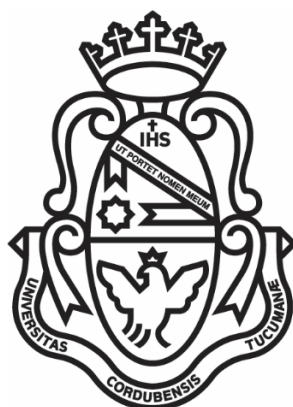


ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO Y GRAFENO

CARACTERIZACIÓN Y DESARROLLO DE
BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS Y
PLASMÓNICOS PARA LA DETECCIÓN DE
BIOMARCADORES DE RELEVANCIA



Tesis Doctoral

Emiliano Nicolás Primo

INFIQC.

Departamento de Físicoquímica.

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional
de Córdoba.

CÓRDOBA, ARGENTINA.

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba, en el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba; bajo la dirección del Dr. Gustavo Adolfo Rivas y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Prof. Dr. Gustavo A. Rivas

COMISIÓN EVALUADORA

Prof. Dra. M. Dolores Rubianes

Prof. Dra. Cecilia I. Álvarez
Igarzábal

Prof. Dr. Rafael G. Oliveira

Prof. Dr. Omar Azzaroni
EVALUADOR EXTERNO

Para Andrea

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas (Universidad Nacional de Córdoba), al Departamento de Físicoquímica y al INFIQC por darme el lugar para realizar el doctorado. Al CONICET por la beca otorgada sin la cual no hubiese sido posible esto.

A los entes que financiaron este trabajo de Tesis: CONICET, ANPCyT, SECyT-UNC, MinCyT-Nación, MinCyT-Córdoba, Fondecyt-Chile, ACCDiS-Chile, MICINN-España.

A los Dres. Rafael Oliveira y Cecilia Álvarez por el tiempo (sobre todo el tiempo de escucharme las reuniones de Tesis eternas), la excelente predisposición y sus inquietudes que enriquecieron esta Tesis.

Al Dr. Omar Azzaroni por su interés en evaluar la Tesis.

A las Dras. M. Teresa Martínez y Soledad Bollo por permitirme hacer parte de mi Tesis en sus laboratorios durante las estancias en Zaragoza y Santiago. Por su tiempo y por abrirme las puertas de sus laboratorios para hacer y deshacer a mi gusto. Al Dr. Marcelo Kogan por las valiosas discusiones respecto al inmunosensor.

A mis jefes los Dres. Gustavo Rivas y Dolores Rubianes, millones de gracias por ser, antes que mis directores, Gus y Dolo. Por sus valores humanos y científicos, por su confianza, por su paciencia a mis preguntas y dudas, y por encauzarme cuando fue necesario. Por darme la libertad absoluta e irrestricta de apropiarme durante estos 5 años de mi lugar de trabajo y de la Tesis.

A los miembros del grupo de Biosensores (los de siempre, los que estuvieron mucho tiempo, los que pasaron por un practicanato o una estancia corta). A Marce por sus comentarios alegres y por tener siempre la solución a todo. Gracias Nancy por la predisposición a ayudar, por tus consejos en el momento justo y por los cafecitos "no supercríticos". Al staff "más viejo" del lab (Guille, Vicky, Yami y Fausto) porque me acompañaron en mis inicios así que fueron casi mis tutores. Por las risas, mates y chistes en nuestros días de medidas hasta tarde y por una amistad que trascendió el lab y sus doctorados. Al staff "más nuevo" (las 3 Marías: Ceci, Lau y Poncita) por devolverle la chispita al lab, por soportar mis males humores, por su tono elevado de risa y sobre todo, por los almuerzo en los que se escucha/aprende/ríe de TODO! A Marcos y a Ale, los compas de ofi. A Fabiola, por habernos acompañado desde que empezamos los dos en el grupo, te merecés un Gracias Totales para vos solita.

A los miembros del Departamento, y sobre todo, a los habitantes de las penurias e inundaciones del sótano. A todas las gentes de los laboratorios 109 y 110 (Ricky, Fer, Ceci V, Dari, Marula, Vale y Laus) por la buena onda, los mates, los reactivos que siempre prestaban, la centrífuga y muchos otros etc. A Susi Chauque. Muchas, muchas gracias.

A "la" Susi Amatto. A las secres del Departamento y del INFIQC, por que su ayuda con el papelerío y la recolección de firmas fue invaluable.

A Budencia y Fraire, por las juntadas de catarsis y "ponerse al día". A Gaby Oksdath, la primera que molesté para ir "a ver que se hacía en el grupo de Orgánica".

A los chicos de Laboratorio III, Química Física y el Cursillo que les tocó sufrirme como profe. Millones de gracias porque seguro que sin darse cuenta ustedes, me mostraron que saber y saber enseñar son dos cosas distintas.

A los chicos del lab de Bioelectroquímica de la UChile, por las risas, los karaokes en el medio de las medidas, los paseos, las micheladas y las super-empanadas chilenas. A Javi por aguantarme cuando no tenía hogar en Santiago. A Camilo, Ricardo y Andy.

A mis amigos y amigas no facultativos, muchas muchas pero muuuchas gracias. No es por ser el cable a tierra ni nada de esa cursilada, sino por estar y dejarse acompañar, por no entenderme los chistes ñoños ni lo de seguir laburando en casa a pesar de estar todo el día en el lab. Por mostrarme de todo y un poco más, porque mis amigos no se callan nada. Gracias Vicky G, por tu eterna devoción. Gracias Nes, por la frescura y los chiste maliisimos que te reís de pena. Amaa, la doctora corazón. Kika y Rolo, las distancias son superfluas, siempre están. Yoha y Guada, lo más. A los chichisos Pablo, Dani, Tomi, Leandro, Pela, Ari y Turco.

A Eliseo (y todos los sobrenombres de moda lo largo de los años), amigo gracias por acompañarme con la seguridad y el soporte en el momento justo y por no dejar de sorprenderme. Porque sos un ejemplo.

A "LA" Ludmi. A mi hermana que me regaló la vida hace unos 16 años cuando andábamos con terrible cara de nenes todavía en las clases con el Chibli Yammal y el *chicken face*. Crecimos juntos y con los años el vínculo se afianzó, superó mudanzas de ciudad y de gustos, de acercamientos y distancias. Pilar de muchas decisiones que tomé, no me imagino hoy acá si no fuese por vos. A tu flía, que me tomó como uno más. Por compartirme de todo. Hasta un ratito de Gladex. Gracias y por millones de Europas juntos.

A la más pesada de todas. Pesada porque nunca me dejó bajar los brazos, porque me prohibió los no, las culpas, los arrepentimientos. Porque me apuntalaste en las peores. Porque me dejaste acompañarte en tus peores. Por la sinceridad y libertad absoluta de poder discutir y hablar de cualquier cosa. Por Tailandia. Porque me la malcrias a la Tulia. Porque yo puedo ser yo y vos podés ser vos. Porque hiciste que no encuentre más palabras ni gestos para decirte todo lo que representas y sos. Gracias Vane, de esas que van con abrazo estrujador. Gracias a la familia extendida, porque también se llevan un parte de este logro. Porque lo tajiste a Ivancito. Gracias Ivancito por elegirnos como tu hogar.

Las familias no convencionales, ese término tan de moda, tienen esa cosa de que los que están lo hacen porque lo elegimos así y no por imposición de ningún lazo sanguíneo. En ese lugar de familia están LOS TÍOS. Soporte en las peores y las mejores. Oídos, manos, ojos y todo cuando tuvieron que serlo. A veces el diccionario es caprichoso, porque te limita con las palabras. El Gracias les queda chico. Comparto este título, porque una parte son ustedes. Gaby y Ony, los amo. A mis primos, Mati y Chris.

A los más chicos, Sofi y Ale. La suerte que yo tengo de tenerlos como hermanos. Porque seguro que no saben, pero me enseñan a ver todo desde otra perspectiva. Porque los amo con toda mi alma, así de simple.

Ahora te toca a vos. La de cosas que pasamos y vivimos no le llegan ni a los talones de la "maldita lisiada" de alguna novela mexicana. Estos momentos son la excusa perfecta de hacer un repaso de todo y ¿sabés qué es lo más importante?: que en todo mi todo estás vos. Gracias Rulos porque no te falte ninguno de los sentimientos habidos y por haber. Porque no me merezco el título de hermano mayor, esa función la cumpliste siempre vos. Aguantador, resolutivo, acompañador, positivo; cualquier adjetivo que alguien te ponga sos un ejemplo para mí. Gas, ya te lo dije y lo vuelvo a repetir, sos lo más, sos mi todo. Te amo. Archimegarequeterecontramil GRACIAS.

Somos instantes. Somos recuerdos. Somos lo que decimos y lo que nos guardamos. Yo, particularmente, soy además tu hijo. Mami, gracias por todo lo que nos diste. Por todo lo que me enseñaste queriendo y sin querer, por todo lo que te faltó mostrarme y por todo lo que pudiste transmitir. Me niego a superarte (como se dice por ahí, que uno supera estas cosas) porque nunca voy a estar listo para saltearte y soltarte. A veces me pregunto si no te olvido. Pero no, jamás. Están el Gas, la Sofi y el Ale para poder verte cuando te necesito. Esto que soy y que logré, fue y será siempre por vos Mami. TE AMO.

“La simplicidad es la máxima sofisticación”

Leonardo Da Vinci

“¿Fracaso? Fracaso es una palabra rara. No veo fracasos. Veo la evolución natural hacia la solución de un problema”

Anónimo

INDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVES	ix
ABREVIATURAS	xiii

CAPÍTULO 1

Introducción general	1
1.1. Nanotubos de carbono	5
1.1.1. Propiedades electroquímicas de CNT	6
1.2. Grafeno y sus nanomateriales derivados	7
1.2.1. Propiedades electroquímicas del grafeno y sus nanomateriales derivados	8
1.3. Biosensores basados en el uso de nanoestructuras de carbono	9
1.3.1. Generalidades de los biosensores	9
1.3.2. Nanoestructuras de carbono en la construcción de biosensores	10
1.4. Procesamiento y funcionalización de nanoestructuras de carbono	12
1.5. Estrategias de ensamblado de nanoestructuras de carbono sobre sustratos sólidos	13
1.6. Bibliografía	14

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos	19
2.1. Voltamperometría cíclica	23
2.1.1. Respuesta de especies en solución (difusión lineal semi-infinita)	23
2.1.2. Respuesta de especies adsorbidas	25
2.1.3. Respuesta de especies con difusión finita	26
2.2. Voltamperometría de pulso diferencial	26

2.2.1. <i>Stripping</i> de adsorción con detección por DPV	27
2.3. Amperometría	28
2.4. Cronocoulometría	29
2.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica	30
2.5.1. Circuitos eléctricos equivalentes	31
2.6. Instrumentación y celdas electroquímicas	34
2.7. Microscopia de barrido electroquímico	34
2.7.1. Instrumentación	36
2.8. Resonancia de plasmón superficial	37
2.8.1. Instrumentación	40
2.9. Microscopia electrónica de barrido	41
2.10. Limpieza, pretratamiento y preparación de los sustratos de trabajo	42
2.10.1. Cuarzo	42
2.10.2. Carbono vítreo	43
2.10.3. Oro policristalino	44
2.11. Autoensamblado de tioles sobre electrodos de Au	46
2.11.1. Adsorción de 3-mercaptopropionato de sodio	47
2.11.2. Adsorción de 4-aminotiofenol	49
2.12. Bibliografía	51

RESULTADOS

- PARTE A -

Plataformas (bio)analíticas basadas en la funcionalización no covalente de BCNT con dsDNA

CAPÍTULO 3

Dispersión de BCNT con dsDNA

57

Caracterización para el desarrollo de plataformas electroactivas

3.1. Introducción	61
3.1.1. Estructura del DNA	61
3.1.2. Factores que estabilizan a la doble hebra	62
3.1.3. Electroquímica del DNA	63
3.1.4. Dispersión de CNT con DNA	64
3.2. Metodología experimental	67
3.3. Resultados y discusión	67
3.3.1. Respuesta electroquímica intrínseca de la dispersión	67
3.3.2. BCNT vs HCNT	68
3.3.3. Optimización de las condiciones de dispersión	70
3.3.3.a. Efecto del solvente y del tiempo de sonicado	70
3.3.3.b. Efecto de la cantidad de BCNT	74
3.3.3.c. Efecto de la concentración de dsDNA	75
3.3.4. Arreglo del DNA en la dispersión BCNT-dsDNA	75
3.3.5. Propiedades electroquímicas de GCE/BCNT-dsDNA	78
3.3.5.a. Caracterización de la respuesta electroquímica	78
3.3.5.b. Estudio de la reactividad electroquímica superficial	81
3.4. Conclusiones parciales	82
3.5. Bibliografía	83

CAPÍTULO 4

Aplicaciones analíticas de GCE/BCNT-dsDNA	89
Biosensor de afinidad para la cuantificación de prometazina	
4.1. Introducción	93
4.1.1. Intercalación del DNA	93
4.1.2. Intercalación como herramienta electroanalítica	94
4.1.3. Prometazina	95

4.2. Metodología	97
4.2.1. Experimental	97
4.2.1.a. Preparación de la dispersión y modificación de GCE	97
4.2.1.b. Modificación del cuarzo	97
4.2.2. Computacional	97
4.3. Resultados y discusión	100
4.3.1. Comportamiento electroquímico de PMZ	100
4.3.2. Análisis del proceso de intercalación	105
4.3.2.a. Espectros de absorción experimentales vs cálculos teóricos	105
4.3.2.b. Cambios en la capacitancia de las plataformas	109
4.3.3. Aplicación analítica para la cuantificación de PMZ	111
4.4. Conclusiones parciales	112
4.5. Bibliografía	113

CAPÍTULO 5

Aplicaciones analíticas de GCE/BCNT-dsDNA	117
Biosensor enzimático para la cuantificación de glucosa	
5.1. Introducción	121
5.1.1. Autoensamblado capa por capa de polielectrolitos	121
5.1.2. Biosensores electroquímicos de glucosa	122
5.1.2.a. Glucosa oxidasa	122
5.1.2.b. Estrategias de inmovilización de GOx sobre CNT	123
5.2. Metodología experimental	125
5.3. Resultados y discusión	125
5.3.1. Optimización de las condiciones de ensamblado	125
5.3.1.a. Naturaleza del polimerización	126
5.3.1.b. Tiempo de inmersión y concentración de PDDA	127

5.3.1.c. <i>Tiempo de inmersión y concentración de GOx</i>	128
5.3.1.d. <i>Estudio de la adsorción de PDDA y GOx sobre GCE/BCNT-dsDNA</i>	129
5.3.2. <i>Construcción y caracterización de multicapas GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n</i>	130
5.3.2.a. <i>Evaluación de la respuesta a glucosa</i>	130
5.3.2.b. <i>Estudio del proceso de adsorción: bloqueo superficial</i>	131
5.3.2.c. <i>Estudio del proceso de adsorción: cantidad de masa</i>	132
5.3.2.d. <i>Análisis de la reversión de cargas</i>	133
5.3.2.e. <i>Evaluación del cubrimiento superficial de GOx bioactiva</i>	136
5.3.3. <i>Parámetros analíticos de GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n</i>	138
5.3.3.a. <i>Estudio de la selectividad y afinidad del biosensor</i>	138
5.3.3.b. <i>Desempeño analítico del biosensor</i>	139
5.4. <i>Conclusiones parciales</i>	140
5.5. <i>Bibliografía</i>	141

RESULTADOS

- PARTE B -

Plataformas (bio)analíticas basadas en el uso de nanomateriales derivados de grafeno

CAPÍTULO 6

Funcionalización e inmovilización de nanomateriales derivados de grafeno 147

Caracterización para el desarrollo de plataformas electroactivas y plasmónicas

6.1. Introducción 151

6.1.1. Funcionalización de nanomateriales derivados de grafeno con polímeros y biomoléculas 151

6.1.2. Factores que afectan la inmovilización de proteínas sobre nanomateriales derivados del grafeno 153

6.2. Metodología experimental	155
6.2.1. Síntesis de GO-CHIT y RGO-CHIT	155
6.2.2. Limpieza y preparado de los sustratos de Au	155
6.2.2.a. <i>Ensamblado no covalente de GO, GO-CHIT y RGO-CHIT</i>	156
6.2.2.b. <i>Ensamblado covalente de GO-CHIT y RGO-CHIT</i>	157
6.2.3. Procedimiento e instrumentación	157
6.3. Resultados y discusión	158
6.3.1. Caracterización de GO, GO-CHIT y RGO-CHIT	158
6.3.2. Ensamblado no covalente de GO	163
6.3.2.a. <i>Propiedades electroquímicas de Au/MPS/PDDA/GO</i>	163
6.3.2.b. <i>Inmovilización de BSA sobre Au/MPS/PDDA/GO</i>	164
6.3.2.c. <i>Efecto del pH sobre la inmovilización de GO y BSA</i>	166
6.3.3. Ensamblado no covalente de GO-CHIT	170
6.3.3.a. <i>Propiedades electroquímicas de Au/MPS/GO-CHIT</i>	170
6.3.3.b. <i>Inmovilización de BSA sobre Au/MPS/GO-CHIT</i>	171
6.3.3.c. <i>Efecto del pH sobre la inmovilización de GO-CHIT y BSA</i>	173
6.3.4. Ensamblado no covalente de RGO-CHIT	176
6.3.4.a. <i>Propiedades electroquímicas de Au/MPS/RGO-CHIT</i>	176
6.3.4.b. <i>Inmovilización de BSA sobre Au/MPS/RGO-CHIT</i>	177
6.3.4.c. <i>Efecto del pH sobre la inmovilización de RGO-CHIT y BSA</i>	179
6.3.5. Inmovilización covalente de GO-CHIT y RGO-CHIT	181
6.3.6. Comparación de las estrategias de inmovilización no covalentes	183
6.4. Conclusiones parciales	185
6.5. Bibliografía	186

CAPÍTULO 7

Aplicación analítica de Au/MPS/PDDA/GO	191
Inmunosensor plasmónico para la detección de un biomarcador de infarto de miocardio	
7.1. Introducción	195
7.1.1. Anticuerpos e inmunosensores	195
7.1.2. Biomarcadores cardíacos	197
7.1.3. Empleo de grafeno y nanomateriales derivados en SPR	198
7.2. Metodología experimental	200
7.2.1. Ensamblado LBL de PDDA/GO	200
7.2.2. Construcción del inmunosensor de Gal3	200
7.3. Resultados y discusión	201
7.3.1. Propiedades ópticas de Au/MPS/(PDDA/GO) _n	201
7.3.2. Propiedades electroquímicas de Au/MPS/(PDDA/GO) _n	203
7.3.3. Efecto en la cantidad de proteína inmovilizada sobre Au/MPS/(PDDA/GO) _n	205
7.3.4. Au/MPS/(PDDA/GO) ₄ : inmovilización del anticuerpo y construcción del inmunosensor	206
7.3.5. Au/MPS/(PDDA/GO) ₄ : efecto de la presencia de GO en la detección de Gal3	208
7.3.6. Desempeño analítico del inmunosensor	209
7.4. Conclusiones parciales	211
7.5. Bibliografía	212

CAPÍTULO 8

Conclusiones generales	215
-------------------------------	------------

RESUMEN

Los biosensores están estrechamente relacionados con la vida moderna, incluyendo aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades como también para la detección de agentes biológicos y contaminantes en el medio ambiente. Entre los distintos biosensores, los electroquímicos representan una prometedora alternativa debido a su alta sensibilidad, elevada relación señal/ruido, relativa simplicidad, tiempo de respuesta rápido y posibilidad de portabilidad y miniaturización.

El carbono, un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, ha sido utilizado por los seres humanos durante mucho tiempo. Con los continuos avances en la nanotecnología, se han encontrado y aplicado diversos alótopos del carbono en numerosos campos, incluyendo la nanoelectrónica y electrónica de alta frecuencia, almacenamiento y conversión de energía, transistores de emisión de campo, teranóstica y biosensores.

En este trabajo de Tesis se funcionalizaron nanotubos de carbono y materiales derivados del grafeno con polímeros y biomoléculas y se inmovilizaron sobre sustratos de carbono vítreo (GCE) y oro con el objetivo de construir plataformas (bio)analíticas para el desarrollo de biosensores electroquímicos y plasmónicos.

El **CAPÍTULO 1** presenta una introducción general acerca de los nanomateriales de carbono utilizados en el trabajo de Tesis: nanotubos de carbono y grafeno y derivados. Se describe la relación entre la estructura y las propiedades electroquímicas y ópticas. Se especifican las distintas metodologías de incorporación de nanotubos de carbono y grafeno sobre sustratos conductores y se detallan las aplicaciones de estos materiales en el desarrollo de biosensores electroquímicos y plasmónicos.

El **CAPÍTULO 2** discute los fundamentos de las técnicas más representativas empleadas en el presente trabajo Tesis y las metodologías llevadas a cabo para obtener los resultados.

En el **CAPÍTULO 3** se muestran los resultados de la funcionalización no covalente de nanotubos de carbono multipared tipo *bamboo* (BCNT) con DNA de doble hebra de timo de ternera (dsDNA). Se discuten las propiedades electroquímicas de la plataforma y las ventajas que presentan BCNT frente a CNT tipo *hollow* convencionales. Asimismo, se analiza el efecto de las condiciones de dispersión (solvente, tiempo de sonicado y relación BCNT:dsDNA) sobre la respuesta electroquímica de la plataforma y la estructura e integridad del DNA, empleando técnicas electroquímicas, espectroscópicas y microscopías electrónicas.

En los **CAPÍTULOS 4 y 5** se exponen las aplicaciones analíticas de la plataforma GCE/BCNT-dsDNA para el desarrollo de biosensores electroquímicos. En el **CAPÍTULO 4**

se presentan los resultados obtenidos tomando ventaja de las propiedades de bio-reconocimiento del dsDNA soportado sobre BCNT dispersos para desarrollar un biosensor dirigido a la cuantificación sensible de prometazina (PMZ), un intercalador de la doble hebra. Se discuten los cambios en la respuesta electroquímica de PMZ al interaccionar con la plataforma GCE/BCNT-dsDNA. Mediante técnicas electroquímicas, espectroscopia UV-Vis y cálculos cuánticos se analiza el proceso de intercalación de PMZ. Se presentan las características analíticas de la cuantificación de PMZ a niveles nanomolares empleando *stripping* de adsorción con detección por voltamperometría de pulso diferencial. En el **CAPÍTULO 5** se muestran las ventajas que ofrece la característica de polianión de dsDNA soportado sobre BCNT para autoensamblar capa por capa la enzima glucosa oxidasa (GOx) con el fin de desarrollar un biosensor de glucosa. Se discuten las condiciones óptimas de ensamblado de GOx y del polianión poli(dialildimetilamonio) (PDDA), y la influencia del número de bicapas tipo (PDDA/GOx)_n en las características morfológicas de las películas ensambladas como así también en la bioactividad de la enzima.

En el **CAPÍTULO 6** se presenta la síntesis y caracterización de óxido de grafeno (GO) modificado covalentemente con quitosano (GO-CHIT) y su posterior reducción química (RGO-CHIT). Se comparan distintas estrategias de inmovilización sobre sustratos de Au:

- No covalentes: mediante autoensamblado capa por capa de PDDA/GO, GO-CHIT y RGO-CHIT sobre Au derivatizado con el tiol 3-mercaptopropan-sulfonato de sodio (MPS).
- Covalentes: a través de la inmovilización de GO-CHIT y RGO-CHIT sobre Au derivatizado con el tiol 4-aminotiofenol (4ATP), utilizando glutaraldehído como agente de acoplamiento.

En todos los casos se discuten las propiedades electroquímicas y el proceso de adsorción a través del empleo de SPR y espectroscopia UV-Vis; y se efectúa el análisis comparativo del cubrimiento de una proteína modelo en las distintas plataformas para poder implementarlas como sustratos de inmovilización de un anticuerpo para el desarrollo de un inmunosensor con detección electroquímica y plasmónica.

En el **CAPÍTULO 7** se utiliza la plataforma Au/MPS/PDDA/GO para la inmovilización de un anticuerpo monoclonal específico para la proteína Galectina-3, biomarcador para la detección temprana de insuficiencia cardíaca aguda. Se evalúan las propiedades ópticas y electroquímicas del autoensamblado (PDDA/GO)_n sobre Au/MPS y su efecto en la capacidad de inmovilización del anticuerpo. Se presentan los parámetros analíticos y especificidad del biosensor propuesto.

Por último, en el **CAPÍTULO 8** se exponen las conclusiones generales del trabajo de Tesis realizado.

PALABRAS CLAVES

Nanotubos de carbono tipo *bamboo*, DNA de doble hebra, intercalador, glucosa, nanomateriales derivados de grafeno, quitosano, galectina-3, biosensor inmunosensor, biosensor de afinidad, biosensor enzimático.

ABREVIATURAS

η	Índice de refracción
ΔE_p	Diferencia de potencial de pico
θ_{SPR}	Ángulo de mínimo de SPR
3ABA	Ácido 3-aminofenil-borónico
4ATP	4-aminotiofenol
4MBA	Ácido 4-mercapto-benzoico
A	Adenina
A_e	Área electroactiva
anti-Gal4	Anticuerpo anti-Galectina-3
BCNT	Nanotubos de carbono multipared tipo <i>bamboo</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Citosina
C_{dc}	Capacidad de la doble capa
CHIT	Quitosano
DFT	Teoría del funcional de densidad
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial
D_R	Coefficiente de difusión de la especie R
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedancia electroquímica
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EtOH	Etanol
F	Constante de Faraday
FcOH	Ferroceno-metanol
G	Guanina

Gal3	Galectina-3
GCE	Electrodo de carbono vítreo
Glut	Glutaraldehido
GO	Óxido de grafeno
GOx	Glucosa oxidasa
H₂Q	Hidroquinona
HCNT	Nanotubos de carbono multipared tipo <i>hollow</i>
i_{pa}	Corriente de pico anódica
k₀	Constante de transferencia de carga heterogénea
LBL	Capa por capa
LOD	Límite de detección
MPS	3-mercaptopropan-sulfonato de sodio
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NP	Nanopartícula
o.c.p.	Potencial de circuito abierto
PDDA	Poli(dialildimetilamonio)
PMZ	Prometazina
Q	Quinona
RGO	Óxido de grafeno químicamente reducido
R_{tc}	Resistencia a la transferencia de carga
SPR	Resonancia de plasmón superficial
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
T	Timina
v	Velocidad de barrido de potencial
VC	Voltamperometría cíclica

CAPÍTULO 1

Introducción general

RESUMEN

En el presente capítulo se presenta una introducción a los nanomateriales de carbono, haciendo especial énfasis en sus propiedades electroquímicas y usos en la construcción de biosensores electroquímicos y plasmónicos.

1.1. Nanotubos de carbono

La primera publicación sobre los nanotubos de carbono (CNT) en 1991 por Iijima [1] trajo a dicho nanomaterial al centro de la escena en la comunidad científica. Los CNT son nanomateriales gráfiticos y forman parte de los alótropos de C junto con el grafito, grafeno y fullerenos, entre otros (**figura 1.1 A**). Idealmente, su estructura consiste en una lámina de C sp^2 enrollada en forma de tubo con dos medios fullerenos en los extremos [2]. Los CNT poseen una elevada relación de aspecto dado que su diámetro se encuentra en las dimensiones nano (entre 0,7 y 40 nm) mientras que su largo es del orden de las micras [3].

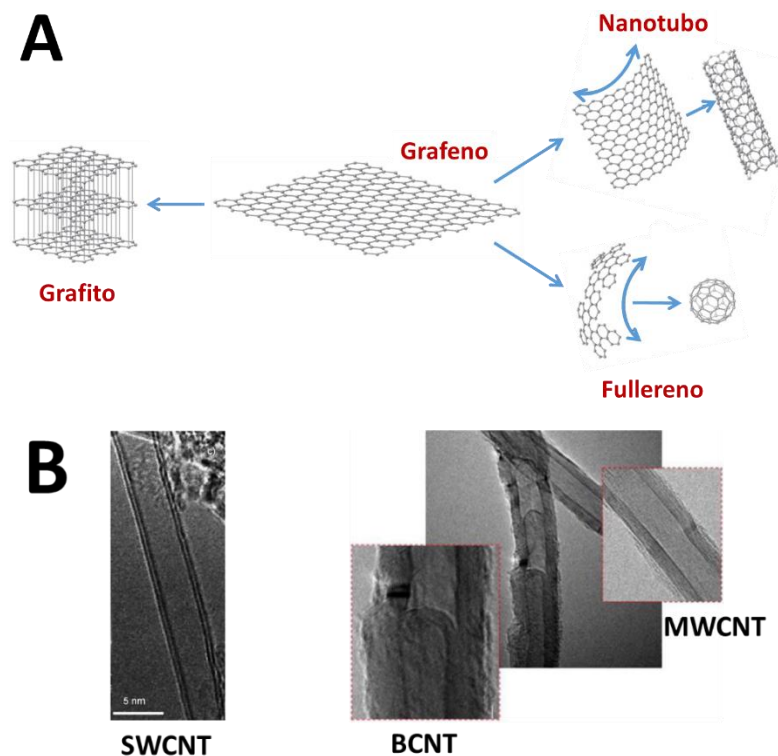


Figura 1.1. A Esquema de la estructura del grafito, grafeno y los alótropos derivados de éste, nanotubo y fullereno. **B** Imágenes TEM de CNT de pared simple (tomada de Ref. [4]) y de CNT de pared múltiple y tipo *bamboo* (tomada de Ref. [5]).

De acuerdo al número de láminas de grafito enrolladas se pueden clasificar en CNT de pared simple (SWCNT) o de pared múltiple (MWCNT), como se muestra en las imágenes TEM de la **figura 1.1 B**. Dependiendo de la densidad de defectos se puede distinguir entre CNT tipo *hollow*, que presentan paredes laterales sin defectos; y CNT tipo *bamboo* (panel central inferior de la imagen TEM de la **figura 1.1 B**) caracterizado por tener defectos de borde transversales a intervalos regulares [6]. Las propiedades electrónicas de los CNT dependen fuertemente de su estructura: mientras los SWCNT pueden ser metálicos o semiconductores (dependiendo de la quiralidad con la que se enrolle la lámina de grafeno), los MWCNT son normalmente metálicos [7].

Los principales métodos de síntesis de CNT son por descarga de arco eléctrico, ablación láser, monóxido de carbono de alta presión (HiPCO) y deposición química-catalítica de vapor (cCVD) [2,7,8]. Los dos primeros métodos emplean fuentes de carbono sólidas e involucran la vaporización de C a altas temperaturas [9]. HiPCO produce CNT mediante reacciones en fase gaseosa de CO con catalizadores de Fe-carbonilo a elevadas presiones [8]. Si bien mediante los tres primeros procesos las nanoestructuras son de alta calidad, se obtienen productos secundarios como C amorfo, nanopartículas (NP) metálicas y fullerenos [7,9]. Por el contrario, con cCVD se obtiene CNT con alta cristalinidad y baja densidad de defectos y un porcentaje ínfimo de C amorfo. Dicha metodología consiste en la descomposición catalítica de gases ricos en C sobre NP metálicas [10].

1.1.1. Propiedades electroquímicas de CNT

Debido a la naturaleza interfacial de la electroquímica, la mayor parte de la investigación de la electroactividad de los CNT se enfoca en la estructura superficial de los mismos [4,11].

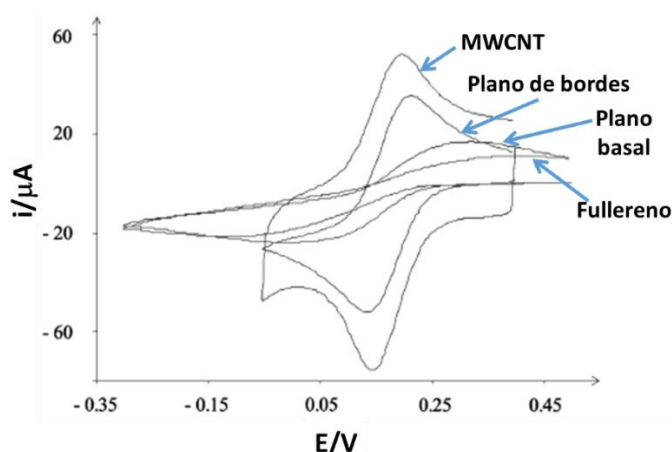


Figura 1.2. Perfiles voltamperométricos obtenidos en $[Fe(CN)_6]^{3-}$ sobre electrodos de grafito pirolítico con planos de borde, basal y modificados con MWCNT y fullerenos. $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. Tomado de la Ref. [12].

Banks y col. [12] compararon la respuesta voltamperométrica de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ sobre electrodos de grafito pirolítico con planos de borde y basales con electrodos modificados con MWCNT y fullerenos (figura 1.2). Los resultados demostraron que la velocidad de transferencia de carga es lenta sobre los planos basales de C sp^2 mientras que es muy rápida sobre los planos de bordes. Al relacionar la estructura con la respuesta electroquímica determinaron que la electrocatálisis hallada en los MWCNT se debe a la presencia de defecto de bordes, lo cual ha sido ampliamente demostrado en bibliografía [4,11,13]. Por otro lado, el grupo de Gooding [14] determinó que los

extremos de los CNT poseen mayor electroactividad que las paredes al comparar la respuesta electroquímica de CNT alineados en distintas direcciones. Existe cierto consenso, también, en que la presencia de grupos oxigenados obtenidos al oxidar los CNT mejora la transferencia de carga de las cuplas redox de esfera interna [11,13].

Por otro lado, se ha discutido extensivamente en bibliografía respecto a si las impurezas que quedan de los procesos de síntesis (como el C amorfo o las NP metálicas) son las que les imparten a los CNT de sus propiedades electrocatalíticas [15]. De esta manera, la purificación de los CNT es vital para su incorporación como transductor electroquímico [16].

1.2. Grafeno y sus nanomateriales derivados

El término grafeno (**figura 1.1 A**) se refiere a una mono-lámina de grafito, donde los átomos de C sp^2 se encuentran arreglados en una red hexagonal que posee por encima y por debajo de ésta orbitales conjugados π [17]. Estrictamente, este término se reserva a una única lámina bidimensional [18], mientras que cuando aumenta el número de láminas apiladas se le coloca el prefijo bicapa, tricapa o multicapas [19].

Como mono-lámina de C, el grafeno es el nanomaterial más delgado conocido hasta ahora ($\sim 3,4 \text{ \AA}$), es impermeable a los gases y tan fuerte como el acero [20]. Debido a esta elevada relación de aspecto posee un área específica teórica de $2639 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y una elevada conductividad eléctrica [20]. Las propiedades antes mencionadas corresponden a la mono-lámina la cual es prácticamente imposible de ser sintetizada de manera masiva, siendo ésta su principal limitación [21]. Los métodos de síntesis escalables incluyen los *top-down* a partir del grafito ya sea en solución, mediante exfoliación o tratamiento mecánico [22]; y por descomposición epitaxial de SiC y CVD sobre sustratos metálicos [21]. Con estos métodos por lo general se obtienen derivados de grafeno en multicapas, con densidad de defectos y cierto carácter sp^3 que, a pesar de ello, poseen la mayoría de las propiedades de la mono-lámina.

El método de obtención de nanoestructuras de grafeno más utilizado, y el que se implementa en el presente trabajo de tesis, es a través del óxido de grafeno (GO) [19,23]. Como lo muestra el esquema de la **figura 1.3**, primero se oxida el grafito en una mezcla a reflujo de agentes oxidantes para formar el óxido de grafito, que luego por tratamiento con ultrasonido se exfolia dando lugar al GO. La presencia de grupos oxigenados hidrofílicos provoca un incremento en el espaciado entre las láminas del óxido de grafito (a $6 - 12 \text{ \AA}$) y luego la exfoliación separa las láminas. El GO forma una dispersión coloidal estable en solución acuosa debido a la carga superficial negativa de los grupos carboxilato [24]. La reducción de GO produce el óxido de grafeno reducido (RGO) [25].

Este material no es estrictamente grafeno debido a que la reducción no suele ser completa y, además, se produce re-apilado del RGO para minimizar el área expuesta de C sp² hidrofóbico a la solución acuosa. La modificación con un agente dispersante mejora la estabilidad coloidal del RGO [26].

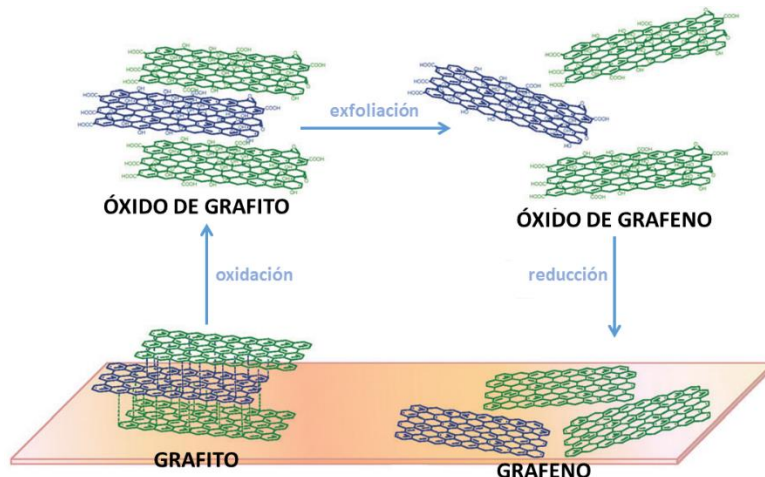


Figura 1.3. Esquema de la síntesis del grafeno a partir de grafito.

1.2.1. Propiedades electroquímicas del grafeno y sus nanomateriales derivados

Al igual que los CNT, la velocidad de transferencia de carga del grafeno y sus materiales derivados depende no sólo de la cupla redox en análisis sino también de la cantidad de defectos presentes en su estructura, los grupos funcionales y las impurezas [27]. Velicky y col. [28] midieron la constante de transferencia de carga heterogénea (k_0), empleando tres mediadores redox independientes, sobre muestras de grafeno con distinto número de láminas apiladas n_L (de 1 a ~ 1000). Si bien los autores no hallaron una tendencia entre n_L y k_0 , encontraron que los planos basales son electroactivos y que dentro de una misma muestra hay una gran variabilidad de k_0 [28].

La dificultad de establecer una relación entre la estructura del grafeno y la actividad electroquímica se debe a que la forma de deposición/inmovilización sobre el electrodo es difícil de controlar, lo cual afecta la densidad relativa de bordes y planos basales expuestos a la solución [29]. A pesar de esto, existe consenso respecto a que los bordes poseen mayores propiedades electrocatalíticas que los planos basales y que el incremento en la relación C/O de los nano-materiales derivados del grafeno promueve el incremento en la k_0 de cuplas redox de esfera interna [27,30]. En un trabajo reciente, Tan y col. [31] demostraron mediante microscopía de barrido electroquímico (SECM) con $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como mediador redox que los defectos sobre la estructura del grafeno incrementan la reactividad electroquímica en un orden de magnitud (**figura 1.4 A**).

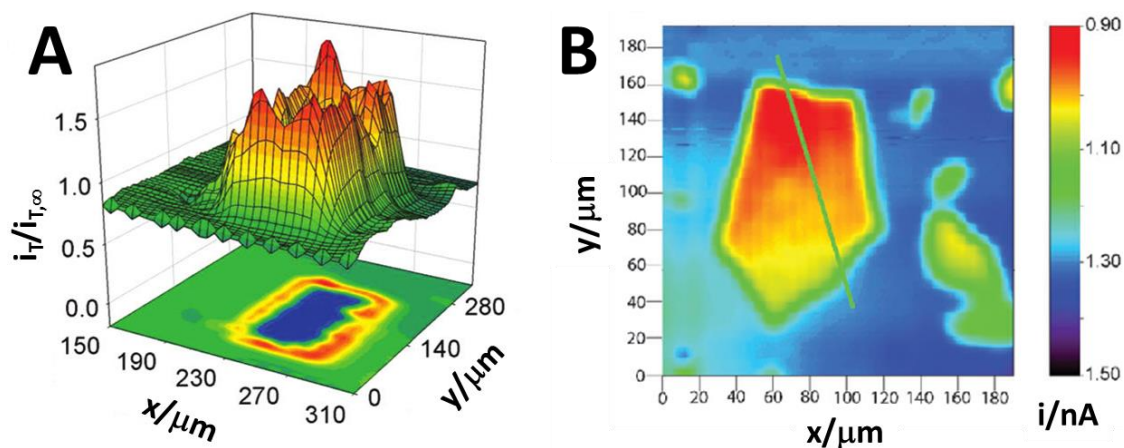


Figura 1.4. **A** Imagen SECM de grafeno sobre SiO_x con un defecto inducido mecánicamente. Cupla redox: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M. UME: Pt de $7,5 \mu\text{m}$ de diámetro. Imagen tomada de Ref. [31]. **B** Imagen SECM de GO sobre Au. Cupla redox: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $1,00 \times 10^{-3}$ M. UME: Pt de $10 \mu\text{m}$ de diámetro. Imagen tomada de Ref. [32].

La electroquímica del GO está caracterizada por una transferencia de carga lenta dado el mayor carácter aislante por la alta densidad de C sp^3 presente en su estructura [23,33]. Rapino y col. [32] estudiaron su comportamiento electroquímico a través de SECM usando diversas sondas redox (**figura 1.4 B**) y demostraron que la respuesta observada sobre superficies modificadas con GO depende fuertemente de la interacción electrostática entre la carga negativa del mismo con la cupla y de la diferencia de k_0 entre el GO y el sustrato [32].

1.3. Biosensores basados en el uso de nanoestructuras de carbono

1.3.1. Generalidades de los biosensores

Un biosensor se compone, básicamente, de dos partes: una capa de bio-reconocimiento, que cumple la función de reconocer e interactuar específicamente con la especie de interés, confiriéndole selectividad al proceso; y el transductor, que se encuentra en íntimo contacto con el material biológico de reconocimiento y transforma la señal físico-química en una señal medible [34]. Dicha señal físico-química se origina como consecuencia de la interacción entre la especie de interés y la plataforma de bio-reconocimiento.

Los biosensores pueden ser clasificados según la naturaleza de la capa de bio-reconocimiento y el tipo de interacción que establecen con la muestra en [35,36]:

- Catalíticos: constituidos por organelas, tejidos o sistemas enzimáticos de origen biológico, utilizados para la detección de diversos analitos. Son capaces de reconocer selectivamente al sustrato y transformarlo en productos a través de

una reacción catalítica. Los biocomponentes catalíticos incrementan la velocidad de reacción, disminuyendo la energía de activación necesaria para que ocurra. El consumo del sustrato es continuo, dando lugar a una respuesta de estado estacionario, la que es colectada por el detector. Entre los elementos de reconocimiento se destacan las enzimas, que son moléculas de naturaleza proteica altamente específicas y eficientes en la detección selectiva de diversas especies.

- De afinidad: emplean la interacción específica existente entre la molécula de bio-reconocimiento y la especie a detectar. Durante este evento de reconocimiento no hay consumo neto de la especie por el bioacomplejante inmovilizado, es decir que el proceso de reconocimiento está gobernado fundamentalmente por la termodinámica de la interacción, en contraste con el control cinético que muestran los sistemas biocatalíticos. Las interacciones que se estudian usualmente, son las del tipo antígeno/anticuerpo (denominados inmunosensores); la interacción entre células receptoras/ligandos (lectinas, entre otros), y los sensores que involucran al DNA (denominados genosensores).
- Celulares: emplean organismos unicelulares tales como bacterias, hongos, levaduras y células de origen animal o vegetal como elementos de bio-reconocimiento. Este tipo de biosensores detecta la respuesta de las células luego de su exposición a una muestra y explota la toxicidad del analito sobre la capa celular inmovilizada.

1.3.2. Nanoestructuras de carbono en la construcción de biosensores

Entre los múltiples tipos de biosensores, los electroquímicos representan una de las alternativas más populares debido a su bajo costo, la capacidad de miniaturizarlos, la portabilidad y su tiempo de respuesta prácticamente instantáneo [37,38]. Por otro lado, los biosensores plasmónicos con detección por resonancia de plasmón superficial (SPR) si bien son más recientes y menos desarrollados que los electroquímicos, presentan la gran ventaja de ser extremadamente sensibles a eventos de reconocimiento específico ligando-biomolécula y que la detección es directa y en tiempo real [39].

En este sentido, la utilización de nanomateriales de carbono en el desarrollo de sistemas electroquímicos de detección es una de sus principales aplicaciones debido a la mejora en el rendimiento analítico que les imparten. Esto se evidencia en el creciente número de publicaciones sobre CNT o grafeno y sus derivados con aplicaciones en biosensores (**figura 1.5**).

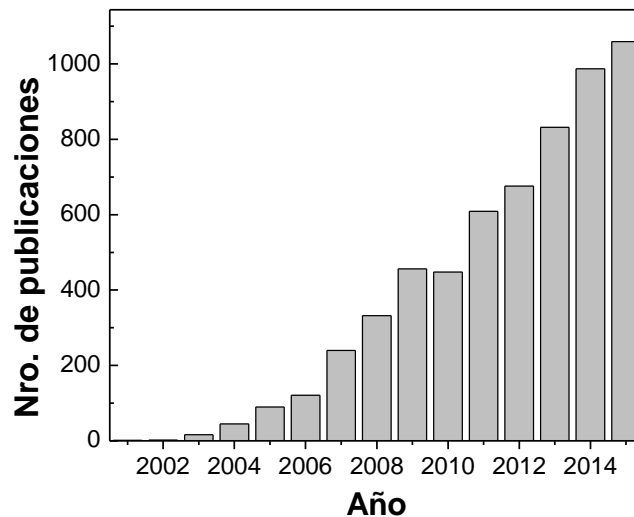


Figura 1.5. Número de publicaciones en revistas indexadas para una búsqueda de los campos "carbon nanotube biosensor" y/o "graphene biosensor" en el buscador *Web of Science* (Thomson Reuters).

A pesar de que el costo y complejidad de las síntesis de algunos nanomateriales de C suele ser similar al de otras nanoestructuras (como las NP metálicas o *quantum dots*), el hecho que deriven de uno de los elementos de mayor abundancia en la corteza terrestre hace que su fuente sea casi ilimitada. Desde el punto de vista de los biosensores electroquímicos, las ventajas del uso de CNT/grafeno y derivados son [40-43]:

- Disminución de los sobrepotenciales de oxidación y reducción de un gran número de compuestos de interés analítico.
- Aumento del área expuesta del transductor electroquímico.
- Mejora en la transferencia de carga entre el transductor y el analito.
- Biocompatibilidad y alta capacidad de inmovilización de biomoléculas.
- Facilidad de ser funcionalizados y derivatizados mediante metodologías covalentes y no covalentes.
- Elevada capacidad de adsorción de diversos tipos de moléculas.

El desarrollo de múltiples estrategias y metodologías analíticas de cuantificación empleando CNT o el grafeno y derivados con transducción electroquímica y plasmónica fue posible gracias a la funcionalización y derivatización de los mismos con el fin de conferirles selectividad y propiedades de reconocimientos específicas. La bioespecificidad se logró mediante la incorporación de polímeros [44-46], proteínas y enzimas [47-49], ácidos nucleicos [50,51], anticuerpos [52], aptámeros [53], entre otros, a CNT y grafeno y sus nanomateriales derivados.

1.4. Procesamiento y funcionalización de nanoestructuras de carbono

El desarrollo de biosensores basados en el uso de nanoestructuras de carbono es posible siempre que la incorporación de las mismas en el transductor (sea óptico o electroquímico) se efectúe de manera reproducible y controlada. La manera más común de incorporar CNT/grafeno y derivados sobre sustratos sólidos que actúan como transductores es mediante su dispersión en algún solvente. El principal problema es la baja o nula dispersabilidad de los mismos en los solventes habituales, especialmente en agua.

La elevada superficie específica del grafeno y derivados promueve la aglomeración espontánea e irreversible o el re-apilado de las láminas cuando el GO se reduce a RGO [25,54]. Como resultado de ello, se obtiene nuevamente un material similar al grafito de partida. En el caso de los CNT, debido a las fuerzas de van der Waals entre las superficies de $C\ sp^2$ de los nanotubos, éstos tienden a formar agregados o “ramilletes” que son muy difíciles de separar incluso utilizando solventes orgánicos apolares [44]. Esta propensión al agregado y baja dispersabilidad está favorecida por su elevada relación de aspecto y su peso molecular [55].

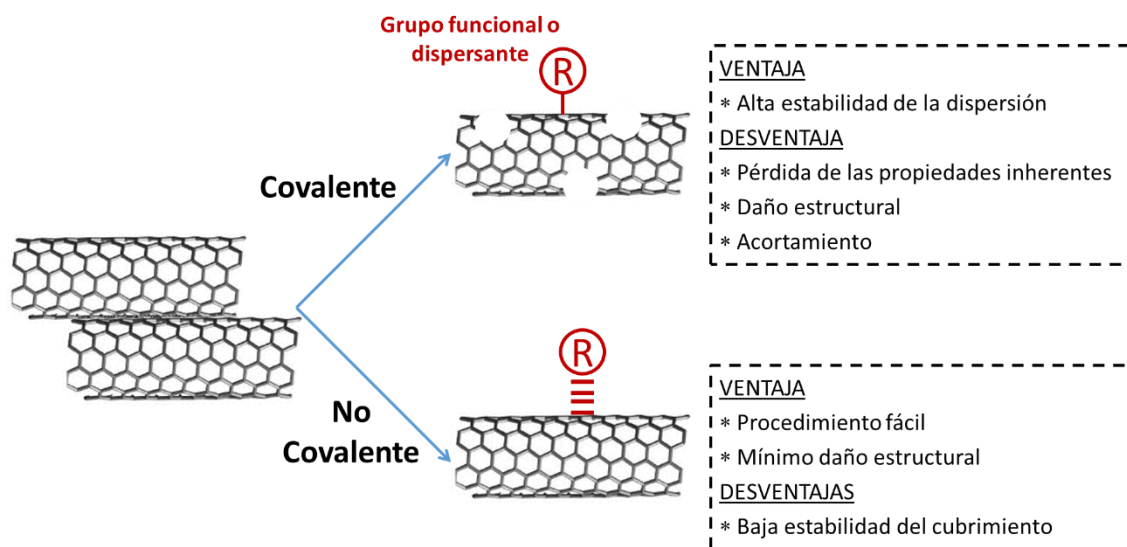


Figura 1.6. Principales estrategias de modificación de CNT/grafeno y derivados.

Dado que las nanoestructuras forman dispersiones coloidales, la teoría de DLVO enuncia que, para favorecer la estabilidad coloidal, se debe modificar la región interfacial superficial de las partículas coloidales con el fin de promover la repulsión entre las mismas [56]. Las diversas estrategias para superar este problema se basan en

la modificación de la superficie de los CNT/grafeno y derivados por métodos covalentes o no covalentes (**figura 1.6**).

Las metodologías covalentes se dividen en dos, dependiendo del grupo funcional que se utilice. La primera consiste en introducir grupos oxigenados mediante la oxidación de CNT [57] o utilizar los grupos presentes en el GO [24] para enlazar covalentemente moléculas, polímeros o grupos funcionales. La segunda se basa en la química del enlace C=C o la introducción de grupos funcionales por mecanismos radicalarios [58,59]. En todos los casos, las modificaciones covalentes suelen ser mejores que las no covalentes en términos de estabilidad y grado de funcionalización [44]. Sin embargo, debido a que se producen cambios químicos en la red de C sp² se suele perder, en cierto grado, las propiedades electroquímicas de los CNT/grafeno y derivados [54].

La funcionalización no covalente se lleva a cabo a través de la adsorción de surfactantes y pequeñas moléculas o el enrollamiento de polímeros sobre la superficie de CNT/grafeno y derivados [44,60]. Dado que no se altera la red de C sp² ni el tamaño de las nanoestructuras, este tipo de modificaciones preserva las propiedades intrínsecas de estos materiales [55]. Sin embargo, la desventaja que posee la modificación no covalente es que suele ser reversible y, por lo tanto, menos estable a lo largo del tiempo.

1.5. Estrategias de ensamblado de nanoestructuras de carbono sobre sustratos sólidos

El ensamblado de nanoestructuras de carbono en arquitecturas ordenadas es un proceso donde las interacciones entre los bloques constituyentes juegan un papel decisivo. Muchas veces este ensamblado puede ser complejo debido a la naturaleza de las múltiples interacciones que se establecen y que incluyen fuerzas de van der Waals, *π-stacking*, de interacción hidrofóbica y, en algunas ocasiones, interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno [61]. El agregado no controlado de estas nanoestructuras raramente conduce a la formación de arquitecturas con la funcionalidad específica que se desea. Es necesario, entonces, controlar el proceso de ensamblado sobre sustratos haciendo uso de las interacciones que se establecen en el coloide con el objetivo de diseñar plataformas con arquitecturas jerárquicas estables [62].

La modificación o ensamblado de nanomateriales de carbono sobre electrodos sólidos se basa en la modificación de los mismos por alguna estrategia covalente o no covalente. Esta modificación se lleva a cabo para mejorar la estabilidad del coloide o brindarle alguna funcionalidad al mismo tal que oriente la modificación de los electrodos. Las mismas se clasifican de acuerdo al tipo de interacción que establecen con la nanoestructura de carbono en [61–64]:

- Mediante fuerzas de van der Waals: incorporando CNT/grafeno y derivados en matrices poliméricas como compósitos o hidrogeles. En este tipo de estrategias, las nanoestructuras de carbono actúan como el material conductor en la matriz polimérica aislante.
- Interacciones electrostáticas: aprovechando la carga superficial de los coloides (como por ejemplo, el GO que se encuentra cargado negativamente) para autoensamblarlos. En este caso, la fuerza impulsora es la reversión de cargas opuestas entre el coloide y la superficie del electrodo.
- Deposición física: involucra la formación de una película macroscópica del nanomaterial. Se basa en las fuerzas de cohesión de grafeno/CNT cuando se seca el solvente de la dispersión coloidal. Incluye las metodologías de *drop-casting*, *spin-coating*, filtración al vacío (formación de *buckypapers*), entre otros.
- Inmovilización covalente: formación de enlaces entre la superficie del electrodo y algún grupo funcional del grafeno/CNT. Estos pueden ser introducidos mediante oxidación de las nanoestructuras con ácidos fuertes o la modificación no covalente con moléculas que posean grupos funcionales.

1.6. Bibliografía

- [1] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*. 354 (1991) 56–58.
- [2] A.T. Lawal, Synthesis and utilization of carbon nanotubes for fabrication of electrochemical biosensors, *Mater. Res. Bull.* 73 (2016) 308–350.
- [3] A.J.P. and F.D. and S.I. and K. Morokuma, Insights into carbon nanotube and graphene formation mechanisms from molecular simulations: a review, *Reports Prog. Phys.* 78 (2015) 36501.
- [4] K. Gong, S. Chakrabarti, L. Dai, Electrochemistry at Carbon Nanotube Electrodes: Is the Nanotube Tip More Active Than the Sidewall?, *Angew. Chemie Int. Ed.* 47 (2008) 5446–5450.
- [5] K.J. MacKenzie, O.M. Dunens, A.T. Harris, Insights into carbon nanotube growth using an automated gravimetric apparatus, *Carbon N. Y.* 59 (2013) 344–365.
- [6] B.R. Stoner, B. Brown, J.T. Glass, Selected topics on the synthesis, properties and applications of multiwalled carbon nanotubes, *Diam. Relat. Mater.* 42 (2014) 49–57.
- [7] A. Jorio, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, *Carbon Nanotubes - Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications*, 1st ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg, 2008.
- [8] N.M. Mubarak, E.C. Abdullah, N.S. Jayakumar, J.N. Sahu, An overview on methods for the production of carbon nanotubes, *J. Ind. Eng. Chem.* 20 (2014) 1186–1197.
- [9] N. Arora, N.N. Sharma, Arc discharge synthesis of carbon nanotubes: Comprehensive review, *Diam. Relat. Mater.* 50 (2014) 135–150.
- [10] K.A. Shah, B.A. Tali, Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapour deposition: A review on carbon sources, catalysts and substrates, *Mater. Sci. Semicond. Process.* 41 (2016) 67–82.
- [11] I. Dumitrescu, P.R. Unwin, J. V Macpherson, Electrochemistry at carbon nanotubes:

- perspective and issues, *Chem. Commun.* (2009) 6886–6901.
- [12] C.E. Banks, R.R. Moore, T.J. Davies, R.G. Compton, Investigation of modified basal plane pyrolytic graphite electrodes: definitive evidence for the electrocatalytic properties of the ends of carbon nanotubes, *Chem. Commun.* (2004) 1804–1805.
- [13] M. Pumera, *The Electrochemistry of Carbon Nanotubes: Fundamentals and Applications*, *Chem. – A Eur. J.* 15 (2009) 4970–4978.
- [14] J. Liu, A. Chou, W. Rahmat, M.N. Paddon-Row, J.J. Gooding, Achieving Direct Electrical Connection to Glucose Oxidase Using Aligned Single Walled Carbon Nanotube Arrays, *Electroanalysis*. 17 (2005) 38–46.
- [15] M. Pumera, Y. Miyahara, What amount of metallic impurities in carbon nanotubes is small enough not to dominate their redox properties?, *Nanoscale*. 1 (2009) 260–265.
- [16] C. Ge, W. Li, Y. Li, B. Li, J. Du, Y. Qiu, et al., Significance and Systematic Analysis of Metallic Impurities of Carbon Nanotubes Produced by Different Manufacturers, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11 (2011) 2389–2397.
- [17] C. Soldano, A. Mahmood, E. Dujardin, Production, properties and potential of graphene, *Carbon N. Y.* 48 (2010) 2127–2150.
- [18] A. Bianco, H.-M. Cheng, T. Enoki, Y. Gogotsi, R.H. Hurt, N. Koratkar, et al., All in the graphene family – A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials, *Carbon N. Y.* 65 (2013) 1–6.
- [19] R.S. Edwards, K.S. Coleman, Graphene synthesis: relationship to applications, *Nanoscale*. 5 (2013) 38–51.
- [20] S. Ray, *Applications of Graphene and Graphene-Oxide based Nanomaterials*, Elsevier Inc., Oxford, 2015.
- [21] K.E. Whitener Jr., P.E. Sheehan, Graphene synthesis, *Diam. Relat. Mater.* 46 (2014) 25–34.
- [22] D.K. James, J.M. Tour, Graphene: Powder, Flakes, Ribbons, and Sheets, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 2307–2318.
- [23] R.A. Timm, A. Kisner, V.C. Bassetto, L.T. Kubota, Critical View on Graphene Oxide Production and Its Transfer to Surfaces Aiming Electrochemical Applications, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 6478–6496.
- [24] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 228–240.
- [25] C.K. Chua, M. Pumera, Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 291–312.
- [26] D. Li, M.B. Muller, S. Gilje, R.B. Kaner, G.G. Wallace, Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 101–105.
- [27] A. Ambrosi, C.K. Chua, A. Bonanni, M. Pumera, Electrochemistry of Graphene and Related Materials, *Chem. Rev.* 114 (2014) 7150–7188.
- [28] M. Velický, D.F. Bradley, A.J. Cooper, E.W. Hill, I.A. Kinloch, A. Mishchenko, et al., Electron Transfer Kinetics on Mono- and Multilayer Graphene, *ACS Nano*. 8 (2014) 10089–10100.
- [29] D.A.C. Brownson, D.K. Kampouris, C.E. Banks, Graphene electrochemistry: fundamental concepts through to prominent applications, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 6944–6976.
- [30] M. Pumera, Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids: Review, *Electrochem. Commun.* 36 (2013) 14–18.
- [31] C. Tan, J. Rodríguez-López, J.J. Parks, N.L. Ritzert, D.C. Ralph, H.D. Abruña, Reactivity of Monolayer Chemical Vapor Deposited Graphene Imperfections Studied Using Scanning Electrochemical Microscopy, *ACS Nano*. 6 (2012) 3070–3079.
- [32] S. Rapino, E. Treossi, V. Palermo, M. Marcaccio, F. Paolucci, F. Zerbetto, Playing peekaboo

with graphene oxide: a scanning electrochemical microscopy investigation, *Chem. Commun.* 50 (2014) 13117–13120.

- [33] M. Pumera, Electrochemistry of graphene, graphene oxide and other graphenoids: Review, *Electrochem. Commun.* 36 (2013) 14–18.
- [34] D.R. Thevenot, K. Tóth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 2333–2348.
- [35] A.M. Pisoschi, Biosensors as Bio-Based Materials in Chemical Analysis: A Review, *J. Biobased Mater. Bioenergy.* 7 (2013) 19–38.
- [36] B. Van Dorst, J. Mehta, K. Bekaert, E. Rouah-Martin, W. De Coen, P. Dubruel, et al., Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1178–1194.
- [37] C.I.L. Justino, A.C. Freitas, R. Pereira, A.C. Duarte, T.A.P. Rocha Santos, Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors, *Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 2–17.
- [38] Z. Li, Y. Yu, Z. Li, T. Wu, J. Yin, The art of signal transforming: electrodes and their smart applications in electrochemical sensing, *Anal. Methods.* 7 (2015) 9732–9743.
- [39] E. Wijaya, C. Lenaerts, S. Maricot, J. Hastanin, S. Habraken, J.-P. Vilcot, et al., Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 15 (2011) 208–224.
- [40] C. Yang, M.E. Denno, P. Pyakurel, B.J. Venton, Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review, *Anal. Chim. Acta.* 887 (2015) 17–37.
- [41] C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures, *Anal. Chem.* 87 (2015) 230–249.
- [42] N. Yang, X. Chen, T. Ren, P. Zhang, D. Yang, Carbon nanotube based biosensors, *Sensors Actuators B Chem.* 207 (2015) 690–715.
- [43] A.T. Lawal, Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors, *Talanta.* 131 (2015) 424–443.
- [44] T. Fujigaya, N. Nakashima, Non-covalent polymer wrapping of carbon nanotubes and the role of wrapped polymers as functional dispersants, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015) 024802.
- [45] P. Bilalis, D. Katsigiannopoulos, A. Avgeropoulos, G. Sakellariou, Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with polymers, *RSC Adv.* 4 (2014) 2911.
- [46] H.J. Salavagione, A.M. Diez-Pascual, E. Lazaro, S. Vera, M.A. Gomez-Fatou, Chemical sensors based on polymer composites with carbon nanotubes and graphene: the role of the polymer, *J. Mater. Chem. A.* 2 (2014) 14289–14328.
- [47] A. Walcarius, S.D. Minteer, J. Wang, Y. Lin, A. Merkoçi, Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 4878.
- [48] Q. Liu, J. Wang, B.J. Boyd, Peptide-based biosensors, *Talanta.* 136 (2015) 114–127.
- [49] S.F. Oliveira, G. Bisker, N.A. Bakh, S.L. Gibbs, M.P. Landry, M.S. Strano, Protein functionalized carbon nanomaterials for biomedical applications, *Carbon N. Y.* 95 (2015) 767–779.
- [50] S.K. Vashist, J.H.T. Luong, Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites, *Carbon N. Y.* 84 (2015) 519–550.
- [51] M.A. Arugula, A. Simonian, Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives, *Meas. Sci. Technol.* 25 (2014) 032001.

- [52] Z. Ma, N. Liu, Design of immunoprobes for electrochemical multiplexed tumor marker detection, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15 (2015) 1075–1083.
- [53] Y. Seok Kim, N.H. Ahmad Raston, M. Bock Gu, Aptamer-based nanobiosensors, *Biosens. Bioelectron.* 76 (2016) 2–19.
- [54] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, et al., Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 6156–6214.
- [55] A. Di Crescenzo, V. Ettore, A. Fontana, Non-covalent and reversible functionalization of carbon nanotubes, *Beilstein J. Nanotechnol.* 5 (2014) 1675–1690.
- [56] B.W. Ninham, On progress in forces since the DLVO theory, *Adv. Colloid Interface Sci.* 83 (1999) 1–17.
- [57] D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, M. Prato, Chemistry of Carbon Nanotubes, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1105–1136.
- [58] S.P. Lonkar, Y.S. Deshmukh, A. a. Abdala, Recent advances in chemical modifications of graphene, *Nano Res.* 8 (2014) 1039–1074.
- [59] X. Peng, S.S. Wong, Functional covalent chemistry of carbon nanotube surfaces, *Adv. Mater.* 21 (2009) 625–642.
- [60] H. Gao, H. Duan, 2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 404–419.
- [61] Z. Li, Z. Liu, H. Sun, C. Gao, Superstructured Assembly of Nanocarbons: Fullerenes, Nanotubes, and Graphene, *Chem. Rev.* 115 (2015) 7046–7117.
- [62] H.-P. Cong, J.-F. Chen, S.-H. Yu, Graphene-based macroscopic assemblies and architectures: an emerging material system., *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 7295–325.
- [63] R.L.D. Whitby, Chemical Control of Graphene Architecture: Tailoring Shape and Properties, *ACS Nano.* 8 (2014) 9733–9754.
- [64] G. Rydzek, Q. Ji, M. Li, P. Schaaf, J.P. Hill, F. Boulmedais, et al., Electrochemical nanoarchitectonics and layer-by-layer assembly: From basics to future, *Nano Today.* 10 (2015) 138–167.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

RESUMEN

En este capítulo se describen los fundamentos teóricos e instrumentales y las aplicaciones de las técnicas empleadas para el desarrollo de este trabajo de Tesis. Se discuten también aspectos experimentales sobre los sustratos sólidos usados.

2.1. Voltamperometría cíclica

2.1.1. Respuesta de especies en solución (difusión lineal semi-infinita)

La voltamperometría cíclica (VC) es la técnica electroquímica por excelencia dado que se utiliza tanto para hacer los primeros estudios cualitativos de un sistema rédox desconocido como para elucidar mecanismos de reacción o para llevar a cabo análisis cuantitativos [1].

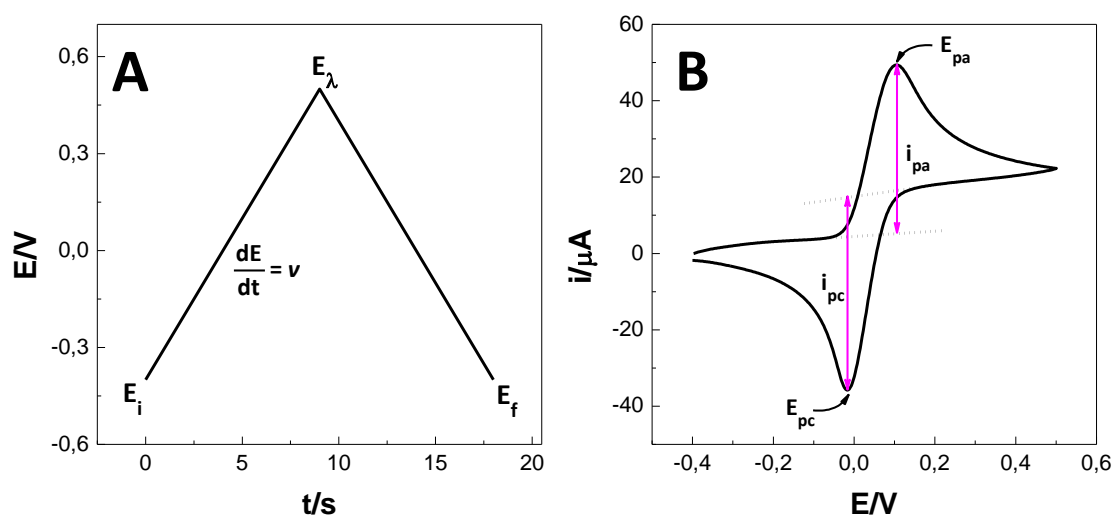


Figura 2.1. **A** Programa de potencial aplicado en voltamperometría cíclica. **B** Voltamperograma cíclico resultante.

El programa potencial-tiempo utilizado en VC se muestra esquemáticamente en la **figura 2.1 A**. El potencial del electrodo de trabajo es variado linealmente (a una velocidad constante ν) desde un valor inicial, E_i , hasta un valor conocido como potencial de corte, E_λ , donde la dirección de barrido se invierte hasta el potencial final, E_f , que puede ser igual o distinto a E_i . Como respuesta a dicha perturbación se produce una corriente que se registra en función del potencial aplicado, dando lugar al voltamperograma cíclico para un proceso reversible (la reacción $R_{(ac)} \rightleftharpoons O_{(ac)} + n e^-$) mostrado en la **figura 2.1 B**. Dicha corriente, como lo muestra la **ecuación 2.1**, depende del gradiente de concentración de la especie electroactiva (C_R) sobre la superficie del electrodo ($x = 0$), de su coeficiente de difusión D_R , del área electroactiva A y del número de electrones intercambiados n [1].

$$i(t) = n F A D_R \left[\frac{\partial C_R(x, t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

La concentración de la especie R en la superficie del electrodo dependerá del sobrepotencial aplicado, $E - E^0$, donde E^0 es el potencial de equilibrio. Para un sistema que contiene sólo la especie reducida R, si el barrido de potencial comienza a un E_i mucho menor que E^0 , no hay procesos de transferencia de carga y la corriente registrada es sólo debido al cargado de la doble capa (corriente capacitiva). Conforme E aumenta, R comienza a oxidarse provocando un aumento en el gradiente de concentración y un incremento en la corriente faradaica (**ecuación 2.1**). Cuando se alcanza el potencial de pico anódico (E_{pa}), el gradiente de concentración es máximo dado que la velocidad de oxidación es máxima. En estas condiciones la concentración de R disminuye a cero en $x = 0$ y se obtiene un valor de corriente máximo [2]. Para $E > E_{pa}$, sólo se formará O cuando R difunda de la solución lo cual provoca un aumento del espesor de la capa difusional (δ) con la consecuente disminución del gradiente y de la corriente. Luego de E_{pa} , cuando la dirección de barrido se invierte y se alcanza el potencial adecuado, ocurre el proceso inverso donde ahora O se reduce a R y la extensión de este proceso dependerá de la reversibilidad de la reacción electroquímica.

En estos sistemas, donde la corriente se encuentra limitada por la difusión de la especie electroactiva se encuentra que la corriente de pico i_p (anódica o catódica) varía linealmente con $\nu^{1/2}$, según la ecuación de Randles-Sevcik (**ecuación 2.2**) [2].

$$i_p = -0,4463 \frac{(n F)^{3/2}}{(R T)^{1/2}} A C_R (D_R \nu)^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

A partir de los perfiles de VC pueden obtenerse diferentes parámetros que caracterizan al proceso redox que ocurre sobre el electrodo. Éstos son la corriente de pico anódica (i_{pa}) y catódica (i_{pc}), el potencial de pico anódico (E_{pa}) y el catódico (E_{pc}) y su diferencia (ΔE_p) [3]. Dichos parámetros se encuentran señalados en la **figura 2.1 B**.

Las relaciones entre las velocidades de transferencia de carga y masa determinan la reversibilidad electroquímica de los sistemas redox [4]. En procesos reversibles, la velocidad de la reacción electroquímica (dada por el valor de k_0) es más rápida que la transferencia de masa y las concentraciones de O y R siempre están determinadas por la ecuación de Nernst. Así, E_p no depende de ν y $\Delta E_p = 59 \text{ mV}/n$ (a 25 °C). De la misma manera, se encuentra que para este tipo de procesos $i_{pa} / i_{pc} = 1$.

En un sistema con comportamiento irreversible, la velocidad de transferencia de masa es mayor a la transferencia de carga. En estos sistemas, i_p es menor que el valor correspondiente a un sistema reversible, E_p depende de ν , y no se observa pico catódico al invertir el barrido de potencial, entre otros criterios de diagnóstico [4].

Los sistemas cuyo comportamiento varía entre los extremos reversible e irreversible, según la velocidad de barrido empleada, se clasifican como cuasi-reversibles. En éstos, ΔE_p es mayor que 0,059 V y aumenta con v [4].

2.1.2. Respuesta de especies adsorbidas

Si la especie electroactiva se encuentra adsorbida fuerte o débilmente sobre la superficie del electrodo, la forma del perfil voltamperométrico i - E VC se modifica. Dado que la reacción $R_{(ads)} \rightleftharpoons O_{(ads)} + n e^-$ indica que sólo se oxida la especie R que se encuentra adsorbida, la corriente solo dependerá de su cubrimiento superficial.

Cuando la adsorción de R puede ser descrita por la isoterma de Langmuir y para un comportamiento reversible, entonces $\Delta E_p = 0$ V, el ancho de pico a la mitad de la corriente máxima, $E_{p1/2}$ tiene un valor de 96 mV/n (a 25 °C) y la corriente de pico estará dada por la **ecuación 2.3**

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{R T} A \Gamma_R v \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde Γ_R es el cubrimiento superficial de R sobre la superficie del electrodo [1]. Para este caso, el perfil voltamperométrico obtenido es simétrico respecto a E_p , como se muestra en la **figura 2.2 a**. El área bajo el pico anódico corresponde a la carga asociada con el proceso de oxidación de la especie R adsorbida, Q_{ads} , [2] por lo que Γ_R puede calcularse según la **ecuación 2.4**.

$$Q_{ads} = n F A \Gamma_R \quad \text{Ecuación 2.4}$$

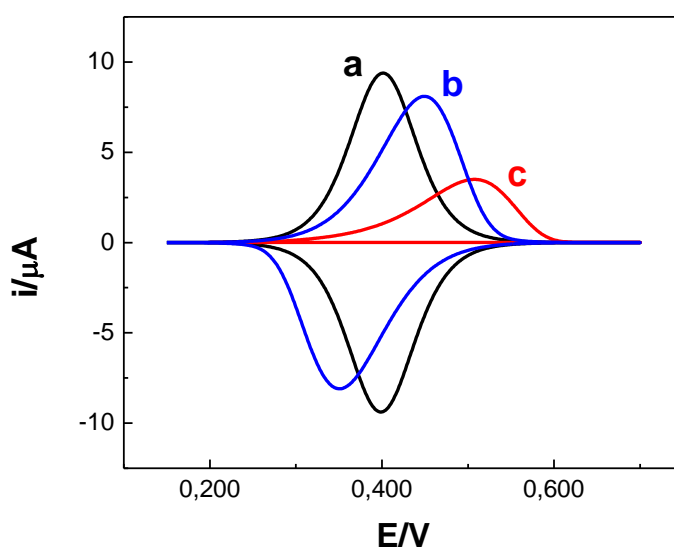


Figura 2.2. Voltamperogramas cíclicos para la oxidación de R según $R_{(ads)} \rightleftharpoons O_{(ads)} + n e^-$, donde el proceso es reversible (a), cuasi reversible (b) e irreversible (c).

En la **figura 2.2 b** y **c** se muestran los VC para la oxidación cuasi reversible e irreversible de R, respectivamente. Al disminuir k_0 , los picos se hacen más anchos y asimétricos y las corrientes asociadas se hacen menores. En procesos cuasi-reversible $\Delta E_p \neq 0$ (**figura 2.2 b**) y aumenta conforme incrementa ν [5]. Para el caso irreversible no hay proceso catódico al invertir el barrido (**figura 2.2 c**) y $E_p = 62,5 \text{ mV}/\alpha n_\alpha$ (siendo α el coeficiente de transferencia y n_α , el número de electrones transferidos hasta el paso determinante). Sin embargo, el área bajo el pico de oxidación es independiente de k_0 y la **ecuación 2.4** se sigue cumpliendo [5].

2.1.3. Repuesta de especies con difusión finita

En ciertas ocasiones, la especie electroactiva se encuentra confinada en una película delgada cuyo espesor L oscila entre δ y el de una monocapa en contacto directo con la superficie del electrodo ($\sim 4 - 5 \text{ \AA}$). Esto se puede dar en el caso de películas de polímeros rédox, moléculas electroactivas que interactúan fuertemente con una capa de polímero ó de óxidos inorgánicos [1].

$$E_p = E^0 + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \left[\frac{nFV(1-\alpha)\nu}{RTAk_0} \right] \quad \text{Ecuación 2.5}$$

En este caso el comportamiento voltamperométrico oscilará entre los observados en las **secciones 2.1.1** y **2.1.2** y dependerá de L , la velocidad ν del experimento y D_R . Cuando L y ν son pequeños, el comportamiento de R se aproxima al de una especie adsorbida y cuando dichos valores son grandes, se aproxima al comportamiento de difusión lineal semi-infinita (**sección 2.1.1**) [6,7]. Los E_p varían con la velocidad según la **ecuación 2.5**, obteniéndose lo que se conoce como “gráficos de trompeta” [6].

2.2. Voltamperometría de pulso diferencial

Una de las desventajas de los métodos voltamperométricos convencionales es la baja sensibilidad analítica debido a que la corriente faradaica suele ser enmascarada por la no faradaica [2], fundamentalmente en electrodos porosos de gran área, como los usados en el presente trabajo de tesis. Las técnicas de pulso proveen límites de detección menores (del orden de 10^{-9} M). La base de estas técnicas es la diferencia en la velocidad de decaimiento de las corrientes de cargado de la doble capa ($i \propto t^{-1}$) y faradaica ($i \propto t^{-1/2}$): la primera tiene una velocidad de decaimiento mucho mayor que la segunda [8]. De esta manera, midiendo la corriente a tiempos cortos se minimiza la

contribución capacitiva. Una de las técnicas de pulso más ampliamente utilizadas es la voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

La **figura 2.3 A** muestra el esquema de la perturbación potencial-tiempo aplicada al electrodo de trabajo. En un experimento de DPV se aplica una escalera de potencial (dada por E_{step}) superpuesta a un pulso (dado por $E_{\text{step}}-E_{\text{amp}}$). La corriente se mide dos veces para cada pulso, la primera vez (**1**, en la figura) antes del pulso y la segunda vez (**2**, en la figura) al final del mismo. Estos puntos de medida se seleccionan para permitir la caída de la corriente capacitiva [8]. La diferencia entre estas corrientes $\Delta i = i_2 - i_1$ se registra en función del potencial, como se encuentra graficado en la **figura 2.3 B**.

