

Interacción enzima-sustrato modificado: diseño y desarrollo de superficies biofuncionales

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas
Bioq. María Fernanda Stragliotto

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

I N F I Q C

INFIQC-Departamento de Físicoquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
2016

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisicoquímica, de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Carla Giacomelli y se presenta a consideración de dicha facultad para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.
Córdoba, junio de 2016.

Prof. Dra. Carla Giacomelli
Directora de Tesis

Comisión Evaluadora

Prof. Dra. Patricia Ortiz
Miembro de la Comisión de Tesis

Prof. Dra. Cecilia Álvarez Igarzábal
Miembro de la Comisión de Tesis

Prof. Dr. Guillermo Montich
Miembro de la Comisión de Tesis

Prof. Dra. Alicia Zon
Evaluadora Externa

A mi Familia

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas y al Departamento de Físicoquímica, por brindarme el espacio para poder realizar este doctorado. A FONCyT, CONICET y SECyT-UNC, por las becas otorgadas. A CONICET, SECyT-UNC, FONCyT y CAPES-SPU, por el apoyo económico que hizo posible este trabajo.

A Carla, por haber dirigido esta Tesis, por sus tantas horas dedicadas a entender los resultados, por su paciencia y entender mis tiempos, por su confianza día a día. Por ayudarme a crecer tanto en lo profesional como en lo personal.

A la Dr. Patricia Ortiz (Pato), por su tiempo durante estos años, por leer este trabajo y por estar en los detalles dulces que alegraron tantos días de trabajo.

A la Dra. Cecilia Álvarez Igarzábal y al Dr. Guillermo Montich por sus aportes y seguimiento durante estos años, por leer este trabajo.

A la Dra. Alicia Zon por aceptar evaluar esta Tesis y por su tiempo para leerla.

A Sergio, por sus aportes en este trabajo, por su tiempo, por darle sentido a algunos resultados "exóticos". Por su disponibilidad constante.

A los Dres. Susana y Roberto Torresi, por abrirme las puertas de su laboratorio y la de su casa en San Pablo tantas veces, por su calidez y hospitalidad. A Roberto, por el tiempo, por el aporte a los experimentos y a la discusión de los resultados. A su grupo: Sueln, Tatiana, Kelly, Jose, Vinicius, Leonardo, Jadielson, Fernando, Marco, Lucas, Braga, Fabián por compartir el día a día y hacerme sentir siempre como en casa. A Vitor, por ser acompañarme y ayudarme en cada momento, por tantas conversaciones sobre los resultados y la vida, por darme su confianza y su amistad, por estar ahí siempre (sin importar la distancia) en cada duda de QCM-D.

A la Dra. Laura Rossi y a su grupo por su colaboración en las síntesis de distintos ferroceno tiolados.

Al Dr. Javier Valdez Taubas y a su grupo por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme y ayudarme en la expresión de la enzima recombinante.

Al Dr. José Fernández por sus aportes en este trabajo, por su tiempo durante mis estadías en Santa Fe y por leer este trabajo. A los chicos de Santa Fe: Gise,

Mariela y Leo por compartir el día a día, su buena onda y las tantas rondas de mate.

A mis padres, por su lucha constante por hacer de sus hijas grandes personas. Por darnos una familia basada en nobles valores y en la búsqueda constante de nuestra realización. Porque sus enseñanzas quedaron en el aire... A mis hermanas por aguantarme y ser mi ejemplo. A toda mi familia, mis abuelas, mis tías, mi primo, mi cuñado, por estar siempre. A Gustavo, por haberme enseñado que existen muchas formas de ver y vivir la vida y que debo luchar por lo que quiero. Al integrante más pequeño de la familia, Thiago por hacerme sentir tanto amor.

A mis amigas...Brenda, por tantos años de amistad y estar siempre. Por ser mi compañera de estudio y entenderme aún cuando ni yo lo hacía, por ser cómplice de tantas noches de largas conversaciones, por confiar en mí. A Ceci y Micaela por aguantar mis demoras en cada juntada por ser un cable a tierra constante, por escucharme y compartir nuestras locuras, por entenderme y quererme así y hacerme tía del corazón. A Ariana, a la vida por cruzarnos porque en vos encontré una hermana, una amiga a la cual siento siempre cerca. A Mariana, por tener un gran corazón, por darme su confianza y su amistad.

A mi grupo, a los que están y a los que la vida los llevó a otros lugares, al Dr. De Pauli, Vale, Lau V, Lau B, Ricky, Taki, Lore, Eli (por ayudarme a dar los primeros pasos), Maru, Lau M, Ceci, Mara, Gon, Ile...por apoyarme en tantos momentos difíciles, por estar ahí cuando sólo cantaba o intentaba encontrarle la vuelta a los resultados que tenía, por ser más que compañeros, por ser buenas personas y ayudarme a crecer.

A Dariana, por compartir los momentos más importantes de este trabajo, por acompañarme largas horas hasta poder ver los resultados que esperaba. Por escucharme llorar y cantar, por compartir grandes momentos y ayudarme a presentar esta Tesis como soñaba. A Vivi, por brindarme su amistad y buena onda constante.

A Fausto, Vicky Bracamonte, Yami, Faby Gutiérrez, Emi por compartir tantas horas de trabajo, por las charlas, los mates. A Caro, Franco, Juan, Esteban, Guadi por tantos momentos, risas y más. A Eli Farías, por tu compañía nocturna durante tantos años, por festejar los éxitos y los fracasos de la electroquímica.

A la gente Físicoquímica, en especial a la del sótano, que con un gesto o una palabra formó parte de mis días durante los últimos seis años.

A Susy, por estar atenta a nosotros en cada momento, por malcriarnos y ayudarnos a estar mejor.

A Nora, por ayudarme a crecer, por enseñarme un mundo distinto pero tan igual al de la ciencia.

A Mary, Sil, Kary, Franco, Lita, por tantas charlas y mates, por escucharme y compartir muchos momentos.

A todas esas personas que pasaron por mi vida, dejando una huella especial con los cuales el tiempo o la vida separó nuestros caminos.....GRACIAS porque me hicieron crecer, sentirme acompañada y querida.

Capítulo 1

Introducción General

1.1.- Antecedentes y conocimientos previos	3
1.1.1.- Superficies biofuncionales	3
1.1.1.1.- Adsorción física de elemento de biorreconocimiento	3
1.1.1.2.- Adsorción química del elemento de biorreconocimiento	4
1.2.- Estrategias para el desarrollo de superficies biofuncionales	4
1.2.1.- Modificación de sustratos sólidos de oro	4
1.2.1.1.- Monocapas autoensambladas (SAMs) de alcanotioles	5
1.2.2.- Enzimas como elemento de biorreconocimiento	7
1.3.- Referencias	9

Capítulo 2

Resumen y esquema de la Tesis

2.1.- Estrategias para el desarrollo de superficies biofuncionales	21
2.1.1.- Modificación de sustratos sólidos de oro	23
2.1.2.- Optimización de la interacción enzima-sustrato sólido de oro modificado	25
2.1.3.- Determinación de la actividad biológica superficial	28
2.2.- Esquema general de la Tesis	29
2.3.- Referencias	30

Capítulo 3

Materiales y métodos: sustratos sólidos de oro

3.1.- Materiales	39
3.1.1.- Sustratos sólidos	39
3.1.1.1.- Sustratos sólidos de oro policristalino (Au) y monocristalino Au(111)	39
3.1.2.- Reactivos y Soluciones	41
3.2.- Métodos	42
3.2.1.- Fundamentos de las técnicas utilizadas	43
3.2.1.1.- Voltamperometría cíclica (CV)	43

3.2.1.2.- Amperometría	49
3.2.1.3.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)	51
3.2.1.4.- Espectroscopía Raman aumentada por la superficie (SERS)	59
3.2.1.5.- Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de la disipación (QCM-D)	61
3.2.2.- Preparación de sustratos de oro	64
3.2.2.1.- Limpieza de sustratos de oro	64
3.2.2.2.- Estudios preliminares para la modificación de oro con SAMs electroactivas	65
3.2.2.3.- Modificación de oro con SAMs simples de Fc y mixtas	70
3.3.- Referencias	72

Capítulo 4

Modificación y caracterización de sustratos sólidos de oro monocristalino (Au(111))

4.1.- Introducción	83
4.2.- Resultados y discusión	83
4.2.1.- Sustratos de Au(111) modificados con SAMs simples	83
4.2.1.1.- SAMs de 6-Ferrocenil hexanotiol (Fc)	84
4.2.1.1.1.- Voltamperometría cíclica	84
4.2.1.1.2.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)	109
4.2.1.2.- SAMs de 3-mercaptopropionico (3-COOH) y de ácido 6-mercaptophexanoico (6-COOH)	119
4.2.1.2.1.- Voltamperometría cíclica	120
4.2.1.2.2.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)	122
4.2.1.2.3.- Espectroscopía Raman aumentada en superficie (SERS)	127
4.2.2.- Sustratos de Au(111) modificados con SAMs mixtas	130
4.2.2.1.- SAMs mixtas de ferroceno (Fc) y 3-mercaptopropionico (3-COOH) y ferroceno (Fc) y ácido 6-mercaptophexanoico (6-COOH)	131
4.2.2.1.1.- Voltamperometría cíclica (VC)	131
4.2.2.1.2.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)	133
4.3.- Conclusiones	136
4.4.- Bibliografía	138

Capítulo 5

Modificación y caracterización de sustratos sólidos de oro policristalino (Au)

5.1.- Introducción	147
5.2.- Resultados y discusión	148
5.2.1.- Sustratos de Au modificados con SAMs mixtas	148
5.2.1.1.- Voltamperometría cíclica	148
5.2.1.1.1.- Tratamiento de ciclado previo en HClO ₄ 1,00 M	148
5.2.1.1.2.- Desorción reductiva de tioles	150
5.2.2.- Sustratos de Au modificados con SAMs mixtas y sitios Ni(II)	154
5.2.1.2.- Microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D)	157
5.3.- Conclusiones	159
5.4.- Bibliografía	160

Capítulo 6

Expresión y caracterización del elemento de biorreconocimiento

6.1.- Introducción	167
His ₆ -RgDAAO recombinante como elemento de biorreconocimiento	167
6.1.- Parte experimental	168
6.2.1.- Materiales	168
6.2.2.- Métodos	168
6.2.2.1.- Transformación, expresión y purificación	168
6.2.2.1.1.- Transformación	168
6.2.2.1.2.- Expresión de His ₆ -RgDAAO recombinante	169
6.2.2.1.3.- Purificación de His ₆ -RgDAAO recombinante	170
6.2.2.1.- Caracterización electroquímica	171
6.3.- Resultados y Discusión	171
6.3.1.- Expresión y purificación	171
6.3.2.- Caracterización electroquímica	174
6.4.- Conclusiones	176
6.5.- Referencias	176

Capítulo 7

Biofuncionalización de sustratos de Au con His₆-RgDAAO

7.1.- Introducción	181
7.2.- Resultados y Discusión	182
7.2.1.- Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de la disipación (QCM-D)	182
7.2.1.2.- Biofuncionalización de sustratos de oro con His ₆ -DAAO.	182
7.2.2.- Amperometría	200
7.2.2.1.- Determinación de la actividad biológica superficial	200
7.3.- Conclusiones	211
7.4.- Referencias	211

Capítulo 8

Conclusiones y perspectivas futuras

8.1.- Conclusiones	217
8.2. Perspectivas futuras	218

ΔD : cambios en la disipación
 Δf : cambios en la frecuencia
3-COOH: ácido 3-mercaptopropionico
6-COOH: ácido 6-mercaptophexanoico
Au(111): oro monocristalino
Au: oro policristalino
BF: buffer pirofosfato
CV: voltamperometría cíclica
Cyst: cisteamina
DAAO: D-aminoácido oxidasa
D-Ala: D-alanina
E: potencial
EC: contraelectrodo
E_o: potencial de oxidación
ER: electrodo de referencia
E_r: potencial de reducción
E_s: potencial aplicado al sustrato
ET: electrodo de trabajo
E_T: potencial aplicado al tip
Fc: 6-ferrocenil hexanotiol
FcCHO: ferroceno aldehído
FcCOOH: ferroceno carboxílico
FcMeOH: ferroceno metanol
His₆-RgDAAO: D-aminoácido oxidasa recombinante
i: corriente
i_L: corriente límite
i_T: corriente del tip
j: densidad de corriente
j_o: densidad de corriente de oxidación
j_r: densidad de corriente de reducción
MP: peso molecular
n: sobretono

O: especies oxidadas

QCM-D: microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de la disipación

Q_T : carga total

Q_{Td} : carga total de desorción

R: especies reducidas

R^2 : ajuste de la recta

SAMs: monocapas autoensambladas

SECM: microscopía electroquímica de barrido

SERS: espectroscopía Raman aumentada por la superficie

t: tiempo

v: velocidad de barrido

vG: parámetros de interacción

z: distancia recorrida por el tip

θ_T : cubrimiento de las especies adsorbidas

Γ : cantidad adsorbida



Capítulo 1

Introducción general

“El éxito es aprender a ir de fracaso en fracaso sin desesperarse”.

W. Churchill

1.1.- Antecedentes y conocimientos previos

1.1.1.- Superficies biofuncionales

Una superficie biofuncional se forma a partir de la adsorción de biomoléculas como por ejemplo anticuerpos, antígenos, enzimas, receptores de células, ADN, etc. sobre un sustrato sólido¹⁻⁶. Estas superficies biofuncionales tienen como objetivo mantener la habilidad natural altamente evolucionada de los sistemas biológicos para reconocer específicamente estructuras a nivel molecular, como por ejemplo el reconocimiento antígeno-anticuerpo^{7,8}, enzima-sustrato⁹⁻¹¹, ligando-receptor¹², etc. Por lo tanto, las biomoléculas adsorbidas sobre los sustratos sólidos se comportan como elementos de biorreconocimiento altamente específicos y selectivos. Kasemo y colaboradores¹³, definieron a la biofuncionalización de superficies como un área interdisciplinaria, muy amplia, capaz de examinar las propiedades y procesos que tienen lugar en la interfaz entre el sustrato y la biomolécula¹³. Existen dos estrategias básicas para la biofuncionalización de sustratos sólidos, los cuales consisten en procesos de adsorción física o específica del elemento de biorreconocimiento.

1.1.1.1.- Adsorción física del elemento de biorreconocimiento

Cuando las biomoléculas se ponen en contacto con un sustrato sólido, rápidamente se produce la adsorción de forma espontánea, representando una estrategia sencilla y de menor costo para biofuncionalizar sustratos sólidos². Durante este proceso de adsorción física, pueden presentarse interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, de dispersión, entre otras, que en muchas ocasiones perturba la estructura tridimensional del elemento de biorreconocimiento y, en consecuencia, su actividad biológica superficial (directamente vinculada con la especificidad y selectividad de reconocimiento)^{2,14}. Dado que este proceso es generalmente rápido da lugar a diferentes poblaciones de biomoléculas adsorbidas, algunas fuertemente unidas y otras débilmente unidas¹⁵. En este último caso, la biofuncionalización se pierde por el simple lavado ya sea por

desorción o por intercambio con otras biomoléculas¹⁶. Además, en la mayoría de los casos la adsorción física resulta en biomoléculas con orientación al azar, disminuyendo la eficiencia del evento de biorreconocimiento¹⁵.

1.1.1.2.- Adsorción química del elemento de biorreconocimiento

La biofuncionalización química requiere la modificación del sustrato y/o del elemento de biorreconocimiento ya que es necesario inducir la formación de enlaces covalentes o de bioafinidad¹⁷⁻²⁰. Por lo tanto, esta estrategia da lugar una interacción fuerte y estable entre las biomoléculas y el sustrato sólidos que es de importancia fundamental para desarrollar superficies biofuncionales con capacidad de reconocimiento específico que sean reproducibles y reutilizables^{13,21}. Con la adsorción química, se evitan los problemas de perturbación estructural, desorción, intercambio con otras moléculas y compromiso de los sitios biológicamente activos a través de la orientación preferencial con la superficie²²⁻²⁴.

1.2.- Estrategias para el desarrollo de superficies biofuncionales

1.2.1.- Modificación de sustratos sólidos

Para el caso de cualquier sistema que involucre al proceso de adsorción de enzimas, los factores que controlan el comportamiento interfacial están vinculados con las propiedades superficiales, las características propias de la enzima nativa y la naturaleza del medio²⁵. En general, la elección del sustrato para realizar un estudio de tipo fundamental del proceso de adsorción de enzimas, se vincula con la posibilidad de evaluar y controlar esas propiedades superficiales. Sobre esta base, se han utilizado una gran variedad de sustratos sólidos, tanto sustratos sólidos (metales, mica, sílica, cuarzo, etc.) como (nano)partículas (metales, óxidos, arcillas, etc.) en ausencia y presencia de modificadores (polímeros, monocapas autoensambladas, etc.)²⁶⁻²⁹. En particular,

la estrategia ideal para preparar superficies biofuncionales involucra la modificación de sustratos sólidos para:

- ♣ inducir una interacción fuerte y estable biomolécula-sustrato,
- ♣ mantener la actividad biológica,
- ♣ exponer los sitios de biorreconocimiento de la biomolécula hacia la solución,
- ♣ evitar la adsorción física.

