A fin de corroborar que la HRP no puede ser ensamblada de manera directa al glicopolielectrolito, en primer lugar se ensayó un ensamblado Au/Os-PA-lac+SDS/HRP. Para ello se realizó la modificación de un electrodo de oro mediante los pasos descritos en 6.2.3.1 y 6.2.3.2.1. Una vez obtenida la configuración deseada, y con el objeto de ensayar la misma, se realizaron voltametrías cíclicas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4 conteniendo  $\text{KNO}_3$  0.1 M, en ausencia de sustrato y en presencia de concentraciones crecientes del mismo, desde 0.01 mM hasta 10 mM. La Figura 6.7 muestra los voltagramas obtenidos para esta construcción, en ausencia de sustrato, en presencia de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y agregando

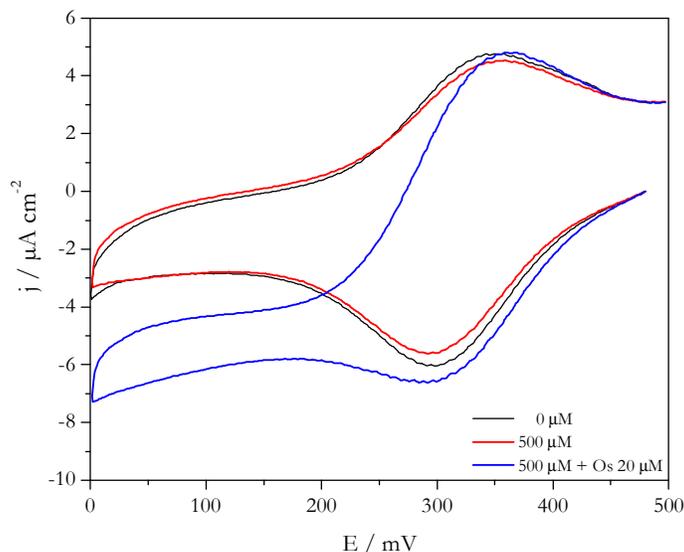
luego  $20 \mu\text{M}$  de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$ . Se observa la ausencia de respuesta catalítica en presencia de sustrato, aún utilizando un mediador soluble, lo que indica la ausencia de la HRP en el electrodo, y por lo tanto, la necesidad de utilizar un elemento adicional para mantener a la enzima unida al glicopolielectrolito.



**Figura 6.7:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/HRP, obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M  $\text{KNO}_3$ , en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en presencia de  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en presencia de  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$   $20 \mu\text{M}$ . Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 6.3.4.2 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/ConA/HRP

En base al resultado anterior, el siguiente control consistió en ensayar la ConA como *linker* específico para la unión de la enzima al glicopolielectrolito redox. Para realizar este nuevo ensamblado Au/Os-PA-lac+SDS/ConA/HRP, utilizando una ConA nativa (no electroactiva) se siguieron los pasos descritos en 6.2.3.1 y 6.2.3.2.2. A fin de evaluar el funcionamiento de este electrodo, se realizaron voltametrías cíclicas en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en presencia de concentraciones crecientes del sustrato. La Figura 6.8 muestra los voltagramas obtenidos para esta construcción, observándose que no hay cambios significativos entre las medidas realizadas a 0 y  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (voltagramas en negro y rojo, respectivamente).

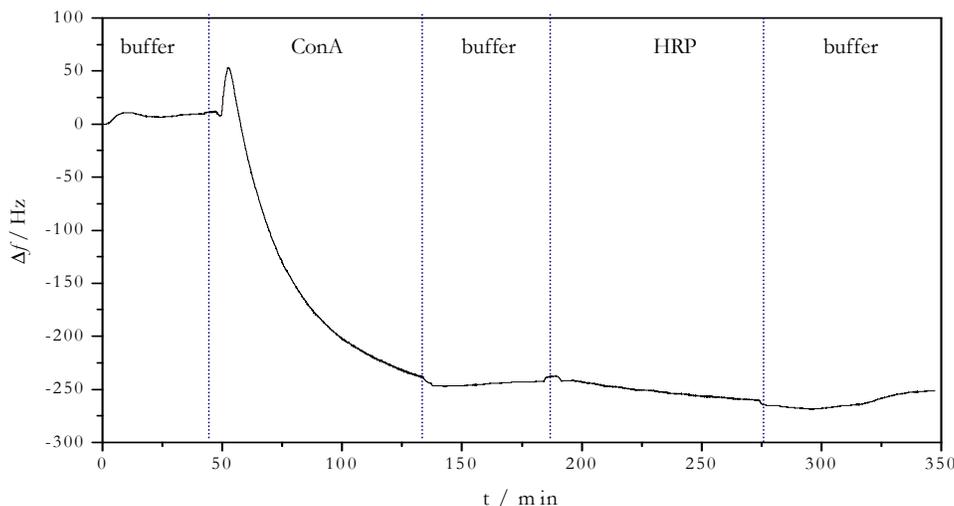


**Figura 6.8:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/ConA/HRP, obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>, en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia de 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en presencia de 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + [Os(bpy)<sub>2</sub>ClpyCOOH]<sup>+</sup> 20 μM. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>.

Con el propósito de demostrar la presencia de la enzima redox inmovilizada sobre la superficie del electrodo, se evaluó la respuesta catalítica amperométrica de la enzima con un mediador redox presente en solución; el agregado del mediador redox soluble [Os(bpy)<sub>2</sub>ClpyCOOH]<sup>+</sup> permite poner de manifiesto la respuesta catalítica, probando que si bien la enzima está ensamblada, no presenta una adecuada conexión con la superficie del electrodo (Figura 6.8, voltograma en azul).

#### 6.3.4.2.1 Microgravimetría

El ensamblado de ConA fue seguido también mediante microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). La Figura 6.9 representa los cambios en la frecuencia cuando el electrodo modificado se puso en contacto con un flujo de solución 1 μM de ConA en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM y MnCl<sub>2</sub> 0.5 mM. La exposición inicial a la solución de ConA condujo a una rápida disminución en la frecuencia, seguida por una ligera y constante disminución. Estos cambios de frecuencia pueden ser traducidos a masa mediante la ecuación de Sauerbrey.



**Figura 6.9:** Respuesta de la balanza de cristal de cuarzo (frecuencia) cuando se hace pasar una solución de ConA  $1 \mu\text{M}$  y una solución de HRP, sobre un electrodo modificado Au/Os-PA-lac+SDS.

Para las condiciones de crecimiento mostradas en la Figura 6.9 se observa un cambio de masa de  $4.4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , que correspondería a  $4.2 \times 10^{-11}$  moles  $\text{cm}^{-2}$  si se considera que toda la masa ensamblada es debida a la proteína. Si bien este valor puede estar sobredimensionado, ya que también debe considerarse el agua atrapada en la película formada, corresponde a más de 20 veces el de una monocapa determinada por resonancia de plasmón superficial ( $1.8 \times 10^{-12}$  moles  $\text{cm}^{-2}$ ), [188] lo que muestra que el polielectrolito en este caso presenta una estructura lo suficientemente abierta como para permitir la incorporación de una proteína de 104 kDa de peso molecular. Posteriormente, se hizo circular una solución de HRP, produciéndose un cambio de frecuencia equivalente a  $0.36 \mu\text{g cm}^{-2}$ , que correspondería a  $8.5 \times 10^{-12}$  moles  $\text{cm}^{-2}$ .

### 6.3.5 Seguimiento de la construcción de los electrodos modificados

Los resultados presentados en la sección anterior muestran que si bien ConA y HRP fueron incorporadas al electrodo, la ConA podría estar actuando como una barrera en el proceso de transferencia electrónica entre los centros de osmio del polielectrolito y la enzima.

Por esta razón, en este capítulo todas las plataformas involucran la incorporación de una concanavalina A con actividad redox (Os-ConA) como bloque de construcción

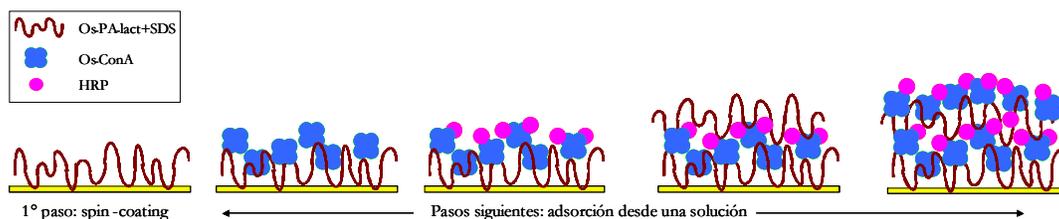
bifuncional, que permite tanto el ensamblado directo de la HRP, como así también el proceso de transferencia electrónica desde el grupo prostético de la enzima hasta la superficie del electrodo.

### 6.3.5.1 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP

Se llevo a cabo la modificación de electrodos de oro mediante la técnica de *spin-coating* como se describe en 6.2.3.1, generándose de esta manera una capa de espesor uniforme del material compuesto Os-PA-lac+SDS, la cual permite la posterior incorporación de Os-ConA, seguida de la incorporación de HRP. Luego, mediante un nuevo paso de ensamblado se incorpora una capa de Os-PA-lac, lo que sienta las bases para incorporar, de ser necesario, una nueva capa de Os-ConA y HRP.

Una de las ventajas de esta configuración es la facilidad con que se realiza su construcción, ya que, para obtener las distintas capas luego de la modificación con el complejo, tan sólo es necesario disolver el reactivo correspondiente en las condiciones adecuadas para promover el ensamblado.

La Figura 6.10 muestra de manera esquemática el proceso de modificación de los electrodos.



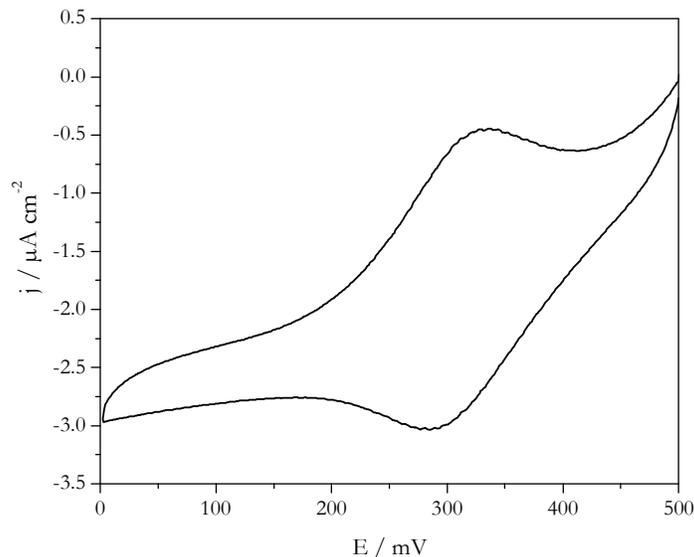
**Figura 6.10:** Esquema mostrando la construcción de los electrodos modificados. La superficie de oro es primero modificada con el glicopolielectrolito redox mediante la técnica de *spin-coating*, y luego las siguientes capas son ensambladas incubando el electrodo en la solución correspondiente.

Tal como se indicó antes, el primer paso de la construcción consiste en la incorporación de una capa de espesor uniforme de Os-PA-lac+SDS. Dado que este primer paso de modificación del electrodo de oro se lleva a cabo mediante la técnica de *spin-coating*, es posible variar el espesor de esta primer capa variando las condiciones de la técnica. A fin de analizar los efectos que diferentes espesores de la capa inicial pudieran tener sobre el proceso de transferencia electrónica, se examinaron dos casos: en primer lugar se estudió el

comportamiento de un electrodo modificado sobre una capa inicial delgada de Os-PA-lac, y luego se realizó el mismo análisis para un electrodo modificado con una capa inicial gruesa del mismo material.