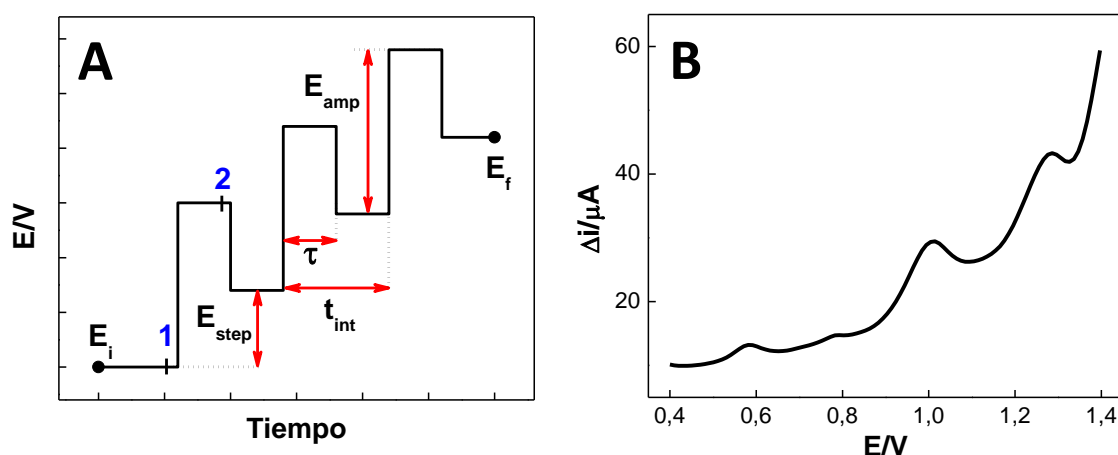


Figura 2.3. **A** Esquema del programa de potencial-tiempo aplicado para DPV, con los parámetros característicos. **B** Perfil voltamperométrico de pulso diferencial.

2.2.1. *Stripping* de adsorción con detección por DPV

Una estrategia para mejorar la sensibilidad y el límite de detección es la utilización de una etapa de pre-concentración de manera de acumular la/s especie/s electroactiva/s sobre la superficie del electrodo. Este paso puede realizarse con control de la corriente o el potencial aplicado o sin aplicar perturbaciones, al potencial de circuito abierto (o.c.p.). Esta metodología se conoce como *stripping* de adsorción, cuyas etapas se muestran a modo ilustrativo en la **figura 2.4**.

La metodología de *stripping* de adsorción generalmente consta de tres pasos [9]:

- Etapa de pre-concentración: adsorción de la/s especie/s en la superficie del electrodo durante un determinado tiempo. Este paso se realiza bajo convección forzada y aplicando una corriente o un potencial o bien a o.c.p. (**figura 2.4 a**).
- Enjuague del electrodo modificado con la/s especie/s adsorbidas, en una solución adecuada durante un tiempo determinado (**figura 2.4 b**).

- Reducción u oxidación de la/s especie/s acumulada/s (adsorbida/s) sobre la superficie del electrodo (**figura 2.4 c**).

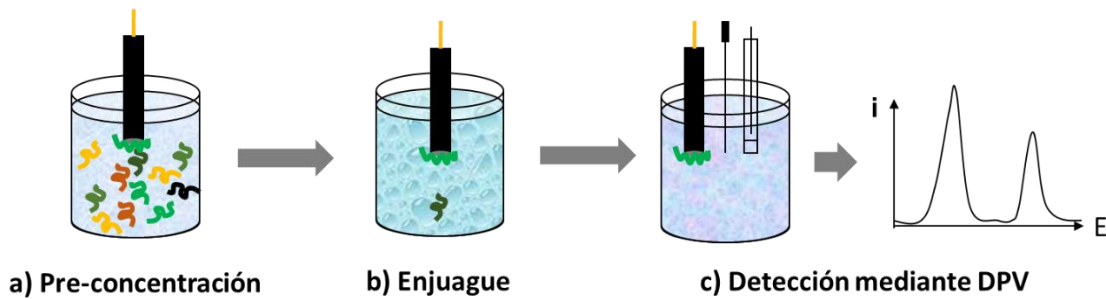


Figura 2.4. Representación esquemática de los pasos involucrados en la determinación de un compuesto electroactivo mediante *stripping* de adsorción: **a)** pre-concentración a un potencial constante, **b)** enjuague en *buffer* y transferencia de medio, y **c)** detección electroquímica mediante DPV del compuesto adsorbido sobre el electrodo.

En el presente trabajo de Tesis se utiliza DPV para la detección electroquímica mediante la metodología de *stripping* pero se puede emplear cualquier otra técnica electroquímica para la determinación de la/s especie/s pre-concentradas.

Dado que el paso de detección se realiza en ausencia de la muestra en la que se encuentra/n la/s especie/s a determinar, la gran ventaja del “cambio de medio” en el *stripping* de adsorción es que se evitan posibles interferencias de otros compuestos presentes en una matriz real. Por lo tanto, además de mejorar la sensibilidad debido a la etapa de pre-concentración, esta estrategia permite la determinación analítica de compuestos redox sin el efecto matriz.

2.3. Amperometría

La amperometría consiste en aplicar un potencial al electrodo de trabajo desde un valor en el que no ocurre la reacción faradaica a un valor de potencial en el que la concentración de R en $x = 0$ es nula. Como el transporte de masa en estas condiciones es sólo por difusión, la curva corriente-tiempo registrada refleja el cambio en el gradiente de concentración en la superficie del electrodo (ver **ecuación 2.1**). Esto involucra una expansión gradual de la capa de difusión (aumento de δ) asociada con el consumo de R en la vecindad de $x = 0$ y, por consiguiente, la corriente cae con el tiempo según la ecuación de Cottrell (**ecuación 2.6**), como lo muestra la **figura 2.5 A [1]**.

$$i(t) = \frac{n F A C_R D_R^{1/2}}{(\pi t)^{1/2}} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Desde el punto de vista analítico, las determinaciones de compuestos con esta técnica suelen tener baja sensibilidad debido a la limitación por difusión del analito. Una manera de mejorar el límite de detección es agitando la solución mediante convección controlada, la cual provoca que la capa de difusión δ no cambie con el tiempo [4]. El espesor de δ estará dado por la viscosidad de la solución y la velocidad de agitación. Así, el gradiente de concentración de R en $x = 0$ será constante por lo que se alcanza una corriente de estado estacionario (i_{ee}), la cual es independiente de t (**ecuación 2.7**).

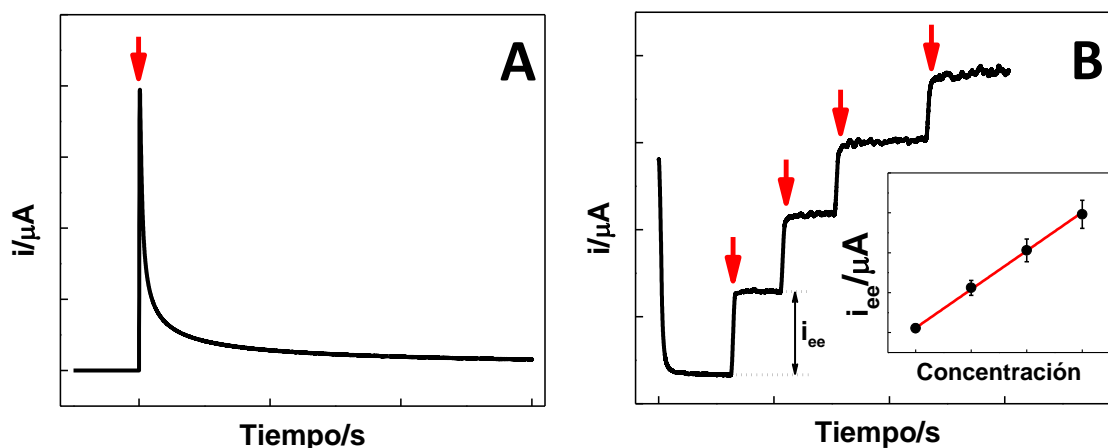


Figura 2.5. **A** Registro amperométrico para un agregado de compuesto electroactivo, marcado con una flecha roja. **B** Registro amperométrico con convección forzada para sucesivos agregados de compuesto electroactivo, marcados con flechas rojas. El *inset* muestra la curva de calibración correspondiente.

$$i_{ee} = \frac{n F A C_R D_R}{\delta} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

El agregado del analito a la celda produce un aumento en la C_R en la superficie del electrodo y el consecuente incremento de i_{ee} , **figura 2.5 B**. La determinación de i_{ee} en función de t se conoce como registro amperométrico y permite conocer la concentración de analito en una solución problema y la sensibilidad con que el mismo es detectado en el electrodo [8], a partir de una curva de calibración como se muestra en el *inset* de la **figura 2.5 B**.

2.4. Cronocoulometría

En un experimento en el que se aplica un pulso de potencial al electrodo, la mayor contribución de la corriente a tiempos cortos ($t < 50$ ms) se debe al cargado de la doble capa eléctrica, la cual es proporcional al área electroactiva del electrodo [1]. En el caso de electrodos con películas porosas, como los utilizados en este trabajo de Tesis, dicha contribución es muy grande dado que su A es elevada. Una manera de superar

esto es integrar la corriente del registro para obtener la carga, la cual varía con el tiempo según la **ecuación 2.8**,

$$Q(t) = \frac{2 n F A C_R D_R^{1/2}}{\pi^{1/2}} t^{1/2} + Q_{dc} + Q_{ads} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

donde Q_{dc} y Q_{ads} corresponden a la carga debido al cargado de la doble capa y la oxidación de especies adsorbidas. De esta manera, a partir de la pendiente de un registro Q vs $t^{1/2}$ se obtiene la contribución del transporte por difusión (de donde se puede calcular A ó D_R) y a partir de la ordenada al origen se pueden determinar las contribuciones del cargado de la doble capa y adsorción.

Si bien esta técnica tiene poca utilidad desde el punto de vista analítico, en el presente trabajo de Tesis se la implementó para realizar la determinación de las áreas electroactivas de las plataformas y/o los coeficientes de difusión de las especies redox.

2.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica

Las técnicas voltamperométricas o la aplicación de pulsos de potencial involucran, por lo general, la aplicación de perturbaciones que llevan al electrodo de trabajo a condiciones alejadas del equilibrio. En contraste, la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) se basa en perturbar al electrodo de trabajo con una señal alterna de pequeña magnitud tal que si dicha perturbación es lo suficientemente pequeña, se puede considerar que el sistema se encuentra prácticamente en condiciones de equilibrio [2,4].

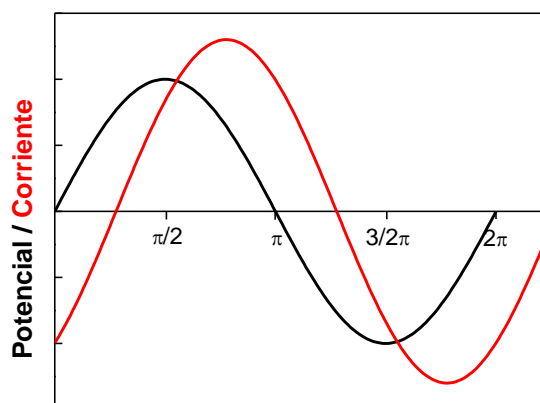


Figura 2.6. Señales de la perturbación en potencial (—) y su respuesta en corriente (—).

La perturbación consiste en aplicar un potencial sinusoidal de amplitud E_{ac} muy pequeña $E(t) = E_{ac} \text{sen}(\omega t)$ superpuesto a uno constante E_{dc} . Esto produce una respuesta en corriente que también posee una componente constante i_{dc} y una

sinusoidal $i(t) = i_{ac} \text{sen}(\omega t + \phi)$, la cual se encuentra desfasada del potencial en una magnitud ϕ . La representación de la perturbación de E y la respuesta en i se muestran en la **figura 2.6**.

De la misma forma que la ley de Ohm para circuitos continuos, la impedancia Z se define como la relación entre el potencial y la corriente (**ecuación 2.9**):

$$Z(\omega) = \frac{E(\omega)}{i(\omega)} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

Similarmente se la puede definir mediante notación compleja, como lo muestra la **ecuación 2.10**,

$$Z = |Z_0| (\cos \phi + j \text{sen} \phi) = Z' + j Z'' \quad \text{Ecuación 2.10}$$

donde $|Z_0|$ es la magnitud, ϕ es la fase, j es el número imaginario $\sqrt{-1}$, Z' es la parte real, y Z'' la parte imaginaria de la impedancia [10].

De esta manera, las mediciones de EIE consisten en definir E_{dc} y E_{ac} y estudiar el comportamiento impedimétrico en un dado rango de frecuencias $f = \omega / 2\pi$ de manera de analizar los procesos de electrodo en relación a las contribuciones de la difusión, transporte de carga, procesos capacitivos, entre otros. Las dos maneras más comunes de presentar los resultados son mediante el *gráfico de Nyquist* ($-Z''$ vs Z') y el *gráfico de Bode* ($|Z_0|$ y ϕ vs f) [10,11].

2.5.1. Circuitos eléctricos equivalentes

El método más común para el modelado de los resultados de EIE implica la combinación de elementos de circuitos eléctricos, llamados circuitos equivalentes, que deben ser seleccionados sobre la base de una comprensión intuitiva del sistema electroquímico [11]. Los dos elementos utilizados para la construcción de los circuitos del presente trabajo de Tesis son la resistencia y el elemento de fase constante.

La respuesta en corriente de una resistencia R a una señal periódica de potencial conduce a una impedancia que tiene sólo componente real e independiente de la ω :

$$Z_R(\omega) = Z' = R \quad \text{Ecuación 2.11}$$

Una R corresponde a $\phi = 0^\circ$ y se utiliza para modelar procesos de transferencia de carga o iones.

Un elemento de fase constante (CPE) se define como:

$$Z_{CPE}(\omega) = A_0 (j \omega)^{-\beta}$$

Ecuación 2.12

donde A_0 es un factor de proporcionalidad y β un parámetro que varía entre $0 \leq \beta \leq 1$. Los CPE se introducen en los circuitos en reemplazo de elementos ideales (tales como capacitores, resistencias ó impedancias de Warburg) para modelar la no idealidad de los mismos, producto de inhomogeneidades y porosidades de la superficie. Cuando $\beta \rightarrow 1$, CPE describe el comportamiento de un capacitor ($\phi = 90^\circ$) por lo que $A_0 = C$. Un capacitor se utiliza para modelar procesos de adsorción o del cargado de la doble capa eléctrica. Cuando $\beta \cong 0,5$, CPE describe el comportamiento de una impedancia de Warburg ($\phi = 45^\circ$) por lo que $A_0 = \sqrt{2} \sigma$ (siendo σ el coeficiente de Warburg). La impedancia de Warburg se utiliza para modelar la difusión lineal semi-infinita.

Para representar un sistema simple de un electrodo en contacto con un electrolito en términos de un circuito equivalente se requiere de 2 elementos de circuito (esquema **A** de la **figura 2.7**) [11]. El primero corresponde a la resistencia de la solución de electrolito entre el electrodo de trabajo y referencia (R_s), y el segundo a la doble capa entre el sustrato conductor y el electrolito, modelado con un CPE de $\beta \rightarrow 1$ llamado capacidad de la doble capa (C_{dc}).

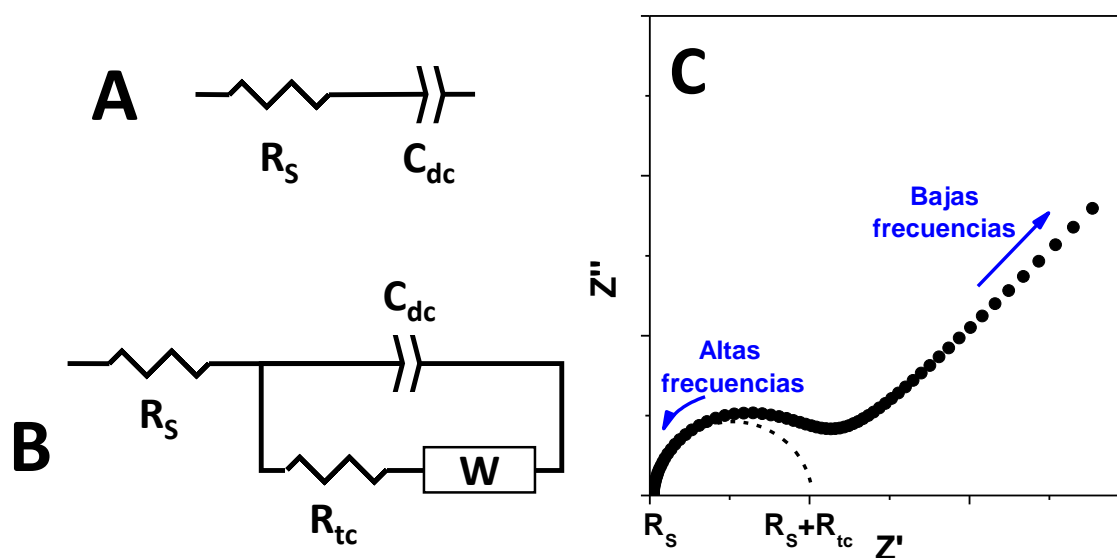


Figura 2.7. **A** Circuito equivalente para un electrodo en contacto con un electrolito. **B** Circuito equivalente de Randles para la transferencia de carga + difusión de una especie redox. **C** Gráfico de Nyquist correspondiente al circuito B.

El circuito de Randles (esquema **B** de la **figura 2.7**), que fue utilizado en el presente trabajo de Tesis para modelar la respuesta impedimétrica de electrodos en una solución con una cupla redox [1,10], consiste en R_s y C_{dc} en paralelo con una resistencia y la impedancia de Warburg. Esta última resistencia se refiere a la de

transferencia de carga (R_{tc}) y se encuentra relacionada con la constante cinética de la reacción k_0 a través de la **ecuación 2.13**. El gráfico de Nyquist de la **figura 2.7 C** muestra un espectro simulado utilizando el circuito de Randles. Dado que las resistencias sólo tienen componente real de impedancia, el semicírculo que se observa en la figura posee dos cortes con el eje Z': el primero representa el valor de R_s y el segundo, $R_s + R_{tc}$.

$$R_{tc} = \frac{RT}{n^2 F^2 k_0 C_O^\alpha C_R^{1-\alpha}} \quad \text{Ecuación 2.13}$$

Cuando los electrodos se encuentran modificados con películas gruesas (del orden de μm) y porosas, la movilidad iónica de la sal del electrolito soporte suele ser distinta a la movilidad en solución acuosa. Esto puede provocar la aparición de una resistencia al transporte de iones (R_{ti}) dentro de la película que se encuentra en paralelo con C_{dc} y $R_{tc}W$ [12,13], como lo muestra el circuito de la **figura 2.8 A**. Esta resistencia suele manifestarse como un curvamiento en el gráfico de Nyquist a frecuencias bajas.

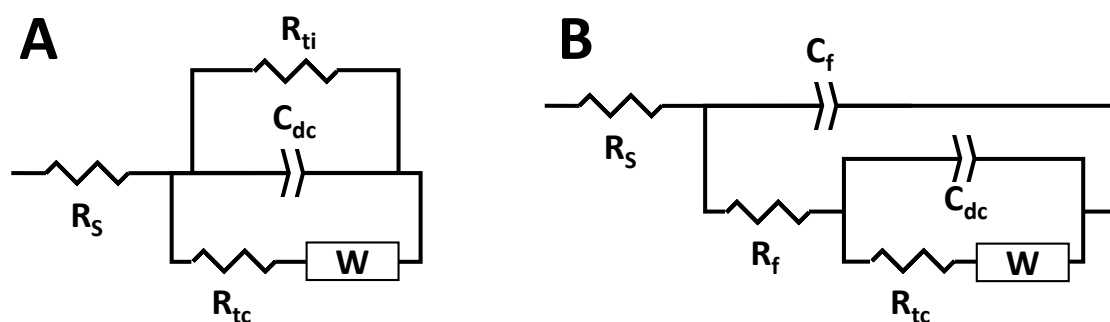


Figura 2.8. **A** Circuito equivalente para película gruesa y porosa. **B** Circuito equivalente para modelo de membrana capilar.

El circuito mostrado en el **figura 2.8 B** corresponde al modelo de membrana capilar y es utilizado para ajustar los espectros de impedancia de electrodos cubiertos con películas de polímeros bloqueantes que generan poros al adsorberse sobre la superficie [14,15]. En este modelo se considera que existen dos zonas de la superficie con diferentes k_0 (y en consecuencia, distintas R) que provocan que la reacción electroquímica de la especie redox se dé a dos velocidades distintas: una en la región del electrodo descubierto; y otra en la zona con el agente bloqueante, que posee menor k_0 . Cada una de estas zonas tiene constantes de tiempo distintas ($R_{tc}C_{dc}$ y R_fC_f) y, dependiendo del sistema, se puede llegar a observar la difusión de las especies redox en el intervalo de frecuencias medido.

2.6. Instrumentación y celdas electroquímicas

En los experimentos electroquímicos se utilizó un sistema de 3 electrodos: uno de trabajo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3M (BAS, MR 1052 y MR 1208), y un alambre de Pt que sirvió como contraelectrodo o electrodo auxiliar. Los mismos se insertan en la celda electroquímica de vidrio (ver **figura 2.9**) a través de los orificios de la tapa de Teflon. La convección forzada en la amperometría o en la etapa de pre-concentración en el *stripping* de adsorción se obtuvo mediante el empleo de una plancha de agitación y un buzo magnético en la celda.

Las medidas de amperometría fueron llevadas a cabo en las estaciones de trabajo TEQ_02 y TEQ_04 mientras que para los experimentos de VC y DPV se utilizaron los potenciostatos PGSTAT128N y PGSTAT101 (Autolab) y Epsilon Workstation (BAS). Los espectros de impedancia fueron adquiridos mediante el módulo FRA32M del potenciostato PGSTAT128N. Los datos de EIE fueron ajustados y modelados con el software ZView2.

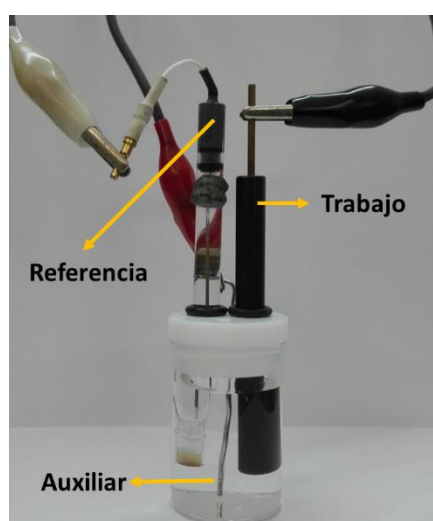


Figura 2.9. Celda electroquímica de trabajo con el sistema de 3 electrodos. La tapa de Teflon posee un orificio extra para la adición de un compuesto rédox en las amperometrías.

2.7. Microscopia de barrido electroquímico

La microscopia de barrido electroquímico (SECM) es una técnica que se emplea para caracterizar la reactividad electroquímica de una superficie mediante el barrido con un ultramicroelectrodo (UME) que cumple la función de sonda. La resolución espacial de SECM es menor a los microscopios de sonda convencionales, como STM o AFM, dado que la fabricación de un UME de dimensiones nanométricas es dificultoso

con la tecnología actual y las corrientes faradaicas que se miden son del orden de los pA o menores [16]. Sin embargo, esta técnica tiene una característica distintiva frente a las otras de mejor resolución y es la posibilidad de generar imágenes locales de reactividad electroquímica y también inducir reacciones químicas locales de manera controlada [17,18].

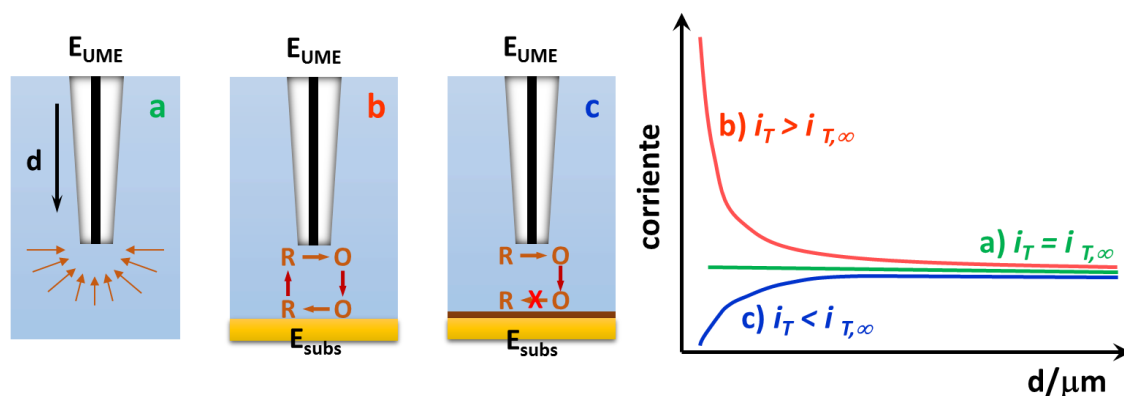


Figura 2.10. Esquema y respuesta de corriente en función de la distancia para el UME lejos de la superficie del sustrato (a), en modo *feedback* positivo (b) y en modo *feedback* negativo (c). E_{UME} : potencial del UME, E_{subs} : potencial del sustrato.

Los principios generales del modo *feedback* se presentan en la **figura 2.10**. Si se aplica un potencial al UME (E_{UME}) que se encuentra inmerso en una solución de la especie R, cuando la corriente alcanza el estado estacionario se forma una región de difusión hemisférica de la especie electrogenerada alrededor de la sonda (**figura 2.10.a**). El tamaño de la capa de difusión depende principalmente del radio a del UME [19] y la corriente de estado estacionario ($i_{T,\infty}$) puede ser descrita por la **ecuación 2.14**.

$$i_{T,\infty} = 4 n F D_R C_R a \quad \text{Ecuación 2.14}$$

La presencia del sustrato en la región de difusión hemisférica cambia la distribución de las especies R/O y, por ende, la corriente del UME (i_T). Si el sustrato es conductor (**figura 2.10 b**), al aplicar un potencial adecuado (E_{subs}) para reducir la especie O, se produce un flujo adicional de R que incrementa su gradiente sobre la superficie del UME y la corriente incrementa ($i_T > i_{T,\infty}$). A este fenómeno se lo denomina *feedback* positivo [19]. Si el sustrato es aislante (**figura 2.10 c**), la especie R no se regenera y se bloquea la difusión hacia el UME, por lo que $i_T < i_{T,\infty}$: esto se conoce como *feedback* negativo [19].

La adquisición de las imágenes se realiza usualmente en el modo *feedback* desplazando el UME sobre la superficie del sustrato en el plano x - y , registrando i_T . Las variaciones en i_T pueden estar relacionadas con cambios en la distancia debidos a modificaciones topográficas del sustrato (**figura 2.11 A**) o a cambios en la reactividad,

es decir variaciones en la constante de transferencia de carga de la reacción redox (**figura 2.11 B**) o a ambos efectos [16].

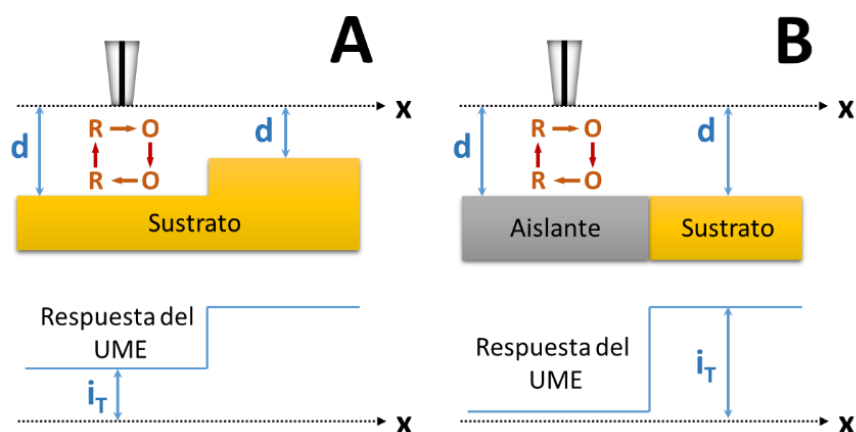


Figura 2.11. Respuesta del UME en función de la distancia obtenido en modo *feedback* a altura constante sobre un sustrato conductor con variaciones de topografía (**A**) y sobre un sustrato con porciones de superficie aislantes (**B**).

2.7.1. Instrumentación

La **figura 2.12** muestra un esquema del equipo de SECM (**A**) y el arreglo de la celda utilizada para las medidas (**B**). El sistema de medición consta de cuatro electrodos: el UME, un electrodo de referencia, el electrodo auxiliar y el electrodo sustrato por debajo. Un posicionador piezoeléctrico desplaza el UME sonda en el plano x - y - z y un bipotenciostato controla independientemente el potencial del UME y del sustrato [19].

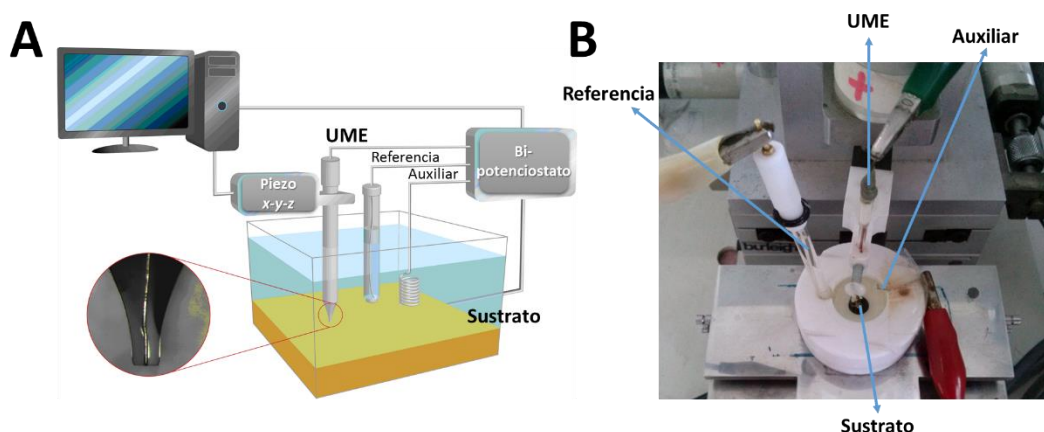


Figura 2.12. **A** Esquema de los componentes básicos del SECM. **B** Imagen del arreglo experimental de medición.

En un experimento típico de SECM se realiza una curva de aproximación sobre el sustrato sin modificar hasta que la corriente del UME sea 1,25 veces mayor que $i_{T,\infty}$. A

dicha distancia se considera que la topografía/electroactividad del sustrato afecta la respuesta del UME. De esta manera, a altura constante, se realizan los barridos x - y aplicando un E_{UME} capaz de oxidar a R y un E_{subs} capaz de reducir a O, y se registra i_T .

Las medidas de SECM se llevaron a cabo empleando un equipo CHI900 de CHInstruments y un UME de fibra de carbono de $10\ \mu\text{m}$ de radio. Antes de realizar cada curva de aproximación el UME fue sometido a un pulido empleando suspensión de alúmina $0,05\ \mu\text{m}$ durante 1 min, corroborándose el estado superficial mediante un VC en FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M. Un parámetro experimental importante es la velocidad de barrido del UME (v_{UME}), expresada en $\mu\text{m s}^{-1}$.

2.8. Resonancia de plasmón superficial

La resonancia de plasmón superficial (SPR) es una técnica óptica no destructiva basada en la detección de cambios en el índice de refracción (η) en la superficie cercana a un metal que sirve de sustrato, típicamente Au. Esto permite el estudio de la adsorción de capas delgadas de moléculas, polímeros y coloides sobre la superficie de Au [20]. Además de sus aplicaciones en bioquímica, para el estudio de la fisicoquímica de interacciones específicas del tipo antígeno-anticuerpo, DNA-DNA y enzima-sustrato [21]; también se puede emplear para el desarrollo de sensores de afinidad debido a la alta sensibilidad de la técnica [22,23]. En el presente trabajo de Tesis, se utilizó un equipo que opera bajo la configuración de Kretschmann. Su funcionamiento se basa en dos fenómenos físicos: la reflectancia total interna (RTI) y los plasmones superficiales (PS) de un metal.

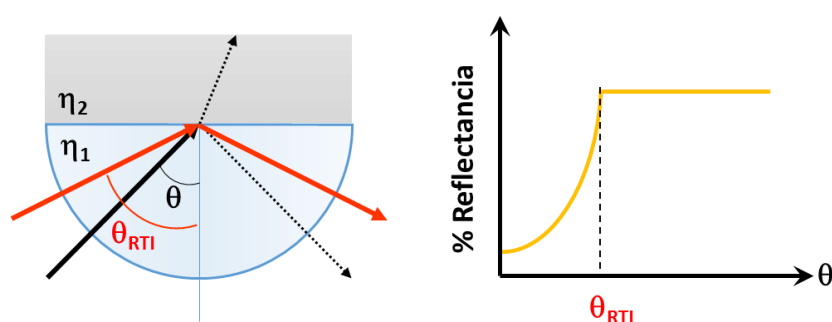


Figura 2.13. Esquema de la condición de reflexión/refracción (flechas en negro) y reflectancia total interna (flechas en rojo) de un prisma (η_1) en contacto con aire (η_2) y del gráfico de reflectancia en función del ángulo de incidencia θ .

Cuando un haz de luz incide desde un medio de menor índice de refracción η_1 a uno de mayor índice de refracción η_2 , el mismo puede sufrir refracción o reflexión. Cambiando el ángulo de incidencia θ se puede llegar a un valor crítico θ_{RTI} a partir del

cual toda la intensidad del haz que incide es reflejada (**figura 2.13**): a esto se lo conoce como RTI y su valor viene dado por la ley de Snell, como lo muestra la **ecuación 2.15**. Si bien en esta condición el 100% del haz incidente es reflejado, el campo eléctrico de los fotones se extiende alrededor de un cuarto de longitud de onda más allá de la superficie reflectante [24].

$$\theta_{RTI} = \arcsen\left(\frac{\eta_2}{\eta_1}\right)$$

Ecuación 2.15

Los PS son ondas electromagnéticas asociadas a la oscilación de cargas de los electrones libres de un metal que se propagan a lo largo de la superficie en contacto con un dieléctrico. La amplitud de dicha onda es máxima en la superficie metálica y decae exponencialmente hacia el interior del dieléctrico [25]. La longitud de decaimiento depende de la longitud de onda del haz incidente y de las propiedades ópticas del metal. Para un haz de $\lambda = 670 \text{ nm}$ que incide sobre un sustrato de oro, la penetración del campo evanescente es del orden de los 200 nm [24].

La excitación de los PS puede lograrse haciendo incidir sobre la superficie metálica un haz de luz p-polarizada en un ángulo adecuado. La condición de resonancia de los plasmones se produce cuando el vector de onda del haz de luz incidente k_x , y el de los plasmones superficiales k_{PS} , se igualan [24].

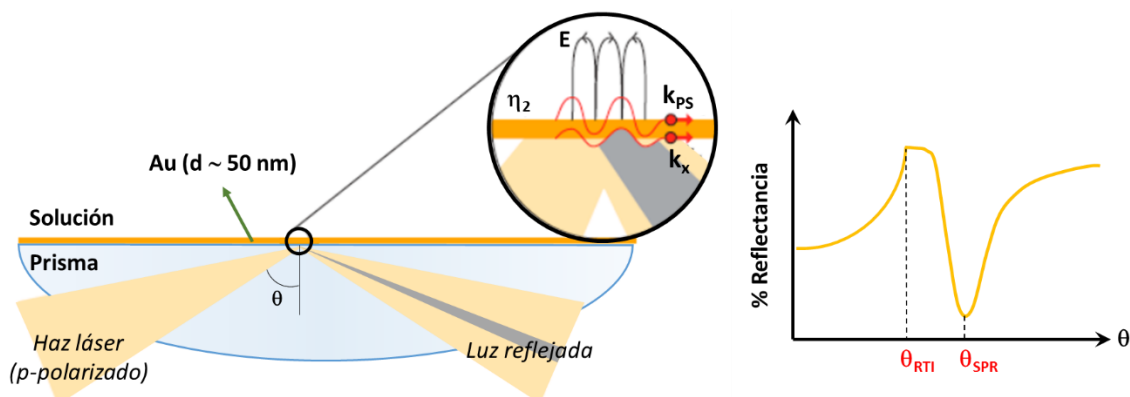


Figura 2.14. Configuración de Kretschmann de un prisma con un depósito de Au en contacto con el canal de la muestra. Se muestra el acoplamiento de los vectores de onda del haz incidente y los PS y el correspondiente gráfico de reflectancia en función del ángulo de incidencia.

En condiciones de RTI, es decir, a un ángulo $\theta > \theta_{RTI}$, la energía de los fotones incidentes interactúa con la energía de los electrones fluctuantes del PS y la intensidad del haz reflejado decae significativamente. Este ángulo se denomina ángulo de resonancia del plasmón superficial θ_{SPR} (**ecuación 2.16**) y en esas condiciones $k_x = k_{SP}$, por lo que θ_{SPR} es función de las constante dieléctricas del prisma (ϵ_p), del medio (ϵ_m) y del metal (ϵ_d) [24]. El esquema de la **figura 2.14** muestra que θ_{SPR} corresponde a un

mínimo de reflectividad dado que la energía de los fotones incidentes se utiliza para excitar los PS del Au.

$$\theta_{SPR} = \arcsen \left(\frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_a}{(\epsilon_m + \epsilon_a) \epsilon_p}} \right) \quad \text{Ecuación 2.16}$$

Dado que la mayor parte de la intensidad del campo de los PS se concentra en el dieléctrico, el k_{PS} es muy sensible a los cambios en el η del dieléctrico. Esta propiedad de los PS es el principio físico subyacente de biosensores de afinidad de SPR: el aumento del η de la película en contacto con la superficie del metal da lugar a un aumento en el k_{PS} que se propaga a lo largo de la superficie de metal.

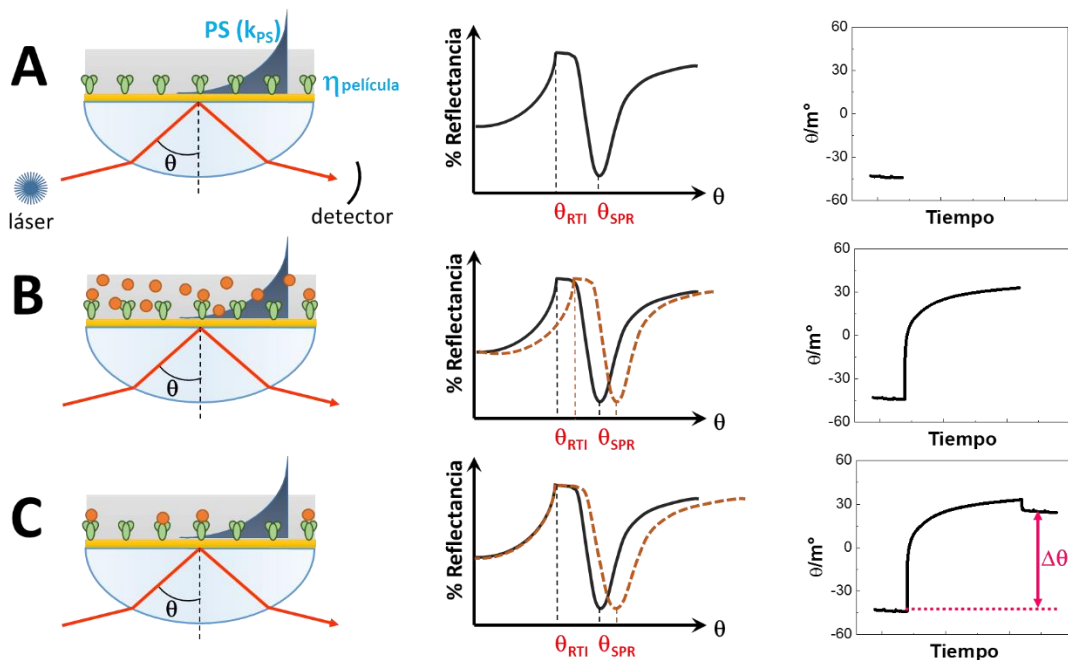


Figura 2.15. Esquema del funcionamiento del SPR, relación entre reflectividad y θ , y sensorgrama (θ vs tiempo) durante la interacción de la capa de reconocimiento con el solvente (A), la solución con adsorbato (B) y el solvente post-adsorción específica (C) .

La **figura 2.15** presenta el modo de operación de SPR: la manera más común de presentar los datos es mediante un sensorgrama, que es una gráfica de θ_{SPR} en función del tiempo (tercera columna de la **figura 2.15**). Cuando la superficie de Au se encuentra en contacto con el solvente (A), θ_{RTI} y θ_{SPR} toman valores característicos que dependen de la constante dieléctrica del solvente y del metal, **ecuaciones 2.15** y **2.16**. Al incorporar la solución de adsorbato a la celda (B) se detectan corrimientos en ambos ángulos. La variación de θ_{RTI} se debe a la modificación del η de la solución en contacto con el sensor, mientras que el cambio en θ_{SPR} es provocado por la modificación del η de la solución y de la película de reconocimiento sobre la superficie del Au. Para conocer el $\Delta\theta_{SPR}$

producido sólo por la inmovilización específica del adsorbato es necesario realizar un cambio de medio al solvente, (C). De esta forma, el cambio neto de ángulo producido entre las etapas A y C puede ser relacionado directamente con la variación de índice de refracción producido por la capa inmovilizada.

Estrictamente, los cambios en $\Delta\theta_{SPR}$ están asociados a modificaciones en el índice de refracción de la superficie de la plataforma sensora; y en el caso de proteínas, biopolímeros y ácidos nucleicos, esta variación suele guardar una relación lineal con la cantidad de masa adsorbida de las mismas [26,27]. Mediante la calibración con diversas proteínas, péptidos y ácidos nucleicos se encontró que la adsorción de una capa de 1 ng mm⁻² provoca un $\Delta\theta$ de 120 m° [28].

La sensibilidad del instrumento de SPR (m) está definida por el mínimo cambio detectable en el η efectivo de la región en contacto directo con el metal [22]. Matemáticamente, esto se expresa como el cociente entre el cambio de la señal de salida ($\Delta\theta_{SPR}$) y el cambio en η ($\Delta\eta_{ef}$), como se muestra en la **ecuación 2.17**.

$$m = \frac{\Delta\theta_{SPR}}{\Delta\eta_{ef}} \quad \text{Ecuación 2.17}$$

2.8.1. Instrumentación

Las medidas de SPR se realizaron con un equipo monocal Autolab Springle. El mismo mide el porcentaje de reflectividad en función del ángulo de incidencia a una longitud de onda constante. En la **figura 2.16 A** se muestra un esquema con los principales componentes del equipo. Un láser de He-Ne de 670 nm es la fuente de radiación, la cual se polariza y direcciona a través de un sistema de lentes y espejos hacia el hemisilindro, el cual actúa como prisma. Por encima del hemisilindro se coloca el disco de vidrio modificado con una capa de Au de 50 nm que sirve como superficie sensora. Una tapa de Teflon con un orificio cónico delimita la celda por donde se realizan los agregados de las soluciones, y permite obtener un "spot" o superficie de medición que corresponde a un área aproximada de 2 mm². El sistema de inyección consta de una jeringa micrométrica mientras que el drenado de la celda se realiza con una bomba peristáltica. El equipo de SPR posee un rango dinámico de 4000 m° y se puede modificar manualmente a través de un perno micrométrico.

En el presente trabajo de Tesis se utilizaron discos de vidrio BK7 con depósito de Au, los cuales se montan sobre el hemisilindro empleando un aceite de índice de refracción similar (**figura 2.16 B**). Estos discos permiten medir películas con índices de refracción entre 1,33 y 1,43, por lo que una modificación superficial que resulte en un η mayor a 1,43 no podrá ser detectada. Por otro lado, el equipo presenta una relación

lineal entre el cambio en θ y la cantidad de masa adsorbida cuando las moléculas inmobilizadas poseen una masa mayor a 1000 Da.

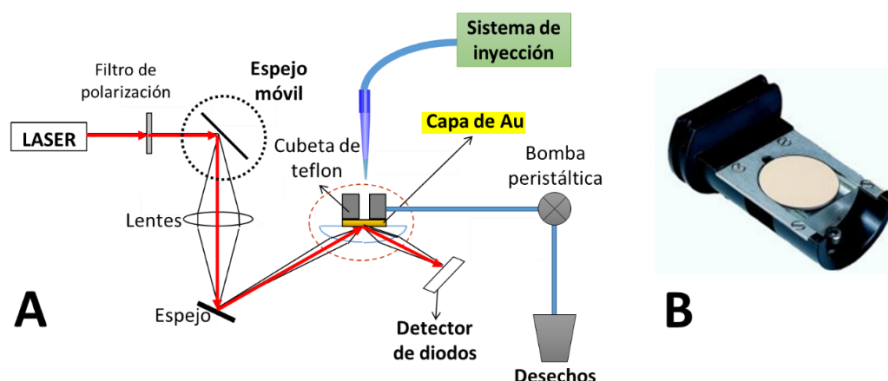


Figura 2.16. **A** Diagrama de los componentes básicos de un equipo de SPR Springle. **B** Disco de Au BK7 montado sobre el hemi-cilindro.

Antes de cada medida se debe estabilizar la superficie de Au, lo cual se consigue realizando 24 lavados consecutivos con agua MQ y verificando que la señal de θ_{SPR} se estabilice.

2.9. Microscopía electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra. Su funcionamiento se basa en el barrido de un haz de electrones sobre una dada región de la superficie mientras en un monitor se visualiza la imagen resultante, la cual variará de acuerdo al detector seleccionado para la medida.

El fundamento del SEM radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de 10^{-7} Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora, objetivo) (**figura 2.17**) desde unos 25.000 - 50.000 nm hasta unos 10 nm. El haz electrónico, prácticamente puntual, es desplazado sobre toda la superficie de la muestra: este desplazamiento del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento. Al producirse la interacción haz incidente-muestra, se genera una variedad de señales que pueden ser captadas por sus correspondientes detectores y brindan distinta información de la muestra.

Cuando el haz interactúa con la superficie, los electrones pierden energía debido a la dispersión al azar y a la absorción de la muestra. Los tipos de señales producidas

por SEM incluyen electrones secundarios (ES), electrones retrodispersados (ERD), rayos X característicos, electrones “Auger” y fotones de varios niveles energéticos. Desde el punto de vista del SEM, los más importantes son los ES y los ERD (en la **figura 2.17** se muestra un esquema de los detectores): los primeros brindan una imagen de la morfología superficial de la muestra; y los segundos son empleados para obtener imágenes de contraste por número atómico y contraste topográfico [29].

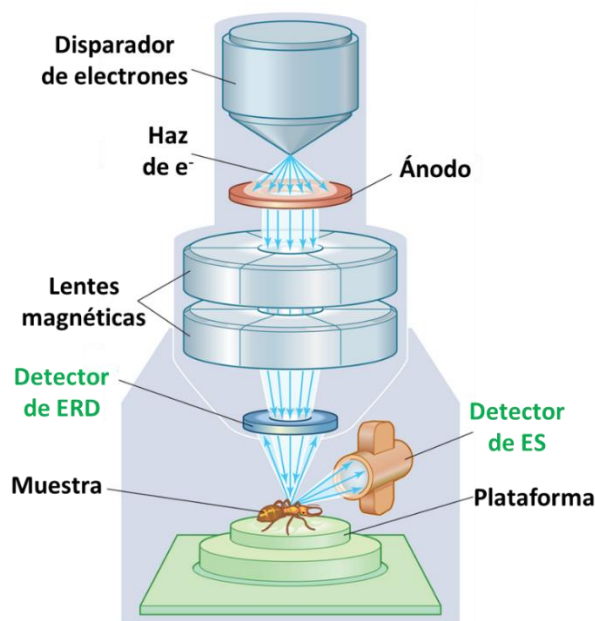


Figura 2.17. Esquema de los componentes principales de un equipo de SEM.

Las micrografías SEM mostradas en este trabajo de Tesis fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido FE-SEM Σigma de Carl Zeiss, empleando un detector de electrones secundarios.

2.10. Limpieza, pretratamiento y preparación de los sustratos de trabajo

2.10.1. Cuarzo

Para el ensamblado de dispersiones y polímeros en los estudios de espectroscopia UV-Vis se utilizó una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico, la cual se lavó con solución “piraña” (H_2SO_4 95 %/ H_2O_2 30 %, en relación 7/3) durante 10 min en ultrasonido.

La generación de cargas negativas en la superficie de cuarzo (por exposición de los grupos silicato) se realizó mediante tratamiento con una solución acuosa:etanólica

(41:59) de NaOH 0,10 M en baño ultrasónico por 30 min, luego se lavó exhaustivamente con agua MQ [30].

2.10.2. Carbono vítreo

Los electrodos de carbono vítreo (GCE) son uno de los materiales de electrodo con mayor aplicación en electroquímica. El carbono vítreo se prepara sometiendo a diversos polímeros orgánicos (principalmente poliacrilonitrilo) a una serie de tratamientos térmicos a presión en atmósfera inerte hasta temperaturas cercanas a los 3000 K. En estas condiciones los heteroátomos se evaporan hasta que sólo queda el carbono. El carbono vítreo es duro y altamente impermeable a gases y líquidos. Su estructura consiste en carbono sp^2 y posee regiones gráficas de no más de 100 Å entrelazadas entre sí a modo de cintas [31].

Desde el punto de vista electroquímico, los GCE poseen capacitancias del orden de los electrodos metálicos ($24 - 36 \mu F cm^{-2}$) y resistividades muy bajas en comparación a otros alótropos de carbono ($4,2 m\Omega cm$) [32]. Si bien la electroactividad de las superficies de GCE es altamente dependiente del proceso de síntesis del material y del pulido, el comportamiento electroquímico de cuplas rédox de esfera interna suele ser entre reversible y cuasi-reversible ($k^0 = 0,005 - 0,45 cm s^{-1}$ para $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) [33].

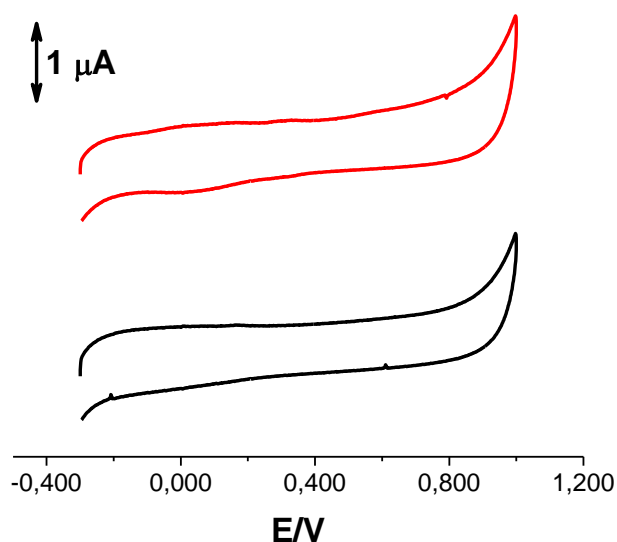


Figura 2.18. Perfiles voltamperométricos sobre GCE en “buffer” fosfato 0,050 M pH 7,40 (—) y “buffer” acetato 0,200 M pH 5,00 (—). $v = 0,100 V s^{-1}$.

En el presente trabajo de Tesis se utilizaron GCE CHI104 de 3 mm de diámetro (CHI Instruments). Para emplearlos como electrodos de trabajo es necesario realizar un acondicionamiento adecuado, ya que al estar en contacto con el aire se genera espontáneamente una película de óxido de grafito que provoca incrementos en la

capacitancia [34]. De esta manera, la limpieza de estas superficies se realizó puliendo mecánicamente durante 30 s sobre papel esmeril #800 (Buehler). Luego, los electrodos se pulieron hasta “apariencia espejo” en suspensiones acuosas de alúmina 0,3 y 0,05 μm , sucesivamente, sobre paño DP-Nap (Struers). Para remover las partículas de alúmina que quedan adsorbidas sobre la superficie, los GCE se lavaron con abundante agua MQ y se sonicaron durante 10 s. La **figura 2.18** muestra los perfiles voltamperométricos de GCE obtenidos en los dos electrolitos soportes utilizados durante el desarrollo de la Tesis: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 (—) y *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00 (—). Se puede observar la amplia ventana de potencial de trabajo de este tipo de electrodos, la cual es una de sus principales ventajas.

2.10.3. Oro policristalino

Los electrodos de oro son, dentro de todos los electrodos metálicos de trabajo disponibles, los más empleados en electroquímica y, puntualmente, en el desarrollo de biosensores. Esto se debe, por un lado, a la facilidad con la que pueden ser modificados con un gran número de moléculas a través de la derivatización con tioles [35,36]; y, por el otro, a la posibilidad que ofrece el oro de ser estudiado por otras técnicas tales como SPR, microbalanza de cristal de cuarzo, microscopio de efecto túnel, entre otras. En el presente trabajo de Tesis se utilizaron electrodos CHI101 de 2 mm de diámetro (CHI Instruments).

Al igual que con los GCE, un factor importante en el uso de Au es la dependencia de la respuesta (en términos de actividad, estabilidad y reproducibilidad) con las condiciones de la superficie del electrodo. Para poder utilizar los electrodos de oro (Au), es necesario realizar un pre-tratamiento exhaustivo con el objetivo de acondicionar la superficie metálica. Existen diversos protocolos según las características del oro y su finalidad de uso [37]. El utilizado en el presente trabajo de Tesis consistió en 4 pasos:

1. Pulido químico: los electrodos se colocaron en una solución “piraña” durante 10 min. Esta solución, al ser oxidante y exotérmica al momento de preparación, oxida los compuestos orgánicos que pueda llegar a tener el electrodo.
2. Pulido mecánico: se pulieron hasta “apariencia espejo” en suspensiones acuosas de alúmina 1 y 0,3 μm , sucesivamente, sobre paño DP-Nap (Struers). En caso de ser necesario, previamente se los trató con pasta de diamante de 1 μm en etilenglicol.
3. Tratamiento con solución “piraña”: efectuado durante 1 min para remover partículas de alúmina que se incrustan en la superficie.
4. Pulido electroquímico: se aplicó una secuencia de 6 ciclos de oxidación/reducción en solución de H_2SO_4 0,50 M. Cada ciclo corresponde a un

pulso de 2,000 V durante 2 s (oxidación) y uno de -1,000 V durante 4 s (reducción). En algunos casos fue necesario ciclar el electrodo en la misma solución entre -0,100 y 1,700 V a 2,000 V s⁻¹.

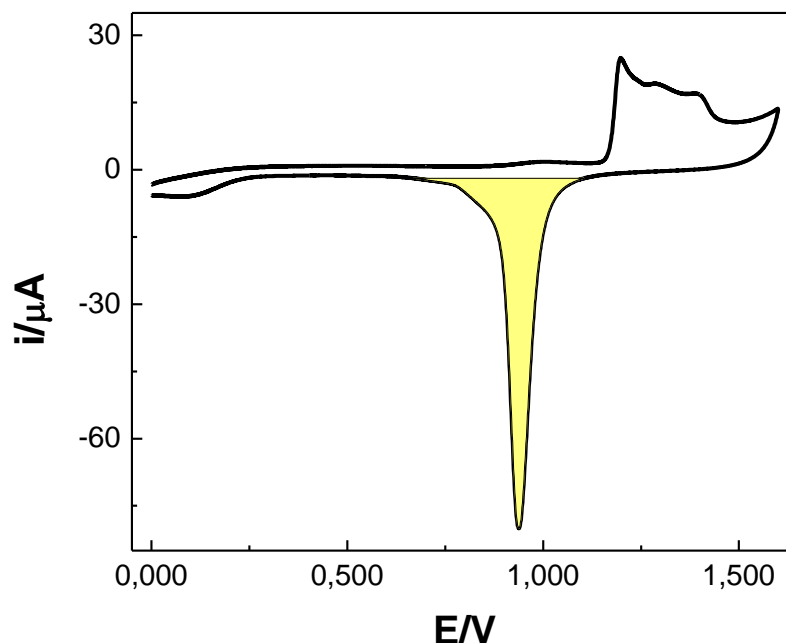


Figura 2.19. Voltamperograma cíclico sobre Au policristalino en H₂SO₄ 0,50 M. El área coloreada muestra la carga debida a la reducción de los óxidos de Au. $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

El estado superficial de los electrodos de Au se verificó realizando un VC en H₂SO₄ 0,50 M a 0,100 V s⁻¹, como se muestra en la **figura 2.19**. En el barrido directo, hasta 1,100 V se observa solamente corriente capacitiva y dicho potencial corresponde al límite superior de la “ventana” de trabajo. Los 3 picos de corriente que se obtienen por encima de 1,100 V corresponden a la formación de los óxidos de oro (AuO) en las distintas caras cristalinas presentes en el electrodo [38]. Al revertir el barrido se observa un pico catódico correspondiente a la reducción de los óxidos de Au formados (sombreado en la **figura 2.19**). El área bajo el pico de reducción de los óxidos de oro es utilizada para determinar la carga (Q_{AuO}) involucrada en el proceso, el área electroactiva de los electrodos y su rugosidad, de acuerdo a las **ecuaciones 2.18 y 2.19**:

$$Q_{AuO} = \frac{1}{\nu} \int_{E_1}^{E_2} i \, dE \quad \text{Ecuación 2.18}$$

$$A = \frac{Q_{AuO}}{420 \, \mu\text{C cm}^2} \quad \text{Ecuación 2.19}$$

donde E1 y E2 son los límites de potencial de la zona sombreada en la **figura 2.19**, y $420 \mu\text{C cm}^{-2}$, un factor que da cuenta de la carga necesaria para reducir una monocapa de Au formada sobre una superficie policristalina de 1 cm^2 [39].

2.11. Autoensamblado de tioles sobre electrodos de Au

La formación de monocapas autoensambladas (SAM) de tioles es la forma más sencilla de modificar los electrodos de Au con películas orgánicas ultrafinas, las cuales le brindan a dicho sustrato funcionalidades químicas y selectividad. Su estudio es particularmente importante en el campo de los sensores [40], en la prevención de la corrosión [41,42], en la nanofabricación [36], para implantes médicos, y en biotecnología [43], entre otros.



Figura 2.20. **A** Esquema de una SAM de tioles sobre un sustrato de Au. **B** Estructura del tior 3-mercaptopropan sulfonato de sodio (MPS). **C** Estructura del tior 4-aminotiofenol (4ATP).

Las SAM (**figura 2.20 A**) se forman espontáneamente por inmersión de un sustrato de Au en una solución que contenga los adsorbatos (tioles). El “grupo cabeza” está formado por el grupo sulfhidrilo (-SH), que se enlaza covalentemente al sustrato (energía de enlace del orden de 50 kcal mol^{-1}) y es el responsable de guiar el proceso de autoensamblado [44]. El “esqueleto” es la cadena hidrocarbonada unida al grupo -SH y a un grupo químico, el “grupo terminal”. Este último es el que determina las propiedades químicas y físicas superficiales de la SAM [35].

El amplio rango de aplicación de las SAM se debe a la variedad de grupos funcionales que se pueden anclar al sustrato de Au, siendo el paso inicial para la construcción de arquitecturas más complejas [45]. En el presente trabajo de Tesis se implementaron SAMs para derivatizar sustratos de Au con dos objetivos distintos:

1. Para otorgarle cargas al sustrato: se utilizó el tior alifático 3-mercaptopropanosulfonato de sodio (MPS, **figura 2.20 B**) debido a que es una molécula hidrofílica muy estable cuya carga es independiente del pH y permite la

inmovilización posterior de polielectrolitos para la construcción de autoensamblados electrostáticos [46,47].

2. Para otorgarle grupos funcionales al sustrato: se utilizó al tiol 4-aminotiofenol (4ATP, **figura 2.20 C**) ya que, al ser una molécula aromática, forma SAM compactas, exponiendo a la solución una alta densidad de grupos amino que sirven para inmovilizar covalentemente otras moléculas y nanoestructuras [48,49].

En las dos secciones siguientes se presentan los resultados de caracterización electroquímica de electrodos de Au modificados con ambos tioles y las condiciones de formación de las SAM. Estos resultados se muestran en el presente capítulo ya que la formación de SAM de MPS y 4ATP sobre Au es un tema ampliamente reportado en bibliografía pero que se debe optimizar a las condiciones superficiales de los electrodos de Au empleados en el trabajo de Tesis.

2.11.1. Adsorción de 3-mercapto-1-propanosulfonato de sodio

La formación de las SAM de MPS se llevó a cabo por deposición de 50 μL de solución acuosa del tiol $2,00 \times 10^{-2}$ M, preparada en H_2SO_4 $1,60 \times 10^{-2}$ M. La modificación fue realizada en cámara húmeda para evitar evaporación del solvente y luego del tiempo de interacción, los electrodos se enjuagaron con abundante agua MQ.

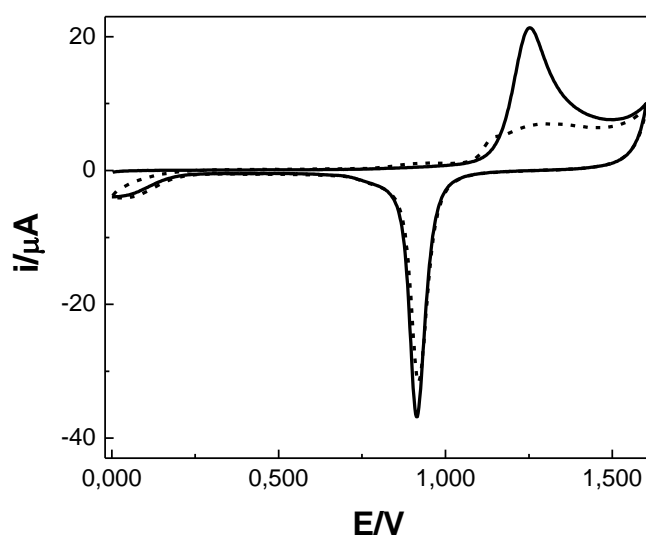
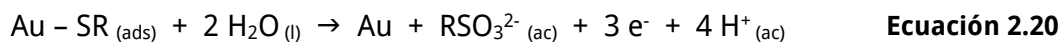


Figura 2.21. Voltamperograma cíclico sobre Au/MPS en HClO_4 0,10 M. La línea llena corresponde al primer ciclo y la punteada, al segundo ciclo. $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

La optimización del tiempo de inmersión se llevó a cabo estudiando la desorción oxidativa del tiol. Para ello se modificaron electrodos de oro con MPS durante 30, 60 y 120 min y luego se llevaron a cabo voltamperogramas en HClO_4 0,10 M, como se muestra en la **figura 2.21**. A $E > 1,100 \text{ V}$ se puede observar un incremento en la corriente debido

a la oxidación irreversible del tiol de acuerdo a la **ecuación 2.20** y la formación de la capa de óxido. La cantidad de MPS adsorbido se puede estimar a partir de la carga asociada (**ecuación 2.18**) con la oxidación de la SAM luego de descontar la carga debido a la formación de óxido de Au en el segundo ciclo [50].



La **tabla 2.1** resume los valores de cubrimiento superficial de MPS (Γ_{MPS}) obtenidos para los distintos tiempos de adsorción. Los resultados muestran que luego de 60 min de adsorción el valor de Γ_{MPS} no varía, por lo que fue elegido como el tiempo óptimo. El cubrimiento alcanzado se encuentra dentro del orden del reportado por Mokrani y col. ($4,6 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) [47].

Tabla 2.1. Cubrimiento superficial de MPS (Γ_{MPS}) a diferentes tiempos de adsorción.

<i>Tiempo/min</i>	<i>$\Gamma_{\text{MPS}}/10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$</i>
30	$6,62 \pm 0,06$
60	$7,89 \pm 0,02$
120	$7,84 \pm 0,05$

La adsorción de tioles sobre Au produce cambios marcados en la interfaz. Esto se debe a que la presencia de cadenas hidrocarbonadas libres de iones con una constante dieléctrica menor produce una disminución de la C_{dc} [35]. Así, mediante EIE en NaClO_4 0,10 M y ajuste con el circuito de la **figura 2.7 A** se encontró que la C_{dc} de Au/MPS fue $10,6 \pm 0,8 \mu\text{F cm}^{-2}$, la cual es menor que la capacitancia de Au sin modificar ($36 \pm 2 \mu\text{F cm}^{-2}$).

Debido a la presencia de los grupos terminales sulfonato, la modificación de Au con MPS le imparte a la superficie una elevada densidad de cargas negativas. Esto se puede observar en los EIE de la **figura 2.22** para Au (●) y Au/MPS (○), realizados en una solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$. Dado que la cupla redox se encuentra cargada negativamente, al modificar el electrodo de Au con MPS la repulsión entre cargas provoca un incremento en la R_{tc} lo cual se evidencia en el aumento en el semicírculo del EIE de Au/MPS respecto a Au. A partir del ajuste con el circuito de Randles (**figura 2.7 B**), se calcularon las R_{tc} y mediante la **ecuación 2.13** se obtuvieron los valores de k_0 para la transferencia de carga de la sonda redox sobre el electrodo de Au ($2,54 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) y sobre Au/MPS ($1,14 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

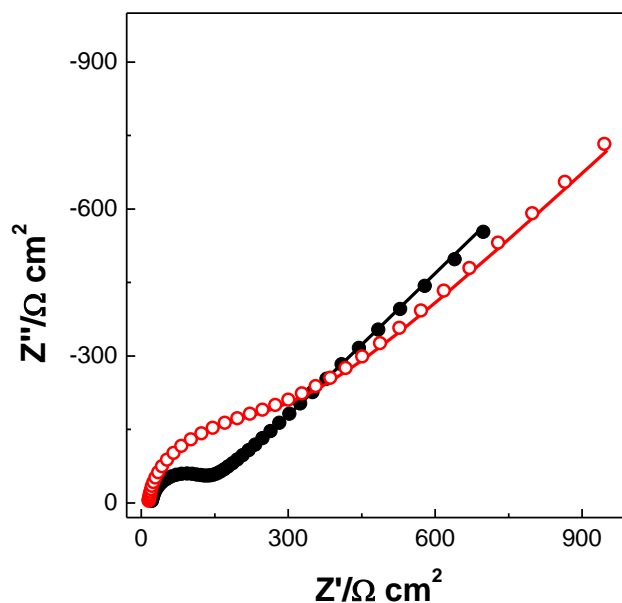


Figura 2.22. Gráficos de Nyquist para experimentos de EIE en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M sobre Au (●) y Au/MPS (○). Potencial de trabajo: 0,200 V. Amplitud: 10 mV. Rango de frecuencias medido: $10^5 - 10^{-1}$ Hz. Electrolito soporte: NaClO_4 0,10 M. Las líneas representan la respuesta a partir del ajuste con el circuito de la **figura 2.7 B**.

2.11.2. Adsorción de 4-aminotiofenol

La formación de SAM de 4ATP se llevó a cabo por inmersión del electrodo en solución etanólica $5,00 \times 10^{-3}$ M durante un dado tiempo, luego del cual se enjuagó el electrodo con abundante EtOH y agua MQ.

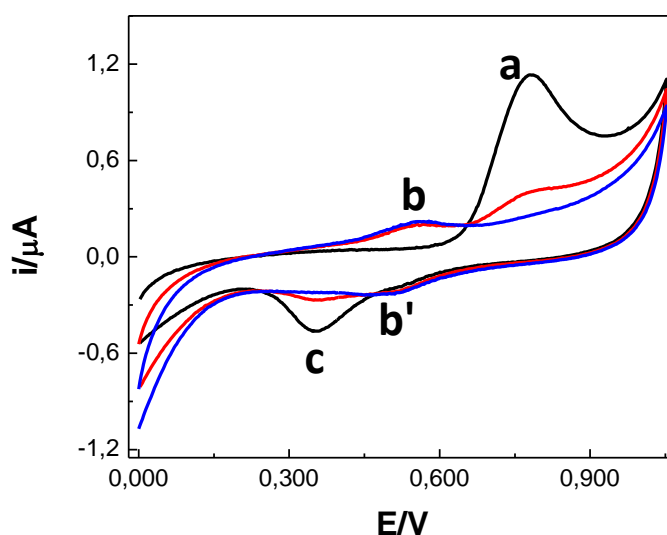
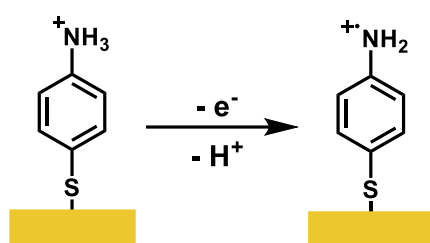
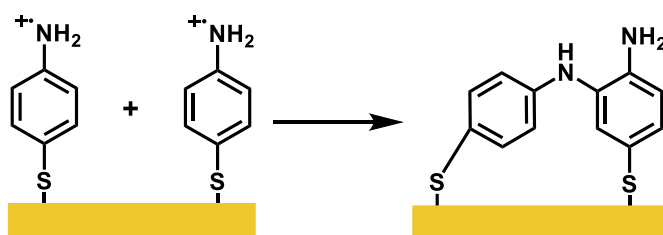


Figura 2.23. Voltamperograma cíclico obtenido sobre Au/4ATP en HClO_4 0,10 M para el primer (—), segundo (—) y tercer ciclo (—). $\nu = 0,020 \text{ V s}^{-1}$.

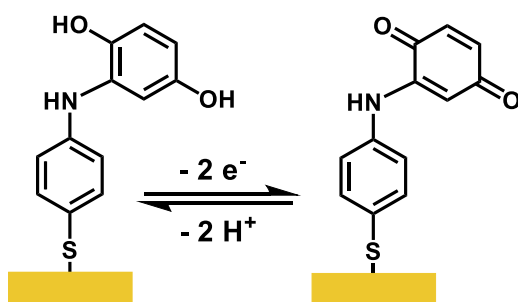
La **figura 2.23** muestra los voltamperogramas correspondientes al primer, segundo y tercer ciclo para la oxidación de Au/4ATP. La SAM de este tiol sufre una reacción de oxidación [51] por la formación irreversible del radical catión (proceso *a* de la **figura 2.23**) y posterior acoplamiento con una molécula vecina de 4ATP, como se indica en la **ecuación 2.21**. Este dímero rígido sufre desorción parcial de la superficie de Au y es hidrolizado (**ecuación 2.22**) para formar el producto final, que contiene el grupo quinona que da origen al proceso reversible *b/b'*(**ecuación 2.23**). El proceso *c* de la **figura 2.23**, que desaparece conforme aumenta el número de ciclos, está asociado a la desorción oxidativa de los átomos de azufre que quedan luego de la reacción de **ecuación 2.22**. A partir de la carga del pico *a* se puede estimar el cubrimiento superficial de 4ATP, teniendo en cuenta que el proceso global transcurre con el intercambio de 2 electrones [50].



Ecuación 2.21



Ecuación 2.22



Ecuación 2.23

La **tabla 2.2** resume los valores de Γ_{4ATP} , donde se observa que a partir de 120 min de adsorción el cubrimiento del tiol no varía. El valor obtenido para 120 min de adsorción se corresponde con los cubrimientos reportados previamente en bibliografía [48,50]. El autoensamblado de 4ATP provoca una disminución en la capacitancia respecto a la correspondiente al electrodo de Au desnudo, siendo ésta $(15 \pm 2) \mu\text{F cm}^{-2}$.

Tabla 2.2. Cubrimiento superficial de MPS (Γ_{4ATP}) a diferentes tiempos de adsorción.

Tiempo/min	$\Gamma_{4ATP}/\times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$
60	$1,8 \pm 0,1$
120	$3,2 \pm 0,7$
240	$3,3 \pm 0,8$

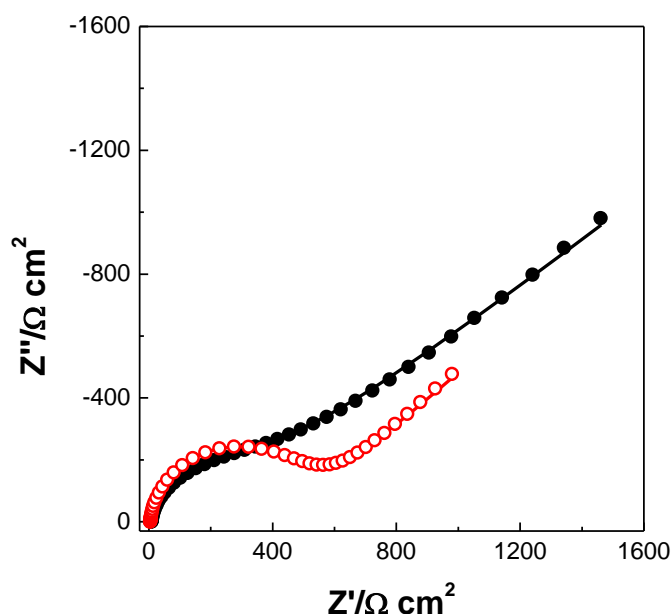


Figura 2.24. Gráficos de Nyquist para experimentos de EIE en Fe(II)/(III) $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre Au (●) y Au/4ATP (○). Potencial de trabajo: 0,505 V. Amplitud: 10 mV. Rango de frecuencias medido: $10^5 - 10^{-1} \text{ Hz}$. Electrolito soporte: H_2SO_4 0,10 M. Las líneas representan la respuesta a partir del ajuste con el circuito de la **figura 2.7 B**.

La modificación de Au con 4ATP genera no sólo una disminución en C_{dc} sino que también le confiere a la superficie una elevada densidad de grupos amino. A pH ácido dichos grupos se encuentran cargados positivamente, lo cual se puede confirmar por EIE en solución de Fe(II)/(III), como lo muestra la **figura 2.24**. Debido a la repulsión electrostática entre la cupla rédox y la superficie de Au/4ATP, la velocidad de transferencia de carga de la misma disminuye, incrementándose el semicírculo correspondiente a la R_{tc} en el gráfico de Nyquist. Mediante la **ecuación 2.13** se obtuvieron los valores de k_0 para las transferencia de carga de la cupla sobre Au ($1,07 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) y Au/4ATP ($5,60 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

2.12. Bibliografía

- [1] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2001.

- [2] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [3] G.A. Mabbott, An introduction to cyclic voltammetry, *J. Chem. Educ.* 60 (1983) 697–702.
- [4] H.H. Girault, *Analytical and Physical Electrochemistry*, EFPL Press, Lausana, 2004.
- [5] J.C. Myland, K.B. Oldham, Quasireversible cyclic voltammetry of a surface confined redox system: A mathematical treatment, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 282–287.
- [6] E. Laviron, L. Roullier, General expression of the linear potential sweep voltammogram for a surface redox reaction with interactions between the adsorbed molecules: Applications to modified electrodes, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 115 (1980) 65–74.
- [7] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 101 (1979) 19–28.
- [8] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.
- [9] G. Henze, *Analytical Voltammetry and Polarography*, in: *Handb. Anal. Tech.*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001: pp. 785–825.
- [10] S. Krause, *Impedance Methods*, in: A.J. Bard, M. Stratmann, P.R. Unwin (Eds.), *Encycl. Electrochem. Vol. 3, Instrum. Electroanal. Chem.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003: p. 196.
- [11] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2008.
- [12] Z. Li, T. Niu, Z. Zhang, R. Chen, G. Feng, S. Bi, Exploration of the specific structural characteristics of thiol-modified single-stranded DNA self-assembled monolayers on gold by a simple model, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4564–4570.
- [13] X. Ren, P.G. Pickup, An impedance study of electron transport and electron transfer in composite polypyrrole + polystyrenesulphonate films, *J. Electroanal. Chem.* 420 (1997) 251–257.
- [14] S.V.P. Barreira, V. Garcia-Morales, C.M. Pereira, J.A. Manzanares, F. Silva, Electrochemical Impedance Spectroscopy of Polyelectrolyte Multilayer Modified Electrodes, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 17973–17982.
- [15] C. Fernández-Sánchez, C.J. McNeil, K. Rawson, Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 37–48.
- [16] H. Shiku, H. Ohya, T. Matsue, *Scanning Electrochemical Microscopy Applied to Biological Systems*, in: A.J. Bard, M. Stratmann, G.S. Wilson (Eds.), *Encycl. Electrochem. Vol. 9, Bioelectrochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002: p. 257.
- [17] S. Bergner, P. Vatsyayan, F.-M. Matysik, Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells – A review, *Anal. Chim. Acta.* 775 (2013) 1–13.
- [18] A.J. Wain, Scanning electrochemical microscopy for combinatorial screening applications: A mini-review, *Electrochem. Commun.* 46 (2014) 9–12.
- [19] A.J. Bard, M. V. Mirkin, *Scanning Electrochemical Microscopy*, CRC Press, Boca Raton, 2012.
- [20] A. Olaru, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, H.Y. Aboul-Enein, Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 45 (2015) 97–105.
- [21] E. Muñoz, D. Ricklin, Analysis of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, in: *Struct. Elucidation Org. Chem.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015: pp. 361–392.