1.2.1.1.- Monocapas autoensambladas (SAMs) de alcanotioles

Las monocapas autoensambladas (SAMs) son ensamblajes orgánicos formados por la adsorción de constituyentes moleculares desde una disolución o fase gaseosa en la superficie de un sustrato sólido. Los adsorbatos son capaces de organizarse espontáneamente dando origen a una estructura ordenada, siendo las interacciones entre subunidades la principal fuerza impulsora de dicho proceso^{20,30-34}.

Este proceso de autoensamblado, ha sido empleado en las últimas décadas como estrategia para modificar las propiedades químicas y físicas de sustratos sólidos³⁵⁻³⁹. Las primeras publicaciones sobre SAMs se realizaron en 1946, cuando Zisman y colaboradores mostraron la preparación de una monocapa autoensamblada a partir de la adsorción de un surfactante sobre un sustrato metálico⁴⁰; en ese momento, el potencial del proceso de autoensamblado no fue reconocido. Sin embargo, en la actualidad, las SAMs de moléculas orgánicas sobre metales y óxidos metálicos son utilizadas como partes funcionales y/o estructurales en diversas aplicaciones nanotecnológicas, que incluyen sensores⁴¹⁻⁴³, sistemas de biorreconocimiento⁴⁴, sistemas basados en electrónica molecular⁴⁵, entre otros.

Las moléculas que forman las SAMs presentan una función química o grupo cabeza que posee una afinidad específica por el sustrato, un esqueleto y un grupo terminal. Existen diferentes grupos cabeza que se unen a metales para

formar SAMs, siendo las más usadas las derivadas de alcanotioles sobre sustratos de oro^{31,46-50}.

Las monocapas de alcanotioles sobre sustratos de oro son uno de los sistemas más estudiados en la literatura, debido a su capacidad para formar fácilmente monocapas estables que permiten modular las propiedades superficiales⁵¹⁻⁵⁴. En particular, la preponderancia de las SAMs de alcanotioles sobre sustratos de oro con respecto a otras, radica principalmente en la combinación de las propiedades del sustrato y el adsorbato (Figura 1.1)^{4,55}.

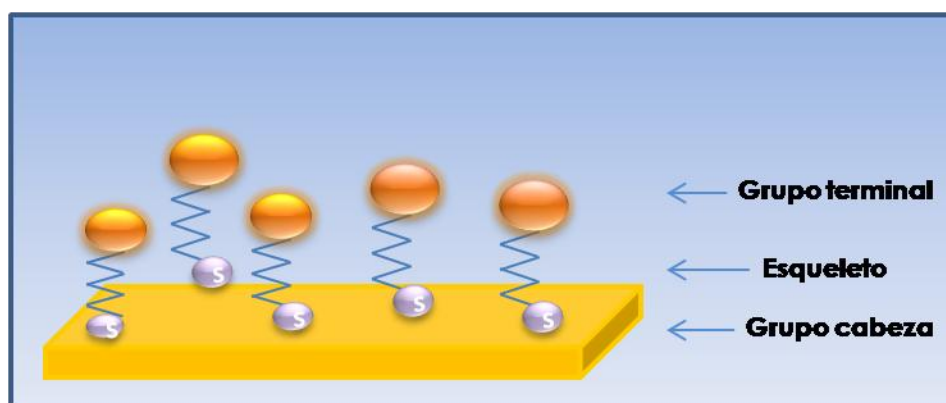


Figura 1.1.- Esquema de una SAMs de tioles sobre oro.

Los alcanotioles son moléculas orgánicas que pueden dividirse en tres partes:

- el grupo cabeza, es el que se encuentra en contacto con el sustrato, está formado por un grupo sulfhidrilo (-SH) que se enlaza covalentemente al oro y es el responsable de guiar el proceso de autoensamblado,
- el esqueleto, es la cadena hidrocarbonada de longitud variada unida al grupo -SH; esta parte de la molécula, es responsable de proveer, entre otras cosas, el espesor bien definido y la estabilidad que poseen estas SAMs, gracias a las interacciones entre cadenas adyacentes, y
- el grupo terminal, es la parte de la molécula que está directamente en contacto con el medio y que por lo tanto, determina las propiedades químicas y físicas superficiales de las SAMs. Este grupo puede, en algunos casos, inducir

pequeños cambios en la estructura de la superficie^{30,56,57}. Estos efectos dependen del tipo de interacción entre grupos terminales (interacciones por puente hidrógeno, repulsivas, etc). Asimismo, el grupo terminal posee gran relevancia ya que a través del mismo se pueden construir estructuras más complejas^{58,59}.

En los estudios teóricos, los alcanotioles de cadena corta son elegidos por su simplicidad. Los alcanotioles de cadena más largas requieren la consideración de la fuerzas de van der Waals entre las cadenas de alquilo^{26,33,60}. Las moléculas de alcanotioles se adsorben sobre la superficie del metal y, gracias a las interacciones intermoleculares, forman estructuras altamente organizadas en la superficie de los sustratos de oro. En la primera etapa, las moléculas de alcanotioles (RSH) con distinto largo de cadena carbonada (R), se adsorben físicamente sobre la superficie de Au y luego pierden el átomo de H del grupo tiol, generando el radical tiol (RS·) para formar una unión tiolato (S-Au), que es considerado un enlace covalente por su alta energía de unión (~200 KJ.mol⁻¹)⁶¹. La reacción formal de adsorción puede escribirse de la siguiente manera:



1.2.2.- Enzimas como elemento de biorreconocimiento

Los elementos biológicos de reconocimiento o de biorreconocimiento pueden clasificarse en dos grandes grupos:

♣ Biocatalíticos: comprenden enzimas aisladas, microorganismos, células o tejidos, que al llevar a catalizar reacciones de catálisis con el analito generan un producto detectable y medible.

♣ Bioligandos: tales como anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos y lectinas, los cuales se caracterizan por tener una reacción de afinidad con el analito⁶².

Estas biomoléculas, han sido utilizadas para diseñar y desarrollar superficies biofuncionales desde hace varias décadas⁶³⁻⁶⁵. Sin embargo, las enzimas oxidorreductasas son las más utilizadas ya que catalizan la transferencia de

electrones desde una molécula donante (el agente reductor) a otra aceptora (el agente oxidante)^{18,65-68}. Estos sistemas, sólo funcionan correctamente cuando se logra una interacción fuerte y estable entre el elemento de biorreconocimiento y el sustrato sin alterar la actividad biológica y con una orientación adecuada que permita el evento de biorreconocimiento, es decir, la interacción entre el analito presente en solución y la biomolécula adsorbida. En consecuencia, el control de los factores que afectan al proceso de adsorción-desorción de enzimas y su efecto en la conformación y orientación de estas proteínas, es indispensable en la preparación de superficies biofuncionales⁶⁹. Como consecuencia, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones tendientes a alcanzar metas que impliquen especificidad y adsorción orientada de la enzima. Entre ellas, se deben destacar los esfuerzos para controlar la orientación de las moléculas de enzima adsorbidas sobre el sustrato sólido a través de interacciones específicas, como son los enlaces covalentes y de bioafinidad

En 1975, Porath y colaboradores^{70,71} desarrollaron una técnica cromatográfica para bioseparaciones, sobre la base de un método ya descrito⁷². Porath y colaboradores^{70,71}, se centraron en la separación y aislamiento de proteínas utilizando una técnica que se basa en la afinidad de estas biomoléculas por cationes metálicos unidos a agentes quelantes inmovilizados sobre el soporte cromatográfico. La aplicación más conocida de este método, denominado Cromatografía de Afinidad de Ion Metálico Inmovilizado (IMAC), es la separación de proteínas recombinantes^{5,73-75}. En este caso, se fusiona un hexapéptido de residuos de histidina (His₆) sobre el extremo N- o C- terminal de la proteína recombinante (proteínas His tag¹⁸) y su purificación mediante IMAC representa una estrategia sencilla y muy útil^{5,18,69}.

El concepto desarrollado para la IMAC puede ser aprovechado para preparar superficies biofuncionales. En consecuencia, las proteínas His tag pueden ser empleadas no sólo para facilitar la purificación de proteínas, sino también como elemento de biorreconocimiento para detectar diferentes analitos^{64,69,76-79}. Esta estrategia, involucra la modificación del sustrato sólido con cationes metálicos (Ni, Cu, Zn), con los cuales los residuos His₆ de la marca proteica forman quelatos estables. Los iones metálicos en estos complejos tienen

su esfera de coordinación ocupada por el ligando superficial y por moléculas de agua. Durante el proceso de adsorción química, los residuos de His₆ de las proteínas His tag desplazan a las moléculas de agua. Por otro lado, la secuencia que codifica para la marca de His₆ se fusiona en el plásmido que expresa al elemento de biorreconocimiento, permitiendo una selección adecuada de su posición en la estructura primaria de la proteína. Este aspecto, resulta sumamente versátil para el desarrollo de superficies biofuncionales ya que permite controlar la estabilidad de la interacción proteína-sustrato⁶⁹ y la orientación del elemento de biorreconocimiento⁷⁶. Asimismo, es posible evitar o minimizar los cambios conformacionales de las proteínas adsorbidas. Por otro lado, la posibilidad de incluir la marca en la etapa pretransduccional de la expresión del elemento de biorreconocimiento no causa cambios estructurales previos a la biofuncionalización⁶⁹. Finalmente, esta estrategia permite preparar superficies biofuncionales reciclables ya que la unión entre los residuos de His₆ y los cationes superficiales, se elimina utilizando ligandos que compiten por la formación del quelato superficial^{15,69,76}. Se ha demostrado, por ejemplo, que las enzimas His tag adsorbidas por este método presentan alta actividad biocatalítica y mayor estabilidad frente a la desnaturalización⁸⁰. Más aún, la alta especificidad de la interacción entre las proteínas His tag y las superficies modificadas con cationes metálicos permite inducir la adsorción específica a partir de extractos crudos de cultivos celulares sin purificaciones previas⁷⁷.

1.3.- Referencias

1. Briand E, Humblot V, Landoulsi J, et al. Chemical modifications of Au/SiO₂ template substrates for patterned biofunctional surfaces. *Langmuir*. 2011;27(2):678-685. doi:10.1021/la101858y.
2. Giacomelli CE, Valenti LE, Carot ML. Biomolecules and Solid Substrate Interaction: Key Factors in Developing Biofunctional Surfaces. In: *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Second Edition*. Vol ; 2007:1-16. doi:10.1081/E-ESCS-120047144.

3. Knopp D, Tang D, Niessner R. Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal Chim Acta*. 2009;647(1):14-30. doi:10.1016/j.aca.2009.05.037.
4. Ossowski J, Wächter T, Silies L, et al. Thiolate versus Selenolate: Structure, Stability, and Charge Transfer Properties. *ACS Nano*. 2015;9(4):4508-4526. doi:10.1021/acsnano.5b01109.
5. Hou J, Jin Q, Du J, Li Q, Yuan Q, Yang J. A rapid in situ immobilization of D-amino acid oxidase based on immobilized metal affinity chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(5):857-864. doi:10.1007/s00449-013-1056-6.
6. López Rodríguez ML, Benimeli C, Madrid RE, Giacomelli CE. A simple *Streptomyces* spore-based impedimetric biosensor to detect lindane pesticide. *Sensors Actuators, B Chem*. 2015;207(Part A):447-454. doi:10.1016/j.snb.2014.10.030.
7. Gonzalez VDG, Gugliotta LM, Giacomelli CE, Meira GR. Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease: II. Chemical coupling of antigen Ag36 onto carboxylated latexes. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(2):789-795. doi:10.1007/s10856-006-0041-x.
8. Ferreira AAP, Colli W, Alves MJM, et al. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T. cruzi by AFM and amperometric measurements. *Electrochim Acta*. 2006;51(24):5046-5052. doi:10.1016/j.electacta.2006.03.061.
9. Padeste C, Steiger B, Grubelnik A, Tiefenauer L. Redox labelled avidin for enzyme sensor architectures. *Biosens Bioelectron*. 2003;19(3):239-247. doi:10.1016/S0956-5663(03)00214-8.
10. Qiu JD, Zhou WM, Guo J, Wang R, Liang RP. Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose. *Anal Biochem*. 2009;385(2):264-269. doi:10.1016/j.ab.2008.12.002.
11. Cadarso VJ, Fernández-Sánchez C, Llobera A, Darder M, Domínguez C. Optical biosensor based on hollow integrated waveguides. *Anal Chem*. 2008;80(9):3498-3501. doi:10.1021/ac702293r.
12. Blankespoor R, Limoges B, Schöllhorn B, Syssa-Magalé JL, Yazidi D. Dense monolayers of metal-chelating ligands covalently attached to carbon electrodes electrochemically and their useful application in affinity binding of histidine-tagged proteins. *Langmuir*. 2005;21(8):3362-3375. doi:10.1021/la047139y.

13. Kasemo B. Biological surface science. *Surf Sci.* 2002;500(1-3):656-677. doi:10.1016/S0039-6028(01)01809-X.
14. Carot ML, Torresi RM, Garcia CD, Esplandiu MJ, Giacomelli CE. Electrostatic and hydrophobic interactions involved in C T biofunctionalization with short ss-D A. *J Phys Chem C.* 2010;114:4459-4465. doi:10.1021/jp9085359.
15. Herrera E. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos. *Tesis Dr.* 2013.
16. Valenti LE, Fiorito P a., Garcia CD, Giacomelli CE. The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes. *J Colloid Interface Sci.* 2007;307(2):349-356. doi:10.1016/j.jcis.2006.11.046.
17. Kang E, Park J, McClellan SJ, et al. Specific Adsorption of Histidine-Tagged Proteins on Silica Surfaces Modified with Ni / NTA-Derivatized Poly (ethylene glycol). *Langmuir.* 2007;(23):6281-6288. doi:10.1021/la063719e.
18. Ley C, Holtmann D, Mangold KM, Schrader J. Immobilization of histidine-tagged proteins on electrodes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;88(2):539-551. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.044.
19. Du Roure O, Debiemme-Chouvy C, Malthête J, Silberzan P. Functionalizing surfaces with nickel ions for the grafting of proteins. *Langmuir.* 2003;19(10):4138-4143. doi:10.1021/la020636z.
20. Karimi Shervedani R, Samiei Froushani M, Bagheri Dehaghi S. Functionalization of gold mercaptopropionic acid self-assembled monolayer with 5-amino-1,10-phenanthroline: Interaction with iron(II) and application for selective recognition of guanine. *Electrochim Acta.* 2015;164:344-352. doi:10.1016/j.electacta.2015.02.170.
21. Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog Surf Sci.* 2000;65:151-256. doi:10.1016/S0079-6816(00)00024-1.
22. Ndamanisha JC, Guo L, Wang G. Mesoporous carbon functionalized with ferrocenecarboxylic acid and its electrocatalytic properties. *Microporous Mesoporous Mater.* 2008;113(1-3):114-121. doi:10.1016/j.micromeso.2007.11.009.
23. Messina GML, Satriano C, Marletta G. A multitechnique study of preferential protein adsorption on hydrophobic and hydrophilic plasma-modified polymer surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2009;70(1):76-83. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.12.013.
24. Chidsey CED, Bertozzi CR, Putvinski TM, Muijsce a M. Coadsorption of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold: electroactive

- self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc.* 1990;112(11):4301-4306. doi:10.1021/ja00167a028.
25. Rabe M, Verdes D, Seeger S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;162(1-2):87-106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007.
 26. Newton L, Slater T, Clark N, Vijayaraghavan A. Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. *J Mater Chem C.* 2013;1(3). doi:10.1039/c2tc00146b.
 27. Benelmekki M, Xuriguera E, Caparros C, et al. Design and characterization of Ni²⁺ and Co²⁺ decorated Porous Magnetic Silica spheres synthesized by hydrothermal-assisted modified-Stöber method for His-tagged proteins separation. *J Colloid Interface Sci.* 2012;365(1):156-162. doi:10.1016/j.jcis.2011.09.051.
 28. Shin C, Shin W, Hong HG. Electrochemical fabrication and electrocatalytic characteristics studies of gold nanopillar array electrode (AuNPE) for development of a novel electrochemical sensor. *Electrochim Acta.* 2007;53(2):720-728. doi:10.1016/j.electacta.2007.07.040.
 29. Delcroix MF, Demoustier-Champagne S, Dupont-Gillain CC. Quartz crystal microbalance study of ionic strength and pH-dependent polymer conformation and protein adsorption/desorption on PAA, PEO, and mixed PEO/PAA brushes. *Langmuir.* 2014;30(1):268-277. doi:10.1021/la403891k.
 30. Vericat C, Vela ME, Benitez G, Carro P, Salvarezza RC. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem Soc Rev.* 2010;39(5):1805-1834. doi:10.1039/b907301a.
 31. Pensa E, Vericat C, Grumelli D, et al. New insight into the electrochemical desorption of alkanethiol SAMs on gold. *Phys Chem Chem Phys.* 2012;14(35):12355. doi:10.1039/c2cp41291h.
 32. Imabayashi S, Hobara D, Kakiuchi T. Selective replacement of adsorbed alkanethiols in phase-separated binary self-assembled monolayers by electrochemical partial desorption. *Langmuir.* 1997;7463(14):4502-4504. doi:10.1021/la970447u.
 33. Uehara TM, de Aguiar HB, Bergamaski K, Miranda PB. Adsorption of Alkylthiol Self-Assembled Monolayers on Gold and the Effect of Substrate Roughness: A Comparative Study Using Scanning Tunneling Microscopy, Cyclic Voltammetry, Second-Harmonic Generation, and Sum-Frequency Generation. *J Phys Chem C.* 2014;140821071532009. doi:10.1021/jp5054919.