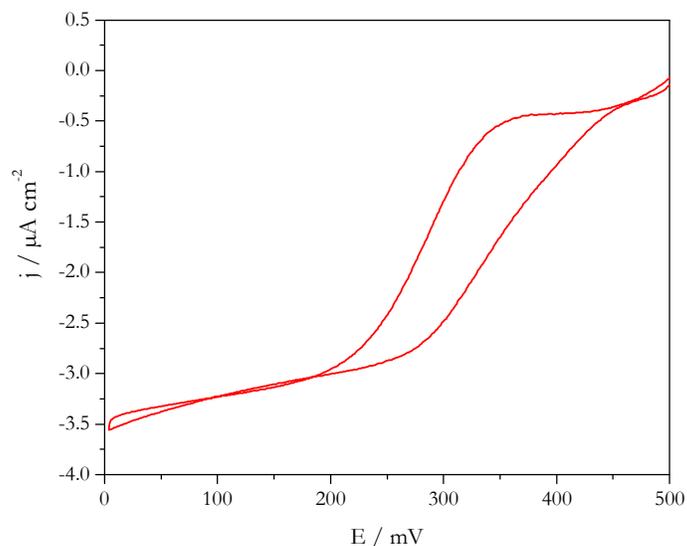
### 6.3.5.1.1 Capa delgada

Sobre una capa inicial delgada del material compuesto se llevaron a cabo los pasos descritos en 6.2.3.3.1 y 6.2.3.3.2, obteniéndose la construcción Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP. La Figura 6.11 muestra la respuesta voltamétrica obtenida en buffer HEPES para dicho electrodo. La carga inicial de osmio observada en este caso es de  $8.5 \mu\text{C cm}^{-2}$ .



**Figura 6.11:** Voltametría cíclica para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP, obtenida en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>. Q = 8.5  $\mu\text{C cm}^{-2}$

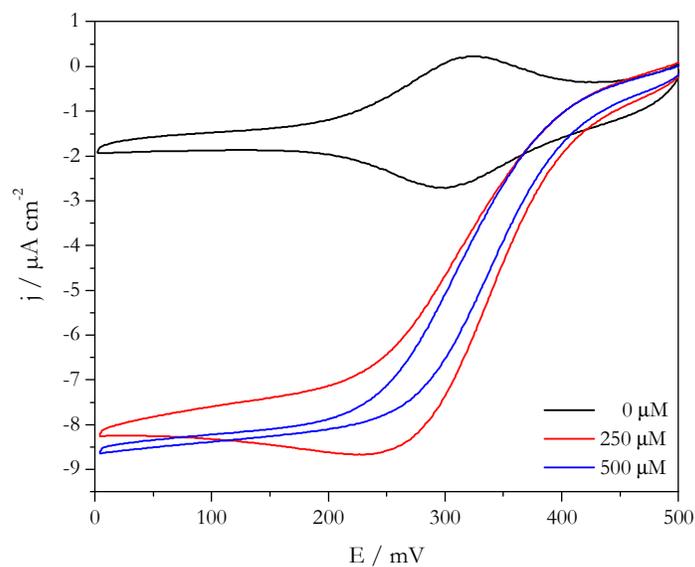
El comportamiento catalítico del electrodo modificado fue evaluado mediante voltametría cíclica en presencia de concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desde 0.01 mM hasta 10 mM. En la Figura 6.12 se muestra la respuesta voltamétrica obtenida para el electrodo en presencia de 250  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poniendo de manifiesto la actividad catalítica del ensamblado. Este resultado permite corroborar no sólo que la Os-ConA suministra la plataforma de bioafinidad necesaria para anclar a la HRP, sino que además permite la transferencia electrónica desde los centros hemo de la enzima hasta la superficie del electrodo.



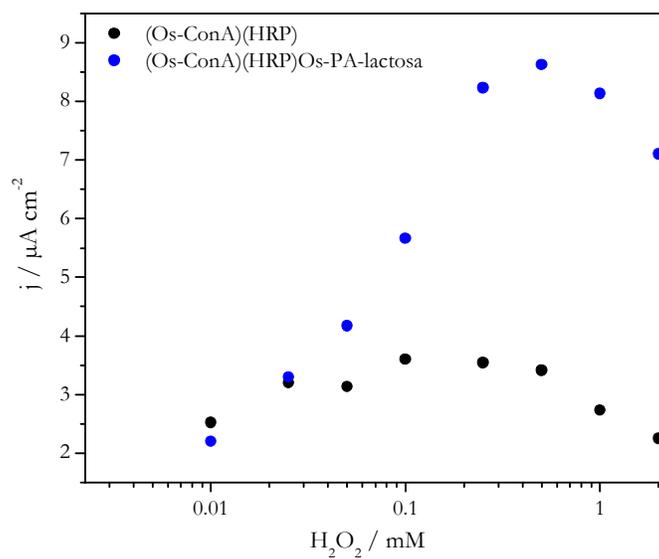
**Figura 6.12:** Voltametría cíclica para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP, obtenida en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>, en presencia de 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>

Con el objeto de constatar si esta respuesta catalítica podría ser mejorada, se ensambló una nueva capa de glicopolielectrolito redox sobre la HRP, como se describe en 6.2.3.3.3, obteniéndose la construcción Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac. Al analizar los resultados obtenidos para este nuevo paso de ensamblado, se observa un incremento de las corrientes catalíticas con respecto al electrodo sin esta nueva capa del polielectrolito; como ejemplo, en presencia de 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa una corriente catalítica de 8.3 μA cm<sup>-2</sup> (Figura 6.13), contra 3.5 μA cm<sup>-2</sup> obtenida para la misma concentración de sustrato en el caso anterior. Este incremento de las corrientes catalíticas puede ser atribuido a un incremento en la concentración de centros de osmio disponibles para conectar más eficientemente a la enzima con el electrodo.

Por otra parte, si se comparan las respuestas catalíticas de ambos sistemas a concentraciones crecientes de sustrato, se evidencia que la saturación de la enzima ocurre a una concentración mayor al agregar una nueva capa de Os-PA-lac sobre la HRP (Figura 6.14), mostrando que además los nuevos sitios de osmio agregados permiten regenerar a la enzima postergando su inhibición a más altas concentraciones de sustrato.



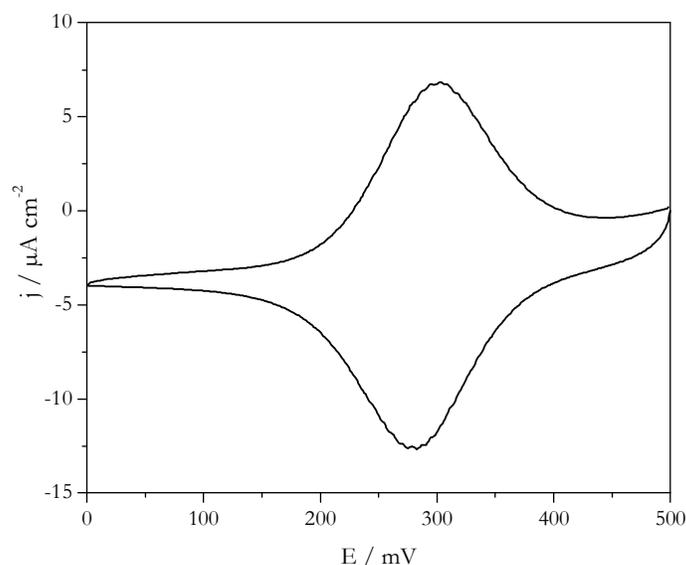
**Figura 6.13:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac, obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>, en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en presencia de 250 y 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>



**Figura 6.14:** Corrientes catalíticas medidas, en función de la concentración de sustrato, para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP (en negro) y Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac (en azul), en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>.

### 6.3.5.1.2 Capa gruesa

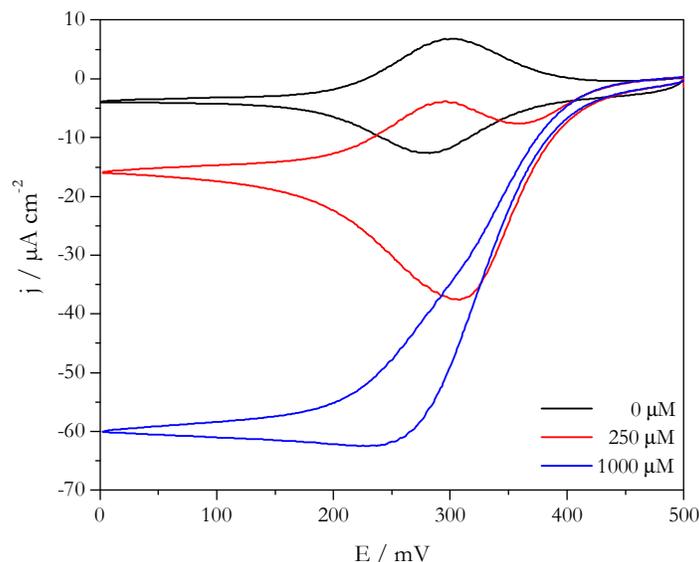
En este caso se siguió el mismo protocolo descrito para la construcción del electrodo de la sección anterior, pero variando las condiciones de *spin-coating* de manera de obtener una capa inicial más gruesa de Os-PA-lac+SDS sobre la superficie de oro. Al modificar el electrodo con esta primer capa se observa en este caso una carga inicial de osmio de  $111 \mu\text{C cm}^{-2}$ , más de diez veces mayor a la carga de osmio inicial observada para el electrodo de capa delgada. La Figura 6.15 muestra el voltograma obtenido en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M  $\text{KNO}_3$ .



**Figura 6.15:** Voltametría cíclica para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS (capa gruesa), obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M  $\text{KNO}_3$ . Velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .  $Q = 111 \mu\text{C cm}^{-2}$ .

Sobre esta capa inicial gruesa se llevaron a cabo los pasos descritos en 6.2.3.3.1 y 6.2.3.3.2, obteniéndose nuevamente la construcción Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP. Cuando se realizan las medidas en presencia de sustrato, se observa un marcado incremento en la respuesta catalítica de este electrodo con respecto al electrodo de capa delgada, mostrando, por ejemplo, un incremento de 15 veces en la catálisis a  $250 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 6.16, voltograma en rojo). Si se analiza el aspecto del voltamograma correspondiente a una concentración de  $250 \mu\text{M}$ , se observa que la corriente de reducción es mayor que la de oxidación, atribuible a la catálisis de reoxidación parcial del osmio presente en la película.

Cuando la concentración aumenta a 1 mM, el aspecto del voltamograma es típico de un proceso EC[151] donde no se observa la oxidación electroquímica del complejo de osmio (Figura 6.16, voltagrama en azul).