- [22] B.A. Snopok, Theory and Practical Application of Surface Plasmon Resonance for Analytical Purposes., *Theor. Exp. Chem.* 48 (2012) 283–306.
- [23] J. Homola, Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 528–539.
- [24] R.P.H. Kooyman, Chapter 2: Physics of Surface Plasmon Resonance, in: A.J. Tudos, R.B.M. Schasfoort (Eds.), *Handb. Surf. Plasmon Reson.*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008: pp. 15–34.
- [25] A.J. Tudos, R.B.M. Schasfoort, Chapter 1: Introduction to Surface Plasmon Resonance, in: A.J. Tudos, R.B.M. Schasfoort (Eds.), *Handb. Surf. Plasmon Reson.*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008: pp. 1–14.
- [26] C. Di Primo, I. Lebars, Determination of refractive index increment ratios for protein–nucleic acid complexes by surface plasmon resonance, *Anal. Biochem.* 368 (2007) 148–155.
- [27] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky, Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins, *J. Colloid Interface Sci.* 143 (1991) 513–526.
- [28] A. Kausaite, M. van Dijk, J. Castrop, A. Ramanaviciene, J.P. Baltrus, J. Acaite, et al., Surface plasmon resonance label-free monitoring of antibody antigen interactions in real time, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 35 (2007) 57–63.
- [29] V. Sorrivias de Lozano, A. Morales, M.J. Yañez, *Principios y práctica de la microscopía electrónica*, Argentina, 2014.
- [30] N.F. Ferreyra, G.A. Rivas, Self-assembled multilayers of polyethylenimine and DNA: Spectrophotometric and electrochemical characterization and application for the determination of acridine orange interaction, *Electroanalysis.* 21 (2009) 1665–1671.
- [31] P.N. Bartlett, R.C. Alkire, J. Lipkowski, *Electrochemistry of Carbon Electrodes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2015.
- [32] R.L. McCreery, *Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry*, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2646–2687.
- [33] R.J. Rice, N.M. Pontikos, R.L. McCreery, Quantitative correlations of heterogeneous electron-transfer kinetics with surface properties of glassy carbon electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 4617–4622.
- [34] A. Dekanski, J. Stevanović, R. Stevanović, B.Ž. Nikolić, V.M. Jovanović, Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation, *Carbon N. Y.* 39 (2001) 1195–1205.
- [35] C. Vericat, M.E. Vela, G. Corthey, E. Pensa, E. Cortes, M.H. Fonticelli, et al., Self-assembled monolayers of thiolates on metals: a review article on sulfur-metal chemistry and surface structures, *RSC Adv.* 4 (2014) 27730–27754.
- [36] H. Hakkinen, The gold-sulfur interface at the nanoscale, *Nat. Chem.* 4 (2012) 443–455.
- [37] L.M. Fischer, M. Tenje, A.R. Heiskanen, N. Masuda, J. Castillo, A. Bentien, et al., Gold cleaning methods for electrochemical detection applications, *Microelectron. Eng.* 86 (2009) 1282–1285.
- [38] A. Hamelin, Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces, *J. Electroanal. Chem.* 407 (1996) 1–11.
- [39] R.F. Carvalhal, R. Sanches Freire, L.T. Kubota, Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation, *Electroanalysis.* 17 (2005) 1251–1259.
- [40] D. Mandler, S. Kraus-Ophir, Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing, *J. Solid State Electrochem.* 15 (2011) 1535–1558.

- [41] B.R. Shrestha, A. Bashir, G.N. Anka, M. Valtiner, F.U. Renner, Localized dealloying corrosion mediated by self-assembled monolayers used as an inhibitor system, *Faraday Discuss.* 180 (2015) 191–204.
- [42] N.R. Parekh, D.N. Shah, A review: Comparative study of corrosion inhibition of metals by using inhibitors and inhibitors assembled on nano particles in acidic media, *Int. Res. J. Chem.* 10 (2015).
- [43] J.T. Koepsel, W.L. Murphy, Patterned Self-Assembled Monolayers: Efficient, Chemically Defined Tools for Cell Biology, *ChemBioChem.* 13 (2012) 1717–1724.
- [44] E. Pensa, E. Cortés, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M.H. Fonticelli, et al., The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model, *Acc. Chem. Res.* 45 (2012) 1183–1192.
- [45] C. Vericat, M.E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R.C. Salvarezza, Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1805–1834.
- [46] L.L. Rouhana, M.D. Moussallem, J.B. Schlenoff, Adsorption of Short-Chain Thiols and Disulfides onto Gold under Defined Mass Transport Conditions: Coverage, Kinetics, and Mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 16080–16091.
- [47] C. Mokrani, J. Fatissou, L. Guérente, P. Labbé, Structural Characterization of (3-Mercaptopropyl)sulfonate Monolayer on Gold Surfaces, *Langmuir.* 21 (2005) 4400–4409.
- [48] E. Valério, L.M. Abrantes, A.S. Viana, 4-aminothiophenol self-assembled monolayer for the development of a DNA biosensor aiming the detection of cylindrospermopsin producing cyanobacteria, *Electroanalysis.* 20 (2008) 2467–2474.
- [49] V. Ganesh, R.R. Pandey, B.D. Malhotra, V. Lakshminarayanan, Electrochemical characterization of self-assembled monolayers (SAMs) of thiophenol and aminothiophenols on polycrystalline Au: Effects of potential cycling and mixed SAM formation, *J. Electroanal. Chem.* 619-620 (2008) 87–97.
- [50] M. Wirde, U. Gelius, L. Nyholm, Self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine on gold studied by XPS and voltammetry, *Langmuir.* 15 (1999) 6370–6378.
- [51] W.A. Hayes, C. Shannon, Electrochemistry of Surface-Confined Mixed Monolayers of 4-Aminothiophenol and Thiophenol on Au, *Langmuir.* 12 (1996) 3688–3694.

RESULTADOS

- PARTE A -

**Plataformas (bio)analíticas
basadas en la
funcionalización no
covalente de BCNT con
dsDNA**

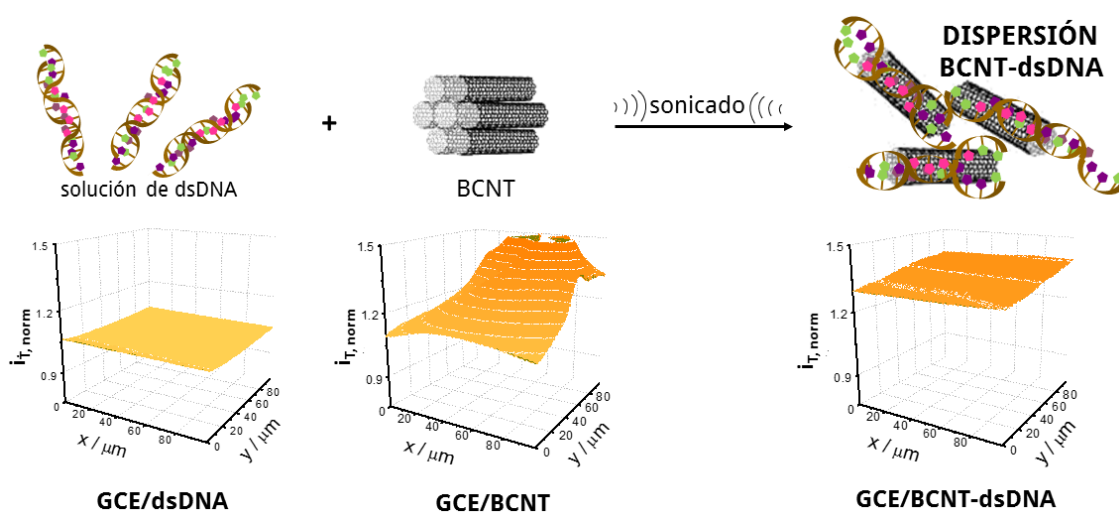
CAPÍTULO 3

Dispersión de BCNT con dsDNA

Caracterización para el
desarrollo de plataformas
electroactivas

RESUMEN

En este capítulo se reporta la utilización de DNA genómico de doble hebra (proveniente de timo de ternera) como agente dispersante de CNT tipo *bamboo* (BCNT) y la posterior inmovilización de la dispersión resultante sobre sustratos de carbono vítreo. El sistema fue caracterizado empleando diferentes técnicas espectroscópicas y electroquímicas en conjunción con microscopías de alta resolución. Se discutirán las ventajas de utilizar BCNT frente a los CNT multi-pared tipo *hollow* convencionales y la influencia de las condiciones de dispersión (tiempo de ultrasonido, solvente, relación BCNT:DNA) en la eficiencia de la dispersión y las propiedades electroquímicas de la plataforma.



3.1. Introducción

3.1.1. Estructura del DNA

Los monómeros del DNA, llamados nucleótidos, están formados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato unido al C5' del azúcar y la base nitrogenada correspondiente (**figura 3.1 A**). Sólo hay cuatro bases orgánicas que existen naturalmente en el DNA: timina, citosina, adenina y guanina (T, C, A, G; respectivamente). Las dos primeras corresponden al grupo de las pirimidinas y las dos últimas, al de las purinas. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena del polímero es la que codifica la información genética. En los seres vivos, el DNA siempre se encuentra apareado con otra cadena formando una doble hebra que se enrolla sobre sí misma adquiriendo una estructura helicoidal. Como se puede observar en la **figura 3.1 B**, la especificidad (complementariedad) en la formación de los pares de bases en el DNA de doble hebra (dsDNA) se debe a los puentes de hidrógeno que forman las bases complementarias: A forma 2 enlaces de hidrógeno con T, y G forma 3 con C. Asimismo, las bases, que tienen una naturaleza hidrofóbica, se encuentran apiladas en el interior de la doble hélice, en planos perpendiculares a su eje mientras que la parte exterior, compuesta por los grupos fosfato y azúcares, es hidrofílica.

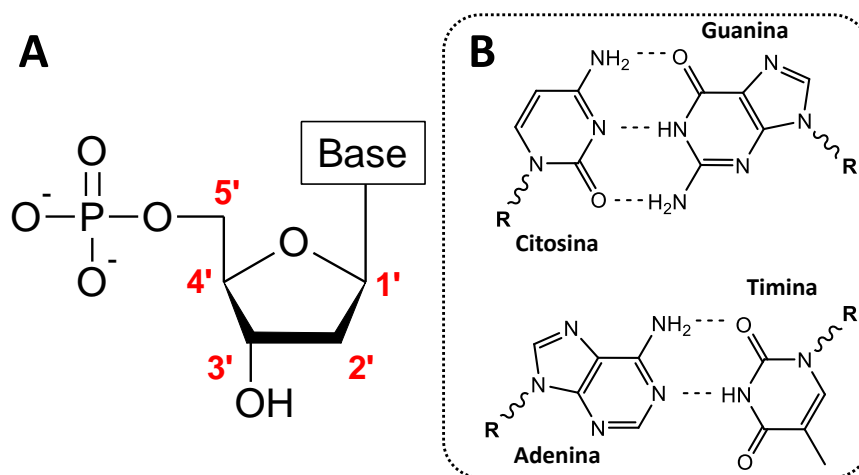


Figura 3.1. **A** Estructura de un nucleótido, con la nomenclatura IUPAC de los carbonos del azúcar. **B** Apareamiento de las bases nitrogenadas en el DNA de doble hebra.

La doble hebra del DNA puede presentar diversas estructuras tridimensionales. El B-DNA (**figura 3.2 A**) es la más común de ellas y se presenta en condiciones fisiológicas en la mayoría de los seres vivos. En esta estructura los pares de bases se sitúan casi perpendicularmente al eje de la hélice y, como resultado de la asimetría de cada par de nucleótidos, se generan dos surcos de distinto tamaño (mayor

y menor) que definen una vuelta de hélice. La distancia entre pares de bases (pb) es de 3,4 Å y una vuelta incluye 10,5 pb. En el A-DNA, mostrado en la **figura 3.2 B**, la hélice es más ancha y una vuelta completa incluye 11 pb. Esta estructura se favorece en medios de bajo contenido acuoso. La otra estructura, el Z-DNA (**figura 3.2 C**), es levógira y tiene una apariencia más elongada y esbelta. Posee 12 pb por vuelta y la distancia entre pb es de 3,7 Å. EL Z-DNA se produce durante la transcripción de los genes en las células ó cuando algunas bases bases sufren metilación.

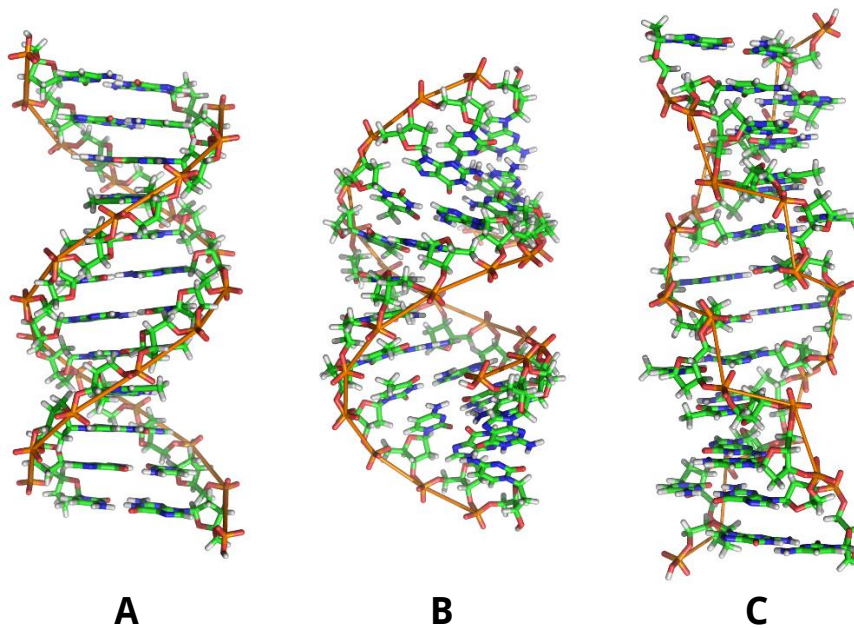


Figura 3.2. Estructuras tridimensionales del DNA. **A** B-DNA. **B** A-DNA. **C** Z-DNA.

3.1.2. Factores que estabilizan la doble hebra del DNA

Existen diversas contribuciones a la energía de estabilización de la doble hebra. Una de ellas son los puentes de hidrógeno debido al apareamiento de las bases. Sin embargo, en solución acuosa, cuando las hebras se encuentran desapareadas, las bases ya interactúan con moléculas de agua mediante puentes de hidrógeno. Este equilibrio significa que un enlace hidrógeno de un par de bases contribuye en sólo 1 kcal mol⁻¹ a la estabilización de la doble hélice [1].

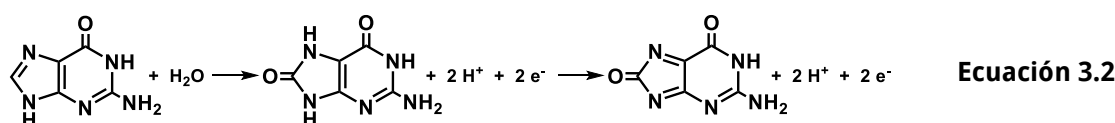
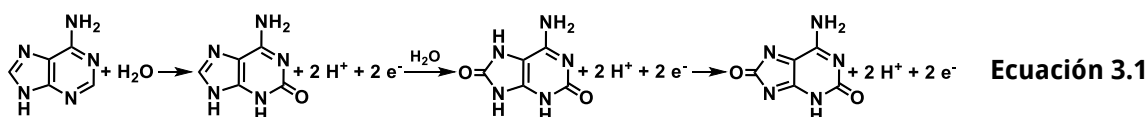
De hecho, la doble hélice se estabiliza más por el apilamiento (π -stacking) de las bases que por el apareamiento. Esto puede deducirse del hecho de que las bases libres en agua se apilan unas sobre otras, en lugar de formar pares de puentes de hidrógeno. Este apilamiento permite a las bases eliminar sus nubes π hidrófobas de los anillos conjugados, de la solución sin obstaculizar el acceso a los grupos que participan en la formación de los puentes de hidrógeno.

El siguiente factor es el apantallamiento de las cargas debido a la presencia de iones. Los contraiones son indispensables para superar la repulsión electrostática entre los grupos fosfato que se encuentran espaciados regularmente a lo largo de cada una de las hebras de DNA. Su importancia se puede juzgar por el hecho de que la doble hebra de DNA no es estable en agua sin la presencia de un electrolito.

El último factor estabilizador que debe considerarse es la entropía del solvente. Al unir dos cadenas simples de DNA se requiere desolvatar la región de las bases que interactúan entre sí, liberando a la solución un gran número de moléculas de agua, con la consecuente ganancia en entropía. Sin embargo, la desolvatación también tiene una contribución negativa ya que la eliminación de las moléculas de agua provoca una pérdida de entalpía. Otra contribución negativa adicional en la doble hélice es la pérdida de flexibilidad en las hebras individuales, la cual constituye una pérdida de entropía [1].

3.1.3. Electroquímica del DNA

Paleček fue el primero en estudiar la electroactividad de las bases nitrogenadas en el año 1958 [2]. Desde esa época han surgido numerosos avances en el estudio de la adsorción y oxidación/reducción de los ácidos nucleicos, fundamentalmente utilizando electrodos de Hg [3,4]. En electrodos sólidos carbonáceos, sólo se puede estudiar la oxidación de las bases y, en general, las púricas requieren de menores sobrepotenciales de oxidación, siendo G la más fácilmente oxidable [5,6]. Mientras la oxidación de A se lleva a cabo con un intercambio de $6\text{H}^+/6\text{e}^-$ (**ecuación 3.1**), la de G se da con $4\text{H}^+/4\text{e}^-$ (**ecuación 3.2**); siendo ambos procesos irreversibles.



La oxidación de los nucleótidos pirimídicos sobre electrodos de carbono se produce a sobrepotenciales mayores que los púricos y las corrientes anódicas son menores. En la **figura 3.3 A** se muestran los perfiles de voltamperometría de onda cuadrada (SWV) de los 4 nucleótidos y se puede observar que, a la misma concentración, las corrientes de pico para la oxidación de guanosina monofosfato y adenosina monofosfato son mayores que las correspondientes a timidina monofosfato y citidina monofosfato [7,8].

Aunque los polinucleótidos también son electroactivos, sus corrientes de oxidación son menores que las de los nucleótidos debido a restricciones conformacionales [4,9,10]. A modo de ejemplo, en la **figura 3.3 B** se muestra el perfil de DPV para la oxidación de ssDNA, donde la señal de oxidación que aparece a potenciales menores corresponde a G y la que se obtiene a potenciales mayores, a A. También se puede observar que las corrientes de oxidación son menores para dsDNA que para ssDNA. Esta disminución en la respuesta no se correlaciona directamente con la menor accesibilidad de los sitios de oxidación de las bases por el apareamiento con la secuencia complementaria, dado que los mismos se encuentran del lado del esqueleto azúcar-fosfato (**ecuaciones 3.1 y 3.2**), sino a impedimentos conformacionales. La mayor flexibilidad de la hebra simple del ssDNA, frente a la doble cadena más rígida del dsDNA, le permite ajustarse a la rugosidad superficial propia del electrodo por lo que el número de segmentos del DNA en contacto directo o en la proximidad del electrodo es mayor. Así, las mayores corrientes de oxidación están asociadas a una mayor concentración de residuos G y A en íntimo contacto con la superficie del electrodo [7,8,11].

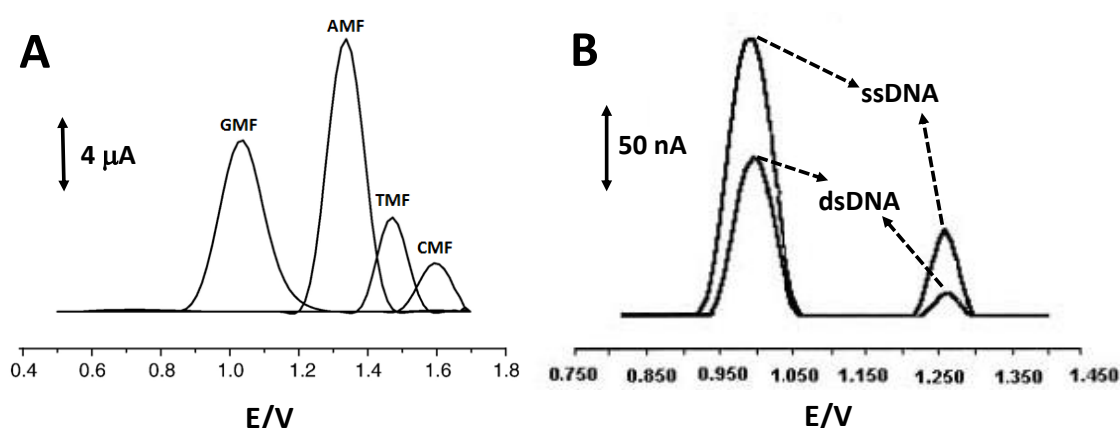


Figura 3.3. **A** Perfiles de SWV sobre electrodo de pasta de carbono de soluciones 1,4 nM de guanosina monofosfato (GMF), adenosina monofosfato (AMF), timidina monofosfato (TMF) y citidina monofosfato (CMF) en *buffer* fosfato salino pH 7,40 (tomado de Ref. [8]). **B** Perfiles de DPV sobre electrodo de pasta de carbono de ssDNA y dsDNA pre-concentrados a partir de soluciones 10 ppm durante 5 min a 0,500 V, en *buffer* acetato pH 4,80 (tomado de Ref. [9]).

Asimismo, se debe destacar que la respuesta electroquímica de los ácidos nucleicos, al estar relacionada con la adsorción de los nucleótidos sobre la superficie del electrodo, es altamente dependiente del estado superficial y estructura de los materiales de carbono [7,12–15].

3.1.4. Dispersión de CNT con DNA

En el año 2003, Zheng y col. [16] reportaron por primera vez la dispersión de SWCNT con homo-oligonucleótidos de diversos tamaños. La misma se llevó a cabo

sonicando una solución del oligonucleótido (ONC) con SWCNT durante 90 min y luego centrifugando para remover el material no dispersado. Los autores encontraron que $d(T)_{30}$ fue el que mejor dispersó a los nanotubos y de forma más estable, utilizando esta estrategia para separar a los SWCNT de acuerdo a sus propiedades electrónicas usando cromatografía de intercambio aniónico. Basados en la misma estrategia, Hugues y col. [17] realizaron un estudio sistemático del grado de exfoliación de SWCNT con $d(G)_{15}$, $d(A)_{15}$, $d(T)_{15}$ y $d(C)_{15}$, encontrando que el orden de dispersabilidad fue $d(T)_{15} > d(C)_{15} > d(G)_{15} \gg d(A)_{15}$. En contraposición a lo anterior, medidas recientes de la energía libre de unión entre las bases de ONC de 100 residuos y SWCNT (obtenidas mediante espectroscopia de fuerza molecular) arrojaron otro orden, $d(A)_{100} > d(G)_{100} > d(T)_{100} > d(C)_{100}$ [18]. A pesar de que los resultados anteriores puedan resultar contradictorios, otros autores [19–24] concluyeron, mediante experimentos y cálculos con simulaciones computacionales, que la energía de interacción entre los nucleótidos del DNA y los CNTs es dependiente de un gran número de factores, entre los que se encuentran el largo de la cadena, la naturaleza de los nucleótidos, el solvente, el diámetro de los CNTs y su quiralidad. Esto último se debe a que la quiralidad de los nanotubos determina las propiedades electrónicas de los mismos (metálicos o semiconductores) y, en última instancia, la energía de los electrones que conforman la nube π que interacciona con los nucleótidos.

También se abordó el uso de DNA genómico, usando DNA de testículo de salmón [25–28] y esperma de pez [29] como agentes dispersantes. Como se demuestra en los trabajos, el DNA genómico actúa como un agente dispersante eficiente de los nanotubos e incluso supera el grado de exfoliación respecto a los ONC. Cathcart y col. [26] encontraron que utilizando bajas concentraciones de nanotubos, el dsDNA puede alcanzar a dispersar al 83% de los SWCNTs individualmente. Hayashida y col. [30] estudiaron la morfología y rugosidad de superficies de mica modificadas con SWCNTs dispersos con ssDNA y dsDNA y determinaron que la exfoliación con DNA genera superficies homogéneas y planas independientemente del uso de DNA de simple o doble hebra.

La exfoliación de los nanotubos por el DNA se debe a la estructura anfifílica de éste, que le permite actuar como “surfactante”. Mediciones experimentales y simulaciones computacionales [16–18,22,24,31] demostraron que el DNA se enrolla alrededor del CNT (**figura 3.4**). Este fenómeno se ve favorecido por la flexibilidad de la cadena polimérica y su tendencia natural a formar estructuras tipo hélice. La misma ocurre cuando las bases aromáticas hidrofóbicas interactúan con las paredes de los CNT vía π -stacking, mientras que el esqueleto azúcar-fosfato hidrofílico queda expuesto para interactuar con el solvente acuoso [23]. De esta manera, la estabilidad coloidal de las

dispersiones CNT-DNA se ve favorecida por la densidad de cargas negativas de los grupos fosfato que quedan expuestos sobre los nanotubos [32].

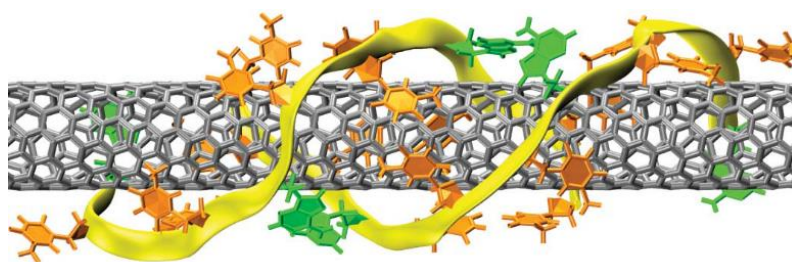


Figura 3.4. Esquema propuesto para la interacción del DNA dispersando a un nanotubo (tomado de Ref. [19]).

Un objetivo importante, fundamentalmente desde el área de la electroquímica, es el desarrollo de metodologías sencillas y reproducibles para ensamblar las dispersiones de CNT-DNA sobre sustratos sólidos. En este sentido, las mismas han sido inmovilizadas siguiendo 3 estrategias distintas:

- Deposición de la dispersión sobre sustratos conductores formando una película delgada, luego de la evaporación del solvente [29,33–35].
- Adsorción electrostática sobre un sustrato con densidad de carga positiva [36–38].
- Ensamblado sobre sustratos de Au, a través del enlace covalente S–Au, empleando DNA modificado e alguno de sus extremos con un tiol de cadena larga [39,40].

Los complejos supramoleculares de CNT con DNA han sido utilizados para desarrollar biosensores electroquímicos para la cuantificación de intercaladores [29,33], H_2O_2 [41] y proteínas [42], y como biosensor de hibridación [34,35]. Al mismo tiempo, se han reportado aplicaciones en diversos campos tales como vectores para terapias fotohipertérmicas contra el cáncer [43], estudios de citotoxicidad [44] y como refuerzo en materiales poliméricos con aplicaciones mecánicas [45,46].

En el presente capítulo se reporta por primera vez la dispersión no covalente de BCNT con dsDNA de timo de ternera con el objetivo de modificar sustratos de carbono vítreo para el desarrollo de plataformas bioactivas. Se evaluaron las ventajas de utilizar BCNT frente a los CNT multipared tipo *hollow* y se realizó un estudio crítico de la influencia de las condiciones de dispersión en el comportamiento electroquímico de GCE/BCNT-dsDNA. Con la ayuda de técnicas espectroscópicas y microscopías de alta resolución se analizó la influencia de los cambios en la morfología superficial de GCE/BCNT-dsDNA y en la estructura del dsDNA afectan que la respuesta observada.

3.2. Metodología experimental

En el presente trabajo de tesis se utilizaron MWCNT tipo *bamboo* (BCNT, NanoLabs, Lote: BPD30L15-031204) de (30 ± 10) nm de diámetro y 1–5 μm de largo y MWCNT tipo *hollow* (HCNT, NanoLabs, Lote: BPD30L15-7045) de (30 ± 15) nm de diámetro y 1–5 μm de largo. El dsDNA fue de timo de ternera (Sigma, Nro. de Catálogo: D4522), cuya longitud es ~ 50.000 pb.

Para la preparación de la dispersión de BCNT-dsDNA se mezcló 1,00 mg de BCNT con 1,00 mL de una solución de dsDNA 100 ppm en $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 50 %V/V, sonicada previamente durante 15 min en baño de ultrasonido. Luego, la mezcla se llevó a baño de ultrasonido durante un dado tiempo. Para eliminar el material no dispersado, se centrifugó durante 15 min a 9000 rpm. Con fines comparativos, se dispersó HCNT en dsDNA (HCNT-dsDNA) y BCNT en $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 50 %V/V; siguiendo el mismo procedimiento anterior.

La modificación de los GCE se llevó a cabo depositando 20 μL de la dispersión correspondiente sobre la superficie del electrodo, dejando evaporar el solvente durante 90 min a temperatura ambiente.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Respuesta electroquímica intrínseca de la dispersión

La **figura 3.5 A** (trazo negro e *inset*) muestra el perfil voltamperométrico de GCE modificado con una solución de dsDNA 100 ppm, en el cual se evidencia un pico anódico ancho y con corriente muy baja a $\sim 0,84$ V debido a la oxidación de los residuos G adsorbidos sobre el sustrato [9]. Como se indicó en la **sección 3.1.3**, la oxidación de los residuos electroactivos en dsDNA presenta corrientes bajas debido a las restricciones conformacionales de la doble hebra que limitan el acceso de los sitios electroactivos de las bases nitrogenadas [7,8,11].

Por el contrario, el perfil voltamperométrico de GCE/BCNT-dsDNA (línea azul en la **figura 3.5 A**) muestra que la corriente de oxidación de G a $(1,000 \pm 0,002)$ V es 99 veces más grande que en el caso de GCE/dsDNA. Esto sugiere que la presencia de BCNT produce una distribución o conformación distinta de los residuos electroactivos de G lo que genera un marcado incremento en la corriente anódica. Con fines comparativos, se presenta el voltamperograma cíclico de la **figura 3.5 A** (línea roja) para GCE/BCNT en el cual no se distingue ningún pico anódico indicando claramente que la señal observada en GCE/BCNT-dsDNA se debe a la oxidación del ácido nucleico.

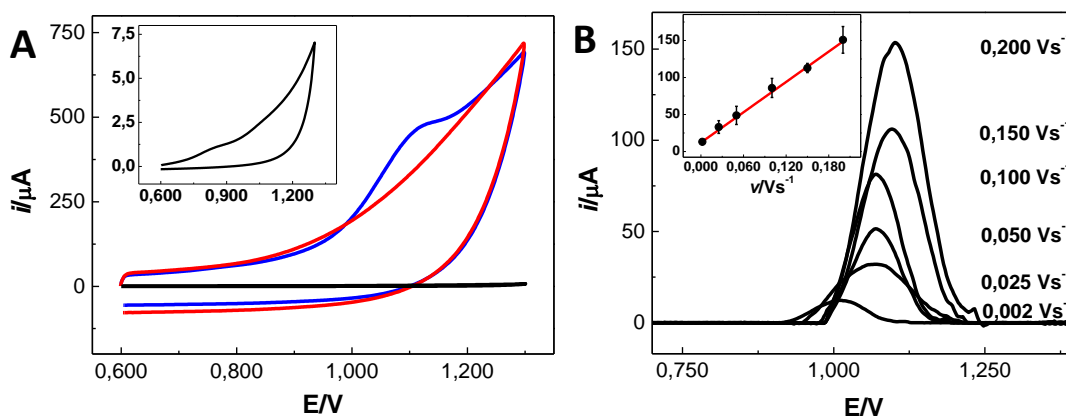


Figura 3.5. A Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE/dsDNA (—), GCE/BCNT-dsDNA (—) y GCE/BCNT (—) en *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. *Inset*: ampliación del voltamperograma sobre GCE/dsDNA. $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B Voltamperogramas de barrido lineal (con la línea de base descontada) sobre GCE/BCNT-dsDNA a distintas ν . *Inset*: variación de i_p con ν , donde los símbolos representan los valores experimentales y la línea roja, el ajuste obtenido. Electrolito soporte: *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00.

La **figura 3.5 B** muestra la dependencia de la corriente de pico de oxidación (i_p) de G sobre GCE/BCNT-dsDNA en función de la velocidad de barrido de potencial (ν). Como se indica en el *inset*, la dependencia de i_p con ν es lineal, indicando que el control del transporte de masa para la oxidación de G es adsorptivo (**ecuación 2.3**). Otros autores [47,48] reportaron también que la oxidación de las bases sobre CNTs se lleva a cabo mediante la adsorción de las mismas sobre las paredes de los nanotubos. En consecuencia, la señal de oxidación puede ser utilizada como marcador del número de contactos entre el dsDNA dispersante y BCNT, lo que en última instancia determina el grado de dispersión de los mismos. A mayor cantidad de puntos de contacto entre las bases y la superficie de BCNT mayor es i_p .

3.3.2. BCNT vs HCNT

Las diferencias en las propiedades electrocatalíticas de BCNT frente a los nanotubos tipo *hollow* (HCNT), que son los que se utilizan en la mayoría de los casos, se realizó comparando la respuesta electroquímica intrínseca de dispersiones de BCNT y HCNT con dsDNA. La **figura 3.6** muestra los perfiles voltamperométricos de GCE/BCNT-dsDNA (línea negra) y GCE/HCNT-dsDNA (línea roja) en *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00.

Sobre GCE/BCNT-dsDNA la oxidación de G ocurre a un potencial 130 mV menor que en el caso de GCE/HCNT-dsDNA y la corriente asociada es un 30% mayor (*inset* de la **figura 3.6**). Compton y col. [49] establecieron que, sobre electrodos de carbono, el factor dominante en el potencial y corriente del pico de oxidación de G es la densidad relativa de los defectos de borde respecto a los basales. En consecuencia, el incremento en la corriente de oxidación y disminución del sobrepotencial de oxidación de los

residuos de G adsorbidos sobre GCE/BCNT-dsDNA frente a la respuesta de G sobre GCE/HCNT-dsDNA se debe a la estructura tipo *bamboo*, que posee una alta densidad de defectos y mejora la transferencia electrónica de G.

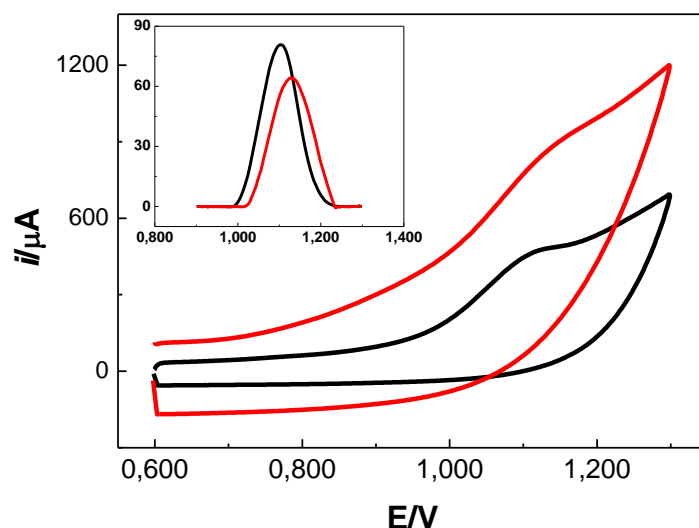


Figura 3.6. Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE/BCNT-dsDNA (—) y GCE/HCNT-dsDNA (—). Inset: picos de oxidación obtenidos sobre cada plataforma, con la línea de base descontada. Electrolito soporte: *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

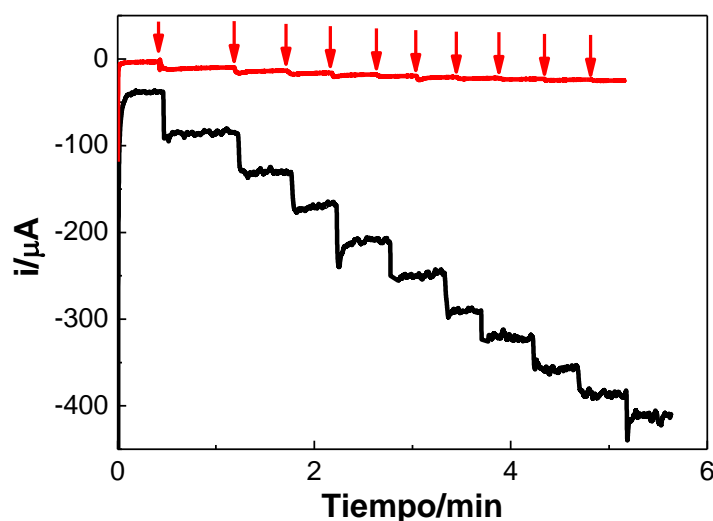


Figura 3.7. Registros amperométricos a $-0,100 \text{ V}$ para adiciones sucesivas de H_2O_2 $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ obtenidas sobre GCE/BCNT-dsDNA (—) y GCE/HCNT-dsDNA (—). Las flechas indican los agregados de H_2O_2 . Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40.

Por otro lado, se evaluó también la electroactividad de los BCNT frente a los HCNT utilizando una cupla externa neutra. En la **figura 3.7** se muestran los VC obtenidos a $-0,100 \text{ V}$ realizando agregados sucesivos de H_2O_2 $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre GCE/BCNT-dsDNA (—) y GCE/HCNT-dsDNA (—). La sensibilidad hacia H_2O_2 aumenta desde $(2,8 \pm 0,3) \times 10^3 \mu\text{A M}^{-1}$, para GCE/HCNT-dsDNA, a $(2,9 \pm 0,1) \times 10^4 \mu\text{A M}^{-1}$, para GCE/BCNT-dsDNA. Este

incremento confirma, con un marcador externo, que la mejora en las propiedades electrocatalíticas de BCNT se debe a los defectos de borde presentes a intervalos regulares en la estructura de los mismos, en acuerdo con lo reportado por otros autores [50,51] utilizando H_2O_2 , ácido ascórbico y G como sondas redox.

3.3.3. Optimización de las condiciones de dispersión

Con el fin de obtener un cubrimiento homogéneo de BCNT-dsDNA sobre GCE y una respuesta electroquímica reproducible de la plataforma, se estudió el efecto del solvente, el tiempo de sonicado y la concentración de BCNT y dsDNA en la dispersión.

3.3.3.a. Efecto del solvente y del tiempo de sonicado

La **figura 3.8** muestra imágenes SEM de las superficies de GCE (**A**) y GCE/BCNT-dsDNA (**B** y **C**) utilizando H_2O (**B**) y una mezcla $H_2O:EtOH$ 50 %V/V (**C**) como solventes de dispersión. Con ambas dispersiones se observa un cubrimiento completo de la superficie de GCE; sin embargo, existe una clara diferencia en la rugosidad y homogeneidad de las plataformas. La **figura 3.8 B** muestra una mayor cantidad de agregados de BCNT que la **figura 3.8 C**, indicando que la mezcla de solventes genera una mejor exfoliación de BCNT respecto al agua.

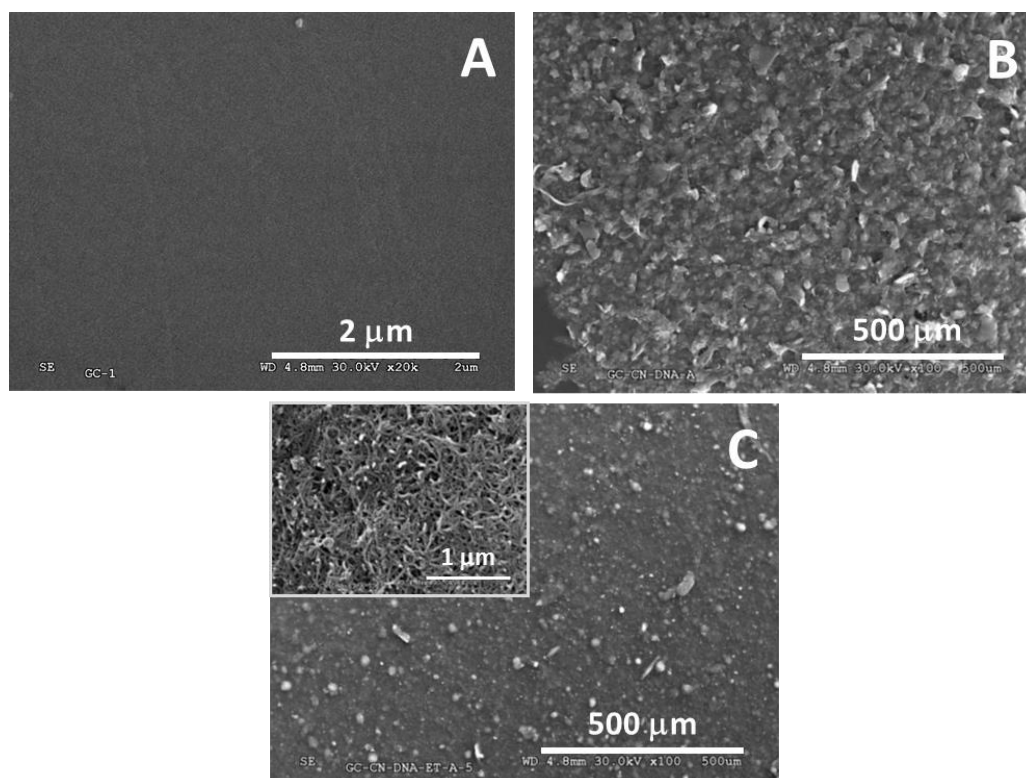


Figura 3.8. Imágenes SEM de GCE (**A**) y GCE modificado con dispersión de BCNT-dsDNA realizada en H_2O (**B**) y en $H_2O:EtOH$ 50 %V/V (**C**). Inset del panel **C** muestra una imagen a mayor magnificación.

Cheng y col. [52] estudiaron el efecto del solvente en la dispersión de SWCNT y encontraron que la dispersabilidad de los mismos disminuye en solventes con baja presión de vapor y alta densidad. En este tipo de solventes, durante el proceso de sonicado, se requiere más energía para inducir la cavitación y, por consiguiente, se libera más energía cuando las burbujas colapsan. Otros autores analizaron los cambios estructurales de polímeros sintéticos utilizados para dispersar SWCNTs [53] y MWCNTs [54] empleando diferentes solventes, y concluyeron que los solventes que favorecen la solubilidad de los polímeros mejoran la dispersión de los CNTs. Contrariamente a lo anteriormente reportado, en nuestro estudio observamos que el mejor solvente fue la mezcla de agua con etanol¹. Paralelamente, es sabido que el agregado de etanol disminuye la solubilidad del dsDNA; por lo que es claro que existe otro fenómeno que mejora la dispersabilidad de los BCNT en el solvente.

Debido a la multiplicidad de factores que afectan la estabilidad del dsDNA y la mayor complejidad en su estructura secundaria y terciaria (secciones 3.1.1 y 3.1.2), se analizó el efecto del solvente sobre el dsDNA utilizando espectroscopia UV-Vis. Los ácidos nucleicos absorben en la región UV del espectro debido a la presencia del sistema aromático de las purinas y pirimidinas. La absorción del ssDNA es mayor que la absorbancia del dsDNA, lo que se conoce como “efecto hipercrómico”. Esto se debe a que los puentes de hidrógeno entre los pb en la doble hélice limitan el comportamiento de resonancia de los anillos π de las bases, lo que se traduce en una disminución en la absorbancia a 260 nm [1,55].

En las dos primeras filas de la **tabla 3.1** se muestran las absorbancias a 260 nm (A_{260}) obtenidas a partir de espectros UV-Vis de soluciones de dsDNA utilizando H₂O y H₂O:EtOH 50 %V/V como solvente. Se puede observar que la presencia de EtOH como co-solvente provoca un incremento en la A_{260} , lo que indica que se produce desnaturalización de la doble hebra. Esta desnaturalización es parcial, dado que la A_{260} del dsDNA en H₂O:EtOH 50 %V/V (0,236) es menor que la del dsDNA desnaturalizado térmicamente (0,335).

Los resultados anteriores prueban que la desnaturalización parcial del dsDNA por efecto del solvente incrementa el grado de dispersión de los BCNT, como se pudo apreciar a partir de las diferencias en la morfología superficial de GCE modificado con BNCT-dsDNA de la **figura 3.8 B y C**. De esta manera, la mejora en la eficiencia de la exfoliación de los BNCT no está únicamente relacionada con las propiedades físicas del solvente ni con los cambios en la solubilidad del polímero, como se indica en las referencias [52–54]. En este caso dicha mejora se relaciona con los cambios que el solvente induce sobre el agente dispersante, los cuales favorecen la apertura de la doble

¹ Teniendo en cuenta que las presiones de vapor y densidades del H₂O y EtOH (a 25 °C) son 23,77 y 65,93 mmHg, y 0,997 y 0,785 g mL⁻¹; respectivamente.

hebra del DNA y de esta manera incrementa el número de puntos de contacto entre las bases que interactúan con las paredes de los nanotubos.

Tabla 3.1. Comparación de las absorbancias a 260 nm (A_{260}) obtenidas de espectros UV-Vis de soluciones de dsDNA 100 ppm, preparados en diferentes solventes y con distintos tratamientos.

<i>Solución</i>	<i>Solvente</i>	A_{260}
dsDNA	H ₂ O	0,202
dsDNA	H ₂ O:EtOH 50 %V/V	0,236
dsDNA desnaturalizado*	H ₂ O	0,335
dsDNA sonificado 15 min	H ₂ O:EtOH 50 %V/V	0,256
dsDNA sonificado 30 min	H ₂ O:EtOH 50 %V/V	0,266
dsDNA sonificado 45 min	H ₂ O:EtOH 50 %V/V	0,274

* La desnaturalización del dsDNA se realizó calentando la solución en un baño de agua en ebullición durante 10 min y luego sumergiéndola rápidamente en un baño de agua-hielo.

Por otro lado, se evaluó el efecto del tiempo de sonicado sobre el dsDNA. En las últimas 3 filas de la **tabla 3.1** se muestran los valores de A_{260} de espectros UV-Vis de soluciones de dsDNA sonicadas durante 15, 30 y 45 min. Se observa que al incrementar el tiempo de sonicado aumenta la A_{260} , lo cual indica que el tratamiento de ultrasonido provoca también desnaturalización parcial del dsDNA (A_{260} es menor que la del dsDNA desnaturalizado térmicamente). Otros autores observaron también un efecto similar sobre el dsDNA. Gladchenko y col. [56] encontraron que dsDNA extraído de eritrocitos de pollo y usado como agente dispersante de SWCNT contenía zonas de doble hebra junto con zonas de desnaturalización total.

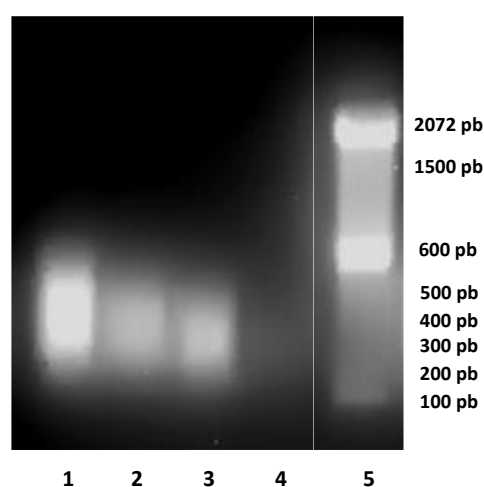


Figura 3.9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de soluciones de dsDNA 100 ppm en H₂O:EtOH 50 %V/V sonicadas 15 min (**1**), 30 (**2**), 45 min (**3**) y sin sonicar (**4**). La corrida (**5**) es la correspondiente con el marcador del tamaño de fragmentos, indicados a la derecha de la imagen.

Para corroborar si el sonicado tiene algún efecto extra sobre la estructura del DNA, se realizaron experimentos de electroforesis en gel de agarosa. La **figura 3.9** muestra una corrida electroforética en gel de agarosa de dsDNA en H₂O:EtOH 50 %V/V sin sonicar y aplicándole ultrasonido por 15, 30 y 45 min. El dsDNA de timo de ternera posee ~50.000 pb, mientras que al sonicarlo durante 15 min se observa la aparición de fragmentos entre 600 y 200 pb (**figura 3.9 1**). Al incrementar el tiempo de sonicado no hay un cambio significativo en la proporción de los distintos fragmentos ni en su peso molecular, sugiriendo que este efecto se produce al inicio del tratamiento de ultrasonido [57].

La respuesta electroquímica de la dispersión en función del tiempo de sonicado fue evaluada mediante voltamperometría cíclica. La **figura 3.10 A** muestra los registros voltamperométricos de GCE modificado con dispersión de BCNT-dsDNA sonicada durante 15 (—), 30 (—), 45 (—) y 60 min (—) min. En la misma se puede observar que al aumentar el tiempo de sonicado, la i_p para la oxidación de los residuos G incrementa hasta 45 min. Esto se debe a que al aumentar el tiempo de aplicación de ultrasonido también lo hace el grado de desnaturalización de dsDNA, aumentando los puntos de contacto entre las bases y la superficie conductora de BCNT lo que se traduce en un incremento en la dispersión de los BCNT.

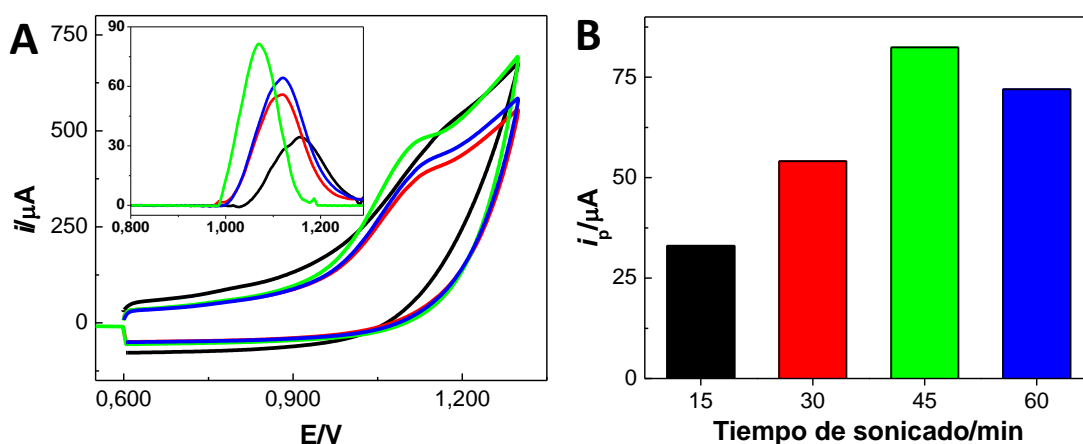


Figura 3.10. A Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE modificado con dispersiones de BCNT-dsDNA sonicadas durante 15 (—), 30 (—), 45 (—) y 60 min (—). El *inset* muestra los VC luego de descontar la línea de base. **B** i_p obtenida de los registros voltamperométricos de (A) en función del tiempo de sonicado. Electrolito soporte: *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. $\nu = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$.

A pesar de que al incrementar el tiempo de sonicado aumenta el grado de desnaturalización del DNA, luego de los 45 min de tratamiento de ultrasonido la corriente de oxidación de G disminuye ligeramente. Esto indica que existe un tiempo óptimo de sonicado y por lo tanto se seleccionó la condición de 45 min.

3.3.3.b. Efecto de la cantidad de BCNT

Otro parámetro de la dispersión a optimizar es la cantidad del nanomaterial conductor presente en la misma. En la **figura 3.11 A** se muestran los perfiles voltamperométricos obtenidos sobre GCE modificado con dispersiones BCNT-dsDNA sonicadas durante 45 min, variando la concentración de BCNT con la que se preparó la dispersión.

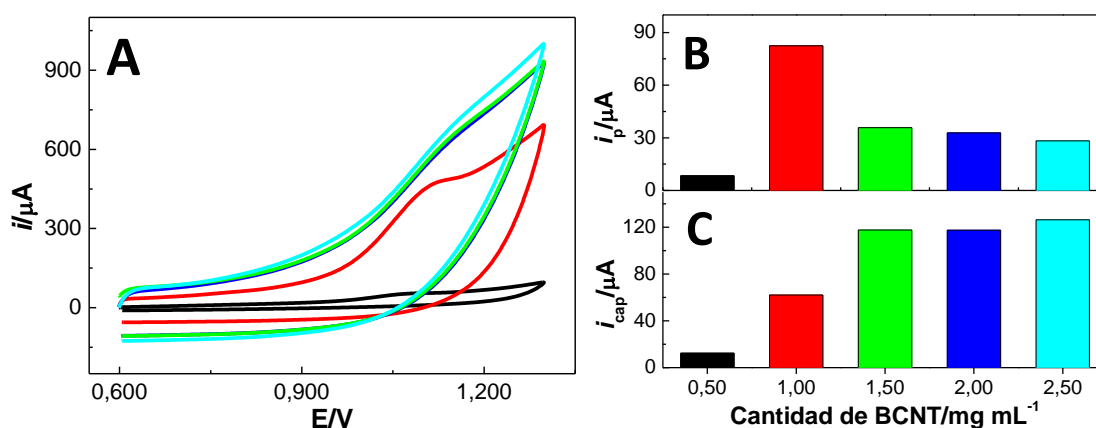


Figura 3.11. **A** Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE modificado con dispersiones de BCNT-dsDNA con cantidades crecientes de BCNT: 0,50 (—), 1,00 (—), 1,50 (—), 2,00 (—) y 2,50 mg mL⁻¹ (—). **B** i_p de los voltamperogramas de **(A)** en función de la cantidad de BCNT. **C** Corriente no faradaica (i_{cap}), medida a 0,800 V, en función de la cantidad de BCNT. Electrolito soporte: *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. $\nu = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$.

De acuerdo con el gráfico de barras mostrado en la **figura 3.11 B** se puede advertir que la i_p máxima para la oxidación de los residuos G se alcanza para una cantidad de BCNT igual a 1,00 mg mL⁻¹. Por lo tanto, manteniendo constante la concentración de dsDNA, existe una proporción óptima donde se maximizan los puntos de contacto entre las bases y la superficie de C sp² de los nanotubos, lo que asegura la exfoliación de los agregados de nanotubos [50,58]. Lo anterior se puede evaluar a partir del área electroactiva de GCE/BCNT-dsDNA dado que es proporcional a la corriente no faradaica o capacitiva de los voltamperogramas [59]. En la **figura 3.11 C** se muestra la corriente capacitiva (i_{cap} , obtenida a 0,800 V a partir de los VC mostrados en la **figura 3.11 A**) en función de la cantidad de BCNT utilizada para la dispersión. La i_{cap} incrementa hasta que la cantidad de BCNT en la dispersión es igual a 1,50 mg mL⁻¹ y luego se mantiene constante. Esto indica que la exfoliación de BCNT con dsDNA 100 ppm se produce hasta esa cantidad. La disminución en el tamaño de los agregados trae aparejado un incremento en el área expuesta de nanotubos a la solución. Por encima de 1,50 mg mL⁻¹ el agregado de mayor cantidad de material conductor no se traduce en un incremento en el área ya que el aumento de i_{cap} producto de la mayor cantidad de CNTs produce un enmascaramiento de la corriente faradaica de oxidación de G [59]. Así,

el compromiso entre incremento de área electroactiva (i_{cap}) y el de la señal de G (corriente faradaica) se logra cuando la cantidad de BCNT en la dispersión es $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.3.3.c. Efecto de la concentración de dsDNA

El efecto de la concentración de dsDNA en la dispersión de BCNT se evaluó dispersando con dsDNA 100 ppm y 200 ppm y luego modificando GCE con las dispersiones resultantes. En la **figura 3.12 A** se presentan los perfiles voltamperométricos para GCE modificado con estas dispersiones. Se puede advertir que el incremento en la concentración del agente dispersante no se traduce en un aumento en la i_p para la oxidación de G: con dsDNA 100 ppm, $i_p = 82,4 \mu\text{A}$ ($E_p = 1,101 \text{ V}$) y con dsDNA 200 ppm, $i_p = 72,2 \mu\text{A}$ ($E_p = 1,150 \text{ V}$). Esto sugiere que el aumento de la cantidad de dsDNA no se correlaciona directamente con una mejora en la dispersión de BCNT.

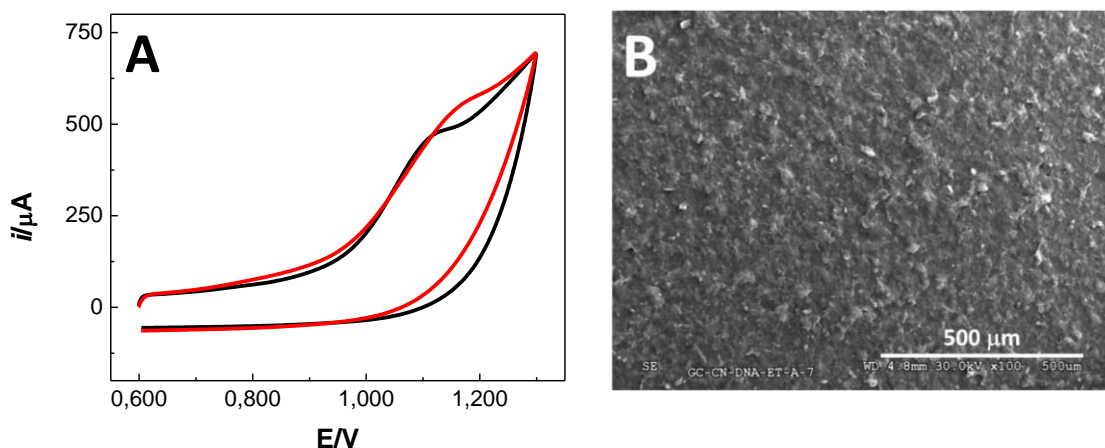


Figura 3.12. **A** Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE modificado con dispersiones de BCNT-dsDNA, utilizando dsDNA 100 (—) y 200 ppm (—). Electrolito soporte: *buffer* acetato $0,200 \text{ M}$ pH $5,00$. $\nu = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$. **B** Imagen SEM de GCE modificado con BCNT-dsDNA(200 ppm).

En efecto, la inspección de la imagen SEM de GCE/BCNT-dsDNA(200 ppm) mostrada en la **figura 3.12 B** muestra una superficie con un mayor número de agregados respecto a GCE/BCNT-dsDNA(100 ppm) (**figura 3.8 C**). Esta disminución en el grado de exfoliación conforme se incrementa la concentración de dsDNA, está relacionada con el incremento en la viscosidad de la solución y, por consiguiente, con la reducción de la efectividad en la cavitación provocada por el ultrasonido [52].

3.3.4. Arreglo del DNA en la dispersión BCNT-dsDNA

La espectroscopia FTIR es una técnica muy útil para evaluar la interacción de los biopolímeros con CNT debido a la alta sensibilidad de las señales de los mismos a los cambios conformacionales. En el espectro FTIR del DNA existen regiones espectrales

que contienen bandas de absorción marcadoras de las conformaciones de la doble hebra y de las interacciones entre las bases [60]:

- i. Región entre 1800 y 1500 cm^{-1} : corresponde a las bandas originadas por vibraciones “en el plano” de las bases nitrogenadas y es sensible al apareamiento y apilamiento de las bases.
- ii. Región entre 1250 y 1000 cm^{-1} : corresponde a las bandas originadas por vibraciones del esqueleto azúcar-fosfato y es sensible a la conformación del mismo.

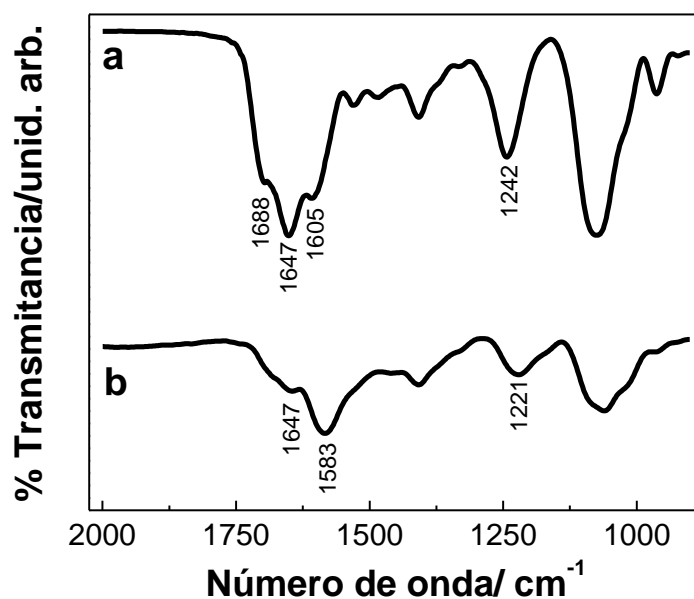


Figura 3.13. Espectros FTIR de dsDNA nativo (a) y de la dispersión de BCNT-dsDNA (b).

En la **figura 3.13** se muestran los espectros de FTIR para dsDNA nativo (a) y la dispersión BCNT-dsDNA (b). Las bandas a 1688 cm^{-1} y 1647 cm^{-1} en el espectro de dsDNA nativo (a) corresponden a la vibración del doble enlace C6=O6 de G y la vibración “en el plano” del anillo de T, respectivamente. La aparición de dichas señales a esos números de onda indica que las bases del DNA se encuentran apareadas. En el espectro correspondiente a BCNT-dsDNA (b) no se encuentra la banda a 1688 cm^{-1} , y solamente aparece una a 1647 cm^{-1} (correspondiente a una conformación de bases apareadas) y una nueva a 1583 cm^{-1} asignada a la vibración del enlace C=N del anillo de G. Esta última banda corresponde a la vibración de G no apareada y demuestra que cuando el DNA dispersa a BCNT hay desnaturalización de la doble hebra por la interacción de las bases con las paredes de los nanotubos, confirmando las conclusiones obtenidas en la sección 3.3.2. Aunque la interacción ocurre entre las bases no apareadas y la superficie de los nanotubos, existen regiones del DNA que mantienen su conformación de doble hebra, como puede observarse en el espectro (b) en la región entre 1220-1240 cm^{-1} . Estas bandas, las cuales también se encuentran presentes en el espectro del dsDNA nativo de

la **figura 3.13 a**, corresponden al estiramiento antisimétrico de los grupos PO_2^- del esqueleto y son marcadores característicos de la conformación de doble hélice (estructuras *A*, *B*- o *Z*;; ver **figura 3.2**). Estos resultados sugieren que el enrollamiento del dsDNA alrededor de BCNT presenta regiones donde las bases no se encuentran apareadas y con una fuerte interacción con las paredes de BCNT; y zonas donde se conserva la estructura de doble hélice.

La dispersión asistida por ultrasonido de BCNT con dsDNA y la presencia de etanol como co-solvente genera cambios importantes en la estructura del polímero debido a las interacciones π -stacking entre las bases nitrogenadas y las paredes de los nanotubos. Mientras se exfolian los agregados de BCNT durante el proceso de cavitación del ultrasonido, el DNA se adsorbe a través de las bases a la superficie de BCNT dejando su esqueleto hidrofílico expuesto a la solución y enrollándose a lo largo del eje longitudinal de los nanotubos. Estudios previos realizados por otros autores [56,61–63] confirman que esta interacción no covalente entre los anillos aromáticos actúa como la fuerza impulsora de la dispersión de CNT por parte del DNA, dado que reduce el área de contacto entre solvente polar y las paredes hidrofóbicas de los nanotubos.



Figura 3.14. Imagen TEM de una dispersión de BCNT-dsDNA donde se puede apreciar una molécula de dsDNA dispersando un BCNT individual. Las flechas indican el enrollamiento del dsDNA alrededor del nanotubo.

Este fenómeno de enrollamiento se puede advertir en la imagen TEM que muestra la **figura 3.14** (indicado por las flechas). Es probable que las zonas donde el DNA se encuentra desnaturalizado sean aquellas en contacto íntimo con BCNT; mientras que las porciones de la doble hebra que están más alejadas de la superficie del nanotubo correspondan a porciones intactas o parcialmente desnaturalizadas del dsDNA [63]. En este sentido, Takahashi y col. [62] estudiaron mediante AFM la

morfología de SWCNT dispersos con dsDNA de esperma de salmón y encontraron estructuras similares a las observadas en la imagen TEM de la **figura 3.14**.

3.3.5. Propiedades electroquímicas de GCE/BCNT-dsDNA

3.3.5.a. Caracterización de la respuesta electroquímica

Se estudió el comportamiento electroquímico de GCE modificados con la dispersión de BCNT-dsDNA, y sus constituyentes por separado, a través de voltamperometría cíclica empleando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M como sonda redox. La **figura 3.15** muestra los perfiles voltamperométricos obtenidos sobre GCE (—), GCE/dsDNA (—), GCE/BCNT (—) y GCE/BCNT-dsDNA (—).

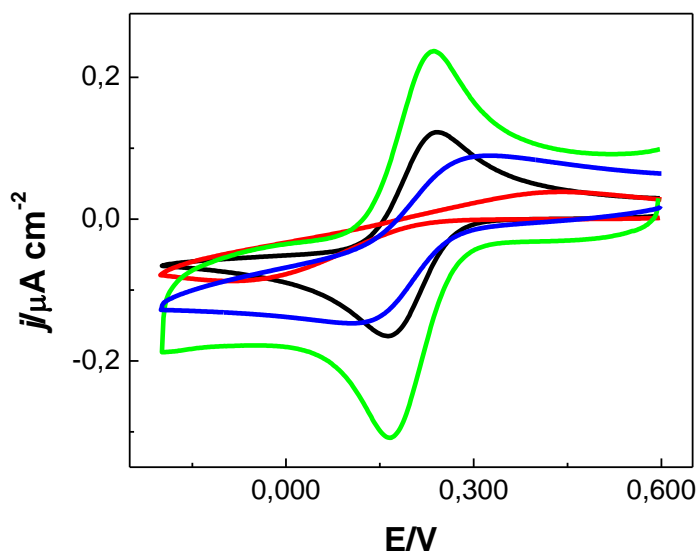


Figura 3.15. Voltamperogramas cíclicos en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M sobre GCE (—), GCE/dsDNA (—), GCE/BCNT (—) y GCE/BCNT-dsDNA (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. $\nu = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$.

Sobre GCE, el voltamperograma muestra un típico proceso de transferencia de electrones cuasi-reversible para el $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [64], con una separación de potenciales de pico (ΔE_p) de (78 ± 2) mV. Cuando la superficie se modifica con BCNT, hay un aumento del 73% en la densidad de corriente para la reducción de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ respecto a GCE, mientras que ΔE_p disminuye hasta (61 ± 2) mV [65]. Estos resultados demuestran, una vez más, que la alta densidad de defectos de borde a lo largo de la superficie de BCNT actúa como centros de electrocatalisis para el proceso de transferencia de carga. El ΔE_p obtenido sobre GCE/dsDNA es $(5,2 \pm 0,2) \times 10^2$ mV mientras que la densidad de corriente decae 46% comparado con GCE. Esto se debe a la repulsión electrostática entre la sonda redox y el esqueleto fosfato del dsDNA, ambos cargados negativamente. Por el contrario, cuando el electrodo se modifica con la dispersión de BCNT-dsDNA el ΔE_p se

reduce a (213 ± 9) mV, demostrando que, incluso en presencia del dsDNA cargado negativamente, la transferencia de electrones de la sonda mejora debido a la presencia de los defectos de BCNT acompañado por un reordenamiento de dsDNA soportado sobre los nanotubos.

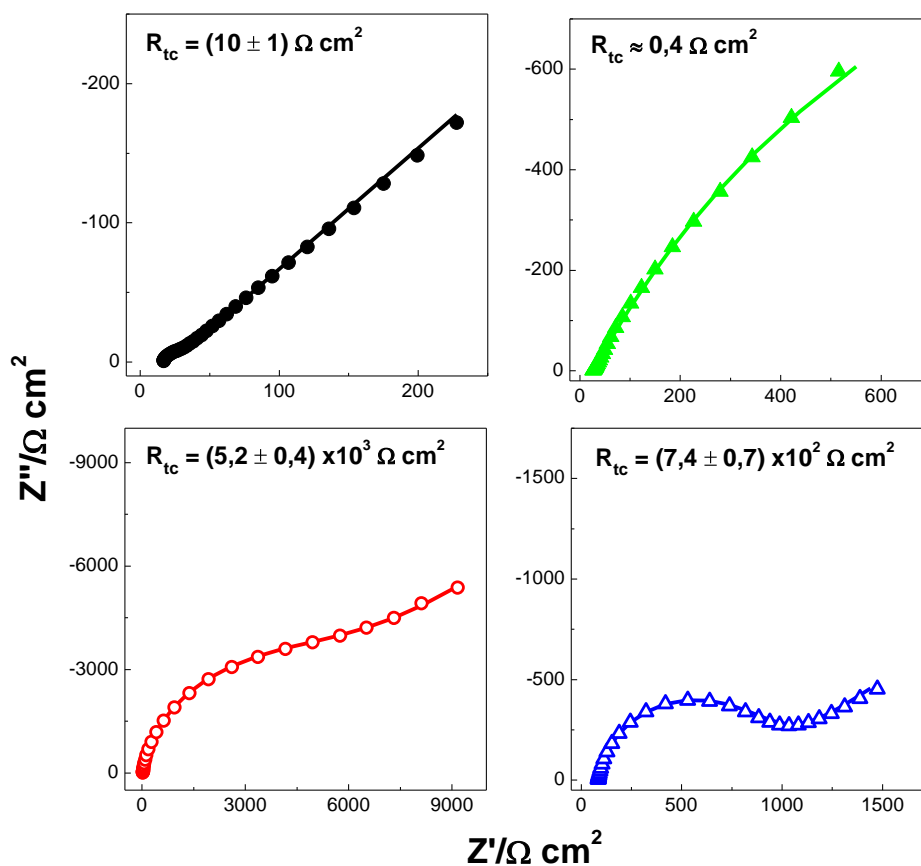


Figura 3.16. Gráficos de Nyquist para experimentos de EIE en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M sobre GCE (●), GCE/dsDNA (○), GCE/BCNT (▲) y GCE/BCNT-dsDNA (△). Potencial de trabajo: 0,200 V. Amplitud: 10 mV. Rango de frecuencias medido: $10^5 - 10^{-1}$ Hz. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. Los números en cada gráfica son los valores de resistencia a la transferencia de carga obtenidos a partir del ajuste con el correspondiente circuito equivalente.

La actividad electroquímica de las diferentes plataformas se evaluó también por EIE. La **figura 3.16** muestra los gráficos de Nyquist (normalizados por el área electroactiva de cada superficie) para GCE (●), GCE/dsDNA (○), GCE/BCNT (▲) y GCE/BCNT-dsDNA (△) en solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M. Los perfiles de Nyquist para GCE, GCE/dsDNA y GCE/BCNT-dsDNA muestran un semicírculo a frecuencias altas y medias (valores bajos de la impedancia) y, a bajas frecuencias, un aumento lineal de la impedancia. Este comportamiento puede ser modelado con el circuito Randles (**figura 2.7 B**) y el ajuste de cada uno de los espectros se muestra con trazo lleno.

A diferencia de los casos anteriores, la respuesta de GCE/BCNT (—▲) presenta un semicírculo muy pequeño a frecuencias altas (proceso de transferencia de carga) y el

proceso de difusión (dado por el elemento de circuito de Warburg) es el que domina el proceso global en el rango de frecuencias medido. Debido al pequeño valor de R_{tc} no se pudo ajustar dicho elemento de circuito con un valor razonable de confianza. Por otro lado, se observa que el elemento de Warburg está superpuesto a otra resistencia que provoca el curvamiento a frecuencias por debajo de 10 Hz. La misma surge del transporte de los iones del electrolito dentro de la película de BCNT sobre el electrodo y se debe a que dicha película formada por BCNT poco dispersos es porosa y con alto grado de hidrofobicidad. Otros autores [66,67] también encontraron comportamientos impedimétricos similares para este tipo de películas. De esta manera, el circuito utilizado para modelar la respuesta sobre GCE/BCNT (**figura 2.8 A**) posee una resistencia al transporte iónico (R_{ti}).

La R_{tc} de GCE/BCNT es muy pequeña ($\sim 0,4 \Omega \text{ cm}^2$), en consonancia con el bajo ΔE_p obtenido por voltamperometría cíclica (**figura 3.15**, línea verde). La comparación de las R_{tc} de GCE, GCE/dsDNA y GCE/BCNT-dsDNA demuestra que la presencia del dsDNA, ya sea modificando la superficie de GCE o soportado sobre BCNT, se comporta como una barrera para la transferencia de carga de la sonda redox. Utilizando los valores de R_{tc} obtenidos a través de los ajustes con los circuitos correspondientes se calcularon las constantes de transferencia heterogéneas (k_0) usando la **ecuación 2.13** [59]. Los valores de k_0 para la cupla redox sobre GCE, GCE/dsDNA y GCE/BCNT-dsDNA fueron $(2,7 \pm 0,5) \times 10^{-2}$, $(5,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ y $(3,6 \pm 0,3) \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente, lo que muestra correlación con los resultados de ΔE_p obtenidos mediante voltamperometría cíclica (**figura 3.15**).

Con el fin de evaluar la contribución de las interacciones electrostáticas y estimar adecuadamente el incremento de la R_{tc} en el caso de GCE/BCNT-dsDNA, se realizaron mediciones de EIE con soluciones de distinta fuerza iónica (mediante la adición de solución de NaCl al electrolito soporte empleado previamente). La **tabla 3.2** resume las R_{tc} , obtenidas a partir del ajuste con los circuitos correspondientes de EIE, en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre GCE, GCE/dsDNA y GCE/BCNT-dsDNA.

Tabla 3.2. Resistencia a la transferencia de carga promedio (R_{tc}) obtenidas mediante EIE en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 2,0 mM en soluciones de fuerza iónica creciente.

<i>Fuerza iónica/M</i>	<i>R_{tc}/Ω</i>		
	GCE	GCE/dsDNA	GCE/BCNT-dsDNA
0,223	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^2$	$(6,4 \pm 0,5) \times 10^4$	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^3$
0,273	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^2$	$(5,6 \pm 0,4) \times 10^4$	$(9 \pm 1) \times 10^2$
0,323	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^2$	$(5,2 \pm 0,3) \times 10^4$	$(6,8 \pm 0,8) \times 10^2$
0,373	$(0,62 \pm 0,06) \times 10^2$	$(4,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,9 \pm 0,5) \times 10^2$

En todos los casos, la disminución de R_{tc} con el aumento de la fuerza iónica se debe a la dependencia de la constante de velocidad de transferencia de carga de la cupla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ con la concentración de cationes, especialmente cuando el catión deriva de un metal alcalino. Este fenómeno se atribuye a la formación de un par iónico entre las especies hexacianoferrato y Na^+ que reduce la carga del complejo activado aniónico y favorece la transferencia de electrones [68]. La caída de R_{tc} con el aumento de la fuerza iónica observada en GCE/BCNT-dsDNA es mayor que la obtenida en GCE. Considerando que la catálisis de los iones Na^+ es un proceso homogéneo, esta disminución adicional de R_{tc} es debida al apantallamiento de las cargas negativas de los grupos fosfato del esqueleto y la consecuente disminución de las fuerzas de repulsión electrostática entre dsDNA y el par redox. Para GCE/dsDNA, la disminución de la R_{tc} es menos pronunciada que sobre GCE/BCNT-dsDNA indicando que, producto de las características de la película de dsDNA, hay un efecto de bloqueo a la transferencia de carga no sólo debido a la repulsión electrostática, sino también por actuar como barrera física. Esto confirma, una vez más, que el cubrimiento de BCNT por parte del dsDNA no es total y compacto y que hay áreas que permanecen descubiertas capaces de actuar como material de electrodo que catalizan la transferencia de carga.

3.3.5.b. Estudio de la reactividad electroquímica superficial

La electroactividad local de las plataformas se evaluó con SECM usando FcOH como sonda redox. La **figura 3.17** presenta las imágenes superficiales de GCE (**A**), GCE/BCNT (**B**), GCE/dsDNA (**C**) y GCE/BCNT-dsDNA (**D**).

Considerando que sobre GCE (**A**) la corriente normalizada es 1,25 $i_{T,\infty}$, la modificación del electrodo con BCNT dispersado en $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 50 %V/V (**B**) produce una mejora en la electroactividad de la plataforma resultante. Sin embargo, la gran variabilidad en los valores de corriente indican que la superficie posee distintas densidades de BCNT (algunos formando cúmulos o agregados). A pesar de ello, la corriente normalizada aumenta drásticamente debido al aumento en el área electroactiva y la mejor conductividad de la superficie [69].

La modificación de GCE con una película de dsDNA sonificado durante 45 min (**C**) produce una disminución de la corriente normalizada en comparación a GCE. Este comportamiento se debe a un *feedback* negativo entre el UME y el sustrato, indicando que dsDNA bloquea parcialmente la transferencia de carga de FcOH como fue demostrado en la sección anterior. Es necesario resaltar que, dado que el FcOH no tiene carga neta y el producto de oxidación es el radical catión FcOH^{*+} (por lo que se esperaría una atracción electrostática con el esqueleto azúcar-fosfato del dsDNA), la disminución de la corriente está relacionada principalmente con un efecto de bloqueo.

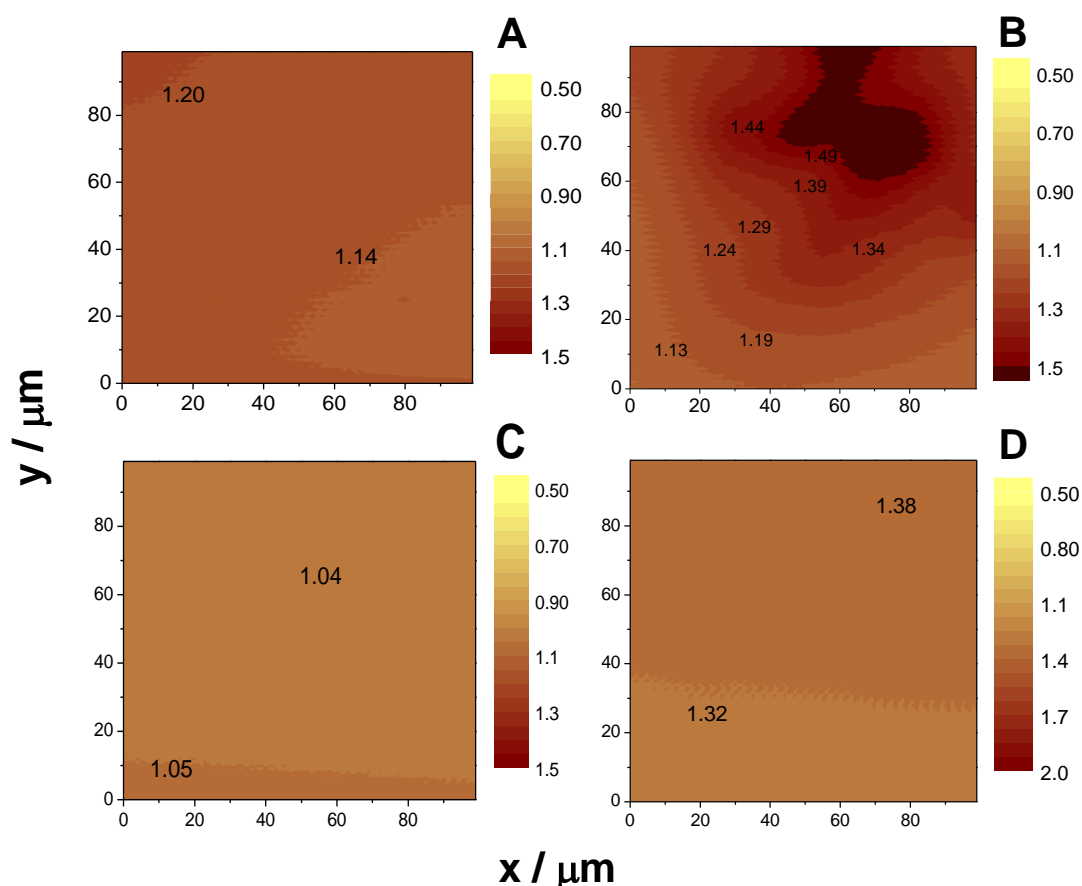


Figura 3.17. Mapeos superficiales de SECM de GCE (A), GCE/BCNT (B), GCE/dsDNA (C) y GCE/BCNT-dsDNA (D). Los números en las imágenes corresponden a los valores de corriente normalizada promedio de la zona. Condiciones experimentales: FcOH 0,50 mM, electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, $E_{UME} = 0,500$ V, $E_{sustrato} = 0,000$ V, velocidad de barrido del UME: $10 \mu\text{m s}^{-1}$.