34. Karimi Shervedani R, Samiei Foroushani M. Comparative Electrochemical Behavior of Proteins; Cytochrome c, Agaricus Bisporus Laccase, and Glucose Oxidase, Immobilized onto Gold-Thiol Self-Assembled Monolayer via Electrostatic, Covalent, and Covalent Coordinate Bond Methods. *Electrochim Acta*. 2016;187:646-654. doi:10.1016/j.electacta.2015.11.080.
35. Tencer M, Berini P. Toposelective electrochemical desorption of thiol SAMs from neighboring polycrystalline gold surfaces. *Langmuir*. 2008;24(21):12097-12101. doi:10.1021/la801443y.
36. Zhang S, Wang N, Yu H, Niu Y, Sun C. Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor. *Bioelectrochemistry*. 2005;67(1):15-22. doi:10.1016/j.bioelechem.2004.12.002.
37. Michota A, Bukowska J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *J Raman Spectrosc*. 2003;34(1):21-25. doi:10.1002/jrs.928.
38. Delacote C, Bouillon JP, Walcarius A. Voltammetric response of ferrocene-grafted mesoporous silica. *Electrochim Acta*. 2006;51(28):6373-6383. doi:10.1016/j.electacta.2006.04.042.
39. Michota A, Kudelski A, Bukowska J. Chemisorption of cysteamine on silver studied by surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir*. 2000;16(26):10236-10242. doi:10.1021/la000707z.
40. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem Rev*. 1996;96(4):1533-1554. doi:10.1021/cr9502357.
41. Xu T, Yu H, Xu P, Li X. A chelating-bond breaking and re-linking technique for rapid re-immobilization of immune micro-sensors. *Biomed Microdevices*. 2012;14(2):303-311. doi:10.1007/s10544-011-9607-6.
42. Lange U, Roznyatovskaya N V, Mirsky VM. Conducting polymers in chemical sensors and arrays. *Anal Chim Acta*. 2008;614(1):1-26. doi:10.1016/j.aca.2008.02.068.
43. Zhang S, Yang W, Niu Y, Sun C. Multilayered construction of glucose oxidase on gold electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Anal Chim Acta*. 2004;523(2):209-217. doi:10.1016/j.aca.2004.07.053.
44. Luong JHT, Male KB, Glennon JD. Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnol Adv*. 2008;26(5):492-500. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.05.007.

45. Méndez De Leo LP, de la Llave E, Scherlis D, Williams FJ. Molecular and electronic structure of electroactive self-assembled monolayers. *J Chem Phys.* 2013;138(11):114707. doi:10.1063/1.4795575.
46. Cancino J, Machado SAS. Microelectrode array in mixed alkanethiol self-assembled monolayers: Electrochemical studies. *Electrochim Acta.* 2012;72:108-113. doi:10.1016/j.electacta.2012.04.009.
47. Hong YK, Yu H, Lee TG, et al. Highly-ordered self-assembled monolayer of alkanethiol on thermally annealed polycrystalline gold films. *Chem Phys.* 2014;428:105-110. doi:10.1016/j.chemphys.2013.10.019.
48. Kohale S, Molina SM, Weeks BL, Khare R, Hope-Weeks LJ. Monitoring the formation of self-assembled monolayers of alkanedithiols using a micromechanical cantilever sensor. *Langmuir.* 2007;23(3):1258-1263. doi:10.1021/la062441n.
49. Kasibhatla BST, Labonte AP, Zahid F, Reifenberger RG, Datta S, Kubiak CP. Reversibly altering electronic conduction through a single molecule by a chemical binding event. *J Phys Chem B.* 2003;107(45):12378-12382. doi:10.1021/Jp036715g.
50. Gadogbe M, Zhou Y, Alahakoon SH, et al. Structures and Conformations of Alkanedithiols on Gold and Silver Nanoparticles in Water. *J Phys Chem C.* 2015;119(32):18414-18421. doi:10.1021/acs.jpcc.5b05514.
51. Chaki NK, Vijayamohanan K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens Bioelectron.* 2002;17(1-2):1-12. doi:10.1016/S0956-5663(01)00277-9.
52. Smalley JF, Finklea HO, Chidsey CED, et al. Heterogeneous electron-transfer kinetics for ruthenium and ferrocene redox moieties through alkanethiol monolayers on gold. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):2004-2013. doi:10.1021/ja028458j.
53. Strutwolf J, O'Sullivan CK. Microstructures by selective desorption of self-assembled monolayer from polycrystalline gold electrodes. *Electroanalysis.* 2007;19(14):1467-1475. doi:10.1002/elan.200703894.
54. Rudnev A V, Yoshida K, Wandlowski T. Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on low-index gold single crystal electrodes. *Electrochim Acta.* 2013;87:770-778. doi:10.1016/j.electacta.2012.09.090.
55. Carvalhal RF, Freire RS, Kubota LT. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol

- self-assembly monolayer formation. *Electroanalysis*. 2005;17(14):1251-1259. doi:10.1002/elan.200403224.
56. Millone MAD, Hamoudi H, Rodriguez L, et al. Self-assembly of alkanedithiols on Au(111) from solution: Effect of chain length and self-assembly conditions. *Langmuir*. 2009;25(22):12945-12953. doi:10.1021/la901601z.
 57. Luque AM, Mulder WH, Calvente JJ, Cuesta A, Andreu R. Proton transfer voltammetry at electrodes modified with acid thiol monolayers. *Anal Chem*. 2012;84(13):5778-5786. doi:10.1021/ac301040r.
 58. Abad JM, Mertens SFL, Pita M, Fernández VM, Schiffrin DJ. Functionalization of thioctic acid-capped gold nanoparticles for specific immobilization of histidine-tagged proteins. *J Am Chem Soc*. 2005;127(15):5689-5694. doi:10.1021/ja042717i.
 59. Valiokas R, Kienkar G, Tinazli A, et al. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: Characterization and application. *Langmuir*. 2008;24(9):4959-4967. doi:10.1021/la703709a.
 60. Wertz CF, Santore MM. Effect of surface hydrophobicity on adsorption and relaxation kinetics of albumin and fibrinogen: single-species and competitive behavior. *Langmuir*. 2001;17(10):3006-3016.
 61. Guidez EB, Mäkinen V, Häkkinen H, Aikens CM. Effects of Silver Doping on the Geometric and Electronic Structure and Optical Absorption Spectra of the Au₂₅-nAg_n(SH)₁₈-(n= 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12) Bimetallic Nanoclusters. *J Phys Chem C*. 2012;116(38):20617-20624. doi:10.1021/jp306885u.
 62. Gooding JJ. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Anal Chim Acta*. 2006;559(2):137-151. doi:10.1016/j.aca.2005.12.020.
 63. Sadana A. Fractal Analysis of Binding and Dissociation Kinetics of Thrombin on Biosensor Surfaces. *Fractal Bind Dissociation Kinet Differ Biosens Appl*. 2005:201-219. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044451945050011X>.
 64. Valenti LE, Smania AM, De Pauli CP, Giacomelli CE. Driving forces for the adsorption of a His-tag Chagas antigen. A rational approach to design bio-functional surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;112:294-301. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.059.
 65. Sadeghi SJ, Gilardi G, Cass AEG. Mediated electrochemistry of peroxidases - Effects of variations in protein and mediator structures. *Biosens Bioelectron*. 1997;12(12):1191-1198. doi:10.1016/S0956-5663(97)00089-4.

66. Mu X, Qiao J, Qi L, Liu Y, Ma H. Construction of a d-Amino Acid Oxidase Reactor Based on Magnetic Nanoparticles Modified by a Reactive Polymer and Its Application in Screening Enzyme Inhibitors. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014. doi:10.1021/am502901b.
67. Pedotti M, Ghisla S, Motteran L, Molla G, Pollegioni L. Catalytic and redox properties of glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie*. 2009;91(5):604-612. doi:10.1016/j.biochi.2009.02.007.
68. Van den Berghe-Snorek S, Stankovich MT. Thermodynamic control of D-amino acid oxidase by benzoate binding. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3373-3379. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2857720>.
69. Herrera E, Valdez Taubas J, Giacomelli CE. D-Amino acid oxidase bio-functionalized platforms: Toward an enhanced enzymatic bio-activity. *Appl Surf Sci*. 2015;356:679-686. doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.121.
70. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. 1975;258(5536):598-599. doi:10.1038/258598a0.
71. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*. 1992;3(4):263-281. doi:10.1016/1046-5928(92)90001-D.
72. Helfferich F. "Ligand Exchange": a Novel Separation Technique. *Nature*. 1961;189:1001-1002. doi:10.1038/1891001a0.
73. Schmitt L, Dietrich C, Tampe R. Synthesis and Characterization of Chelator-Lipids for Reversible Immobilization of Engineered Proteins at Self-Assembled Lipid Interfaces. *J Am Chem Soc*. 1994;116(19):8485-8491. doi:10.1021/Ja00098a008.
74. Segura MDLM, Levin G, Miranda M V, Mendive FM, Targovnik HM, Cascone O. High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture. *Process Biochem*. 2005;40(2):795-800. doi:10.1016/j.procbio.2004.02.009.
75. Dixon DD, Yu VY, Doyle RP. Recombinant expression of His-tagged saposin B and pH-dependent binding to the lipid coenzyme Q10. *Anal Biochem*. 2011;419(2):145-152. doi:10.1016/j.ab.2011.08.042.
76. Valenti LE, Martins VL, Herrera E, Torresi RM, Giacomelli CE. Ni(ii)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins. *J Mater Chem B*. 2013;1(38):4921. doi:10.1039/c3tb20769b.

77. Valenti LE, Herrera E, Stragliotto F, et al. Optimizing the Bioaffinity Interaction between His-Tag Proteins and Ni (II) Surface Sites. *Proteins Interfaces III State art*. 2012;(li):37-53. doi:10.1021/bk-2012-1120.
78. Kuan I, Liao R, Hsieh H, Chen K, Yu C. Properties of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase immobilized on magnetic beads through his-tag. *J Biosci Bioeng*. 2008;105(2):110-115. doi:10.1263/jbb.105.110.
79. Cappelletti P, Piubelli L, Murtas G, et al. Structure-function relationships in human d-amino acid oxidase variants corresponding to known SNPs. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(9):1150-1159. doi:10.1016/j.bbapap.2015.02.005.
80. Rouiller V, Clarke S, Changjiang Y, et al. High-affinity labeling and tracking of individual histidine-tagged proteins in live cells using Ni²⁺ tris-nitrilotriacetic acid quantum dot conjugates. *Nano Lett*. 2009;9(3):1228-1234. doi:10.1021/nl9001298.



Capítulo 2

Resumen y esquema de la Tesis

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es la victoria completa”.

Mahatma Gandhi

2.1.- Estrategias para el desarrollo de superficies biofuncionales

Desde finales del siglo pasado, los materiales diseñados con funciones específicas se han utilizado ampliamente tanto para diversas áreas de estudio como en distintos campos de aplicación¹⁻⁵. En particular, la modificación de diferentes sustratos sólidos con funcionalidades biológicas ha recibido creciente atención y es un tema prioritario para extender el uso de materiales diseñados en implantes médicos, biosensores y biochips, tejidos artificiales, bioelectrónica, etc^{6,7}. Con esta motivación, se han publicado una gran cantidad de trabajos referidos al proceso de adsorción de distintas biomoléculas (enzimas, anticuerpos, antígenos, ADN, etc) sobre diversos sustratos sólidos⁸⁻¹⁴. Sin embargo, y a pesar de la valiosa contribución científica que se ha realizado en los últimos años, la descripción cuantitativa a partir de los principios de la interacción entre las moléculas biológicas y los sustratos sólidos, está lejos de ser alcanzada. Más aún, y justamente porque esta área es muy amplia y se aborda con muy distintas metodologías, muchos de los resultados publicados son controvertidos. El objetivo fundamental de todos estos estudios, es minimizar la perturbación del proceso de adsorción (física o química) sobre la conformación y actividad de las moléculas biológicas para lograr una modificación superficial con capacidad de reconocimiento molecular selectiva y específica, propia de las biomoléculas nativas. Por lo tanto, el éxito de las estrategias de biofuncionalización radica en mantener la estructura 3D nativa de las moléculas biológicas en el estado adsorbido para lograr la mejor actividad biológica superficial que resulte en una modificación estable, selectiva y específica.

En particular para este trabajo de tesis doctoral, se utilizó D-aminoácido oxidasa (DAAO) marcada con residuos de histidina en el N-terminal (His₆-RgDAAO), como elemento de biorreconocimiento, adsorbida sobre sustratos sólidos de oro modificados con grupos Ni(II) para formar quelatos estables enzima-sustrato. Esta superficie biofuncional represente un potencial transductor de la actividad enzimática superficial en una señal cuantificable. La estrategia propuesta para la biofuncionalización, pretende promover una interacción fuerte

y estable enzima-sustrato e inducir una orientación preferencial sin pérdida de la actividad biológica del elemento de biorreconocimiento. En este contexto, el objetivo general de este trabajo fue **estudiar las propiedades y procesos que tienen lugar en la interfaz entre sustratos sólidos de oro y enzimas His₆-RgDAAO para diseñar racionalmente superficies biofuncionales con capacidad de reconocimiento específico de D-alanina**. Esta Tesis, se basa en el estudio sistemático de las interacciones entre el sustrato sólido y la enzima, combinando distintas metodologías superficiales que incluyen determinaciones electroquímicas, microscópicas, espectroscópicas y gravimétricas.

El esquema general de trabajo, incluye la modificación controlada de los sustratos sólidos, el estudio sistemático del proceso de adsorción y la evaluación del evento de biorreconocimiento superficial. Este esquema, representa la base para el diseño racional de superficies biofuncionales ya que integra los conceptos fundamentales del proceso de adsorción de enzimas con la optimización de la detección de la actividad biológica superficial. Para alcanzar el objetivo general con este sistema específico, el trabajo de Tesis Doctoral se ejecutó en tres etapas de estudio con objetivos propios, aunque mutuamente interrelacionados.

- 1. Modificación de sustratos sólidos:** optimizar la modificación de sustratos sólidos de oro para incluir tanto sitios Ni(II), que permitan una adecuada biofuncionalización con His₆-RgDAAO, como ferroceno (Fc), un mediador redox que mejora la detección electroquímica del evento de biorreconocimiento.
- 2. Optimización de la interacción enzima-sustrato sólido modificado:** estudiar sistemáticamente el proceso de adsorción de His₆-RgDAAO sobre los sustratos de oro modificados, para preservar la conformación de la enzima y evitar o minimizar la interacción inespecífica.
- 3. Determinación de la actividad biológica superficial:** evaluar la biofuncionalidad superficial mediante la detección electroquímica de H₂O₂.

Los aspectos metodológicos son propios de cada una de las tres etapas propuestas para el diseño de las superficies biofuncionales. A continuación, se

describe el diseño experimental para concretar los objetivos específicos de cada una de ellas.

2.1.1.- Modificación de sustratos sólidos de oro

La respuesta del sistema que se pretende conseguir con estos experimentos, está relacionada con la búsqueda de las condiciones óptimas que permitan adsorber enzimas His tag preferencialmente por las interacciones de bioafinidad (con orientación adecuada para no comprometer el sitio activo de la enzima y sin cambios conformacionales) histidina-Ni(II) y detectar el evento de biorreconocimiento superficial.

Para estudiar la modificación propuesta, se utilizaron sustratos sólidos de oro monocristalino Au(111) y policristalino (Au). Los sustratos de oro permiten realizar estudios estructurales de proteínas adsorbidas por espectroscopia Raman aumentada por superficie (SERS)¹⁵⁻¹⁷ y determinar la actividad biológica superficial con métodos electroquímicos¹⁸⁻²⁰. Estos sustratos fueron modificados tanto con sitios Ni(II)²¹⁻²³, para lograr una adecuada biofuncionalización con proteínas His tag, como con mediadores redox, tales como el ferroceno para mejorar la detección electroquímica del evento de biorreconocimiento^{24,25}.