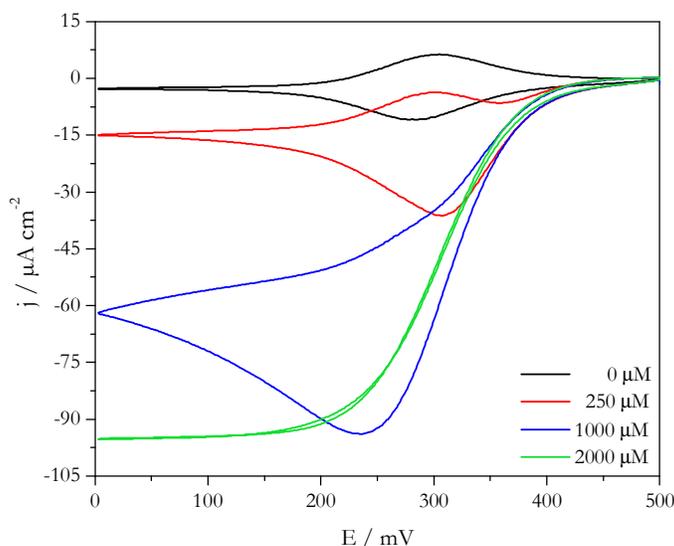


**Figura 6.16:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP, obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>, en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en presencia de 250 y 1000 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>

En el siguiente paso, al agregar la nueva capa del glicopolielectrolito redox sobre la HRP, se observa una importante diferencia con el electrodo de capa delgada, ya que en este caso las corrientes catalíticas obtenidas no aumentan, sino que incluso disminuyen cuando las concentraciones de sustrato superan los 250 μM (volveremos más adelante sobre este punto).

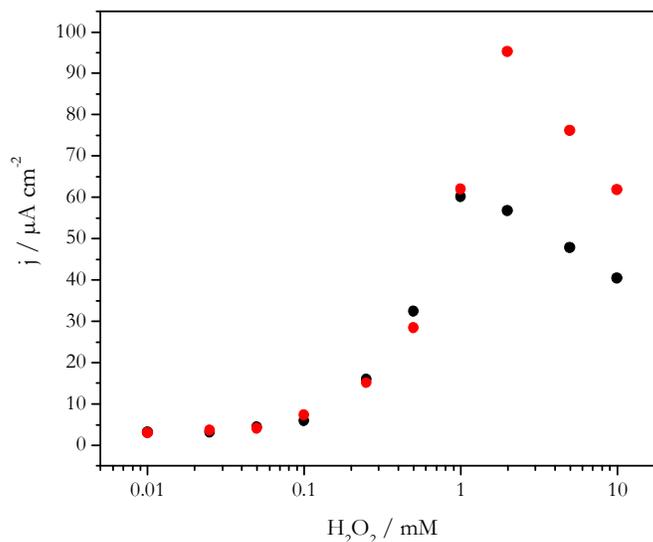
Con el objeto de mejorar la sensibilidad del electrodo se ensayó la incorporación de una nueva capa de la enzima, mediante la construcción Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac/Os-ConA/HRP. En la Figura 6.17 puede observarse cómo las corrientes catalíticas aumentan significativamente, lo que indica que no sólo se ha logrado incorporar más HRP sino que además ésta se halla muy bien conectada. Estos resultados indican que la introducción de una segunda capa de Os-PA-lac permite obtener sobre el electrodo una mayor superficie a la cual ensamblar una nueva capa de Os-ConA y, en consecuencia, más HRP. Además puede observarse que con esta segunda capa el control difusional es aún mayor. Compárese la corriente obtenida para una concentración 1 mM de

$\text{H}_2\text{O}_2$  en la Figura 6.16 y en la Figura 6.17. Para la primera se observa un *plateau* con muy poca histéresis, mientras que para la segunda se observa una corriente pico cuyo valor es un 50% mayor que la obtenida en el caso anterior y una importante disminución de la corriente luego de haber llegado a su máximo, indicativo de un fuerte consumo local del sustrato y la imposibilidad de recuperar su concentración original por difusión.[182] En lo que respecta a la inhibición por concentración, en este último sistema se observa que la máxima corriente se obtiene a una concentración de 2 mM, y que ese valor también coincide con un comportamiento catalítico típico de un sistema EC'.[151]



**Figura 6.17:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac/Os-ConA/HRP, obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M  $\text{KNO}_3$ , en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en presencia de 250  $\mu\text{M}$ , 1 y 2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Velocidad de barrido: 10  $\text{mV s}^{-1}$

En la Figura 6.18 se comparan las respuestas catalíticas medidas para ambos sistemas, Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP (en negro) y Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac/Os-ConA/HRP (en rojo), a concentraciones crecientes de sustrato.

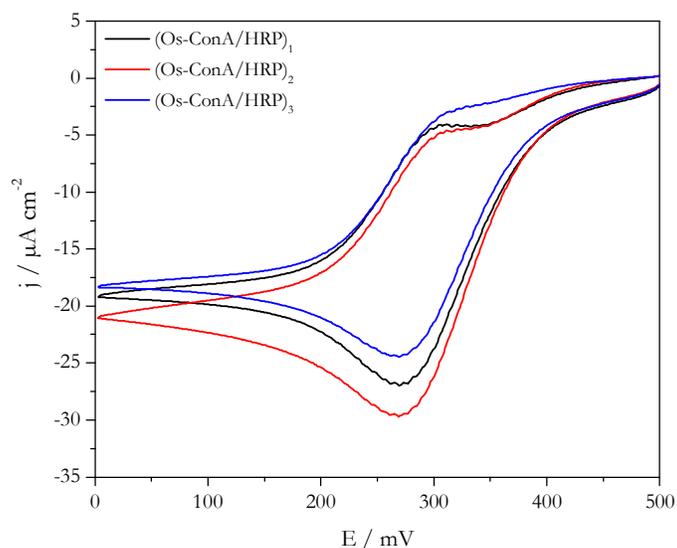


**Figura 6.18:** Corrientes catalíticas medidas, en función de la concentración de sustrato, para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP (en negro) y Au/Os-PA-lac+SDS/Os-ConA/HRP/Os-PA-lac/Os-ConA/HRP (en rojo), en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>.

### 6.3.5.2 Configuración Au/Os-PA-lac+SDS/(Os-ConA/HRP)<sub>n</sub>

Por último otro posible mecanismo de ensamblado es utilizar el complejo glicopolielectrolito redox+SDS como sistema de anclaje a la superficie y luego crecer alternativamente capas de Os-ConA y HRP, de manera de generar un sistema Au/Os-PA-lac+SDS/(Os-ConA/HRP)<sub>n</sub>. En la Figura 6.19 se muestra la respuesta catalítica para una concentración de 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando electrodos con n = 1, 2 y 3.

Puede verse que este tipo de ensamblado no presenta una mejora significativa en las corrientes catalíticas al agregar una segunda o tercer capa de HRP, ratificando la necesidad de intercalar una capa de glicopolielectrolito redox.



**Figura 6.19:** Voltametrías cíclicas para el sistema Au/Os-PA-lac+SDS/(Os-ConA/HRP)<sub>n</sub>, obtenidas en buffer HEPES 50 mM pH 7.4, 0.1 M KNO<sub>3</sub>, en presencia de 250 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Velocidad de barrido: 10 mV s<sup>-1</sup>

#### 6.4 Discusión y sumario

La introducción de lactosa en el polielectrolito redox genera un material que preserva su capacidad de interactuar con SDS y de ser aplicado a distintas superficies (grafito, oro o silicio) mostrando excelente estabilidad. Los estudios por GISAXS muestran que el sistema mantiene un ordenamiento mesoporoso orientándose paralelamente al sustrato, como sucede para el sistema sin osmio, a lo que se suma la contribución de dominios lamelares multiorientados.

El polielectrolito así generado suma una nueva función, que es la habilidad de producir uniones por bioreconocimiento, ejemplificado por la unión de ConA y HRP. Los estudios de balanza de cuarzo muestran un importante ensamblado de ConA, que corresponde a más de una monocapa, mientras que los moles de HRP incorporados son la quinta parte. Esto guarda relación con lo observado por Pallarola *et al.*, [171] en donde la cantidad de moles de HRP incorporados es prácticamente un tercio de los correspondientes a ConA. Otra característica interesante de este sistema es el hecho de que la adición de ConA no produce una marcada disminución en la corriente observada en el polielectrolito redox, por lo cual los centros redox encuentran caminos alternativos para el intercambio de

electrones ya que la corriente observada para el polielectrolito redox antes y después del agregado de ConA es prácticamente la misma. Sin embargo, no es posible el intercambio electrónico con HRP, lo que muestra que ConA actúa como una eficiente barrera aislante entre el polielectrolito redox y la HRP.

Con el fin de disminuir el efecto aislante de la ConA se utilizó un conjugado de la misma con complejos de osmio. El uso de estos derivados ha sido previamente reportado en la literatura.[171] En ese trabajo se demostró que ConA conjugada con complejos de osmio (Os-ConA) mantiene su capacidad de unión a residuos manosa o glucosa y se comporta como un eficiente mediador redox entre la superficie de un electrodo y la enzima HRP; para el anclaje de la Os-ConA se recurrió a dos pasos de modificación sobre la superficie de oro, primero con cistamina y luego con manosilpiranosilfenil isocianato, al cual la Os-ConA se une. En nuestro caso la modificación de la superficie de oro es más sencilla y la incorporación del conjugado Os-ConA y de la HRP se produce exitosamente. Para el electrodo Au/Os-PA-lac/Os-ConA/HRP el proceso de inhibición por sustrato se produce a la misma concentración que para el autoensamblado reportado en la referencia [171]; mientras que la corriente catalítica máxima observada es prácticamente el doble en este caso,  $3.5 \approx 2 \mu\text{A cm}^{-2}$ . Otro aspecto interesante a observar en el proceso catalítico es la forma de la señal en la Figura 6.12, donde se observa que la corriente en el barrido de retorno es mayor que en el de ida, esto sugiere que el sistema no entra rápidamente en este estado estacionario y que por lo tanto el proceso de transferencia electrónica en algún punto se hace relativamente lento.

Cuando se agrega otra capa de Os-PA-lac se produce un aumento en la corriente debido a un crecimiento del número de centros redox, lo que indica que la Os-ConA todavía es capaz de reaccionar con otros centros glicosilados y consecuentemente facilita la interacción de más centros redox con la HRP presente. En presencia de peróxido de hidrógeno, se observa que la catálisis para bajas concentraciones (10 y 25  $\mu\text{M}$ ) no presenta grandes cambios, siendo la corriente aun un poco menor para la concentración más baja, indicando que el control difusional a bajas concentraciones es importante, fenómeno ya observado por Sèveant en su estudio sobre transferencia electrónica entre electrodos y HRP mediada por complejos de osmio.[182] A concentraciones mayores las corrientes aumentan y se observa que la máxima corriente catalítica se produce a una concentración de 250  $\mu\text{M}$ , obteniéndose un valor de corriente de prácticamente  $9 \mu\text{A cm}^{-2}$ . En este caso la corriente supera en más de 4 veces al valor obtenido por Pallarola *et al.* para una monocapa Os-ConA/HRP. Por su parte, el sistema de autoensamblado presentado en la referencia [171]

permite el agregado de otra monocapa Os-ConA/HRP y se observa una corriente catalítica máxima a 100  $\mu\text{M}$  y con un valor también de 9  $\mu\text{A cm}^{-2}$ . En nuestro caso el aumento de la corriente fue únicamente debido a la incorporación de osmio en el sistema produciendo una conexión más eficiente entre electrodo y enzima, ya que la cantidad de HRP inmovilizada no varió, y para una dada concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por ejemplo para 100  $\mu\text{M}$ , la corriente pasa de 3.5 a 5.7  $\mu\text{A cm}^{-2}$  (Figura 6.14). Por otro lado, el efecto inhibitorio de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se produce a una concentración mayor (500  $\mu\text{M}$ ), lo cual también puede atribuirse a que el número de centros redox cercanos a la HRP es mucho mayor evitando la formación de oxiperoxidasa, la forma electroquímicamente inactiva de la peroxidasa ( $\text{E}_3$  en el ciclo presentado en la Figura 6.2).