Por el contrario, cuando la dispersión de BCNT con dsDNA se deposita sobre GCE (D), la electroactividad de la superficie es prácticamente homogénea. La corriente normalizada es ligeramente menor que la de GCE/BCNT (de acuerdo con los resultados de EIE), aunque es mayor que la de GCE/dsDNA, indicando que los nanotubos son dispersados eficientemente por el polímero y cubren la superficie del electrodo, contrarrestando el efecto de bloqueo de dsDNA [70].

3.4. Conclusiones parciales

Se logró funcionalizar eficientemente BCNT con dsDNA de manera no covalente lo que permitió una eficiente dispersión de los nanotubos. Los experimentos espectroscópicos demostraron que el tratamiento drástico para dispersar los BCNTs (sonicado por 45 min en solución de H₂O:EtOH 50 %V/V), produce desnaturalización parcial y disminución en la longitud de las cadenas de dsDNA, lo que facilita la dispersión de los nanotubos y mejora la transferencia de carga de los residuos G al electrodo. Esto

se debe a que la desnaturalización y consecuente exposición hacia la solución de las bases nitrogenadas incrementa el número de puntos de contacto entre las mismas y las paredes de los BCNT.

Luego de optimizar las condiciones de dispersión (solvente, tiempo de sonicado, cantidad de BCNT y concentración de dsDNA), se estudiaron las propiedades electroquímicas de GCE/BCNT-dsDNA. Se demostró el incremento en la electroactividad de la superficie de GCE y una respuesta electroquímica local con mayor homogeneidad cuando el dsDNA dispersa a los BCNT.

3.5. Bibliografía

- [1] R. Lavery, *Multiple Aspects of DNA and RNA: From Biophysics to Bioinformatics*, École D'Été de Physics des Houches Session LXXXII, Elsevier, 2005.
- [2] E. Paleček, *Oszillographische Polarographie der Nucleinsäuren und ihrer Bestandteile*, *Naturwissenschaften*. 45 (1958) 186–187.
- [3] E. Paleček, M. Bartošík, *Electrochemistry of Nucleic Acids*, *Chem. Rev.* 112 (2012) 3427–3481.
- [4] V. Brabec, V. Vetterl, O. Vrána, *Electrochemistry of biomacromolecules*, in: V. Brabec, D. Walz, G. Milazzo (Eds.), *Exp. Tech. Bioelectrochemistry*, 1st ed., Birkhäuser Verlag, Basel, 1996: pp. 287–359.
- [5] G. Dryhurst, G.F. Pace, *Electrochemical Oxidation of Guanine at the Pyrolytic Graphite Electrode*, *J. Electrochem. Soc.* . 117 (1970) 1259–1264.
- [6] G. Dryhurst, P.J. Elving, *Electrochemical Oxidation of Adenine: Reaction Products and Mechanisms*, *J. Electrochem. Soc.* . 115 (1968) 1014–1020.
- [7] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva, V.C. Diculescu, *Voltammetric determination of all DNA nucleotides*, *Anal. Biochem.* 332 (2004) 321–329.
- [8] I. Stempkowska, M. Ligaj, J. Jasnowska, J. Langer, M. Filipiak, *Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode*, *Bioelectrochemistry*. 70 (2007) 488–494.
- [9] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, M. Ozsoz, *Indicator-free electrochemical DNA biosensor based on adenine and guanine signals*, *Electroanalysis*. 14 (2002) 1245–1250.
- [10] M.L. Pedano, G.A. Rivas, *Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors*, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2002) 269–277.
- [11] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira Brett, S.H.P. Serrano, *On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes*, *J. Electroanal. Chem.* 366 (1994) 225–231.
- [12] M.L. Pedano, L.I. Pietrasanta, M.L. Teijelo, G.A. Rivas, *Characterization of DNA layers adsorbed on glassy carbon electrodes*, *Electroanalysis*. 20 (2008) 739–749.
- [13] M.L. Pedano, G.A. Rivas, *Adsorption and electrooxidation of nucleic acids at carbon nanotubes paste electrodes*, *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 10–16.
- [14] M.L. Pedano, G.A. Rivas, *Adsorption and Electrooxidation of DNA at Glassy Carbon Paste Electrodes*, *Anal. Lett.* 43 (2010) 1703–1712.
- [15] P. Cañete-Rosales, M. González, A. Ansón, M.T. Martínez, C. Yáñez, S. Bollo, *Electrochemical characterization of oligonucleotide-carbon nanotube functionalized using different strategies*, *Electrochim. Acta.* 140 (2014) 489–496.
- [16] M. Zheng, A. Jagota, E.D. Semke, B. a Diner, R.S. McLean, S.R. Lustig, et al., *DNA-assisted*

- dispersion and separation of carbon nanotubes., *Nat. Mater.* 2 (2003) 338–342.
- [17] J.M. Hughes, H. Cathcart, J.N. Coleman, Dispersion and Exfoliation of Nanotubes with Synthetic Oligonucleotides: Variation of Dispersion Efficiency and Oligo-Nanotube Interaction with Base Type, *J. Phys. Chem. C.* 114 (2010) 11741–11747.
- [18] S. Iliafar, J. Mittal, D. Vezenov, A. Jagota, Interaction of Single-Stranded DNA with Curved Carbon Nanotube Is Much Stronger Than with Flat Graphite, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 12947–12957.
- [19] X. Tu, S. Manohar, A. Jagota, M. Zheng, DNA sequence motifs for structure-specific recognition and separation of carbon nanotubes., *Nature.* 460 (2009) 250–253.
- [20] D. Roxbury, J. Mittal, A. Jagota, Molecular-basis of single-walled carbon nanotube recognition by single-stranded DNA, *Nano Lett.* 12 (2012) 1464–1469.
- [21] M.C. Amirani, T. Tang, A QM:MM model for the interaction of DNA nucleotides with carbon nanotubes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 7564–7575.
- [22] B. Gigliotti, B. Sakizzie, D.S. Bethune, R.M. Shelby, J.N. Cha, Sequence-Independent Helical Wrapping of Single-Walled Carbon Nanotubes by Long Genomic DNA, *Nano Lett.* 6 (2006) 159–164.
- [23] G. Sánchez-Pomales, C. Pagán-Miranda, L. Santiago-Rodríguez, C.R. Cabrera, DNA-Wrapped Carbon Nanotubes: From Synthesis to Applications, in: J.M. Marulanda (Ed.), *Carbon Nanotub.*, InTech, 2010: pp. 721–748.
- [24] F. Albertorio, M.E. Hughes, J.A. Golovchenko, D. Branton, Base dependent DNA-carbon nanotube interactions: activation enthalpies and assembly-disassembly control., *Nanotechnology.* 20 (2009) 395101.
- [25] J.N. Barisci, M. Tahhan, G.G. Wallace, S. Badaire, T. Vaugien, M. Maugey, et al., Properties of Carbon Nanotube Fibers Spun from DNA-Stabilized Dispersions, *Adv. Funct. Mater.* 14 (2004) 133–138.
- [26] H. Cathcart, S. Quinn, V. Nicolosi, J.M. Kelly, W.J. Blau, J.N. Coleman, Spontaneous debundling of single-walled carbon nanotubes in DNA-based dispersions, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 66–74.
- [27] Y. Asada, Y. Miyata, Y. Ohno, R. Kitaura, T. Sugai, T. Mizutani, et al., High-performance thin-film transistors with DNA-assisted solution processing of isolated single-walled carbon nanotubes, *Adv. Mater.* 22 (2010) 2698–2701.
- [28] R. Wang, J. Sun, L. Gao, J. Zhang, Dispersion of single-walled carbon nanotubes by DNA for preparing transparent conductive films, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 6903.
- [29] Y. Wang, H. Liu, F. Wang, Y. Gao, Electrochemical oxidation behavior of methotrexate at DNA/SWCNT/Nafion composite film-modified glassy carbon electrode, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 3227–3235.
- [30] T. Hayashida, K. Umemura, Surface morphology of hybrids of double-stranded DNA and single-walled carbon nanotubes studied by atomic force microscopy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 101 (2013) 49–54.
- [31] K. Umemura, Hybrids of Nucleic Acids and Carbon Nanotubes for Nanobiotechnology, *Nanomaterials.* 5 (2015) 321–350.
- [32] M.S. Strano, V.C. Moore, M.K. Miller, M.J. Allen, E.H. Haroz, C. Kittrell, et al., The Role of Surfactant Adsorption during Ultrasonication in the Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 3 (2003) 81–86.
- [33] W. Yan, X.C. Shen, Z.L. Zhang, C. Chen, D.W. Pang, Electrochemical Behavior of Daunorubicin at DNA/MWCNT Bioconjugates Modified Glassy Carbon Electrodes, *Anal. Lett.* 38 (2005) 2579–2595.
- [34] N.T. Thuy, P.D. Tam, M.A. Tuan, A.T. Le, L.T. Tam, V. Van Thu, et al., Detection of pathogenic microorganisms using biosensor based on multi-walled carbon nanotubes

- dispersed in DNA solution, *Curr. Appl. Phys.* 12 (2012) 1553–1560.
- [35] S. Jung, M. Cha, J. Park, N. Jeong, G. Kim, C. Park, et al., Dissociation of single-strand DNA: single-walled carbon nanotube hybrids by Watson-Crick base-pairing, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 10964–10966.
- [36] R.A. Zangmeister, J.E. Maslar, A. Opdahl, M.J. Tarlov, Adsorption Behavior of DNA-Wrapped Carbon Nanotubes on Self-Assembled Monolayer Surfaces, *Langmuir*. 23 (2007) 6252–6256.
- [37] Z. Kang, X. Yan, Y. Zhang, J. Pan, J. Shi, X. Zhang, et al., Single-Stranded DNA Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes for Microbiosensors via Layer-by-Layer Electrostatic Self-Assembly, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 6 (2014) 3784–3789.
- [38] Y. Zhang, M.A. Arugula, M. Wales, J. Wild, A.L. Simonian, A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 287–295.
- [39] G. Sanchez-Pomales, N.E. Rivera-Vélez, C. Cabrera, DNA-Wrapped Carbon Nanotubes Assembled on Gold Substrates, *ECS Trans.* 3 (2006) 21–29.
- [40] G. Sánchez-Pomales, C.R. Cabrera, Vertical attachment of DNA–CNT hybrids on gold, *J. Electroanal. Chem.* 606 (2007) 47–54.
- [41] Z. Liang, R. Lao, J. Wang, Y. Liu, L. Wang, Q. Huang, et al., Solubilization of single-walled carbon nanotubes with single-stranded DNA generated from asymmetric PCR, *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 705–713.
- [42] Z. Wu, Z. Zhen, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Terminal Protection of Small-Molecule-Linked DNA for Sensitive Electrochemical Detection of Protein Binding via Selective Carbon Nanotube Assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 12325–12332.
- [43] S. Zhou, Y. Hashida, S. Kawakami, J. Mihara, T. Umeyama, H. Imahori, et al., Preparation of immunostimulatory single-walled carbon nanotube/CpG DNA complexes and evaluation of their potential in cancer immunotherapy, *Int. J. Pharm.* 471 (2014) 214–223.
- [44] X. Gong, A.K. Sharma, M.S. Strano, D. Mukhopadhyay, Selective Assembly of DNA-Conjugated Single-Walled Carbon Nanotubes from the Vascular Secretome, *ACS Nano*. 8 (2014) 9126–9136.
- [45] S.S. Spearman, F. Irin, I. V. Rivero, M.J. Green, N. Abidi, Effect of dsDNA wrapped single-walled carbon nanotubes on the thermal and mechanical properties of polycaprolactone and polyglycolide fiber blend composites, *Polymer (Guildf)*. 56 (2015) 476–481.
- [46] A. Zinchenko, Y. Taki, V.G. Sergeev, S. Murata, DNA-Assisted Solubilization of Carbon Nanotubes and Construction of DNA-MWCNT Cross-Linked Hybrid Hydrogels, *Nanomaterials*. 5 (2015) 270–283.
- [47] J. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li, Z. Gu, Electrochemistry of DNA at Single-Wall Carbon Nanotubes, *Electroanalysis*. 16 (2004) 140–144.
- [48] M.I. Pividori, S. Alegret, DNA Adsorption on Carbonaceous Materials, in: C. Wittmann (Ed.), *Immobil. DNA Chips I*, Springer Berlin Heidelberg, 2005: pp. 1–36.
- [49] Q. Li, C. Batchelor-Mcauley, R.G. Compton, Electrochemical oxidation of guanine: Electrode reaction mechanism and tailoring carbon electrode surfaces to switch between adsorptive and diffusional responses, *J. Phys. Chem. B*. 114 (2010) 7423–7428.
- [50] M. Eguílaz, N.F. Ferreyra, G. a. Rivas, Dispersions of Hollow and Bamboo-Like Multiwalled Carbon Nanotubes in Polyethyleneimine: Critical Analysis of the Preparation Conditions and Applications for Electrochemical Sensing, *Electroanalysis*. 26 (2014) 2434–2444.
- [51] L.Y. Heng, A. Chou, J. Yu, Y. Chen, J.J. Gooding, Demonstration of the advantages of using bamboo-like nanotubes for electrochemical biosensor applications compared with single

walled carbon nanotubes, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 1457–1462.

- [52] Q. Cheng, S. Debnath, E. Gregan, H.J. Byrne, Ultrasound-Assisted SWNTs dispersion: Effects of sonication parameters and solvent properties, *J. Phys. Chem. C.* 114 (2010) 8821–8827.
- [53] T. Liu, G. Xu, J. Zhang, H. Zhang, J. Pang, Dispersion of carbon nanotubes by the branched block copolymer Tetronic 1107 in an alcohol-water solution, *Colloid Polym. Sci.* 291 (2013) 691–698.
- [54] T. V. Plisko, A. V. Bilyukevich, Debundling of multiwalled carbon nanotubes in N, N-dimethylacetamide by polymers, *Colloid Polym. Sci.* 292 (2014) 2571–2580.
- [55] M. D’Abramo, C.L. Castellazzi, M. Orozco, A. Amadei, On the nature of DNA hyperchromic effect, *J. Phys. Chem. B.* 117 (2013) 8697–8704.
- [56] G.O. Gladchenko, M. V. Karachevtsev, V.S. Leontiev, V.A. Valeev, A.Y. Glamazda, A.M. Plokhotnichenko, et al., Interaction of fragmented double-stranded DNA with carbon nanotubes in aqueous solution, *Mol. Phys.* 104 (2006) 3193–3201.
- [57] T.L. Mann, U.J. Krull, The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 945–955.
- [58] H. Cathcart, V. Nicolosi, J.M. Hughes, W.J. Blau, J.M. Kelly, S.J. Quinn, et al., Ordered DNA Wrapping Switches on Luminescence in Single-Walled Nanotube Dispersions, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 12734–12744.
- [59] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2001.
- [60] M. Banyay, M. Sarkar, A. Gräslund, A library of IR bands of nucleic acids in solution, *Biophys. Chem.* 104 (2003) 477–488.
- [61] N. Alegret, E. Santos, A. Rodríguez-Forteza, F.X. Rius, J.M. Poblet, Disruption of small double stranded DNA molecules on carbon nanotubes: A molecular dynamics study, *Chem. Phys. Lett.* 525-526 (2012) 120–124.
- [62] H. Takahashi, S. Numao, S. Bandow, S. Iijima, AFM imaging of wrapped multiwall carbon nanotube in DNA, *Chem. Phys. Lett.* 418 (2006) 535–539.
- [63] V.A. Karachevtsev, G.O. Gladchenko, M. V. Karachevtsev, V.A. Valeev, V.S. Leontiev, O.S. Lytvyn, Adsorption of poly(rA) on the carbon nanotube surface and its hybridization with poly(rU), *ChemPhysChem.* 9 (2008) 2010–2018.
- [64] N.P.C. Stevens, M.B. Rooney, A.M. Bond, S.W. Feldberg, A Comparison of Simulated and Experimental Voltammograms Obtained for the [Fe(CN)₆]^{3-/4-} Couple in the Absence of Added Supporting Electrolyte at a Rotating Disk Electrode, *J. Phys. Chem. A.* 105 (2001) 9085–9093.
- [65] S. Shanmugam, A. Gedanken, Electrochemical properties of bamboo-shaped multiwalled carbon nanotubes generated by solid state pyrolysis, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1099–1105.
- [66] X. Ren, P.G. Pickup, An impedance study of electron transport and electron transfer in composite polypyrrole + polystyrenesulphonate films, *J. Electroanal. Chem.* 420 (1997) 251–257.
- [67] Z. Li, T. Niu, Z. Zhang, R. Chen, G. Feng, S. Bi, Exploration of the specific structural characteristics of thiol-modified single-stranded DNA self-assembled monolayers on gold by a simple model, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4564–4570.
- [68] L.M. Peter, W. Dürr, P. Bindra, H. Gerischer, The influence of alkali metal cations on the rate of the Fe(CN)₆⁴⁻/Fe(CN)₆³⁻ electrode process, *J. Electroanal. Chem.* 71 (1976) 31–50.
- [69] K. González-Segura, P. Cañete-Rosales, R. Del Rio, C. Yáñez, N.F. Ferreyra, G.A. Rivas, et al., Effect of the Dispersing Agent on the Electrochemical Response of Glassy Carbon

Electrodes Modified with Dispersions of Carbon Nanotubes, *Electroanalysis*. 24 (2012) 2317–2323.

- [70] E.N. Primo, F.A. Gutierrez, G.L. Luque, P.R. Dalmasso, A. Gasnier, Y. Jalit, et al., Comparative study of the electrochemical behavior and analytical applications of (bio)sensing platforms based on the use of multi-walled carbon nanotubes dispersed in different polymers, *Anal. Chim. Acta*. 805 (2013) 19–35.

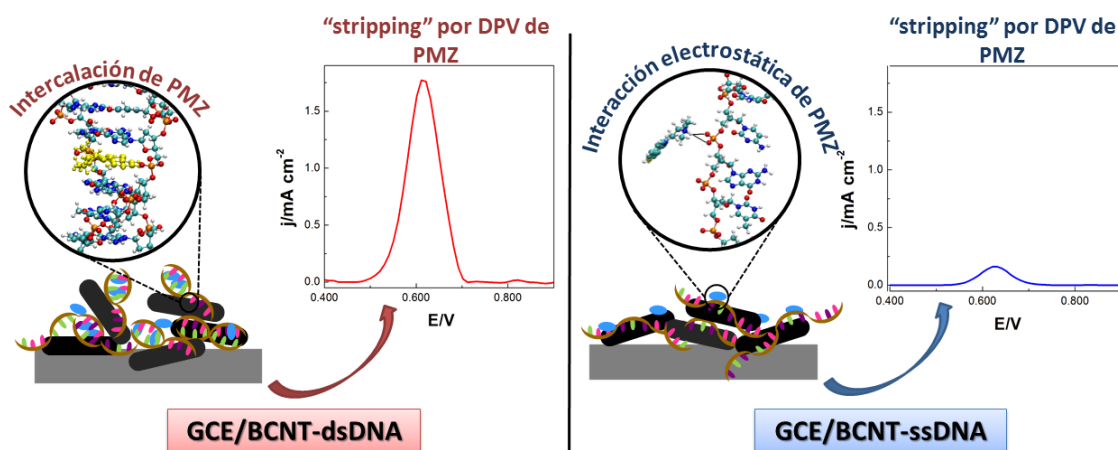
CAPÍTULO 4

Aplicaciones analíticas de GCE/BCNT-dsDNA I:

Biosensor de afinidad
para la cuantificación
de prometazina

RESUMEN

Como se demostró, los BCNT son dispersados por dsDNA mediante el enrollamiento del biopolímero alrededor de las paredes de los nanotubos. Esta modificación no covalente con el dsDNA le imparte a los BCNT propiedades particulares. En el presente capítulo se exploran las aplicaciones analíticas de la plataforma GCE/BCNT-dsDNA tomando ventaja de las propiedades de bio-reconocimiento del dsDNA. Teniendo en cuenta el tratamiento drástico que sufre el dsDNA durante la preparación de la dispersión, se evalúa si el dsDNA aún es capaz de reconocer a un intercalador de la doble hebra, la prometazina (PMZ). Se estudia la interacción entre PMZ y el dsDNA soportado sobre BCNT a partir de la actividad electroquímica de PMZ sobre GC/BCNT-dsDNA, con el objetivo de desarrollar una plataforma de bioafinidad para la cuantificación de PMZ. Con fines comparativos, se estudia el comportamiento electroquímico de PMZ sobre GCE/BNCT y GCE modificado con una dispersión de BCNT con ssDNA. La intercalación de PMZ en dsDNA y BCNT-dsDNA se confirma mediante espectroscopia UV-Vis y cálculos de dinámica cuántica a nivel *Tight Binding* basado en el funcional de densidad (DFTB). Asimismo, se utiliza la plataforma para cuantificación de PMZ en una formulación farmacéutica.



4.1. Introducción

4.1.1. Intercalación del DNA

Los compuestos que interactúan con dsDNA lo hacen a través de diferentes vías: covalentes y no covalentes. Dentro de ellas, la intercalación [1,2] es un modo de interacción no covalente que se da cuando una molécula con un grupo aromático extendido se inserta entre los pares de bases adyacentes del DNA, como se observa en la **Figura 4.1**. La interacción ocurre entre los sistemas de electrones π del anillo policíclico aromático y los anillos heterocíclicos de los pares de bases.

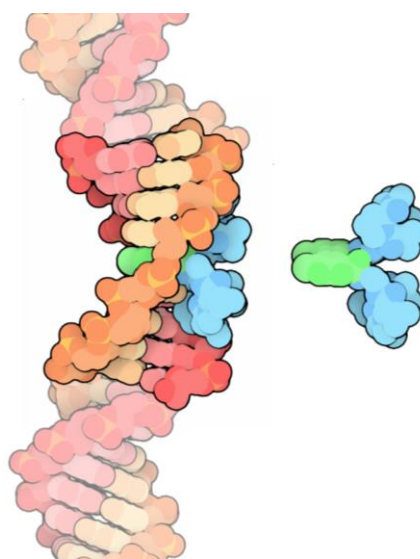


Figura 4.1. Representación de la intercalación de la una molécula con un sistema de anillos planos (en color verde) entre dos pares de DNA de doble hebra.

Si bien la estructura B- del DNA se mantiene luego del evento de intercalación por algún agente, se alteran ciertas funciones biológicas del mismo, como la capacidad de unirse específicamente a proteínas y enzimas [3]. Se debe tener en cuenta que el fenómeno de intercalación no provoca la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las bases [4].

El proceso de intercalación puede esquematizarse como se muestra en la **Figura 4.2**. El valor de la constante de equilibrio K_{Int} dependerá del tipo y magnitud de las interacciones que establezca la molécula con el DNA. En términos generales, el valor de K_{Int} es mayor al aumentar la cantidad de anillos conjugados, la presencia de grupos ionizables de carga positiva (los cuales generan atracciones coulombicas con los grupos fosfato del esqueleto del DNA) y de grupos sustituyentes voluminosos capaces de unirse a los surcos del DNA [5].

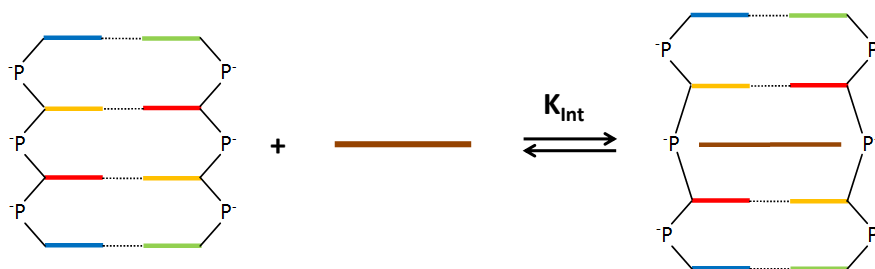


Figura 4.2. Esquema que representa la interacción entre un intercalador y una porción de DNA. Las líneas de color verde, amarillo, azul y rojo representan las bases del dsDNA, las letras P⁻ a los grupos fosfato, y la línea marrón al intercalador.

La intercalación produce cambios en los ángulos de torsión azúcar-fosfato de manera de acomodar el compuesto aromático, causando la separación de los pares de bases con un alargamiento de la doble hélice de aproximadamente 3.4 Å y disminución de la torsión helicoidal [6]. Esto genera un incremento de la viscosidad (debido a que la molécula se hace más rígida), de la temperatura de *melting* de la doble hebra, y cambios en el coeficiente de sedimentación del DNA [3].

El proceso de intercalación tiene amplias aplicaciones terapéuticas y los intercaladores a menudo se utilizan como fármacos en el tratamientos contra el cáncer y también para tratar las infecciones microbianas y parasitarias [7]. Por otra parte, los agentes intercaladores también se utilizan como sonda para estudiar la estructura y los cambios morfológicos de los ácidos nucleicos [3,4].

4.1.2. Intercalación como herramienta electroanalítica

Los métodos electroquímicos permiten estudiar las interacciones entre diversas biomoléculas y complejos orgánicos e inorgánicos con el DNA. Esto se lleva a cabo analizando los cambios en las señales de oxidación de las bases del DNA o del agente intercalador, si éste es electroactivo [8-11].

La **figura 4.3** muestra el esquema más utilizado para la detección del evento de intercalación. En el mismo, un intercalador electroactivo (**figura 4.3 A**) se acumula en un electrodo modificado con dsDNA (**figura 4.3 C**). Así, la señal específica del intercalador se ve incrementada, en comparación con una débil respuesta electroquímica para el mismo compuesto obtenido con el electrodo sin dsDNA. Esta metodología es posible siempre que el intercalador pueda ser oxidado o reducido sobre la superficie del electrodo. En caso que el mismo no posea señal redox, la detección se debe realizar a través de los cambios en la señal de oxidación intrínseca de las bases del dsDNA debido a la intercalación (**figura 4.3 B vs. C**) o de otras alternativas que pongan de manifiesto los cambios que tienen lugar [12].

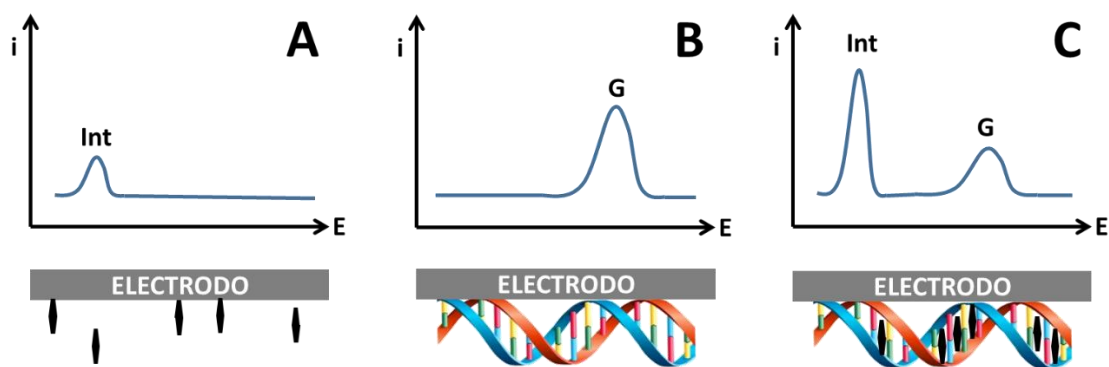


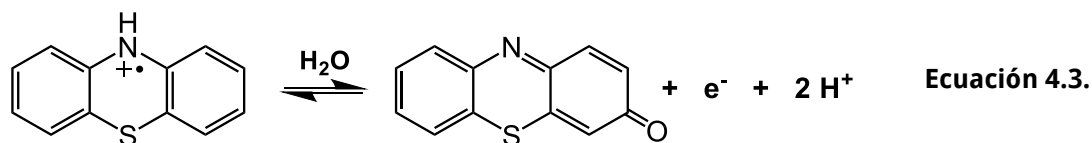
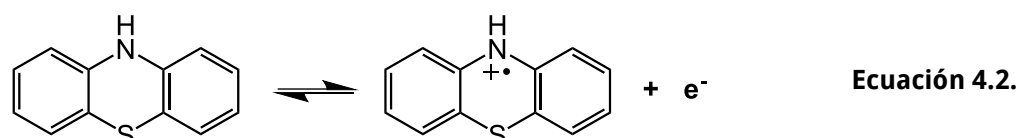
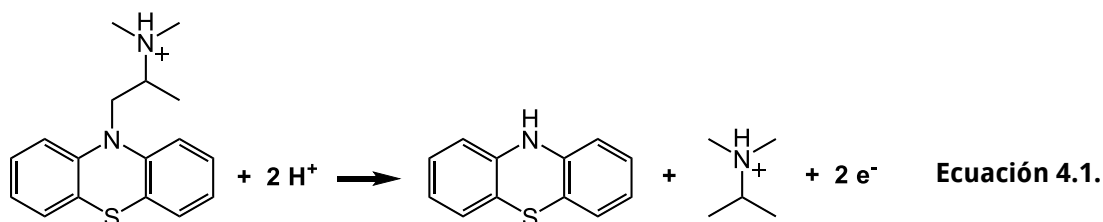
Figura 4.3. Esquema representativo del modo general en el que se detecta electroquímicamente el evento de intercalación. El intercalador electroactivo (A) posee una acumulación facilitada sobre el electrodo modificado con dsDNA (C) que incrementa notablemente su señal electroquímica, en comparación a su señal sobre el electrodo sin modificar. La detección de la intercalación también se puede llevar a cabo debido a cambios en las señales de oxidación de las bases nitrogenadas del dsDNA (B) cuando se acumula el intercalador (C).

Entre algunas de las estrategias reportadas en bibliografía, Wang y col. [13] dispersaron láminas de MoS₂ con tionina y luego modificaron GCE para desarrollar un biosensor de dsDNA. Dado que la tionina es capaz de intercalarse en el dsDNA, utilizaron la disminución en su señal de oxidación como señal analítica para la cuantificación del DNA. En otro ejemplo, Sato y col. [14] sintetizaron un intercalador “enhebrante” electroactivo modificando una molécula de naftaleno diimida con dos grupos Fc. Este tipo de intercaladores posee una mayor afinidad por el dsDNA gracias a los grupos laterales que interactúan con los surcos del DNA. Los autores pudieron discriminar, a partir de la intensidad de corriente para la oxidación de los grupos Fc, el daño provocado al dsDNA a partir de la metilación de las bases. En otra estrategia, Boon y col. [15] utilizaron al azul de metileno como agente intercalante para detectar mutaciones y desapareamiento de bases en la secuencia del gen p53. La detección electroquímica se llevó a cabo reduciendo el azul de metileno intercalado, el cual fue reoxidado debido a la presencia de [Fe(CN)₆]³⁻ generando un ciclo catalítico que incrementó la sensibilidad de la metodología.

4.1.3. Prometazina

La prometazina (PMZ) deriva de un grupo de compuestos llamados fenotiazinas y es considerada un neuroléptico débil. Por otro lado, bloquea los receptores H1 de la histamina en el cuerpo, por lo que también se la utiliza como antihistamínico. De esta manera, se indica para tratar los síntomas de alergia como picazón, secreción nasal, estornudos, picazón, urticaria y erupciones cutáneas. También previene la cinetosis y se usa para tratar las náuseas y vómitos o dolor después de una cirugía, por lo que se la indica como sedante suave.

Desde el punto de vista electroquímico, la PMZ es un compuesto electroactivo y su mecanismo de reacción [16] sobre superficies carbonáceas se esquematiza en las **ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3**. El mismo consta de una primera etapa irreversible de escisión de la cadena lateral (**ecuación 4.1**) y la generación del núcleo fenotiazina. Este heterociclo sufre dos reacciones reversibles (a potenciales menores que los del primer proceso irreversible): la formación del radical catión fenotiazinio (**ecuación 4.2**) y la reacción de éste para dar la quinona 3-H-fenotiazin-3-ona (**ecuación 4.3**).



Algunos estudios de mediadores de la década de los 80 [17–19] sugirieron que el radical catión fenotiazinio, obtenido de la oxidación enzimática de PMZ, podía interactuar irreversiblemente intercalando en el DNA. A partir de esto se han reportado diversas metodologías que permiten la cuantificación de PMZ en formulaciones farmacéuticas a partir de la interacción entre la molécula y electrodos modificados con DNA. Algunas de las metodologías propuestas fueron la modificación de NP de Au con dsDNA [20] y la acumulación de dsDNA sobre electrodos de pasta de carbono [21], de diamante dopado con boro [22], carbono vítreo [23] y electrodos modificados con CNTs [24,25]. A pesar de las diversas aplicaciones basadas en la intercalación de PMZ, no se han realizado hasta la fecha estudios sistemáticos de esta interacción con el dsDNA y tampoco se ha reportado el efecto que tiene la estrategia de inmovilización del dsDNA en su capacidad de ser intercalado.

En este capítulo se discute la capacidad del dsDNA soportado sobre los BCNT de ser intercalado por la PMZ mediante espectroscopia UV-Vis validada por simulaciones de los espectros, empleando cálculos de dinámica cuántica a nivel DFTB. Mediante el empleo de técnicas electroquímicas (VC y DPV siguiendo la estrategia de *stripping* de adsorción con cambio de medio) se obtuvo información acerca de las interacciones de

PMZ con la dispersión de BCNT-dsDNA, a través de la comparación con la respuesta obtenida sobre GCE modificado con BCNT y BCNT-ssDNA. En último lugar se presentan las aplicaciones analíticas de la plataforma para la cuantificación del intercalador en una formulación farmacéutica.

4.2. Metodología

4.2.1. Experimental

4.2.1.a. Preparación de la dispersión y modificación de GCE

La dispersión de BCNT-dsDNA y modificación de GCE se llevó a cabo de la manera descrita en la **sección 3.2**. Con fines comparativos, se dispersó BCNT con una solución de ssDNA 100 ppm preparada en H₂O:EtOH 50 %V/V de la misma manera que BCNT-dsDNA.

4.2.1.b. Modificación del cuarzo

La espectroscopia UV-Vis se implementó para evaluar la intercalación de PMZ en el DNA. Los experimentos se llevaron a cabo en una celda de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. Para el estudio de la interacción de PMZ-dsDNA y PMZ-ssDNA en solución se mezcló una solución de PMZ con soluciones de dsDNA y ssDNA 100 ppm preparadas en *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. En el caso de la interacción entre PMZ y la dispersión se requirió de un paso previo de inmovilización de BCNT-dsDNA. Para ello se activó el cuarzo de acuerdo al procedimiento indicado en la **sección 2.10.1** y luego se ensambló una solución de quitosano cuaternario 0,50 mg mL⁻¹ con el fin de revertir las cargas negativas de los grupos silicato del cuarzo activado. A continuación, se ensambló durante 60 min la dispersión BCNT-dsDNA sobre el cuarzo derivatizado positivamente con el quitosano. En todos los casos, los espectros UV-Vis se tomaron luego de 5 min de interacción (para emular las condiciones de *stripping* de adsorción por DPV), entre 200 y 600 nm.

4.2.2. Computacional

El modelado molecular es una herramienta poderosa para analizar las interacciones de sistemas biomoleculares, como las de los ácidos nucleicos con otros compuestos. El tratamiento de estos sistemas complejos requiere del uso de métodos de mecánica molecular, los cuales presentan bajo costo computacional y buena precisión. Sin embargo, en estos métodos la descripción de la estructura electrónica de estas macromoléculas se considera constante a lo largo de la simulación y es imposible

describir las propiedades ópticas o los procesos de transferencia de carga. Para ello, es necesario utilizar métodos basados en la química cuántica.

A pesar de lo anterior, el estudio de la intercalación de ciertos compuestos con dsDNA a nivel atomístico es una tarea difícil de abordar para la química cuántica, ya que es necesaria una descripción exacta de las interacciones intermoleculares débiles, como los puentes de hidrógeno y el *stacking* de los pares de bases en la doble hebra. En las últimas décadas, la teoría del funcional de la densidad (DFT) ha sido una de las herramientas más usadas para representar la estructura electrónica de una amplia variedad de sistemas moleculares dada la exactitud de estos cálculos en comparación con los métodos *ab-initio*, de mayor costo computacional. Sin embargo, la DFT tiene algunos inconvenientes ya que su formalismo no describe correctamente las fuerzas de dispersión de London, responsables del "*stacking*" de las bases en el DNA. Si bien esta deficiencia puede ser superada fácilmente mediante la introducción de un término empírico correctivo (DFT-D), la convergencia de las energías de interacción es bastante lenta y es necesario utilizar un conjunto de base grande que a su vez limita significativamente el tamaño del sistema. En el presente trabajo de Tesis, y con el objetivo de describir la intercalación de PMZ en un oligómero de dsDNA, se utilizó un enfoque alternativo denominado *Self Consistent Charges Density Functional Tight-Binding* con corrección empírica para las energías de dispersión (SCC-DFTB-D) [26].

El método SCC-DFTB se basa en la expansión de segundo orden del funcional de energía de Kohn-Sham, respecto a la densidad electrónica de referencia de los átomos neutros [27]. Los elementos de la matriz Hamiltoniana se obtienen según la **ecuación 4.4**,

$$H_{\mu\nu} = \langle \varphi_{\mu} | \hat{H}_0 | \varphi_{\nu} \rangle + \frac{1}{2} S_{\mu\nu} \sum_k (\gamma_{ik} + \gamma_{jk}) \Delta q_k \quad \text{Ecuación 4.4.}$$

donde φ_{μ} y φ_{ν} representan los orbitales atómicos de las especies i y j , respectivamente; $\langle \varphi_{\mu} | \hat{H}_0 | \varphi_{\nu} \rangle$ son los elementos de matriz del Hamiltoniano no SCC-DFTB dentro de la parametrización de Slater-Koster. El término $S_{\mu\nu} = \langle \varphi_{\mu} | \varphi_{\nu} \rangle$ es la matriz de solapamiento y $\Delta q_k = q_k - q_k^0$ es la diferencia entre la carga del átomo aislado q_k^0 y la carga q_k cuando el átomo k está formando parte del sistema, obtenida mediante el análisis de poblaciones de Mulliken. γ es una función que depende de la separación interatómica, donde la contribución de las interacciones de los electrones se tiene en cuenta implícitamente. Por otro lado, se agrega un término suplementario a la energía electrónica (**ecuación 4.5**) que da cuenta de las fuerzas de dispersión:

$$E = E_{DFTB} - \sum_{ij} f(R_{ij}) \frac{C_{ij}}{R_{ij}^6} \quad \text{Ecuación 4.5.}$$

donde $f(R_{ij})$ es una función de amortiguación que permite obtener un balance entre las fuerzas atractivas y repulsivas de corto alcance, C_{ij} son coeficientes empíricos que dependen de las polarizabilidades atómicas y R_{ij} es la distancia entre los átomos i y j .

Se utilizó el código DFTB+ [28] para la optimización de las geometrías moleculares, el cálculo de la matriz Hamiltoniana y de solapamiento en la base de orbitales atómicos de Slater, y la matriz inicial de densidad de un solo electrón en la base de orbitales moleculares. Para los cálculos realizados en el presente trabajo de tesis se utilizó el conjunto de parámetros *mio-1-1* para los elementos H, O, N, C, P y S [27,29,30].

Este método se extiende al SCC-DFTB dependiente del tiempo (TD-DFTB) con el objetivo de obtener las propiedades de los estados excitados del sistema [31–33]. Se han propuesto diversas estrategias para la implementación de la TD-DFTB utilizando tanto la teoría de respuesta lineal como dinámicas electrónicas no lineales. En el presente trabajo se efectuó la propagación de la matriz densidad de un solo electrón en lugar de la función de onda de las partículas. Este método fue implementado exitosamente para calcular los espectros de absorción de pigmentos fotosintéticos [31,34] y de moléculas orgánicas adsorbidas sobre nanopartículas de TiO₂ [35]. Los mismos demostraron que los espectros de absorción basados en la TD-DFTB presentan mejor correlación con los experimentales que aquellos calculados a través de la TD-DFT.

Para calcular el espectro de absorción de PMZ y dsDNA se debe aplicar una perturbación al sistema y registrar la evolución temporal de la matriz densidad monoeléctronica. Esta perturbación consiste en una delta de Dirac aplicada a la matriz de densidad inicial del estado basal. Después de la aplicación del pulso, la misma evoluciona en el tiempo y dicha evolución puede ser calculada integrando la ecuación de Liouville-von Neumann (**ecuación 4.6**) en función del tiempo:

$$\frac{\partial \hat{\rho}}{\partial t} = [S^{-1} \hat{H} [\rho] \hat{\rho} - \hat{H} [\rho] \hat{\rho} S^{-1}] \quad \text{Ecuación 4.6.}$$

donde $\hat{\rho}$ es la matriz de densidad de un solo electrón, S es la matriz de solapamiento y \hat{H} es el Hamiltoniano de SCC-DFTB. Cuando el campo eléctrico aplicado es pequeño, el sistema responde linealmente, y el momento dipolar viene dado por la **ecuación 4.7**:

$$\mu(t) = \int \alpha(t - \tau) E(\tau) d\tau \quad \text{Ecuación 4.7.}$$

donde $\alpha(t - \tau)$ es la polarizabilidad a lo largo del eje donde se aplica el campo eléctrico externo $E(\tau)$. El espectro de absorción del sistema es proporcional a la parte imaginaria de la polarizabilidad dependiente de la frecuencia ω (**ecuación 4.8**), obtenida a partir de

la transformada de Fourier del momento dipolar dependiente del tiempo y luego de la deconvolución con el campo eléctrico aplicado.

$$\alpha(\omega) = \frac{\mu(\omega)}{E(\omega)} \quad \text{Ecuación 4.8.}$$

Los cálculos de los espectros de absorción fueron realizados por la Dra. M. Belén Oviedo, del grupo del Prof. Dr. Cristián Gabriel Sánchez, en un trabajo en colaboración. En las simulaciones de dinámica cuántica se utilizó un octámero de dsDNA cuya secuencia fue 5'-d[CCTCGTCC]-3'. El sitio de intercalación se localiza entre el cuarto y quinto par de bases. La estructura minimizada de partida fue obtenida de la *Protein Data Bank* a partir de la secuencia intercalada por daunomicina, luego de lo cual esta molécula fue removida y reemplazada por PMZ. La **figura 4.4** muestra la estructura del octámero con y sin la PMZ intercalada.

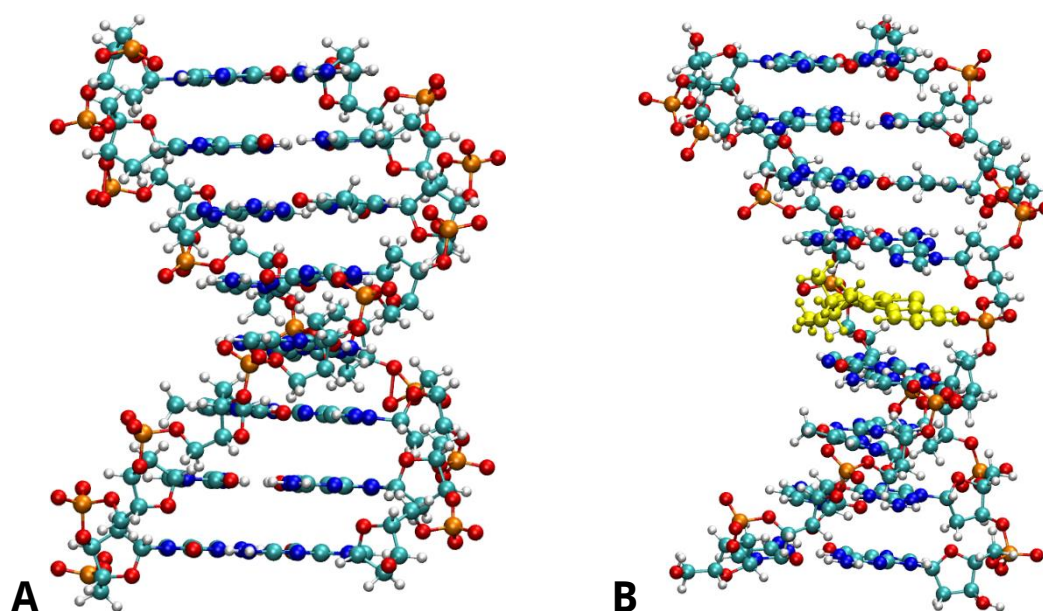


Figura 4.4. Estructuras optimizadas del oligonucleótido 5'-d[CCTCGTCC]-3' (**A**) y del oligonucleótido con la PMZ intercalada entre el cuarto y quinto pb (**B**). Cian: C; rojo: O; blanco: H; azul: N; naranja: P; amarillo: PMZ.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Comportamiento electroquímico de PMZ

La **figura 4.5** muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE (—) y GCE modificado con BCNT (—), BCNT-dsDNA (—) y BCNT-ssDNA (—) en solución de PMZ $1,00 \times 10^{-4}$ M preparada en *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. El perfil voltamperométrico

de PMZ sobre GCE (mostrado en más detalle en el *inset*) exhibe, en el barrido directo, dos procesos anódicos, el primero a $(0,638 \pm 0,002)$ y el segundo a $(0,81 \pm 0,01)$ V, asociados a la escisión irreversible de la cadena lateral y a la formación del radical-catión fenotiazinio (**ecuación 4.1**) [16].

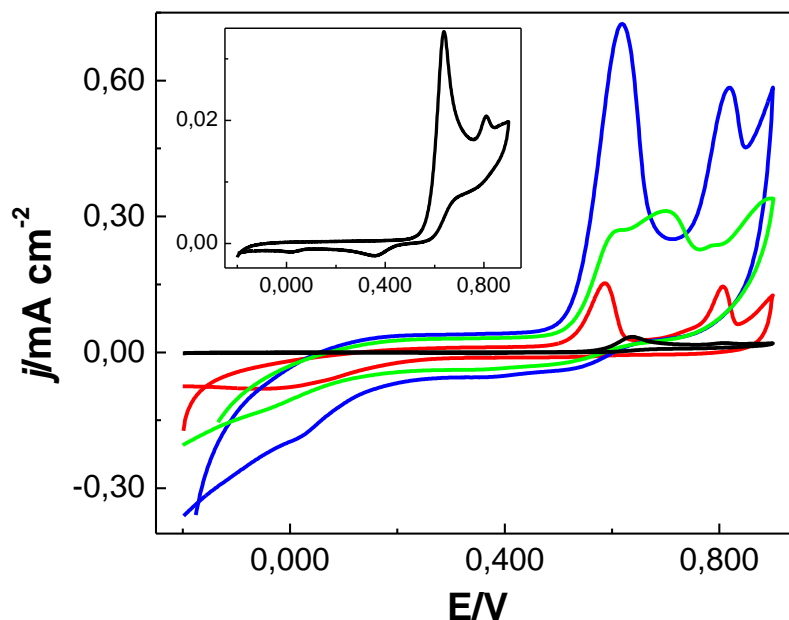


Figura 4.5. Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE (—) y GCE modificado con BCNT (—), BCNT-dsDNA (—) y BCNT-ssDNA (—) en solución de PMZ $1,00 \times 10^{-4}$ M. Electrolito soporte: *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. $\nu = 0,010$ V s^{-1} . *Inset*: ampliación del voltamperograma cíclico sobre GCE.

En el barrido inverso de potencial aparecen dos picos catódicos, uno a $(0,386 \pm 0,003)$ V y otro a $(0,038 \pm 0,004)$ V, asociados a los procesos reversibles del radical-catión fenotiazinio (**ecuaciones 4.2 y 4.3**) [16]. Experimentos de VC realizados revirtiendo el barrido a 0,700 V no modificaron la aparición de los procesos catódicos lo que indica que estos procesos de reducción sólo dependen del producto de oxidación de la PMZ generado a 0,638 V.

Sobre GCE/BCNT (**figura 4.5**, trazo rojo) se observa una disminución en el sobrepotencial del primer proceso de oxidación respecto a GCE ($(0,58 \pm 0,06)$ vs. $(0,638 \pm 0,002)$ V) y también un incremento de 4,1 veces en la densidad de corriente asociada. Esto se debe a las propiedades electrocatalíticas de los BCNT, ya discutidas en el capítulo anterior (**sección 3.3.2**). El perfil voltamperométrico de PMZ sobre GCE/BCNT-dsDNA (**figura 4.5**, trazo azul) muestra un incremento aún mayor en la densidad de corriente (19,7 y 4,9 veces más grande que sobre GCE y GCE/BCNT, respectivamente) indicando que hay una transferencia de carga facilitada y/o una mayor acumulación de la molécula sobre la superficie del electrodo modificado. Para estudiar el efecto de la presencia del dsDNA en la respuesta electroquímica de PMZ, se evaluó su respuesta sobre GCE

modificado con una dispersión de BCNT con ssDNA (**figura 4.5**, trazo verde). Se puede observar en el perfil j-E un pico de corriente ancho que involucra varios procesos anódicos, con densidades de corriente mayores que las obtenidas sobre GCE/BCNT pero mucho menores que las alcanzadas sobre GCE/BCNT-dsDNA. Estos múltiples procesos electroquímicos se pueden atribuir a la reacción del radical catión fenotiazinio con las bases libres del ssDNA que dispersa a BCNT, ya que dicho radical presenta alta tendencia a reaccionar con las bases nitrogenadas desapareadas [17].

Con el objetivo de dilucidar el mecanismo de transferencia de carga de PMZ sobre las distintas plataformas, se estudió el efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la respuesta de voltamperometría cíclica.

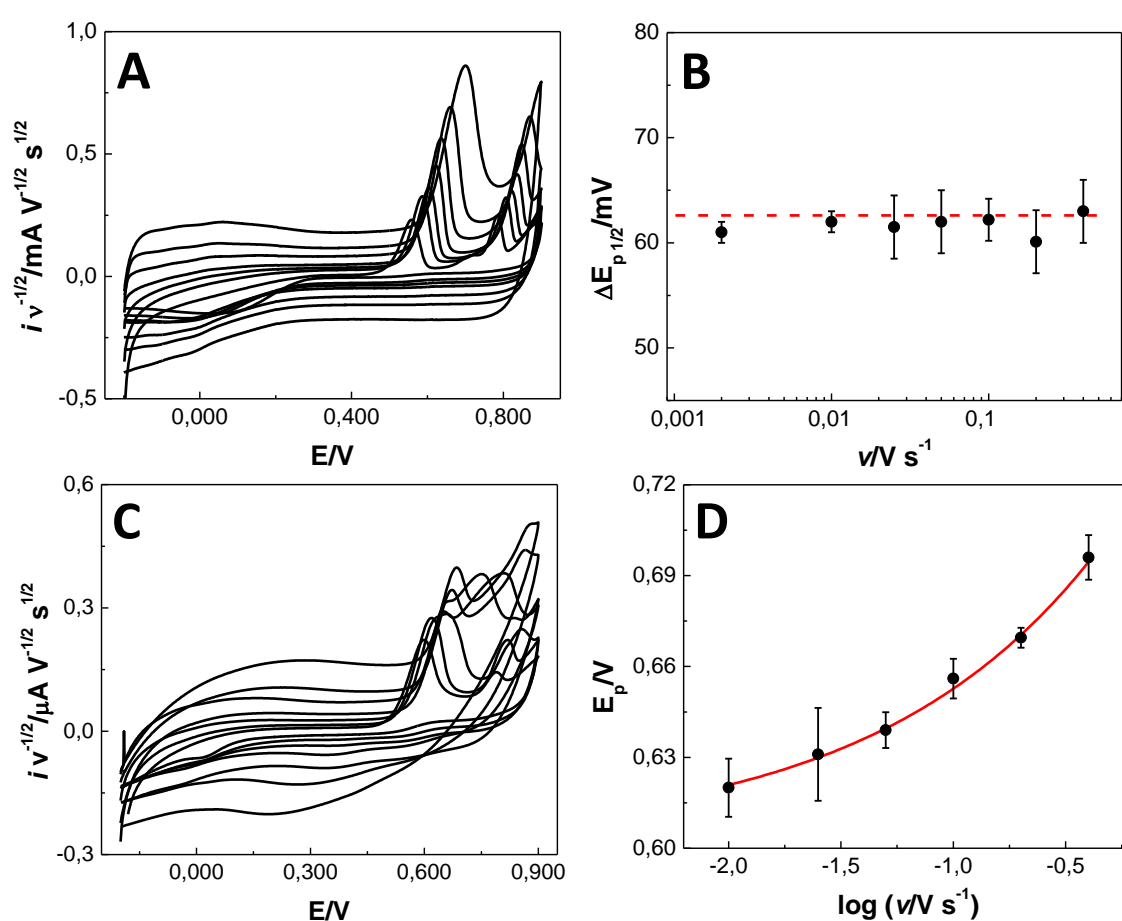


Figura 4.6. **A** Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE/BCNT en solución de PMZ $1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ a distintas velocidades de barrido: 0,002; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200 y $0,400 \text{ V s}^{-1}$. **B** Variación del ancho de medio pico ($\Delta E_{p/2}$) con ν para el primer proceso anódico de PMZ sobre GCE/BCNT. La línea roja muestra el valor de $\Delta E_{p/2}$ para la oxidación irreversible controlada por adsorción. **C** Voltamperogramas cíclicos obtenidos sobre GCE/BCNT-dsDNA en solución de PMZ $1,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ a distintas velocidades de barrido: 0,002; 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200 y $0,400 \text{ V s}^{-1}$. **D** Variación del potencial de oxidación (E_p) con ν para el primer proceso anódico de PMZ sobre GCE/BCNT-dsDNA. La línea roja muestra el ajuste según un mecanismo de difusión en capa delgada. Los voltamperogramas **A** y **C** fueron normalizados por $\nu^{1/2}$ para mejor visualización. Electrolito soporte: *buffer* acetato $0,200 \text{ M}$ pH 5,00.

Dado que los fenómenos de transferencia de masa y carga son altamente dependientes de la escala de tiempo utilizada en voltamperometría (**sección 2.1**), variando este parámetro y analizando los cambios en los perfiles i-E se obtiene información mecanística de la reacción. En la **figura 4.6 A** se muestran los perfiles voltamperométricos (normalizados por $\nu^{1/2}$) sobre GCE/BCNT obtenidos en una solución de PMZ $1,00 \times 10^{-4}$ M a distintas ν . En la **figura 4.6 B** se grafica la dependencia del ancho de medio pico ($\Delta E_{p\ 1/2}$) con ν para el primer proceso anódico de PMZ. Para cualquier velocidad se observa que $\Delta E_{p\ 1/2}$ es constante y aproximadamente igual a 62,5 mV, lo cual se ajusta a un mecanismo de oxidación irreversible controlado por adsorción (**sección 2.1.2**).

De la misma manera, se estudió el proceso de transferencia de carga sobre GE/BCNT-dsDNA. En la **figura 4.6 C** se presentan los perfiles voltamperométricos (normalizados por $\nu^{1/2}$) de PMZ $1,00 \times 10^{-4}$ M sobre GCE/BCNT-dsDNA a distintas ν . La dependencia del potencial del primer pico anódico de PMZ con $\log \nu$ (**figura 4.6 D**) corresponde al comportamiento de una cupla redox controlado por difusión en capa fina (**sección 2.1.3**). Estos resultados indican que PMZ interactúa fuertemente con la película de dsDNA que se encuentra dispersando a BCNT más que con éstos últimos. El comportamiento redox observado es similar al encontrado en otras moléculas electroactivas confinadas en una película delgada de polímero [36,37].

En el caso de GCE/BCNT-ssDNA, no fue posible obtener E_p con un grado de certeza razonable para todas las ν medidas debido a la convolución de los múltiples picos de oxidación de PMZ. A pesar de esto, queda claro que el origen de las diferencias en los mecanismos electroquímicos de PMZ sobre GCE/BCNT, GCE/BCNT-dsDNA y GCE/BCNT-ssDNA es la presencia de la doble/simple hebra del DNA y las distintas interacciones que se establecen con PMZ.

Con el fin de analizar sólo la fracción de PMZ que interactúa con las distintas plataformas y eliminar la contribución de las moléculas que difunden desde el seno de la solución, se realizaron experimentos de *stripping* de adsorción con cambio de medio y detección por DPV (**sección 2.2.1**).

En la **figura 4.7** se muestran los perfiles de DPV obtenidos sobre GCE modificado con BCNT (**A**), BCNT-dsDNA (**B**) y BCNT-ssDNA (**C**) luego de la acumulación de PMZ $5,00 \times 10^{-6}$ M por 5 min y posterior cambio de medio. Se puede observar que la mayor densidad de corriente anódica para PMZ, en consonancia con los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica, se obtiene sobre GCE/BCNT-dsDNA.

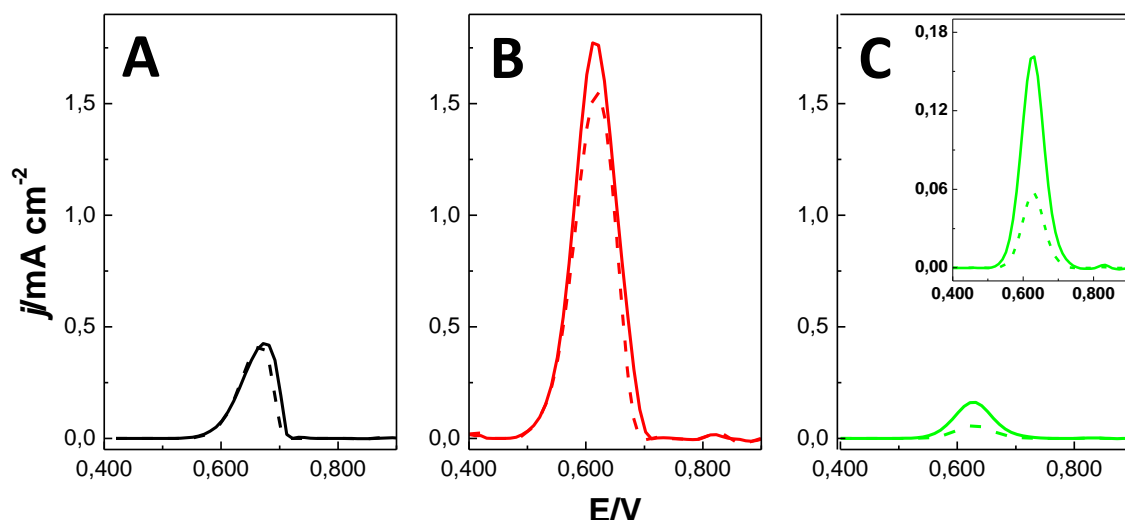


Figura 4.7. Perfiles j - E obtenidos por voltamperometría de pulso diferencial (con sustracción de línea de base) sobre GCE modificado con BCNT (A), BCNT-dsDNA (B) y BCNT-ssDNA (C) luego de acumular PMZ $5,00 \times 10^{-6}$ M por 5 min al o.c.p. y posterior lavado con *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00 (trazo lleno) ó con dicho *buffer* y solución de NaCl 0,200 M (trazo discontinuo). Electrolito soporte: *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00. El inset del panel C muestra una ampliación de la respuesta DPV sobre GCE/BCNT-ssDNA.

Puesto que el DNA tiene densidad de carga negativa, es esperable que se establezca una interacción electrostática atractiva entre PMZ ($pK_a = 9,10$) con ss o dsDNA. Sin embargo, en el caso de la interacción entre PMZ y el dsDNA soportado sobre BCNT debe haber otra contribución, además de la electrostática, que es responsable del importante aumento en la densidad de corriente obtenido sobre esta plataforma. Con el fin de estudiar este comportamiento, se evaluó el efecto de la fuerza iónica (f.i.) en la interacción de PMZ llevando a cabo experimentos de *stripping* de adsorción en idénticas condiciones a las anteriores pero adicionando al *buffer* de enjuague una solución de NaCl 0,200 M (f.i. = 0,200 M). Los perfiles de DPV correspondientes se muestran, para las 3 plataformas, en la **figura 4.7** con las líneas en trazo discontinuo. Sobre GCE/BCNT-dsDNA y GCE/BCNT-ssDNA se advierte una disminución en la densidad de corriente de oxidación debido a que el medio de lavado de alta f.i. produce la eliminación de PMZ que interacciona electrostáticamente con el DNA.

En la **tabla 4.1** se muestran las densidades de corriente de pico (j_p) para los perfiles de DPV mostrados en la **figura 4.7**. Se puede constatar que la disminución de j_p para GCE/BCNT luego de lavar con solución de f.i. elevada fue sólo del 2%. Esto se debe a que las moléculas de PMZ se adsorben a través del sistema de anillos conjugados sobre las paredes de $C sp^2$ de BCNT mediante interacciones hidrofóbicas π -*stacking*, las cuales son invariantes a las concentración de sal del electrolito de lavado. Por otro lado, sobre BCNT-ssDNA la densidad de corriente anódica de PMZ adsorbida disminuye un 59% al enjuagar con el medio de mayor f.i., evidenciando que el modo de interacción principal de PMZ sobre el ssDNA soportado sobre los BCNT es de tipo electrostático. Sobre BCNT-

dsDNA, la reducción en la densidad de corriente es sólo del 11% reforzando la conclusión de que, aunque las fuerzas electrostáticas juegan algún rol en la interacción entre PMZ y BCNT-dsDNA, las fuerzas de van der Waals son las principales responsables de la mayor acumulación frente a las otras plataformas.

Tabla 4.1. Efecto de la solución de lavado de GCE/BCNT, GCE/BCNT-dsDNA y GCE/BCNT-ssDNA conteniendo PMZ acumulada.

	$j_p/\text{mA cm}^{-2}$ ^a		Disminución porcentual ^b
	<i>Lavado con buffer acetato</i>	<i>Lavado con buffer acetato + NaCl 0,200 M</i>	
GCE/BCNT	0,425 ± 0,009	0,415 ± 0,009	2%
GCE/BCNT-dsDNA	1,77 ± 0,03	1,55 ± 0,05	11%
GCE/BCNT-ssDNA	0,16 ± 0,02	0,057 ± 0,002	59%

^a Densidades de corriente de pico (j_p) obtenidas de los perfiles de DPV de la **figura 4.7**. ^b Calculado como $(j_{p, \text{buffer}} - j_{p, \text{NaCl}}) 100 / j_{p, \text{buffer}}$.

4.3.2. Análisis del proceso de intercalación

4.3.2.a. Espectros de absorción experimentales vs cálculos teóricos

Con el objetivo de evaluar críticamente la intercalación de PMZ en dsDNA, se realizaron estudios mediante espectroscopia UV-Vis y se modelaron los mismos a partir de cálculos de dinámica cuántica en el nivel de teoría de la DFTB. La **figura 4.8** compara los espectros UV-Vis de dsDNA (**A**) y PMZ (**C**) con los calculados por el método de TD-DFTB descrito en la **sección 4.2.2 (B y D)**, para dsDNA y PMZ, respectivamente). El espectro experimental de dsDNA muestra una banda ancha a 260 nm, que corresponde a la convolución de las transiciones electrónicas $\pi - \pi^*$ de las 4 bases que lo componen [38]. El espectro calculado muestra un perfil similar pero con un corrimiento batocrómico del máximo de absorción de aproximadamente 7 nm, respecto del observado experimentalmente (**figura 4.8 B**). Esta fenómeno se atribuye a la diferencia en tamaño entre el DNA utilizado para el cálculo (oligómero de 8 pb) y el dsDNA de timo de ternera (de longitud aproximada de 50.000 pb), dado que la gran cantidad de pares de bases produce muchas interacciones π -stacking que estabilizan el estado electrónico fundamental del DNA y aumentan la energía de excitación electrónica.

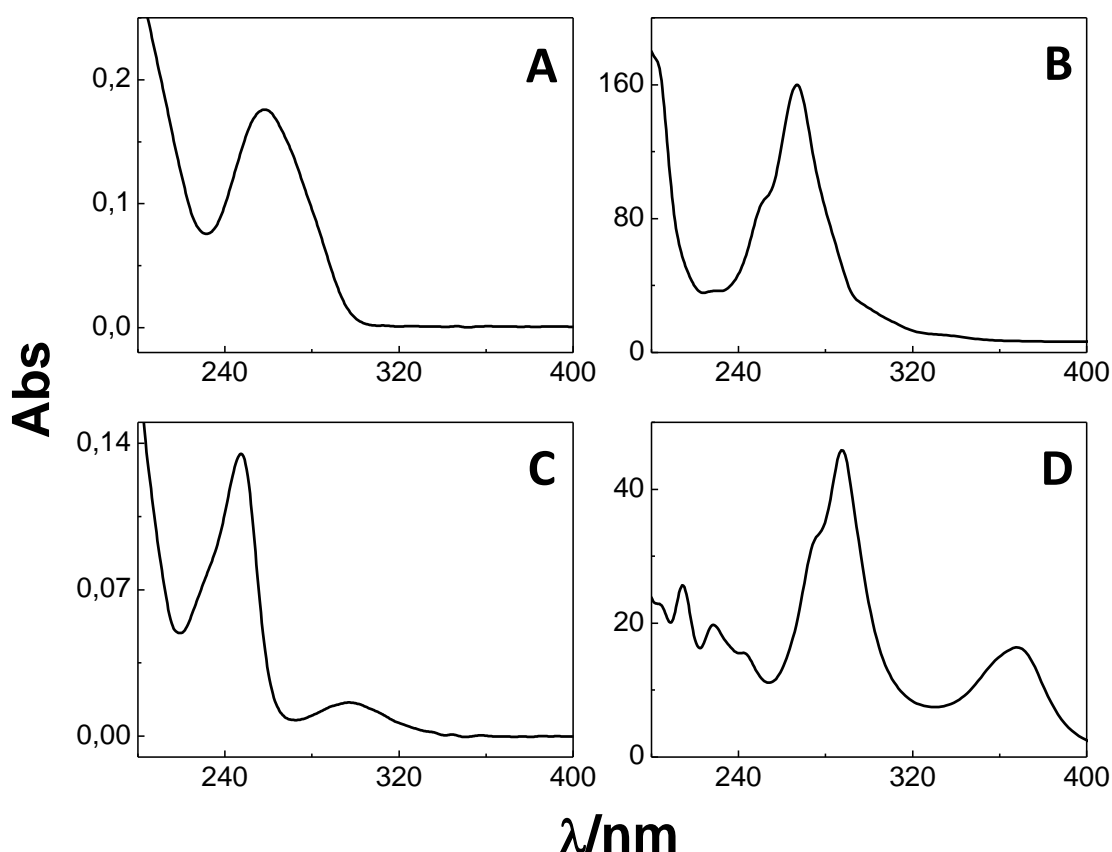


Figura 4.8. Espectro de absorción experimental para una solución de dsDNA 100 ppm (A) y de PMZ $5,0 \times 10^{-5}$ M (C); y espectros calculado según la metodología descrita en la **sección 4.2.2** para el oligómero (B); y para una molécula de PMZ (D).

El espectro experimental de PMZ (**figura 4.8 C**) muestra dos bandas de absorción, a 249,8 nm y 298,5 nm. Al comparar el espectro experimental con el calculado (**figura 4.8 D**), la longitud de onda de máxima absorción se desplaza hacia el rojo en aproximadamente 68 nm. Esta discrepancia puede ser atribuida a dos factores: i) el hecho de que el espectro de absorción teórico de PMZ se calculó en el vacío mientras que el espectro experimental se obtuvo en *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00, donde el solvente tiene cierto efecto de estabilización sobre el estado basal de la molécula; ii) la subestimación del método de TD-DFTB en la energía de excitación. Para confirmar que esta subestimación es inherente a la metodología y no está relacionada con la parametrización del método, se comparó este resultado con aquel obtenido por el método estándar de TD-DFT al nivel B3PW91/6-31 + G(d) implementado en el paquete de programa de Gaussian 09 [39]. Con esta metodología se constató que la segunda banda de absorción de PMZ aparece a 397,3 nm, siendo este valor mayor al experimental por 99 nm, lo que indica que la TD-DFT exhibe menos exactitud que la TD-DFTB.

Es importante remarcar que el principal interés del presente trabajo de Tesis radica en analizar los cambios relativos cualitativos de los espectros de absorción, de

manera de complementar los resultados experimentales para evaluar la intercalación de PMZ en dsDNA. Dado que la intercalación consiste en el π -stacking entre la molécula y dos pares de bases adyacentes del dsDNA, la principal variación en el espectro de absorción de PMZ se da en la banda de absorción asociada a la transición electrónica π - π^* de la molécula (la densidad de probabilidad de los orbitales moleculares π y π^* calculados se muestran en la **figura 4.9**).

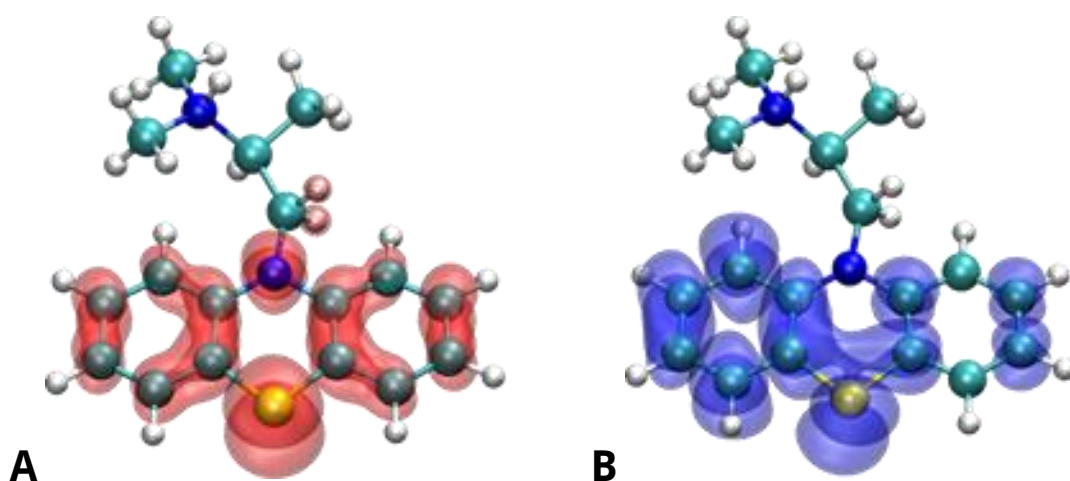


Figura 4.9. Esquemas de la densidad de probabilidad de los orbitales moleculares involucrados en la transición electrónica de menor energía de PMZ (367 nm) correspondientes al HOMO (A) y LUMO+1 (B).

A fin de evaluar la intercalación de PMZ en el dsDNA, se obtuvo el espectro UV-Vis experimental para una solución de PMZ $5,00 \times 10^{-5}$ M en presencia de dsDNA. Debido a la superposición de bandas de absorción de PMZ y dsDNA, el espectro de dsDNA se restó al de la mezcla, ya que sus propiedades ópticas no varían por la presencia del intercalador. La **figura 4.10 A** muestra la región del espectro de PMZ alrededor de 300 nm (a) y las señales de PMZ en presencia de dsDNA (b) y ssDNA (c), luego de sustraer los espectros de dsDNA y ssDNA puros, respectivamente. Al interactuar con el dsDNA, la longitud de onda de máxima absorción de PMZ se desplaza de 298,5 a 302,0 nm y la absorbancia disminuye ligeramente. Este desplazamiento puede atribuirse al cambio en la constante dieléctrica efectiva en el entorno próximo de la molécula (cuando se compara con el de PMZ libre en solución), lo que produce una disminución en la energía de los electrones π y el consiguiente desplazamiento batocrómico en el espectro de PMZ. Como se muestra en la **figura 4.10 A,c**, prácticamente no se observan cambios en el espectro de PMZ en presencia de ssDNA. Esto indica que no hay variaciones en las propiedades ópticas del intercalador cuando el DNA se encuentra en su estructura de simple hebra.

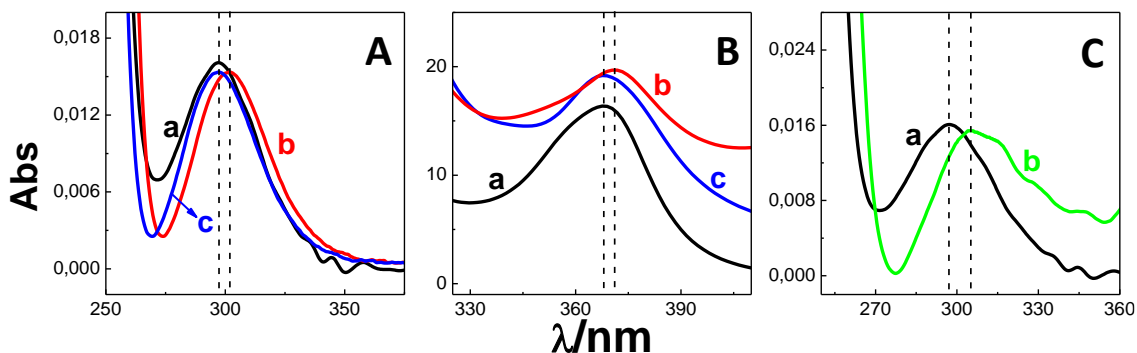


Figura 4.10. **A** Espectros de absorción experimentales para una solución de PMZ $5,00 \times 10^{-5}$ M (**a**) y los espectros sustraídos para PMZ luego de 5 min de interacción con una solución de dsDNA 100 ppm (**b**) y ssDNA 100 ppm (**c**). **B** Espectros de absorción calculados mediante la metodología TD-DFTB para PMZ (**a**), PMZ + oligómero doble hebra (**b**) y PMZ + oligómero simple hebra. **C** Espectros de absorción experimentales para una solución de PMZ $5,00 \times 10^{-5}$ M (**a**) y el espectro sustraído para PMZ M luego de 5 min de interacción con la dispersión BCNT-dsDNA inmovilizada sobre la cubeta de cuarzo (**b**). Las líneas discontinuas verticales representan la posición de los máximos de absorción.

La **figura 4.10 B** exhibe los espectros teóricos de PMZ libre (**a**) e intercalada en el oligómero (**b**). Como se puede observar, hay un desplazamiento en el máximo de absorción de 367,6 a 370,4 nm, en consonancia con los resultados experimentales. Este comportamiento es similar al observado con otros intercaladores [40–42] y prueba claramente que PMZ puede ser intercalada en el dsDNA. Por el contrario, en el espectro de la **figura 4.10 B,c**, que muestra la banda de absorción de la PMZ que interacciona con ssDNA, no se evidencia ningún cambio en la banda a 367,6 nm respecto al espectro teórico de PMZ libre. En este caso, la PMZ interacciona con la simple hebra de DNA, principalmente, a través de fuerzas electrostáticas entre el grupo amonio de la cadena lateral y los grupos fosfato del esqueleto. La estructura optimizada PMZ-ssDNA con la que se realizaron los cálculos de dinámica cuántica se ilustra en la **figura 4.11**.

El panel **C** de la **figura 4.10** muestra el espectro obtenido luego de la interacción de PMZ durante 5 min con la dispersión BCNT-dsDNA inmovilizada sobre la cubeta de cuarzo. El mismo muestra un desplazamiento batocrómico en el máximo de absorción de 298,5 nm a 305,2 nm (**figura 4.10 C,a vs b**). Al igual que en el caso anterior, este corrimiento de 6,7 nm a longitudes de onda mayores corrobora que la PMZ intercala en las porciones de doble hebra del DNA soportado sobre la superficie de BCNT. De esta manera, se demuestra que existe una contribución neta de la intercalación en la acumulación de PMZ sobre BCNT-dsDNA. La comparación de los espectros de PMZ intercalada en el dsDNA nativo y en BCNT-dsDNA muestra un mayor desplazamiento del máximo de absorción en el segundo caso, atribuido a los diferentes ambientes donde se encuentra PMZ (dsDNA libre en solución frente al dsDNA dispersando a BCNT) que produciría cambios adicionales en la constante dieléctrica efectiva de los alrededores de la molécula.

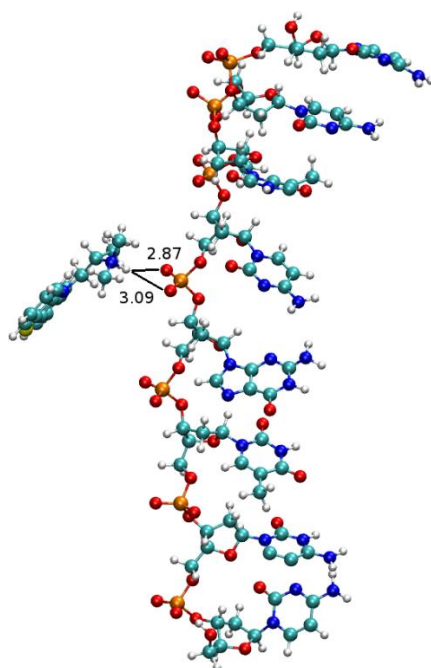


Figura 4.11. Estructuras optimizadas de una hebra 5'-d[CCTCGTCC]-3' interaccionando con la cadena lateral cargada positivamente de una molécula de PMZ, a través de uno de los grupos fosfato. Cian: C; rojo: O; blanco: H; azul: N; naranja: P; amarillo: S.