Las SAMs de ferroceno son uno de los agregados moleculares más estudiados sobre electrodos metálicos. Desde el trabajo pionero de Chidsey²⁶, se han estudiado de forma sistemática SAMs con alcanotioles de ferroceno²⁷⁻³⁰. Estos sistemas poseen muchas ventajas respecto a los sistemas que utilizan los mediadores redox en solución, debido a que son fáciles de preparar y proporcionan un sistema estable y reproducible para estudiar el efecto del microambiente en los parámetros de transferencia de electrones³¹. En este trabajo, se ha optimizado la incorporación de ferroceno utilizando distintos procedimientos, entre los cuales, la mejor estrategia fue utilizar ferroceno tiolado. En particular, el 6-ferrocenil hexanotiol (Fc) para formar la SAMs ya que se logra una modificación estable con una muy buena respuesta electroquímica (Figura 2.1).

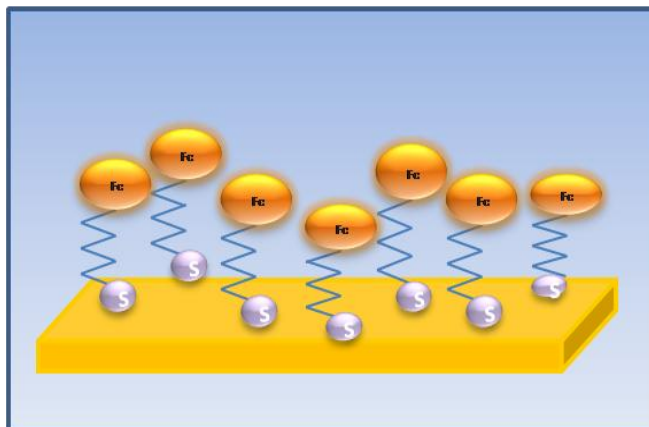


Figura 2.1.- Esquema de SAMs de ferroceno

La siguiente etapa para concretar este objetivo específico implicó la incorporación de cationes Ni(II) ³²⁻³⁴ a los sustratos sólidos de oro. Con este propósito, se utilizaron SAMs funcionalizadas con el ácido 3-mercaptopropionico (3-COOH) o el ácido 6-mercaptophexanoico (6-COOH) (Figura 2.2 a y b) para comparar la respuesta electroquímicas de las SAMs de distinto largo de cadena carbonada.

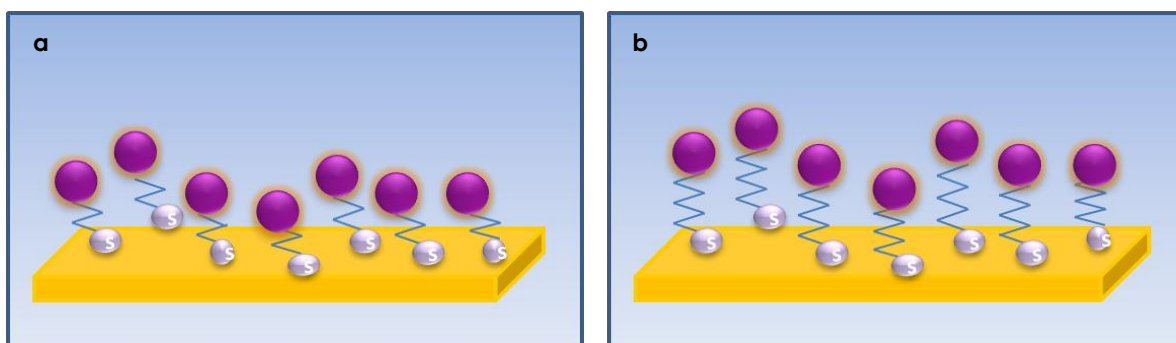


Figura 2.2.- Esquema de SAMs de a.- 3-COOH y b.- 6-COOH

Las SAMs simples y mixtas (Figura 2.3) cuyos extremos expuestos hacia la solución presenten grupos Fc y grupos COOH, se caracterizaron utilizando voltamperometría cíclica (CV), microscopía electroquímica de barrido (SECM), y SERS que permiten evaluar la estabilidad de la SAMs mixta, su composición y respuesta frente a la presencia de H_2O_2 .

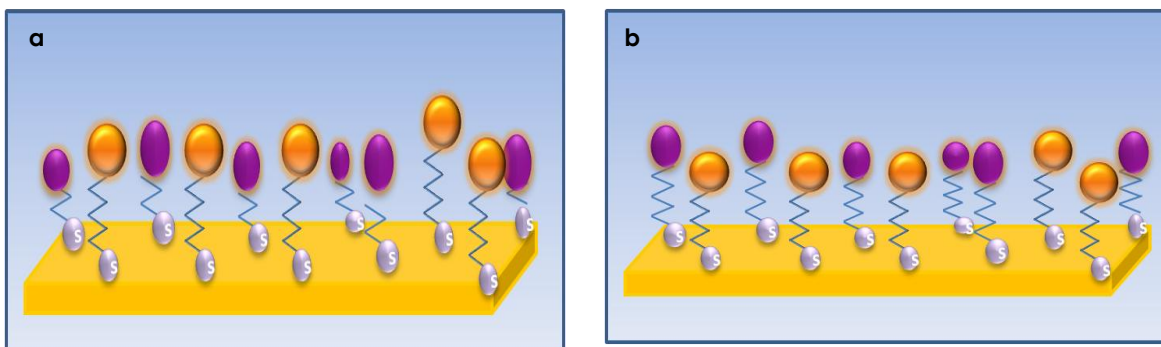


Figura 2.3.- Esquema de SAMs de a.- oro/3-COOH+Fc y b.- oro/6-COOH+Fc

Teniendo en cuenta la bibliografía asociada a este objetivo específico^{4,28,32,35-42}, los factores a ser evaluados para el diseño experimental están dados por:

- 👉 la naturaleza química (grupos funcionales, largo de cadena para formar la SAM, etc.) de los modificadores (ferroceno y Ni(II)) que condicionan la interacción con el sustrato sólido, y por lo tanto la estabilidad de la modificación, relacionada directamente con la adsorción específica de proteínas His tag y la detección electroquímica de la actividad biológica superficial,

- 👉 el pH y fuerza iónica de la solución que controlan la reactividad de los grupos funcionales (protonación/deprotonación) y la adsorción inespecífica de proteínas a través de interacciones electrostáticas,

- 👉 el grado de cubrimiento superficial que determina los cambios conformacionales de las proteínas adsorbidas y la orientación preferencial para poder mantener la capacidad de biorreconocimiento de las enzimas.

2.1.2.- Optimización de la interacción enzima-sustrato sólido de oro modificado

La estrategia de biofuncionalización propuesta, se basa en el principio originalmente utilizado para desarrollar la cromatografía IMAC, como se describió en el Capítulo 1⁴³⁻⁴⁵, utilizando la enzima recombinante His₆-RgDAAO. La DAAO

(E.C 1.4.3.3), es una flavoenzima descubierta por Krebs en 1935⁴⁶, que cataliza la oxidación de D-aminoácidos a sus correspondientes iminoácidos, los cuales son rápidamente hidrolizados a alfa-cetoácidos con la liberación de NH_4^+ y H_2O_2 ⁴⁷⁻⁵⁰.

En los últimos años, esta enzima ha recibido una creciente atención para cuantificar D-aminoácidos debido a que estudios recientes los han vinculado a distintas patologías. A modo de ejemplo, la D-serina tiene una importante función en el sistema nervioso central de los mamíferos y juega un rol fundamental en el proceso de aprendizaje y en el desarrollo de esquizofrenia y epilepsia⁵¹, el ácido D-aspártico regula la liberación de hormonas en las glándulas pituitarias, testiculares y pineales y se ha observado una disminución en la concentración de este aminoácido en el cerebro de pacientes con mal de Alzheimer⁵². Otros D-aminoácidos han sido relacionados con enfermedades renales y el envejecimiento⁵³. Por otro lado, los D-aminoácidos se utilizan como marcadores para determinar la actividad bacteriana y los procesos de fermentación en productos alimenticios⁵⁴. Además, nuevos avances utilizan a la DAAO en posibles terapias enzimáticas contra el cáncer^{47,55}.

La respuesta de esta enzima como parte de una superficie biofuncional depende fuertemente de su origen. Tradicionalmente, la más utilizada es la DAAO de riñón de cerdo (pkDAAO) que puede conseguirse comercialmente. Sin embargo, se ha comenzado a utilizar la de levadura (RgDAAO)^{38,56,57} que es más robusta frente a la perturbación superficial²² y puede modificarse por técnicas recombinantes^{46,57,58}. La expresión de la His₆-RgDAAO se realizó en el laboratorio del Dr. Javier Valdez Taubas, del CIQUIBIC, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Este procedimiento permitió, además, controlar la orientación de las enzimas adsorbidas y minimizar la perturbación conformacional causada por la adsorción. Finalmente, la His₆-RgDAAO como elemento de biorreconocimiento, representa un modelo genérico para una gran cantidad de enzimas óxidoreductasas cuya actividad biológica se vincula con la catálisis de reacciones que involucran la formación o consumo de H_2O_2 .

En todos los casos, se realizó un primer estudio de adsorción física utilizando His₆-RgDAAO sobre los sustratos modificados en ausencia de Ni(II), como punto de

partida en el diseño de las superficies biofuncionales. La Figura 2.4 muestra un esquema de las superficies biofuncionales formadas a partir de SAMs mixtas con grupos carboxilato y grupos ferroceno.

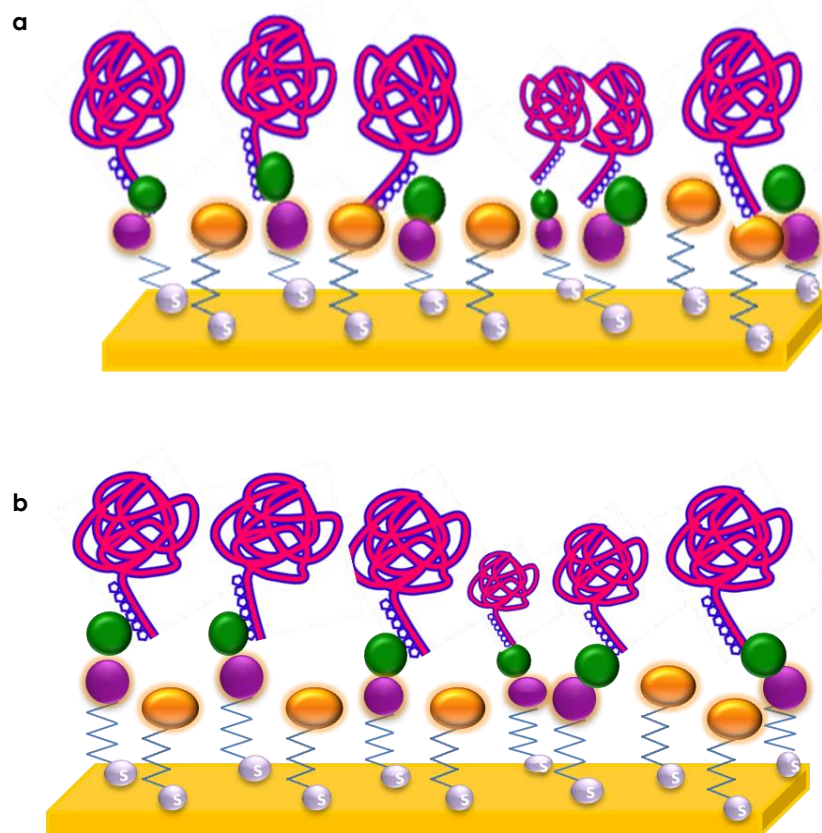


Figura 2.4.- Esquema de dos superficies biofuncionales de a.- oro/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO y b.- oro/6-COOH+Fc Ni(II)+His₆-RgDAAO.

Este primer estudio, permitió conocer las condiciones en las cuales se suprime/minimiza la adsorción inespecífica, que suele causar cambios estructurales en las enzimas y pérdida de la actividad biológica superficial. El proceso de adsorción-desorción se analizó mediante microbalanza de cristal de cuarzo con control de la disipación (QCM-D) en el laboratorio del Dr. Roberto Torresi, Instituto de Química, Universidad de San Pablo, Brasil, que permite evaluar las distintas etapas del mecanismo de adsorción. La fuerza de interacción enzima-sustrato se evaluó a partir de la desorción con distintos agentes específicos como el imidazol.

2.1.3.- Determinación de la actividad biológica superficial

Para la determinación de la actividad biológica superficial, existen fundamentalmente cuatro tipos de dispositivos: electroquímicos, ópticos, microgravimétricos y termométricos^{22,59}. Los métodos ópticos, particularmente aquéllos basados en determinaciones de fluorescencia, son los más sensibles aunque muy costosos⁶⁰. Por otro lado, debido a las ventajas propias de los métodos electroquímicos (rápidos, de bajo costo y simples), este tipo de detección es la más apropiada para sistemas convencionales^{61,6256,61,62}. Los métodos electroquímicos, han sido aplicados en aproximadamente el 50% de los sistemas con potenciales aplicaciones como biosensores, informados en la literatura. Una de las razones principales de la elección mayoritaria de las enzimas oxidorreductasas para construir superficies biofuncionales, se basa en el uso de métodos electroquímicos para la detección del evento de biorreconocimiento. Cuando se utilizan oxidasas, la detección electroquímica se basa principalmente en el consumo de O₂ o en la producción de H₂O₂, acoplado a la reacción enzimática⁶³⁻⁶⁵. En este trabajo, el evento de biorreconocimiento se determinó por amperometría, cuantificando el H₂O₂ formado, producto de la actividad catalítica de la His₆-RgDAAO. Para ello, se analizaron todas las siguientes modificaciones de sustratos: Au/n-COOH+Fc+Ni(II), Au/n-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO, Au/n-COOH+Fc+His₆-RgDAAO, Au/+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO y Au/n-COOH+Ni(II)+His₆-RgDAAO, frente al agregado de analito (D-alanina) para evaluar el efecto de la perturbación dada por la adsorción física y específica sobre la actividad superficial. Teniendo en cuenta que uno de los mayores inconvenientes de la detección electroquímica en presencia de esta enzima es la baja eficiencia de la reacción de transferencia de carga^{22,46,57}, con la presencia de grupos Fc adsorbidos, se buscó mejorar la detección del evento de biorreconocimiento superficial^{28,31,66-69}.

2.2.- Esquema general de la Tesis

Las superficies biofuncionales son el sustento de una gran cantidad de sistemas artificiales basados en la alta especificidad y selectividad de los sistemas biológicos. Los capítulos presentados a continuación proporcionan una descripción detallada del estudio realizado sobre "**Interacción enzima-sustrato modificado: diseño y desarrollo de superficies biofuncionales**".

En el Capítulo 3, se describen las diversas técnicas y condiciones experimentales empleadas durante el desarrollo de esta Tesis y se discuten los fundamentos y conceptos necesarios para la comprensión de los resultados presentados.

En el Capítulo 4, se presenta el comportamiento electroquímico de sustratos de Au(111), modificados con SAMs de Fc a partir del estudio de la respuesta voltamperométrica en diferentes electrolitos y su interpretación, utilizando modelos computacionales para ajustar los voltamperogramas cíclicos experimentales. Además, se analizaron los voltamperogramas cíclicos de las SAMs simples de 3-COOH y 6-COOH formadas sobre Au(111) y sus espectros SERS. A partir de los resultados obtenidos con las SAMs simples, se discutieron las respuestas de las SAMs mixtas de 3-COOH+Fc y 6-COOH+Fc formadas sobre Au(111).

En el Capítulo 5, se presenta el comportamiento electroquímico de sustratos de Au modificados con SAMs mixtas de Fc, 3-COOH y 6-COOH en distintos electrolitos para establecer las condiciones experimentales adecuadas para el desarrollo de la superficie biofuncional. Además se estudió la respuesta de las SAMs mixtas frente a la incorporación de sitios Ni(II).

En el Capítulo 6, se discute la expresión y caracterización del elemento de biorreconocimiento que comprende la expresión, purificación y caracterización de la enzima recombinante His₆-RgDAAO.

En el Capítulo 7, se presentan los resultados obtenidos en la QCM-D durante los procesos de adsorción de la His₆-RgDAAO y se plantea la tercera etapa en el diseño de una superficie biofuncional, que incluye la evaluación de la

biofuncionalidad superficial mediante la detección electroquímica de H₂O₂ en sustratos sólidos modificados y los mecanismos de adsorción de la His₆-RgDAAO.

En el Capítulo 8, se resumen las principales conclusiones de este trabajo de Tesis Doctoral junto a las perspectivas futuras.