En el caso de una película más gruesa, con una carga de osmio aproximadamente 10 veces mayor, se observa que a bajas concentraciones (menores que 100  $\mu\text{M}$ ) existe un efecto catalítico, pero que una importante cantidad de osmio no participa en dicho proceso evidenciado por el comportamiento mixto que presentan los voltagramas realizados en estas condiciones, donde se observa un incremento en la corriente catódica debido a la presencia de peróxido de hidrógeno, pero también una corriente pico en el barrido de retorno debido a la oxidación del complejo que no ha participado en el ciclo catalítico de la HRP. Por otra parte cuando las concentraciones aumentan no se observa proceso de inhibición hasta una concentración de 1 mM. Esto es atribuible a la alta concentración de osmio rodeando a la peroxidasa, lo que evita la formación de oxiperoxidasa como se indicara previamente. Otro aspecto interesante es que cuando se agrega una segunda capa de Os-PA-lac, la corriente debida a la incorporación de centros de osmio prácticamente no cambia. Esto indica que en el caso de películas gruesas el complejo Os-ConA/HRP penetra en la estructura del glicopolielectrolito quedando eficientemente rodeado, y la adición de una segunda capa de Os-PA-lac no es efectiva. La adición de una nueva capa de Os-ConA/HRP mejora la señal catalítica a altas concentraciones, presentando una corriente máxima para una concentración de agua oxigenada de 2 mM. Esto sugiere que Os-ConA se une a la HRP ya presente en el electrodo y a su vez permite la incorporación de más HRP, sin embargo, este tema requiere una mayor exploración. En el caso de esta película gruesa, a bajas concentraciones de sustrato, la primera y la segunda capa de Os-ConA/HRP dan resultados similares (Figura 6.18) y por lo tanto el control difusional tiene un rol muy importante como ya se discutió previamente.

En este capítulo se ha demostrado que es posible modificar el polielectrolito tanto con un centro redox como con un residuo glicosídico de manera de favorecer el reconocimiento biomolecular, en este caso de una proteína del tipo lectina.

El sistema presentado se puede aplicar prácticamente sobre cualquier superficie y muestra una gran estabilidad. Este polielectrolito, combinado con ConA conjugada con complejos de osmio, ha demostrado ser capaz de inmovilizar por un método suave la peroxidasa de rábano picante y ha demostrado ser un eficiente mediador redox; otro aspecto interesante de los resultados presentados es el hecho que controlando el espesor de la película se puede controlar el rango de sensibilidad del electrodo al peróxido.

Una posible aplicación del sistema aquí presentado es el uso de microorganismos como parte de sensores o celdas de combustibles,[189] lo que ha suscitado un gran interés en la comunidad científica. Las paredes celulares de las bacterias están compuestas de hidratos de carbono que podrían ser bioreconocidos por lectinas unidas a este glicopolielectrolito redox permitiendo de esta manera la conexión eléctrica de bacterias a la superficie de un electrodo. Por otra parte, la alta concentración local de estas lectinas en la superficie del electrodo permitiría generar lenguas electrónicas para el reconocimiento de dichos microorganismos a muy bajas concentraciones.[190]

Finalmente, existe un renovado interés en el uso de neuronas como elementos para biosensado, debido a que ellas utilizan señales eléctricas para el procesamiento de la información.[191-192] En muchos casos, la unión silicio-neurona se realiza utilizando ConA como adhesivo entre la célula y el sustrato.[193] En este contexto, la combinación de nuestro glicopolielectrolito, capaz de adherirse prácticamente a cualquier superficie con ConA, podría introducir una nueva variable para la comunicación eléctrica entre la célula y el transistor introduciendo nuevas perspectivas en el desarrollo de biosensores.



---

# Capítulo 7

## Discusión y Conclusiones



## 7.1 Discusión y Conclusiones

Este trabajo se ha centrado en la modificación de superficies mediante autoensamblado de polielectrolitos con surfactantes para su aplicación en sensores electroquímicos, utilizando como sistema modelo poli(alilamina) (PA) y dodecilsulfato de sodio (SDS).

Desde los trabajos seminales de Decher,[19] sobre autoensamblados capa por capa de polielectrolitos, y Antonietti,[50] sobre la formación de autoensamblados de polielectrolito-surfactante a partir de complejos solubles, el estudio sobre la utilización de polielectrolitos como materiales para la construcción de dispositivos avocó el esfuerzo de un gran número de grupos de investigación. Esto se debe a que ambos métodos se basan en la formación espontánea de un arreglo de moléculas en condiciones suaves, lo cual se traduce en simples métodos de síntesis y la posibilidad de incorporar nuevas especies, que en otras condiciones sería prácticamente imposible, generando un amplio abanico de investigaciones con aplicaciones tan diversas como la liberación controlada de especies[194] o la producción de cambios de color en polielectrolitos conjugados según la cantidad de surfactante presente en la mezcla.[195]

En este trabajo la formación de autoensamblados capa por capa, de complejos polielectrolito-surfactante, y la combinación de ambos métodos ha sido explorada con el fin de comprender cuales son las posibles ventajas que puede tener la incorporación de estas técnicas y de un nuevo elemento, el surfactante dodecilsulfato de sodio, a la construcción de sensores amperométricos.

La experiencia en el tema de distintos grupos de trabajo en el DQIAQF (FCEN, UBA) involucra el uso de PA como polielectrolito modificado con un derivado de ferroceno[196] o con un complejo de osmio.[152, 197-198] En los dos primeros trabajos se utilizó el polielectrolito en conjunto con la enzima glucosa oxidasa formando un hidrogel, mientras que en los tres últimos, el uso de autoensamblados para la construcción de dispositivos fue el método utilizado.

La formación de autoensamblados híbridos con biomoléculas, nanopartículas y colorantes[199-203] ha sido ampliamente estudiada, pero poco se conoce acerca de la acción de surfactantes en estos sistemas. Como punto de partida de esta tesis se estudió la incorporación de un surfactante al sistema de autoensamblado capa por capa formado por poli(alilamina) derivatizada con un complejo de osmio (Os-PA) y glucosa oxidasa (GOx). SDS resultó ser una interesante elección. Si bien en solución SDS es capaz de formar un

complejo insoluble con Os-PA, cuando un autoensamblado Au/MPS/Os-PA se expuso a SDS se observó un proceso de lavado, evidenciado por la disminución de la señal amperométrica debida al osmio y a una disminución de la masa en experimentos de QCM. Este fenómeno fue también observado recientemente por Rahim *et al.*[112] en donde un autoensamblado compuesto por poli(alilamina) y poliestirensulfonato puede ser desestabilizado por lavados con dodecilsulfato, produciéndose la desorción parcial de los polielectrolitos. Por otra parte Jones *et al.*[111] encontraron que SDS a pH mayor que 6 puede interactuar con GOx sin producir su desnaturalización. Sus resultados muestran que el origen de la resistencia de GOx a la desactivación por encima de pH 6 se encuentra en el relativamente alto contenido de residuos ácidos (la relación de residuos ácidos a básico es de 3.4:1), apantallando la interacción electrostática del residuo aniónico del SDS con los catiónicos de la enzima, que la llevarían a su desnaturalización como ocurre a pH menor que 6. Experimentos de diálisis muestran que a pH mayor que 6 el SDS está unido a la enzima, lo cual es atribuible a interacciones hidrofóbicas, reteniendo su actividad catalítica, de esta manera la carga neta negativa de la enzima se incrementa. Esto explicaría los resultados observados en la experiencia de microbalanza de cuarzo presentados en el capítulo 3 donde a partir de la incorporación de glucosa oxidasa se observa la incorporación de SDS y posteriormente un incremento en la incorporación de Os-PA. Este resultado es muy llamativo y merece ser estudiado en más detalle a futuro ya que un control más detallado de la relación GOx/SDS/Os-PA podría originar sistemas con una alta eficiencia en el proceso de transferencias electrónica. Por otra parte los sistemas capa por capa deben ser construidos a través de diversos pasos de inmersión y lavados y requieren la modificación previa de la superficie con una especie que reaccione con facilidad sobre el sustrato. En el caso del oro esto se resuelve fácilmente con tioles, aunque ellos presentan ciertas limitaciones en cuanto a estabilidad.

Las limitaciones que presenta la modificación de electrodos mediante el sistema capa por capa nos llevó a explorar el uso del complejo polielectrolito-surfactante; como primer paso se estudió el sistema más sencillo posible, poli(alilamina)-dodecilsulfato (capítulo 4), el cual dependiendo de las condiciones de trabajo forma una suspensión coloidal que puede manipularse fácilmente y cuyo tamaño menor al micrón permite incorporarlo a procesos de construcción por serigrafía, donde las mallas tensadas para la aplicación de los distintos elementos tienen tamaño de poro de hasta 50 micrones. Para esta mezcla, el proceso principalmente utilizado fue el depósito del material compuesto sobre electrodos de grafito (recubrimiento y secado), utilizando distintas concentraciones

de poli(alilamina) que dieron como resultado películas de distinto espesor pero con características similares. Desde el punto de vista de aplicaciones a sensores, como uno de los resultados más interesantes puede considerarse la incorporación de una especie electroactiva (ferrocianuro) con carga negativa que podría actuar como mediador redox; un ejemplo de ello fue presentado por Anzai para la detección de ácido ascórbico a partir de un sistema capa por capa el cual era capaz de incorporar ferrocianuro.[141] Otra posible aplicación es la incorporación de catalizadores, en nuestro caso la incorporación de nanotubos de carbono mejoró notablemente la cinética de transferencia electrónica para especies de origen biológico como ascorbato y dopamina, especialmente para esta última, utilizando una técnica rápida como voltametría diferencial de pulso es posible detectar dopamina a pH neutro y en una concentración de 2 micromolar. Estudios complementarios realizados en colaboración con el Dr. Azzaroni muestran que estos sistemas permanecen estructurados en una escala mesoscópica aun en presencia de nanotubos de carbono.

La combinación de SDS con poli(alilamina) modificada con un complejo de osmio produjo un precipitado soluble en solventes orgánicos como metanol y DMF; este comportamiento es el usualmente observado en la formación de complejos polielectrolito-surfactante.[50] La solución de este complejo fue depositada tanto sobre electrodos de grafito como de oro, mostrando en ambos casos un proceso reversible de transferencia electrónica y una gran estabilidad. Este material se utilizó para la construcción de un sensor a glucosa, recurriendo a una técnica de construcción híbrida: en primer lugar el mediador es aplicado mediante recubrimiento y secado, o por la técnica de *spin-coating*, a partir de una solución en fase orgánica de Os-PA con dodecilsulfato y posteriormente GOx se adsorbió sobre el electrodo modificado, esto permitió obtener corrientes catalíticas similares a las que se obtuvieron en el capítulo 3 para autoensamblados, luego de 16 inmersiones. La posibilidad de aplicar el polielectrolito electroactivo sobre distintas superficies como si fuera una pintura y la posterior adsorción de GOx redujeron el proceso de construcción a dos pasos. La optimización del sistema se logró encontrando un espesor adecuado a partir del uso de la técnica de *spin-coating* y una característica relevante es que este sistema no se satura aun a concentraciones mayores de 50 mM. En nuestro modelo numérico hemos atribuido este comportamiento a un cambio de afinidad entre la enzima y el sustrato, aunque también podría ser atribuible a un cambio de coeficiente de difusión de la glucosa dentro de la película o a una importante constante de partición entre la película y la solución debido a las características hidrofóbicas de la primera.