4.3.2.b. Cambios en la capacitancia de las plataformas

Dado que las dispersiones de nanotubos de carbono depositadas sobre un electrodo forman una película porosa que permite el flujo de electrolito y solvente, es posible examinar la naturaleza de las interacciones entre PMZ y BCNT y/o dsDNA a través del estudio de las propiedades interfaciales de las plataformas. Por lo tanto, la capacitancia específica de la doble capa (C) puede utilizarse para caracterizar la superficie accesible en estos materiales porosos. La **tabla 4.2** muestra las capacitancias obtenidas en *buffer* acetato en ausencia y en presencia de PMZ sobre GCE modificado con BCNT, BCNT-dsDNA y BCNT-ssDNA. La C obtenida sobre GCE/BCNT se correlaciona con valores reportados previamente para otros electrodos basados en CNT [43]. Cuando se dispersan los BCNT, ya sea con ssDNA ó con dsDNA, se produce un aumento en la C de ambas plataformas respecto a GCE/BCNT, confirmando la formación de una capa más porosa sobre el electrodo debido a una mejor exfoliación de los nanotubos. Es ampliamente conocido que al incrementar la porosidad de un sustrato electroactivo en contacto con un electrolito, la C también aumenta [44]. En el caso de las películas de nanotubos inmovilizadas sobre GCE, este incremento está relacionado con una mejor dispersión de los BCNT que deja mayor densidad de poros o reducción en la hidrofobicidad de la superficie debido a la presencia del agente dispersante (dsDNA), lo cual permite mayor flujo de iones y de moléculas de agua [45].

Tabla 4.2. Capacitancias específicas de la doble capa (C) para las distintas plataformas, en presencia y ausencia de una solución de PMZ $1,00 \times 10^{-4}$ M.

Plataforma	$C/mF\ cm^{-2}$ ^a	
	en buffer acetato	en PMZ
GCE/BCNT	$1,81 \pm 0,02$	$1,66 \pm 0,04$
GCE/BCNT-dsDNA	$4,23 \pm 0,05$	$5,12 \pm 0,03$
GCE/BCNT-ssDNA	$3,64 \pm 0,02$	$3,3 \pm 0,1$

^a Las C se obtuvieron de gráficos de densidad de corriente no faradaica (j_{n-f}) en función de v ; de acuerdo a $C = \partial j_{n-f} / \partial v$. Las densidades de corrientes se midieron de experimentos de VC a distintas velocidades, tomando el valor de j_{n-f} a un potencial igual a $E = 0,360$ V.

La C también brinda información sobre las propiedades dieléctricas de la interfaz. En el modelo más simple, la C puede ser definida como un condensador de placas paralelas con capacitancia $C = \epsilon_0 \epsilon_{dl} / \delta$ (donde: ϵ_0 es la constante dieléctrica en el vacío, ϵ_{dl} es la constante dieléctrica de la interfaz, y δ es el espesor de la doble capa) [46]. Las C de GCE/BCNT y GCE/BCNT-ssDNA disminuyeron 8,3% y 9,3%, respectivamente, tras la interacción con PMZ (tabla 4.3). Esta disminución puede atribuirse a la adsorción hidrofóbica de PMZ sobre BCNT (confirmado en la sección 4.3.1.2) o a la interacción electrostática con el ssDNA formando una capa sobre la superficie de la película (demostrado en la sección anterior). Como la PMZ es una molécula orgánica aislante, produce una disminución en la constante dieléctrica de la interfaz y la consiguiente reducción de la C . Esta disminución también se puede encontrar cuando se modifica cualquier sustrato conductor con una capa orgánica aislante [47]. Por el contrario, después de la interacción de PMZ con dsDNA soportado sobre BCNT, la capacitancia aumenta en un 21.0%, indicando claramente una afinidad diferencial entre esta plataforma y PMZ.

Esta interacción de afinidad fue demostrada en la sección anterior mediante experimentos de espectroscopia UV-Vis corroborados con cálculos de dinámica cuántica. La intercalación de PMZ en el dsDNA que dispersa los BCNT permite explicar el inusual aumento en la C . Como consecuencia de la intercalación, la doble hélice de DNA se alarga para reducir la tensión, y las propiedades hidrodinámicas y la viscosidad de la hebra del DNA cambian [41]. Por lo tanto, ocurre cierta distorsión en las zonas de doble hebra del DNA que dispersa a los BCNT haciendo que la película del polímero sea más permeable al flujo de moléculas de agua y iones del electrolito soporte. Estos cambios físicos y el consiguiente incremento en la permeabilidad del polímero provocan un aumento en la ϵ_{dl} y podrían explicar no sólo el aumento de la C cuando PMZ está presente en GCE/BCNT-dsDNA, sino también el corrimiento batocrómico del máximo de absorción de PMZ en las mismas condiciones (figura 4.10 C).

4.3.3. Aplicación analítica para la cuantificación de PMZ

Sobre la base de la eficiente acumulación de PMZ sobre la capa superficial de BCNT-dsDNA, se propone una nueva estrategia para la cuantificación del intercalador. Para ello se utilizó el paso de pre-concentración antes de la medición electroquímica siguiendo la estrategia de *stripping* de adsorción con cambio de medio para la determinación analítica de PMZ.

Se estudió la influencia del tiempo de acumulación (realizado a o.c.p.) en la respuesta por DPV de la PMZ pre-concentrada. La señal analítica utilizada fue la densidad de corriente del pico de oxidación de PMZ acumulada, la cual aumenta rápidamente con el tiempo de pre-concentración hasta 3 min y luego se mantiene constante. De esta manera, el tiempo seleccionado para la acumulación de PMZ fue de 5 min.

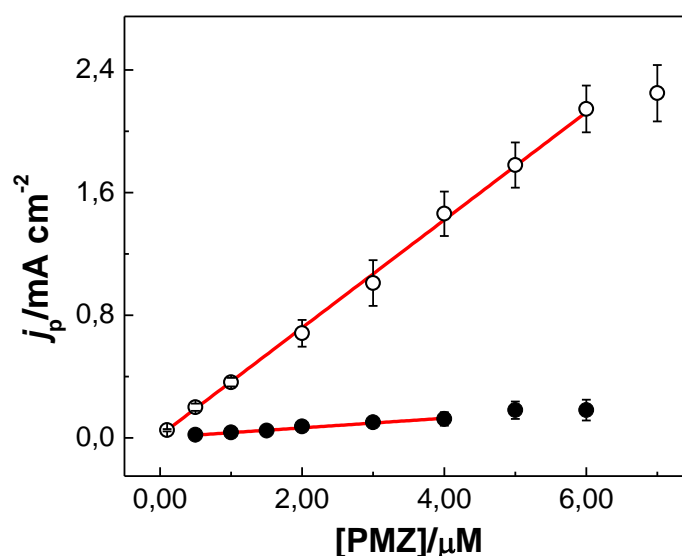


Figura 4.12. Curvas de calibrado de PMZ sobre GCE/BCNT-ssDNA (●) y GCE/BCNT-dsDNA (○) a partir de la densidad de corriente de pico (j_p) de registros de DPV tomados luego de acumular en soluciones de PMZ de concentración creciente. Los parámetros analíticos de los ajustes lineales (mostrados en las líneas rojas) se muestran en la **tabla 4.3**. GCE/BCNT-ssDNA: $j_p([\text{PMZ}]) = (0,031 \pm 0,002) [\text{PMZ}]$. GCE/bCNT-dsDNA: $j_p([\text{PMZ}]) = (0,350 \pm 0,005) [\text{PMZ}] + (0,014 \pm 0,006)$.

La **figura 4.12** muestra las curvas de calibración para PMZ obtenidas en *buffer* acetato 0,200 M pH 5,00 después de 5 min de interacción de GCE/BCNT-dsDNA (círculos llenos) y GCE/BCNT-ssDNA (círculos vacíos) con PMZ en concentraciones crecientes. La **tabla 4.3** muestra los parámetros analíticos obtenidos a partir de las curvas de calibrado para ambos bioelectrodos.

El aumento en la sensibilidad obtenida sobre GCE/BCNT-dsDNA en un orden de magnitud en comparación con GCE/BCNT-ssDNA confirma, una vez más, que la intercalación entre PMZ y el dsDNA le brinda a la plataforma importantes propiedades

de acumulación. Esto se traduce en un mejor rendimiento analítico de GCE/BCNT-dsDNA, permitiendo la detección de PMZ a niveles de concentración nanomolares.

Tabla 4.3. Parámetros analíticos para la cuantificación de PMZ, obtenidos del ajuste lineal de las curvas de calibrado para la determinación de PMZ de la **figura 4.12**.

<i>Parámetro analítico</i>	<i>GCE/BCNT-ssDNA</i>	<i>GCE/BCNT-dsDNA</i>
Sensibilidad/ $\mu\text{A M}^{-1} \text{cm}^{-2}$	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^7$	$(3,50 \pm 0,05) \times 10^8$
R^2 ^a	0,95	0,998
Rango lineal/ μM	1,0 – 4,0	0,07 – 6,0
LOD/ μM ^b	0,34	0,023

^a Coeficiente de correlación lineal; ^b El LOD (límite de detección) se calculó como $3,3\sigma/s$, donde σ es la desviación estándar de la señal del blanco y s es la sensibilidad.

El biosensor GCE/BCNT-dsDNA fue empleado para la determinación de PMZ en una formulación farmacéutica de uso hospitalario (*Prometazina Cevallos*). El valor de la concentración de PMZ obtenido con el biosensor propuesto fue $(51,30 \pm 0,05)$ mg en 2 mL del inyectable mientras que el valor reportado por el laboratorio fabricante es de 50 mg de PMZ en 2mL. Por lo tanto, la metodología propuesta para la detección de PMZ no sólo se realiza de manera altamente sensible sino que también permite cuantificar al intercalador en muestras reales con un alto grado de exactitud (Error: 2,6 %).

4.4. Conclusiones parciales

La modificación de GCE con la dispersión de BCNT-dsDNA mejora la transferencia de carga de PMZ debido a dos efectos sinérgicos: por un lado, a las propiedades electrocatalíticas de BCNT y por el otro, a la interacción favorable de PMZ con dsDNA. El *stripping* de adsorción con cambio de medio demostró que la PMZ interactúa con la película de dsDNA soportada sobre BCNT principalmente mediante interacciones hidrofóbicas, a diferencia de la interacción electrostática con ssDNA. Mediciones espectroscópicas y cálculos de dinámica cuántica en el nivel de teoría de DFTB brindaron evidencias contundentes de las propiedades de PMZ como agente intercalador del dsDNA nativo, las cuales no habían sido analizadas de manera exhaustiva en bibliografía. Por otro lado, estos experimentos demostraron que el dsDNA que actúa como agente dispersante de los BCNT conserva su capacidad de interacción con un intercalador. Es importante destacar que este fenómeno ocurre a pesar de las drásticas condiciones a las que es sujeta la biomolécula durante el proceso de dispersión (sonicado durante 45 min en H₂O:EtOH 50 %V/V).

Gracias a la fuerte interacción que se establece entre PMZ y la dispersión de BCNT con dsDNA soportada sobre GCE, se pudo pre-concentrar de manera eficiente el intercalador, lo que brindó una nueva estrategia de cuantificación altamente sensible de la PMZ hasta niveles nanomolares y posibilita su determinación en muestras reales.

4.5. Bibliografía

- [1] V. Luzzati, F. Masson, L.S. Lerman, Interaction of DNA and proflavine: A small-angle X-ray scattering study, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 634–639.
- [2] L.S. Lerman, Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 18–IN14.
- [3] A. Mukherjee, W.D. Sasikala, Drug-DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism, in: T.K.-C.B.T.-A. in P.C. and S. Biology (Ed.), *Dyn. Proteins Nucleic Acids*, Academic Press, 2013: pp. 1–62.
- [4] R. Lavery, *Multiple Aspects of DNA and RNA: From Biophysics to Bioinformatics*, École D'ÉtÉ de Physics des Houches Session LXXXII, Elsevier, 2005.
- [5] A. Rescifina, C. Zagni, M.G. Varrica, V. Pistarà, A. Corsaro, Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 95–115.
- [6] N.J. Wheate, C.R. Brodie, J.G. Collins, S. Kemp, J.R. Aldrich-Wright, DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis, *Mini Rev. Med. Chem.* 7 (2007) 627–648.
- [7] H.-K. Liu, P.J. Sadler, Metal Complexes as DNA Intercalators, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 349–359.
- [8] E. Paleček, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage., *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 621–628.
- [9] E. Paleček, M. Bartošík, *Electrochemistry of Nucleic Acids*, *Chem. Rev.* 112 (2012) 3427–3481.
- [10] D. Kato, O. Niwa, Carbon-based electrode materials for DNA electroanalysis., *Anal. Sci.* 29 (2013) 385–392.
- [11] M. Fojta, Electrochemical sensors for DNA interactions and damage, *Electroanalysis.* 14 (2002) 1449–1463.
- [12] R.L. Zaffino, T. Galan, W.A. Pardo, M. Mir, J. Samitier, Nanoprobes for enhanced electrochemical DNA sensors, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 7 (2015) 817–827.
- [13] T. Wang, R. Zhu, J. Zhuo, Z. Zhu, Y. Shao, M. Li, Direct Detection of DNA below ppb Level Based on Thionin- Functionalized Layered MoS₂ Electrochemical Sensors, (2014).
- [14] S. Sato, M. Tsueda, S. Takenaka, Electrochemical detection of aberrant methylated gene using naphthalene diimide derivative carrying four ferrocene moieties, *J. Organomet. Chem.* 695 (2010) 1858–1862.
- [15] M.Y. Wei, L.H. Guo, P. Famouri, DNA biosensors based on metallo-intercalator probes and electrocatalytic amplification, *Microchim. Acta.* 172 (2011) 247–260.
- [16] B. Blankert, H. Hayen, S.M. Van Leeuwen, U. Karst, E. Bodoki, S. Lotrean, et al., Electrochemical, chemical and enzymatic oxidations of phenothiazines, *Electroanalysis.* 17 (2005) 1501–1510.
- [17] N.J. de Mol, A.B.C. Becht, J. Koenen, G. Lodder, Irreversible binding with biological

macromolecules and effects in bacterial mutagenicity tests of the radical cation of promethazine and photoactivated promethazine. Comparison with chlorpromazine, *Chem. Biol. Interact.* 57 (1986) 73–83.

- [18] E. Gocke, Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines, *Mutat. Res. - Rev. Genet. Toxicol.* 366 (1996) 9–21.
- [19] K. Stolze, R.P. Mason, ESR spectroscopy of flow-oriented cation radicals of phenothiazine derivatives and phenoxathiin intercalated in DNA, *Chem. Biol. Interact.* 77 (1991) 283–289.
- [20] J. Zhong, Z. Qi, H. Dai, C. Fan, G. Li, N. Matsuda, Sensing phenothiazine drugs at a gold electrode co-modified with DNA and gold nanoparticles., *Anal. Sci.* 19 (2003) 653–657.
- [21] J. Wang, G. Rivas, X. Cai, H. Shiraishi, P.A.M. Farias, N. Dontha, et al., Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes, *Anal. Chim. Acta.* 332 (1996) 139–144.
- [22] F.W.P. Ribeiro, A.S. Cardoso, R.R. Portela, J.E.S. Lima, S.A.S. Machado, P. De Lima-Neto, et al., Electroanalytical determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes using square-wave adsorptive voltammetry, *Electroanalysis.* 20 (2008) 2031–2039.
- [23] Z.-S. Yang, J. Zhao, D.-P. Zhang, Y.-C. Liu, Electrochemical determination of trace promethazine hydrochloride by a pretreated glassy carbon electrode modified with DNA., *Anal. Sci.* 23 (2007) 569–572.
- [24] J.P. Marco, K.B. Borges, C.R.T. Tarley, E.S. Ribeiro, A.C. Pereira, Development of a simple, rapid and validated square wave voltametric method for determination of promethazine in raw material and pharmaceutical formulation using DNA modified multiwall carbon nanotube paste electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 177 (2013) 251–259.
- [25] H. Tang, J. Chen, K. Cui, L. Nie, Y. Kuang, S. Yao, Immobilization and electro-oxidation of calf thymus deoxyribonucleic acid at alkylamine modified carbon nanotube electrode and its interaction with promethazine hydrochloride, *J. Electroanal. Chem.* 587 (2006) 269–275.
- [26] M. Elstner, P. Hobza, T. Frauenheim, S. Suhai, E. Kaxiras, Hydrogen bonding and stacking interactions of nucleic acid base pairs: A density-functional-theory based treatment, *J. Chem. Phys.* 114 (2001).
- [27] M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, T. Frauenheim, et al., Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties, *Phys. Rev. B.* 58 (1998) 7260–7268.
- [28] B. Aradi, B. Hourahine, T. Frauenheim, DFTB+, a Sparse Matrix-Based Implementation of the DFTB Method, *J. Phys. Chem. A.* 111 (2007) 5678–5684.
- [29] T.A. Niehaus, M. Elstner, T. Frauenheim, S. Suhai, Application of an approximate density-functional method to sulfur containing compounds, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 541 (2001) 185–194.
- [30] M. Gaus, Q. Cui, M. Elstner, DFTB3: Extension of the Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding Method (SCC-DFTB), *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 931–948.
- [31] M.B. Oviedo, C.F.A. Negre, C.G. Sánchez, Dynamical simulation of the optical response of photosynthetic pigments., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 6706–6711.
- [32] V.C.F. and C.F.A.N. and M.B.O. and F.P.B. and F.Y.O. and C.G. Sánchez, A theoretical study of the optical properties of nanostructured TiO₂, *J. Phys. Condens. Matter.* 25 (2013) 115304.
- [33] C.F.A. Negre, V.C. Fuertes, M.B. Oviedo, F.Y. Oliva, C.G. Sánchez, Quantum Dynamics of Light-Induced Charge Injection in a Model Dye–Nanoparticle Complex, *J. Phys. Chem. C.* 116 (2012) 14748–14753.

- [34] M.B. Oviedo, C.G. Sánchez, Transition Dipole Moments of the Qy Band in Photosynthetic Pigments, *J. Phys. Chem. A.* 115 (2011) 12280–12285.
- [35] M.B. Oviedo, X. Zarate, C.F.A. Negre, E. Schott, R. Arratia-Pérez, C.G. Sánchez, Quantum Dynamical Simulations as a Tool for Predicting Photoinjection Mechanisms in Dye-Sensitized TiO₂ Solar Cells, *J. Phys. Chem. Lett.* 3 (2012) 2548–2555.
- [36] Y. Dai, B. Chakraborty, B. Ge, H.-Z. Yu, Adenosine-Triggered Elimination of Methylene Blue Noncovalently Bound to Immobilized Functional dsDNA-Aptamer Constructs, *J. Phys. Chem. B.* 116 (2012) 6361–6368.
- [37] S. Khezrian, A. Salimi, H. Teymourian, R. Hallaj, Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent attachment of aptamer onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified electrode, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 218–225.
- [38] D. Voet, W.B. Gratzer, R.A. Cox, P. Doty, Absorption spectra of nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids in the far ultraviolet, *Biopolymers.* 1 (1963) 193–208.
- [39] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, et al., *Gaussian 09 (Revision D.01)*, (2009).
- [40] J. Lang, M. Liu, Layer-by-Layer Assembly of DNA Films and Their Interactions with Dyes, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 11393–11397.
- [41] D. Suh, J.B. Chaires, Criteria for the mode of binding of DNA binding agents, *Bioorg. Med. Chem.* 3 (1995) 723–728.
- [42] L. Pérez-Flores, A.J. Ruiz-Chica, J.G. Delcros, F. Sánchez-Jiménez, F.J. Ramírez, Intercalation and groove binding of an acridine–spermine conjugate on DNA sequences: an FT-Raman and UV-visible absorption study, *J. Mol. Struct.* 744–747 (2005) 699–704.
- [43] J. Li, A. Cassell, L. Delzeit, J. Han, M. Meyyappan, Novel Three-Dimensional Electrodes: Electrochemical Properties of Carbon Nanotube Ensembles, *J. Phys. Chem. B.* 106 (2002) 9299–9305.
- [44] H.J. Zheng, A.M. Yu, C.A. Ma, Effect of pore characteristics on electrochemical capacitance of activated carbons, *Russ. J. Electrochem.* 48 (2012) 1179–1186.
- [45] P. Simon, a Burke, Nanostructured carbons: Double-layer capacitance and more, *Electrochem. Soc. Interface.* 17 (2008) 38–43.
- [46] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2001.
- [47] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers, *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 1769–1802.

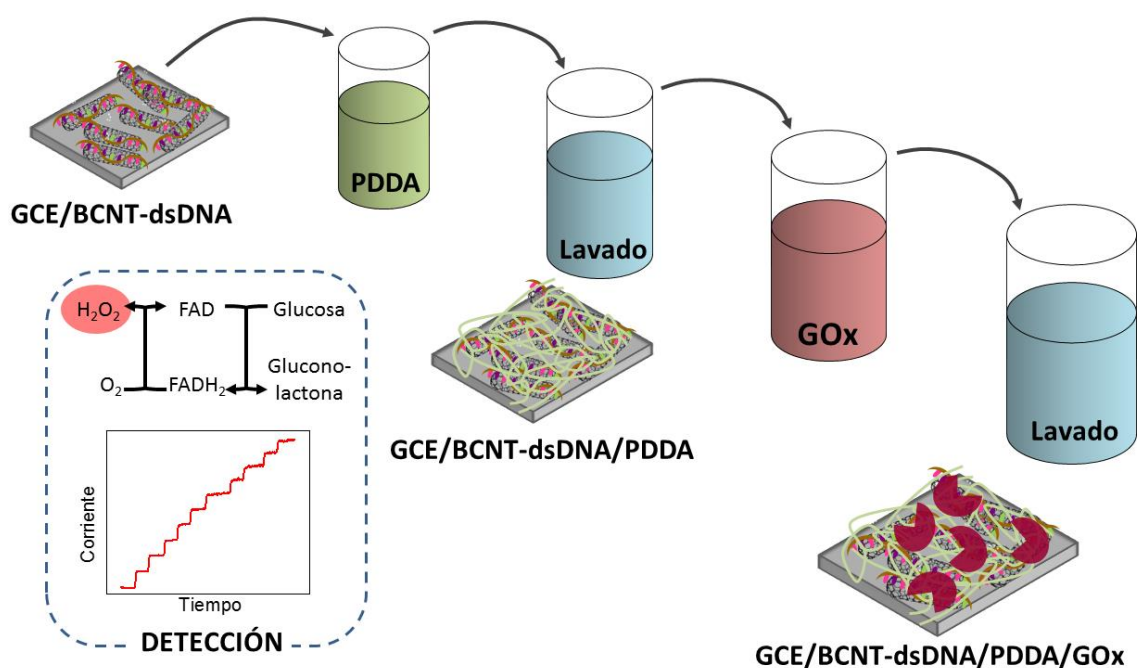
CAPÍTULO 5

Aplicaciones analíticas de GCE/BCNT-dsDNA II:

Biosensor enzimático
para la cuantificación
de glucosa.

RESUMEN

En el presente capítulo se toma ventaja de la característica de polianión del dsDNA soportado sobre BCNT para desarrollar un biosensor sensible y selectivo hacia glucosa. El biosensor enzimático se obtuvo mediante el autoensamblado capa por capa del polication polidialildimetilamonio (PDDA) con la enzima glucosa oxidasa (GOx) sobre GCE modificado con BCNT-dsDNA. Se discuten la influencia de las condiciones de autoensamblado de PDDA y GOx y el efecto del número de bicapas (n) en el desempeño analítico de GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n. La caracterización se realiza estudiando la reversión de carga y el bloqueo superficial mediante EIE y el cubrimiento superficial de GOx bioactiva. Asimismo, se evalúa el proceso de adsorción de los polielectrolitos mediante SPR. La mejora en la sensibilidad hacia glucosa con el ensamblado de un mayor número de bicapas (PDDA/GOx)_n permite la cuantificación sensible, selectiva y altamente reproducible del analito con límites de detección micromolares, lo cual posibilita determinar la concentración de glucosa en muestras de una gaseosa, un jugo natural y un medicamento.



5.1. Introducción

5.1.1. Autoensamblado capa por capa de polielectrolitos

El autoensamblado capa por capa (LBL) es una metodología simple, eficiente, reproducible, robusta y extremadamente versátil para modificar superficies y fabricar multicapas de polímeros altamente ordenadas, mediante la cual se puede lograr un control estricto del espesor de las películas, la composición y la morfología. Debido a estas ventajas, el autoensamblado LBL ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de biosensores [1], en ingeniería de tejidos [2,3], liberación controlada de drogas y células [4,5], en la industria alimenticia [6], catálisis [7,8] y en conversión y almacenamiento de energía [9], entre otras.

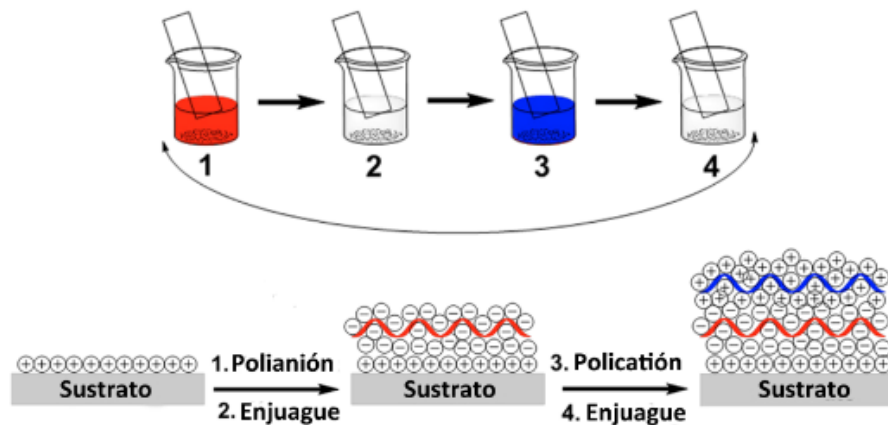


Figura 5.1. Esquema de formación de un autoensamblado capa por capa de un polianión y un policatión sobre un sustrato plano cargado positivamente.

Como muestra el esquema de la **figura 5.1**, la forma más común de ensamblar capa por capa es mediante interacciones electrostáticas atractivas entre polielectrolitos de carga opuesta. De esta manera, la película crece como consecuencia de la inmersión sucesiva de un sustrato sólido en soluciones del policatión o polianión. La fuerza impulsora del crecimiento de la multiestructura sobre la superficie del sustrato está dada por la atracción electrostática entre el polielectrolito inmovilizado y el de la solución de la etapa siguiente. Para cada capa, el proceso de adsorción (que suele llevar algunos minutos) finaliza cuando las cargas de la superficie son sobrecompensadas por las cargas de la capa del polielectrolito subsiguiente. De hecho, la carga del sustrato es totalmente revertida en cada paso, lo cual hace que la superficie repela al polielectrolito libre en la solución. Por lo tanto, el crecimiento de películas vía ensamblado LBL es auto-regulado.

Estudios experimentales y teóricos han demostrado que la principal causa de formación de estas estructuras autoensambladas es el aumento entrópico provocado por la liberación de iones y agua durante la adsorción de los polielectrolitos [10–12].

5.1.2. Biosensores electroquímicos de glucosa

La *diabetes mellitus* es un problema de salud pública en todo el mundo ya que es una de las principales causas de muerte y discapacidad. Este desorden metabólico crónico se desencadena cuando el organismo pierde su capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla con eficacia y se refleja en concentraciones de glucosa en sangre mayores que el rango normal de 70 – 110 mg mL⁻¹ (4,4 – 6,6 mM) [13]. En consecuencia, millones de diabéticos deben medirse sus niveles de glucosa diariamente, convirtiendo a la glucosa en el biomarcador de mayor relevancia desde el punto de vista analítico [14]. De hecho, el 85% del mercado mundial de biosensores corresponde a los biosensores de glucosa [15]. Esta relevancia impacta también en la industria, debido a la necesidad de informar y controlar los niveles de glucosa en alimentos y productos farmacéuticos [16].

Los métodos electroquímicos, especialmente los métodos amperométricos, han sido ampliamente utilizados en la determinación de glucosa, incluso por encima de los colorimétricos [17,18]. Se ha descrito la oxidación directa de glucosa sobre algunos metales (como Pt, Ag, Ni, Cu y Zn), la cual puede ser aprovechada con fines cuantitativos [19]. En los últimos años, ha incrementado el número de reportes de estos biosensores de glucosa no enzimáticos, particularmente usando óxidos de los metales anteriormente mencionados de dimensiones nanométricas [20,21]. Sin embargo, la gran desventaja de esta estrategia es la baja selectividad, dado que cualquier otro tipo de carbohidrato es también susceptible de ser oxidado esas condiciones.

El desarrollo de biosensores enzimáticos de glucosa se remonta al año 1962, cuando Clark y Lyons [22] crearon una metodología de detección de glucosa usando glucosa oxidasa (GOx) como capa de bio-reconocimiento. Desde entonces, los biosensores basados en GOx (y otras enzimas) representan la alternativa con mayor avance en el campo de la investigación básica y aplicada [17,18,23].

5.1.2.a. Glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa (GOx) es una glicoenzima de la familia de las oxidoreductasas. Su estructura, mostrada en la **figura 5.2**, consta de dos dímeros idénticos que se encuentran unidos mediante enlaces disulfuro y presenta ciertas variaciones dependiendo de la fuente de la enzima [24,25]. La GOx obtenida del hongo *Aspergillus niger* consiste en 2 subunidades idénticas con masa molecular de 80 kDa.

Cada uno de los dímeros contiene el cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD), que actúa como aceptor de hidrógeno.

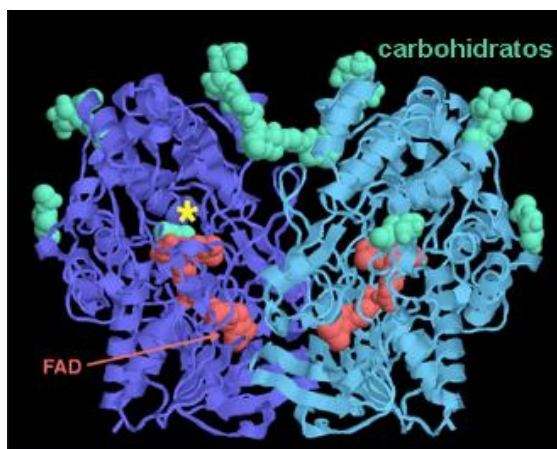
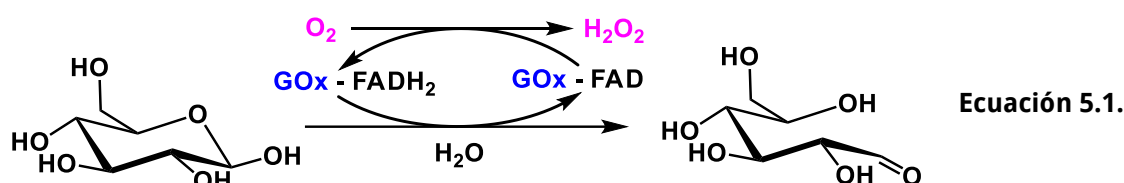


Figura 5.2. Estructura secundaria de GOx de *Aspergillus niger*. En verde claro se muestran las cadenas glicosídicas y en rosa, los cofactores FAD.

GOx cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona, la cual se hidroliza no enzimáticamente convirtiéndose en ácido glucónico, mientras que el cofactor FAD acepta los dos protones generados en la oxidación de la glucosa [26]. La regeneración de la enzima tiene lugar por acción de su mediador natural O_2 , el cual reoxida el cofactor enzimático, reduciéndose a H_2O_2 .



En los biosensores basados en GOx, la regeneración del cofactor FAD es vital para el ciclo catalítico, de lo contrario, la enzima actúa una vez y el ciclo enzimático se interrumpe. Esto se logra utilizando un aceptor de electrones, siendo el más habitual el mediador natural de la enzima O_2 . Existen otras alternativas de regeneración del cofactor, las cuales involucran la utilización de mediadores redox artificiales como los derivados del ferroceno [27].

5.1.2.b. Estrategias de inmovilización de GOx sobre CNT

Las estrategias de inmovilización de enzimas sobre sustratos sólidos es uno de los factores cruciales para la fabricación de biosensores enzimáticos [28-30]. Debido a la interacción de las mismas con el soporte, la inmovilización altera el microentorno de la enzima pudiendo provocar cambios en la actividad, selectividad y reactividad [31]. El

método seleccionado debe minimizar los efectos anteriores y evitar cambios conformacionales drásticos en la estructura de las enzimas que alteren sus propiedades de reconocimiento molecular [32].

Existen diversas estrategias tales como la adsorción física, inmovilización covalente y atrapamiento físico o inclusión en compósitos [33,34]. Si bien la inmovilización puede mejorar la estabilidad operacional a largo plazo del biosensor, la matriz del electrodo no debe alterar la conformación estructural y actividad catalítica de la enzima [34]. En este sentido, se han utilizado diversos materiales de electrodo que actúan como matriz de atrapamiento de la enzima a la vez que mejoran la “comunicación” eléctrica con el centro activo de la misma [17,30,35]. De todos ellos, los CNT han demostrado ser excelentes candidatos debido a su elevada área superficial, excelente conductividad eléctrica y múltiples posibilidades de funcionalización [30,36–38].

La incorporación de GOx (y enzimas, en general) y CNT en estructuras auto-organizadas representa una interesante alternativa debido a la facilidad del proceso de ensamblado y a su versatilidad (**sección 5.1.1**). El uso de CNT para construir arquitecturas supramoleculares por autoensamblado se basa en dos estrategias distintas: servir de plataforma para autoensamblar posteriormente la enzima con la ayuda de otro polielectrolito (**figura 5.3 A**); o ser parte activa de la arquitectura mediante el inmovilización alternada de películas del elemento de bio-reconocimiento y CNT (**figura 5.3 B**) [39–43].

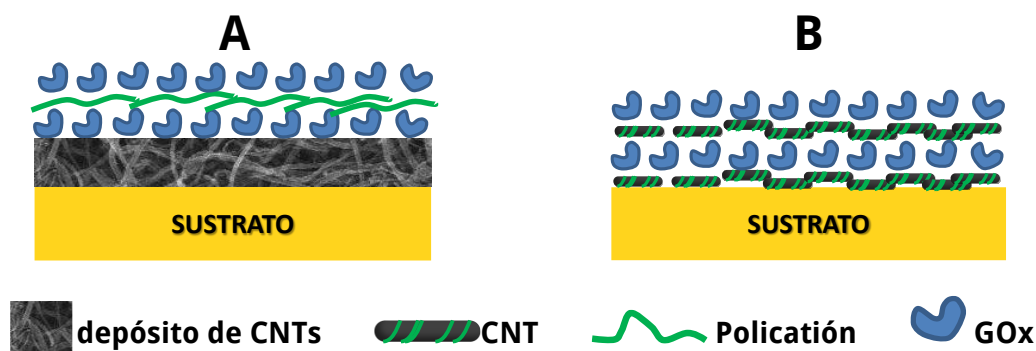


Figura 5.3. Representación de las estrategias de inmovilización de GOx y CNT mediante autoensamblado LBL: (A) utilizando el electrodo modificado con CNT como plataforma base para autoensamblar la enzima con la ayuda de otro polielectrolito; y (B) ensamblando GOx y CNTs sobre un dado sustrato.

Tomando ventaja de la densidad de carga negativa de GCE modificado con la dispersión de BCNT-dsDNA (**sección 3.4.5.a**) y de las excelentes propiedades electrocatalíticas de la plataforma hacia H₂O₂ (**sección 3.4.2**), en el presente capítulo se utilizó la estrategia de autoensamblado LBL para el desarrollo de un biosensor de

glucosa. El mismo se construyó utilizando GOx y el polícatión polidialildimetilamonio (PDDA), formando multiestructuras del tipo GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n donde *n* es el número de bicapas. En las secciones siguientes se discute la optimización de las condiciones de autoensamblado de la enzima y el polícatión, y la incidencia de *n* en la sensibilidad a glucosa. El autoensamblado fue caracterizado empleando EIE con dos marcadores redox y mediante SPR, con especial énfasis en el estudio de los aspectos morfológicos y estructurales de las multicapas. Se evalúa también su aplicación analítica en la cuantificación de glucosa en muestras reales.

5.2. Metodología experimental

La dispersión de BCNT con dsDNA fue preparada siguiendo el esquema previamente descrito en la **sección 3.2**. La modificación del disco de Au para los experimentos de SPR se llevó a cabo depositando *ex-situ* 20 µL de dispersión de BCNT-dsDNA 0,30 mg mL⁻¹ preparada en las mismas condiciones que las anteriores.

Las soluciones de PDDA y GOx se prepararon con agua MQ y *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, respectivamente. El biosensor de glucosa se obtuvo por inmersión de GCE/BCNT-dsDNA en una solución de PDDA 0,50 mg mL⁻¹ por 5 min seguido de la inmersión en una solución de GOx 1,00 mg mL⁻¹ por 15 min. Luego de cada paso de adsorción se enjuagó el electrodo en el medio apropiado: al finalizar la capa de PDDA, con agua MQ y después de la de GOx, con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. El biosensor con multicapas se obtuvo repitiendo el esquema anterior *n* veces para obtener GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Optimización de las condiciones de ensamblado

En la presente sección se discute el efecto de la naturaleza del polícatión empleado para ensamblar la enzima y la optimización de la concentración y el tiempo de inmersión en las soluciones de los polielectrolitos.

La evaluación de las condiciones de ensamblado se realizó mediante el análisis de la sensibilidad a glucosa, obtenida a partir de experimentos amperométricos como el que se muestra en la **figura 5.4**. En estos experimentos se aplicó un potencial de trabajo de 0,700 V y se realizaron agregados sucesivos de glucosa. En presencia de GOx, la glucosa se oxida a gluconolactona, generándose H₂O₂ en el ciclo catalítico de la enzima el cual difunde a la superficie del electrodo y se oxida, produciendo una corriente anódica.

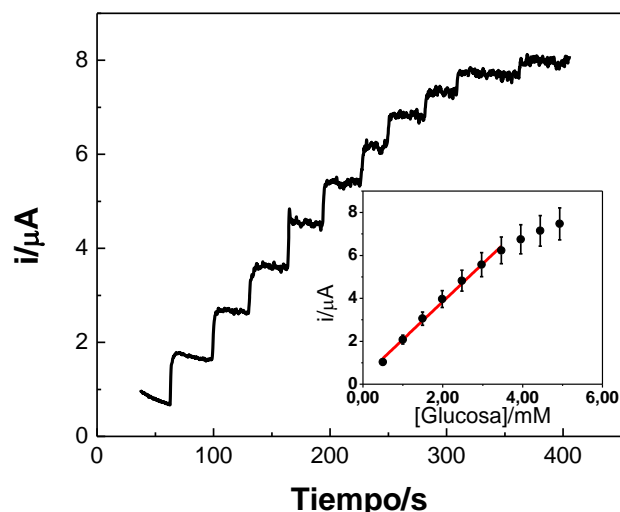


Figura 5.4. Registro amperométrico obtenido sobre GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx luego de agregados sucesivos de glucosa $5,00 \times 10^{-4}$ M. El *inset* muestra la curva de calibración obtenida del experimento amperométrico. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. Potencial de trabajo: 0,700 V.

5.3.1.a. Naturaleza del policación

En la **figura 5.5** se muestran las sensibilidades a glucosa para GCE/BCNT-dsDNA/*policación*/GOx obtenidas a partir de amperometrías a 0,700 V luego de agregados sucesivos de glucosa 0,50 mM. Los policações utilizados fueron polilisina (PLis) y PDDA $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$. Se puede observar que, independientemente del tiempo de inmersión en la solución del policación, la sensibilidad a glucosa es considerablemente mayor sobre la plataforma ensamblada con PDDA que con PLis.

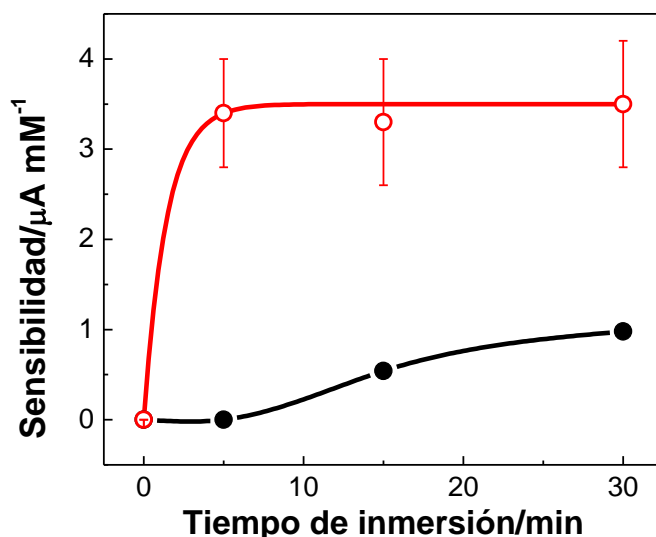
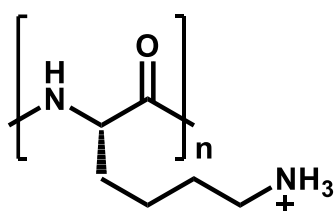
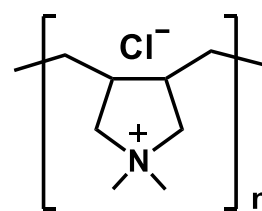


Figura 5.5. Sensibilidades para glucosa obtenidas a partir de determinaciones amperométricas mediante agregados sucesivos de glucosa $5,00 \times 10^{-4}$ M empleando GCE/BCNT-dsDNA/*policación*/GOx para distintos tiempos de inmersión en PLis (●) y PDDA (○). Condiciones de ensamblado: concentración de policación = $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, concentración de GOx = $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, tiempo de inmersión de GOx = 15 min. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. Potencial de trabajo: 0,700 V.

El comportamiento anterior puede ser explicado a través de dos factores. Por un lado, PLis (**esquema 5.1**) es un polielectrolito débil dado que deriva de la lisina, cuyo pKa para el grupo ϵ -amino es 10,54; mientras que PDDA (**esquema 5.2**) deriva de un monómero con un grupo amonio cuaternario que posee carga positiva permanente. Por otro lado, PLis es un polímero ramificado mientras que PDDA es un polímero lineal. Es conocido que los polímeros con un alto grado de ramificación, al adsorberse sobre un sustrato, generan una película con un menor grado de cohesión y mayor rugosidad superficial [44,45]. Como consecuencia, la inmovilización electrostática de GOx sobre PLis es menos eficiente, lo cual genera menores cubrimientos de enzima y, por ende, menor sensibilidad. Sobre la base de los resultados anteriores, el polímero elegido fue PDDA.



Esquema 5.1. Estructura de PLis



Esquema 5.2. Estructura de PDDA

5.3.1.b. Tiempo de inmersión y concentración de PDDA

La **figura 5.6** muestra la dependencia de la sensibilidad a glucosa con la concentración y tiempo de inmersión de PDDA, manteniendo constantes las condiciones de adsorción de GOx. Se observa que la sensibilidad a glucosa es menor cuando la solución de PDDA es $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ independientemente del tiempo de inmersión y que, en general, las sensibilidades obtenidas cuando se emplean las dos concentraciones mayores de PDDA son prácticamente iguales. De esto se concluye que la adsorción del polímero es rápida y que después de 5 min la superficie de GCE/BCNT-dsDNA se encuentra saturada para las tres concentraciones analizadas.

La selección de las condiciones óptimas se realizó sobre la base de un análisis de la sensibilidad, reproducibilidad, rango lineal, repetitividad y simplicidad. Dado que la sensibilidad es invariante con el tiempo de adsorción de PDDA, se seleccionó el más corto (5 min) para la adsorción de PDDA. Por otro lado, al incrementar la concentración de PDDA de $0,50$ a $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ la sensibilidad aumenta sólo un 26,0%. Además, los errores relativos de las dos concentraciones mayores son, respectivamente, 18,0% y 19,0% mientras que para PDDA $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ es 2,5%. En consecuencia, la condición seleccionada para la adsorción de PDDA es $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ durante 5 min.

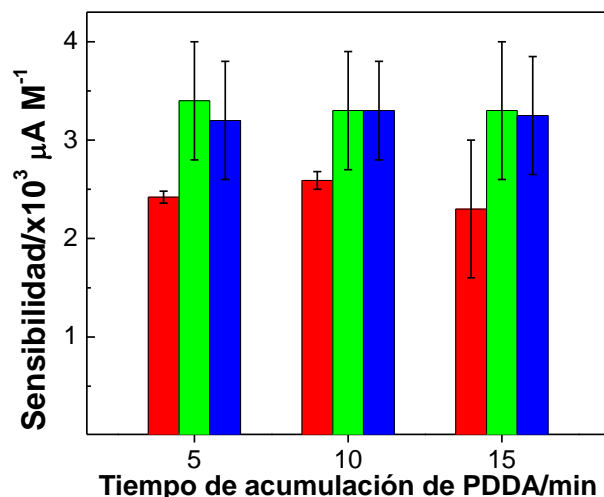


Figura 5.6. Dependencia de la sensibilidad a glucosa para GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx en función del tiempo de acumulación para soluciones de PDDA 0,50 (■), 1,00 (■) y 2,00 (■) mg mL⁻¹. Condiciones de ensamblado: concentración de GOx = 1,00 mg mL⁻¹, tiempo de inmersión de GOx = 15 min. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. Potencial de trabajo: 0,700 V.

5.3.1.c. Tiempo de inmersión y concentración de GOx

La **figura 5.7** muestra la dependencia de la sensibilidad a glucosa con la concentración y tiempo de inmersión de GOx, manteniendo constantes las condiciones de adsorción de PDDA. En términos generales, para una misma concentración de solución de GOx, las sensibilidades no varían significativamente al incrementar el tiempo de inmersión, a diferencia de lo que ocurre para un mismo tiempo, donde, en general, aumentan con la concentración de la solución de inmersión de GOx.

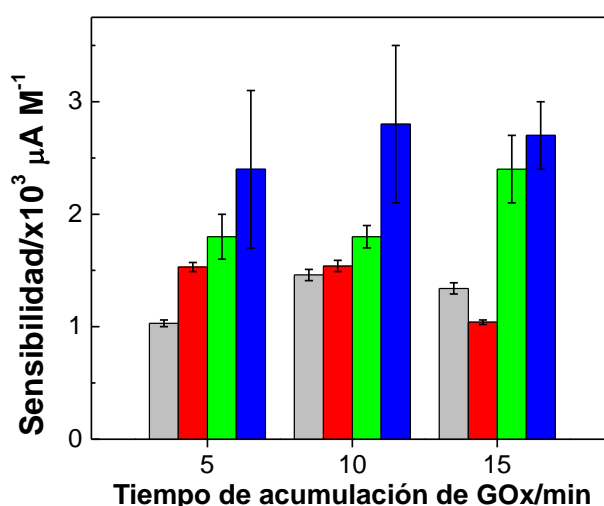


Figura 5.7. Dependencia de la sensibilidad a glucosa de GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx en función del tiempo de inmersión para soluciones de GOx 0,25 (■), 0,50 (■), 1,00 (■) y 2,00 (■) mg mL⁻¹. Condiciones de ensamblado: concentración de PDDA = 0,50 mg mL⁻¹, tiempo de inmersión de PDDA = 5 min. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. Potencial de trabajo: 0,700 V.

Como en el caso de PDDA, la elección de la condición óptima para el ensamblado de GOx se efectuó analizando diversos factores. En este caso, para 15 min de inmersión se alcanzan los mayores rangos lineales y las mejores repetitividads. En esta condición, la sensibilidad obtenida para GOx 1,00 mg mL⁻¹ es casi el doble que la obtenida para concentraciones menores. Sin embargo, al duplicar a 2,00 mg mL⁻¹ la sensibilidad sólo aumenta un 12%. En consecuencia, la concentración óptima para el autoensamblado de GOx es 1,00 mg mL⁻¹ y el tiempo de adsorción, 15 min.

5.3.1.d. Estudio de la adsorción de PDDA y GOx sobre GCE/BCNT-dsDNA

La adsorción de los polielectrolitos sobre BCNT-dsDNA fue caracterizada mediante SPR. La **figura 5.8** muestra la evolución de θ_{SPR} en función del tiempo durante el proceso de ensamblado. Las flechas indican el contacto de la superficie con PDDA (↓) y GOx (↓) y los lavados con agua ultra-pura (↓) y *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,4 (↓).

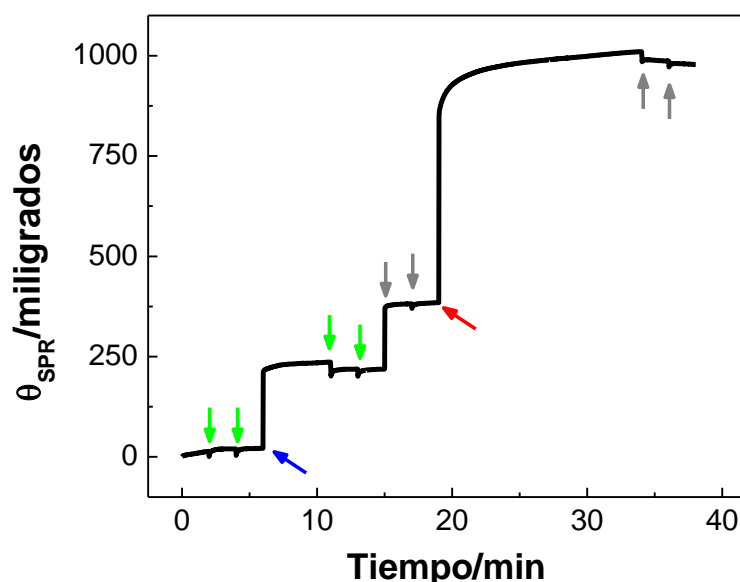


Figura 5.8. θ_{SPR} vs tiempo durante el ensamblado de PDDA y GOx sobre Au/BCNT-dsDNA. Las flechas indican el contacto de la superficie con PDDA (↓) y GOx (↓) y los lavados con agua MQ (↓) y *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,4 (↓).

El sensorgrama obtenido muestra que el contacto de la solución de PDDA con la superficie provoca un incremento de 149 m° en el ángulo de SPR, alcanzando un valor estable luego de 5 min de adsorción. Este aumento de θ_{SPR} se asocia a la masa de PDDA que se adsorbe sobre la superficie. El lavado posterior con agua MQ provoca una disminución en θ_{SPR} debido a la remoción de polímero débilmente adsorbido. Debido a que GOx se encuentra en un medio diferente al que se encuentra PDDA, se debe realizar un lavado previo con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,4. El aumento en θ_{SPR} al lavar con este medio se debe al mayor índice de refracción de esta solución respecto al agua MQ. Al

inyectar la solución de GOx, la señal incrementa nuevamente ($\Delta\theta_{SPR} = 599 \text{ m}^\circ$) debido a la adsorción de enzima sobre Au/BCNT-dsDNA/PDDA, la cual alcanza el 90% de la señal de equilibrio luego de 5 min. En ambos casos se observa que la adsorción de los polielectrolitos es rápida.

5.3.2. Construcción y caracterización de multicapas GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n

5.3.2.a. Evaluación de la respuesta a glucosa

La **figura 5.9** presenta las sensibilidades para la determinación de glucosa, en función del número de bicapas (PDDA/GOx)_n ensambladas sobre GCE/BCNT-dsDNA. En la misma se puede observar que la sensibilidad crece hasta la tercer bicapa, para luego disminuir ligeramente. Por otro lado, el aumento del número de bicapas al doble no se traduce en un incremento en la misma razón de la sensibilidad.

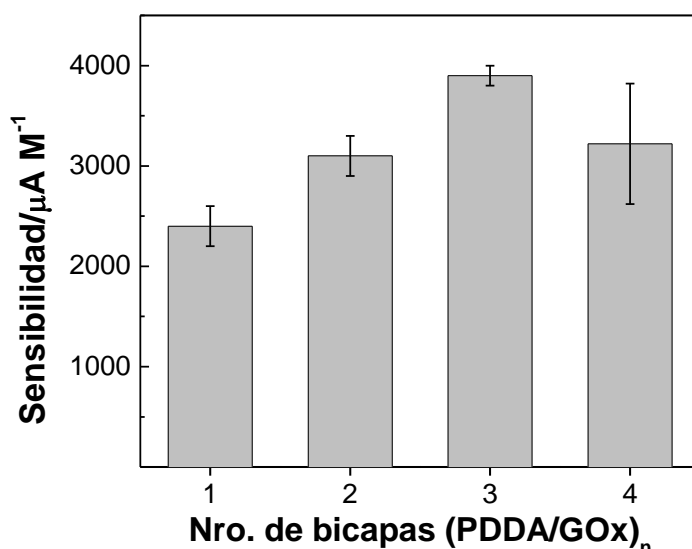


Figura 5.9. Sensibilidades a glucosa en función del número de bicapas (PDDA/GOx)_n ensambladas sobre GCE/BCNT-dsDNA. Las mismas se obtuvieron a partir de amperometrías con agregados sucesivos de glucosa $5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$. Condiciones de ensamblado: concentración de PDDA = $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, tiempo de adsorción de PDDA = 5 min, concentración de GOx = $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$, tiempo de adsorción de GOx = 15 min. Electrolito soporte: *buffer* fosfato $0,050 \text{ M}$ pH 7,40. Potencial de trabajo: $0,700 \text{ V}$.

Del análisis de las sensibilidades para glucosa presentadas en la **figura 5.9** se puede concluir que la misma aumenta hasta $n = 3$. Para encontrar las razones de este comportamiento se deben estudiar aspectos morfológicos y conformacionales de las películas de PDDA/GOx sobre GCE/BCNT-dsDNA, los que se discuten en las secciones siguientes.

5.3.2.b. Estudio del proceso de adsorción: bloqueo superficial

El crecimiento de la multiestructura fue evaluado mediante EIE utilizando Q/H₂Q como cupla redox. El mecanismo de esta cupla involucra el intercambio de 2e⁻/2H⁺ y es sensible al bloqueo superficial dado que se adsorbe sobre C sp² para la transferencia de carga, por lo que se considera de esfera interna [46,47].

Los espectros de EIE obtenidos en solución de Q/H₂Q 2,00 x10⁻³ M en función del crecimiento de la multiestructura de PDDA y GOx se presentan en la **figura 5.10**. Para el ajuste de los datos se utilizó el circuito de Randles (**figura 2.7 B**), por lo que el aumento en el semicírculo del gráfico de Nyquist con *n* se correlaciona con la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}).

La **figura 5.11** muestra las R_{tc} obtenidas de los espectros de impedancia anteriores, para la construcción de GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n. El aumento observado en la R_{tc} conforme se inmoviliza un mayor número de capas de polielectrolito está relacionado con la disminución en la velocidad de transferencia de carga de la cupla Q/H₂Q y se correlaciona con los cambios en el espesor de la película que crece sobre GCE/BCNT-dsDNA. La R_{tc}, y en consecuencia el espesor, aumenta marcadamente hasta la segunda bicapa de PDDA/GOx, a continuación lo hace moderadamente para luego mantenerse constante a partir de la 3er bicapa. Estos resultados demuestran que el crecimiento de las capas de PDDA y GOx no es lineal y sugerirían que a partir de *n* = 3 no hay más adsorción de polielectrolito.

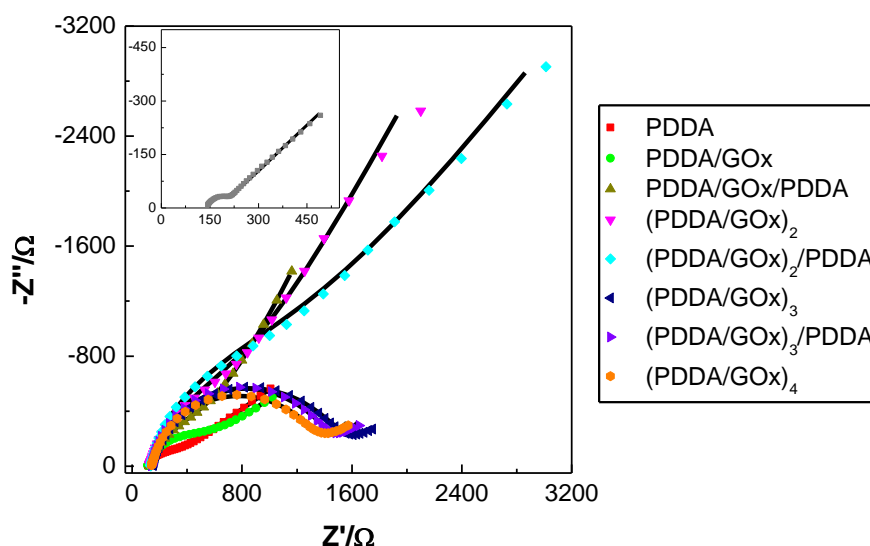


Figura 5.10. Gráficos de Nyquist obtenidos en solución de Q/H₂Q 2,00 x10⁻³ M sobre GCE/BCNT-dsDNA (mostrado en el inset) en función del autoensamblado LBL de PDDA y GOx. E_{dc} = 0,050 V. Amplitud = 10 mV. Rango de frecuencias = 10⁵ – 10⁻¹ Hz. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,100 M pH 7,40.

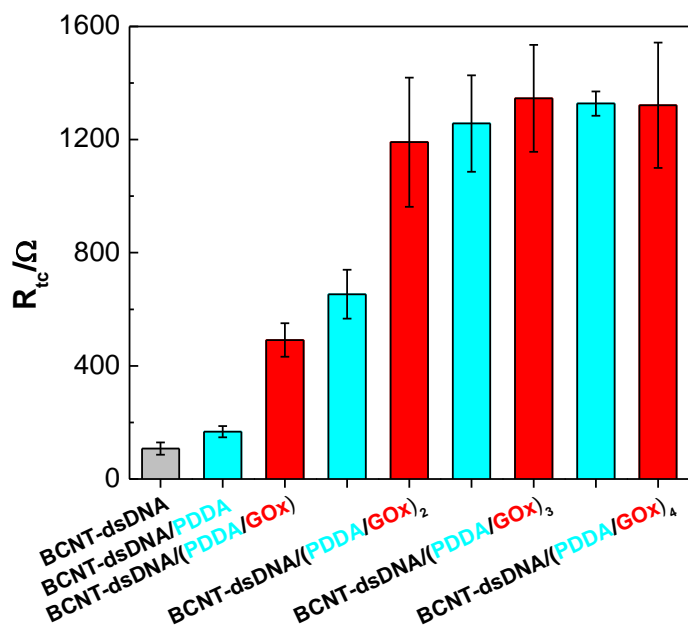


Figura 5.11. Dependencia de la adsorción de las capas de PDDA y GOx sobre GCE/BCNT-dsDNA con la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}), obtenida a partir de los ajustes de la **figura 5.10**. Las barras cian corresponden a R_{tc} de las capas terminadas en PDDA y las rojas, a las terminadas en GOx.

5.3.2.c. Estudio del proceso de adsorción: cantidad de masa

SPR también se utilizó para monitorear el autoensamblado LBL de PDDA y GOx. En la **figura 5.12** se muestra la variación de θ_{SPR} ($\Delta\theta_{SPR}$) en función del número de capas de PDDA y GOx ensambladas sobre BCNT-dsDNA. La misma presenta los valores del ángulo de SPR obtenidos luego de efectuado el lavado con el solvente correspondiente (ver **sección 2.8**).

En concordancia con los resultados de las sensibilidades (**figura 5.9**) y R_{tc} de Q/H₂Q (**figura 5.11**), $\Delta\theta_{SPR}$ experimenta un aumento marcado en la cantidad de masa adsorbida hasta la tercer bicapa. Por otro lado, también se puede observar que para cada bicapa (PDDA/GOx)_n la masa adsorbida de enzima es mayor que la de PDDA, lo cual está relacionado con las distintas morfologías que presentan ambos polímeros: mientras PDDA es un polímero lineal, GOx es una proteína globular.

En la **tabla 5.1** se encuentran tabulados los porcentajes de incremento a capa final de GOx respecto a la capa anterior de PDDA para los resultados obtenidos de R_{tc} de Q/H₂Q y $\Delta\theta_{SPR}$. Se puede observar que los mayores incrementos se dan en $\Delta\theta_{SPR}$, lo cual indica que la masa de polielectrolito adsorbida sobre la multiestructura crece en mayor medida que el espesor de las películas formadas. Esto se debe a que el autoensamblado de PDDA/GOx no forma películas estratificadas, sino que hay una interpenetración significativa entre las cadenas de los polímeros durante los sucesivos

ciclos de adsorción [5,48,49]. A pesar de haber un incremento en la masa en cada paso de adsorción, su relación no es lineal con el crecimiento de la multiestructura.

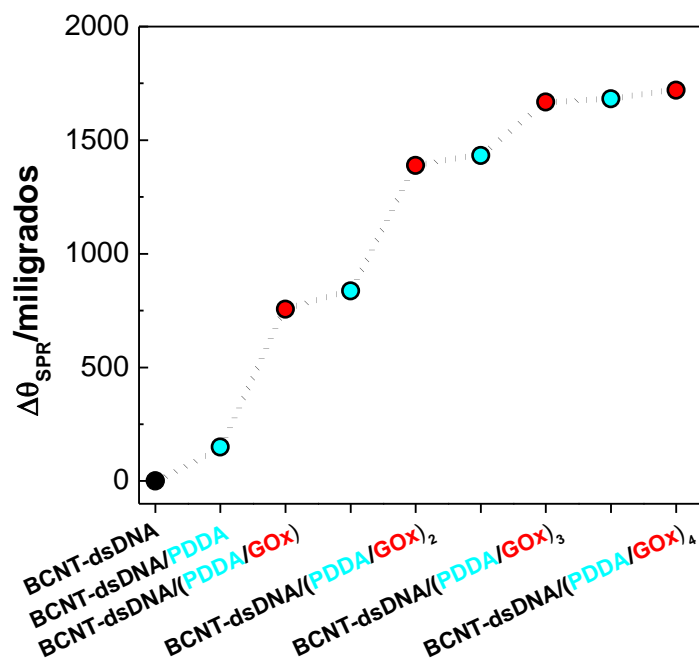


Figura 5.12. Variación del ángulo de SPR ($\Delta\theta_{SPR}$) obtenidos luego del ensamblado LBL de PDDA y GOx sobre GCE/BCNT-dsDNA.

Tabla 5.1. Porcentaje de incremento de R_{tc} (figura 5.10) y $\Delta\theta_{SPR}$ (figura 5.11) de una capa de $(GOx)_n$ respecto a la capa de $(PDDA)_n$ anterior.

Plataforma	% incremento de R_{tc}	% incremento de $\Delta\theta_{SPR}$
BCNT-dsDNA/PDDA/GOx	306	593
BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx) ₂	231	445
BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx) ₃	34	387
BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx) ₄	6	169

5.3.2.d. Análisis de la reversión de cargas

Uno de los factores determinantes en el crecimiento de multicapas por autoensamblado de polielectrolitos es el balance de las cargas en cada paso sucesivo [5,50,51]. Para evaluar esta variable, se realizaron experimentos de EIE con $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ya que al ser una cupla redox cargada negativamente, es sensible a los cambios en la densidad de carga superficial [52].

Los espectros de impedancia para las plataformas terminadas en PDDA se muestran en la **figura 5.13 A** y las terminadas en GOx, en la **figura 5.13 B**. Los espectros de las capas finalizadas en PDDA se ajustaron con un circuito de Randles, mientras que

los espectros de las capas terminadas en GOx se ajustaron con un circuito correspondiente al modelo de membrana capilar, de dos constantes de tiempo (**figura 2.8 B**). La presencia de dos constantes de tiempo en las superficies terminadas en GOx evidencia dos regiones superficiales con distintas propiedades y, en consecuencia, con dos k_0 para la transferencia de carga de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Una explicación para el comportamiento observado, es que la adsorción de la enzima sobre la capa subyacente de PDDA no genera un cubrimiento completo de la superficie y deja zonas cargadas positivamente. Esta reversión incompleta de cargas a nivel local ya ha sido descrita en otros sistemas enzima – polición [53] y está relacionada con las distintas morfologías de GOx y PDDA.

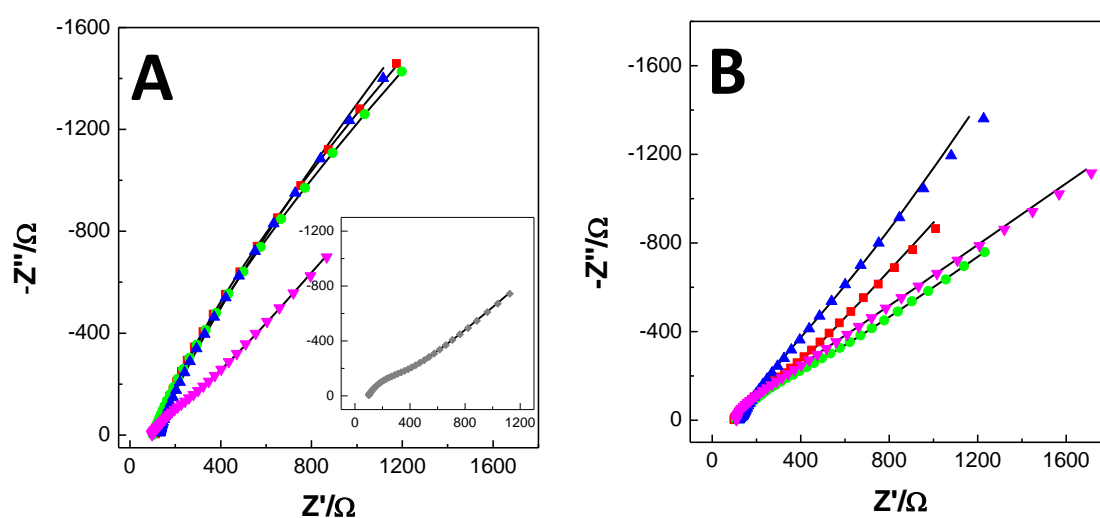


Figura 5.13. Gráficos de Nyquist obtenidos en solución de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M sobre GCE/BCNT-dsDNA (mostrado en el *inset* de **A**) en función del autoensamblado LBL de PDDA y GOx. **A** Espectros de impedancia correspondientes a: GCE/BCNT-dsDNA/PDDA (■), GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx/PDDA (●), GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₂/PDDA (▲), y GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₃/PDDA (▼). **B** Espectros de impedancia correspondientes a: GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx (■), GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₂ (●), GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₃ (▲), y GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₄ (▼). $E_{dc} = 0,250$ V. Otras condiciones como en la **figura 5.10**.

La **figura 5.14** presenta la variación en la R_{tc} total obtenida del ajuste de espectros de EIE en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,00 \times 10^{-3}$ M de la figura anterior, en función del número de capas de PDDA y GOx ensambladas sobre BCNT-dsDNA. Se observa un típico perfil zig-zag [54] de la R_{tc} total producto de la atracción/repulsión electrostática al ensamblar alternadamente PDDA/GOx, respectivamente, sobre el sustrato. Sin embargo, una inspección cuidadosa de la figura muestra que a partir de la tercera capa de GOx ensamblada hay un incremento marcado en las R_{tc} . Debido a la interpenetración de las capas (**sección 5.3.2.c**), la cual se acentúa a medida que n crece, la arquitectura supramolecular se hace más compacta y el efecto más importante que determina los

cambios en la constante de transferencia aparente de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ es el bloqueo superficial.

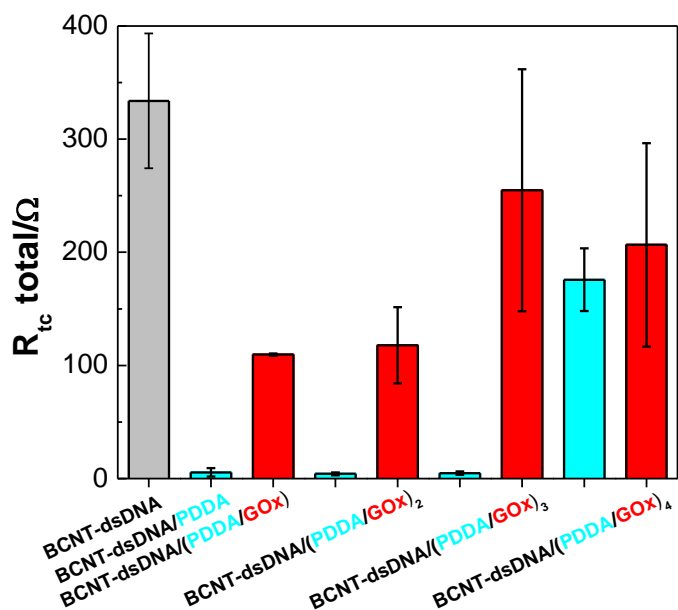


Figura 5.14. Dependencia de la resistencia a la transferencia de carga (R_{tc}) total con el autoensamblado LBL de PDDA y GOx sobre GCE/BCNT-dsDNA, obtenida del ajuste de los espectros de impedancia de la **figura 5.13**. Las barras cian corresponden a R_{tc} de las capas terminadas en PDDA y las rojas, a las terminadas en GOx.

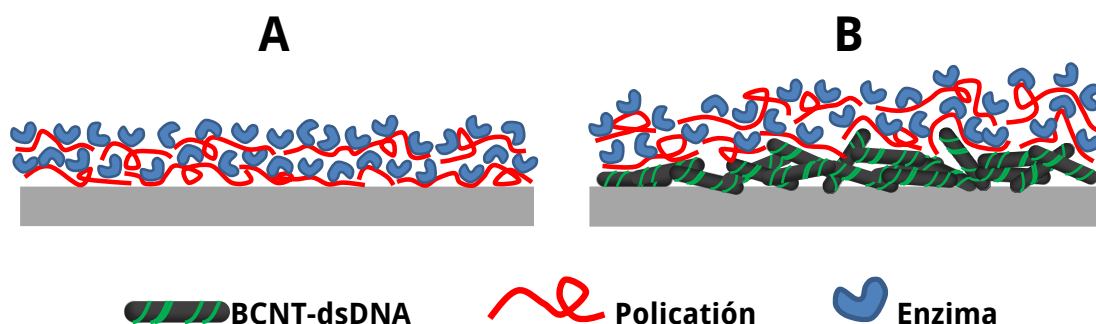


Figura 5.15. Esquema de la formación de multicapas polielectrolito/enzima sobre un sustrato plano (A) y sobre un sustrato modificado con una dispersión de BCNT-dsDNA (B).

La derivación más relevante del análisis de la R_{tc} total de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ es que la reversión se carga es menos eficiente al aumentar la interpenetración entre las películas. Esto se traduce en un crecimiento menos estratificado de las capas de $(\text{PDDA}/\text{GOx})_n$ conforme aumenta n y explica por qué se alcanza un máximo en las sensibilidades a glucosa (**sección 5.3.2.a**) y en la masa de enzima inmovilizada (**sección 5.3.2.c**). Si bien en bibliografía hay extensos reportes de crecimientos lineales o exponenciales en autoensamblado de polielectrolitos [5,51,55–57], ninguno de ellos usa como sustrato de partida una dispersión de CNTs. Se ha observado un comportamiento similar ensamblando GOx sobre una dispersión de HCNT con polihistidina [41]. Es

probable que este tipo de crecimiento en los autoensamblados se deba a la alta rugosidad de las superficies modificadas con CNT, lo cual favorece la interpenetración de las capas. Un esquema de lo anterior se muestra en la **figura 5.15**.

5.3.2.e. Evaluación del cubrimiento superficial de GOx bioactiva

La **figura 5.16** muestra los perfiles voltamperométricos obtenidos en solución de FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M sobre GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx en ausencia (—) y presencia de glucosa 0,30 M (—) y también para las bicapas con $n = 2$ (—), 3 (—), y 4 (—) en presencia de FcOH y glucosa.

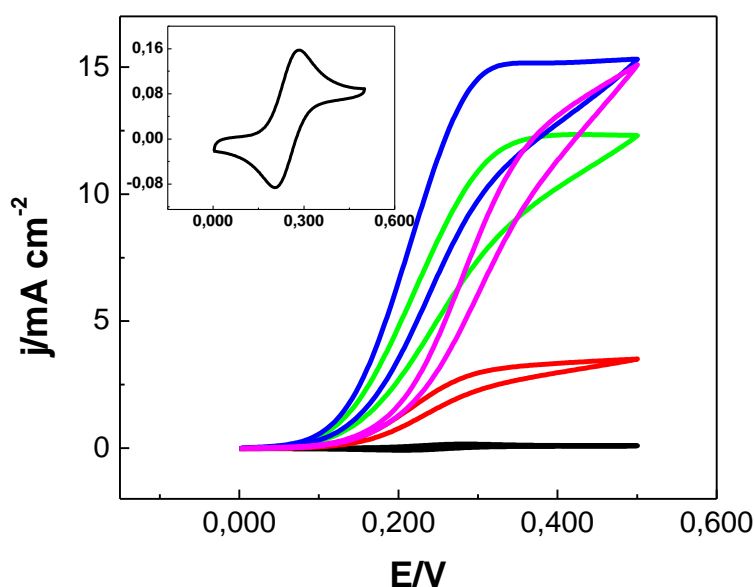
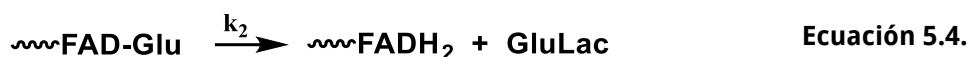


Figura 5.16. Perfiles voltamperométricos de FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M obtenidos sobre GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx en ausencia de glucosa (—) y en presencia de glucosa 0,30 M sobre GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx (—), GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₂ (—), GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₃ (—) y GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₄ (—). El *inset* muestra una ampliación del voltamperograma obtenido en ausencia de glucosa. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,100 M pH 7,40. $\nu = 0,005$ Vs⁻¹.

El perfil voltamperométrico obtenido sobre GCE/BCNT-dsDNA/PDDA/GOx en ausencia de glucosa (**figura 5.16**, línea negra) muestra el perfil típico de una cupla con difusión lineal semi-infinita (**sección 2.1.1**) [58]. En presencia de glucosa en condiciones de saturación (**figura 5.16**, línea roja) se obtiene un perfil sinusoidal como consecuencia de la oxidación catalítica de glucosa en presencia de GOx. Dado que la solución se encuentra desoxigenada, la regeneración del cofactor FAD es realizada por el mediador redox FcOH, de acuerdo al mecanismo mostrado en las **ecuaciones 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5**:





donde FAD y FADH₂ son las formas oxidada y reducida del cofactor, FAD-Glu es el complejo enzima-sustrato, y Glu y GluLac son glucosa y gluconolactona, respectivamente.

Como se puede observar en los perfiles voltamperométricos sinusoidales de la **figura 5.16**, al ensamblar un mayor número de bicapas PDDA/GOx aumenta la corriente catalítica debido a que se inmoviliza mayor cantidad de enzima. Si a cada voltamperograma realizado en presencia de glucosa se le sustrae el realizado en las mismas condiciones pero en ausencia del sustrato de GOx, se obtendrá la contribución del ciclo catalítico de la enzima (j_{cat}) a la respuesta electroquímica de FcOH. La j_{cat} fue utilizada para obtener la cobertura superficial de enzima bioactiva (Γ_{GOx}). Para obtener Γ_{GOx} en función del número de bicapas inmovilizadas sobre la plataforma se empleó el análisis cinético desarrollado por Moiroux y col. [59], considerando las mismas constantes de velocidad que las determinadas en solución para el mismo mediador redox [60]. En ausencia de limitaciones por transporte de masa, Γ_{GOx} puede ser derivada de los VC mostrados en la **figura 5.16**, usando la expresión para j_{cat} presentada en la **ecuación 5.6**.

$$\frac{1}{j_{cat}} = \frac{1}{2 F k_3 \Gamma_{GOx}^0} \frac{1}{[\text{FcOH}^{\bullet+}]_0} + \frac{1}{2 F \Gamma_{GOx}^0} \left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_{red} [\text{Glu}]} \right) \quad \text{Ecuación 5.6.}$$

En la **figura 5.17** se muestra el efecto del número de bicapas (PDDA/GOx)_n en Γ_{GOx} bioactiva, calculada según la **ecuación 5.6** a partir de los perfiles voltamperométricos de la **figura 5.16**. Se puede observar que Γ_{GOx} crece hasta la tercera bicapa, para luego mantenerse prácticamente constante. Esto confirma que a partir de $n = 3$ no se detecta el ensamblado de mayor cantidad de GOx bioactiva. Como se determinó anteriormente, la marcada interpenetración de las películas provocaría que el sitio activo de la enzima no esté disponible.

Este comportamiento se correlaciona con los resultados obtenidos con EIE y SPR y confirma que hasta $n = 3$ hay un crecimiento no lineal del autoensamblado, y que por encima de la tercer bicapa no se adsorbe más enzima bioactiva que genere una mejora en la sensibilidad a glucosa.