2.3.- Referencias

1. Delamarche E, Delamarche BE, Michel B, Michel B, Biebuyck H a, Biebuyck H a. Golden Interfaces: The Surface of Self- Assembled Monolayers **. *Adv Mater.* 1996;(9):719-729. doi:10.1002/adma.19960080903.
2. Photochemie A. Formation of Ordered Two-Dimensional Gold Colloid Lattices. *J Phys Chem.* 1993:6334-6336. doi:10.1021/j100126a003.
3. Kang E, Park J, McClellan SJ, et al. Specific Adsorption of Histidine-Tagged Proteins on Silica Surfaces Modified with Ni / NTA-Derivatized Poly (ethylene glycol). *Langmuir.* 2007;(23):6281-6288. doi:10.1021/la063719e.
4. Mora MF, Valenti LE, García CD, Giacomelli CE. Driving Forces and Consequences of the Adsorption of Proteins to Carbon Nanotubes. *Key Eng Mater.* 2010;441:75-94. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.441.75.
5. Kasemo B. Biological surface science. *Surf Sci.* 2002;500(1-3):656-677. doi:10.1016/S0039-6028(01)01809-X.
6. Hong YK, Yu H, Lee TG, et al. Highly-ordered self-assembled monolayer of alkanethiol on thermally annealed polycrystalline gold films. *Chem Phys.* 2014;428:105-110. doi:10.1016/j.chemphys.2013.10.019.
7. Holmberg M, Hansen TS, Lind JU, Hjortø GM. Increased adsorption of histidine-tagged proteins onto tissue culture polystyrene. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2012;92:286-292. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.001.
8. Gadogbe M, Zhou Y, Alahakoon SH, et al. Structures and Conformations of Alkanedithiols on Gold and Silver Nanoparticles in Water. *J Phys Chem C.* 2015;119(32):18414-18421. doi:10.1021/acs.jpcc.5b05514.
9. Shin C, Shin W, Hong HG. Electrochemical fabrication and electrocatalytic characteristics studies of gold nanopillar array electrode (AuNPE) for development of a novel electrochemical sensor. *Electrochim Acta.* 2007;53(2):720-728. doi:10.1016/j.electacta.2007.07.040.

10. Astuti Y, Topoglidis E, Cass AG, Durrant JR. Direct spectroelectrochemistry of peroxidases immobilised on mesoporous metal oxide electrodes: Towards reagentless hydrogen peroxide sensing. *Anal Chim Acta*. 2009;648(1):2-6. doi:10.1016/j.aca.2009.06.031.
11. Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DMF, Vojinović V, Cabral JMS, Fonseca LP. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev*. 2003;9(03):199-247. doi:10.1016/S1387-2656(03)09003-3.
12. Ferreira AAP, Colli W, Alves MJM, et al. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T. cruzi by AFM and amperometric measurements. *Electrochim Acta*. 2006;51(24):5046-5052. doi:10.1016/j.electacta.2006.03.061.
13. Ahirwal GK, Mitra CK. Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(9):2016-2020. doi:10.1016/j.bios.2010.01.029.
14. Ferapontova E, Gorton L. Effect of pH on direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase. *Bioelectrochemistry*. 2002;55(1-2):83-87. doi:10.1016/S1567-5394(01)00158-X.
15. Razmute-Razme I, Kuodis Z, Eicher-Lorka O, Niaura G. SERS observation of soft C-H vibrational mode of bifunctional alkanethiol molecules adsorbed at Au and Ag electrodes. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(18):4564-4568. doi:10.1039/b921291d.
16. Gu HY, Yu AM, Chen HY. Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloid-cysteamine-modified gold electrode. *J Electroanal Chem*. 2001;516(1-2):119-126. doi:10.1016/S0022-0728(01)00669-6.
17. Garrett NL, Vukusic P, Ogrin F, Sirotkin E, Winlove CP, Moger J. Spectroscopy on the wing: Naturally inspired SERS substrates for biochemical analysis. *J Biophotonics*. 2009;2(3):157-166. doi:10.1002/jbio.200810057.
18. Wcisło M, Compagnone D, Trojanowicz M. Enantioselective screen-printed amperometric biosensor for the determination of d-amino acids. *Bioelectrochemistry*. 2007;71(1):91-98. doi:10.1016/j.bioelechem.2006.09.001.
19. Mena ML, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal Biochem*. 2005;336(1):20-27. doi:10.1016/j.ab.2004.07.038.
20. Ruan C, Yang R, Chen X, Deng J. A reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalently binding horseradish peroxidase and

- thionine using a thiol-modified gold electrode. *J Electroanal Chem.* 1998;455(1-2):121-125. doi:10.1016/S0022-0728(98)00153-3.
21. Du Roure O, Debiemme-Chouvy C, Malthête J, Silberzan P. Functionalizing surfaces with nickel ions for the grafting of proteins. *Langmuir.* 2003;19(10):4138-4143. doi:10.1021/la020636z.
 22. Valenti LE, Martins VL, Herrera E, Torresi RM, Giacomelli CE. Ni(ii)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins. *J Mater Chem B.* 2013;1(38):4921. doi:10.1039/c3tb20769b.
 23. Benelmekki M, Xuriguera E, Caparros C, et al. Design and characterization of Ni²⁺ and Co²⁺ decorated Porous Magnetic Silica spheres synthesized by hydrothermal-assisted modified-Stöber method for His-tagged proteins separation. *J Colloid Interface Sci.* 2012;365(1):156-162. doi:10.1016/j.jcis.2011.09.051.
 24. Padeste C, Grubelnik A, Tiefenauer L. Ferrocene-avidin conjugates for bioelectrochemical applications. *Biosens Bioelectron.* 2000;15(9-10):431-438. doi:10.1016/S0956-5663(00)00106-8.
 25. Peng Z, Qu X, Dong S. Co-assembly of ferrocene-terminated and alkylthiophene thiols on gold and its redox chemistry modulated by surfactant adsorption. *J Electroanal Chem.* 2004;563(2):291-298. doi:10.1016/j.jelechem.2003.09.022.
 26. Porter MD, Bright TB, Allara DL, Chidsey CED. Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 4. Structural Characterization of n-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared Spectroscopy, and Electrochemistry. *Jacs.* 1987;109(6):3559-3568. doi:10.1021/ja00246a011.
 27. Lee M, Chung C. Self-assembled monolayers of ferrocene-terminated thiol on gold: Reorientation induced by coadsorption of dodecanethiol [2]. *Bull Korean Chem Soc.* 1999;20(2):132-134.
 28. Rudnev A V, Yoshida K, Wandlowski T. Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on low-index gold single crystal electrodes. *Electrochim Acta.* 2013;87:770-778. doi:10.1016/j.electacta.2012.09.090.
 29. Ho MY, Li P, Estrela P, Goodchild S, Migliorato P. Detection of molecular interactions with modified ferrocene self-assembled monolayers. *J Phys Chem B.* 2010;114(32):10661-10665. doi:10.1021/jp104560e.
 30. Dubacheva G V, Van Der Heyden A, Dumy P, et al. Electrochemically controlled adsorption of Fc-functionalized polymers on β -CD-modified self-

- assembled monolayers. *Langmuir*. 2010;26(17):13976-13986. doi:10.1021/la102026h.
31. Balland V, Lecomte S, Limoges B. Characterization of the electron transfer of a ferrocene redox probe and a histidine-tagged hemoprotein specifically bound to a nitrilotriacetic-terminated self-assembled monolayer. *Langmuir*. 2009;25(11):6532-6542. doi:10.1021/la900062y.
 32. Valiokas R, Kienkar G, Tinazli A, et al. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: Characterization and application. *Langmuir*. 2008;24(9):4959-4967. doi:10.1021/la703709a.
 33. Wang CHK, Jiang S, Pun SH. Localized cell uptake of his-tagged polyplexes immobilized on NTA self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2010;26(19):15445-15452. doi:10.1021/la1025203.
 34. Luque AM, Mulder WH, Calvente JJ, Cuesta A, Andreu R. Proton transfer voltammetry at electrodes modified with acid thiol monolayers. *Anal Chem*. 2012;84(13):5778-5786. doi:10.1021/ac301040r.
 35. Laviron E. Surface linear potential sweep voltammetry. *Electroanal Chem Interfacial Electrochem*. 1974;52:395-402.
 36. Mulder WH, Calvente JJ, Andreu R. A kinetic model for the reductive desorption of self-assembled thiol monolayers. *Langmuir*. 2001;17(11):3273-3280. doi:10.1021/la001283b.
 37. Méndez De Leo LP, de la Llave E, Scherlis D, Williams FJ. Molecular and electronic structure of electroactive self-assembled monolayers. *J Chem Phys*. 2013;138(11):114707. doi:10.1063/1.4795575.
 38. Valenti LE, Herrera E, Stragliotto F, et al. Optimizing the Bioaffinity Interaction between His-Tag Proteins and Ni (II) Surface Sites. *Proteins Interfaces III State art*. 2012;(li):37-53. doi:10.1021/bk-2012-1120.
 39. Yokota Y, Yamada T, Kawai M. Ion-Pair Formation between Ferrocene-Terminated Self-Assembled Monolayers and Counteranions Studied by Force Measurements. *J Phys Chem C*. 2011;115(14):6775-6781. doi:10.1021/jp2001404.
 40. Van Staveren DR, Metzler-Nolte N. Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem Rev*. 2004;104(12):5931-5985. doi:10.1021/cr0101510.
 41. Qiu JD, Zhou WM, Guo J, Wang R, Liang RP. Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose. *Anal Biochem*. 2009;385(2):264-269. doi:10.1016/j.ab.2008.12.002.

42. Rouiller V, Clarke S, Changjiang Y, et al. High-affinity labeling and tracking of individual histidine-tagged proteins in live cells using Ni²⁺ tris-nitrilotriacetic acid quantum dot conjugates. *Nano Lett.* 2009;9(3):1228-1234. doi:10.1021/nl9001298.
43. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.* 1975;258(5536):598-599. doi:10.1038/258598a0.
44. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif.* 1992;3(4):263-281. doi:10.1016/1046-5928(92)90001-D.
45. Ley C, Holtmann D, Mangold KM, Schrader J. Immobilization of histidine-tagged proteins on electrodes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;88(2):539-551. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.044.
46. Herrera E. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos. *Tesis Dr.* 2013.
47. Pollegioni L, Molla G, Sacchi S, Rosini E, Verga R, Pilone MS. Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78(1):1-16. doi:10.1007/s00253-007-1282-4.
48. Pollegioni L, Porrini D, Molla G, Pilone MS. Redox potentials and their pH dependence of D-amino-acid oxidase of *Rhodotorula gracilis* and *Trigonopsis variabilis*. *Eur J Biochem.* 2000;267(22):6624-6632. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054115>.
49. Mora MF, Giacomelli CE, Garcia CD. Interaction of D-amino acid oxidase with carbon nanotubes: Implications in the design of biosensors. *Anal Chem.* 2009;81(3):1016-1022. doi:10.1021/ac802068n.
50. Cappelletti P, Piubelli L, Murtas G, et al. Structure-function relationships in human d-amino acid oxidase variants corresponding to known SNPs. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1854(9):1150-1159. doi:10.1016/j.bbapap.2015.02.005.
51. Chen Z, Huang W, Srinivas SR, Jones CR, Ganapathy V, Prasad PD. Serine racemase and D-serine transport in human placenta and evidence for a transplacental gradient for D-serine in humans. *J Soc Gynecol Investig.* 2004;11(5):294-303. doi:10.1016/j.jsjg.2004.02.003.
52. Hamase K, Morikawa A, Zaitso K. D-amino acids in mammals and their diagnostic value. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2002;781(1-2):73-91. doi:10.1016/S1570-0232(02)00690-6.

53. Chervyakov A V, Gulyaeva N V, Zakharova MN. D-amino acids in normal ageing and pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem J*. 2011;5(2):100-114. doi:10.1134/S1819712411020036.
54. Csapo J, Csapo-Kiss Z, Stefler J, Martin TG, Nemethy S. Influence of Mastitis on D-Amino Acid Content of Milk. *J Dairy Sci*. 1995;78:2375-2381. <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/78/11/2375>.
55. Bava A. d -amino acid oxidase – nanoparticle system : a potential novel approach for cancer enzymatic therapy R esearch A rticle. *Nanomedicine*. 2013;8(11):1797-1806.
56. Polcari D, Kwan A, Van Horn MR, et al. Disk-shaped amperometric enzymatic biosensor for in vivo detection of D-serine. *Anal Chem*. 2014;86(7):3501-3507. doi:10.1021/ac404111u.
57. Herrera E, Valdez Taubas J, Giacomelli CE. D-Amino acid oxidase bio-functionalized platforms: Toward an enhanced enzymatic bio-activity. *Appl Surf Sci*. 2015;356:679-686. doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.121.
58. Hou J, Jin Q, Du J, Li Q, Yuan Q, Yang J. A rapid in situ immobilization of D-amino acid oxidase based on immobilized metal affinity chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(5):857-864. doi:10.1007/s00449-013-1056-6.
59. Lata S, Batra B, Kumar P, Pundir CS. Construction of an amperometric d-amino acid biosensor based on d-amino acid oxidase/carboxylated mutliwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaliline modified gold electrode. *Anal Biochem*. 2013;437(1):1-9. doi:10.1016/j.ab.2013.01.030.
60. Raje VP, Morgado PI, Ribeiro MP, et al. Dual on-off and off-on switchable oligoaziridine biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2013;39(1):64-69. doi:10.1016/j.bios.2012.06.047.
61. Knopp D, Tang D, Niessner R. Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal Chim Acta*. 2009;647(1):14-30. doi:10.1016/j.aca.2009.05.037.
62. Calvente JJ, Luque AM, Andreu R, Mulder WH, José Luis O-S. Analytical Expressions for Proton Transfer Voltammetry: Analogy to Surface Redox Voltammetry with Frumkin Interactions. *Anal Chem*. 2013;85:4475+4482. doi:10.1021/ac303661g.
63. Aissaoui N, Bergaoui L, Boujday S, Lambert JF, Méthivier C, Landoulsi J. Enzyme immobilization on silane-modified surface through short linkers: Fate of interfacial phases and impact on catalytic activity. *Langmuir*. 2014;30(14):4066-4077. doi:10.1021/la404935q.

64. Mu X, Qiao J, Qi L, Liu Y, Ma H. Construction of a d-Amino Acid Oxidase Reactor Based on Magnetic Nanoparticles Modified by a Reactive Polymer and Its Application in Screening Enzyme Inhibitors. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014. doi:10.1021/am502901b.
65. Gulaboski R, Mirčeski V, Bogeski I, Hoth M. Protein film voltammetry: Electrochemical enzymatic spectroscopy. A review on recent progress. *J Solid State Electrochem*. 2012;16(7):2315-2328. doi:10.1007/s10008-011-1397-5.
66. Creager SE, Rowe GK. Competitive self-assembly and electrochemistry of some ferrocenyl-n-alkanethiol derivatives on gold. *J Electroanal Chem*. 1994;370(1-2):203-211. doi:10.1016/0022-0728(93)03173-M.
67. Fernández L, Carrero H. Electrochemical evaluation of ferrocene carboxylic acids confined on surfactant-clay modified glassy carbon electrodes: Oxidation of ascorbic acid and uric acid. *Electrochim Acta*. 2005;50(5):1233-1240. doi:10.1016/j.electacta.2004.08.016.
68. Rowe GK, Creager SE. Redox and Ion-Pairing Thermodynamics in Self - Assembled Monolayers. *Langmuir*. 1991;7(10):2307-2312. doi:10.1021/la00058a055.
69. Lee LYS, Sutherland TC, Rucareanu S, Lennox RB. Ferrocenylalkylthiolates as a probe of heterogeneity in binary self-assembled monolayers on gold. *Langmuir*. 2006;22(9):4438-4444. doi:10.1021/la053317r.



Capítulo 3

Materiales y métodos: sustratos sólidos de oro

“De eso se trata, de coincidir con gente que te haga ver cosas que tú no ves. Que te enseñen a mirar con otros ojos”.

M. Benedetti

3.1.- Materiales

3.1.1.- Sustratos sólidos

Los soportes físicos sobre los que se forman las SAMs se denominan comúnmente como "sustratos". Estos sustratos varían desde superficies planas como pueden ser vidrio, silicio o películas metálicas hasta nanoestructuras altamente curvas como por ejemplo los coloides o nanocristales^{1,2}.

Se conocen numerosas variantes de SAMs sobre sustratos metálicos dependiendo de la combinación entre el bloque molecular, como por ejemplo alcoxisilanos o alcanotioles, y el tipo de sustrato. Entre ellas, las SAMs de alcanotioles sobre oro han sido y son las más estudiadas debido que son consideradas sistemas simples y sencillos de preparar, características que las hacen atractivas para su uso en el laboratorio³⁻⁷.

3.1.1.1.- Sustratos sólidos de oro policristalino (Au) y monocristalino (Au(111))

El oro es un metal con un característico color amarillo brillante. Existen muchas razones por las cuales se elije este metal como sustrato, entre las que se pueden destacar³:

- ✓ Tiene la mayor maleabilidad y ductilidad de todos los metales nobles.
- ✓ Es un metal inerte, no es afectado por el aire, agua, compuestos ácidos (excepto por la mezcla HNO₃/HCl) ni alcalinos. El oro no se oxida a temperaturas por debajo de su punto de fusión (1064,4°C) y tampoco reacciona con el O₂ atmosférico. Estas propiedades hacen posible manejar y manipular muestras de este metal bajo las condiciones atmosféricas en lugar de utilizar ultra alto vacío.
- ✓ Se puede conseguir de forma sencilla.
- ✓ Permite preparar SAMs de forma simple. Los tioles se unen al oro con alta afinidad formando SAMs estables durante periodos de días o semanas.
- ✓ Es compatible con muchas técnicas de análisis superficial.