En el capítulo 6 se realizó una modificación ulterior sobre el polielectrolito, de manera de generar un nuevo modo de anclaje de moléculas a partir de la introducción de un grupo glicosídico. En este caso, además de utilizar la capacidad de generar autoensamblados por interacción polielectrolito-surfactante, se introduce una nueva funcionalidad al polielectrolito que permite el bioreconocimiento de proteínas lectínicas.

Desde el punto de vista de la construcción de sensores y dispositivos moleculares, la introducción de un residuo glicosídico en el polielectrolito no representa un problema, ya que el sistema sigue siendo estable y se continúa observando un eficiente proceso de transferencia electrónica. La presencia del residuo glicosídico permitió la incorporación de proteínas al sistema, lo que hubiese sido imposible de lograr de otra manera. Se demostró la eficiente incorporación de una lectina (concanavalina A) y que ésta a su vez permite el anclaje de glicoproteínas como HRP. En la medida que la concanavalina se encuentre conjugada con centros redox el transporte de carga entre la superficie del electrodo y la HRP es altamente eficiente.

En el caso del sensado de peróxido, el sistema presenta algunas diferencias con lo observado por otros autores;[171, 182] la inhibición por sustrato se produce a concentraciones mayores, un fenómeno similar al observado en los electrodos de glucosa donde la saturación de la señal se produce a concentraciones mayores que en la mayoría de los casos presentados en la literatura.[95, 104] También en este caso, un estudio minucioso sobre la difusión de  $H_2O_2$  en la película y posibles cambios en la relación estequiométrica efectiva entre centros redox y grupos hemo debe realizarse.

Los estudios por reflectometría de rayos X (XRR) y dispersión de rayos X en configuración rasante (GISAXS) de los complejos polielectrolito-surfactante presentados en este trabajo muestran que tanto PA+SDS, Os-PA+SDS como Os-PA-lac+SDS forman estructuras lamelares que en el primer caso están orientadas paralelas al sustrato, en el caso del polielectrolito con el complejo de osmio se orientan perpendiculares al sustrato, mientras que la introducción del residuo glicosídico produce pequeños dominios distribuidos aleatoriamente. El ordenamiento mesoscópico observado en estos sistemas y su efecto en los procesos de transferencia electrónica es otro punto para seguir explorando, con un polielectrolito redox en el cual el dominio del número de centros redox sea más fácil de controlar, y surfactantes con largo de cadena variable, de manera de poder llevar a cabo un trabajo sistemático que correlacione ordenamiento con velocidad de transferencia de carga. Los resultados aquí presentados muestran que el sistema base polielectrolito-surfactante es un excelente punto de partida para construcción de

dispositivos estables y que a través de modificaciones apropiadas pueden ser útiles para distintos tipos de aplicaciones basadas en materiales con propiedades de reconocimiento específico (*e.g.* enzimas y lectinas) o con características electrocatalíticas (*e.g.* nanotubos de carbono).

Los resultados que se presentan en este trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

1- Cortez M.L., Cukierman A.L., Battaglini F. “Surfactant presence in a multilayer polyelectrolyte–enzyme system improves its catalytic response”. *Electrochemistry Communications* **11**, (2009) 990-993.

2- Cortez M.L., Gonzalez G.A., Battaglini F. “An electroactive versatile matrix for the construction of sensors”. *Electroanalysis* **23**, 1 (2011) 156-160

3- Cortez M.L., Ceolin M., Azzaroni O., Battaglini F. “Electrochemical sensing platform based on a polyelectrolyte-surfactant complex. Its effect in charged redox couples and the carbon nanotube dispersion”. *Analytical Chemistry*, aceptado (2011), en prensa.

4- Cortez M.L., Pallarola D., Ceolin M., Azzaroni O., Battaglini F. “Electroactive glicopolyelectrolyte-surfactant complex as a new material in self-assembling process.” (2011) en redacción.

---

# Referencias



1. *Chemical Sensors. Definitions and Classification in Analytical Chemistry Division, Commission on General Aspects of Analytical Chemistry*, IUPAC, Editor. A. Hulanicki, S. Geab, F. Ingman,(1991).
2. Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., and Wilson, G.S. *Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification*. *Biosensors and Bioelectronics* **16**,(2001) 121-131.
3. *Commercial Biosensors, Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples*, in *Chemical Analysis*, G. Ramsay, Editor. Wiley & Sons Inc.: New York,(1998), Chapter 1. p. 6-18.
4. Pingarrón, J.M. and Sánchez Batanero, P. *Química Electroanalítica, Fundamentos y Aplicaciones*, ed. Síntesis.(1999).
5. Cass, A.E.G., Davis, G., Francis, G.D., Allen O Hill, H., Aston, W.J., John Higgins, I., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L., and Turner, A.P.F. *Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose*. *Analytical Chemistry* **56**,(1984) 667-671.
6. *Microfluidic Techniques* D. Shelley, Editor. Humana Press Inc.: New Jersey, EEUU,(2006), Chapter 2. p. 5.
7. Lauks, I., Van der Siegel, J., Sansen, W., and Steyaert, M. *Multispecies integrated electrochemical sensor with on-chip CMOS circuitry*. (1985).
8. *Commercial Biosensors, Applications to Clinical, Bioprocess, and Environmental Samples*, in *Chemical Analysis*, G. Ramsay, Editor. Wiley & Sons Inc.: New York,(1998), Chapter 2. p. 55-59.
9. Choi, J. and Rubner, M.F. *Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly*. *Macromolecules* **38**,(2005) 116-124.
10. Hill, T.L. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. Dover Publications: New York,(1986).
11. Manning, G.S. *Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions I. Colligative properties*. *The Journal of Chemical Physics* **51**,(1969) 924-933.
12. Oyama, N. and Anson, F.C. *Facile attachment of transition metal complexes to graphite electrodes coated with polymeric ligands. Observation and control of metal-ligand coordination among reactants confined to electrode surfaces [4]*. *Journal of the American Chemical Society* **101**,(1979) 739-741.
13. Oyama, N. and Anson, F.C. *Polymeric ligands as anchoring groups for the attachment of metal complexes to graphite electrode surfaces*. *Journal of the American Chemical Society* **101**,(1979) 3450-3456.
14. Oyama, N. and Anson, F.C. *Factors affecting the electrochemical responses of metal complexes at pyrolytic graphite electrodes coated with films of poly(4-vinylpyridine)*. *Journal of the Electrochemical Society* **127**,(1980) 640-647.
15. Heller, A. *Electrical wiring of redox enzymes*. *Accounts of Chemical Research* **23**,(1990) 128-134.
16. Degani, Y. and Heller, A. *Electrical communication between redox centers of glucose oxidase and electrodes via electrostatically and covalently bound redox polymers*. *Journal of the American Chemical Society* **111**,(1989) 2357-2358.
17. Danilowicz, C., Corton, E., and Battaglini, F. *Osmium complexes bearing functional groups: building blocks for integrated chemical systems*. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **445**,(1998) 89-94.
18. Cortón, E. *Tesis Doctoral: Desarrollo de Biosensores para la Industria Alimentaria*. (2000) Universidad de Buenos Aires. Argentina.
19. Decher, G., J.D. Hong *Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. I. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces*. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*,(1991) 321.

20. Decher, G., Hong, J.D., and Schmitt, J. *Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces.* Thin Solid Films **210-211**,(1992) 831-835.
21. Hodak, J., Etchenique, R., Calvo, E.J., Singhal, K., and Bartlett, P.N. *Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase with a poly(allylamine)ferrocene redox mediator.* Langmuir **13**,(1997) 2708-2716.
22. Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., and Kunitake, T. *Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption.* Journal of the American Chemical Society **117**,(1995) 6117-6123.
23. Yoo, P.J., Nam, K.T., Qi, J., Lee, S.K., Park, J., Belcher, A.M., and Hammond, P.T. *Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces.* Nature Materials **5**,(2006) 234-240.
24. Kotov, N.A. *Layer-by-Layer Assembly of Nanoparticles and Nanocolloids: Intermolecular Interactions, Structure and Materials Perspectives.*, in *Multilayer Thin Films*, G. Decher, Editor. Wiley-VCH: Weinheim,(2003).
25. Fendler, J.H. *Layer-by-Layer Self-assembled Polyelectrolytes and Nanoplatelets*, in *Multilayer Thin Films*, G. Decher, Editor. Wiley-VCH: Weinheim,(2003).
26. Liu, S., Kurth, D.G., Bredenkötter, B., and Volkmer, D. *The structure of self-assembled multilayers with polyoxometalate nanoclusters.* Journal of the American Chemical Society **124**,(2002) 12279-12287.
27. Liu, S., Kurth, D.G., Möhwald, H., and Volkmer, D. *A thin-film electrochromic device based on a polyoxometalate cluster.* Advanced Materials **14**,(2002) 225-228.
28. Zhang, X., Chen, H., and Zhang, H. *Layer-by-layer assembly: From conventional to unconventional methods.* Chemical Communications,(2007) 1395-1405.
29. Laurent, D. and Schlenoff, J.B. *Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes.* Langmuir **13**,(1997) 1552-1557.
30. Moriguchi, I. and Fendler, J.H. *Characterization and Electrochromic Properties of Ultrathin Films Self-Assembled from Poly(diallyldimethylammonium) Chloride and Sodium Decatungstate.* Chemistry of Materials **10**,(1998) 2205-2211.
31. Zotti, G., Zecchin, S., Schiavon, G., Vercelli, B., Berlin, A., and Porzio, W. *Electrostatically self-assembled multilayers of novel symmetrical rigid-rod polyanionic and polycationic polythiophenes on ITO/glass and gold electrodes.* Chemistry of Materials **16**,(2004) 2091-2100.
32. Schmidt, D.J., Cebeci, F.Ç., Kalcioğlu, Z.I., Wyman, S.G., Ortiz, C., Van Vliet, K.J., and Hammond, P.T. *Electrochemically controlled swelling and mechanical properties of a polymer nanocomposite.* ACS Nano **3**,(2009) 2207-2216.
33. Jin, W., Toutianoush, A., Pyrasch, M., Schnepf, J., Gottschalk, H., Rammensee, W., and Tiede, B. *Self-assembled films of Prussian blue and analogues: Structure and morphology, elemental composition, film growth, and nanosieving of ions.* Journal of Physical Chemistry B **107**,(2003) 12062-12070.
34. Wang, J., Zeng, B., Fang, C., and Zhou, X. *Influence of surfactants on the electron-transfer reaction at self-assembled thiol monolayers modifying a gold electrode.* Journal of Electroanalytical Chemistry **484**,(2000) 88-92.
35. Wang, X.G., Wu, Q.S., Liu, W.Z., and Ding, Y.P. *Simultaneous determination of dinitrophenol isomers with electrochemical method enhanced by surfactant and their mechanisms research.* Electrochimica Acta **52**,(2006) 589-594.
36. Zheng, J. and Zhou, X. *Sodium dodecyl sulfate-modified carbon paste electrodes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid.* Bioelectrochemistry **70**,(2007) 408-415.
37. Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., and Prato, M. *Chemistry of carbon nanotubes.* Chemical Reviews **106**,(2006) 1105-1136.