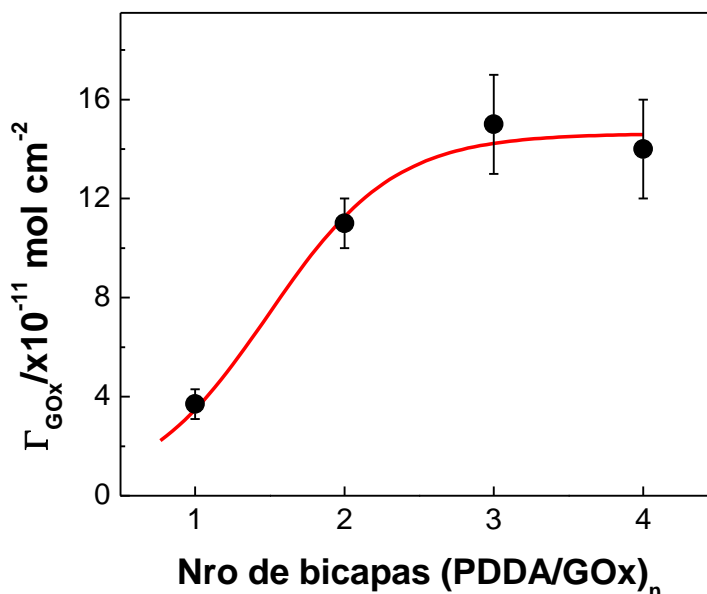


Figura 5.17. Concentración superficial de GOx bioactiva (Γ_{GOx}) en función del número de bicapas PDDA/GOx, obtenida de los perfiles voltamperométricos (**figura 5.15**) obtenidos para glucosa 0,30 M usando FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M como mediador redox.

5.3.3. Parámetros analíticos de GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n

5.3.3.a. Estudio de la selectividad y afinidad del biosensor

Las constantes de Michaelis-Menten aparentes (K_M^{ap}) para cada bicapa, obtenidas de diagramas de Eadie-Hofstee, fueron: $(1,8 \pm 0,7)$, $(0,62 \pm 0,08)$, y $(0,21 \pm 0,03)$ mM para la primera, segunda y tercer bicapa. La K_M^{ap} puede ser tomada como una medida de la fuerza de interacción entre la enzima y su sustrato dado que valores elevados de K_M^{ap} corresponden a un complejo débilmente ligado [61]. Teniendo en cuenta que los valores de K_M para GOx en solución oscilan entre 110 y 10 mM [62,63], la inmovilización de GOx no provoca cambios apreciables en la afinidad de la enzima por su sustrato.

Si bien la afinidad de GOx por la glucosa no varía significativamente, puede suceder que si se altere su selectividad respecto a la oxidación de otros azúcares, debido a un cambio conformacional en la enzima que altere el sitio activo [64–66]. Esto, a su vez, haría que el biosensor pierda su especificidad hacia el analito de interés provocando interferencia de otros compuestos.

Con el objeto de evaluar la selectividad del biosensor, en la **figura 5.18** se muestran los perfiles amperométricos a 0,700 V luego de agregados de fructosa, maltosa, galactosa y manosa $1,00 \times 10^{-3}$ M y glucosa $5,00 \times 10^{-4}$ M sobre GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n con $n = 1$ (**A**), 2 (**B**) y 3 (**C**).

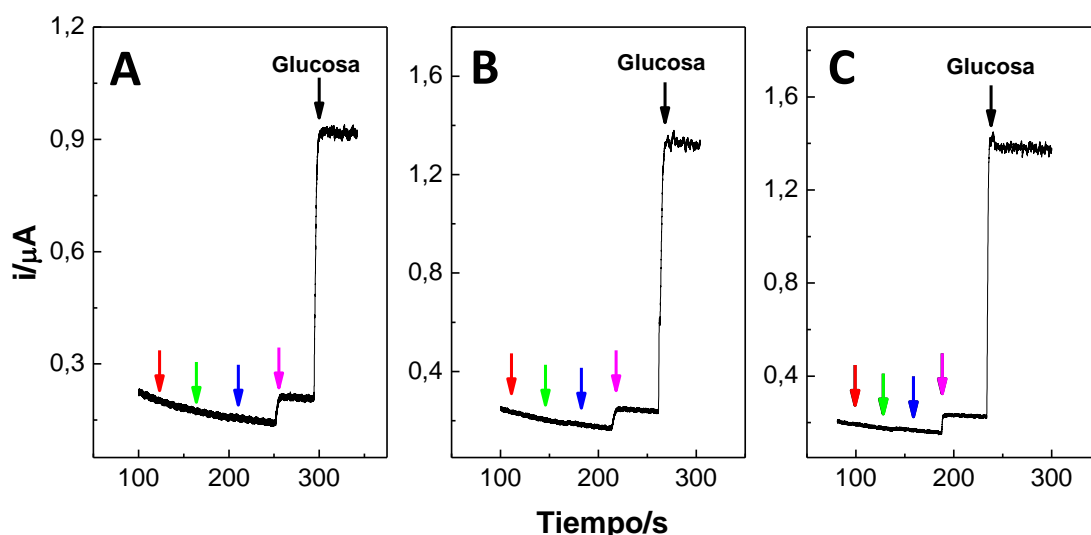


Figura 5.18. Respuesta amperométrica obtenida sobre GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n con $n = 1$ (A), 2 (B) y 3 (C) luego de la adición de fructosa (↓), galactosa (↓), manosa (↓) y maltosa (↓) $1,00 \times 10^{-3}$ M y glucosa (↓) $5,00 \times 10^{-4}$ M.

Se puede observar que fructosa, galactosa y manosa no interfieren en la determinación de glucosa dado que al agregar dichos glúcidos no se produce una corriente anódica. En el caso de maltosa, se observan interferencias del 9,8; 6,8; y 7,2 % respecto a la señal de glucosa. Sin embargo, los valores de interferencia se encuentran por debajo del 10%, considerado como límite analítico. La oxidación de maltosa por parte de la GOx se debe a que la misma es un dímero de la glucosa.

5.3.3.b. Desempeño analítico del biosensor

En la **tabla 5.2** se muestran los parámetros analíticos del biosensor. Como ya se discutió anteriormente, la mayor sensibilidad a glucosa se alcanza con la plataforma GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₃.

Tabla 5.2. Parámetros analíticos para GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n, con $n = 1, 2$ y 3.

	<i>Sensibilidad/μA mM⁻¹ cm⁻²</i>	<i>LOD/mM</i>	<i>Rango lineal/mM</i>
(PDDA/GOx) ₁	86 ± 7	0,10	Hasta 2,5
(PDDA/GOx) ₂	172 ± 9	0,10	Hasta 3,0
(PDDA/GOx) ₃	265 ± 7	0,05	Hasta 2,0

Por otro lado, se evaluó también la estabilidad a corto plazo midiendo 10 calibrados sucesivos con las distintas plataformas. Los resultados arrojaron una excelente estabilidad e, incluso con la plataforma GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)₄, hubo pérdida de sólo un 4,4 % de la sensibilidad luego de 180 min de uso continuo.

Tabla 5.3. Comparación de los valores de glucosa, en diversas muestras reales, obtenidos a través del biosensor propuesto con los valores reportados por los fabricantes.

<i>Muestra</i>	<i>Nro. de bicapas *</i>	<i>Valor encontrado</i>	<i>Valor reportado</i>	<i>Error</i>
Pepsi cola	1	(40 ± 4) mg mL ⁻¹	39 mg mL ⁻¹	2,5 %
Jugo Baggio de Naranja	1	(0,6 ± 0,1) x10 ² mg mL ⁻¹	66,25 mg mL ⁻¹	9,8 %
Spray nasal "Allenys"	1	2,6 ± 0,2 mg Glu/dosis	2,75 mg Glu/dosis	5,4 %
	2	2,9 ± 0,1 mg Glu/dosis		5,4 %
	3	2,9 ± 0,3 mg Glu/dosis		5,4 %

* Representa el valor de n en las plataformas GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n con las que se realizaron las cuantificaciones.

Cabe destacar que la sensibilidad a glucosa del biosensor propuesto es mejor a las reportadas en bibliografía [41,67–73], empleando estrategias similares de autoensamblado de CNT y GOx. Dadas las excepcionales propiedades analíticas del biosensor propuesto, el mismo se confrontó con diversas muestras reales (mostradas en la **tabla 5.3**) donde los valores obtenidos por la plataforma tuvieron una excelente correlación con la concentración de glucosa reportada por los fabricantes.

5.4. Conclusiones parciales

Los resultados presentados demuestran la utilidad de la dispersión de BCNT con dsDNA para la construcción de arquitecturas supramoleculares con fines analíticos. La característica de polielectrolito cargado negativamente del dsDNA que dispersa a los BCNT posibilitó autoensamblar GOx a través de la utilización de un polication (PDDA). Esto, combinado con las propiedades electrocatalíticas de BCNT hacia H₂O₂, posibilitó el desarrollo de un biosensor enzimático para glucosa.

Se demostró que debido a la fuerte interpenetración de las capas subyacentes, el proceso de reversión de cargas va disminuyendo su eficiencia conforme incrementa n , lo que se ve favorecido por las distintas morfologías de la enzima y el PDDA, y por la rugosidad superficial del depósito de BCNT-dsDNA sobre GCE. Todos los fenómenos anteriores hacen que la inmovilización de GOx sea menos eficiente y que para $n = 3$ la sensibilidad a glucosa sea máxima.

El entorno biocompatible de la multiestructura permitió que la enzima mantuviera su bioactividad y selectividad, posibilitando la aplicación del biosensor en la cuantificación sensible y selectiva de glucosa en muestras reales.

5.5. Bibliografía

- [1] T.W. Tsai, G. Heckert, L.F. Neves, Y. Tan, D.Y. Kao, R.G. Harrison, et al., Adsorption of glucose oxidase onto single-walled carbon nanotubes and its application in layer-by-layer biosensors, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7917–7925.
- [2] A. Shukla, B. Almeida, *Advances in cellular and tissue engineering using layer-by-layer assembly*, Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology. 6 (2014) 411–421.
- [3] V. Gribova, R. Auzely-Velty, C. Picart, *Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering*, *Chem. Mater.* 24 (2012) 854–869.
- [4] K. Sato, S. Takahashi, J. Anzai, *Layer-by-layer Thin Films and Microcapsules for Biosensors and Controlled Release*, *Anal. Sci.* 28 (2012) 929–938.
- [5] J. Borges, J.F. Mano, *Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers*, *Chem. Rev.* 114 (2014) 8883–8942.
- [6] L.L. del Mercato, M.M. Ferraro, F. Baldassarre, S. Mancarella, V. Greco, R. Rinaldi, et al., *Biological applications of LbL multilayer capsules: From drug delivery to sensing*, *Adv. Colloid Interface Sci.* 207 (2014) 139–154.
- [7] Y. Wang, A.S. Angelatos, F. Caruso, *Template Synthesis of Nanostructured Materials via Layer-by-Layer Assembly*, *Chem. Mater.* 20 (2008) 848–858.
- [8] L.L. Del Mercato, P. Rivera-Gil, A.Z. Abbasi, M. Ochs, C. Ganas, I. Zins, et al., *LbL multilayer capsules: Recent progress and future outlook for their use in life sciences*, *Nanoscale.* 2 (2010) 458–467.
- [9] Y. Xiang, S. Lu, S.P. Jiang, *Layer-by-layer self-assembly in the development of electrochemical energy conversion and storage devices from fuel cells to supercapacitors*, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7291–7321.
- [10] C.F. Narambuena, D.M. Beltramo, E.P.M. Leiva, *Polyelectrolyte Adsorption on a Charged Surface. A Study by Monte Carlo Simulations*, *Macromolecules.* 40 (2007) 7336–7342.
- [11] B. Qiao, J.J. Cerdà, C. Holm, *Poly(styrenesulfonate)–Poly(diallyldimethylammonium) Mixtures: Toward the Understanding of Polyelectrolyte Complexes and Multilayers via Atomistic Simulations*, *Macromolecules.* 43 (2010) 7828–7838.
- [12] V. Ball, A. Laachachi, V. Toniazzo, D. Ruch, *Influence of the nature of the polycation on the adsorption kinetics and on exchange processes in polyelectrolyte multilayer films*, *J. Colloid Interface Sci.* 366 (2012) 96–104.
- [13] *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*, *Diabetes Care.* 31 (2008) S55–S60.
- [14] H.M.E. Azzazy, A.H.A. Elbehery, *Clinical laboratory data: Acquire, analyze, communicate, liberate*, *Clin. Chim. Acta.* 438 (2014) 186–194.
- [15] V. Lodwig, B. Kulzer, O. Schnell, L. Heinemann, *Current trends in continuous glucose monitoring*, *J. Diabetes Sci. Technol.* 8 (2014) 390–396.
- [16] A.L. Galant, R.C. Kaufman, J.D. Wilson, *Glucose: Detection and Analysis*, *Food Chem.* 188 (2015) 149–160.
- [17] C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan, et al., *Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review*, *RSC Adv.* 3 (2013) 4473–4491.
- [18] J. Wang, *Electrochemical glucose biosensors*, *Chem. Rev.* 108 (2008) 814–825.
- [19] K. Tian, M. Prestgard, A. Tiwari, *A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors*, *Mater. Sci. Eng. C.* 41 (2014) 100–118.
- [20] P. Si, Y. Huang, T. Wang, J. Ma, *Nanomaterials for electrochemical non-enzymatic glucose biosensors*, *RSC Adv.* 3 (2013) 3487–3502.
- [21] M.M. Rahman, A.J.S. Ahammad, J.-H. Jin, S.J. Ahn, J.-J. Lee, *A Comprehensive Review of*

- Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides, *Sensors*. 10 (2010) 4855–4886.
- [22] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45.
- [23] A. Heller, B. Feldman, Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2482–2505.
- [24] H.M. Kalisz, H.-J. Hecht, D. Schomburg, R.D. Schmid, Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1080 (1991) 138–142.
- [25] H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid, Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1997) 502–507.
- [26] S.B. Bankar, M. V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase - An overview, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 489–501.
- [27] M. Saleem, H. Yu, L. Wang, Zain-ul-Abdin, H. Khalid, M. Akram, et al., Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing, *Anal. Chim. Acta.* 876 (2015) 9–25.
- [28] R. Fogel, J.L. Limson, Probing fundamental film parameters of immobilized enzymes - Towards enhanced biosensor performance. Part II - Electroanalytical estimation of immobilized enzyme performance, *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 153–159.
- [29] R. Fogel, J.L. Limson, Probing fundamental film parameters of immobilized enzymes - Towards enhanced biosensor performance. Part I - QCM-D mass and rheological measurements, *Enzyme Microb. Technol.* 49 (2011) 146–152.
- [30] Z. Zhu, L. Garcia-Gancedo, A.J. Flewitt, H. Xie, F. Moussy, W.I. Milne, A Critical Review of Glucose Biosensors Based on Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes and Graphene, *Sensors*. 12 (2012) 5996–6022.
- [31] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech.* 3 (2013) 1–9.
- [32] N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Equip.* 29 (2015) 205–220.
- [33] E.P. Cipolatti, M.J.A. Silva, M. Klein, V. Feddern, M.M.C. Feltes, J.V. Oliveira, et al., Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 99 (2014) 56–67.
- [34] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511.
- [35] A. Walcarius, S.D. Minter, J. Wang, Y. Lin, A. Merkoçi, Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 4878.
- [36] N. Yang, X. Chen, T. Ren, P. Zhang, D. Yang, Carbon nanotube based biosensors, *Sensors Actuators B Chem.* 207 (2015) 690–715.
- [37] Z. Wang, Z. Dai, Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview, *Nanoscale.* 7 (2015) 6420–6431.
- [38] E.N. Primo, F.A. Gutierrez, G.L. Luque, P.R. Dalmaso, A. Gasnier, Y. Jalit, et al., Comparative study of the electrochemical behavior and analytical applications of (bio)sensing platforms based on the use of multi-walled carbon nanotubes dispersed in different polymers, *Anal. Chim. Acta.* 805 (2013) 19–35.
- [39] Y. Zhang, M.A. Arugula, J.S. Kirsch, X. Yang, E. Olsen, A.L. Simonian, Layer-by-Layer Assembled Carbon Nanotube-Acetylcholinesterase/Biopolymer Renewable Interfaces: SPR and Electrochemical Characterization, *Langmuir.* 31 (2015) 1462–1468.

- [40] D. Lee, T. Cui, Layer-by-layer self-assembly of single-walled carbon nanotubes with amine-functionalized weak polyelectrolytes for electrochemically tunable pH sensitivity, *Langmuir*. 27 (2011) 3348–3354.
- [41] P.R. Dalmasso, M.L. Pedano, G.A. Rivas, Supramolecular architecture based on the self-assembling of multiwall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine and glucose oxidase: Characterization and analytical applications for glucose biosensing, *Biosens. Bioelectron.* 39 (2013) 76–81.
- [42] M. Ma, Z. Miao, D. Zhang, X. Du, Y. Zhang, C. Zhang, et al., Highly-ordered perpendicularly immobilized FWCNTs on the thionine monolayer-modified electrode for hydrogen peroxide and glucose sensors, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 477–484.
- [43] Y. Zhang, M.A. Arugula, M. Wales, J. Wild, A.L. Simonian, A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 287–295.
- [44] X. Zhu, Y. Zhou, D. Yan, Influence of branching architecture on polymer properties, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 49 (2011) 1277–1286.
- [45] Y. Zhou, D. Yan, Self-Assembly of Hyperbranched Polymers, in: S. Kobayashi, K. Müllen (Eds.), *Encycl. Polym. Nanomater. SE - 27-1*, Springer Berlin Heidelberg, 2014: pp. 1–11.
- [46] J. Medina-Ramos, T.M. Alligrant, A. Clingenpeel, J.C. Alvarez, Comparing the Hydrogen-Bonding Effect of Bronsted Bases in Solution and When They Are Covalently Bound to the Surface of Glassy Carbon Electrodes in the Electrochemical Behavior of Hydroquinone, *J. Phys. Chem. C*. 116 (2012) 20447–20457.
- [47] R.L. McCreery, *Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry*, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2646–2687.
- [48] M. Gopinadhan, O. Ivanova, H. Ahrens, J.-U. Günther, R. Steitz, C.A. Helm, The Influence of Secondary Interactions during the Formation of Polyelectrolyte Multilayers: Layer Thickness, Bound Water and Layer Interpretation, *J. Phys. Chem. B*. 111 (2007) 8426–8434.
- [49] G. Liu, J. Zhao, Q. Sun, G. Zhang, Role of chain interpenetration in layer-by-layer deposition of polyelectrolytes, *J. Phys. Chem. B*. 112 (2008) 3333–3338.
- [50] F.N. Crespilho, V. Zucolotto, O.N. Oliveira, F.C. Nart, Electrochemistry of layer-by-layer films: A review, *Int. J. Electrochem. Sci.* 1 (2006) 194–214.
- [51] R.M. Iost, F.N. Crespilho, Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics, *Biosens. Bioelectron.* 31 (2012) 1–10.
- [52] T. Noguchi, J. Anzai, 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.
- [53] J.C. Antunes, C.L. Pereira, M. Molinos, F. Ferreira-da-Silva, M. Dessi, a Gloria, et al., Layer-by-Layer Self-Assembly of Chitosan and Poly(gamma-glutamic acid) into Polyelectrolyte Complexes, *Biomacromolecules*. 12 (2011) 4183–4195.
- [54] E. Vázquez, A.E. Aguilar, I. Moggio, E. Arias, J. Romero, H. Barrientos, et al., Immobilization of the enzyme β -lactamase by self-assembly on thin films of a poly(phenyleneethynylene) sequenced with flexible segments containing sulfur atoms, *Mater. Sci. Eng. C*. 27 (2007) 787–793.
- [55] É. Lojou, P. Bianco, Buildup of polyelectrolyte-protein multilayer assemblies on gold electrodes. Role of the hydrophobic effect, *Langmuir*. 20 (2004) 748–755.
- [56] D. Kovačević, S. Glavanović, N. Peran, Application of optical reflectometry for characterization of polyelectrolyte-protein multilayers, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 277 (2006) 177–182.

- [57] M. Houska, E. Brynda, K. Bohatá, The effect of polyelectrolyte chain length on layer-by-layer protein/polyelectrolyte assembly - An experimental study, *J. Colloid Interface Sci.* 273 (2004) 140–147.
- [58] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2001.
- [59] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Gueris, J. Moiroux, J.-M. Savéant, A Fully Active Monolayer Enzyme Electrode Derivatized by Antigen-Antibody Attachment, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 12264–12269.
- [60] N. Ferreyra, L. Coche-Guérente, P. Labbé, Construction of layer-by-layer self-assemblies of glucose oxidase and cationic polyelectrolyte onto glassy carbon electrodes and electrochemical study of the redox-mediated enzymatic activity, *Electrochim. Acta.* 49 (2004) 477–484.
- [61] P.N. Bartlett, G.-S. Toh, Kinetic modeling for biosensors, in: J.M. Cooper, A.E.G. Cass (Eds.), *Biosensors*, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, 2004: pp. 59–96.
- [62] G. Palestino, R. Legros, V. Agarwal, E. Pérez, C. Gergely, Functionalization of nanostructured porous silicon microcavities for glucose oxidase detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 135 (2008) 27–34.
- [63] H.-Z. Zhao, J.-J. Sun, J. Song, Q.-Z. Yang, Direct electron transfer and conformational change of glucose oxidase on carbon nanotube-based electrodes, *Carbon N. Y.* 48 (2010) 1508–1514.
- [64] V. Panchagnula, C. V. Kumar, J.F. Rusling, Ultrathin layered myoglobin-polyion films functional and stable at acidic pH values, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 12515–12521.
- [65] C.D. Heyes, A.Y. Kobitski, E. V. Amirgoulova, G.U. Nienhaus, Biocompatible surfaces for specific tethering of individual protein molecules, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 13387–13394.
- [66] A. Sethuraman, M. Han, R.S. Kane, G. Belfort, Effect of surface wettability on the adhesion of proteins, *Langmuir.* 20 (2004) 7779–7788.
- [67] Y. Sun, H. Wang, C. Sun, Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer covalent attachment of AMWNTs and IO₄⁻-oxidized GOx, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 22–28.
- [68] Y. Zou, C. Xiang, L. Sun, F. Xu, Amperometric glucose biosensor prepared with biocompatible material and carbon nanotube by layer-by-layer self-assembly technique, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 4089–4095.
- [69] P. Si, P. Kannan, L. Guo, H. Son, D.-H. Kim, Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3845–3851.
- [70] M.M. Barsan, M. David, M. Florescu, L. Tugulea, C.M.A. Brett, A new self-assembled layer-by-layer glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped graphene, *Bioelectrochemistry.* 99 (2014) 46–52.
- [71] J.L. Deluca, D.P. Hickey, D.A. Bamper, D.T. Glatzhofer, M.B. Johnson, D.W. Schmidtke, Layer-by-Layer Assembly of Ferrocene-Modified Linear Polyethylenimine Redox Polymer Films, *ChemPhysChem.* 14 (2013) 2149–2158.
- [72] J. Tian, P.-X. Yuan, D. Shan, S.-N. Ding, G.-Y. Zhang, X.-J. Zhang, Biosensing platform based on graphene oxide via self-assembly induced by synergic interactions, *Anal. Biochem.* 460 (2014) 16–21.
- [73] Y. Zhang, Y. Li, W. Wu, Y. Jiang, B. Hu, Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 60 (2014) 271–276.

RESULTADOS

- PARTE B -

**Plataformas (bio)analíticas
basadas en el
uso de nanomateriales
derivados de grafeno**

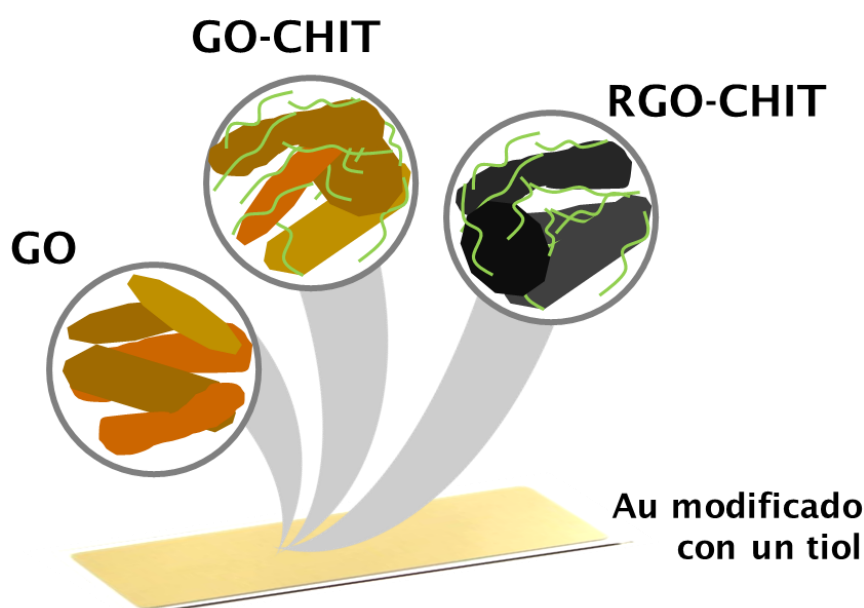
CAPÍTULO 6

Funcionalización e inmovilización de nanomateriales derivados de grafeno

Caracterización para el
desarrollo de plataformas
electroactivas y
plasmónicas

RESUMEN

Una de las consideraciones clave para el desarrollo de biosensores es la inmovilización del elemento de bio-reconocimiento sobre la superficie del sustrato sensor, dado que la base de la detección de la molécula *target* se sustenta en la interacción con dicha superficie. Así, en el presente capítulo se propone el estudio crítico de distintas maneras de inmovilizar materiales derivados de grafeno como sustratos para incorporar biomoléculas. Los materiales empleados fueron óxido de grafeno (GO), GO modificado covalentemente con quitosano (CHIT) y GO-CHIT reducido químicamente (RGO-CHIT). Se analizaron diferentes estrategias de inmovilización covalentes y no covalentes sobre sustratos de Au, evaluando principalmente la capacidad de unir proteínas. Se estudiaron las propiedades electroquímicas de las plataformas resultantes a partir de experimentos de EIE con Q/H₂Q y [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, la reactividad electroquímica superficial con SECM y los procesos de inmovilización con SPR. Estos resultados se correlacionaron con la cantidad de material de grafeno inmovilizado y de proteína unida.



6.1. Introducción

6.1.1. Funcionalización de nanomateriales derivados de grafeno con polímeros y biomoléculas

El GO (**figura 6.1**) puede ser descrito como una lámina gráfica con regiones aromáticas (átomos de C tipo sp^2) distribuidas aleatoriamente y regiones oxigenadas alifáticas (átomos de C tipo sp^3) conteniendo grupos hidroxilo, epoxi, carbonilo y carboxilo [1]. La presencia de estos grupos le confiere al GO tres características importantes: el carácter aislante (debido a la interrupción de la red conjugada sp^2), la elevada estabilidad coloidal (debido a la ionización de los grupos carboxilos y estabilización por repulsión de cargas) y la posibilidad de ser derivatizado (gracias a la química de los grupos carboxilo e hidroxilo) [2]. Esta última característica ha sido ampliamente utilizada para la inmovilización de macromoléculas de interés bioanalítico como capa de reconocimiento, tales como secuencias de DNA, enzimas, aptámeros y anticuerpos [3,4].

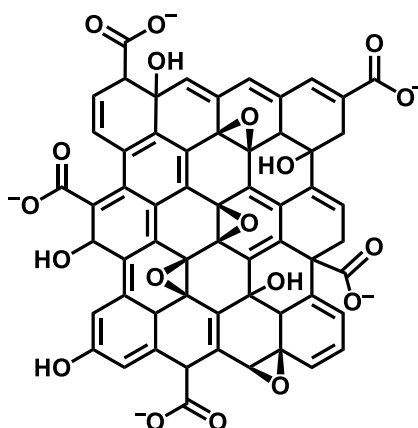


Figura 6.1. Estructura propuesta del GO.

La gran ventaja de la modificación covalente de GO a través de sus grupos carboxilos e hidroxilos es la estabilidad que brinda este tipo de funcionalización frente a las no covalentes (en términos de uso continuo de las plataformas, pérdida de capa de bio-reconocimiento, cambios estructurales frente al pH/temperatura, entre otras). Además, luego de la modificación se puede recuperar parcialmente la estructura sp^2 conductora del grafeno (ver la **sección 1.2**) dado que no hay modificación estructural drástica de los anillos de 6 C [5]. Esto último se puede observar en el esquema la **figura 6.1**, dado que los grupos carboxilo e hidroxilo se encuentran mayormente en los bordes del GO.

La manera más común de enlazar covalentemente moléculas al GO es a través de los agentes acoplantes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-

hidroxisuccinimida (NHS) [6]. Como se muestra en la reacción de la **figura 6.2 A**, el EDC ataca el grupo carboxilo del GO para formar un intermediario poco estable debido a la elevada velocidad de hidrólisis del éster formado. Sin embargo, la presencia de NHS forma un éster de amina de mayor estabilidad que actúa como excelente grupo saliente para el acoplamiento con un grupo amino de un polímero ó biomolécula [2,6]. Esta estrategia fue utilizada para la inmovilización de polietilenglicol [7,8], quitosano [9], poli(etilenimina) para liberación controlada de fármacos [10], de poli(vinilalcohol) como refuerzo en materiales compósitos [11]; y de diversos cromóforos [12].

Otras metodologías para la funcionalización de GO incluyen la silanización de los grupos hidroxilo [13] y la polimerización por transferencia de radicales [14] sobre la red de C sp². Hsiao y col. estudiaron diversas maneras de modificar covalentemente el GO y encontraron que las estrategias basadas en el uso de los grupos funcionales oxigenados del GO brindaron mejores cubrimientos y con mayor estabilidad térmica frente a las radicalarias [15].

La inmovilización de proteínas y ácidos nucleicos reviste de gran importancia en el campo de la química analítica debido a que estas biomoléculas actúan como capa de bio-reconocimiento en el desarrollo de biosensores [5,16]. En este sentido, los materiales derivados del grafeno son candidatos ideales para servir de soporte de biomoléculas y actuar como transductores del evento de bio-reconocimiento en biosensores electroquímicos, ópticos y plasmónicos [16–18]. Como se mencionó anteriormente, su importancia y amplia aplicabilidad se debe a las múltiples posibilidades de funcionalización que poseen estos nanomateriales [19].

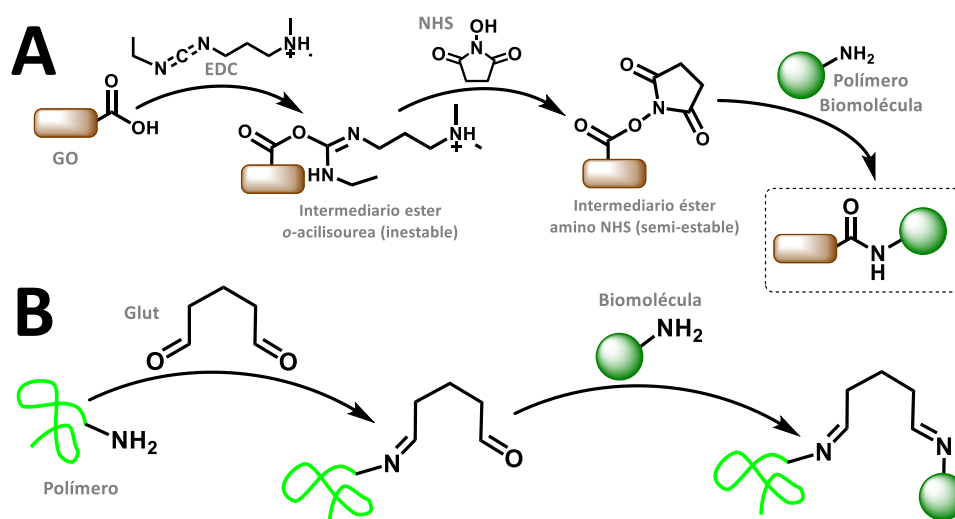


Figura 6.2. A Representación de la reacción de acoplamiento de los grupos carboxilato del GO con grupos amino de polímeros o biomolécula a través de los agentes de acoplamiento EDC/NHS. **B** Representación de la reacción de acoplamiento entre el glutaraldehído (Glut) y los grupos amino de un polímero y una biomolécula.

El GO y diversos tipos de GO reducidos térmica, química, electroquímica e hidrotérmicamente han sido empleados para inmovilizar biomoléculas [18,20–22]. La unión covalente de las mismas se lleva a cabo usando los agentes de acoplamiento EDC/NHS (**figura 6.2 A**) o utilizando el agente entrecruzante glutaraldehído (Glut), de acuerdo al esquema mostrado en la **figura 6.2 B**. Se debe derivatizar a los nanomateriales de grafeno con grupos $-NH_2$ dado que el Glut actúa como acoplante de aminas [23].

Siguiendo algunas de las dos estrategias anteriores (EDC/NHS o Glut), se inmovilizó sobre nanomateriales derivados del grafeno a biomoléculas como GOx [24], peroxidasa de rábano (HRP) [25,26], albúmina sérica bovina [27], proteasa alcalina [28], y diversos anticuerpos monoclonales para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos [29–33]. En todos los casos anteriores, los híbridos proteína-GO están incorporados en arquitecturas más complejas junto con polímeros y nanopartículas metálicas y de óxidos.

6.1.2. Factores que afectan la inmovilización de proteínas sobre nanomateriales derivados del grafeno

Una de las consideraciones clave para la fabricación de biosensores es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre la superficie de la plataforma. En bibliografía se han reportado tres técnicas de modificación de derivados del grafeno con biomoléculas (**figura 6.3**): adsorción física (**a**), unión covalente (**b**), e interacción de afinidad con alguna molécula que oriente el enlace (**c**). Loo y col. [34] estudiaron el efecto del tipo de inmovilización de un aptámero anti-trombina sobre electrodos modificados con GO en la capacidad de reconocer a su proteína *target*. Los autores concluyeron que en términos de estabilidad las tres metodologías presentaron resultados similares. Respecto a la selectividad y sensibilidad, los electrodos con las metodologías **a** y **b** presentaron la mejor respuesta [34].

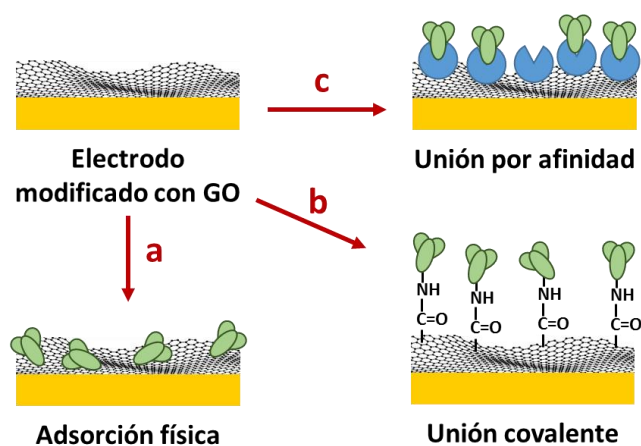


Figura 6.3. Representación esquemática de los protocolos de inmovilización de una proteína con propiedades de bio-reconocimiento (en color verde) sobre un sustrato modificado con GO: fisisorción (**a**), inmovilización covalente a través de los agentes de acoplamiento EDC/NHS (**b**), y unión mediante interacción de afinidad avidina/biotina (**c**).

Alwarappan y col. [35] intentaron relacionar el número de capas de GO reducido (RGO) con la cantidad y actividad de la enzima GOx inmovilizada. A partir de la modificación de GCE mediante por deposición de dispersiones de RGO de una capa, pocas capas y multicapas y posterior adsorción física de la enzima, los autores determinaron que tanto la cantidad como la actividad de GOx eran iguales en todos los electrodos [35]. Por otro lado, Zhang y col. [36] evaluaron el efecto del grado de reducción en muestras de RGO sobre la actividad y cantidad de enzimas HRP y oxalato oxidasa (OOx) inmovilizadas no covalentemente. Se encontró que si bien al aumentar el grado de hidrofobicidad (tiempo de reducción) de RGO se incrementa la cantidad de HRP y OOx inmovilizadas, esto también provoca una pérdida de actividad de las enzimas [36]. Se han reportado otros estudios en bibliografía respecto a la relación entre la actividad/cantidad de proteína y alguna característica estructural del grafeno, con resultados contradictorios entre sí [19,37-39].

Otro de los factores a tener en cuenta es la metodología con la que se incorporan los nanomateriales derivados del grafeno sobre los sustratos sólidos que actúan como transductores. Las estrategias reportadas en bibliografía son:

- Incorporación no covalente de la proteína en dispersiones de GO/RGO con polímeros y otros nanomateriales inorgánicos y la posterior modificación del sustrato mediante la metodología de *drop-casting* [18,40,41].
- Autoensamblado LBL de enzimas con GO/RGO y polímeros sobre el sustrato, mediado por interacciones electrostáticas [42].
- Inmovilización covalente de GO/RGO sobre sustratos sólidos derivatizados a través de los grupos carboxilato de GO ó grupos funcionales introducidos en GO/RGO [41,43,44].

A pesar de los limitados avances en términos de estudios fundamentales de la sinergia grafeno-proteína, la asociación de estas biomoléculas (enzimas o anticuerpos) con nanomateriales derivados del grafeno es un campo en pleno auge y es ampliamente utilizada como estrategia para el desarrollo de biosensores electroquímicos y plasmónicos. En este sentido, se requiere del diseño de metodologías simples y reproducibles, poniendo énfasis en la inmovilización de una mayor cantidad de biomoléculas con propiedades de bio-reconocimiento. Se evidencia en bibliografía una falta de estudios fundamentales que establezcan una relación entre la señal analítica, la elección del nanomaterial de grafeno y la cantidad de proteína inmovilizada.

En el presente capítulo, se discuten diversas estrategias de inmovilización de nanomateriales derivados del grafeno sobre sustratos de Au con especial énfasis en la influencia de éstos sobre las propiedades electroquímicas y ópticas de las plataformas resultantes y su relación con la cantidad de proteína inmovilizada. El objetivo es encontrar una metodología de incorporación de GO y/o RGO sobre Au a los fines de

maximizar la sensibilidad y la masa de proteína inmovilizada, ya que ésta es la que le brinda la especificidad a la plataforma como capa de bio-reconocimiento. Los nanomateriales estudiados fueron el GO, GO modificado con quitosano (CHIT, un polímero rico en grupos amino) y GO-CHIT reducido químicamente (RGO-CHIT). El ensamblado sobre los sustratos de Au se realizó de manera no covalente (mediante autoensamblado LBL) y covalentemente (a través del agente de acoplamiento Glut). Se estudiaron las propiedades electroquímicas a través de EIE y SECM utilizando FcOH como sonda redox, y las propiedades ópticas a través de espectroscopia UV-Vis y SPR. En todos los casos, se evaluó la capacidad de inmovilizar una proteína modelo, la albúmina sérica bovina (BSA), a través de la determinación de los cubrimientos superficiales.

6.2. Metodología experimental

6.2.1. Síntesis de GO-CHIT y RGO-CHIT

Se utilizó una dispersión comercial de GO (4 mg mL⁻¹, Graphenea) y CHIT (bajo peso molecular, 20-300 cP, Sigma-Aldrich). En primer lugar, se preparó una solución de CHIT 2,00 mg mL⁻¹, disolviendo al polímero en *buffer* de ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) 0,100 M pH 5,00 y sonicando durante 2 horas.

Una vez disuelto el CHIT, se agregó la dispersión de GO (hasta llegar a una concentración final de 1,25 mg mL⁻¹) y se llevó a baño de ultrasonido por 2 horas con el fin de dispersar el coloide con el polímero. Para la modificación covalente, se adicionó EDC 0,100 M y NHS 0,100 M con el fin de favorecer la formación de enlaces amida. Se sonicó nuevamente durante 2 horas y luego se mantuvo en agitación durante toda la noche para completar la reacción.

La purificación de GO-CHIT se llevó a cabo centrifugando durante 60 min a 14000 rpm y resuspendiendo en *buffer* MES 0,100 M pH 5,00, repitiendo dicho procedimiento 4 veces. Para obtener RGO-CHIT, se redujo químicamente el GO-CHIT mediante el agregado de exceso de NaBH₄ a la dispersión y se agitó durante un día. El lavado de RGO-CHIT se realizó siguiendo el procedimiento anterior.

6.2.2. Limpieza y preparado de los sustratos de Au

Los electrodos de Au fueron pretratados de acuerdo al protocolo de la **sección 2.10.3**. Para los experimentos de SPR, se utilizaron discos de Au BK7 y el acondicionamiento utilizado es el informado en **sección 2.8.1**. La inmovilización del tiol y los nanomateriales derivados de grafeno sobre los dos sustratos de Au se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento.

6.2.2.a. Ensamblado no covalente de GO, GO-CHIT y RGO-CHIT

Las estrategias de inmovilización no covalente se llevaron a cabo mediante la metodología de autoensamblado LBL. Para ello se derivatizaron en primer lugar los sustratos de Au con el tiol 3-mercaptopropan-sulfonato de sodio (MPS) de acuerdo al procedimiento indicado en la **sección 2.11.1**. Esta modificación le confiere a la superficie de Au una densidad de cargas negativas, que sirve de punto de anclaje para el ensamblado posterior de GO y GO/RGO-CHIT. En el primer caso, para poder inmovilizar al GO cargado negativamente, es necesario incorporar una capa previa de un polielectrolito. Como se muestra en la **figura 6.4 A**, Au/MPS se sumergió en una solución de PDDA 1,00 mg mL⁻¹ preparada en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 durante 15 min. Luego, el GO se adsorbe sobre Au/MPS/PDDA a partir de una dispersión de GO 0,50 mg mL⁻¹ durante 30 min para obtener la plataforma AU/MPS/PDDA/GO. Finalmente, la BSA se inmovilizó covalentemente activando los grupos carboxilato expuestos del GO sobre Au/MPS/PDDA/GO con los agentes de acoplamiento EDC/NHS durante 20 min y luego poniendo en contacto por 30 min a la plataforma activada con solución de BSA 1,00 mg mL⁻¹ preparada en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 (**figura 6.4 A**). La evaluación de la cantidad de proteína inmovilizada se realiza mediante SPR.

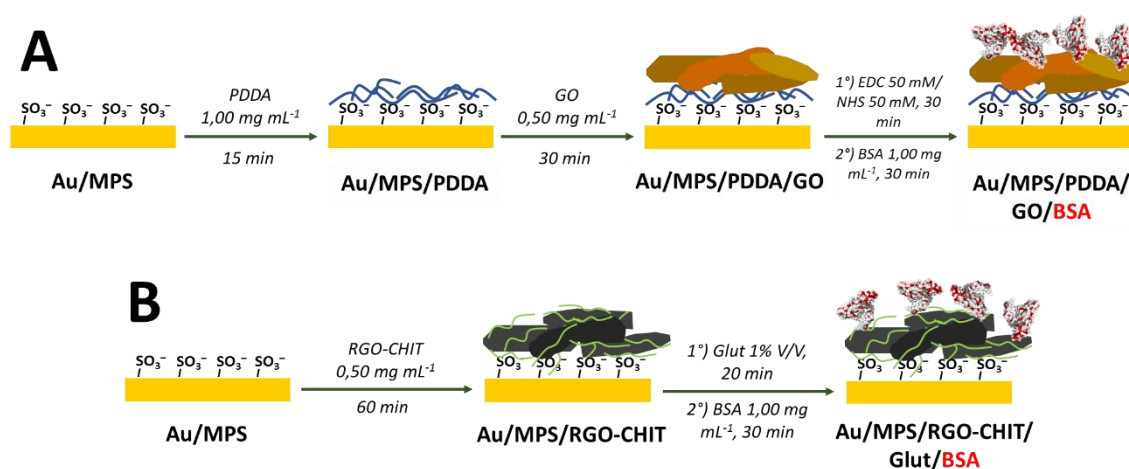


Figura 6.4. Esquema del autoensamblado de GO (**A**) y GO-CHIT/RGO-CHIT (**B**) sobre Au/MPS, y posterior inmovilización de BSA.

La inmovilización no covalente de GO-CHIT y RGO-CHIT se llevó a cabo mediante el autoensamblado directo sobre Au/MPS ya que el polímero CHIT posee densidad de carga positiva. Dicho autoensamblado se realizó por inmersión en una dispersión de GO-CHIT ó RGO-CHIT 0,50 mg mL⁻¹ por 60 min (**figura 6.4 B**). La inmovilización covalente de la proteína modelo BSA se llevó a cabo mediante el empleo del agente de acoplamiento Glut, que liga los grupos amino expuestos de CHIT en Au/MPS/GO-CHIT (ó RGO-CHIT) con los mismos grupos de la BSA. A tal fin se dejó interactuar a la plataforma con solución de Glut 1,0 %V/V (preparado en ácido acético al 1,0 %V/V)

durante 20 min, y luego poniendo en contacto por 30 min a la plataforma con solución de BSA 1,00 mg mL⁻¹ preparada en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 (**figura 6.4 B**).

6.2.2.b. Ensamblado covalente de GO-CHIT y RGO-CHIT

Las estrategias de inmovilización covalente se llevaron a cabo uniendo los grupos amino del polímero en GO-CHIT/RGO-CHIT a la superficie de Au modificada con el tiol 4-aminotiofenol (4ATP), la cual posee grupos amino expuestos a la solución. Para ello se derivatizaron los sustratos de Au con 4ATP de acuerdo al procedimiento de la **sección 2.11.2**. A continuación se dejó interaccionar Au/4ATP con Glut 1,0 %V/V por 20 min y luego con la dispersión de GO-CHIT (ó RGO-CHIT) 0,50 mg mL⁻¹ durante un dado tiempo, como se esquematiza en la **figura 6.5**. Para bloquear los grupos amino superficiales que no reaccionaron con la dispersión, se incubó por 15 min a Au/4ATP/Glut/GO-CHIT (ó RGO-CHIT) en solución acuosa de etanolamina 1,0 M pH 8,30. La inmovilización de BSA se llevó a cabo de la misma manera que en el ensamblado no covalente de GO-CHIT/RGO-CHIT.

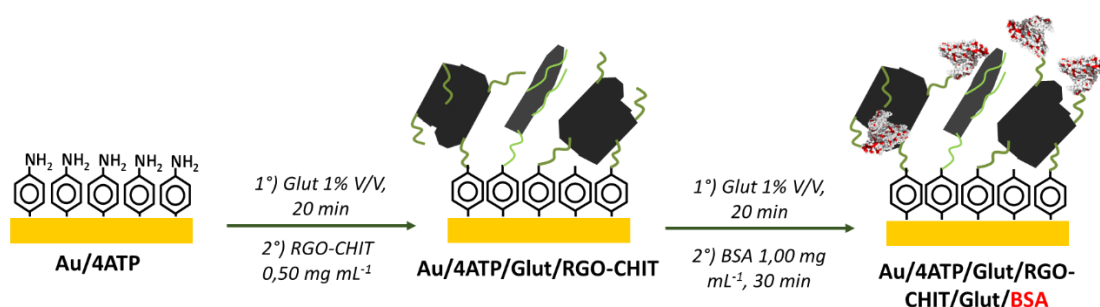


Figura 6.5. Esquema de la inmovilización covalente de GO-CHIT/RGO-CHIT sobre Au/4ATP, y posterior inmovilización de BSA.

6.2.3. Procedimiento e instrumentación

Las mediciones de espectroscopia FTIR se realizaron con el instrumento 200X-ATR-V (Interspectrum) usando una celda de ATR Miracle con ventana de cristal de Ge. Los espectros Raman de las muestras en polvo fueron obtenidos con un espectrómetro Horiba Jobin Yvon LabRaman HR equipado con un láser de $\lambda = 632$ nm. Las mediciones corresponden a un promedio de 5 espectros y se tomaron con un filtro de atenuación de potencia al 10 %.

Los perfiles de análisis termogravimétrico (TGA) se obtuvieron a partir de las muestras en polvo con un equipo DTG-60 (Shimadzu). Los experimentos se llevaron a cabo en atmósfera de N₂ a una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

El radio hidrodinámico aparente y el potencial ζ de las muestras fueron determinados por dispersión de luz dinámica y dispersión de luz electroforética, respectivamente, usando un instrumento Delsa Nano C (Beckman Coulter). Para las medidas se utilizaron dispersiones acuosas de GO y GO-CHIT, ajustando su pH con NaOH 0,10 M ó HCl 0,10 M según corresponda.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Caracterización de GO, GO-CHIT y RGO-CHIT

Como se muestra en el esquema de la **figura 6.6**, el GO fue funcionalizado con CHIT vía formación de enlaces amida entre los grupos carboxilato del primero (activados con EDC/NHS) y los grupos amino del segundo. El CHIT es un polisacárido que proviene de la quitina y su cinética de solubilización (y su pKa) dependen del grado de deacetilación de los grupos amino, es decir, de la relación entre n y m [45]. Las concentraciones de CHIT y de EDC/NHS se pusieron en exceso respecto a la cantidad de grupos carboxilato presentes en el GO ($3,809 \times 10^{-6}$ moles carboxilato/mg de GO, determinado por titulación).

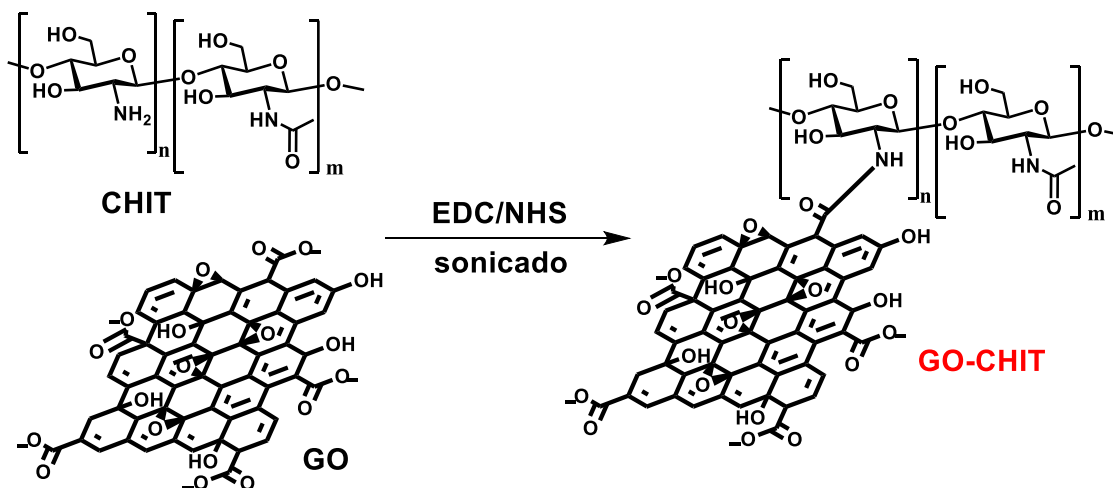


Figura 6.6. Esquema de la reacción entre el GO y el CHIT para formar GO-CHIT.

La espectroscopia FTIR fue utilizada para verificar la formación del enlace amida en GO-CHIT y la reducción a RGO-CHIT. La **figura 6.7** muestra los espectros IR para CHIT (—), GO (—), RGO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—). El espectro de CHIT (—) muestra dos bandas características a 1650 cm^{-1} (amida I) y 1592 cm^{-1} (amida II) correspondientes al estiramiento C=O y la deformación N-H, respectivamente. Las múltiples bandas en las zonas a $1450\text{--}1200$ y a $1200\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$ corresponden a las

deformaciones C-H (en los grupos metilo y metileno) y O-H, y las tensiones C-O, respectivamente. En el caso del GO (—), las bandas correspondientes a 1734 y 1626 cm^{-1} son originadas por el estiramiento C=O de los bordes y C=C conjugados, respectivamente. Se observa también la aparición de otras bandas características de los grupos presentes en su estructura (**figura 6.1 A**), a 1169 cm^{-1} (estiramiento C-O en fenoles) y a 1049 cm^{-1} (estiramiento C-O-C en grupos epoxi). Al reducir GO con NaBH_4 , el espectro de RGO (—) exhibe cambios: desaparece la banda a 1734 cm^{-1} debido a la reducción de los grupos carboxilato y hay un corrimiento a número de onda más pequeño de la banda de estiramiento de los enlaces C=C (1578 cm^{-1}) debido a la restitución de la aromaticidad e incremento relativo de las zonas de C sp^2 . Por otro lado, en la zona entre 1400–900 cm^{-1} aún se observan bandas (las cuales corresponden a vibraciones de los enlaces O-H, C-O y C-O-C) debido a que la reducción con este agente no es completa y aún se mantienen algunos grupos oxigenados en la estructura del RGO [46].

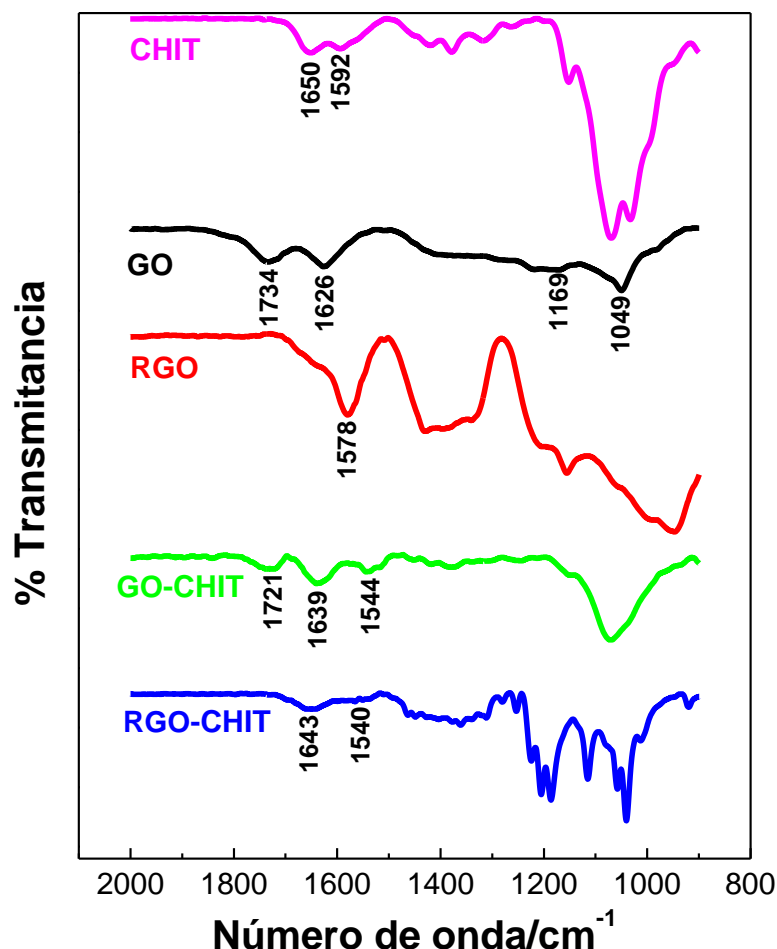


Figura 6.7. Espectros FTIR para CHIT (—), GO (—), RGO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—).

La modificación covalente de GO con CHIT (—) provoca un desplazamiento a números de onda más pequeños de las bandas amida I (1639 cm^{-1}) y amida II (1544

cm⁻¹), producto de los nuevos enlaces amida formados entre -NH₂ del CHIT y C=O del GO. Por otro lado, aún se observa la banda correspondiente a los grupos C=O del GO (a 1721 cm⁻¹) indicando que la modificación covalente del GO no fue total. Luego de la reducción del GO-CHIT, el espectro del RGO-CHIT (—) aún muestra las bandas amida I y amida II y la consecuente desaparición de la absorción de los grupos C=O del RGO debido a la reducción con NaBH₄.

La espectroscopia UV-Vis brinda información respecto la restitución de la red de C sp². La **figura 6.8** muestra los espectros UV-Vis de CHIT (—), y de dispersiones acuosas de GO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—). Debido a la eliminación de las cargas negativas en el proceso de reducción de RGO, no se pudo realizar una dispersión acuosa estable y, en consecuencia, no fue posible tomar el espectro correspondiente.

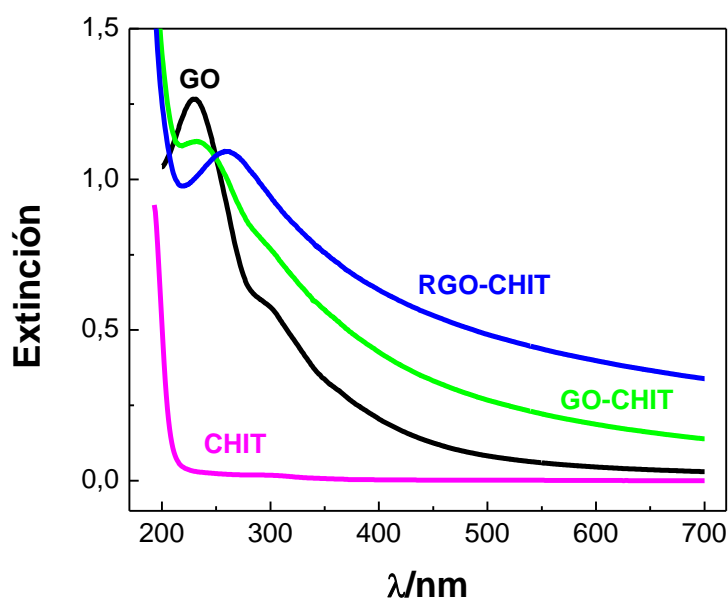


Figura 6.8. Espectros UV-Vis de CHIT (—), y de dispersiones acuosas de GO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—).

El espectro de CHIT (—) muestra un incremento en la absorbancia a λ cercanas a 200 nm producto de las transiciones $n \rightarrow \sigma^*$ del polímero. El espectro del GO (—) presenta dos bandas de extinción a 234 y 305 nm, debido a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de las zonas con enlaces C=C conjugados y a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del enlace C=O, respectivamente [47]. La modificación covalente de GO con CHIT (—) provoca un corrimiento de las bandas de extinción a λ mayores debido al cambio en la constante dieléctrica del medio por la presencia del polímero. Al reducir a RGO-CHIT, la banda correspondiente al enlace C=O desaparece mientras que se produce un corrimiento a λ mayores de la banda de C=C (260 nm) debido a la restitución de la conjugación π [47].

Los cambios estructurales que sufren el GO y GO-CHIT al reducirse por tratamiento con NaBH_4 se reflejan también en los espectros Raman de las muestras. La **figura 6.9** muestra los espectros Raman para GO (—), RGO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—); donde se observa la presencia de los picos D (a $\sim 1330 \text{ cm}^{-1}$), G (a $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) y 2D (a $\sim 2650 \text{ cm}^{-1}$). El primero está asociado a transiciones activadas por el desorden en la red gráfica debido a la presencia de defectos, el segundo, al fonón de la estructura gráfica sp^2 , y el último, al ordenamiento en estructuras de multicapas [48,49]. Las posiciones de las bandas y los anchos de medio pico (FWHM) se encuentran tabuladas en la **tabla 6.1**. Al reducir el GO y GO-CHIT se observa un corrimiento a números de onda más pequeños de la banda D y G, asociados a la restauración de la red gráfica de C sp^2 [50].

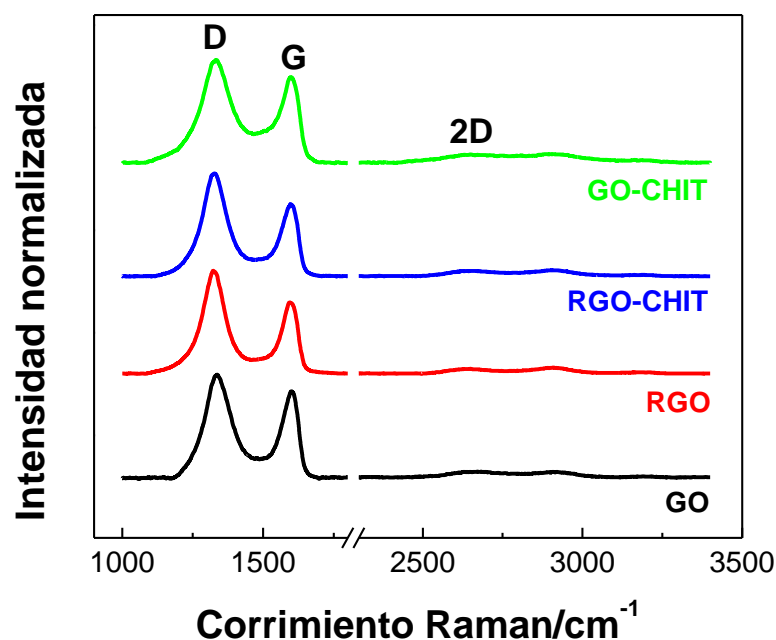


Figura 6.9. Espectros Raman de GO (—), RGO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—). La intensidad de cada espectro fue normalizada por su I_D correspondiente.

Tabla 6.1. Posiciones de las bandas D, G y 2D; anchos de medio pico (FWHM) de las bandas D y G. Los datos fueron obtenidos de los espectros Raman de la **figura 6.9**.

	GO	RGO	GO-CHIT	RGO-CHIT
D/cm^{-1}	1336	1322	1334	1328
$\text{FWHM}_D/\text{cm}^{-1}$	97	88	118	93
G/cm^{-1}	1598	1592	1600	1597
$\text{FWHM}_G/\text{cm}^{-1}$	57	55	66	58
$2D/\text{cm}^{-1}$	2657	2648	2648	2636

Los cambios en FWHM de las bandas D y G son indicadores de la presencia de defectos en el plano basal de la estructura gráfica debido a la presencia de vacancias y grupos oxigenados [51]. Como se observa en la **tabla 6.1**, los FWHM de las bandas D y G disminuyen al reducir al GO/GO-CHIT a RGO/RGO-CHIT debido a la remoción parcial de los grupos oxigenados y al cambio de hibridación del C de sp^3 a sp^2 . Por otro lado, la modificación covalente de GO y RGO con el polímero promueve la estabilidad de las dispersiones y evita el reapilado de las láminas gráficas. Esto se traduce en una disminución en el número de onda de la banda 2D [52] al comparar GO con GO-CHIT y RGO con RGO-CHIT.

La **figura 6.10** ilustra los perfiles de TGA para CHIT (—), GO (—), RGO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—). En todas las curvas, la pérdida de masa que se observa en el rango de temperaturas entre 50 y 70 °C corresponde a la remoción de moléculas de H_2O adsorbidas entre las capas gráficas y sobre el polímero.

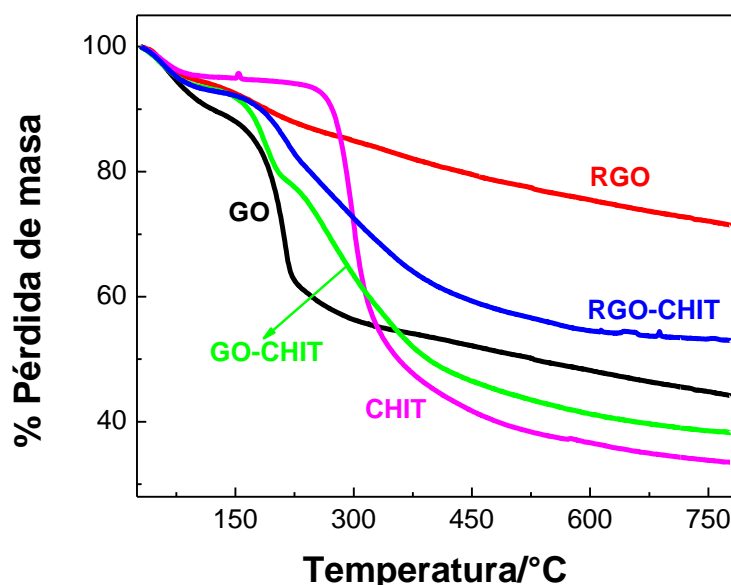


Figura 6.10. Curvas de TGA para CHIT (—), GO (—), RGO (—), GO-CHIT (—) y RGO-CHIT (—).

La curva termogravimétrica para GO (—) muestra una pérdida de masa del 33,4 % de masa a 211 °C atribuido a la pirólisis de los grupos oxigenados lábiles para formar CO , CO_2 y vapor [50,53]. En el caso de CHIT (—), la pérdida de masa de casi 60 % a 302 °C se asocia a la descomposición térmica y oxidativa del polímero [54]. La reducción del GO a RGO (—) provoca la desaparición de la pérdida de masa asociada a los grupos oxigenados. La modificación covalente de GO con CHIT (—) genera una pérdida de masa a 280 °C debido a la presencia del polímero, lo cual confirma una vez más la funcionalización efectiva de las láminas. La reducción de GO-CHIT (—) y consecuente remoción parcial de los grupos oxigenados provoca que la pérdida de masa observada

a 200 °C sea la mitad que en el caso del GO-CHIT. Por otro lado, la curva de RGO-CHIT muestra la pérdida de masa a 300 °C provocada por la presencia del CHIT.

6.3.2. Ensamblado no covalente de GO

6.3.2.a. Propiedades electroquímicas de Au/MPS/PDDA/GO

La adsorción de PDDA y GO se estudió a través de experimentos de VC empleando FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M como sonda redox. La **figura 6.11 A** presenta los perfiles voltamperométricos obtenidos para Au (—), Au/MPS (—), Au/MPS/PDDA (—), y Au/MPS/PDDA/GO (—).

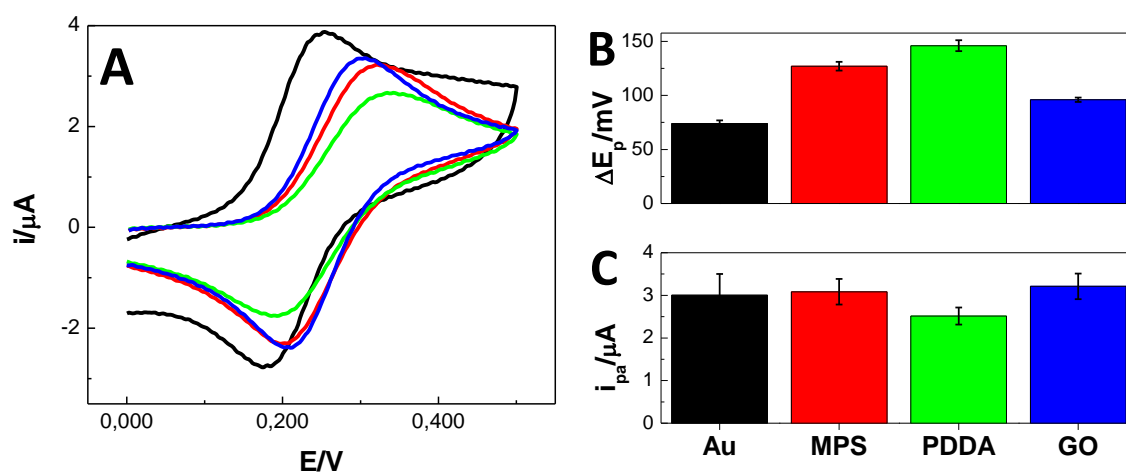


Figura 6.11. **A** Perfiles voltamperométricos en FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M obtenidos sobre Au (—), Au/MPS (—), Au/MPS/PDDA (—) y Au/MPS/PDDA/GO (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. $\nu = 0,050$ V s^{-1} . **B** y **C** Diferencia de potencial de pico (ΔE_p) y corriente de pico anódica (i_{pa}), respectivamente, para los voltamperogramas del panel **A**.

En las **figuras 6.11 B** y **C** se resumen los valores de ΔE_p e i_{pa} obtenidos a partir de la **figura 6.11 A**. La modificación de Au con MPS provoca un incremento en ΔE_p debido al bloqueo de la transferencia de carga. La adsorción de PDDA sobre Au/MPS acentúa este efecto debido a la formación de una película bloqueante sobre la superficie del electrodo y además, por repulsión de cargas similares entre el polication y el producto de oxidación $FcOH^{*+}$ [55]. El autoensamblado de GO (—) provoca una disminución en ΔE_p y un aumento en la i_{pa} , debido a la complementariedad de cargas entre el producto de oxidación de la sonda y los grupos carboxilato del GO.

La superficie modificada con GO se caracterizó también con SECM por el método de *feedback* empleando FcOH como sonda redox. La **figura 6.12** muestra las imágenes SECM obtenidas sobre Au (**a**), Au/MPS/PDDA (**b**), y Au/MPS/PDDA/GO (**c**). Sobre Au (**a**), la corriente normalizada del UME ($i_T/i_{T,\infty}$) es $(1,268 \pm 0,004)$ tal como corresponde para una superficie conductora (**sección 2.7**).

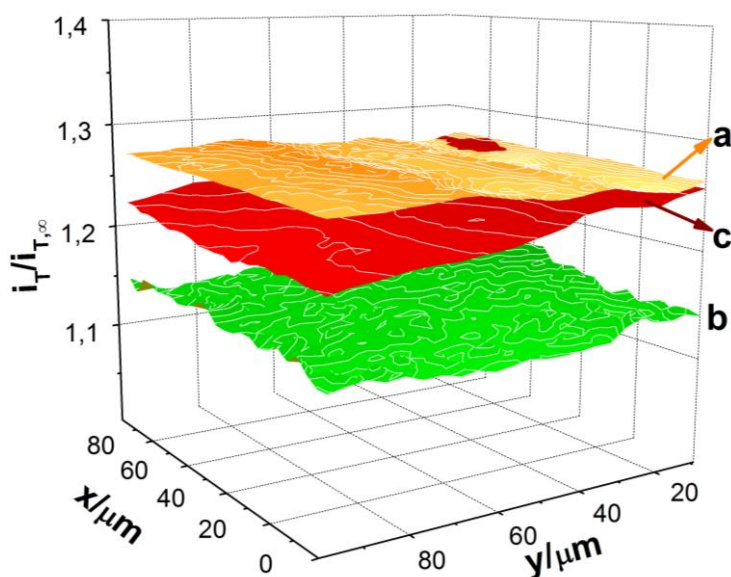


Figura 6.12. Imágenes SECM obtenidas sobre Au (a), Au/MPS/PDDA (b), y Au/MPS/PDDA/GO (c) empleando FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M como sonda redox. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. $E_{UME} = 0,500$ V. $E_{subs} = 0,000$ V. $v_{UME} = 10,0 \mu\text{m s}^{-1}$.

La modificación de Au con MPS/PDDA (b) provoca una disminución en la $i_T/i_{T,\infty}$ del UME, hasta $1,14 \pm 0,01$. El autoensamblado de GO sobre el polímero (c) restaura la corriente normalizada hasta valores cercanos al del electrodo desnudo ($1,24 \pm 0,02$). Esto se debe a que en términos de velocidad de *feedback* de FcOH sobre el UME, las láminas de GO y la superficie de Au regeneran al mediador redox con velocidades similares [56]. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos mediante VC con la misma sonda redox (figura 6.11).

6.3.2.b. Inmovilización de BSA sobre Au/MPS/PDDA/GO

El autoensamblado de PDDA y GO sobre Au/MPS así como también la inmovilización covalente de la proteína se estudió mediante SPR. La figura 6.13 muestra el sensorgrama para el autoensamblado sucesivo de PDDA (↓) y GO (↓) y la posterior inmovilización de la proteína modelo, BSA (↓).

La señal de SPR por la inmovilización de PDDA (↓) y GO (↓) luego 1 y 5 min, respectivamente, alcanza el 90% del valor de θ_{SPR} de equilibrio, lo cual indica que son procesos rápidos. El enjuague con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 (↓) luego de agregar GO produce un incremento en θ_{SPR} que se asocia al ingreso de aniones fosfato y agua a la película formada, originando cambios en el índice de refracción del medio en contacto con el Au [57]. Luego del agregado de EDC/NHS (↓) para activar los grupos carboxilato de Au/MPS/PDDA/GO, se observa un marcado incremento en θ_{SPR} debido al elevado índice de refracción de la mezcla. Luego del lavado con *buffer* (↓), se pone en contacto la

superficie con solución de BSA $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ (↓). A partir del cambio en θ_{SPR} antes y después del agregado de BSA (**sección 2.8**) se puede obtener el cubrimiento superficial de la proteína Γ_{BSA} , la cual fue de $8,21 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$.

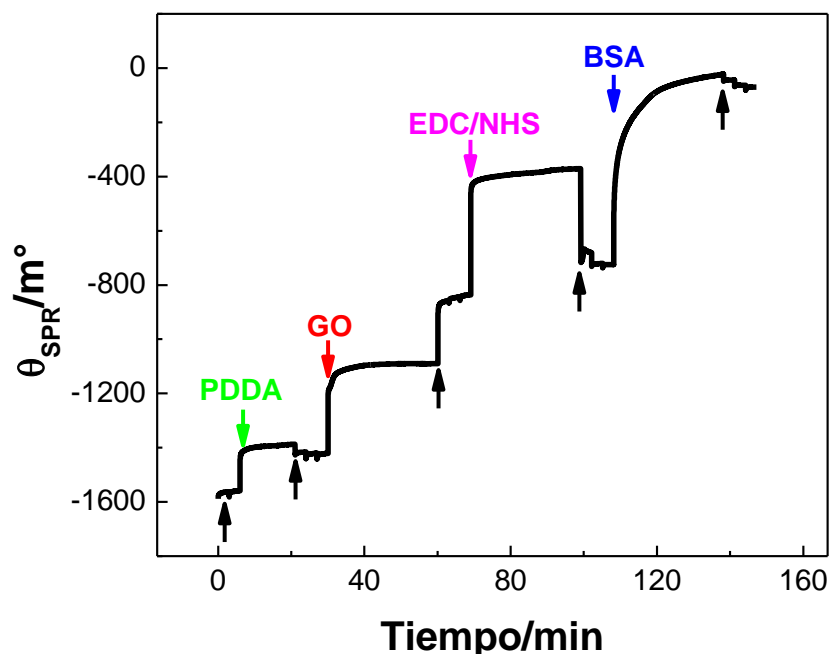


Figura 6.13. Sensorgrama para el ensamblado de PDDA (↓) y GO (↓), activación con EDC/NHS (↓) e inmovilización covalente de BSA (↓). Las flechas negras ↓ representan los enjuagues con el *buffer* correspondiente.

La inmovilización de BSA sobre la superficie de Au/MPS/PDDA/GO provoca cambios en las propiedades electroquímicas de la plataforma que pueden ser determinadas por EIE, dado que como se mencionó anteriormente es una técnica extremadamente sensible a los eventos de bio-reconocimiento que suceden en la región interfacial [58]. Esto se debe a que las biomoléculas (que en general poseen peso molecular alto o están eléctricamente cargadas) que se unen al electrodo impactan significativamente en la cinética de transferencia de carga de una sonda redox [34]. Éste es el principio mediante el cual funcionan todos los biosensores impedimétricos reportados en bibliografía [59].

La **figura 6.14** presenta los gráficos de Nyquist obtenidos en Q/H_2Q $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre Au/MPS/PDDA/GO (●) y Au/MPS/PDDA/GO/BSA (○). Los espectros de impedancia fueron ajustados con el circuito de la **figura 2.7 B**, sin el elemento de Warburg. La R_{ct} para Au/MPS/PDDA/GO fue $(9,1 \pm 0,4) \times 10^5 \Omega$ mientras que cuando BSA se une covalentemente a la plataforma aumenta 109 %, a $(1,90 \pm 0,02) \times 10^6 \Omega$. Esto se debe a que la proteína actúa como agente bloqueante de la transferencia de carga de la cupla redox, provocando una disminución en la k_0 aparente.

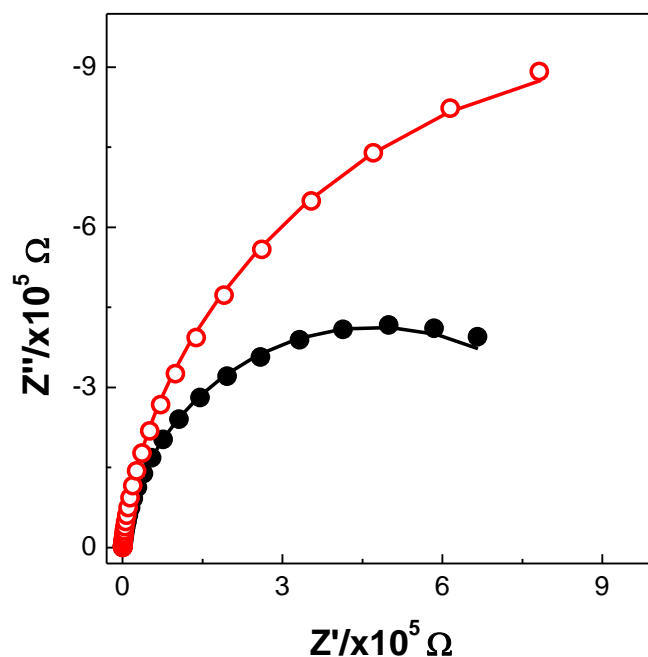


Figura 6.14. Gráficos de Nyquist para experimentos de EIE en Q/H₂Q 2,00 x10⁻³ M sobre Au/MPS/PDDA/GO (●) y Au/MPS/PDDA/GO/BSA (○). Potencial de trabajo: ~ 0,070 V. Amplitud: 10 mV. Rango de frecuencias medido: 10⁵ – 10⁻¹ Hz. Electrolito soporte: MOPS 0,010 M + NaClO₄ 0,100 M. Las líneas representan la respuesta a partir del ajuste con el circuito de la **figura 2.7 B** (sin el elemento de Warburg).

6.3.2.c. Efecto del pH sobre la inmovilización de GO y BSA

Como se determinó mediante SPR, la inmovilización de GO es rápida, por lo que es de esperar que el tiempo de autoensamblado tenga poca influencia en las características de la plataforma obtenida. Además del tiempo de adsorción, existen otras variables que se pueden ajustar para controlar el autoensamblado LBL, siendo el pH una de las más ampliamente reconocidas y estudiadas [60]. En este sentido, se estudió el efecto del pH de la dispersión de GO sobre las propiedades electroquímicas de Au/MPS/PDDA/GO. Las imágenes SECM de la **figura 6.15** presentan la reactividad superficial para Au/MPS/PDDA (**a**) y para GO inmovilizado sobre dicha plataforma a partir de dispersiones a distintos pHs: 6,00 (**b**), 7,00 (**c**), 8,00 (**d**) y 9,00 (**e**). La **tabla 6.2** resume los valores de $i_T/i_{T,\infty}$ promedios del UME para cada superficie.

La modificación con dispersiones de pH creciente incrementa la corriente medida por el UME respecto a Au/MPS/PDDA. Incluso, a pH 8,00 el valor de $i_T/i_{T,\infty}$ promedio supera a la corriente medida sobre Au. Teniendo en cuenta que, desde el punto de vista electroquímico, GO es un aislante [61] estas variaciones en la corriente del UME se deben a variaciones en las propiedades o estructura de la película de GO formada en función del pH.