✓ La toxicidad del oro es relativamente baja frente a las células, es decir, las células pueden adherirse y funcionar en superficies de oro.

Un cristal consiste en un arreglo de átomos, moléculas o iones dispuestos según un patrón que se repite periódicamente, dando lugar a una red cristalina. De acuerdo al modo en el cual crece ese arreglo periódico, los cristales pueden ser mono o policristalinos. En un monocristal, la red cristalina se repite sin interrupciones a lo largo de toda la muestra y se extiende hasta dimensiones macroscópicas. Cualquier superficie expuesta de un monocristal, corresponde a uno de los planos de la red en la cual cristaliza el sólido y sus propiedades están determinadas por un único patrón (red bidimensional). Por otra parte, un material policristalino se compone de una multitud de monocristales microscópicos, denominados granos (o cristalitas), de distintos tamaños, orientados en todas las direcciones posibles. En consecuencia, la superficie de los policristales muestra un promedio de las diferentes propiedades que poseen los distintos planos. Por esta razón, los policristales son estructuras bastante complejas que presentan, en general, características razonablemente reproducibles sólo cuando las condiciones de preparación se controlan rigurosamente^{8,9}.

Como muchos metales, el oro cristaliza con un empaquetamiento cúbico centrado en las caras (fcc). En este caso, las superficies energéticamente más estables son las que resultan en los índices de Miller (111), (100) y (110) con redes bidimensionales hexagonal, cuadrada y rectangular, respectivamente. En particular, el plano (111) es el más importante en relación al estudio de SAMs de tioles ya que no sólo es una superficie estable, sino también presenta la mayor densidad atómica. Por ello, las SAMs de tioles sobre esta superficie son las que presentan el mayor empaquetamiento posible¹⁰⁻¹².

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se trabajó con sustratos de oro monocristalino (Au(111)) y policristalino (Au). Los sustratos de Au(111) fueron adquiridos comercialmente a la firma Arrandee® de Werther, Alemania. Los mismos se prepararon por evaporación de oro sobre vidrio borosilicato "Robax". Puesto que la adherencia del oro al vidrio no es buena, el fabricante deposita una capa intermedia de cromo de 1 a 4 nm de espesor para lograr una mejor

adhesión del oro al soporte de vidrio. Las placas son de 11 mm x 11 mm y el espesor de la película de oro informado es de 250 ± 50 nm (Figura 3.1).

Los sustratos de Au fueron electrodos adquiridos comercialmente a la firma CH Instruments de Austin, Estados Unidos: alambres de Au montados en un cilindro de teflón que deja expuesta un área circular de $0,03$ cm² (Figura 3.2). También se trabajó con láminas de Au de 99,99% de 0,30 mm de espesor de 0,50 cm x 1,50 cm (Figura 3.3).

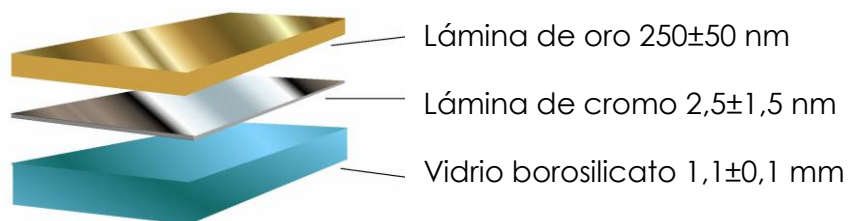


Figura 3.1.- Disposición de las capas que componen el sustrato de Au(111) y sus respectivos espesores (imagen modificada de la publicada por Arrandee® en <http://www.arrandee.com>)



Figura 3.2.- Electrodos comerciales de Au.
(imagen tomada de la publicada por CHinstrument en <http://www.chinstruments.com>)



Figura 3.3.- Láminas de Au.

3.1.2.- Reactivos y Soluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico: NaOH, KOH, MgSO₄, KH₂PO₄ y K₂HPO₄ (Baker), NaClO₄ y NaBH₄ (Tetrahedron), HClO₄ (Merck), H₂SO₄ y HNO₃ (Cicarelli), KClO₄ (Carlo Erba), CH₂Cl₂, y C₂H₅OH absoluto (Dorwil), C₅H₅N

(Anedra), NaCNBH_3 (Fluka), $\text{C}_3\text{F}_3\text{N}_3$, $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FeO}$ (ferroceno aldehído: FcCHO), $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FeO}$ (ferroceno metanol: FcMeOH), ácido 3-mercaptopropionico (3-COOH) y ácido 6-mercaptohexanoico (6-COOH) (Aldrich), $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FeO}_2$ (ferroceno carboxílico: FcCOOH), $\text{C}_2\text{H}_7\text{NS}$ (cisteamina: cyst), $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{FeS}$ (6 ferrocenil hexanotiol: Fc) (Sigma), Alúmina 1 μM y 0,05 μM (Prazis) y paño de pulido Microcloth Plain Back 10 weel Buehler Oil/Water Resistant Adhesive Black (Buehler). Las soluciones acuosas se prepararon con agua deionizada de resistencia 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ (Milli Q).

3.2.- Métodos

A lo largo del presente trabajo de Tesis Doctoral, se utilizaron distintas metodologías experimentales que permitieron la caracterización de los sustratos modificados, estudiar el proceso de adsorción de proteínas y evaluar la bioactividad superficial. En particular, se usaron técnicas electroquímicas (voltamperometría cíclica y amperometría), microscópicas (electroquímica de barrido y Raman aumentada por la superficie) y de superficie (microbalanza de cristal de cuarzo con control de la disipación).

Todas las mediciones electroquímicas, se realizaron, ya sea con un potenciostato CH Instrument 760C o con un Autolab PGSTAT101 empleando una celda electroquímica de tres electrodos que permite variar arbitrariamente el potencial entre el electrodo de trabajo (ET) y el de referencia (ER). El contraelectrodo (EC) es el tercer electrodo involucrado y se utiliza para balancear la corriente que circula por el ET^{10,13,14}. Las mediciones se realizaron dentro de una caja metálica que actúa como jaula de Faraday. Los experimentos de microscopía Raman se realizaron con los sustratos de Au(111) modificados con SAMs, en un espectrómetro Raman Horiba - Jobin Yvon acoplado con un microscopio confocal con láser de ión argón ($\lambda = 514 \text{ nm}$) y de helio/neón ($\lambda = 632 \text{ nm}$). Los espectros se tomaron desde 100 cm^{-1} hasta 1800 cm^{-1} , utilizando objetivos 10X. Cada espectro se corrigió por la línea de base y por el blanco de Au(111) sin modificar. Para las mediciones de microscopía

electroquímica de barrido (SECM: *Scanning Electrochemical Microscopy*), se empleó un bipotenciostato Heka PG340 y 2 posicionadores XYZ. El primero es para el control “grueso” de la posición, consta de 3 motores de paso (TLA28-M Zaber) con longitudes de barrido de 28 mm y resoluciones de 0,1 μm , los que accionan sendas plataformas de traslación (TSB28-M, Zaber). El segundo, para el posicionamiento “fino”, consiste en un piezoeléctrico o nanoposicionador de 3 ejes (Nanocube P-611.3S, Physic Instrumente), con longitud de barrido máxima de 100 μm y resolución de 2 nm cada uno. Las mediciones se realizaron dentro de una caja metálica que actúa como jaula de Faraday, estando la celda y el posicionador montado sobre un soporte antivibratorio, con lo cual se filtran la mayor parte de los ruidos electromagnéticos y vibracionales. Este equipo, se encuentra instalado en el PRELINE, Programa de Electroquímica Aplicada e Ingeniería Electroquímica, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe. Las determinaciones experimentales y discusión de resultados se realizaron bajo la dirección del Dr. José L. Fernández. Los experimentos de microbalanza de cristal de cuarzo con control de la disipación (QCM-D), se realizaron con un equipo Q-Sense E4 en una celda de flujo instalado en el Laboratorio de Materiales Electroactivos del Instituto de Química de la Universidad de San Pablo, Brasil. Las determinaciones experimentales y discusión de resultados se realizaron bajo la dirección del Dr. Roberto Torresi.

3.2.1.- Fundamentos de las técnicas utilizadas

3.2.1.1.- Voltamperometría cíclica (CV)

La CV, es una técnica electroquímica simple que permite obtener información en segundos. A través de la CV se estudian las propiedades redox de compuestos químicos y de estructuras de la interface electrodo/solución. Es una herramienta adecuada para determinar los potenciales redox formales, para la detección de reacciones químicas que preceden o siguen a una reacción electroquímica y para la evaluación de la cinética de transferencia de carga^{15,16}. En general, con las técnicas electroquímicas se estudian los procesos y factores

que afectan el transporte de carga a través de la interface entre un conductor electrónico (un electrodo) y un conductor iónico (un electrolito). La carga es transportada a través del electrodo por el movimiento de electrones (y huecos), mientras que en el electrolito el transporte de carga se realiza por el movimiento de los iones¹⁶. En los electrodos ocurren dos tipos de procesos^{10,17}. Uno de ellos, comprende reacciones en las que las cargas, por ejemplo electrones, son transferidas a través de la interface metal-solución, causando la oxidación o la reducción de las especies cercanas a la superficie metálica. Dado que estas reacciones están gobernadas por la ley de Faraday, estos procesos se denominan faradaicos. El segundo tipo de proceso, está vinculado con la adsorción o desorción de especies o con cambios en la estructura de la interface electrodo/solución dados por la variación del potencial o de la composición de la solución. Estos procesos se llaman no faradaicos y dan origen a la denominada corriente de doble capa o corriente capacitiva^{10,18}, cuya magnitud refleja la distribución de iones en el lado de la solución de las interfaces electrodo/solución. Ambos procesos ocurren en condiciones en las cuales se produce la oxidación o reducción de especies. Sin embargo, bajo algunas condiciones, la interface electrodo/solución muestra un intervalo de potenciales donde no ocurren procesos faradaicos porque las reacciones de transferencia de carga no son favorables termodinámica o cinéticamente^{10,19}.

La CV consiste en variar de una manera cíclica el potencial aplicado (E) al ET inmerso en una solución electrolítica quiescente y medir la intensidad de corriente (i) resultante^{10,15,19}. El valor de E varía linealmente a una determinada velocidad (v) y es barrido entre dos valores designados ($v = \Delta E/\Delta t$)¹⁰, dando lugar a una curva de barrido triangular (Figura 3.4 a). Los voltamperogramas cíclicos completos están formados por las ondas anódicas (oxidación) y catódicas (reducción), como se muestra en la Figura 3.4 b. En los voltamperogramas cíclicos, se representa i vs. E y brindan información acerca de la naturaleza de las especies en solución, del comportamiento del electrodo en ese medio y de las reacciones que ocurren en las interfaces. Estos procesos no sólo dependen de un gran número de parámetros fisicoquímicos sino también de v, que puede variar desde unos cuantos milivoltios por segundo hasta cientos de voltios por segundo.

En particular, la Figura 3.4 b muestra la respuesta típica para un proceso controlado por difusión reversible de una cupla redox desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo durante un ciclo de barrido completo. En estas condiciones, la forma reducida R está presente inicialmente en solución y se hace un barrido en sentido positivo para obtener el primer medio ciclo. A medida que E se aproxima al potencial característico de la cupla redox, el valor de i anódica comienza a aumentar hasta que se alcanza un valor máximo. La presencia de este máximo, se debe a que el proceso de difusión no es lo suficientemente rápido para compensar el consumo de la especie R durante la oxidación. Por lo tanto, el valor de i de este máximo depende de v (Figura 3.4 c) que, en el caso particular de un proceso difusional reversible, es proporcional a su raíz cuadrada (Figura 3.4 d) y este comportamiento es predicho por la ecuación de Randles-Sevick¹⁰. Una vez que tiene lugar el proceso de oxidación, la dirección del barrido de potencial se revierte y las especies oxidadas O (generadas en el primer medio ciclo y acumuladas cerca de la superficie) son nuevamente reducidas. En este punto aparece la onda catódica, cuyo máximo se encuentra desplazado 59 mV respecto de la onda anódica para un proceso difusional reversible de un electrón a 25 °C. En resumen, los parámetros que definen el comportamiento de la cupla redox a una dada v , son los potenciales de los respectivos picos anódico (E_o) y catódico (E_r), sus correspondientes intensidades de corriente, así como la diferencia entre ambos potenciales y la dependencia de i con v . Es decir, se pueden definir criterios de diagnóstico para caracterizar el proceso de transferencia de carga a partir del perfil i -E medido experimentalmente. Por otra parte, dado que el número de electrones transferido está relacionado estequiométricamente con la reacción electroquímica, se puede calcular la carga total (Q_T) que circula por el circuito a partir de la integración de las ondas anódicas y/o catódicas. Finalmente, en la Figura 3.4 b, también pueden observarse las zonas de potencial donde sólo ocurren procesos no faradaicos, estas zonas están comprendidas entre -0,300 V y -0.100 V. En consecuencia, como resultado de los estudios con CV se obtiene información acerca del potencial redox, las velocidades de las reacciones electroquímica y la concentración de especies electroactivas. Además, es posible distinguir entre los procesos

relacionados con especies adsorbidas sobre el ET y los debidos a especies en solución, siendo posible analizar la reversibilidad o irreversibilidad de los procesos de transferencia electrónica, el número de electrones transferidos, los coeficientes de difusión y las constantes de velocidad, entre otros parámetros^{15,16}.

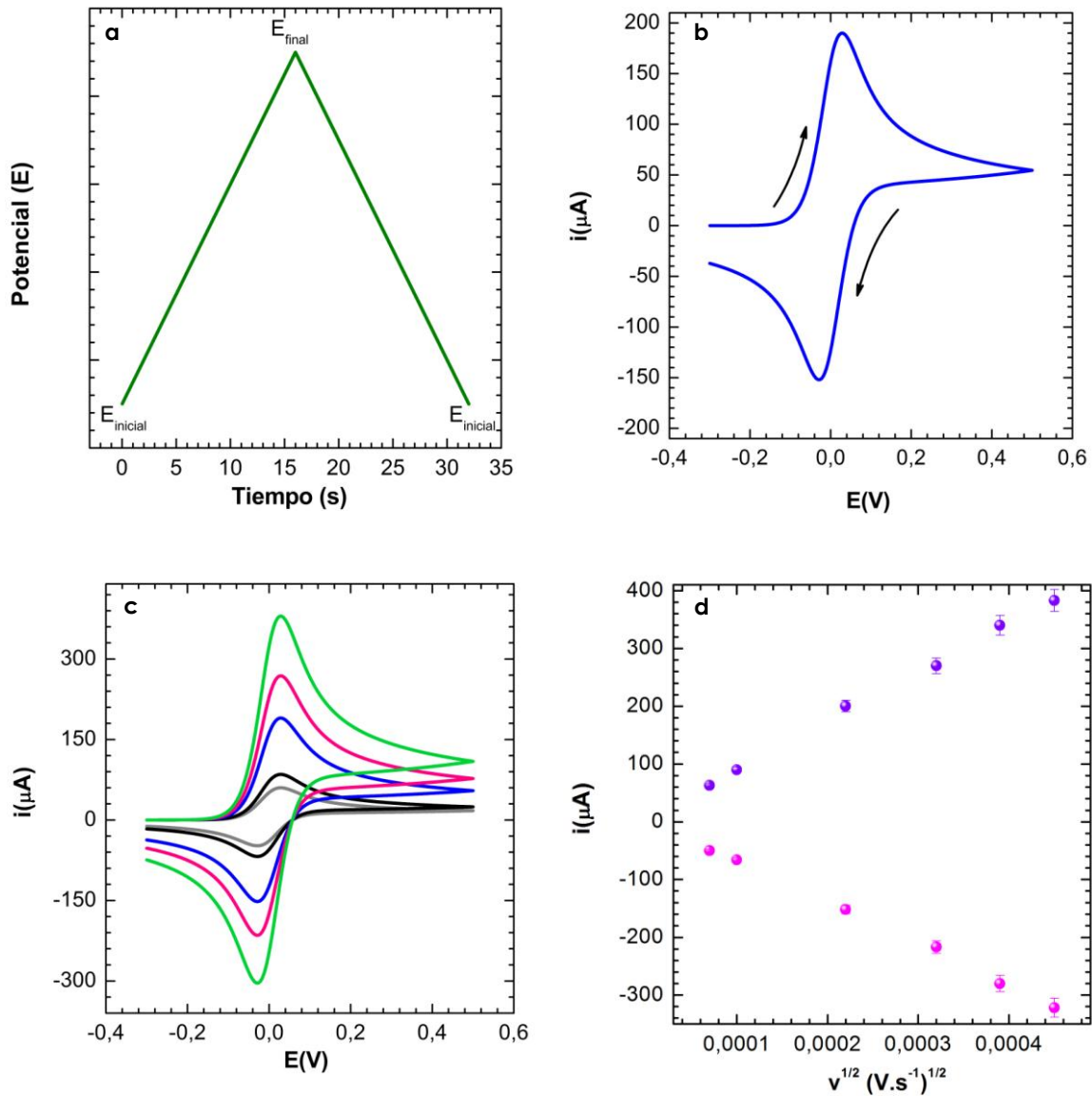


Figura 3.4 a.- Programa de potencial aplicado al ET, b.- Voltamperograma cíclico simulado para un proceso difusional reversible de un electrón a 25 °C, c.- Voltamperogramas cíclicos simulado para un proceso difusional reversible de un electrón a 25 °C a distintas velocidades de barrido (v): 0,005 $V \cdot s^{-1}$ (—) 0,010 $V \cdot s^{-1}$ (—), 0,050 $V \cdot s^{-1}$ (—), 0,100 $V \cdot s^{-1}$ (—) y 0,200 $V \cdot s^{-1}$ (—) y d.- Intensidad de corriente (i) anódica (violeta) y catódica (rosa) en función de $v^{1/2}$.