38. Zhang, J. and Gao, L. *Dispersion of multiwall carbon nanotubes by sodium dodecyl sulfate for preparation of modified electrodes toward detecting hydrogen peroxide*. Materials Letters **61**,(2007) 3571-3574.
39. Mao, X., Ma, Y., Zhang, A., Zhang, L., Zeng, L., and Liu, G. *Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip*. Analytical Chemistry **81**,(2009) 1660-1668.
40. Deng, J.P., Wu, C., Yang, C.H., and Mou, C.Y. *Pyrene-assisted synthesis of size-controlled gold nanoparticles in sodium dodecyl sulfate micelles*. Langmuir **21**,(2005) 8947-8951.
41. Thünemann, A.F., Müller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J.F., and Löwen, H. *Polyelectrolyte Complexes*. Advances in Polymer Science **166**,(2004) 113-171.
42. Johal, M.S. and Chiarelli, P.A. *Polymer-surfactant complexation in polyelectrolyte multilayer assemblies*. Soft Matter **3**,(2007) 34-46.
43. Goddard, E.D. and Ananthapadmanabhan, K.P. *Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins*. CRC Press: Boca Raton,(1993).
44. Satake, I. and Yang, J.T. *Biopolymers*,(1976), Chapter 15. p. 226.
45. Bronich, T.K., Cherry, T., Vinogradov, S.V., Eisenberg, A., Kabanov, V.A., and Kabanov, A.V. *Self-assembly in mixtures of poly(ethylene oxide)-graft-poly(ethyleneimine) and alkyl sulfates*. Langmuir **14**,(1998) 6101-6106.
46. Thünemann, A.F. *Complexes of polyethyleneimine with perfluorinated carboxylic acids: Wettability of lamellar structured mesophases*. Langmuir **16**,(2000) 824-828.
47. Wallin, T. and Linse, P. *Monte Carlo simulations of polyelectrolytes at charged micelles. 2. Effects of linear charge density*. Journal of Physical Chemistry **100**,(1996) 17873-17880.
48. Wallin, T. and Linse, P. *Monte Carlo simulations of polyelectrolytes at charged micelles. 1. Effects of chain flexibility*. Langmuir **12**,(1996) 305-314.
49. Goddard, E.D. *Polymer-surfactant interaction part II. Polymer and surfactant of opposite charge*. Colloids and Surfaces **19**,(1986) 301-329.
50. Antonietti, M., Conrad, J., and Thünemann, A. *Polyelectrolyte-surfactant complexes: A new type of solid, mesomorphous material*. Macromolecules **27**,(1994) 6007-6011.
51. Antonietti, M., Neese, M., Blum, G., and Kremer, F. *Dielectric and mechanic relaxation in polyelectrolyte-supported bilayer stacks: A model for the dynamics of membranes*. Langmuir **12**,(1996) 4436-4441.
52. Zhou, S., Burger, C., Yeh, F., and Chu, B. *Charge density effect of polyelectrolyte chains on the nanostructures of polyelectrolyte-surfactant complexes*. Macromolecules **31**,(1998) 8157-8163.
53. Thünemann, A.F. *Polyelectrolyte-surfactant complexes (synthesis, structure and materials aspects)*. Progress in Polymer Science (Oxford) **27**,(2002) 1473-1572.
54. Thünemann, A.F., Ruppelt, D., Schnablegger, H., and Blaul, J. *Rigid-rod complex of a cationic poly(p-phenylene) and a fluorinated amphiphile*. Macromolecules **33**,(2000) 2124-2128.
55. Antonietti, M. and Conrad, J. *Synthesis of very highly ordered liquid crystalline phases by complex formation of polyacrylic acid with cationic surfactants*. Angewandte Chemie (International Edition in English) **33**,(1994) 1869-1870.
56. Antonietti, M., Burger, C., and Effing, J. *Mesomorphous polyelectrolyte-surfactant complexes*. Advanced Materials **7**,(1995) 751-753.
57. Zhou, S. and Chu, B. *Assembled materials: Polyelectrolyte-surfactant complexes*. Advanced Materials **12**,(2000) 545-556.
58. Macknight, W.J., Ponomarenko, E.A., and Tirrell, D.A. *Self-Assembled Polyelectrolyte - Surfactant Complexes in Nonaqueous Solvents and in the Solid State*. Accounts of Chemical Research **31**,(1998) 781-788.
59. Ober, C.K. and Wegner, G. *Polyelectrolyte-surfactant complexes in the solid state: Facile building blocks for self-organizing materials*. Advanced Materials **9**,(1997) 17-31.

60. Ren, B., Tong, Z., Gao, F., Liu, X., and Zeng, F. *Fluorescence and X-ray diffraction studies on binding and complexes of surfactants and dansylated polyelectrolytes with sulfonate groups*. *Polymer* **42**,(2001) 7291-7298.
61. Ren, B., Cheng, Z., Tong, Z., Liu, X., Wang, C., and Zeng, F. *Novel structure change in nonequimolar complexes of linear poly(ethylenimine) and octadecanoic acid: Effects of composition*. *Macromolecules* **38**,(2005) 5675-5680.
62. Ren, B., Cheng, Z., Tong, Z., Liu, X., Wang, C., and Zeng, F. *Significant structure change in nonequimolar complexes of poly(ethylenimine) and octadecanoic acid induced by polymer backbone branching*. *Macromolecules* **39**,(2006) 6552-6557.
63. Cheng, Z., Ren, B., Gao, M., Liu, X., and Tong, Z. *Ionic self-assembled redox-active polyelectrolyte-ferrocenyl surfactant complexes: Mesomorphic structure and electrochemical behavior*. *Macromolecules* **40**,(2007) 7638-7643.
64. Cheng, Z., Ren, B., Zhao, D., Liu, X., and Tong, Z. *Novel thermotropic liquid crystalline and redox-active complexes of ionically self-assembled poly(ferrocenylsilane) and dendritic amphiphiles*. *Macromolecules* **42**,(2009) 2762-2766.
65. Bard, A.J. and Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*. 2nd Edition. Wiley & Sons Inc.: New York,(2001).
66. Kissinger, P.T. and Heineman, W.R. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed. Marcel Dekker: New York,(1996).
67. Sawyer, D.T., Sobkowiak, A., and Roberts Jr, J.L. *Electrochemistry for Chemists*, 2nd. ed. Wiley: New York,(1995).
68. Pletcher, R., Greef, R., Peat, R., and Peter, L.M. *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Chemical Science Series, ed. Southampton Electrochemistry Group. Horwood Publishing: England,(2001).
69. Bard, A.J. and Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*. 2nd Edition. Wiley & Sons Inc.: New York,(2001), Chapter 6. p. 25-26.
70. Nicholson, R.S. and Shain, I. *Theory of stationary electrode polarography single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems*. *Analytical Chemistry* **36**,(1964) 706-723.
71. Bard, A.J. and Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*. 2nd Edition Wiley & Sons Inc.: New York,(2001), Chapter 5. p. 22-24.
72. Bard, A.J. and Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*. 2nd Edition. Wiley & Sons Inc.: New York,(2001), Chapter 7. p. 28-30.
73. Buttry, D.A. and Ward, M.D. *Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance*. *Chemical Reviews* **92**,(1992) 1355-1379.
74. Sauerbrey, G.Z. *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*. *Z. Phys.* **155**,(1959) 206-222.
75. Bauermann, L.P. and Bartlett, P.N. *EQCM measurements of the ion and solvent flux in thin poly(aniline)- poly(styrenesulfonate) films during redox switching*. *Electrochimica Acta* **50**,(2005) 1537-1546.
76. Berne, B.J. and Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*. Wiley: New York,(1976).
77. Schurr, J.M. *Dynamic light scattering of biopolymers and biocolloids*. *CRC critical reviews in biochemistry* **4**,(1977) 371-431.
78. Ross Hallett, F. *Particle size analysis by dynamic light scattering*. *Food Research International* **27**,(1994) 195-198.
79. Tadmor, R. *Line energy and the relation between advancing, receding, and Young contact angles*. *Langmuir* **20**,(2004) 7659-7664.
80. Goodhew, P.J., Humphreys, J., and Beanland, R. *Microscopy with light and electrons*, in *Electron Microscopy and Analysis*. Taylor & Francis: London,(2001).
81. Goodhew, P.J., Humphreys, J., and Beanland, R. *The scanning electron microscope*, in *Electron Microscopy and Analysis*. Taylor & Francis: London,(2001).

82. Newman, J. and Thomas-Alyea, K. in *Electrochemical Systems 3rd ed.* Wiley & Sons,(2004), Chapter 11.
83. Zhang, B., Zhang, Y., and White, H.S. *The nanopore electrode.* Analytical Chemistry **76**,(2004) 6229-6238.
84. Lee, S., Zhang, Y., White, H.S., Harrell, C.C., and Martin, C.R. *Electrophoretic capture and detection of nanoparticles at the opening of a membrane pore using scanning electrochemical microscopy.* Analytical Chemistry **76**,(2004) 6108-6115.
85. Danilowicz, C., Corton, E., and Battaglini, F. *Osmium complexes bearing functional groups: building blocks for integrated chemical systems.* J. Electroanal. Chem. **445**,(1998) 89-94.
86. Danilowicz, C., Corton, E., Battaglini, F., and Calvo, E.J. *An os(byp)(2)clpych(2)nhpoly(allylamine) hydrogel mediator for enzyme wiring at electrodes.* Electrochim. Acta **43**,(1998) 3525-3531.
87. Calvo, E.J., Etchenique, R., Pietrasanta, L., Wolosiuk, A., and Danilowicz, C. *Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase and os(Bpy)2CIPyCH2NH-poly(allylamine) bioelectrode.* Analytical Chemistry **73**,(2001) 1161-1168.
88. Priano, G., González, G., Günther, M., and Battaglini, F. *Disposable gold electrode array for simultaneous electrochemical studies.* Electroanalysis **20**,(2008) 91-97.
89. Finklea, H.O., Snider, D.A., and Fedyk, J. *Passivation of pinholes in octadecanethiol monolayers on gold electrodes by electrochemical polymerization of phenol.* Langmuir **6**,(1990) 371-376.
90. Hoogvliet, J.C., Dijkstra, M., Kamp, B., and Van Bennekom, W.P. *Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: A study in phosphate buffer pH 7.4.* Analytical Chemistry **72**,(2000) 2016-2021.
91. Calvo, E.J., Battaglini, F., Danilowicz, C., Wolosiuk, A., and Otero, M. *Layer-by-layer electrostatic deposition of biomolecules on surfaces for molecular recognition, redox mediation and signal generation.* Faraday Discussions **116**,(2000) 47-65.
92. Calvo, E.J., Danilowicz, C., and Wolosiuk, A. *Molecular "wiring" enzymes in organized nanostructures.* Journal of the American Chemical Society **124**,(2002) 2452-2453.
93. Calvo, E.J., Danilowicz, C.B., and Wolosiuk, A. *Supramolecular multilayer structures of wired redox enzyme electrodes.* Physical Chemistry Chemical Physics **7**,(2005) 1800-1806.
94. Calvo, E.J. and Wolosiuk, A. *Wiring enzymes in nanostructures built with electrostatically self-assembled thin films.* ChemPhysChem **6**,(2005) 43-47.
95. Flexer, V., Forzani, E.S., Calvo, E.J., Ludueña, S.J., and Pietrasanta, L.I. *Structure and thickness dependence of "molecular wiring" in nanostructured enzyme multilayers.* Analytical Chemistry **78**,(2006) 399-407.
96. Flexer, V., Calvo, E.J., and Bartlett, P.N. *The application of the relaxation and simplex method to the analysis of data for glucose electrodes based on glucose oxidase immobilised in an osmium redox polymer.* Journal of Electroanalytical Chemistry **646**,(2010) 24-32.
97. Lehninger, A.L. *Bioquímica.* Omega S. A.: Barcelona,(1995).
98. Wilson, R. and Turner, A.P.F. *Glucose oxidase: an ideal enzyme.* Biosensors and Bioelectronics **7**,(1992) 165-185.
99. Robinson, J. and Cooper, J.M. *Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode.* Analytical Biochemistry **33**,(1970) 390-399.
100. Villarta, R.L., Cunningham, D.D., and Guilbault, G.G. *Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate.* Talanta **38**,(1991) 49-55.
101. Galiatsatos, C., Ikariyama, Y., Mark, J.E., and Heineman, W.R. *Immobilization of glucose oxidase in a poly [vinyl alcohol] matrix on platinumized graphite electrodes by gamma-irradiation.* Biosensors and Bioelectronics **5**,(1990) 47-61.