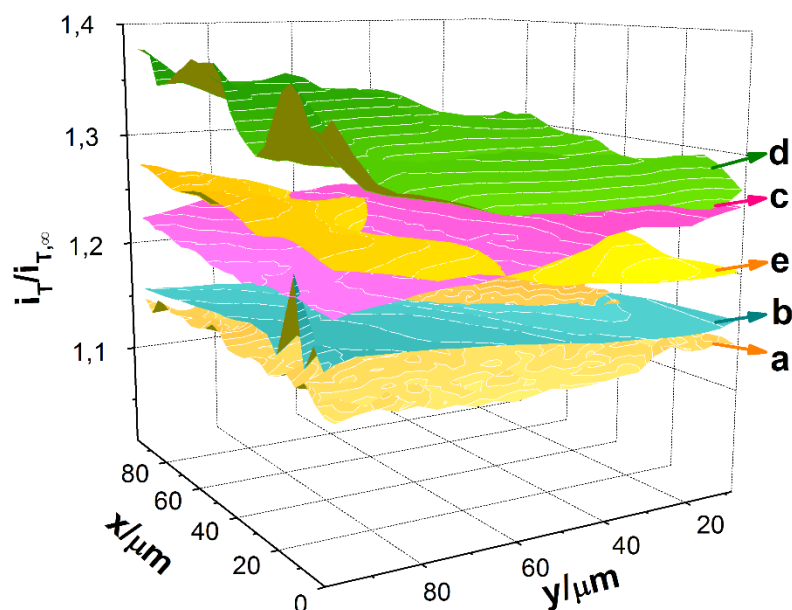


Figura 6.15. Imágenes SECM obtenidas sobre Au/MPS/PDDA (a), y Au/MPS/PDDA/GO a partir de dispersiones de GO 0,50 mg mL⁻¹ a distintos pH: 6,00 (b), 7,00 (c), 8,00 (d), y 9,00 (e). Condiciones experimentales iguales a la **figura 6.12**.

Tabla 6.2. Valores de corriente normalizada del UME ($i_T/i_{T,\infty}$) para las imágenes SECM de la **figura 6.15**.

	$i_T/i_{T,\infty}$
<i>Au</i>	1,268 ± 0,004
<i>Au/MPS/PDDA</i>	1,14 ± 0,01
<i>Au/MPS/PDDA/GO (pH 6,00)</i>	1,16 ± 0,01
<i>Au/MPS/PDDA/GO (pH 7,00)</i>	1,23 ± 0,02
<i>Au/MPS/PDDA/GO (pH 8,00)</i>	1,32 ± 0,02
<i>Au/MPS/PDDA/GO (pH 9,00)</i>	1,23 ± 0,02

En una dispersión coloidal (como la de GO) el movimiento browniano produce colisión entre las partículas y si las fuerzas de atracción predominan, las partículas se aglomeran después de la colisión. En caso contrario, si las fuerzas de repulsión predominan, las partículas permanecen separadas después de la colisión. Las fuerzas de atracción son las de van der Waals, en tanto que las fuerzas de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a las partículas [62]. Dado que las cargas superficiales del GO están dadas por el grado de ionización de los grupos carboxilato, es de esperar que la estabilidad coloidal dependa fuertemente del pH. La **figura 6.16** muestra el potencial ζ y el radio hidrodinámico para dispersiones de GO

0,50 mg mL⁻¹ en función del pH, obtenidos mediante un equipo que utiliza el principio de dispersión de luz dinámica.

El potencial ζ disminuye conforme aumenta el pH hasta 8,00 para aumentar luego levemente. Otros autores han reportado comportamientos similares, donde el pH al cual se alcanza el mínimo valor de potencial depende del método de síntesis del GO [63–65]. Dicho mínimo está relacionado con la concentración de iones del NaOH usado para ajustar el pH: al aumentar éste, incrementa la concentración de los iones Na⁺ que apantallan las cargas negativas del GO.

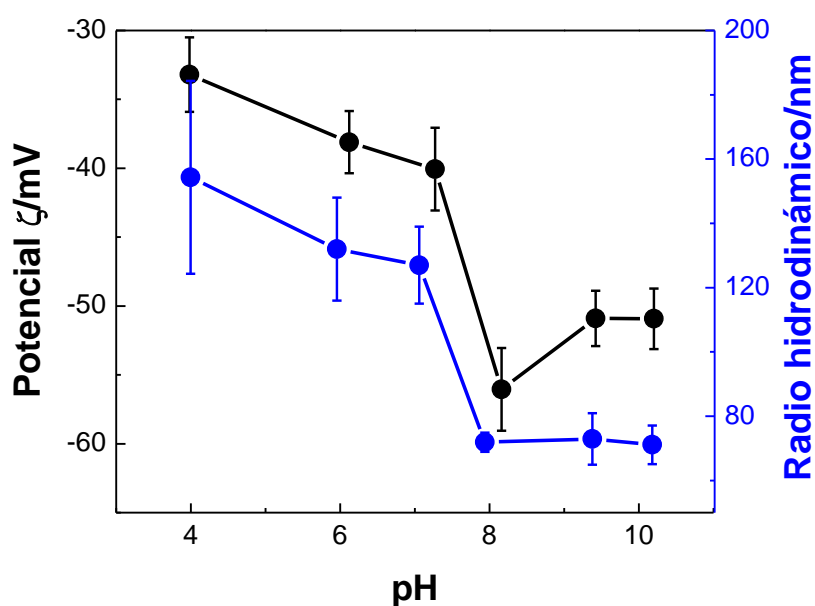


Figura 6.16. Potencial ζ (eje de la izquierda, ●) y radio hidrodinámico (eje de la derecha, ●) en función del pH para dispersiones acuosas de GO 0,50 mg mL⁻¹. El pH de las muestras fue ajustado con NaOH 0,10 M.

El radio hidrodinámico ha demostrado ser una herramienta muy útil para evaluar cambios en el tamaño de las láminas de GO dado que se puede correlacionar directamente con los tamaños reales medidos por TEM, pero empleando una técnica más sencilla y menos costosa [66]. Los puntos azules de la **figura 6.16** muestran que el radio disminuye hasta pH 8,00 para luego mantenerse constante. Esta tendencia, que se correlaciona con la del potencial ζ , sugiere que a pH básico y debido a que su carácter se hace más hidrofílico, porque los grupos carboxilato se encuentran deprotonados, las láminas de GO se encuentran más extendidas. Al disminuir el pH, la protonación de los grupos carboxilato disminuye la hidrofiliidad del GO produciendo agregado de las partículas e incremento de su radio. Cote y col. [63] observaron un comportamiento similar con el pH, estudiando la formación de películas de Langmuir en la interfaz agua-aire.

De esta manera, los incrementos en la corriente observados en las imágenes SECM con el aumento del pH de la dispersión de GO están relacionados con una mejor disponibilidad de los grupos carboxilato (producto de un ensamblado más eficiente por reducción del radio hidrodinámico y aumento de la carga superficial) que favorecen la transferencia de carga de FcOH por complementariedad de cargas.

Para evaluar el efecto del pH sobre la inmovilización de BSA, se autoensamblaron dispersiones de GO de pH creciente sobre Au/MPS/PDDA y luego se unió covalentemente la proteína, previa activación con EDC/NHS. La cantidad de BSA inmovilizada fue determinada mediante experimentos de SPR y se muestra en la **figura 6.17 A**. Se puede observar que Γ_{BSA} aumenta hasta pH 8,00, siguiendo la misma tendencia que los resultados anteriores: si aumenta la disponibilidad de los grupos carboxilato, aumentan los puntos de unión con la proteína.

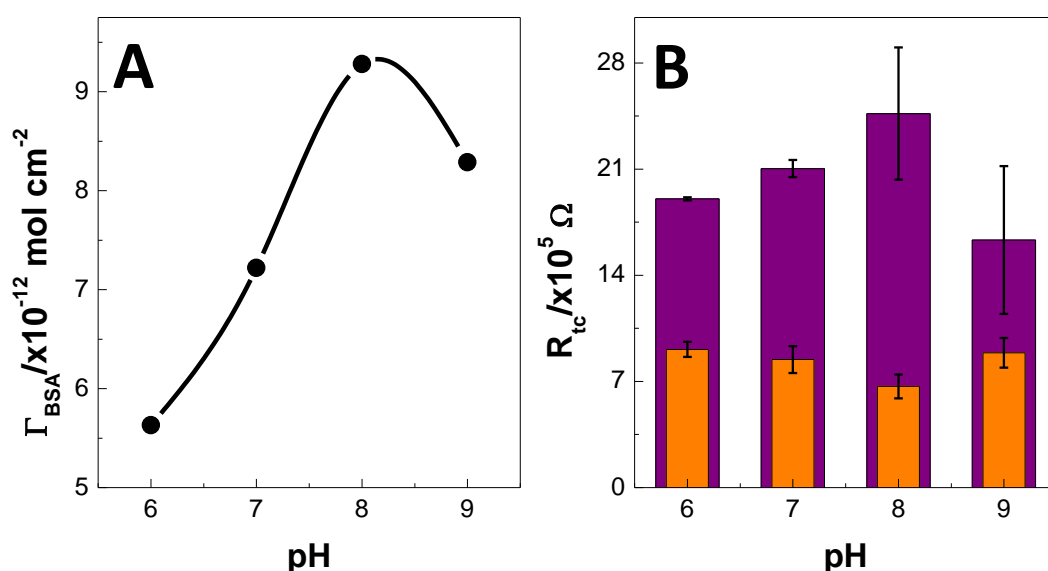


Figura 6.17. A Cubrimientos superficiales de BSA (Γ_{BSA}) en función del pH de la dispersión de GO ensamblada sobre Au/MPS/PDDA. Los Γ_{BSA} fueron obtenidos de experimentos de SPR, a partir del $\Delta\theta_{SPR}$ debido a la inmovilización covalente de la proteína. **B** Dependencia de R_{tc} de espectros de impedancia en Q/H_2Q $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ en función del pH de la dispersión de GO ensamblada sobre Au/MPS/PDDA. Las barras en naranja corresponden a los valores de R_{tc} obtenidos antes de la inmovilización de BSA y las barras violetas, para los R_{tc} luego de la unión de Au/MPS/PDDA/GO con BSA.

Los cambios en la plataforma producto de la inmovilización de BSA también pueden ser evaluados mediante EIE usando Q/H_2Q $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ como sonda redox, a partir del análisis de las R_{tc} . El panel **B** de la **figura 6.17** presenta las R_{tc} obtenidas sobre Au/MPS/PDDA/GO (barras naranjas) y Au/MPS/PDDA/GO/BSA (barras violetas) en función del pH de la dispersión de GO. Este marcador redox muestra que R_{tc} es mínimo cuando el pH de la dispersión de GO ensamblado es 8,00. Si bien se conoce que GO es un aislante desde el punto de vista electroquímico, respecto a la capa de Au/MPS/PDDA subyacente posee una cinética de transferencia de carga mayor (**sección 2.5.1**). Esto se

traduce en una disminución en la R_{tc} conforme se inmoviliza mayor cantidad de GO. Por otro lado, dado que a pH 8,00 es cuando se obtiene mayor Γ_{BSA} , en esta condición se alcanza el mayor incremento en R_{tc} cuando se modifica Au/MPS/PDDA/GO con BSA dado que la misma actúa como agente bloqueante para la transferencia de carga de Q/H_2Q .

6.3.3. Ensamblado no covalente de GO-CHIT

6.3.3.a. Propiedades electroquímicas de Au/MPS/GO-CHIT

En la **figura 6.18 A** se muestran los perfiles voltamperométricos obtenidos para Au (—), Au/MPS (—), y Au/MPS/GO-CHIT (—) preparados a partir de la adsorción durante 60 min de una dispersión de GO-CHIT $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ en presencia de FcOH $5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ como sonda redox. Para la adsorción de GO modificado covalentemente con CHIT, no fue necesario ensamblar previamente un polímero debido a la complementariedad de cargas entre el MPS y los grupos amino del CHIT.

A diferencia del caso de Au/MPS/PDDA/GO, el ensamblado de GO-CHIT sobre el sustrato modificado con el tiol incrementa ΔE_p en 35,5 mV (**figura 6.18 B**) y disminuye i_{pa} 1,28 veces (**figura 6.18 C**). Esto se debe a dos efectos: por un lado, a que el polímero actúa como agente bloqueante de la transferencia de carga; y por el otro, a la repulsión electrostática entre cargas positivas del CHIT y del producto de oxidación $FcOH^{*+}$ [55].

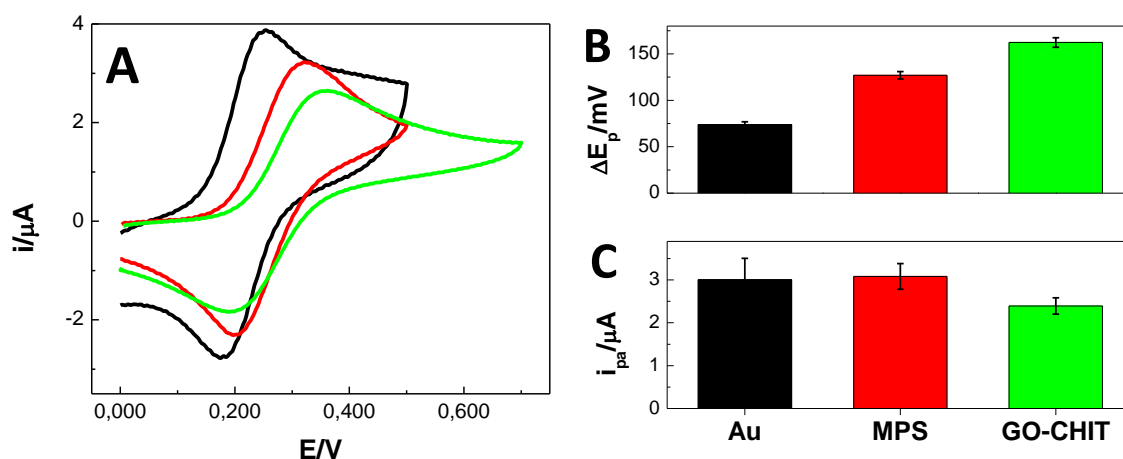


Figura 6.18. **A** Perfiles voltamperométricos en FcOH $5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ obtenidos sobre Au (—), Au/MPS (—), y Au/MPS/GO-CHIT (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato $0,050 \text{ M}$ pH 7,40. $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. **B** y **C** Diferencia de potencial de pico (ΔE_p) y corriente de pico anódica (i_{pa}), respectivamente, para los voltamperogramas del panel **A**.

Mediante SECM se realizaron estudios electroquímicos complementarios, usando FcOH como sonda redox. La **figura 6.19** muestra la corriente normalizada del UME obtenida sobre Au (**a**) y Au/MPS/GO-CHIT (**b**). La modificación de Au con MPS y GO-CHIT provoca una disminución de la corriente normalizada hasta un valor de $(1,139 \pm$

0,005) $i_{T,\infty}$, en consonancia con los resultados de VC. Se puede observar una respuesta electroquímica superficial homogénea indicando que la capa inmobilizada de GO-CHIT se encuentra uniformemente distribuida sobre la superficie de Au/MPS.

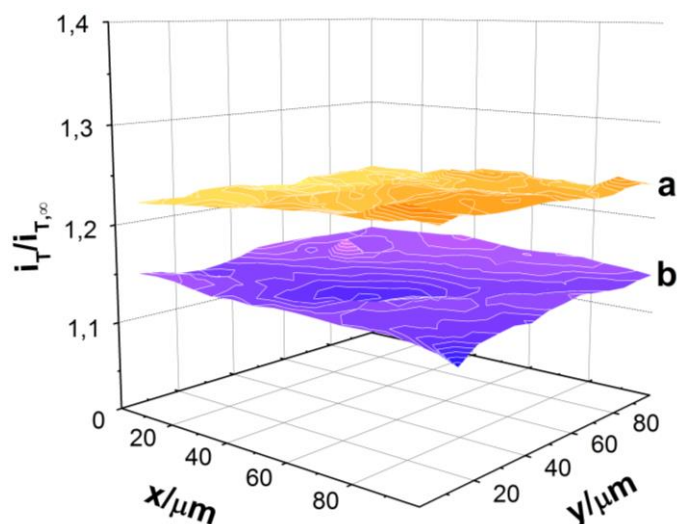


Figura 6.19. Imágenes SECM obtenidas sobre Au (a), y Au/MPS/GO-CHIT (b), empleando FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M como sonda redox. Condiciones experimentales iguales a las de la **figura 6.12**.

6.3.3.b. Inmovilización de BSA sobre Au/MPS/GO-CHIT

La construcción de la plataforma Au/MPS/GO-CHIT y la inmovilización covalente de la proteína, empleando Glut, fueron evaluadas en tiempo real utilizando SPR. La **figura 6.20** muestra el sensorgrama obtenido durante el proceso de ensamblado.

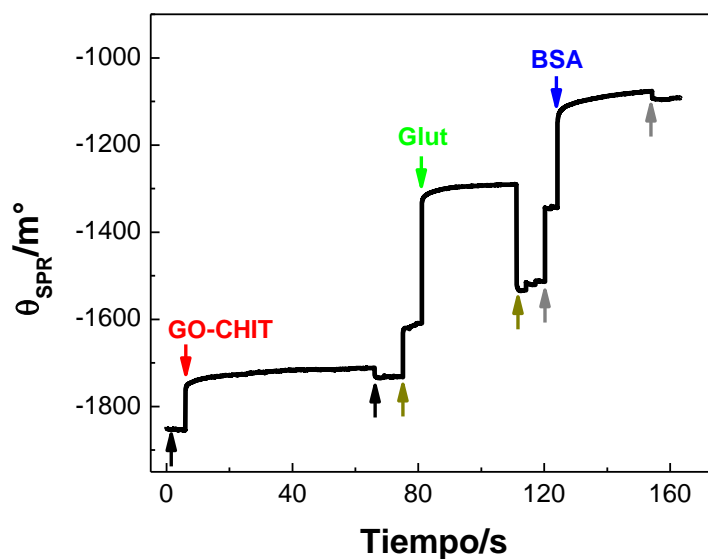


Figura 6.20. Sensorgrama para el ensamblado de GO-CHIT (↓), y luego la activación con Glut (↓) e inmovilización covalente de BSA (↓). Las flechas ↓, ↓, y ↓ representan los enjuagues y cambios de medio con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, ácido acético 1 %V/V, y *buffer* acetato 0,020 M pH 5,00; respectivamente.

La inyección de GO-CHIT $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ (\downarrow) sobre Au/MPS provoca un incremento en θ_{SPR} debido a la adsorción mediada por cargas complementarias de la dispersión sobre la superficie. La misma es rápida, dado que al cabo de 6 min se alcanza el 90 % de la señal de equilibrio. Luego del lavado con *buffer* fosfato $0,050 \text{ M}$ pH 7,40 (\downarrow) y el cambio de medio, a ácido acético 1% V/V (\downarrow), se ponen en contacto Au/MPS/GO-CHIT con Glut 1 %V/V (\downarrow) por 30 min para activar los grupos amino. Se cambia de medio a *buffer* acetato $0,020 \text{ M}$ pH 5,00 (\downarrow) y luego se inyecta BSA $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ (\downarrow) durante 30 min. El incremento en θ_{SPR} está asociado a la unión covalente entre el CHIT-Glut y los grupos amino de la proteína.

A partir de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ obtenido como consecuencia del agregado de BSA se puede calcular Γ_{BSA} (**sección 2.8**), cuyo valor es de $3,14 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$. En el caso de esta plataforma, se inmoviliza una menor cantidad de proteína en comparación con Au/MPS/PDDA/GO.

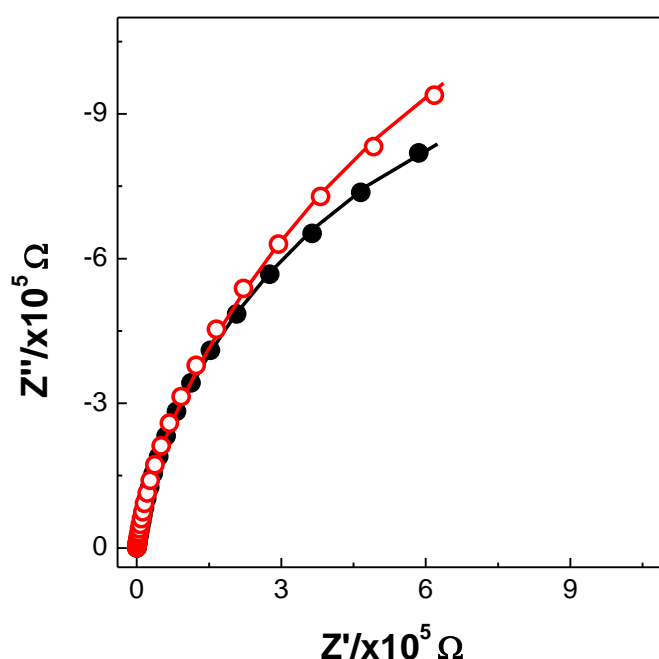


Figura 6.21. Gráficos de Nyquist para experimentos de EIE en $\text{Q}/\text{H}_2\text{Q}$ $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre Au/MPS/GO-CHIT (●) y Au/MPS/GO-CHIT/Glut/BSA (○). Condiciones experimentales iguales a las de la **figura 6.14**. Las líneas representan la respuesta a partir del ajuste con el circuito de la **figura 2.8 B** (sin el elemento de Warburg).

Los cambios en el comportamiento electroquímico de la plataforma se evaluaron mediante EIE con $\text{Q}/\text{H}_2\text{Q}$ $2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ como sonda redox. La **figura 6.21** compara los gráficos de Nyquist obtenidos sobre Au/MPS/GO-CHIT (●) y Au/MPS/GO-CHIT/Glut/BSA (○), los cuales fueron ajustados con el circuito equivalente de la **figura 2.8 B** sin el elemento de Warburg. Dicho circuito corresponde al modelo de membrana capilar y posee dos constantes de tiempo distintas que representan dos zonas de la superficie

con k_0 significativamente distintas (**sección 2.5.1**). Esto quiere decir que, si bien el cubrimiento de la superficie con GO-CHIT es homogéneo, es probable que el polímero esté distribuido cerca de los bordes del GO, donde se encuentran los grupos carboxilato. De esta manera quedan expuestas dos zonas a la solución: las que poseen el CHIT y aquellas con el GO descubierto.

La R_{tc} total incrementa de $(2,4 \pm 0,2) \times 10^6 \Omega$ para Au/MPS/GO-CHIT a $(2,8 \pm 0,4) \times 10^6 \Omega$ para Au/MPS/GO-CHIT/Glut/BSA. De manera similar al sistema PDDA/GO, este incremento se debe al efecto bloqueante de la proteína a la transferencia de carga de la cupla redox. En este caso, el aumento en la R_{tc} es sólo de 17 % lo que se correlaciona con la pequeña cantidad de proteína inmovilizada, determinada mediante SPR.

6.3.3.c. Efecto del pH sobre la inmovilización de GO-CHIT y BSA

La reactividad electroquímica superficial de las plataformas Au/MPS/GO-CHIT, obtenidas a partir de dispersiones de GO-CHIT preparadas a diferentes pH, fue evaluada mediante SECM en modo *feedback*. La **figura 6.22** presenta las imágenes SECM de Au (**a**) y Au/MPS/GO-CHIT a partir del ensamblado de dispersiones de GO-CHIT $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ a pH 6,01 (**b**), 4,49 (**c**), 3,01 (**d**), y 1,98 (**e**).

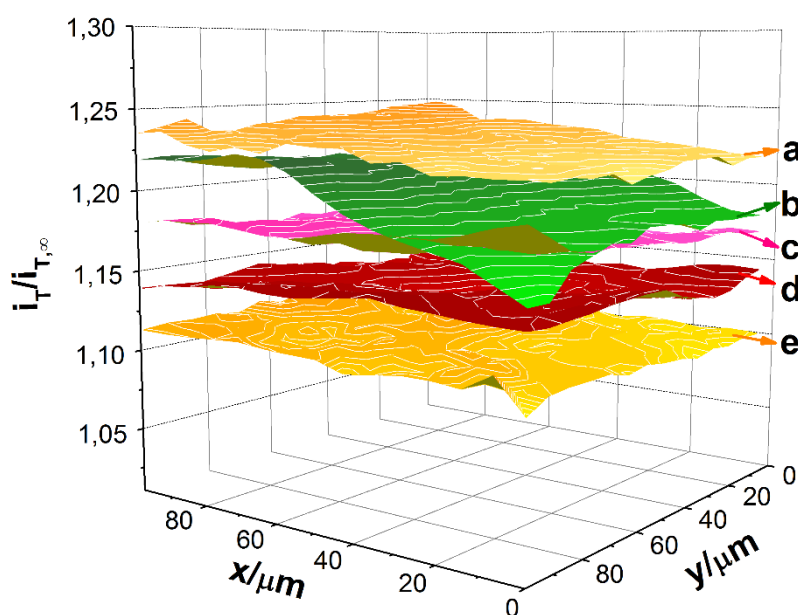


Figura 6.22. Imágenes SECM obtenidas sobre Au (**a**), y Au/MPS/GO-CHIT a partir de dispersiones de GO-CHIT $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ preparadas a distintos pHs: 6,01 (**b**), 4,49 (**c**), 3,01 (**d**), y 1,98 (**e**). Condiciones experimentales iguales a la **figura 6.12**.

Se observa que conforme disminuye el pH de la dispersión de GO-CHIT, la corriente normalizada del UME también disminuye. En la **tabla 6.3** se muestran los valores de $i_T/i_{T,\infty}$ promedio para cada una de las plataformas. Dado que GO-CHIT

disminuye la velocidad de la transferencia de carga de FcOH, esa disminución en $i_T/i_{T,\infty}$ estaría relacionada con un incremento en la cantidad de GO-CHIT sobre la superficie conforme disminuye el pH de la dispersión.

Tabla 6.3. Valores de corriente normalizada del UME ($i_T/i_{T,\infty}$) para las imágenes SECM de la **figura 6.22**.

	$i_T/i_{T,\infty}$
<i>Au</i>	$1,268 \pm 0,004$
<i>Au/MPS/GO-CHIT (pH 6,01)</i>	$1,20 \pm 0,01$
<i>Au/MPS/GO-CHIT (pH 4,49)</i>	$1,174 \pm 0,009$
<i>Au/MPS/GO-CHIT (pH 3,01)</i>	$1,139 \pm 0,005$
<i>Au/MPS/GO-CHIT (pH 1,98)</i>	$1,110 \pm 0,003$

Para analizar el efecto del pH en la dispersión coloidal de GO-CHIT, se midieron el potencial ζ y el radio hidrodinámico mediante dispersión de luz dinámica, los cuales se muestran en la **figura 6.23**. Debido a la incorporación de CHIT (su pKa oscila entre 2,5 – 4,5 dependiendo del tamaño y grado de deacetilación [45]) al GO, las láminas pueden ser dispersas en medio acuoso. En medio ácido, como se puede observar en la **figura 6.23**, la dispersión coloidal tiene carga positiva.

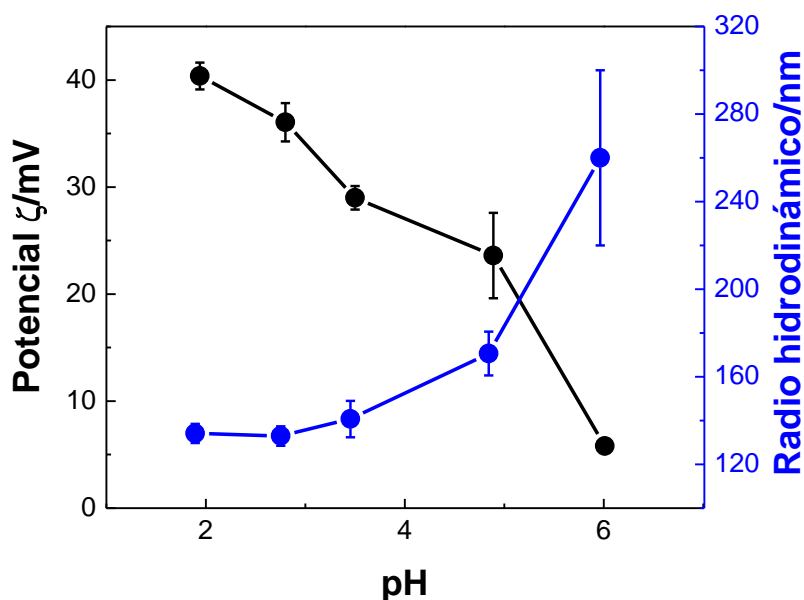


Figura 6.23. Potencial ζ (eje de la izquierda, ●) y radio hidrodinámico (eje de la derecha, ●) en función del pH para dispersiones acuosas de GO-CHIT 0,50 mg mL⁻¹. El pH de las muestras fue ajustado con NaOH/HCl 0,10 M.

Conforme se incrementa el pH de la dispersión de GO-CHIT, el potencial ζ se reduce y el radio hidrodinámico aumenta, lo cual indica que al disminuir la carga superficial se observa un agregado de la dispersión producto de la deprotonación de los grupos amonio del CHIT [9]. Esto resulta en un “ovillado” del polímero, ya que no están presentes las repulsiones electrostáticas, lo cual favorece la formación de agregados por interacciones de van de Waals y puentes de hidrógeno. Por encima de pH 5,50 se observó que la dispersión no es estable y que precipita una vez suspendido el tratamiento de ultrasonido.

Dado que la dispersabilidad de las láminas de GO-CHIT aumenta al disminuir el pH, esto favorece el autoensamblado sobre Au/MPS: las imágenes SECM de la **figura 6.22** correspondientes a los pH más altos (**b, c**) muestran un cubrimiento incompleto e irregular de la superficie producto del ensamblado de agregados de GO-CHIT.

El efecto del pH de la dispersión de GO-CHIT en la inmovilización covalente de BSA se evaluó calculando los cubrimientos superficiales, mostrados en la **figura 6.24 A**. Los mismos se determinaron a partir de los $\Delta\theta_{SPR}$ de sensorgramas obtenidos a cada pH. Siguiendo la tendencia de los resultados anteriores, al disminuir el pH se inmoviliza una mayor cantidad de proteína. Esto se debe a que se ensambla una mayor cantidad de GO-CHIT sobre Au/MPS, lo cual incrementa la densidad de grupos amino que sirven como puntos de anclaje de la BSA.

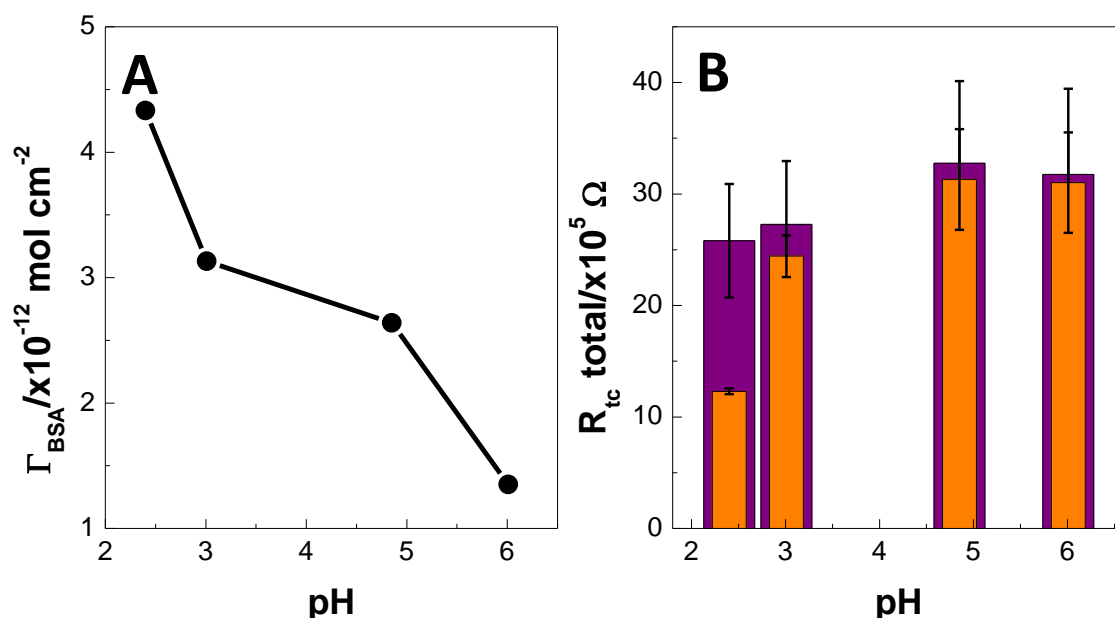


Figura 6.24. A Cubrimientos superficiales de BSA (Γ_{BSA}) en función del pH de la dispersión de GO-CHIT ensamblada sobre Au/MPS. **B** Dependencia de R_{tc} total de espectros de impedancia en Q/H₂Q 2,00 x10⁻³ M en función del pH de la dispersión de GO-CHIT ensamblada sobre Au/MPS. Las barras en naranja corresponden a los valores de R_{tc} obtenidos antes de la inmovilización de BSA y las barras violetas, para los R_{tc} luego de la unión de Au/MPS/GO-CHIT con BSA.

Los cambios en la inmovilización de BSA en función del pH de GO-CHIT también fueron analizados mediante la R_{tc} total obtenida a partir de EIE usando Q/H_2Q $2,00 \times 10^{-3}$ M como sonda redox (**figura 6.24 B**, barras naranjas). Conforme disminuye el pH de la dispersión de GO-CHIT ensamblada sobre Au/MPS, disminuye la R_{tc} total. Si bien GO-CHIT es un aislante desde el punto de vista electroquímico, la k_0 en comparación con la capa subyacente de Au/MPS es mayor. De esta manera, al inmovilizar mayor cantidad de GO-CHIT disminuye la R_{tc} total.

Dado que Γ_{BSA} aumenta cuando el pH disminuye, la modificación de Au/MPS/GO-CHIT con BSA produce un aumento en la diferencia de R_{tc} total de la plataforma, con y sin proteína (**figura 6.24 B**, barras violetas). Dicha diferencia en R_{tc} se acentúa con la disminución del pH: en la condición óptima (pH 2,48) el incremento en R_{tc} es del doble.

6.3.4. Ensamblado no covalente de RGO-CHIT

6.3.4.a. Propiedades electroquímicas de Au/MPS/RGO-CHIT

El efecto de la adsorción de RGO-CHIT sobre la respuesta electroquímica de Au/MPS fue estudiado mediante VC utilizando $FcOH$ $5,00 \times 10^{-4}$ M como sonda redox. La **figura 6.25 A** muestra los perfiles voltamperométricos obtenidos sobre Au (—), Au/MPS (—), y Au/MPS/RGO-CHIT (—) preparado a partir de la adsorción de una dispersión de RGO-CHIT $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ durante 60 min. Los gráficos de barra de las **figuras 6.25 B y C** presentan los parámetros electroquímicos ΔE_p y i_{pa} , respectivamente, obtenidos a partir de los voltamperogramas sobre cada plataforma.

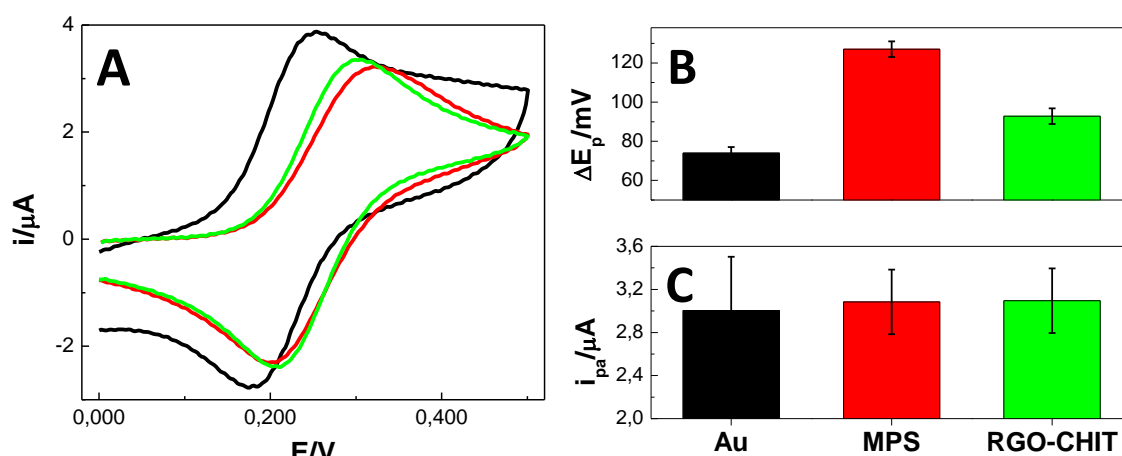


Figura 6.25. A Perfiles voltamperométricos en $FcOH$ $5,00 \times 10^{-4}$ M obtenidos sobre Au (—), Au/MPS (—), y Au/MPS/RGO-CHIT (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato $0,050$ M pH $7,40$. $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$. B y C Diferencia de potencial de pico (ΔE_p) y corriente de pico anódica (i_{pa}), respectivamente, para los voltamperogramas del panel A.

El ensamblado de RGO-CHIT sobre Au/MPS produce una disminución del ΔE_p , de (127 ± 4) mV a (93 ± 4) mV, asociada a una mejora en la cinética de la transferencia de carga de la cupla redox. En la **sección 6.3.1** se demostró que al reducir GO-CHIT con NaBH_4 se restablece parcialmente la red gráfica sp^2 del nanomaterial por lo que, cuando se ensambla al mismo sobre la plataforma se favorece la “comunicación electroquímica” con la sonda [67].

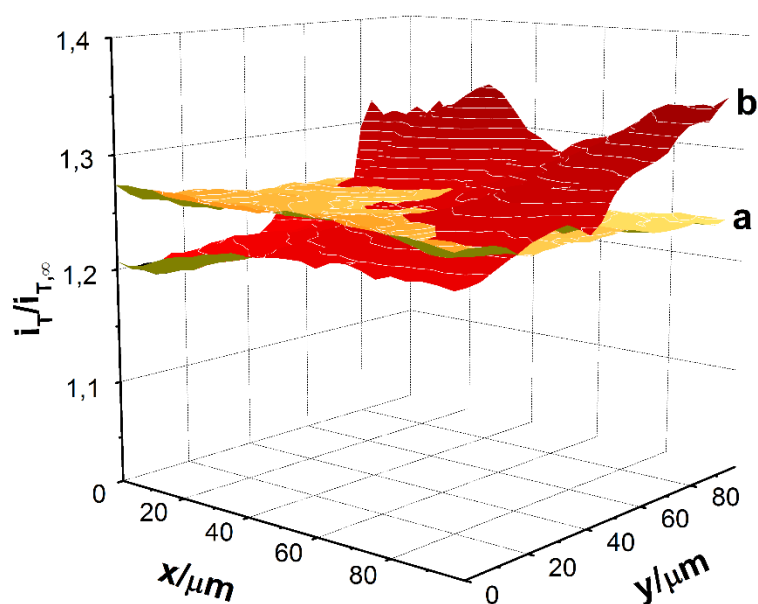


Figura 6.26. Imágenes SECM obtenidas sobre Au (a), y Au/MPS/GO-CHIT (b), empleando FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M como sonda redox. Condiciones experimentales iguales a la **figura 6.12**.

Se realizaron estudios de las plataformas mediante SECM con el fin de caracterizar la reactividad electroquímica superficial. La **figura 6.26** muestra las imágenes SECM de corriente normalizada obtenidas sobre Au (a) y Au/MPS/RGO-CHIT (b). La corriente normalizada promedio de Au/MPS/RGO-CHIT es estadísticamente igual a la del electrodo desnudo: $(1,26 \pm 0,03)$ y $(1,268 \pm 0,004) i_{T,\infty}$, respectivamente. Sin embargo, la respuesta sobre Au/MPS/RGO-CHIT no es uniforme, indicando que la adsorción de RGO-CHIT es heterogénea. Las zonas de corriente más alta corresponden a zonas cubiertas por la dispersión mientras las de corriente más baja, a zonas donde el cubrimiento de RGO-CHIT es bajo o nulo.

6.3.4.b. Inmovilización de BSA sobre Au/MPS/RGO-CHIT

Mediante SPR se evaluó el autoensamblado de RGO-CHIT y la inmovilización, mediada por Glut, de BSA. La **figura 6.27** ilustra el sensorgrama obtenido durante la construcción de la plataforma Au/MPS/RGO-CHIT y la posterior inmovilización covalente de la proteína.

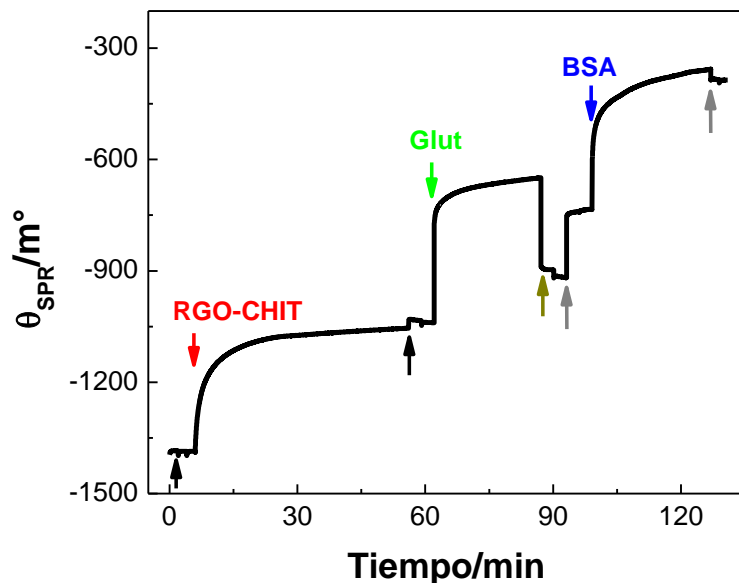


Figura 6.27. Sensorgrama para el ensamblado de RGO-CHIT (↓), y luego la activación con Glut (↓) e inmovilización covalente de BSA (↓). Las flechas ↓, ↓, y ↓ representan los enjuagues y cambios de medio con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, ácido acético 1 %V/V, y *buffer* acetato 0,020 M pH 5,00; respectivamente. Condiciones experimentales como en la **sección 6.2.2.a**.

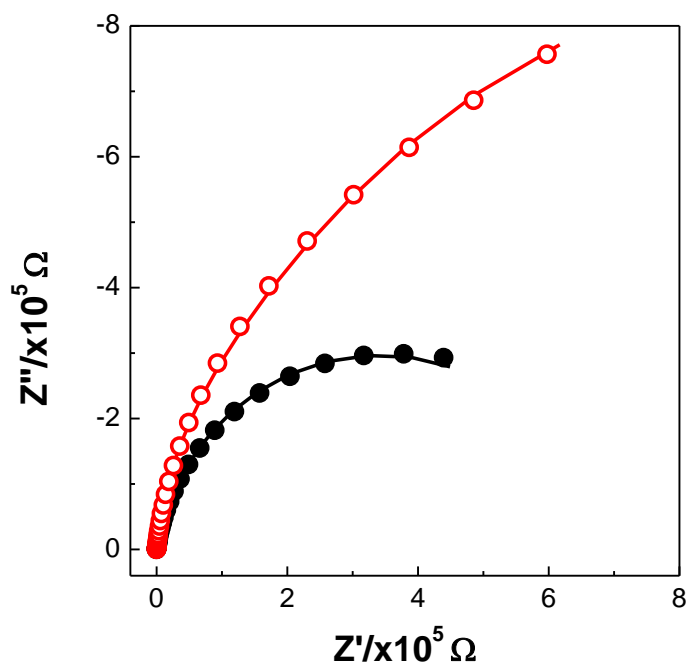


Figura 6.28. Gráficos de Nyquist para experimentos de EIE en Q/H_2Q $2,00 \times 10^{-3}$ M sobre Au/MPS/RGO-CHIT (●) y Au/MPS/RGO-CHIT/Glut/BSA (○). Condiciones experimentales iguales a las de la **figura 6.14**. Las líneas representan la respuesta a partir del ajuste con el circuito de la **figura 2.8 B** (sin el elemento de Warburg).

La interacción de Au/MPS con la dispersión de RGO-CHIT $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ (↓) produce un aumento de θ_{SPR} asociado a la adsorción de la dispersión sobre el sustrato de carga complementaria. Luego del lavado con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 (↓) se

activan los grupos amino expuestos de Au/MPS/RGO-CHIT con Glut 1 %V/V (↓) por 30 min. Posterior al cambio de medio a *buffer* acetato 0,020 M pH 5,00 (↓), se inyecta BSA 1,00 mg mL⁻¹ (↓). El cambio en el ángulo de SPR permitió determinar Γ_{BSA} para Au/MPS/RGO-CHIT, el cual fue de $4,46 \times 10^{-12}$ mol cm⁻².

Al igual que en los casos anteriores, la modificación con BSA genera cambios en las propiedades interfaciales de la plataforma que pueden ser evaluadas mediante EIE. La **figura 6.28** muestra los gráficos de Nyquist obtenidos sobre Au/MPS/RGO-CHIT (●) y Au/MPS/RGO-CHIT/Glut/BSA (○) en solución de Q/H₂Q $2,00 \times 10^{-3}$ M. Los espectros de impedancia fueron ajustados con el circuito equivalente de la **figura 2.8 B** sin el elemento de Warburg. La utilización del modelo de membrana capilar implica la presencia de dos zonas con k_0 aparente distintas debido a la distribución del polímero bloqueante y la superficie conductora del RGO (**sección 6.3.3.b**).

La inmovilización covalente de BSA sobre Au/MPS/RGO-CHIT provoca el incremento en la R_{tc} total de $(7,6 \pm 0,6) \times 10^5$ a $(2,0 \pm 0,2) \times 10^6 \Omega$. De manera similar a las plataformas con GO y GO-CHIT, la disminución en la accesibilidad de la sonda a la superficie electroactiva por la presencia de la proteína produce este aumento en R_{tc} .

6.3.4.c. Efecto del pH sobre la inmovilización de RGO-CHIT y BSA

Se estudió el efecto del pH de la dispersión de RGO-CHIT sobre las propiedades electroquímicas de Au/MPS/RGO-CHIT. Las imágenes SECM de la **figura 6.29** presentan la reactividad superficial para Au (**a**) y Au/MPS/RGO-CHIT a partir del ensamblado de dispersiones de RGO-CHIT 0,50 mg mL⁻¹ a distintos pHs: 5,80 (**b**), 4,00 (**c**), 2,95 (**d**) y 1,95 (**e**).

En la **tabla 6.4** se muestran los valores de $i_T/i_{T,\infty}$ promedio para cada una de las superficies. Se observa que la modificación con la dispersión de RGO-CHIT a pH 5,80 no incrementa la corriente normalizada respecto a la superficie de Au. Esto se puede explicar por el hecho que a pH cercanos a 7 las cadenas de CHIT se encuentran poco protonadas (**figura 6.23**), haciendo que el polímero no se encuentre extendido sino ovillado y bloqueando la conducción de las láminas de RGO. Al disminuir el pH de la dispersión a 4,00, la $i_T/i_{T,\infty}$ comienza a aumentar. La respuesta en corriente es poco regular lo cual indica la formación de agregados sobre la superficie, dado que la dispersabilidad de RGO-CHIT no es buena. La reducción del pH a 2,95 y 1,95 genera aumentos marcados en la corriente normalizada y superficies con una respuesta más homogénea, sugiriendo cubrimientos regulares de RGO-CHIT.

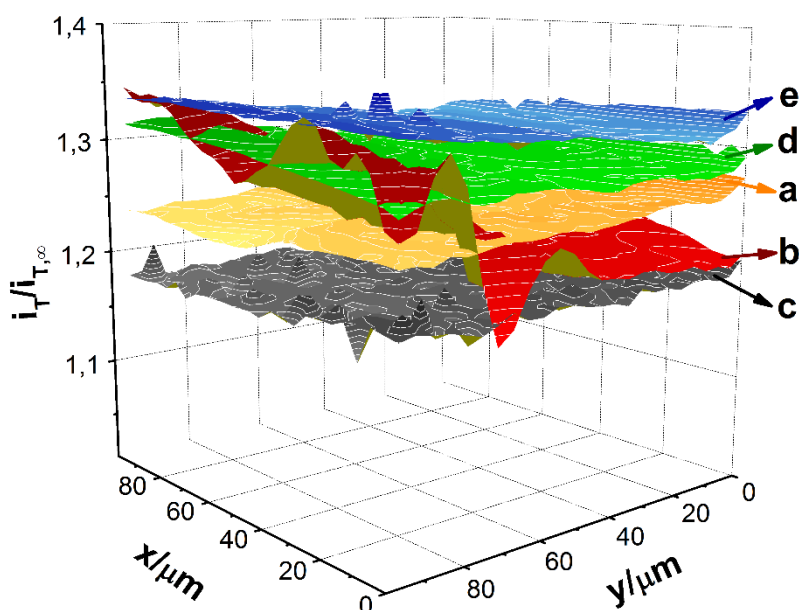


Figura 6.29. Imágenes SECM obtenidas sobre Au (a), y Au/MPS/RGO-CHIT a partir de dispersiones de RGO-CHIT 0,50 mg mL⁻¹ preparadas a distintos pHs: 5,80 (b), 4,00 (c), 2,95 (d), y 1,95 (e). Condiciones experimentales iguales a la **figura 6.12**.

Tabla 6.4. Valores de corriente normalizada del UME ($i_T/i_{T,\infty}$) para las imágenes SECM de la **figura 6.29**.

	$i_T/i_{T,\infty}$
<i>Au</i>	1,268 ± 0,004
<i>Au/MPS/RGO-CHIT (pH 5,80)</i>	1,186 ± 0,006
<i>Au/MPS/RGO-CHIT (pH 4,00)</i>	1,26 ± 0,03
<i>Au/MPS/RGO-CHIT (pH 2,95)</i>	1,294 ± 0,009
<i>Au/MPS/RGO-CHIT (pH 1,95)</i>	1,322 ± 0,008

Los resultados anteriores demuestran que, a pesar de que el CHIT que modifica a RGO sea un bloqueante para la transferencia de carga, cuando la dispersabilidad de RGO-CHIT es óptima (a pHs bajos) prima el comportamiento conductor del RGO.

El pH de RGO-CHIT también tiene un marcado efecto en la inmovilización de BSA. La disminución del pH de la dispersión provoca un incremento en la cantidad de proteína covalentemente inmovilizada, como lo muestran los Γ_{BSA} (**figura 6.30 A**) obtenidos mediante experimentos de SPR. Al inmovilizar mayor cantidad de CHIT aumenta la cantidad de grupos amino disponibles que sirven de puntos de anclaje para BSA.

La unión de BSA a Au/MPS/RGO-CHIT produce cambios en la región interfacial que, de la misma manera que con las plataformas anteriores, puede ser evaluado

mediante EIE. La R_{tc} total (**figura 6.30 B**), obtenida a partir de experimentos de EIE con Q/H_2Q $2,00 \times 10^{-3}$ M para Au/MPS/RGO-CHIT, disminuye al reducir el pH de la dispersión ensamblada. Dado que RGO-CHIT es conductor y posee un alto porcentaje de $C sp^2$, dicha disminución está asociada a un aumento en la k_0 (**ecuación 2.13**) por el ensamblado de una mayor cantidad de RGO-CHIT al reducir el pH.

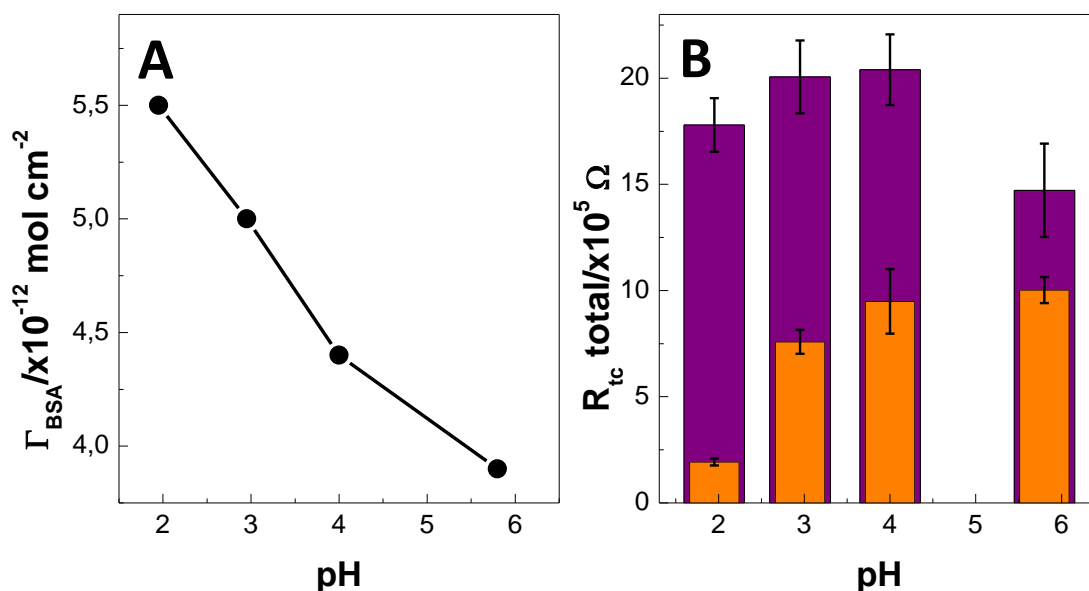


Figura 6.30. A Cubrimientos superficiales de BSA (Γ_{BSA}) en función del pH de la dispersión de RGO-CHIT ensamblada sobre Au/MPS. **B** Dependencia de R_{tc} total de espectros de impedancia en Q/H_2Q $2,00 \times 10^{-3}$ M en función del pH de la dispersión de RGO-CHIT ensamblada sobre Au/MPS. Las barras en naranja corresponden a los valores de R_{tc} obtenidos antes de la inmovilización de BSA y las barras violetas, para los R_{tc} luego de la unión de Au/MPS/RGO-CHIT con BSA.

Al inmovilizar covalentemente BSA sobre las plataformas a cada pH, la R_{tc} total aumenta en comparación a la obtenida sin BSA (**figura 6.30 B**, barras violetas) debido al bloqueo de la superficie. Dado que la plataforma ensamblada a pH 1,95 es la que posee mayor cantidad de RGO-CHIT es la que presenta el mayor cambio en la R_{tc} .

6.3.5. Inmovilización covalente de GO-CHIT y RGO-CHIT

La inmovilización covalente de GO-CHIT y RGO-CHIT se llevó a cabo activando la plataforma Au/4ATP con Glut y luego dejando interaccionar la superficie activada con la dispersión correspondiente. La modificación sucesiva de la plataforma fue evaluada mediante VC utilizando a FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M como marcador redox. La **figura 6.31 A** muestra los perfiles voltamperométricos obtenidos sobre Au (—), Au/4ATP (—), Au/4ATP/Glut/GO-CHIT (—), y Au/4ATP/Glut/RGO-CHIT (—) preparados a partir de la interacción de Au/4ATP/Glut con dispersiones de GO-CHIT ó RGO-CHIT $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ a pH 1,95, durante 15 h. El ensamblado del tiol 4ATP sobre Au produce una disminución en la i_{pa} de FcOH (**figura 6.31 B**) debido a la repulsión electrostática del producto de

oxidación y los grupos amino de la monocapa del tiol. La inmovilización de las dispersiones sobre Au/4ATP/Glut no genera cambios marcados en ΔE_p y i_{pa} (**figura 6.31 B y C**, respectivamente) aún después de 15 h de dejar interacción, lo cual indica que no hay un cambio apreciable en las propiedades electroquímicas de la plataforma. Esto sugiere una baja densidad de modificación de Au/4ATP/Glut con GO-CHIT y RGO-CHIT.

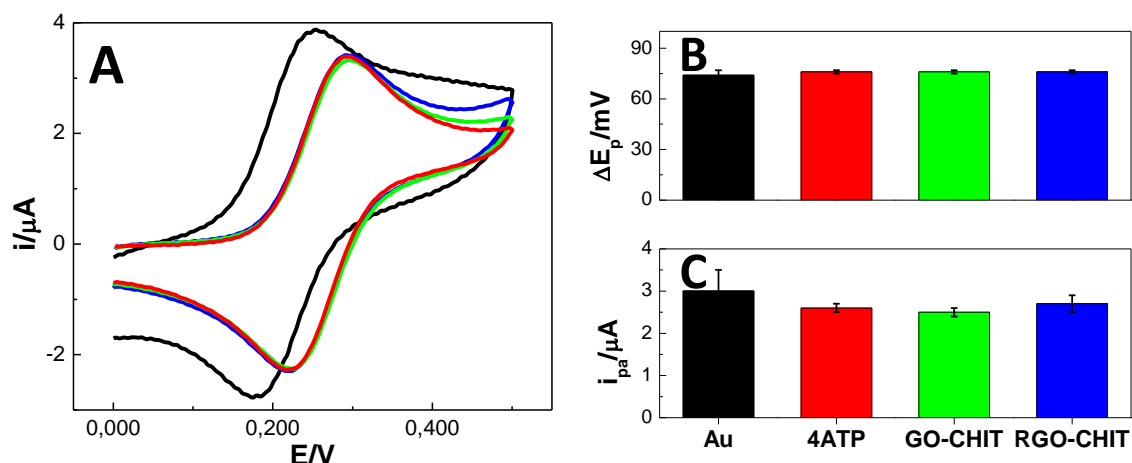


Figura 6.31. A Perfiles voltamperométricos en FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M sobre Au (—), Au/4ATP (—), Au/4ATP/Glut/GO-CHIT (—), y Au/4ATP/Glut/RGO-CHIT (—). Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. $\nu = 0,050$ V s^{-1} . B y C Diferencia de potencial de pico (ΔE_p) y corriente de pico anódica (i_{pa}), respectivamente, para los voltamperogramas del panel A.

La inmovilización covalente de GO-CHIT y RGO-CHIT fue evaluada en tiempo real a través de SPR. Las **figuras 6.32 A y B** muestran los sensorgramas obtenidos durante la construcción de las plataformas a partir de dispersiones de GO-CHIT y RGO-CHIT, respectivamente. En primer término se activaron los grupos amino de Au/4ATP con Glut 1 %V/V (↓) para poder luego enlazar covalentemente GO-CHIT ó RGO-CHIT (↓) incubando durante 15 hs una dispersión del nano-material correspondiente a pH 1,95 (**secciones 6.3.3.c y 6.3.4.c**). Se seleccionó dicho tiempo de incubado para alcanzar una modificación con la mayor cantidad posible de dispersión, ya que a tiempos menores se encontraron cubrimientos prácticamente nulos de BSA. A continuación, se bloquearon los grupos amino de 4ATP que no reaccionaron con etanolamina 1,0 M pH 8,30 durante 15 min (↓). Luego de los enjuagues correspondientes se activaron nuevamente los grupos amino del CHIT con Glut (↓) y se inmovilizó covalentemente BSA (↓), siguiendo el mismo protocolo de las **secciones 6.3.3.b y 6.3.4.b**. Al igual que en los casos anteriores, a partir de $\Delta\theta_{SPR}$ se pudieron calcular los Γ_{BSA} para Au/4ATP/Glut/GO-CHIT/Glut/BSA y Au/4ATP/Glut/RGO-CHIT/Glut/BSA los cuales fueron, respectivamente, $1,64 \times 10^{-12}$ y $2,37 \times 10^{-12}$ mol cm^{-2} . En consonancia con los resultados de caracterización electroquímica, la modificación con la proteína fue más baja en comparación a las plataformas ensambladas no covalentemente. Estos resultados, y los tiempos prolongados de

modificación de esta estrategia, permiten concluir que la inmovilización covalente de los derivados de grafeno no presenta ventajas comparativas superiores frente a las metodologías no covalentes.

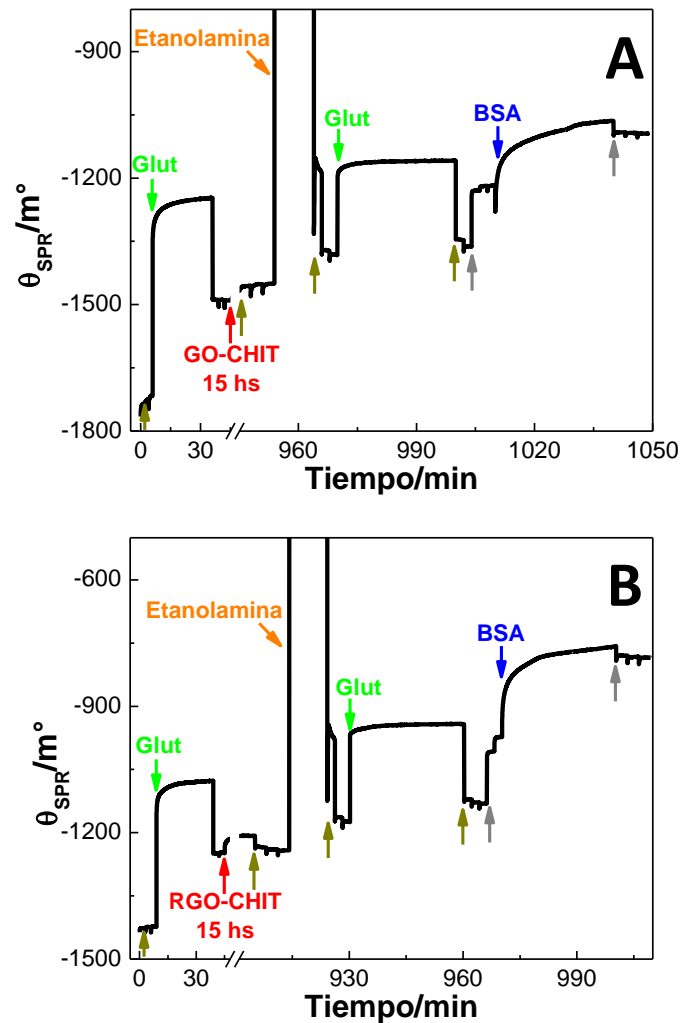
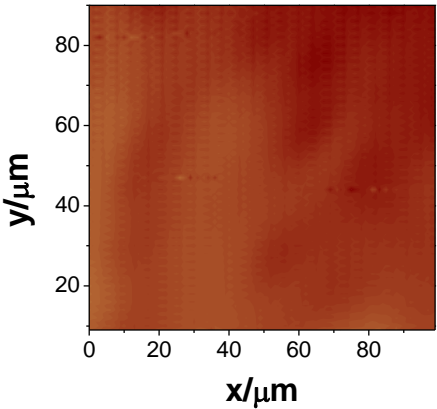
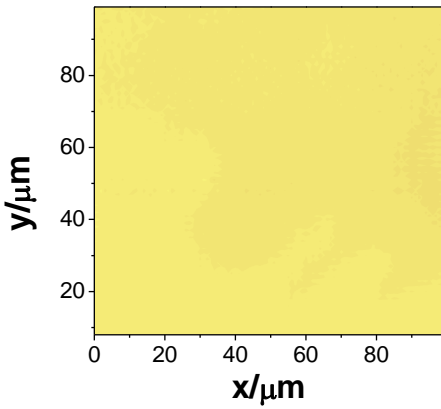
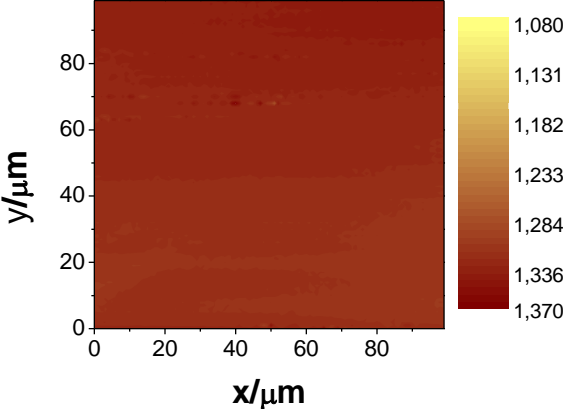


Figura 6.32. Sensorgramas para el ensamblado covalente por incubado en dispersiones de GO-CHIT (A) y RGO-CHIT (B). Las flechas \downarrow , y \downarrow representan los enjuagues y cambios de medio con ácido acético 1 %V/V, y *buffer* acetato 0,020 M pH 5,00; respectivamente. Condiciones experimentales como en la **sección 6.2.2.a**.

6.3.6. Comparación de las estrategias de inmovilización no covalentes

A partir de una inspección rápida de los resultados se concluye que entre las estrategias covalentes y las no covalentes de inmovilización de los nanomateriales derivados de grafeno, las no covalentes arrojan cubrimientos de BSA más grandes, cambios marcados en las propiedades electroquímicas y rapidez y simplicidad en el preparado e las plataformas.

Tabla 6.5. Comparación de los resultados más relevantes para las estrategias de inmovilización no covalentes: Au/MPS/PDDA/GO, Au/MPS/GO-CHIT, y Au/MPS/RGO-CHIT. En todos los casos, los resultados mostrados corresponden a la condición óptima de pH.

	<i>PDDA/GO</i>	<i>GO-CHIT</i>	<i>RGO-CHIT</i>
Reactividad superficial (SECM) ^a			
$\Gamma_{BSA}/\text{mol cm}^{-2}$	$9,18 \times 10^{-12}$	$4,33 \times 10^{-12}$	$5,50 \times 10^{-12}$
Cubrimiento superficial de nano-material ^b /mg cm ⁻²	$6,90 \times 10^{-4}$	$3,78 \times 10^{-4}$	$3,64 \times 10^{-4}$
% aumento R_{tc} ^c	269	110	821

^a Corresponden a las imágenes SECM mostradas en las secciones anteriores, presentadas en 2D.

^b Obtenido de ensamblar PDDA/GO, GO-CHIT ó RGO-CHIT sobre una cubeta de cuarzo (**sección 2.10.1**) en las mismas condiciones al ensamblado sobre electrodos de Au. Luego de tomar los espectros UV-Vis correspondientes se obtuvieron los cubrimientos a partir de los coeficientes de extinción determinados. $\epsilon(\text{GO}, 230 \text{ nm}) = 49,0 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. $\epsilon(\text{GO-CHIT}, 232 \text{ nm}) = 22,4 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. $\epsilon(\text{RGO-CHIT}, 258 \text{ nm}) = 22,0 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

^c Calculado como $[R_{tc}(\text{con BSA}) - R_{tc}(\text{sin BSA})] * 100 / R_{tc}(\text{sin BSA})$.

En la **tabla 6.5** se presenta un resumen de los datos más relevantes para realizar dicha comparación: la reactividad superficial a partir de imágenes SECM usando FcOH como sonda, los cubrimientos de la proteínas modelo obtenidos mediante SPR, la cantidad de nanomaterial inmovilizado (a partir de experimentos UV-Vis inmovilizando al nanomaterial correspondiente sobre cuarzo activado) y el porcentaje de incremento de R_{tc} para los experimentos de EIE con Q/H₂Q 2,00 x10⁻³ M como cupla redox.

De todas las plataformas, sobre Au/MPS/PDDA/GO se obtienen los mayores cubrimientos de BSA. En consecuencia, para el desarrollo de biosensores de afinidad donde la capa de reconocimiento es una proteína y donde el método de detección es directo y depende de la cantidad de proteína inmovilizada (SPR, por ejemplo) Au/MPS/PDDA/GO es la plataforma de elección.

Desde el punto de vista electroquímico, la plataforma que presenta mayores cambios en la respuesta frente a la inmovilización de la proteína es Au/MPS/RGO-CHIT. Esta mayor sensibilidad electroquímica no está asociada al Γ_{BSA} ni a la cantidad de nanomaterial inmovilizado, dado que Au/MPS/PDDA incorpora cerca del doble de GO que RGO-CHIT sobre Au/MPS. Al ser RGO-CHIT mejor conductor, la velocidad de transferencia de carga es mayor sobre dicha plataforma por lo que es razonable esperar que su respuesta electroquímica sea más sensible al bloqueo superficial. Sobre la base de estos resultados, para el desarrollo de biosensores donde el método de detección la detección se haga a partir de cambios en las propiedades electroquímicas, Au/MPS/RGO-CHIT es la plataforma analítica.

6.4. Conclusiones parciales

Se modificó covalentemente a GO con CHIT, un polímero rico en grupos amino, y luego se redujo químicamente para obtener RGO-CHIT. La caracterización por espectroscopia IR, UV-Vis y Raman y TGA permitió evaluar la modificación exitosa con CHIT y la restauración de la red de C sp² del RGO-CHIT. Los nanomateriales sintetizados fueron utilizados para modificar covalente y no covalentemente a sustratos de Au, previa derivatización de la superficie con un tiol.

Las estrategias covalentes de inmovilización sobre Au/4ATP/Glut brindaron cubrimientos bajos de BSA y tiempos de preparación prolongados por lo que no muestran ventajas competitivas frente a las metodologías no covalentes estudiadas en el presente capítulo.

En el caso de las estrategias no covalentes se evaluaron las plataformas Au/MPS/PDDA/GO, Au/MPS/GO-CHIT y Au/MPS/RGO-CHIT. En los tres casos se encontraron cambios significativos en la respuesta electroquímica y reactividad

superficial usando FcOH como sonda redox. A partir de SPR se evaluó en tiempo real la construcción de las arquitecturas supramoleculares y se obtuvieron los cubrimientos superficiales de BSA, la proteína utilizada como modelo. A partir de la variación del pH de las dispersiones ensambladas se encontró que la dispersabilidad y la carga superficial son factores determinantes de la cantidad de nanomaterial inmovilizado y de las propiedades electroquímicas de las plataformas. Au/MPS/PDDA/GO fue la plataforma que presentó la mayor capacidad de inmovilización de la proteína modelo, mientras que Au/MPS/RGO-CHIT fue la de mayor sensibilidad electroquímica frente a la inmovilización de la misma. Así, la primera plataforma sería la indicada para biosensores de afinidad con detección óptica mientras que la segunda, para biosensores electroquímicos de afinidad.

6.5. Bibliografía

- [1] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, The chemistry of graphene oxide, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 228–240.
- [2] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, et al., Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 6156–6214.
- [3] S.S. Nanda, G.C. Papaefthymiou, D.K. Yi, Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 40 (2015) 291–315.
- [4] S.P. Lonkar, Y.S. Deshmukh, A. a. Abdala, Recent advances in chemical modifications of graphene, *Nano Res.* 8 (2014) 1039–1074.
- [5] A. Martín, A. Escarpa, Graphene: The cutting-edge interaction between chemistry and electrochemistry, *Trends Anal. Chem.* 56 (2014) 13–26.
- [6] G.T. Hermanson, Capítulo 4 - Zero-Length Crosslinkers, in: G.T.B.T.-B.T. (Third edition) Hermanson (Ed.), Academic Press, Boston, 2013: pp. 259–273.
- [7] Z. Liu, J.T. Robinson, X. Sun, H. Dai, PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 10876–10877.
- [8] L. Jin, K. Yang, K. Yao, S. Zhang, H. Tao, S.-T. Lee, et al., Functionalized Graphene Oxide in Enzyme Engineering: A Selective Modulator for Enzyme Activity and Thermostability, *ACS Nano.* 6 (2012) 4864–4875.
- [9] H. Bao, Y. Pan, Y. Ping, N.G. Sahoo, T. Wu, L. Li, et al., Chitosan-Functionalized Graphene Oxide as a Nanocarrier for Drug and Gene Delivery, *Small.* 7 (2011) 1569–1578.
- [10] Y. Weng, B. Jiang, K. Yang, Z. Sui, L. Zhang, Y. Zhang, Polyethyleneimine-modified graphene oxide nanocomposites for effective protein functionalization, *Nanoscale.* 7 (2015) 14284–14291.
- [11] H.K.F. Cheng, N.G. Sahoo, Y.P. Tan, Y. Pan, H. Bao, L. Li, et al., Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites Filled with Poly(vinyl alcohol)-Grafted Graphene Oxide, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 4 (2012) 2387–2394.
- [12] J. Liu, J. Tang, J.J. Gooding, Strategies for chemical modification of graphene and applications of chemically modified graphene, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 12435–12452.
- [13] Z. Liu, X. Duan, G. Qian, X. Zhou, W. Yuan, Eco-friendly one-pot synthesis of highly dispersible functionalized graphene nanosheets with free amino groups., *Nanotechnology.* 24 (2013) 045609.

- [14] S.H. Lee, D.R. Dreyer, J. An, A. Velamakanni, R.D. Piner, S. Park, et al., Polymer Brushes via Controlled, Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) from Graphene Oxide, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 281–288.
- [15] M.-C. Hsiao, S.-H. Liao, M.-Y. Yen, P.-I. Liu, N.-W. Pu, C.-A. Wang, et al., Preparation of Covalently Functionalized Graphene Using Residual Oxygen-Containing Functional Groups, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2 (2010) 3092–3099.
- [16] A. Karimi, A. Othman, A. Uzunoglu, L. Stanciu, S. Andreescu, Graphene based enzymatic bioelectrodes and biofuel cells, *Nanoscale.* 7 (2015) 6909–6923.
- [17] L. Tang, Y. Wang, J. Li, The graphene/nucleic acid nanobiointerface, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 6954–6980.
- [18] Y. Fang, E. Wang, Electrochemical biosensors on platforms of graphene, *Chem. Commun.* 49 (2013) 9526–9539.
- [19] Y. Zhang, C. Wu, S. Guo, J. Zhang, Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides, *Nanotechnol. Rev.* 2 (2013) 27–45.
- [20] R.S. Edwards, K.S. Coleman, Graphene synthesis: relationship to applications, *Nanoscale.* 5 (2013) 38–51.
- [21] H.-P. Cong, J.-F. Chen, S.-H. Yu, Graphene-based macroscopic assemblies and architectures: an emerging material system., *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 7295–325.
- [22] F. Li, S. Gan, D. Han, L. Niu, Graphene-Based Nanohybrids for Advanced Electrochemical Sensing, *Electroanalysis.* 27 (2015) 2098–2115.
- [23] G.T. Hermanson, Capítulo 5 - Homobifunctional Crosslinkers, in: G.T.B.T.-B.T. (Third edition) Hermanson (Ed.), Academic Press, Boston, 2013: pp. 275–298.
- [24] Y. Liu, D. Yu, C. Zeng, Z. Miao, L. Dai, Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors, *Langmuir.* 26 (2010) 6158–6160.
- [25] C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, Water-Soluble Graphene Covalently Functionalized by Biocompatible Poly-L-lysine, *Langmuir.* 25 (2009) 12030–12033.
- [26] J. Zhang, J. Zhang, F. Zhang, H. Yang, X. Huang, H. Liu, et al., Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization, *Langmuir.* 26 (2010) 6083–6085.
- [27] J. Shen, M. Shi, B. Yan, H. Ma, N. Li, Y. Hu, et al., Covalent attaching protein to graphene oxide via diimide-activated amidation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 81 (2010) 434–438.
- [28] R. Su, P. Shi, M. Zhu, F. Hong, D. Li, Studies on the properties of graphene oxide–alkaline protease bio-composites, *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 136–140.
- [29] L. Li, L. Zhang, J. Yu, S. Ge, X. Song, All-graphene composite materials for signal amplification toward ultrasensitive electrochemical immunosensing of tumor marker, *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 108–114.
- [30] F. Yang, Z. Yang, Y. Zhuo, Y. Chai, R. Yuan, Ultrasensitive electrochemical immunosensor for carbohydrate antigen 19-9 using Au/porous graphene nanocomposites as platform and Au@Pd core/shell bimetallic functionalized graphene nanocomposites as signal enhancers, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 356–362.
- [31] B. Kavosi, A. Salimi, R. Hallaj, F. Moradi, Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 915–923.
- [32] Y. Wang, H. Ma, X. Wang, X. Pang, D. Wu, B. Du, et al., Novel signal amplification strategy for ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor employing Pd–Fe₃O₄-GS as the matrix and SiO₂ as the label, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 59–65.
- [33] Y. Zhao, Y. Zheng, R. Kong, L. Xia, F. Qu, Ultrasensitive electrochemical immunosensor

based on horseradish peroxidase (HRP)-loaded silica-poly(acrylic acid) brushes for protein biomarker detection, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 383–388.

- [34] A.H. Loo, A. Bonanni, M. Pumera, Biorecognition on graphene: Physical, covalent, and affinity immobilization methods exhibiting dramatic differences, *Chem. - An Asian J.* 8 (2013) 198–203.
- [35] S. Alwarappan, S. Boyapalle, A. Kumar, C.Z. Li, S. Mohapatra, Comparative study of single-, few-, and multilayered graphene toward enzyme conjugation and electrochemical response, *J. Phys. Chem. C.* 116 (2012) 6556–6559.
- [36] Y. Zhang, J. Zhang, X. Huang, X. Zhou, H. Wu, S. Guo, Assembly of graphene oxide-enzyme conjugates through hydrophobic interaction, *Small.* 8 (2012) 154–159.
- [37] G. Hernández-Cancel, D. Suazo-Dávila, A.J. Ojeda-Cruzado, D. García-Torres, C.R. Cabrera, K. Griebenow, Graphene oxide as a protein matrix: influence on protein biophysical properties, *J. Nanobiotechnology.* 13 (2015) 70.
- [38] V. Stavyiannoudaki, V. Vamvakaki, N. Chaniotakis, Comparison of protein immobilisation methods onto oxidised and native carbon nanofibres for optimum biosensor development, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 429–435.
- [39] I. V Pavlidis, M. Patila, A.C. Polydera, D. Gournis, H. Stamatis, Immobilization of Enzymes and other Biomolecules on Graphene, in: V. Georgakilas (Ed.), *Funct. Graphene*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2014: pp. 139–172.
- [40] H. Gao, H. Duan, 2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 404–419.
- [41] J. Liu, Z. Liu, C.J. Barrow, W. Yang, Molecularly engineered graphene surfaces for sensing applications: A review, *Anal. Chim. Acta.* 859 (2015) 1–19.
- [42] T. Lee, S.H. Min, M. Gu, Y.K. Jung, W. Lee, J.U. Lee, et al., Layer-by-Layer Assembly for Graphene-Based Multilayer Nanocomposites: Synthesis and Applications, *Chem. Mater.* 27 (2015) 3785–3796.
- [43] Y. Gu, C. Ju, Y. Li, Z. Shang, Y. Wu, Y. Jia, et al., Detection of circulating tumor cells in prostate cancer based on carboxylated graphene oxide modified light addressable potentiometric sensor, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 24–31.
- [44] J. Narayanan, M.K. Sharma, S. Ponmariappan, Sarita, M. Shaik, S. Upadhyay, Electrochemical immunosensor for botulinum neurotoxin type-E using covalently ordered graphene nanosheets modified electrodes and gold nanoparticles-enzyme conjugate, *Biosens. Bioelectron.* 69 (2015) 249–256.
- [45] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632.
- [46] H.J. Shin, K.K. Kim, A. Benayad, S.M. Yoon, H.K. Park, I.S. Jung, et al., Efficient reduction of graphite oxide by sodium borohydride and its effect on electrical conductance, *Adv. Funct. Mater.* 19 (2009) 1987–1992.
- [47] D. Li, M.B. Muller, S. Gilje, R.B. Kaner, G.G. Wallace, Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 101–105.
- [48] A.C. Ferrari, D.M. Basko, Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene, *Nat. Nanotechnol.* 8 (2013) 235–246.
- [49] M.S. Dresselhaus, A. Jorio, L.G. Cançado, G. Dresselhaus, R. Saito, Raman Spectroscopy: Characterization of Edges, Defects, and the Fermi Energy of Graphene and sp² Carbons, in: H. Raza (Ed.), *Graphene Nanoelectron.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2012: pp. 15–55.
- [50] S. Stankovich, D. a. Dikin, R.D. Piner, K. a. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, et al., Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon N. Y.* 45 (2007) 1558–1565.