También se puede realizar CV con especies redox adsorbidas²⁰⁻²⁸, tal es el caso de la mayoría de los resultados de esta Tesis Doctoral, en la cual se trabajó principalmente con especies electroactivas adsorbidas sobre los sustratos de Au y Au(111). Para estos sistemas, los criterios de diagnóstico para caracterizar el proceso de transferencia de carga a partir del perfil i - E medido experimentalmente son diferentes que para las especies redox en solución^{10,17}. Cuando el proceso de transferencia de carga es reversible, el centro redox se encuentra directamente adsorbido al ET y no existen interacciones laterales entre las especies adsorbidas, las intensidades de corriente del proceso de oxidación y reducción tienen el mismo valor, la diferencia entre los valores de E_o y E_r es igual a cero y los valores de i son directamente proporcionales a v (Figura 3.5 a, b y c)^{4,14-16}. El grado de cubrimiento de las especies adsorbidas (θ) en función de E (Figura 3.5 d) muestra que la fracción de la especie adsorbida en su forma reducida R disminuye a medida que avanzamos hacia E más positivos para formar la especie oxidada O . Cuando el potencial aplicado es igual a E_o , sobre la superficie se encuentra la misma fracción de las especies R y O . Al finalizar el barrido anódico, se observa que la reducción de la especie O da lugar a la misma distribución de especies debido a la reversibilidad del proceso.

En ocasiones, las formas de los Voltamperogramas cíclicos son distintas a las que se esperan para sistemas reversibles^{23,26}. En la Figura 3.6 a y b, se muestra un perfil i - E y su correspondiente θ - E para especies redox adsorbidas directamente al electrodo y sin interacciones laterales cuya reacción electroquímica es cuasi-reversible. A diferencia de la Figura 3.5 d, se puede observar que para la especie adsorbida en su forma reducida R se produce histéresis entre el barrido positivo y el negativo. A medida que se avanza en E , aparecen las especies oxidadas O aunque la distribución de especies en la superficie es diferente al caso del proceso reversible. El valor de E en el cual se encuentra la misma fracción de las especies R y O no coincide para ambos barridos debido a que el proceso electroquímico es cuasi-reversible. Esta diferencia se hace más notable en cuanto la reacción es menos reversible.

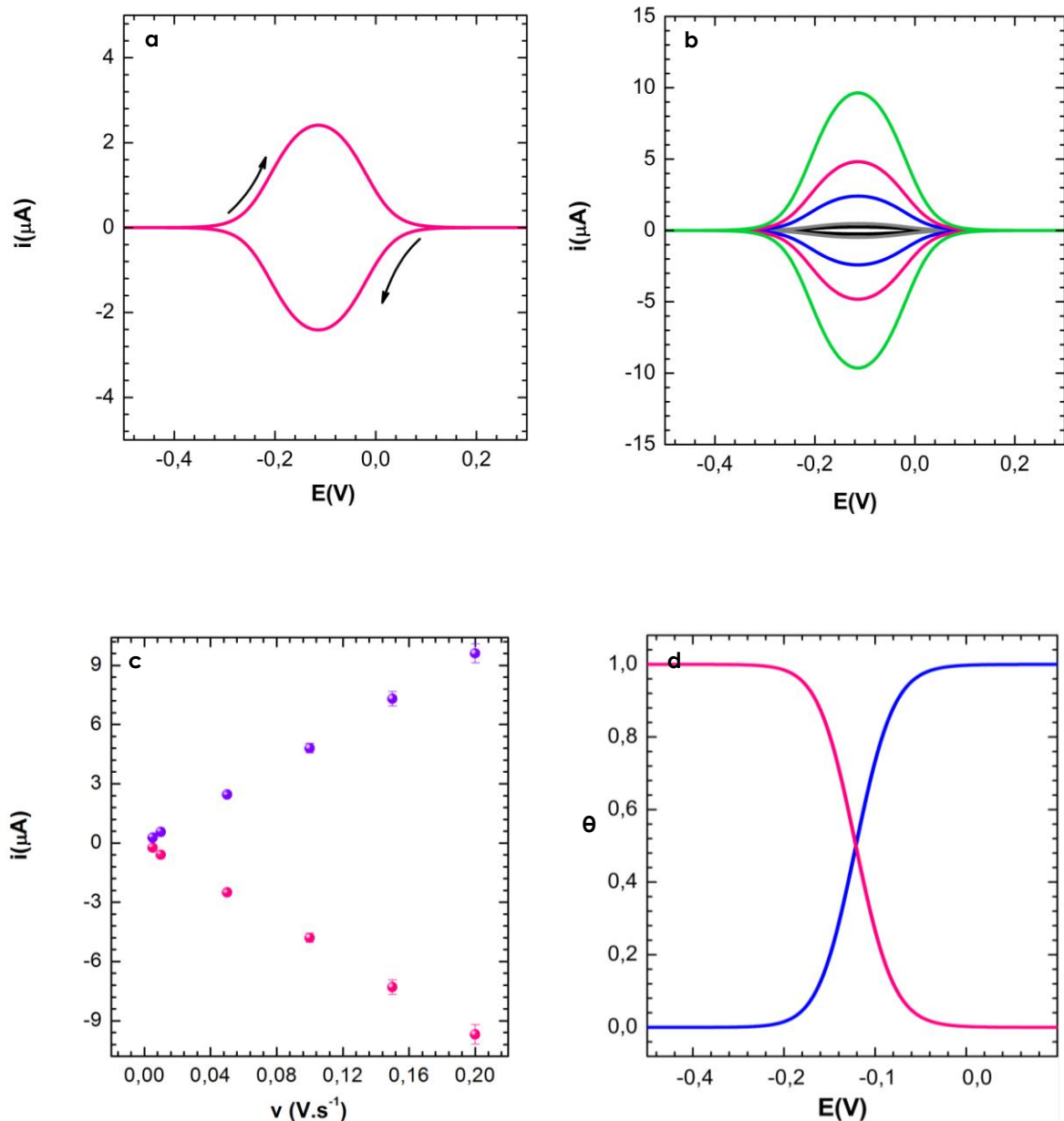


Figura 3.5 a.- Voltamperogramas cíclicos simulados para especies redox adsorbidas directamente al ET sin interacciones laterales, b.- Voltamperogramas cíclicos simulados para especies redox adsorbidas directamente al ET sin interacciones laterales a distintas v : $0,005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—), $0,010 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—), $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—), $0,100 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—) y $0,200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—), c.- i anódica y catódica en función de v y d.-Grado de cubrimiento superficial (θ) calculado para las especies adsorbidas reducidas (—) y oxidadas (—) en función del potencial aplicado (E) cuando la reacción es electroquímicamente reversible.

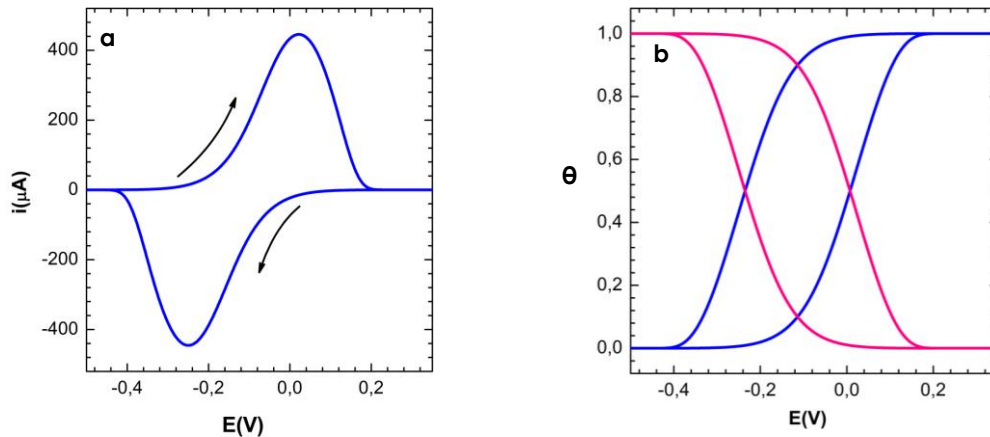


Figura 3.6 a.- Voltamperogramas cíclicos simulados para especies adsorbidas directamente al ET sin interacciones laterales, b.- Grado de cubrimiento superficial (θ) calculado para las especies adsorbidas reducidas (—) y oxidadas (—) durante la CV cuando la reacción es electroquímicamente cuasi-reversible.

A lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral, se utilizó CV con distintos propósitos: estudiar el proceso de transferencia de carga de especies adsorbidas (SAMs de ferroceno y mixtas), evaluar el grado de cubrimiento superficial de esas especies y establecer el potencial de trabajo para las determinaciones amperométricas.

3.2.1.2.- Amperometría

La amperometría es una técnica ampliamente utilizada para determinaciones electroanalíticas que permite medir la i que circula por el circuito cuando se aplica un determinado E entre el ET y el ER^{10,29}. Para tener una utilidad analítica, i debe ser una función conocida (generalmente lineal) de la concentración de un analito electroactivo que se desee cuantificar^{10,30}. Esto se logra cuando se trabaja en condiciones donde la difusión es el único mecanismo de transporte del analito. En este caso, se determina una "corriente límite" que es directamente proporcional a la concentración del analito. Experimentalmente, se utiliza una celda con agitación para lograr condiciones de convección forzada, aplicando un potencial en el cual se oxida o reduce el analito que se agrega una

vez establecida la línea de base. La respuesta se mide siguiendo el transitorio de corriente hasta llegar al valor de i estacionario.

La amperometría es uno de los métodos más usados para determinar la concentración de analitos con biosensores electroquímicos³¹⁻³³. Además, puede utilizarse para determinar la actividad de enzimas oxidorreductasas (a través de la producción de peróxido o el consumo de oxígeno) tanto en solución como en superficies biofuncionales³⁴⁻³⁸.

En este trabajo de Tesis Doctoral, se evaluó por amperometría la actividad enzimática de la His₆-RgDAAO nativa y adsorbida por interacciones físicas y de bioafinidad. En estos experimentos, se determinó la respuesta de los sustratos de Au antes y después de la modificación con SAMs simples de grupos carboxilato y con SAMs mixtas en presencia y ausencia de la His₆-RgDAAO adsorbida frente al agregado de distintas concentraciones de H₂O₂ y D-alanina. Estos analitos fueron seleccionados ya que la D-alanina es sustrato de la enzima y se produce H₂O₂ durante el proceso de oxidación. Para determinar la actividad enzimática de la His₆-RgDAAO nativa se utilizaron sustratos sólidos de Au modificados con SAMs simples y mixtas de ferroceno y carboxilatos tiolados. Estos sustratos modificados, fueron incubados con soluciones de la enzima de 0,10 mg.mL⁻¹ a pH 8,50 durante 2 horas. Las medidas se llevaron a cabo en una celda convencional electroquímica con agitación de tres electrodos, como ET se utilizó la superficie biofuncional, Ag/AgCl/KC_(sat) como ER y un alambre de platino como CE, sumergidos en solución reguladora de pH 8,50 (BF). Para determinar la señal de corriente producida por el H₂O₂ formado a partir de la reacción enzimática se adicionó distintas concentraciones de D-alanina trabajando a 0,200 V y -0,200 V. Para realizar las curvas de calibración, se inyectaron distintas alícuotas de una solución de H₂O₂ y se determinaron los cambios en la señal de corriente medidas a 0,200 V y -0,200 V en una celda electroquímica convencional con agitación.

3.2.1.3.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)

La SECM, es una técnica electroquímica que actualmente se utiliza de manera muy frecuente para el estudio de una gran variedad de procesos que demandan alta resolución espacial y temporal³⁹. Estos procesos abarcan reacciones electroquímicas, reacciones químicas heterogéneas y en solución, reacciones enzimáticas, procesos de transporte a través de interfaces (lipídicas, líquido-líquido, membranas celulares, etc.), entre muchos otros^{39,40}. Sus inicios datan de principios de la década del 90, y sus campos de aplicación se han incrementado casi exponencialmente en los últimos años^{25,39-42}. La técnica, se basa en el monitoreo de procesos con transferencia de electrones que ocurren en un microelectrodo ubicado en el extremo de una punta (o tip) cuando se acerca a un sustrato que se desea analizar^{10,39}. Dependiendo del tipo de control que se ejerza tanto sobre el tip como sobre el sustrato, pueden originarse un gran número de modos de operación del SECM³⁹.

El más común, y el que será usado en este trabajo, es el conocido como “Modo *feedback*”, el cual dio origen a la técnica propiamente dicha⁴³ ya que la demostración del fenómeno fue un factor detonante para la posterior búsqueda de potenciales aplicaciones y para la subsiguiente producción comercial del instrumento³⁹. En este modo de operación, que se esquematiza en la Figura 3.7 a, b y c, se monitorea la corriente del tip (i_T) causada por una reacción producida por una sonda redox ($O + e^- \rightarrow R$) en solución a medida que el tip se acerca al sustrato. El aspecto más importante, es que el sustrato regenera el reactivo O a una dada velocidad, generándose una retroalimentación (o *feedback*) local de esta especie y estableciéndose un circuito O/R en el espacio (d) entre el tip y el sustrato.

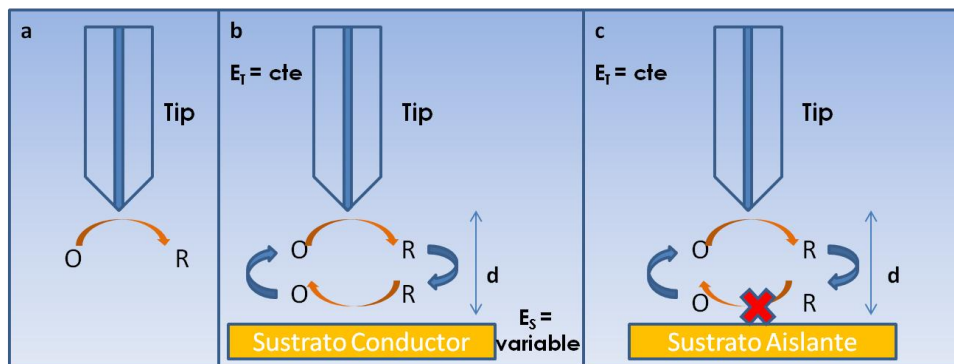


Figura 3.7.- Respuesta de la sonda redox ($O \rightarrow R$) sobre el tip a un potencial constante (E_T) a.- lejos del sustrato, b.- a una distancia (d) cercana a un sustrato conductor (*feedback* positivo) y c.- a una distancia (d) cercana a un sustrato aislante (*feedback* negativo).

En realidad puede haber muchas variantes, según cual sea el tipo de control de potencial que se aplique tanto sobre el tip como sobre el sustrato. La situación más típica consiste en utilizar la reacción redox bajo control difusional, es decir a un potencial del tip (E_T) constante, tal que se establezca la corriente límite difusional ($i_T = i_L$) dada por la sonda redox (Figura 3.7 a). Esta señal difiere de un macroelectrodo porque es un microelectrodo y la difusión no es lineal sino hemisférica^{16,39}. En este caso, al acercarse el tip al sustrato, i_L se verá incrementada si el sustrato regenera a la especie O a alta velocidad produciendo una retroalimentación positiva (conocida como *feedback* positivo), como se indica en la Figura 3.7 b. Por otro lado, i_L se verá disminuida si el sustrato no regenera a la especie O (conocida como *feedback* negativo), como se indica en la Figura 3.7 c, ya que en este caso el sustrato bloquea la difusión de O hacia el tip. En realidad, la magnitud del incremento de i_L por regeneración local de la especie O dependerá de la velocidad de reacción en el sustrato, la cual se ve afectada por E_s y por la constante cinética de la reacción. La dependencia i_L (potencial del sustrato (E_s), d) resultará una situación intermedia entre los casos extremos que se dan cuando la reacción en el sustrato opera bajo control difusional (*feedback* positivo total) y cuando la velocidad de reacción en el sustrato es nula (*feedback* negativo), y contiene información sobre el mecanismo y la cinética de la reacción en el sustrato.