102. Wang, J., Myung, N.V., Yun, M., and Monbouquette, H.G. *Glucose oxidase entrapped in polypyrrole on high-surface-area Pt electrodes: A model platform for sensitive electroenzymatic biosensors*. Journal of Electroanalytical Chemistry **575**,(2005) 139-146.
103. Heller, A. and Feldman, B. *Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management*. Chemical Reviews **108**,(2008) 2482-2505.
104. Gregg, B.A. and Heller, A. *Cross-Linked Redox Gels Containing Glucose-Oxidase for Amperometric Biosensor Applications*. Analytical Chemistry **62**,(1990) 258-263.
105. Gregg, B.A. and Heller, A. *Redox polymer films containing enzymes. 1. A redox-conducting epoxy cement: Synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinone*. Journal of Physical Chemistry **95**,(1991) 5970-5975.
106. Heller, A. *Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes*. Journal of Physical Chemistry **96**,(1992) 3579-3587.
107. Bartlett, P.N. and Caruana, D.J. *Electrochemical immobilisation of enzymes: Part V. Microelectrodes for the detection of glucose based on glucose oxidase immobilised in poly(phenol) film*. The Analyst **117**,(1992) 1287-1292.
108. Mitala, J.J. and Michael, A.C. *Improving the performance of electrochemical microsensors based on enzymes entrapped in a redox hydrogel*. Analytica Chimica Acta **556**,(2006) 326-332.
109. Rusling, J.F. *Enzyme Bioelectrochemistry in Cast Biomembrane-Like Films*. Accounts of Chemical Research **31**,(1998) 363-369.
110. Xu, Y., Hu, C., and Hu, S. *Single-chain surfactant monolayer on carbon paste electrode and its application for the studies on the direct electron transfer of hemoglobin*. Bioelectrochemistry **74**,(2009) 254-259.
111. Jones, M.N., Manley, P., and Wilkinson, A. *The dissociation of glucose oxidase by sodium n-dodecyl sulphate*. Biochemical Journal **203**,(1982) 285-291.
112. Rahim, M.A., Choi, W.S., Lee, H.J., and Jeon, I.C. *Ionic surfactant-triggered renewal of the structures and properties of polyelectrolyte multilayer films*. Langmuir **26**,(2010) 4680-4686.
113. McCreery, R.L. *Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry*. Chemical Reviews **108**,(2008) 2646-2687.
114. Harris, P.J. *Carbon nanotubes and related structures. New materials for the twenty-first century*. Cambridge Press: U.K.,(2003).
115. Niyogi, S., Hamon, M.A., Hu, H., Zhao, B., Bhowmik, P., Sen, R., Itkis, M.E., and Haddon, R.C. *Chemistry of single-walled carbon nanotubes*. Accounts of Chemical Research **35**,(2002) 1105-1113.
116. Ajayan, P.M. *Nanotubes from Carbon*. Chemical Reviews **99**,(1999) 1787-1799.
117. Gooding, J.J. *Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing*. Electrochimica Acta **50**,(2005) 3049-3060.
118. Rivas, G.A., Rubianes, M.D., Rodríguez, M.C., Ferreyra, N.F., Luque, G.L., Pedano, M.L., Miscoria, S.A., and Parrado, C. *Carbon nanotubes for electrochemical biosensing*. Talanta **74**,(2007) 291-307.
119. Iijima, S. *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature **354**,(1991) 56-58.
120. Iijima, S. and Ichihashi, T. *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter*. Nature **363**,(1993) 603-605.
121. Britto, P.J., Santhanam, K.S.V., and Ajayan, P.M. *Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics **41**,(1996) 121-125.
122. Odom, T.W., Huang, J.L., Kim, P., and Lieber, C.M. *Structure and Electronic Properties of Carbon Nanotubes*. Journal of Physical Chemistry B **104**,(2000) 2794-2809.
123. Dresselhaus, M.S., Lin, Y.M., Rabin, O., Jorio, A., Souza Filho, A.G., Pimenta, M.A., Saito, R., Samsonidze, G.G., and Dresselhaus, G. *Nanowires and nanotubes*. Materials Science and Engineering C **23**,(2003) 129-140.
124. Hiura, H., Ebbesen, T.W., and Tanigaki, K. *Opening and purification of carbon nanotubes in high yields*. Advanced Materials **7**,(1995) 275-276.

125. Britto, P.J., Santhanam, K.S.V., Rubio, A., Alonso, J.A., and Ajayan, P.M. *Improved charge transfer at carbon nanotube electrodes*. *Advanced Materials* **11**,(1999) 154-157.
126. Barthos, R., Méhn, D., Demortier, A., Pierard, N., Morciaux, Y., Demortier, G., Fonseca, A., and Nagy, J.B. *Functionalization of single-walled carbon nanotubes by using alkyl-halides*. *Carbon* **43**,(2005) 321-325.
127. Dettlaff-Weglikowska, U., Benoit, J.M., Chiu, P.W., Graupmer, R., Lebedkin, S., and Roth, S. *Chemical functionalization of single walled carbon nanotubes*. *Current Applied Physics* **2**,(2002) 497-501.
128. Kuzmany, H., Kukovecz, A., Simon, F., Holzweber, M., Kramberger, C., and Pichler, T. *Functionalization of carbon nanotubes*. *Synthetic Metals* **141**,(2004) 113-122.
129. Hou, P.X., Liu, C., and Cheng, H.M. *Purification of carbon nanotubes*. *Carbon* **46**,(2008) 2003-2025.
130. Lin, Y., Taylor, S., Li, H., Fernando, K.A.S., Qu, L., Wang, W., Gu, L., Zhou, B., and Sun, Y.P. *Advances toward bioapplications of carbon nanotubes*. *Journal of Materials Chemistry* **14**,(2004) 527-541.
131. Rubianes, M.D. and Rivas, G.A. *Carbon nanotubes paste electrode*. *Electrochemistry Communications* **5**,(2003) 689-694.
132. Rubianes, M.D. and Rivas, G.A. *Dispersion of multi-wall carbon nanotubes in polyethylenimine: A new alternative for preparing electrochemical sensors*. *Electrochemistry Communications* **9**,(2007) 480-484.
133. Kobayashi, S., Tokunoh, M., Saegusa, T., and Mashio, F. *Poly(allylamine): Chelating properties and resins for uranium recovery from seawater*. *Macromolecules* **18**,(1985) 2357-2361.
134. Chen, W. and McCarthy, T.J. *Layer-by-layer deposition: A tool for polymer surface modification*. *Macromolecules* **30**,(1997) 78-86.
135. Shiratori, S.S. and Rubner, M.F. *pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes*. *Macromolecules* **33**,(2000) 4213-4219.
136. Gregg, B.A. and Heller, A. *Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications*. *Analytical Chemistry* **62**,(1990) 258-263.
137. Scodeller, P., Flexer, V., Szamocki, R., Calvo, E.J., Tognalli, N., Troiani, H., and Fainstein, A. *Wired-enzyme core-shell Au nanoparticle biosensor*. *Journal of the American Chemical Society* **130**,(2008) 12690-12697.
138. Narváez, A., Suárez, G., Popescu, I.C., Katakis, I., and Domínguez, E. *Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures*. *Biosensors and Bioelectronics* **15**,(2000) 43-52.
139. Rusling, J.F. and Forster, R.J. *Electrochemical catalysis with redox polymer and polyion-protein films*. *Journal of Colloid and Interface Science* **262**,(2003) 1-15.
140. Scodeller, P., Carballo, R., Szamocki, R., Levin, L., Forchiassin, F., and Calvo, E.J. *Layer-by-layer self-assembled osmium polymer-mediated laccase oxygen cathodes for biofuel cells: The role of hydrogen peroxide*. *Journal of the American Chemical Society* **132**,(2010) 11132-11140.
141. Noguchi, T. and Anzai, J.I. *Redox properties of the ferricyanide ion on electrodes coated with layer-by-layer thin films composed of polysaccharide and poly(allylamine)*. *Langmuir* **22**,(2006) 2870-2875.
142. Zahn, R., Boulmedais, F., Vörös, J., Schaaf, P., and Zambelli, T. *Ion and solvent exchange processes in PGA/PAH polyelectrolyte multilayers containing ferrocyanide*. *Journal of Physical Chemistry B* **114**,(2010) 3759-3768.
143. Wang, B. and Anzai, J.I. *Redox reactions of ferricyanide ions in layer-by-layer deposited polysaccharide films: A significant effect of the type of polycation in the films*. *Langmuir* **23**,(2007) 7378-7384.

144. Cao, X., Luo, L., Ding, Y., Zou, X., and Bian, R. *Electrochemical methods for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using cetylpyridine bromide/chitosan composite film-modified glassy carbon electrode*. Sensors and Actuators, B: Chemical **129**,(2008) 941-946.
145. Heras, J.Y., Giacobone, A.F.F., and Battaglini, F. *Ascorbate amperometric determination using conducting copolymers from aniline and N-(3-propane sulfonic acid)aniline*. Talanta **71**,(2007) 1684-1689.
146. Bonastre, A.M. and Bartlett, P.N. *Electrodeposition of PANi films on platinum needle type microelectrodes. Application to the oxidation of ascorbate in human plasma*. Analytica Chimica Acta **676**,(2010) 1-8.
147. Sinani, V.A., Gheith, M.K., Yaroslavov, A.A., Rakhnyanskaya, A.A., Sun, K., Mamedov, A.A., Wicksted, J.P., and Kotov, N.A. *Aqueous dispersions of single-wall and multiwall carbon nanotubes with designed amphiphilic polyocations*. Journal of the American Chemical Society **127**,(2005) 3463-3472.
148. Islam, M.F., Rojas, E., Bergey, D.M., Johnson, A.T., and Yodh, A.G. *High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water*. Nano Letters **3**,(2003) 269-273.
149. Bonastre, A.M., Sosna, M., and Bartlett, P.N. *An analysis of the kinetics of oxidation of ascorbate at poly(aniline)-poly(styrene sulfonate) modified microelectrodes*. Physical Chemistry Chemical Physics **13**,(2011) 5365-5372.
150. Duvall, S.H. and McCreery, R.L. *Self-catalysis by catechols and quinones during heterogeneous electron transfer at carbon electrodes*. Journal of the American Chemical Society **122**,(2000) 6759-6764.
151. Bard A.J. and L.R., F. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications. 2nd Edition*. Wiley & Sons Inc.: New York,(2001).
152. Flexer, V. *Tesis Doctoral: Estudios experimentales y modelado de sistemas enzimáticos autoensamblados para generación electroquímica de señal de biosensores*. (2007) Universidad de Buenos Aires. Argentina.
153. Peinetti, A.S., González, G.A., and Battaglini, F. *Modeling the electrochemical response of mesoporous materials toward its application to biomolecular detection*. Electroanalysis **22**,(2010) 1329-1336.
154. Forster, R.J. and Vos, J.G. *Homogeneous and heterogenous charge transfer dynamics of [Os(bipy)2(PVP)nCl]Cl films in neutral pH electrolytes*. Electrochimica Acta **37**,(1992) 159-167.
155. Gibson, Q.H., Swoboda, B.E., and Massey, V. *Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase*. The Journal of biological chemistry **239**,(1964) 3927-3934.
156. Abad, J.M., Vélez, M., Santamaría, C., Guisán, J.M., Matheus, P.R., Vázquez, L., Gazaryan, I., Gorton, L., Gibson, T., and Fernández, V.M. *Immobilization of peroxidase glycoprotein on gold electrodes modified with mixed epoxy-boronic acid monolayers*. Journal of the American Chemical Society **124**,(2002) 12845-12853.
157. Prieto-Simón, B., Campàs, M., and Marty, J.L. *Biomolecule immobilization in biosensor development: Tailored strategies based on affinity interactions*. Protein and Peptide Letters **15**,(2008) 757-763.
158. Monzo, A., Bonn, G.K., and Guttman, A. *Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry **26**,(2007) 423-432.
159. Farooqi, M., Sosnitsa, P., Saleemuddin, M., Ulber, R., and Scheper, T. *Immunoaffinity layering of enzymes: Stabilization and use in flow injection analysis of glucose and hydrogen peroxide*. Applied Microbiology and Biotechnology **52**,(1999) 373-379.
160. Farooqi, M., Saleemuddin, M., Ulber, R., Sosnitsa, P., and Scheper, T. *Bioaffinity layering: A novel strategy for the immobilization of large quantities of glycoenzymes*. Journal of Biotechnology **55**,(1997) 171-179.