- [51] M. V Bracamonte, G.I. Lacconi, S.E. Urreta, L.E.F. Foa Torres, On the Nature of Defects in Liquid-Phase Exfoliated Graphene, *J. Phys. Chem. C*. 118 (2014) 15455–15459.
- [52] A.C. Ferrari, J.C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, et al., Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 187401.
- [53] J. Shen, Y. Hu, C. Li, C. Qin, M. Ye, Synthesis of Amphiphilic Graphene Nanoplatelets, *Small*. 5 (2009) 82–85.
- [54] G.K. da R. Cortes, E.F.S. Vieira, A.R. Cestari, R.A. Chagas, Tetracycline release from chitosan/fish-scale-based membranes, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014) 39943.
- [55] L. Yang, W. Wei, J. Xia, H. Tao, P. Yang, Electrochemical Studies of Derivatized Thiol Self-Assembled Monolayers on Gold Electrode in the Presence of Surfactants, *Anal. Sci.* 21 (2005) 679–684.
- [56] S. Rapino, E. Treossi, V. Palermo, M. Marcaccio, F. Paolucci, F. Zerbetto, Playing peekaboo with graphene oxide: a scanning electrochemical microscopy investigation, *Chem. Commun.* 50 (2014) 13117–13120.
- [57] S. Ekgasit, A. Tangcharoenbumrungsuk, F. Yu, A. Baba, W. Knoll, Resonance shifts in SPR curves of nonabsorbing, weakly absorbing, and strongly absorbing dielectrics, *Sensors Actuators B Chem.* 105 (2005) 532–541.
- [58] M.E. Orazem, B. Tribollet, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2008.
- [59] A. Santos, J.J. Davis, P.R. Bueno, Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors, *J. Anal. Bioanal. Tech.* 5 (2014) S7:016.
- [60] J. Borges, J.F. Mano, Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers, *Chem. Rev.* 114 (2014) 8883–8942.
- [61] Y. Song, M. Feng, H. Zhan, Geometry-dependent electrochemistry of graphene oxide family, *Electrochem. Commun.* 56 (2015) 38–42.
- [62] B.W. Ninham, On progress in forces since the DLVO theory, *Adv. Colloid Interface Sci.* 83 (1999) 1–17.
- [63] L.J. Cote, J. Kim, Z. Zhang, C. Sun, J. Huang, Tunable assembly of graphene oxide surfactant sheets: wrinkles, overlaps and impacts on thin film properties, *Soft Matter*. 6 (2010) 6096–6101.
- [64] J. Rong, M. Ge, X. Fang, C. Zhou, Solution ionic strength engineering as a generic strategy to coat graphene oxide (GO) on various functional particles and its application in high-performance lithium-sulfur (Li-S) batteries, *Nano Lett.* 14 (2014) 473–479.
- [65] B. Konkena, S. Vasudevan, Understanding Aqueous Dispersibility of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide through pKa Measurements, *J. Phys. Chem. Lett.* 3 (2012) 867–872.
- [66] M. Lotya, A. Rakovich, J.F. Donegan, J.N. Coleman, Measuring the lateral size of liquid-exfoliated nanosheets with dynamic light scattering, *Nanotechnology*. 24 (2013) 265703.
- [67] X. Zong, N. Kong, J. Liu, W. Yang, M. Cao, J.J. Gooding, The influence of graphene on the electrical communication through organic layers on graphite and gold electrodes, *Electroanalysis*. 26 (2014) 84–92.

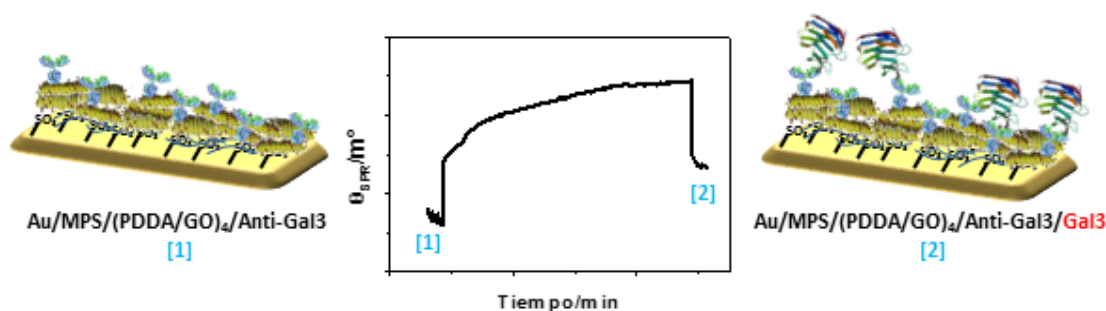
CAPÍTULO 7

Aplicación analítica de Au/MPS/PDDA/GO

Inmunosensor plasmónico
para la detección de un
biomarcador de infarto
de miocardio

RESUMEN

Como se demostró en el capítulo anterior, la plataforma PDDA/GO fue la que presentó mejor capacidad de inmovilizar a una proteína modelo. Sobre esa base, en el presente capítulo se discute el autoensamblado de multicapas tipo PDDA/GO sobre Au/MPS y las posterior inmovilización del anticuerpo Anti-Gal3 a través del acoplamiento por afinidad con el ácido 3-aminofenilborónico. El objetivo final es desarrollar un inmunosensor plasmónico para la detección sensible y selectiva de Gal3, una lectina marcadora de riesgo de insuficiencia cardíaca aguda. Mediante SPR, espectroscopia UV-Vis y SECM se analizó el crecimiento de la arquitectura supramolecular Au/MPS/(PDDA/GO)_n, las propiedades ópticas y electroquímicas de las películas formadas y la cantidad de proteína covalentemente inmovilizada. Se muestran las ventajas de utilizar GO en la construcción de biosensores plasmónicos y se analizan los parámetros analíticos del biosensor propuesto tales como selectividad, sensibilidad y rango lineal.



7.1. Introducción

7.1.1. Anticuerpos e inmunosensores

Los anticuerpos son glicoproteínas presentes en el suero sanguíneo de todos los vertebrados y son empleados por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar elementos extraños y potencialmente dañinos como bacterias, virus o parásitos [1]. Su estructura básica consta de dos subunidades pesadas (P, en color gris en la **figura 7.1**) de ~ 50 kDa y de dos livianas (L, en color celeste en la **figura 7.1**) de ~ 23 kDa. Estos dominios se mantienen unidos por puentes disulfuro e interacciones no covalentes y hacen que los anticuerpos posean forma de Y, donde las dos regiones superiores se denominan Fab y la inferior, Fc.

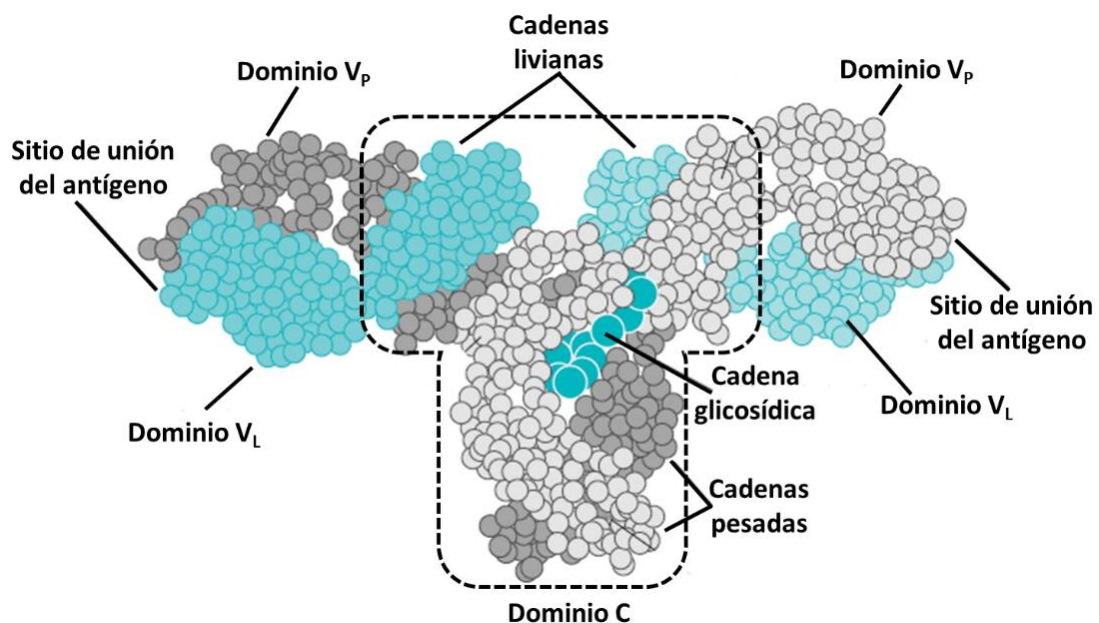


Figura 7.1. Esquema de la estructura de un anticuerpo.

Los anticuerpos poseen dos dominios: uno que se conserva independientemente del tipo de anticuerpo y se denomina constante (C, en la **figura 7.1**) y otro hipervariable que es el que determina la especificidad hacia un dado antígeno (V, en la **figura 7.1**). Cada anticuerpo posee dos sitios de unión del antígeno (en la región Fab), formados por los dominios V_P y V_L y una cadena glicosídica en la región Fc (se muestra con esferas más grandes en la **figura 7.1**).

Desde el punto de vista analítico, los anticuerpos revisten una gran importancia debido a la capacidad de actuar como capa de bio-reconocimiento de elevada selectividad [2]. En este sentido, los inmunosensores han sido utilizados para cuantificar y detectar proteínas, toxinas biológicas, y biomarcadores en un campo amplio como

seguridad alimenticia, química farmacéutica, monitoreo ambiental y bioquímica clínica [2-5].

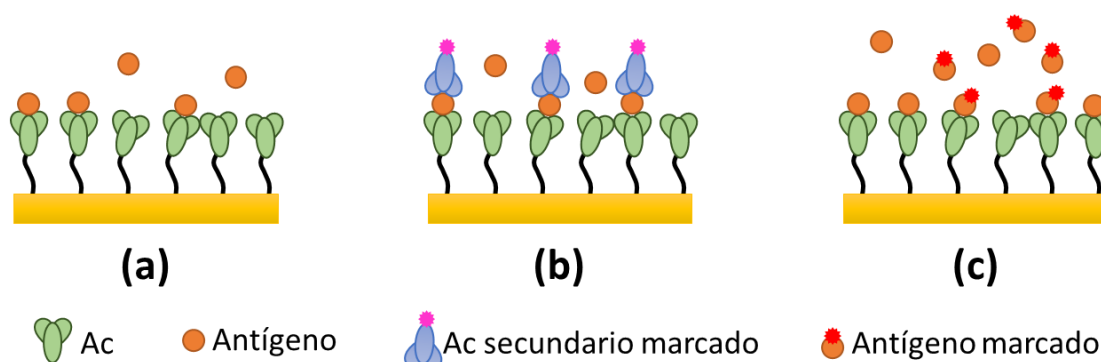


Figura 7.2. Esquemas de detección directo (a) e indirectos (b y c) para un inmunosensor óptico o electroquímico.

La estrategia de detección del antígeno determinará la rapidez, sencillez y sensibilidad de la medida [6,7], independientemente de que el transductor utilizado sea óptico o electroquímico. Existen dos metodologías reportadas en bibliografía: la directa (**Figura 7.2 a**) y las indirectas (**Figura 7.2 b y c**) [6,7]. La primera consiste en detectar el evento de bio-reconocimiento entre el antígeno y el anticuerpo a través del cambio en la respuesta electroquímica de una sonda redox externa (transducción electroquímica) o a través del cambio en la señal óptica producto de la adsorción específica del antígeno (transducción óptica). El esquema indirecto mediante anticuerpos secundarios (**figura 7.2 b**) consiste en unir al complejo antígeno-anticuerpo otro anticuerpo secundario marcado con una enzima redox o un compuesto que maximice la señal óptica. La otra estrategia indirecta (**figura 7.2 c**) consiste en un ensayo competitivo entre el antígeno a determinar y otro marcado. Las metodologías indirectas, si bien son más sensibles y selectivas que las directas, presentan la desventaja de tener más etapas en su construcción, ser más costosas y requerir de mayor cantidad de parámetros analíticos a optimizar [4].

Otro aspecto experimental crucial para el desarrollo de inmunosensores es la metodología de inmovilización del anticuerpo sobre el sustrato sólido [5,6]. Esto se debe que al inmovilizar el anticuerpo, se pueden producir cambios en el microambiente de la proteína que alteren los sitios de unión del antígeno y afecten negativamente sobre las propiedades de bio-reconocimiento. Entre las numerosas técnicas, las tres más extendidas son la fisisorción, la inmovilización covalente y la unión mediante interacciones de afinidad específicas [5,6]. En términos generales, las metodologías covalentes y orientadas mejoran la sensibilidad y especificidad del biosensor [8,9].

7.1.2. Biomarcadores cardíacos

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares se consideran la pandemia más significativa del siglo XXI. De acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Salud de la Nación, de las 3.200.000 personas que murieron en Argentina desde 2000 a 2012, el 26 % tuvo como causa de muerte complicaciones cardiovasculares. La característica silenciosa y crónica de las cardiopatías ha impulsado la investigación de moléculas que permitan su diagnóstico precoz y sirvan como marcadores para el pronóstico tanto en la fase crónica, como en la aguda.

Un biomarcador es una molécula, proteína o enzima presente en sangre que proporciona un valor diagnóstico y pronóstico independiente y cuya concentración refleja un estado de enfermedad o trastorno subyacente [10,11]. En la actualidad, existen numerosos biomarcadores estandarizados en las prácticas de bioquímica clínica que dan cuenta de los distintos estadios de infarto agudo de miocardio cuando ya existe daño tisular en el corazón. Entre los mismos se puede mencionar al complejo proteico troponina T e I (más específico del síndrome coronario agudo) [12], a la enzima cardíaca creatina-kinasa y a la mioglobina [13]. Existen otros marcadores, como los péptidos natriuréticos tipo B que son implementados en la detección y diagnóstico de insuficiencia cardíaca aguda [14]. Los biomarcadores mencionados anteriormente sirven para diagnosticar las cardiopatías en pacientes que ya presentan sintomatología [11]. En este sentido, la tendencia de la medicina es hacia la prevención de las enfermedades más que a la cura, por lo que se necesita de nuevos biomarcadores que cumplan esta función [15].

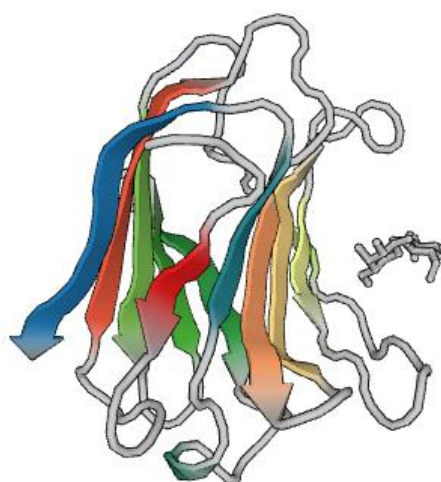


Figura 7.3. Estructura de la proteína Gal3 humana, donde las secciones planas representan las láminas β .

La galectina-3 (Gal3) es una proteína de 26 kDa de la familia de las lectinas que posee afinidad por los β -galactósidos, dado que en su estructura posee un dominio de

reconocimiento de carbohidratos [16] (**figura 7.3**). Entre sus funciones se encuentran la activación de macrófagos; el quimiotaxismo; la regulación de la proliferación celular, de la señalización intracelular y la expresión genética; el control de la apoptosis; y la interacción entre células y con la matriz extracelular [17]. Dada la multiplicidad de procesos fisiológicos en los que está involucrada esta proteína, los cambios en sus niveles de expresión están asociados a procesos patológicos como cáncer, diabetes y resistencia a la insulina, complicaciones durante el embarazo, inflamación y fibrosis, enfermedades cardíacas e infarto [18].

Las investigaciones de los últimos 10 años han demostrado que esta proteína juega un papel fundamental en el remodelado cardíaco que deriva, en última instancia, en el síndrome de insuficiencia cardíaca aguda (ICA) [17]. Se cree que los efectos dañinos de Gal3 se deben a la capacidad de la misma de unirse a proteínas de la matriz extracelular como lamininas, fibronectinas y colágeno. La Gal3 se origina en el tejido cardíaco pero es subsecuentemente secretada al torrente sanguíneo, por lo que concentraciones elevadas de esta proteína están asociadas a un alto riesgo de desarrollar ICA [16–18]. El incremento crónico en la cantidad de Gal3 induce una fibrogénesis activa y puede producir un remodelado cardíaco patológico.

Los ensayos de los niveles de Gal3 como biomarcador de la fibrosis miocárdica son prescritos para estratificar el nivel de riesgo del paciente. Así, aquellos que presentan un nivel de Gal3 en suero menor que $17,80 \text{ ng mL}^{-1}$ se consideran de riesgo bajo y aquellos cuyos niveles superan los $25,90 \text{ ng mL}^{-1}$ poseen hasta un 80 % de probabilidad de sufrir ICA [19,20].

7.1.3. Empleo de grafeno y nanomateriales derivados en SPR

La espectroscopia SPR se basa en la resonancia de la luz incidente con los polaritones plasmónicos superficiales debido a la oscilación colectiva de la densidad de carga en la interfaz entre una película delgada de un metal y un dieléctrico (**sección 2.8**). Debido a la confinación del campo electromagnético en la región interfacial solución-Au, esta técnica es muy útil para estudiar fenómenos de adsorción-desorción sobre superficies lo cual ha sido ampliamente explotado para el desarrollo de biosensores ópticos [21–23].

Las aplicaciones analíticas actuales están convergiendo a sistemas de detección de molécula única por lo que se requiere de metodologías con sensibilidades cada vez mayores [24]. En este sentido, la incorporación de nanoestructuras plasmónicas a los sustratos sensores de SPR es una de las estrategias más prometedoras debido a los incrementos por campo acoplado [25]. El grafeno y sus materiales derivados representan una novedosa y poco explorada alternativa debido a dos factores: la

transmitancia de una lámina de grafeno es de 97,7 % y los polaritones plasmónicos superficiales poseen elevado confinamiento y alta propagación [26,27].

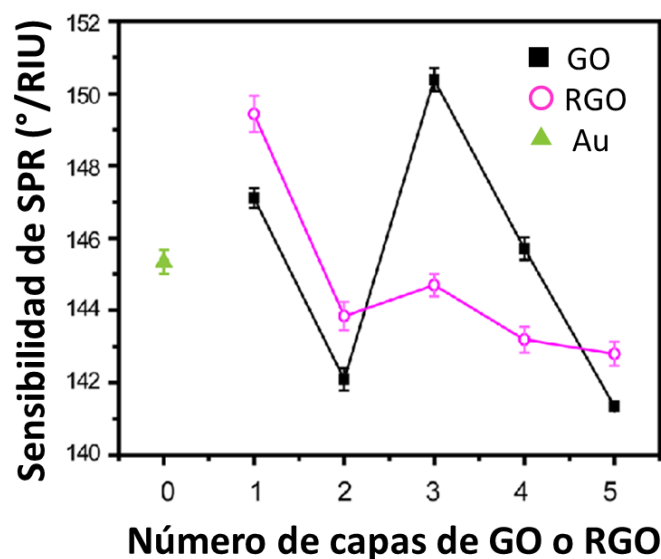


Figura 7.4. Sensibilidad en el cambio de señal de SPR sobre el chip sensor de Au y sobre películas de GO y RGO. Imagen tomada de Ref. [28].

Algunos resultados experimentales y cálculos teóricos [28–31] han postulado y predicho que la incorporación de grafeno sobre la superficie del sensor de Au puede mejorar la sensibilidad de SPR. La mejora en la sensibilidad (m, **ecuación 2.17**) se debe a que frente a una dada variación en el índice de refracción de la zona cercana a la superficie de Au, se produce un cambio más marcado del θ_{SPR} , producto de la variación en la constante de propagación de los polaritones plasmónicos superficiales de la película de Au [30]. Chung y col. [28] determinaron cuantitativamente los cambios en la sensibilidad de un instrumento de SPR, que mide en unidades de índice de refracción (RIU), para la deposición de películas de GO y RGO (**figura 7.4**). Al comparar los datos con la sensibilidad sobre el sustrato de Au sin modificar observaron una mejora en m para la primera capa de GO y RGO, mientras que el ensamblado de mayor cantidad de material arrojó resultados dispares. Otros autores han reconocido también que el incremento de la sensibilidad se debe no sólo a las propiedades plasmónicas del grafeno y derivados, sino también a un incremento en el área superficial expuesta a la solución, lo que provoca un aumento en la cantidad de moléculas adsorbidas sobre el sustrato [30].

En el presente capítulo se presenta un inmunosensor plasmónico para la detección de Gal3. En el Capítulo 6 se demostró que la inmovilización por autoensamblado LBL del polication PDDA y GO sobre Au/MPS permite alcanzar un elevado cubrimiento superficial de proteína total. Sobre la base de estos resultados se inmovilizó un anticuerpo monoclonal anti-Gal3 sobre Au/MPS/(PDDA/GO)_n para el

desarrollo de una estrategia de cuantificación plasmónica directa del biomarcador. Se discute la influencia del número de bicapas PDDA/GO inmovilizadas en términos de las propiedades ópticas y electroquímicas de la plataforma Au/MPS/(PDDA/GO)_n y su efecto en la cantidad de proteína inmovilizada con el fin de unir covalentemente anti-Gal3. Una vez optimizadas las condiciones de unión del anticuerpo se evaluarán la especificidad, selectividad y linealidad en la respuesta del inmunosensor desarrollado.

7.2. Metodología experimental

La galectina-3 recombinante humana (Gal3, 1154-GA-050) fue obtenida de R&D Systems. El anticuerpo monoclonal de rata anti-Gal3 (B2C10: sc-32790) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology. Su paratopo reconoce los primeros 18 aminoácidos de Gal3. El ácido 3-aminofenilborónico (3ABA, Cat. 410705), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Cat. 03449), *N*-hidroxisuccinimida (NHS, Cat. 130672), y la albúmina sérica bovina (BSA, Cat. 05482) se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

7.2.1. Ensamblado LBL de PDDA/GO

Los sustratos de Au fueron modificados con el tiol 3-mercaptopropan-sulfonato de sodio (MPS) de acuerdo el procedimiento descrito en la **sección 2.11.1**. La deposición LBL de PDDA y GO se llevó cabo siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Capítulo 6. Las multiestructuras Au/MPS/(PDDA/GO)_n fueron construidas por inmersión en solución de PDDA 1,00 mg mL⁻¹ (preparada en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40) durante 7 min y luego en una dispersión de GO 0,50 mg mL⁻¹ (pH = 8,00) durante 20 min. Este procedimiento se repitió *n* veces para el autoensamblado de las multicapas sobre Au/MPS.

7.2.2. Construcción del inmunosensor de Gal3

La modificación de Au/MPS/(PDDA/GO)_n se esquematiza en la **figura 7.5**. Luego del ensamblado de las multicapas se procede a activar los grupos carboxilato del GO con EDC 0,050 M/NHS 0,050 M (preparados en *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40) durante 20 min. Luego se pone en contacto la superficie activada con una solución de ácido 3-aminofenilborónico (3ABA) 0,050 M durante 30 min. El bloqueo de los grupos carboxilato activados que no reaccionaron se realizó mediante inmersión en solución de etanolamina 1,00 M pH 8,30 durante 20 min. A continuación, se dejó interaccionar a la superficie con una solución de anti-Gal3 0,10 mg mL⁻¹ (preparada en *buffer* fosfato salino 0,100 M pH 7,40) durante 40 min para inmovilizar el anticuerpo. Con el fin de bloquear los sitios de adsorción inespecífica se agregó una solución de BSA 2,00 %P/V

durante 30 min. La detección del antígeno Gal3 se llevó a cabo por inyección de una solución de la proteína durante 60 min.

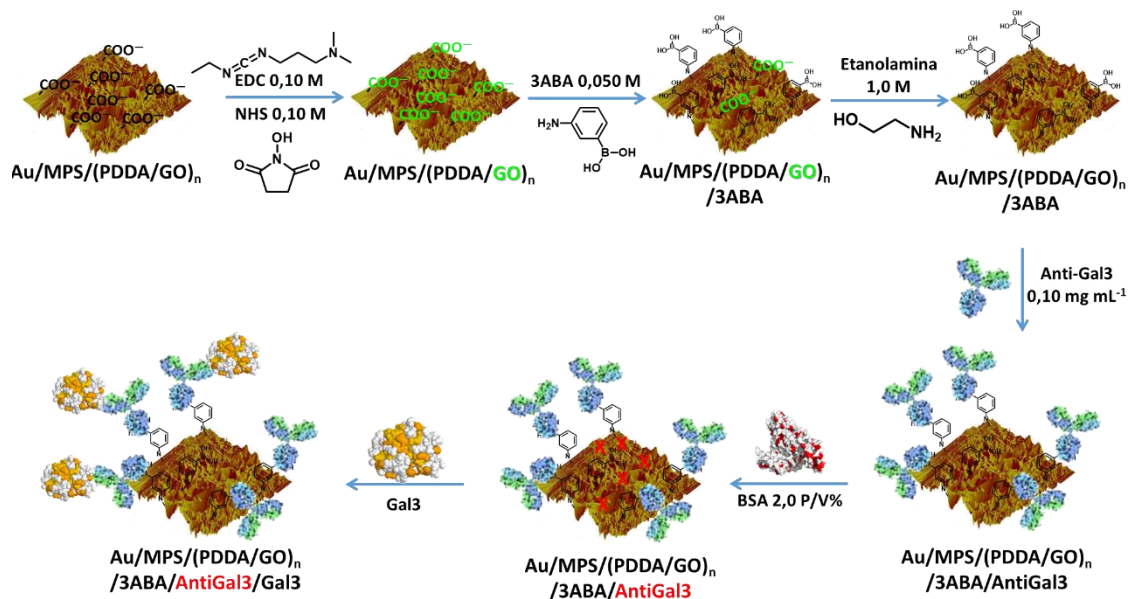


Figura 7.5. Esquema de la construcción del inmunosensor a Gal3.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Propiedades ópticas de Au/MPS/(PDDA/GO)_n

En la **sección 6.3.2** se estudió el crecimiento de la primer bicapa de PDDA/GO sobre Au/MPS. Se demostró que la adsorción del polication y de GO mediada por reversión de cargas se lleva a cabo de manera rápida y que se producen cambios en las propiedades electroquímicas y ópticas de la plataforma conforme crece la multiestructura.

La **figura 7.6 A** muestra el sensorgrama obtenido durante el crecimiento por autoensamblado LBL de Au/MPS/(PDDA/GO)_n para la inmovilización de 5 bicapas de PDDA/GO ($n = 5$). Luego de la adsorción de PDDA (↓) y GO (↓), se procedió a lavar la superficie con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 (↓) y solución con pH 8,00 (↓), respectivamente, con el fin de eliminar el material débilmente adsorbido. Los ciclos de adsorción sucesivos producen incrementos en el θ_{SPR} indicando que hay inmovilización efectiva de PDDA/GO sobre Au/MPS con el consecuente crecimiento de la multiestructura. Sin embargo conforme aumenta n se observa que el proceso de adsorción se torna más lento, especialmente en el caso de GO, lo cual sugeriría que se encuentra menos favorecido.

En la **figura 7.6 B** se presentan los cambios en el ángulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) correspondientes a cada paso de adsorción de PDDA (barras en rojo) y GO (barras en azul) en el crecimiento de las 5 bicapas de Au/MPS/(PDDA/GO)_n. El gráfico muestra que fundamentalmente para GO, la adsorción de las capas sucesivas no genera el mismo cambio de θ_{SPR} . Dado que SPR es sensible a los cambios en el índice de refracción de la película en contacto con la superficie de Au (**sección 2.8**), la disminución en $\Delta\theta_{\text{SPR,GO}}$ con el incremento de *n* se puede deber a que se inmoviliza menor masa de GO o a que las propiedades ópticas de las sucesivas capas van cambiando conforme crece *n* [32,33].

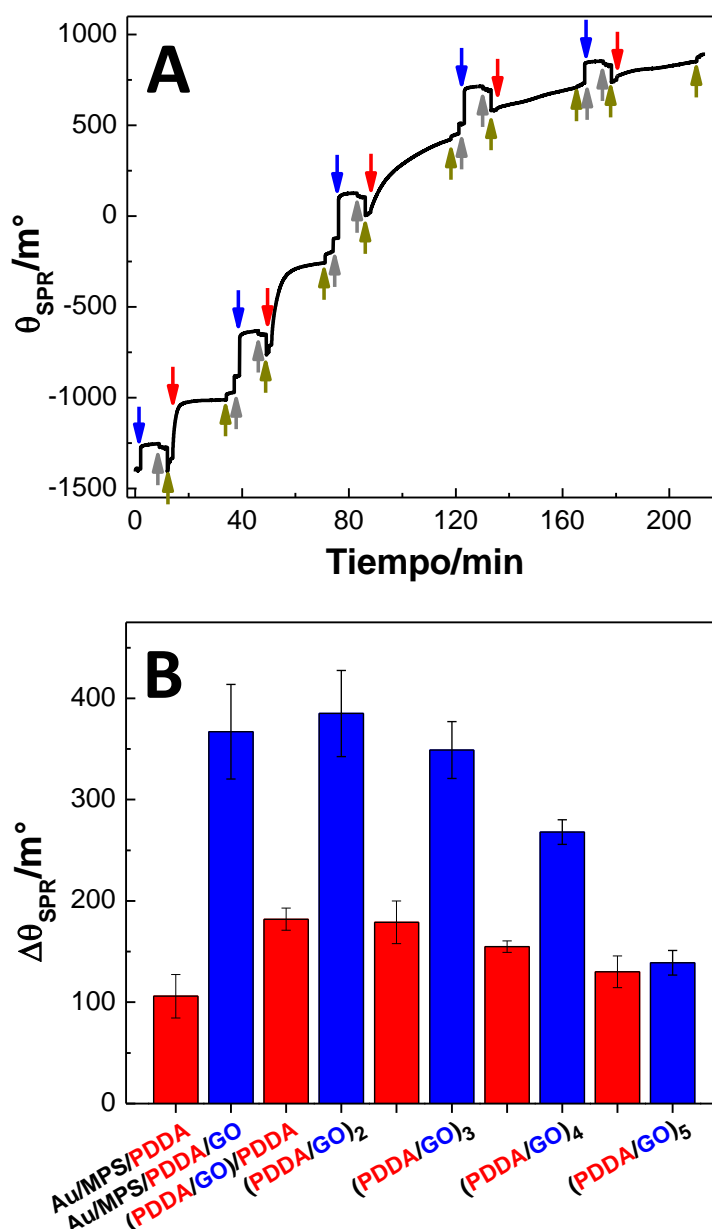


Figura 7.6. A Sensorgrama para la inmovilización sucesiva de una solución de PDDA 1,00 mg mL⁻¹ (\downarrow) y dispersión de GO 0,50 mg mL⁻¹ (\downarrow) sobre Au/MPS. Las flechas \downarrow y \downarrow corresponden a los lavados y cambios de medio con *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40 y solución de pH 8,00, respectivamente. **B** Cambios en el ángulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) obtenidos del sensorgrama del panel **A** correspondiente al autoensamblado LBL de PDDA y GO sobre Au/MPS.

Para poder determinar cuál de los dos efectos es el responsable del comportamiento observado, se ensambló PDDA y GO en una cubeta de cuarzo activada según el protocolo indicado en la **sección 2.10.1** en las mismas condiciones que los experimentos anteriores. Al finalizar cada paso de adsorción se obtuvieron los espectros UV-Vis correspondientes, los cuales se muestran en la **figura 7.7**. Los registros espectrales muestran que PDDA no absorbe en el rango de longitudes de onda medido, y que la absorbancia incrementa con n como consecuencia de la inmovilización de GO.

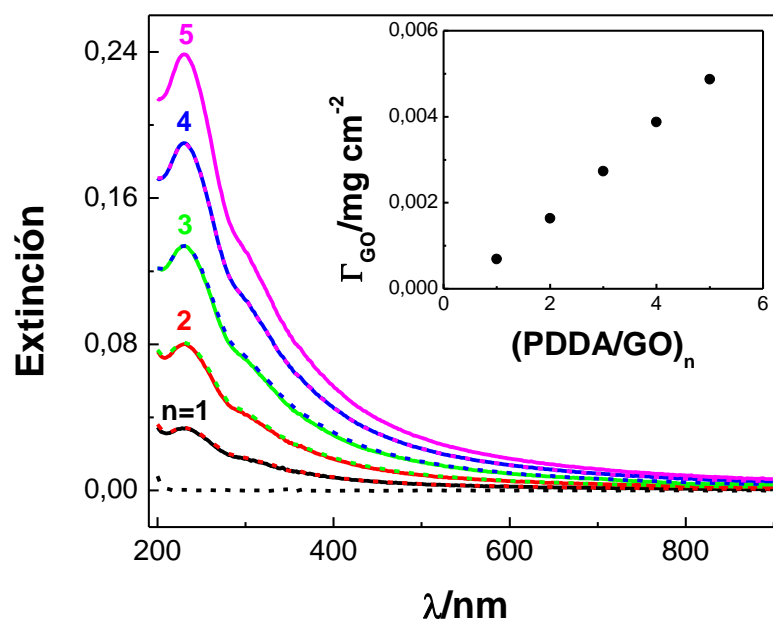


Figura 7.7. Espectros UV-Vis obtenidas sobre cuarzo/(PDDA/GO)_n para $n = 1$ (—), 2 (—), 3 (—), 4 (—), y 5 (—); a capa final PDDA (línea punteada) y GO (línea llena). El *inset* muestra el cubrimiento superficial del GO (Γ_{GO}) en función de n , obtenidos a partir de los espectros a capa final de GO y usando $\epsilon(GO, 230 \text{ nm}) = 49,0 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A partir del máximo de extinción a 230 nm (correspondiente a la absorción de los plasmones, **sección 6.3.1**) y del valor del coeficiente de extinción derivado experimentalmente, se determinaron los cubrimientos superficiales de GO (Γ_{GO}), los que se muestran en el *inset* de la **figura 7.7** en función del número de bicapas (PDDA/GO)_n. La tendencia de Γ_{GO} indica que aumenta linealmente con el número de bicapas PDDA/GO. Este comportamiento se encuentra de acuerdo al observado por otros autores en sistemas autoensamblados de GO [34,35] e indica que la variabilidad en $\Delta\theta_{SPR,GO}$ cuando aumenta n se debe a que las propiedades de las bicapas PDDA/GO no son iguales en las distintas etapas del crecimiento de la arquitectura supramolecular.

7.3.2. Propiedades electroquímicas de Au/MPS/(PDDA/GO)_n

La reactividad superficial de Au/MPS modificado con (PDDA/GO)_n fue caracterizada por SECM usando FcOH $5,00 \times 10^{-4} \text{ M}$ como sonda redox. La **figura 7.8**

presenta las imágenes SECM obtenidas para Au/MPS (**a**) modificado con (PDDA/GO)_n para $n = 1$ (**b**), 2 (**c**), 3 (**d**), 4 (**e**), y 5 (**f**). La modificación con la primer bicapa de PDDA/GO produce una disminución en la corriente normalizada como consecuencia de la menor velocidad de transferencia de carga para FcOH respecto al electrodo de Au desnudo. Por otro lado, conforme aumenta n , la corriente normalizada de las imágenes SECM disminuye.

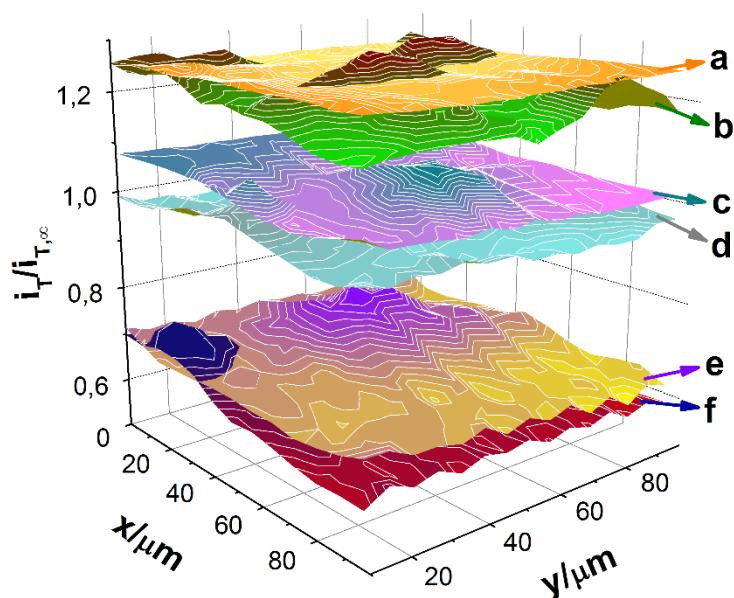


Figura 7.8. Imágenes SECM obtenidas sobre Au/MPS (**a**), y Au/MPS/(PDDA/GO)_n para $n = 1$ (**b**), 2 (**c**), 3 (**d**), 4 (**e**), y 5 (**f**); empleando FcOH $5,00 \times 10^{-4}$ M como sonda redox. Electrolito soporte: *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40. $E_{UME} = 0,500$ V. $E_{Subs} = 0,000$ V. $v_{UME} = 20,0 \mu\text{m s}^{-1}$.

Tabla 7.1. Valores de corriente normalizada del UME ($i_T/i_{T,\infty}$) para las imágenes SECM de la **figura 7.8**.

$Au/MPS/(PDDA/GO)_n$	$i_T/i_{T,\infty}$
1	$1,22 \pm 0,03$
2	$1,05 \pm 0,02$
3	$0,97 \pm 0,02$
4	$0,69 \pm 0,03$
5	$0,67 \pm 0,03$

En la **tabla 7.1** se muestran los valores promedio de la corriente normalizada en función del número de bicapas. La disminución de $i_T/i_{T,\infty}$ no es proporcional a n , al igual que la tendencia que se observa para $\Delta\theta_{SPR,GO}$ en función de n (**figura 7.7 B**). Estos resultados sugieren que si bien la masa de GO autoensamblada es proporcional a n , las propiedades de las películas cambian a medida que n aumenta. En bibliografía, existen

muy pocos estudios acerca de la relación entre la estructura y las propiedades ópticas y electroquímicas en este tipo de autoensamblados. Sham y col. [35] determinaron que las propiedades visco-elásticas de películas obtenidas mediante autoensamblado de poli(etilenimina) y grafeno disperso en un surfactante varían con n , producto de la interpenetración. Así, el comportamiento observado en la **figura 7.8** estaría relacionada con la pérdida marcada de la estratificación de las capas a medida que se autoensambla un mayor número de películas del nanomaterial.

7.3.3. Efecto en la cantidad de proteína inmovilizada sobre Au/MPS/(PDDA/GO)_n

El objetivo de la construcción de Au/MPS/(PDDA/GO)_n es aumentar la capacidad de inmovilizar proteína a los fines de incrementar la cantidad de anticuerpo con propiedades de bio-reconocimiento. Si bien no es estrictamente equivalente, se realizó la optimización con una proteína modelo, BSA, de la misma manera que en el capítulo 6.

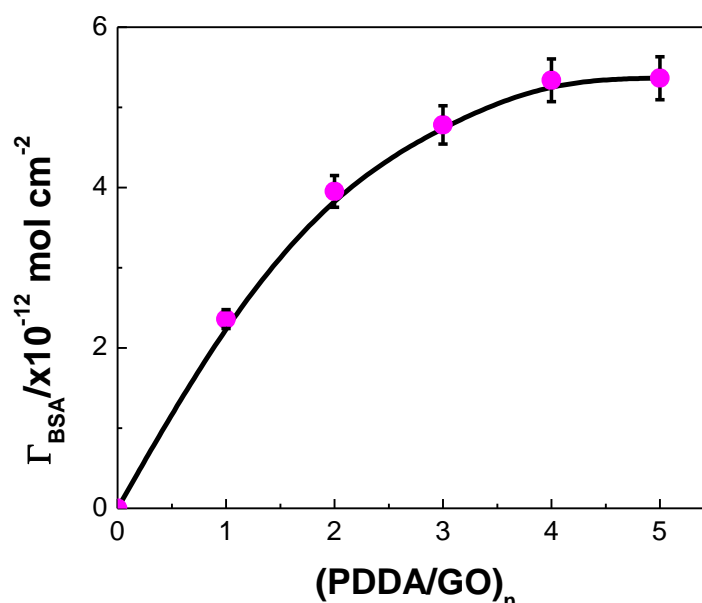


Figura 7.9. Cubrimiento superficial de BSA (Γ_{BSA}) en función del número de bicapas (PDDA/GO)_n inmovilizadas sobre Au/MPS. Γ_{BSA} fue obtenido de experimentos de SPR a partir de la inmovilización covalente de la proteína previa activación de la plataforma con EDC 0,050 M/NHS 0,050 M durante 30 min.

En la **figura 7.9** se muestra el cubrimiento superficial de BSA (Γ_{BSA}) covalentemente inmovilizada en función del número de capas de PDDA/GO subyacente autoensambladas sobre Au/MPS. Γ_{BSA} fue obtenida de experimentos de SPR a partir de $\Delta\theta_{SPR}$ luego del agregado de BSA sobre Au/MPS/(PDDA/GO)_n. La cantidad de proteína

inmovilizada aumenta con el número de bicapas ensambladas hasta $n = 4$, donde se observa que Γ_{BSA} se mantiene prácticamente constante.

Estos resultados confirman que el autoensamblado posee un alto grado de interpenetración dado que no hay una relación lineal entre Γ_{BSA} y n . Por otro lado, la tendencia de la figura indica que existe una cantidad máxima de BSA que se inmoviliza y se alcanza con $n = 4$. Dado que la masa de BSA inmovilizada depende directamente de la disponibilidad de grupos carboxilato capaces de servir como puntos de anclaje, es probable que la interpenetración de las capas haga que estos grupos queden menos expuestos para reaccionar con BSA.

Cabe destacar que este comportamiento tipo *plateau* no está relacionado con el crecimiento del autoensamblado más allá de la región donde la técnica de SPR es sensible a los cambios de η (de ~ 200 nm). Si bien los otros sistemas reportados en bibliografía no son idénticos al estudiado en el presente capítulo [34,36–38], todos concuerdan en que las películas de hasta 15 bicapas no superan un espesor de 100 nm.

7.3.4. Au/MPS/(PDDA/GO)₄: inmovilización del anticuerpo y construcción del inmunosensor

La construcción del inmunosensor sobre la plataforma optimizada se evaluó en tiempo real utilizando SPR. La **figura 7.10** muestra el sensorgrama para la inmovilización del anticuerpo y detección de Gal3 sobre Au/MPS/(PDDA/GO)₄.

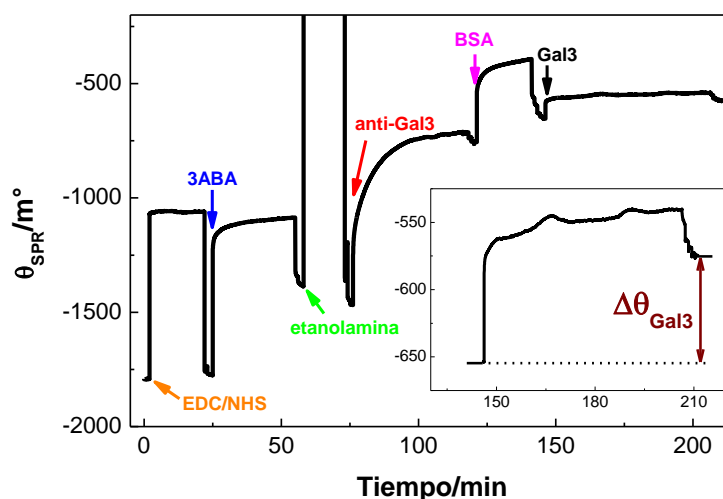
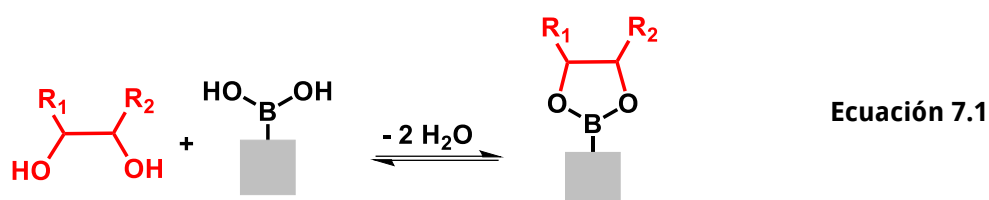


Figura 7.10. Sensorgrama obtenido durante la construcción del inmunosensor a Gal3 de acuerdo al procedimiento experimental de la **sección 7.2.2**. El *inset* muestra $\Delta\theta_{Gal3}$ asociado a Gal3 que interacciona con la capa de bio-reconocimiento.

Los grupos carboxilato de la superficie fueron activados mediante el agregado a la celda de una mezcla de EDC 0,050 M/NHS 0,050 M (↓). La inmovilización directa del anticuerpo sobre los grupos carboxilato activados es un proceso que ocurre sin control

ya que cualquier grupo amino libre del anticuerpo se unirá a la superficie. Por ello, en este trabajo se empleó la metodología de inmovilización orientada mediante interacciones de afinidad (**sección 7.1.1**). Para ello, se dejó interaccionar a la plataforma activada con una solución de ácido 3-aminofenilborónico (3ABA, ↓) 0,050 M de manera que el enlace amida se forme entre el GO y el -NH₂ del 3ABA (ver la estructura en la **figura 7.5**). El ácido borónico reacciona con 1,2-dioles para formar un éster boronato (**ecuación 7.1**) [8,39,40]. Así, el 3ABA orienta la unión del anticuerpo a la superficie debido a que la región Fc de los mismos posee una cadena glucosídica capaz de servir como punto de anclaje al sustrato [39].



Luego de efectuado el bloqueo de los grupos carboxilato que no reaccionaron mediante inyección de solución de etanolamina 1,0 M pH 8,30 (↓) durante 20 min, se dejó interaccionar por 40 min una solución de anti-Gal3 (↓) para su inmovilización por afinidad con el 3ABA. Luego de los lavados con *buffer* fosfato salino 0,100 M pH 7,40 se obtuvo un cubrimiento de anticuerpo $\Gamma_{\text{anti-Gal3}} = (2,0 \pm 0,1) \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$. Como se procede habitualmente en la construcción de biosensores de afinidad se agregó una solución concentrada de BSA (↓) para bloquear los sitios de adsorción inespecífica de la superficie.

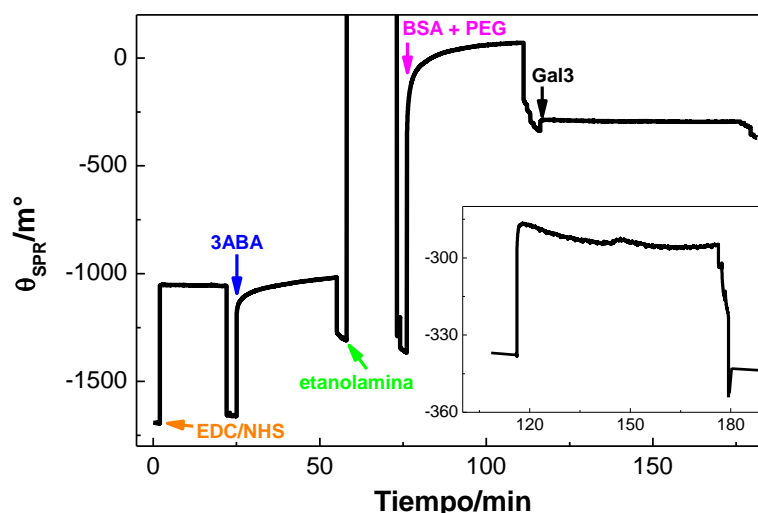


Figura 7.11. Sensorgrama obtenido en idénticas condiciones a la **figura 7.10** pero sin el agregado de anti-Gal3. El *inset* muestra un aumento del sensorgrama correspondiente a la inyección del antígeno.

Una vez construida la plataforma de bio-reconocimiento, se inyectó el antígeno (\downarrow) y se lo dejó interactuar durante 60 min. El cambio de la señal de SPR luego del lavado con *buffer* fosfato salino 0,100 M pH 7,40 + Tween 0,050 %V/V (mostrado en el inset de la **figura 7.10**) será utilizado como señal analítica. Para el sensorgrama mostrado, el agregado de Gal 50,00 ng mL⁻¹ generó un $\Delta\theta_{SPR}$ igual a (85 ± 9) m°.

La **figura 7.11** muestra el sensorgrama obtenido en idénticas condiciones al del inmunosensor, pero sin la inmovilización de anti-Gal3. En este caso, a la etapa de bloqueo de los sitios de adsorción inespecífica con BSA se le agrega también polietilenglicol (PEG), para neutralizar el 3ABA que queda expuesto a la solución.

Dado que en este esquema el elemento de bio-reconocimiento se encuentra ausente, al inyectar Gal3 y luego de realizar los lavados con *buffer* fosfato salino 0,100 M pH 7,40 + Tween 0,050 %V/V no se observa cambio neto en la señal de SPR. Esto indica que $\Delta\theta_{SPR}$ observado en la **figura 7.10** se debe solamente a la interacción específica entre la proteína y el anticuerpo inmovilizado sobre la superficie y que, dentro de los límites de detección de la técnica, no hay interacciones inespecíficas con la plataforma sensora.

7.3.5. Au/MPS/(PDDA/GO)₄: efecto de la presencia de GO en la detección de Gal3

El efecto de la presencia de GO en la detección de la proteína Gal3 fue efectuado mediante la comparación de las respuestas por SPR del inmunosensor construido sobre Au/MPS/(PDDA/GO)₄ y sobre Au/4MBA, como lo muestran los esquemas de la **figura 7.12**.



Figura 7.12. Esquema del biosensor construido sobre la plataforma optimizada de Au/MPS/(PDDA/GO)₄/3ABA (**a**) y sobre la superficie de Au derivatizada con un tiol con grupos carboxilato (**b**).

A los fines de comparar la inmovilización del anticuerpo y detección de la proteína, la superficie de Au modificada con el tiol ácido 4-mercaptobenzoico (4MBA) cumple la función de ser fuente de grupos carboxilato para la inmovilización covalente de 3ABA y unión por afinidad de anti-Gal3.

La **figura 7.13 A** muestra la comparación de los sensorgramas obtenidos para la inmovilización de anti-Gal3 sobre Au/MPS/(PDDA/GO)₄/3ABA (**a**) y sobre Au/4MBA/3ABA

(b). En el mismo se puede observar la marcada diferencia en $\Delta\theta_{\text{SPR}}$: mientras que en el primer caso se alcanza un cubrimiento de $\Gamma_{\text{anti-Gal3}} = (2,0 \pm 0,1) \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, sobre Au/4MBA $\Gamma_{\text{anti-Gal3}}$ es $(9 \pm 1) \times 10^{-13} \text{ mol cm}^{-2}$. Esta diferencia en casi dos órdenes de magnitud se debe, en primer lugar, al aumento en el área expuesta hacia la solución producto de la mayor rugosidad de la plataforma con GO. En segundo término, el incremento se debe también al acoplamiento en el campo evanescente del Au con el plasmón superficial del GO (**sección 7.1.1**).

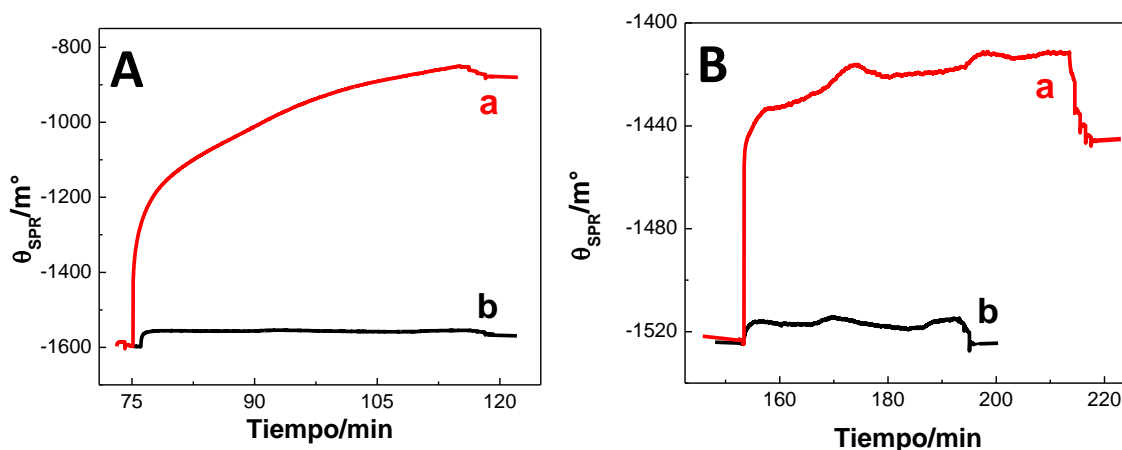


Figura 7.13. A Sensorgrama para la inmovilización orientada de anti-Gal3 sobre Au/MPS/(PDDA/GO)₄ (a) y Au/4MBA (b). B Sensorgrama para la interacción de Gal3 sobre las plataformas Au/MPS/(PDDA/GO)₄/3ABA/anti-Gal3 (a) y Au/4MBA/4ABA/anti-Gal3 (b). Condiciones experimentales idénticas a la **figura 7.12**.

La **figura 7.13 B** presenta los sensorgramas para la detección de Gal3 donde se puede observar que sobre Au/4MBA/3ABA/anti-Gal3 y como es de esperar, el cambio en la señal de SPR es prácticamente nulo.

7.3.6. Desempeño analítico del inmunosensor

Con el objetivo de evaluar la selectividad del inmunosensor, se realizaron experimentos SPR sobre la plataforma optimizada estudiando la respuesta frente al agregado de las principales proteínas presentes en suero sanguíneo humano.

La **figura 7.14** muestra el sensorgrama obtenido para Au/MPS/(PDDA/GO)₄/3ABA/anti-Gal₃ luego del agregado de solución de albúmina sérica humana (HSA) 4,00 %P/V (↓), inmunoglobulina G (IgG) 1,50 %P/V (↓), hemoglobina (Hb) 15,00 %P/V (↓), y transferrina 0,30 %P/V (↓); todas preparadas en *buffer* fosfato salino 0,100 M pH 7,40. Con fines comparativos, luego del agregado de los interferentes se realizó una inyección de Gal3 50,00 ng mL⁻¹ (↓). La **tabla 7.2** muestra los porcentajes de interferencia calculados en referencia a la señal de Gal3 y se puede observar que los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites analíticos.

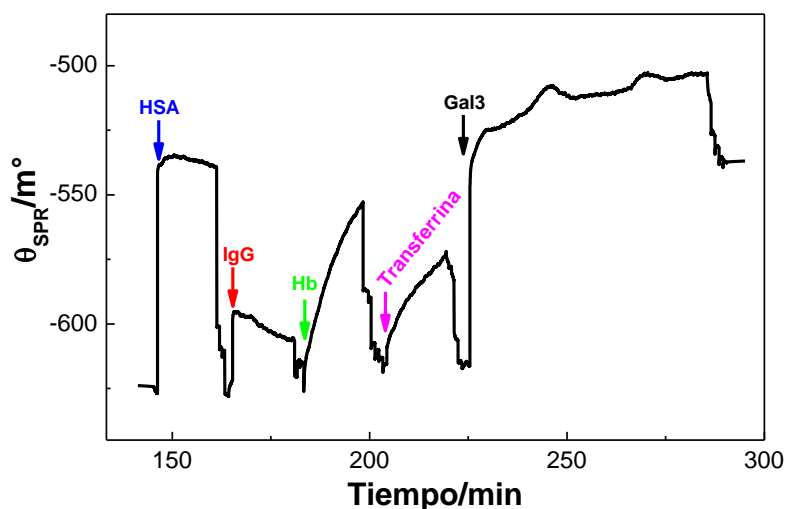


Figura 7.14. Sensorgrama obtenido en idénticas condiciones la **figura 7.10** para el agregado de albúmina sérica humana (HSA) 4,00 %P/V (↓), inmunoglobulina G (IgG) 1,50 %P/V (↓), hemoglobina (Hb) 15,00 %P/V (↓), transferrina 0,30 %P/V (↓), y Gal3 50,00 ng mL⁻¹ (↓).

Tabla 7.2. Porcentajes de interferencia de las 4 proteínas que poseen mayor concentración en e suero sanguíneo, respecto a la señal de Gal3 50,00 ng mL⁻¹.

<i>Proteína</i>	<i>% interferencia</i>
HSA 40,00 mg mL ⁻¹	0,3
IgG 15,00 mg mL ⁻¹	11,4
Hb 150,00 mg mL ⁻¹	~ 0
Transferrina 3,00 mg mL ⁻¹	1,2

Por otro lado, no hubo cambios significativos en la señal de Gal3 luego de la inyección de las proteínas interferentes frente a $\Delta\theta_{SPR}$ de la **figura 7.11**, indicando que no hay interferencia en la medida. Cabe destacar la diferencia en el orden de magnitud de la concentración de las proteínas empleadas como posibles interferentes (varían entre 150 - 3 mg mL⁻¹) frente a la concentración del orden de los ng mL⁻¹ de Gal3.

La **figura 7.15 A** muestra los registros de SPR para el agregado de soluciones de Gal3 de distinta concentración sobre la plataforma optimizada Au/MPS/(PDDA/GO)₄/3ABA/anti-Gal3. Se puede observar que la variación en la concentración de las soluciones de Gal3 inyectadas provoca cambios en la señal de SPR y que, para los valores de concentración medidos, la respuesta del inmunosensor es lineal (**figura 7.15 B**).

Si se tiene en cuenta que los límites de concentración de interés clínico establecidos para Gal3 (**sección 7.1.3**) están comprendidos entre 17,8 y 25,0 ng mL⁻¹, el inmunosensor propuesto presenta variación lineal de la respuesta en el rango de interés

y la respuesta obtenida permite discriminar de manera sensible y selectiva a Gal3 en un intervalo de concentraciones muy acotado.

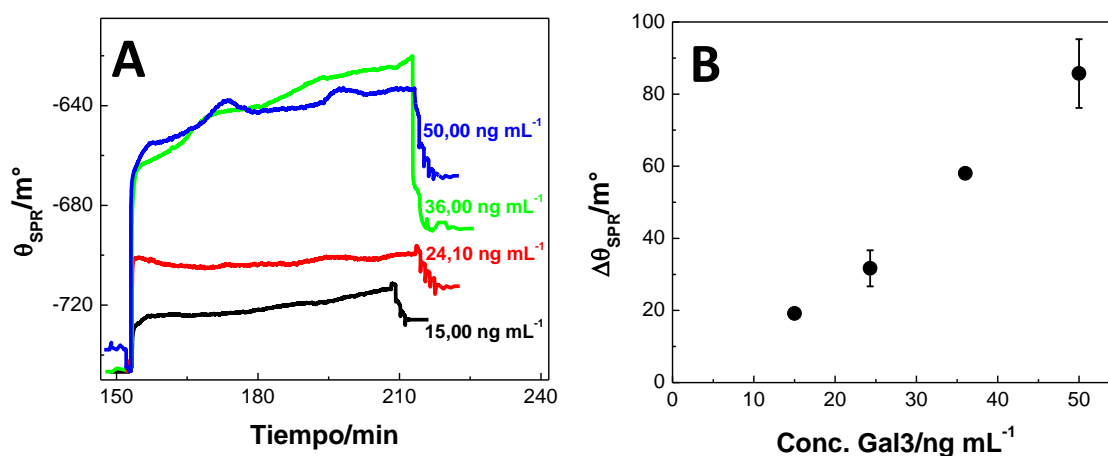


Figura 7.15. A Registros SPR para agregados de Gal3 50,00; 36,00; 24,10; y 15,00 ng mL⁻¹ sobre Au/MPS/(PDDA/GO)₄/3ABA/anti-Gal₃. Cada sensorgrama corresponde a un experimento independiente. **B** Señal de SPR vs. concentración de Gal3 utilizada.

Hasta este momento (finales de diciembre de 2015) no existe en bibliografía biosensores electroquímicos o plasmónicos que planteen una alternativa de cuantificación de este biomarcador emergente, por lo que el inmunosensor propuesto representa una novedosa alternativa.

7.4. Conclusiones parciales

La caracterización óptica (mediante SPR y espectroscopia UV-Vis) y electroquímica de la Au/MPS/(PDDA/GO)_n evidenció un crecimiento lineal en masa del autoensamblado pero irregular respecto a sus propiedades. La cantidad de proteína unida covalentemente a (PDDA/GO)_n aumenta de manera no lineal con *n* debido a la pérdida de estratificación y menor accesibilidad de los grupos carboxilato. En base a los cubrimientos obtenidos para la proteína modelo se estableció que la plataforma para la construcción del inmunosensor sea Au/MPS/(PDDA/GO)₄.

La inmovilización orientada del anticuerpo anti-Gal3 (a través de la derivatización del GO con ácido 3-aminofenilborónico) permitió detectar exitosamente a Gal3 en tiempo real mediante SPR. El inmunosensor Au/MPS/(PDDA/GO)₄/Anti-Gal3 demostró ser altamente sensible, ya que permite la detección de Gal3 en el rango de concentraciones de interés clínico; y selectivo, porque se puede determinar Gal3 frente a otras proteínas plasmáticas que actúan como posibles interferentes. A la luz de estos resultados el biosensor representa una novedosa alternativa para su aplicación en la detección temprana de insuficiencia cardíaca aguda.

7.5. Bibliografía

- [1] K. Murphy, *Janeway's Immunobiology*, 8th ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, Nueva York, 2011.
- [2] C.I.L. Justino, A.C. Freitas, R. Pereira, A.C. Duarte, T.A.P. Rocha Santos, Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors, *Trends Anal. Chem.* 68 (2015) 2–17.
- [3] E. Burcu Bahadır, M. Kemal Sezgintürk, Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta.* 132 (2015) 162–174.
- [4] S.C.B. Gopinath, T.-H. Tang, M. Citartan, Y. Chen, T. Lakshmipriya, Current aspects in immunosensors, *Biosens. Bioelectron.* 57 (2014) 292–302.
- [5] Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu, C. Fan, Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 1–11.
- [6] F. Ricci, G. Adornetto, G. Palleschi, A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors, *Electrochim. Acta.* 84 (2012) 74–83.
- [7] S. Mariani, M. Minunni, Surface plasmon resonance applications in clinical analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2303–2323.
- [8] W.-C. Liao, J. Annie Ho, Improved activity of immobilized antibody by paratope orientation controller: Probing paratope orientation by electrochemical strategy and surface plasmon resonance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.* 55 (2014) 32–38.
- [9] A. Kausaite-Minkstimiene, A. Ramanaviciene, J. Kirlyte, A. Ramanavicius, Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6401–6408.
- [10] A. Clerico, C. Passino, M. Franzini, M. Emdin, Cardiac biomarker testing in the clinical laboratory: Where do we stand? General overview of the methodology with special emphasis on natriuretic peptides, *Clin. Chim. Acta.* 443 (2015) 17–24.
- [11] L.E. Cahill, M.L. Bertoia, S.A. Aroner, K.J. Mukamal, M.K. Jensen, New and Emerging Biomarkers in Cardiovascular Disease, *Curr. Diab. Rep.* 15 (2015) 1–15.
- [12] M.F.M. Fathil, M.K. Md Arshad, S.C.B. Gopinath, U. Hashim, R. Adzhri, R.M. Ayub, et al., Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers, *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 209–220.
- [13] M. Rubini Gimenez, R. Twerenbold, C. Mueller, Beyond cardiac troponin: recent advances in the development of alternative biomarkers for cardiovascular disease, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15 (2015) 547–556.
- [14] S.A. Smith, R.J. Mentz, L. Roessig, A. Mebazza, D. Longrois, M. Gheorghide, et al., Using Natriuretic Peptides for Selection of Patients in Acute Heart Failure Clinical Trials, *Am. J. Cardiol.* 116 (2015) 1304–1310.
- [15] P. Collinson, The role of cardiac biomarkers in cardiovascular disease risk assessment, *Curr. Opin. Cardiol.* 29 (2014).
- [16] Y.-H. Lin, L.-Y. Lin, Y.-W. Wu, K.-L. Chien, C.-M. Lee, R.-B. Hsu, et al., The relationship between serum galectin-3 and serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in heart failure patients, *Clin. Chim. Acta.* 409 (2009) 96–99.
- [17] R.A. de Boer, A.R. van der Velde, C. Mueller, D.J. van Veldhuisen, S.D. Anker, W.F. Peacock, et al., Galectin-3: A Modifiable Risk Factor in Heart Failure, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 28 (2014) 237–246.
- [18] D. Gruson, G. Ko, Galectins testing: New promises for the diagnosis and risk stratification of chronic diseases?, *Clin. Biochem.* 45 (2012) 719–726.
- [19] G.M. Felker, M. Fiuzat, L.K. Shaw, R. Clare, D.J. Whellan, L. Bettari, et al., Galectin-3 in

- Ambulatory Patients With Heart Failure: Results From the HF-ACTION Study , *Circ. Hear. Fail.* . 5 (2012) 72–78.
- [20] E.W. Grandin, P. Jarolim, S.A. Murphy, L. Ritterova, C.P. Cannon, E. Braunwald, et al., Galectin-3 and the Development of Heart Failure after Acute Coronary Syndrome: Pilot Experience from PROVE IT-TIMI 22, *Clin. Chem.* . 58 (2012) 267–273.
- [21] A. Olaru, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, H.Y. Aboul-Enein, Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 45 (2015) 97–105.
- [22] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications, *Sensors.* 15 (2015) 10481.
- [23] S. Wang, G.K. Poon, W.D. Wilson, Quantitative Investigation of Protein–Nucleic Acid Interactions by Biosensor Surface Plasmon Resonance, in: B.P. Leblanc, S. Rodrigue (Eds.), *DNA-Protein Interact. SE - 20*, Springer New York, 2015: pp. 313–332.
- [24] H.H. Gorris, Special Issue: Single Molecule Techniques, *Molecules.* 20 (2015) 7772.
- [25] S. Zeng, D. Baillargeat, H.-P. Ho, K.-T. Yong, Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 3426–3452.
- [26] A.N. Grigorenko, M. Polini, K.S. Novoselov, Graphene plasmonics, *Nat. Photonics.* 6 (2012) 749–758.
- [27] I.J. and J.-S.R. and J.Y.S. and R.S.R. and K.-Y. Rhee, Colors of graphene and graphene-oxide multilayers on various substrates, *Nanotechnology.* 23 (2012) 25708.
- [28] K. Chung, A. Rani, J.-E. Lee, J.E. Kim, Y. Kim, H. Yang, et al., Systematic Study on the Sensitivity Enhancement in Graphene Plasmonic Sensors Based on Layer-by-Layer Self-Assembled Graphene Oxide Multilayers and Their Reduced Analogues, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 144–151.
- [29] Y. Zhao, Y. Zhu, Graphene-based hybrid films for plasmonic sensing, *Nanoscale.* 7 (2015) 14561–14576.
- [30] S. Szunerits, N. Maalouli, E. Wijaya, J.P. Vilcot, R. Boukherroub, Recent advances in the development of graphene-based surface plasmon resonance (SPR) interfaces, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1435–1443.
- [31] M. Singh, M. Holzinger, M. Tabrizian, S. Winters, N.C. Berner, S. Cosnier, et al., Noncovalently Functionalized Monolayer Graphene for Sensitivity Enhancement of Surface Plasmon Resonance Immunosensors, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 2800–2803.
- [32] S. Ekgasit, A. Tangcharoenbumrungsuk, F. Yu, A. Baba, W. Knoll, Resonance shifts in SPR curves of nonabsorbing, weakly absorbing, and strongly absorbing dielectrics, *Sensors Actuators B Chem.* 105 (2005) 532–541.
- [33] O. V Shynkarenko, S.A. Kravchenko, Surface Plasmon Resonance Sensors: Methods of Surface Functionalization and Sensitivity Enhancement, *Theor. Exp. Chem.* 51 (2015) 273–292.
- [34] T. Lee, S.H. Min, M. Gu, Y.K. Jung, W. Lee, J.U. Lee, et al., Layer-by-Layer Assembly for Graphene-Based Multilayer Nanocomposites: Synthesis and Applications, *Chem. Mater.* 27 (2015) 3785–3796.
- [35] A.Y.W. Sham, S.M. Notley, Layer-by-Layer Assembly of Thin Films Containing Exfoliated Pristine Graphene Nanosheets and Polyethyleneimine, *Langmuir.* 30 (2014) 2410–2418.
- [36] X. Zhao, Q. Zhang, Y. Hao, Y. Li, Y. Fang, D. Chen, Alternate Multilayer Films of Poly(vinyl alcohol) and Exfoliated Graphene Oxide Fabricated via a Facial Layer-by-Layer Assembly, *Macromolecules.* 43 (2010) 9411–9416.
- [37] D. Huang, B. Zhang, Y. Zhang, F. Zhan, X. Xu, Y. Shen, et al., Electrochemically reduced graphene oxide multilayer films as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction, *J. Mater. Chem. A.* 1 (2013) 1415–1420.

- [38] K. Sheng, H. Bai, Y. Sun, C. Li, G. Shi, Layer-by-layer assembly of graphene/polyaniline multilayer films and their application for electrochromic devices, *Polymer (Guildf)*. 52 (2011) 5567–5572.
- [39] F. Duval, T.A. van Beek, H. Zuilhof, Key steps towards the oriented immobilization of antibodies using boronic acids, *Analyst*. 140 (2015) 6467–6472.
- [40] Q. Wang, I. Kaminska, J. Niedziolka-Jonsson, M. Opallo, M. Li, R. Boukherroub, et al., Sensitive sugar detection using 4-aminophenylboronic acid modified graphene, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 331–337.

CAPÍTULO 8

Conclusiones generales

El presente trabajo de Tesis estuvo dirigido al desarrollo de plataformas (bio)analíticas para la cuantificación de analitos de interés clínico, farmacéutico y bromatológico; basados en el empleo de nanoestructuras de carbono funcionalizadas con biomoléculas. Se utilizaron nanotubos de carbono tipo *bamboo* (BCNT), un tipo de nanomaterial escasamente aplicado en el desarrollo de biosensores electroquímicos; y derivados de grafeno, los cuales fueron funcionalizados con el fin de mejorar y controlar su incorporación sobre sustratos sólidos.

En la primera parte de este trabajo de Tesis se realizó la funcionalización no covalentemente de BCNT con dsDNA de timo de ternera por primera vez, y se incorporó de manera controlada y reproducible la dispersión resultante sobre electrodos de carbono vítreo (GCE). Dicha modificación le confirió a la plataforma las propiedades electrocatalíticas de BCNT, debido a la alta densidad de defectos de borde de su estructura; y las propiedades de bio-reconocimiento y polianión del dsDNA. La exfoliación de BCNT se vio favorecida por la desnaturalización parcial que el dsDNA sufre durante el proceso de dispersión asistida por ultrasonido en solvente de agua:etanol 50 %V/V.

Se utilizó GCE/BCNT-dsDNA para la detección electroquímica de prometazina (PMZ), a través de la intercalación en el dsDNA soportado sobre la superficie de BCNT. Mediante técnicas electroquímicas y ópticas, se demostró que a pesar de los cambios estructurales que sufre el DNA durante el proceso de dispersión, aún mantiene su capacidad de interaccionar específicamente con un intercalador. Estas interacciones fueron corroboradas mediante simulaciones computacionales, lo que representa una novedad respecto a la profundidad en el análisis de la evidencia experimental. Sobre la base de estos estudios, se desarrolló un biosensor electroquímico para la cuantificación de PMZ mediante *stripping* de adsorción con detección por DPV. La eficiente preconcentración de PMZ sobre BCNT-dsDNA permitió su cuantificación de manera altamente sensible (niveles nanomolares) y selectiva, con excelente aplicación para su determinación en un producto farmacéutico.

La inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx) sobre GCE/BCNT-dsDNA permitió la construcción de un biosensor de glucosa mediante el autoensamblado capa por capa a través del uso de poli(dialildimetilamonio) (PDDA) para formar películas tipo GCE/BCNT-dsDNA/(PDDA/GOx)_n. La biocompatibilidad del polianión y del dsDNA permitió ensamblar hasta tres bicapas PDDA/GOx sin pérdida de actividad enzimática y selectividad lo que, en combinación con las propiedades electrocatalíticas de BCNT hacia la oxidación de H₂O₂, posibilitó la cuantificación sensible y selectiva de glucosa en muestras alimenticias y farmacéuticas.

En la segunda parte del presente trabajo de Tesis se utilizaron diversos nanomateriales derivados de grafeno para la modificación de sustratos de Au con el fin

de desarrollar plataformas para la inmovilización de proteínas. Se logró inmovilizar una proteína modelo (BSA) sobre sustratos de Au modificados con óxido de grafeno (GO), GO modificado covalentemente con el polímero quitosano (GO-CHIT), y el producto de la reducción química de GO-CHIT (RGO-CHIT). Mediante el análisis de las propiedades ópticas, plasmónicas y electroquímicas y su correlación con los cubrimientos superficiales de BSA se evaluaron diversas metodologías de inmovilización, covalentes y no covalentes, de los nanomateriales sobre los sustratos de Au. Se determinó que las metodologías no covalentes permiten obtener mejores cubrimientos del nanomaterial derivado de grafeno y que las etapas de ensamblado son más sencillas y rápidas. Por otro lado, se concluyó que para biosensores plasmónicos, en los cuales la sensibilidad está determinada por la cantidad de proteína inmovilizada, la plataforma seleccionada fue Au/MPS/PDDA/GO. En cambio, para la construcción de plataformas (bio)analíticas electroactivas, en las cuales la sensibilidad está determinada por los cambios en la cinética de transferencia de carga de una sonda redox externa, la plataforma seleccionada fue Au/MPS/RGO-CHIT.

La plataforma Au/MPS/(PDDA/GO)_n fue empleada para el desarrollo de un inmunosensor plasmónico para la determinación de galectina-3 (Gal3), la cual se ha comenzado a utilizar recientemente como biomarcador para la detección temprana de insuficiencia cardíaca aguda (afección que causa infarto de miocardio). La optimización del número de bicapas PDDA/GO ensambladas sobre Au/MPS permitió maximizar la cantidad de anticuerpo anti-Gal3 inmovilizado. El inmunosensor fue construido a través de la inmovilización orientada de anti-Gal3 sobre Au/MPS/(PDDA/GO)₄ con ácido 3-aminofenilborónico. Esto, junto con la presencia de GO, que incrementa la sensibilidad del instrumento de SPR por acoplamiento del campo de los plasmones, posibilitó la detección del Gal3 en el orden de concentraciones de interés clínico (~ ng mL⁻¹) de manera selectiva frente a las principales proteínas interferentes del suero sanguíneo. El desarrollo del inmunosensor no sólo representa el primero en su tipo para la detección de Gal3, sino que abre las puertas a futuros desarrollos para la determinación analítica del biomarcador en muestras de plasma sanguíneo.

En términos generales, a lo largo del presente trabajo de Tesis se funcionalizaron diversas nanoestructuras de carbono con biopolímeros. A modo de conclusión general se puede establecer que los dos parámetros más importantes a la hora de modificar sustratos electroactivos son: (a) la metodología implementada para su incorporación (la cual determina la disponibilidad del nanomaterial electroactivo y las funcionalidades provistas por el polímero); y (b) la relación entre las cantidades relativas de nanomaterial y polímero, ya que debe haber un balance entre la modificación y el bloqueo de las propiedades electrocatalíticas de los nanomateriales a sondas redox internas y externas.

Se demostró que el diseño racional de la plataforma biosensora nanoestructurada permite optimizar, controlar y definir las aplicaciones en la detección de analitos y marcadores de relevancia. El estudio cuidadoso de la relación estructura/propiedad de las funcionalizaciones llevadas a cabo a lo largo de la Tesis permitió modular las propiedades individuales de sus dos componentes: la nanoestructura de carbono y el biopolímero.

Las metodologías de funcionalización presentadas en esta Tesis abren las puertas para nuevos desarrollos y estudios. En el caso de los nanomateriales derivados de grafeno sobre sustratos de Au, se puede evaluar la funcionalización de GO o RGO con otros biopolímeros o incluso ensayar con otras nanoestructuras derivadas del grafeno y analizar el efecto sobre las propiedades de las plataformas o la inmovilización de proteínas con propiedades de bio-reconocimiento.