161. Inoue, H., Sato, K., and Anzai, J.I. *Disintegration of layer-by-layer assemblies composed of 2-iminobiotin-labeled poly(ethyleneimine) and avidin*. Biomacromolecules **6**,(2005) 27-29.
162. Kobayashi, Y., Hoshi, T., and Anzai, J.I. *Glucose and lactate biosensors prepared by a layer-by-layer deposition of concanavalin A and mannose-labeled enzymes: Electrochemical response in the presence of electron mediators*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin **49**,(2001) 755-757.
163. Azzaroni, O., Álvarez, M., Abou-Kandil, A.I., Yameen, B., and Knoll, W. *Tuning the unidirectional electron transfer at interfaces with multilayered redox-active supramolecular bionanoassemblies*. Advanced Functional Materials **18**,(2008) 3487-3496.
164. Mir, M., Álvarez, M., Azzaroni, O., Tiefenauer, L., and Knoll, W. *Molecular architectures for electrocatalytic amplification of oligonucleotide hybridization*. Analytical Chemistry **80**,(2008) 6554-6559.
165. Saleemuddin, M. and Husain, Q. *Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilization - A review*. Enzyme and Microbial Technology **13**,(1991) 290-295.
166. Husain, S., Jafri, F., and Saleemuddin, M. *Immobilization and stabilization of horseradish peroxidase isoforms*. Biochemistry and Molecular Biology International **40**,(1996) 1-11.
167. Turkova, J., Fusek, M., Maksimov, J.J., and Alakhov, Y.B. *Reversible and irreversible immobilization of carboxypeptidase Y using biospecific adsorption*. Journal of Chromatography - Biomedical Applications **VOL. 376**,(1986) 315-321.
168. Rosenfeld, H., Aniulyte, J., Helmholz, H., Liesiene, J., Thiesen, P., Niemeyer, B., and Prange, A. *Comparison of modified supports on the base of glycoprotein interaction studies and of adsorption investigations*. Journal of Chromatography A **1092**,(2005) 76-88.
169. Yavuz, H., Akgöl, S., Arica, Y., and Denizli, A. *Concanavalin A immobilized affinity adsorbents for reversible use in yeast invertase adsorption*. Macromolecular Bioscience **4**,(2004) 674-679.
170. Miranda, M.V., Magri, M.L., Navarro Del Cañizo, A.A., and Cascone, O. *Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concanavalin A-Agarose*. Process Biochemistry **38**,(2002) 537-543.
171. Pallarola, D., Queralto, N., Knoll, W., Azzaroni, O., and Battaglini, F. *Facile glycoenzyme wiring to electrode supports by redox-active biosupramolecular glue*. Chemistry - A European Journal **16**,(2010) 13970-13975.
172. Deacon, A., Gleichmann, T., Kalb, A.J., Price, H., Raftery, J., Bradbrook, G., Yariv, J., and Helliwell, J.R. *The structure of concanavalin a and its bound solvent determined with small-molecule accuracy at 0.94 Å resolution*. Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions **93**,(1997) 4305-4312.
173. Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Reeke Jr, G.N., Becker, J.W., Waxdal, M.J., and Wang, J.L. *The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **69**,(1972) 2580-2584.
174. Arrondo, J.L.R., Young, N.M., and Mantsch, H.H. *The solution structure of concanavalin A probed by FT-IR spectroscopy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular **952**,(1988) 261-268.
175. Alter, G.M., Pandolfino, E.R., Christie, D.J., and Magnuson, J.A. *Calcium-induced cooperativity of manganese binding to concanavalin A*. Biochemistry **16**,(1977) 4034-4038.
176. Becker, J.W., Reeke Jr, G.N., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. *New evidence on the location of the saccharide binding site of concanavalin A*. Nature **259**,(1976) 406-409.
177. Kalb, A.J. and Levitzki, A. *Metal-binding sites of concanavalin A and their role in the binding of alpha-methyl d-glucopyranoside*. Biochemical Journal **109**,(1968) 669-672.
178. Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J.R., Kalb, A.J., Dodson, E.J., Papiz, M.Z., Wan, T., and Campbell, J. *The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A*. EMBO Journal **8**,(1989) 2189-2193.

179. Reeke Jr, G.N., Becker, J.W., and Edelman, G.M. *The covalent and three dimensional structure of concanavalin A. IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure.* Journal of Biological Chemistry **250**,(1975) 1525-1547.
180. Yamazaki, I., Tamura, M., and Nakajima, R. *Horseradish peroxidase C.* Molecular and Cellular Biochemistry **40**,(1981) 143-153.
181. Ogawa, S., Shiro, Y., and Morishima, I. *Calcium binding by horseradish peroxidase c and the heme environmental structure.* Biochemical and Biophysical Research Communications **90**,(1979) 674-678.
182. Dequaire, M., Limoges, B., Moiroux, J., and Savéant, J.M. *Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase. Catalysis and inhibition.* Journal of the American Chemical Society **124**,(2002) 240-253.
183. Pallarola, D., Queralto, N., Knoll, W., Ceoli, Azzaroni, O., and Battaglini, F. *Redox-active concanavalin a: Synthesis, characterization, and recognition-driven assembly of interfacial architectures for bioelectronic applications.* Langmuir **26**,(2010) 13684-13696.
184. Fu, Q. and Gowda, D.C. *Carbohydrate-directed conjugation of cobra venom factor to antibody by selective derivatization of the terminal galactose residues.* Bioconjugate Chemistry **12**,(2001) 271-279.
185. Thünemann, A.F., Müller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J.F., and Löwen, H. 2004. p. 113-171.
186. Cortez, M.L., Cukierman, A.L., and Battaglini, F. *Surfactant presence in a multilayer polyelectrolyte-enzyme system improves its catalytic response.* Electrochemistry Communications **11**,(2009) 990-993.
187. Cortón, E. and Battaglini, F. *Effect of milk proteins on the behavior of a biosensor based on poly(allylamine) containing an osmium complex wired to redox enzymes: Part 2. Bienzymatic configuration.* Journal of Electroanalytical Chemistry **511**,(2001) 8-12.
188. Pallarola, D., Queralto, N., Battaglini, F., and Azzaroni, O. *Supramolecular assembly of glucose oxidase on concanavalin A - Modified gold electrodes.* Physical Chemistry Chemical Physics **12**,(2010) 8071-8083.
189. Coman, V., Gustavsson, T., Finkelsteinas, A., Von Wachenfeldt, C., Hägerhäll, C., and Gorton, L. *Electrical wiring of live, metabolically enhanced Bacillus subtilis cells with flexible osmium-redox polymers.* Journal of the American Chemical Society **131**,(2009) 16171-16176.
190. Ertl, P. and Mikkelsen, S.R. *Electrochemical biosensor array for the identification of microorganisms based on lectin - Lipopolysaccharide recognition.* Analytical Chemistry **73**,(2001) 4241-4248.
191. Reska, A., Gasteier, P., Schulte, P., Moeller, M., Offenhäusser, A., and Groll, J. *Ultrathin coatings with change in reactivity over time enable functional in vitro networks of insect neurons.* Advanced Materials **20**,(2008) 2751-2755.
192. Fromherz, P. *Electronic And Ionic Devices: Semiconductor chips with brain tissue.* (2008).
193. Schätzthauer, R. *Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents.* European Journal of Neuroscience **10**,(1998) 1956-1962.
194. Thünemann, A.F. and General, S. *Nanoparticles of a polyelectrolyte-fatty acid complex: Carriers for Q10 and triiodothyronine.* Journal of Controlled Release **75**,(2001) 237-247.
195. Knaapila, M., Evans, R.C., Garamus, V.M., Almásy, L., Székely, N.K., Gutacker, A., Scherf, U., and Burrows, H.D. *Structure and "surfactochromic" properties of conjugated polyelectrolyte (CPE): surfactant complexes between a cationic polythiophene and SDS in water.* Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids **26**,(2010) 15634-15643.
196. Danilowicz, C. *Tesis Doctoral: Estudio de electrodos enzimáticos amperométricos diseñados con hidrogeles redox.* (1995) Universidad de Buenos Aires. Argentina.

197. Wolosiuk, A. *Tesis Doctoral: Sistemas supramoleculares organizados por ensamblado de capas monomoleculares de enzimas y polímeros redox.* (2002) Universidad de Buenos Aires. Argentina.
198. Scodeller, P. *Aplicaciones de electrodos enzimáticos y multicapas enzimáticas en biosensores y bioceldas de combustible.* (2011) Universidad de Buenos Aires. Argentina.
199. Moya, S., Donath, E., Sukhorukov, G.B., Auch, M., Bäuml, H., Lichtenfeld, H., and Möhwald, H. *Lipid coating on polyelectrolyte surface modified colloidal particles and polyelectrolyte capsules.* *Macromolecules* **33**,(2000) 4538-4544.
200. Dai, Z., Voigt, A., Leporatti, S., Donath, E., Dähne, L., and Möhwald, H. *Layer-by-layer self-assembly of polyelectrolyte and low molecular weight species into capsules.* *Advanced Materials* **13**,(2001) 1339-1342.
201. Caruso, F., Spasova, M., Salgueiriño-Maceira, V., and Liz-Marzán, L.M. *Multilayer assemblies of silica-encapsulated gold nanoparticles on decomposable colloid templates.* *Advanced Materials* **13**,(2001) 1090-1094.
202. Sukhorukov, G., Dähne, L., Hartmann, J., Donath, E., and Möhwald, H. *Controlled precipitation of dyes into hollow polyelectrolyte capsules based on colloids and biocolloids.* *Advanced Materials* **12**,(2000) 112-115.
203. Kamata, K., Lu, Y., and Xia, Y. *Synthesis and characterization of monodispersed core-shell spherical colloids with movable cores.* *Journal of the American Chemical Society* **125**,(2003) 2384-2385.