De esta manera, i_L es una medida indirecta de la velocidad de regeneración de la sonda redox en el sustrato y puede utilizarse para calcular la/s constante/s de velocidad de reacción de transferencia de carga (a partir de un adecuado modelado de los procesos cinético-difusional). En este caso, se analiza la dependencia de i_L tanto con el potencial del sustrato (E_s) como con d . Cabe mencionar que, además de las posibilidades mencionadas, existen numerosas variantes de esta disposición diseñadas para analizar problemas específicos^{44,45}, como por ejemplo el estudio de reacciones químicas acopladas al procesos redox, o el análisis cinético de reacciones en el tip mediante dependencias $i_T(E_T, d)$.

Un gráfico de i_T vs. la distancia recorrida por el tip (z), se denomina curva de aproximación y permite monitorear el acercamiento del tip al sustrato y calcular con exactitud su distancia d . En algunos casos también permite obtener información sobre la constante de transferencia de carga del sistema. En estas curvas, z varía desde un valor z_0 , donde el tip y el sustrato no interactúan entre ellos, hacia valores positivos en los cuales el tip se acerca al sustrato. La Figura 3.8 a, muestra las curvas de aproximación típicas para un sustrato conductor donde la velocidad de regeneración de la especie redox opera bajo control difusional, y uno aislante que bloquea la difusión de la especie redox hacia el tip. Estas curvas se suelen presentar en forma adimensional como $I = i_T/i_{T,\infty}$ vs. $L = d/a$, donde $i_{T,\infty}$ es el valor de i_L a distancia infinita del sustrato y a es el radio del tip, tal como se muestra en la Figura 3.8 b. El ajuste de estas curvas de aproximación con ecuaciones semiempíricas que tienen en cuenta la geometría del tip permite establecer la dependencia $I(L)$ para el tip utilizado y así determinar la distancia tip-sustrato a partir de la medición de I .

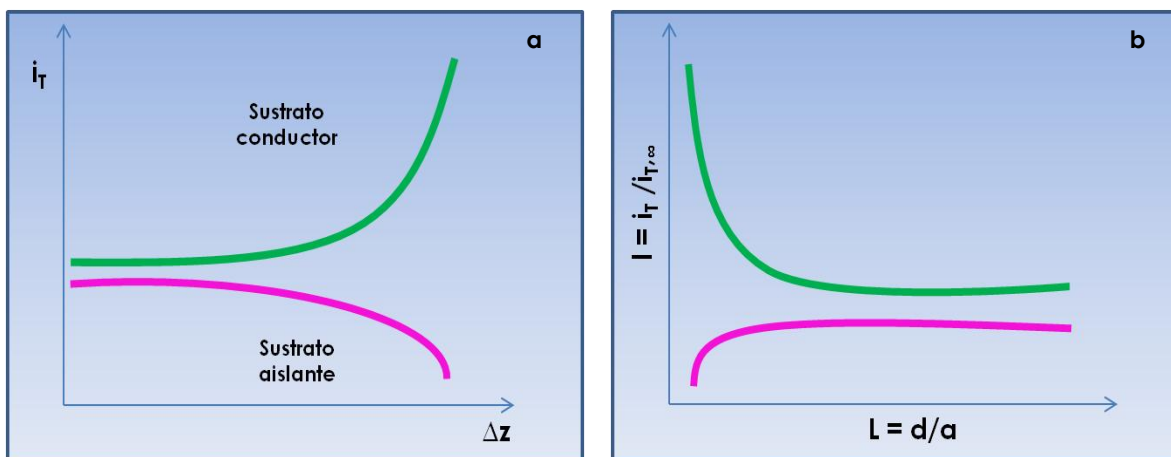


Figura 3.8 a.- Típicas curvas de aproximación experimentales del tip a un sustrato conductor (feedback positivo total) (—) y a un sustrato aislante o inactivo (feedback negativo), representadas por la intensidad de corriente del tip (i_T) en función de la distancia recorrida por el tip (z) (—). **b.-** Ajustes de las curvas de aproximación experimentales normalizadas usando ecuaciones teóricas $I(L)$ reportadas³⁹, donde $d = z - z_0$, siendo z_0 la longitud recorrida por el tip para llegar a la superficie del sustrato.

Si se ubica el tip a una determinada distancia del sustrato, aplicando al tip un E_T tal que la oxidación/reducción de la sonda redox ocurre en condiciones de corriente límite y se barre E_s a baja v , se obtiene una dependencia i_T vs. E_s de la reducción/oxidación de la sonda redox ocurriendo sólo en la zona del sustrato afectada por el tip. Este experimento, se conoce como voltamperometría tip sustrato (VTS). En la Figura 3.9, se muestra, a modo de ejemplo, un VTS para estudiar la reducción de ferrocenio metanol (FcMeOH^+) en un sustrato de Au(111) modificado con 6-COOH, usando como sonda redox FcMeOH 1,00 mM disuelto en NaClO_4 0,10 M. El experimento se realizó aplicando un $E_T = 0,450$ V (oxidando FcMeOH a FcMeOH^+) barriendo E_s en una ventana entre 0,400 V y -0,300 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{sat})}$) y utilizando una v de $0,050$ $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$. Cuando $E_s > 0,200$ V se verifica que $i_T = 0$ ya que la reacción en el sustrato opera en la misma dirección que en el tip⁴², mientras que i_T aumenta a potenciales más negativos, dando cuenta de la regeneración de la sonda redox en esa ventana de potencial. El perfil mostrado en la figura 3.9 es característico de un proceso reversible de la sonda redox, indicando una alta velocidad de regeneración de FcMeOH sobre el sustrato²⁹. Dado que la presencia de la SAMs debería bloquear la reacción de la sonda redox, la corriente detectada proviene de los defectos

de la modificación que dejan expuesto al Au(111). En general, las superficies de los sustratos de Au(111) no son atómicamente lisas, presentando escalones con bordes que pueden cambiar las señales registradas durante el análisis por SECM. Cuando se modifican estos sustratos con SAMs, el cubrimiento no es homogéneo, originando zonas libres de funcionalización, denominadas agujeros o *pinholes*, a partir de los cuales ocurre la transferencia de electrones. Estos defectos contribuyen a la actividad electroquímica y pueden producir resultados inexactos en el análisis cinético de los datos cuando no se toman en cuenta²⁵. La contribución de los *pinholes*, varía de una muestra a otra debido a factores tales como la estructura del sustrato y la limpieza, la temperatura, la concentración de tiol, y el tiempo de incubación^{12,25,39}.

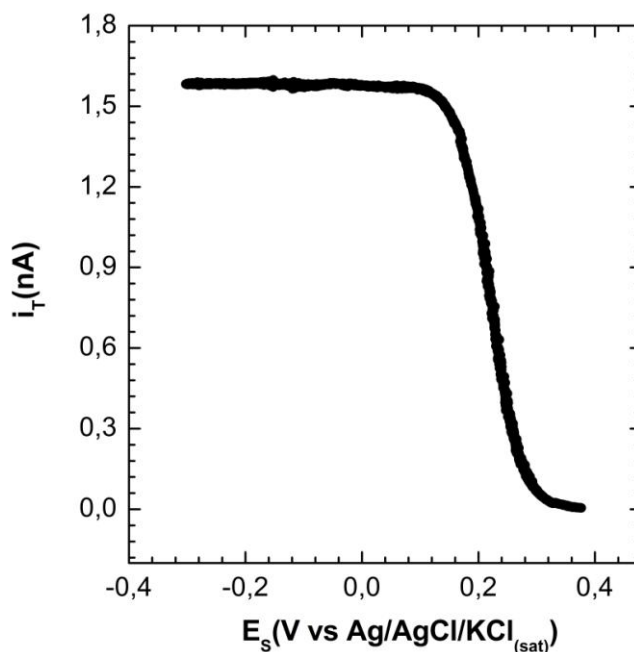


Figura 3.9.- VTS realizado con un sustrato sólido de Au(111) modificado con 6-COOH en presencia de FcMeOH 1,00 mM disuelto en NaClO₄ 0,10 M, realizado a $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ con $E_s = 0,450 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl/KCl_(sat)).

Cabe remarcar que al tratarse de una SAMs electroactiva (por ejemplo con tioles terminados en grupos redox) la respuesta de la VTS también reflejaría la velocidad de la reacción de reducción de FcMeOH⁺ sobre la misma, y podría ser

usada para analizar la cinética de este proceso. En tal sentido, se muestra un esquema, a modo de ejemplo, de los experimentos realizados por SECM (Figura 3.10) con los sustratos de Au(111) modificados con monocapas de ferroceno (Au(111)/Fc) en presencia de la sonda redox en solución (FcMeOH).

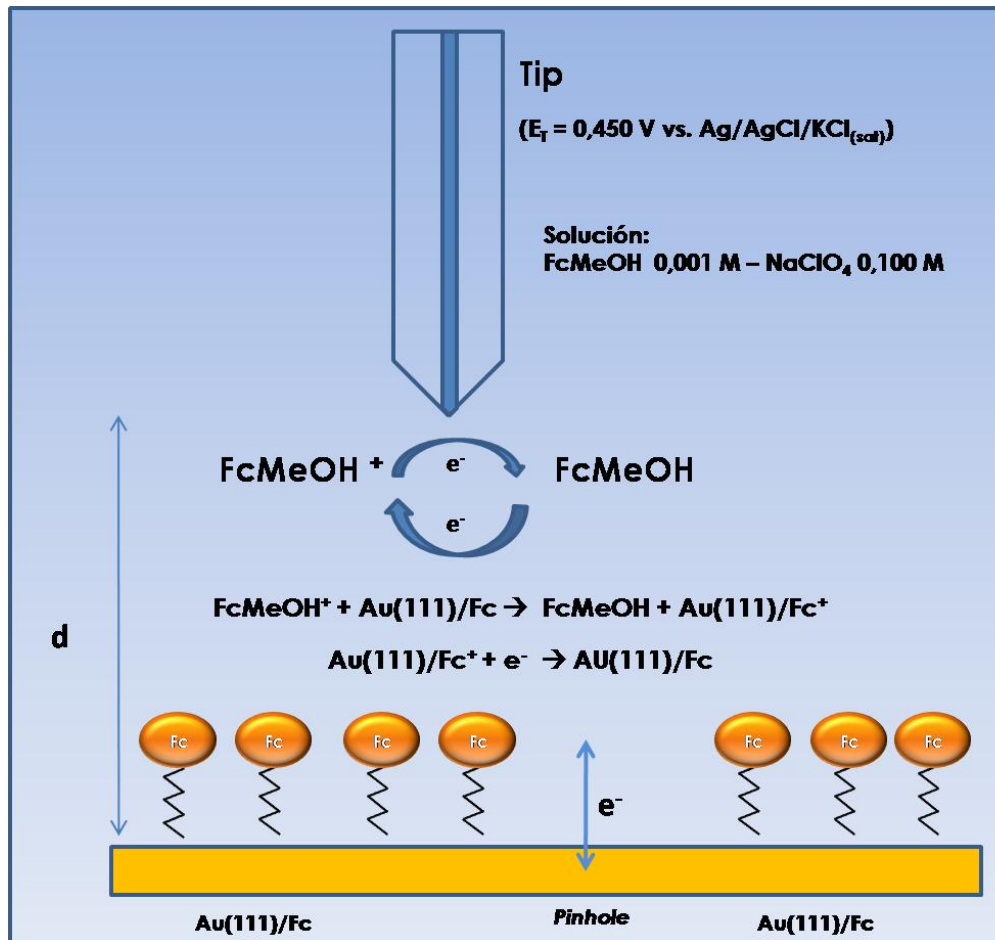


Figura 3.10.- Esquema general (no realizado a escala) de los experimentos realizados por SECM utilizando el modo *feedback* con un sustrato de Au(111) modificado con monocapas de ferroceno (Au(111)/Fc) en presencia de una sonda redox (FcMeOH) en solución acuosa.

Como se indica en el esquema de la Figura 3.10, la actividad electroquímica detectada por SECM sobre los sustratos de Au(111) modificados con SAMs de ferroceno debería provenir tanto de la transferencia de electrones a través de la SAM hacia los grupos redox terminales (representada por las flechas) que terminan regenerando la sonda redox en solución, como de los *pinholes* en la

monocapa²⁵. En el primer caso, la transferencia de electrones a la sonda redox se encuentra acoplada con la reducción/oxidación del mediador redox adsorbido. Para el segundo proceso, la transferencia de electrones dada por la reacción redox de la sonda ocurre directamente sobre el sustrato metálico. Este último proceso, también está presente cuando los sustratos de Au(111) se modifican con SAMs con grupos carboxilato (Figura 3.9). Sin embargo, la detección de ambos procesos depende principalmente de la compactación de la monocapa y de los tratamientos químicos o electroquímicos a los cuales se someta el sistema^{11,12,25,46}

Para los experimentos de SECM realizados en este trabajo de Tesis Doctoral, los tips se fabricaron mediante sellado dentro de un capilar de vidrio de un alambre de platino (diámetro = 25 μm) afinado mediante ataque electroquímico, y posterior pulido de la sección transversal hasta exponer el disco de Pt⁴⁷. En la Figura 3.11, se muestra una fotografía de la celda de trabajo construida en teflón en donde se colocan el EC de Pt, el ER (no mostrado) y el ET (Au(111)) sumergidos en una solución conteniendo a la sonda redox. El tip se ubica en un soporte de acrílico unido a un posicionador piezoeléctrico, el cual a su vez se encuentra ubicado sobre las plataformas de traslación accionadas por los motores de paso.

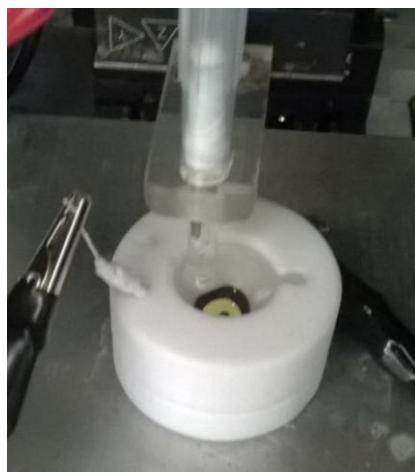


Figura 3.11.- Fotografía de la celda electroquímica utilizada para los experimentos de SECM

Se realizaron pruebas con distintas sondas redox, entre ellas dimetilaminometil ferroceno, comprobándose que muchas de ellas produjeron desactivación del tip provocando respuestas no reproducibles. Finalmente, se

eligió como sonda redox una solución de FcMeOH 1,00 mM que se preparó en NaClO₄ 0,10 M, ya que fue la única que no dañó el tip y lo mantuvo limpio durante el análisis del sustrato. Cada tipo de SAMs, se estudió analizando, como mínimo, dos sustratos de Au(111) modificados. Además, se analizaron las respuestas generadas en distintas zonas de la superficie y se compararon las señales registradas en las zonas sin tratamiento posterior a la modificación y en zonas con ciclado electroquímico previo a la determinación.

En este trabajo de Tesis Doctoral, además de los experimentos de VTS previamente descritos se realizaron imágenes SECM de actividad electroquímica sobre los sustratos de Au(111) con las distintas modificaciones. La adquisición de las imágenes se realizó en el modo *feedback* manteniendo la altura z del tip constante desplazando el mismo sobre la superficie del sustrato en el plano x-y y registrando i_T para detectar zonas de mayor corriente (mayor actividad electroquímica) o zonas de menor corriente (inactividad electroquímica causada por un mayor bloqueo). La imagen SECM se genera representando gráficamente en un mapa de colores o de escala de grises la dependencia experimental $i_T(x,y)$, como se ilustra en el ejemplo de la Figura 3.12. El objetivo fue, determinar la homogeneidad de la modificación sobre el sustrato sólido de Au(111).

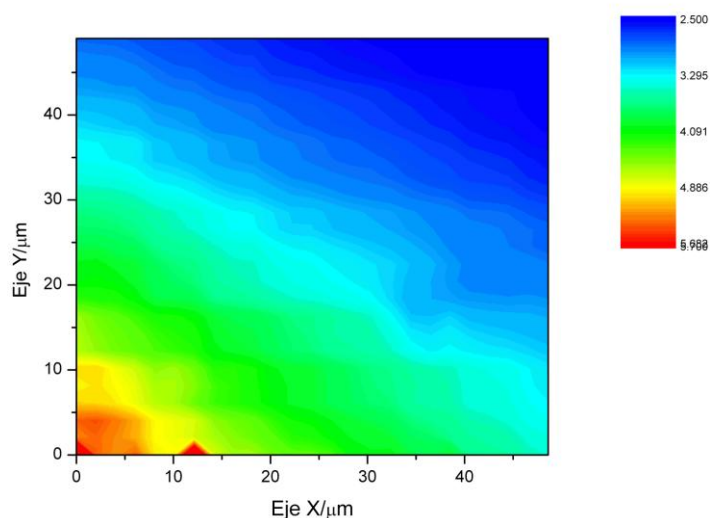


Figura 3.12.- Imágenes SECM obtenidas de SAMs mixtas de Fc y 6-COOH (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM de cada componente en CH₂Cl₂ durante 15 h) empleando FcMeOH en NaClO₄ 0,10 M como sonda redox. Condiciones experimentales: $E_s = 0,000$ V. ER: Ag/AgCl/KCl_(sat). EC: alambre de Pt. Parámetros de imagen: 50 x 50 μ m.

3.2.1.4.- Espectroscopía Raman aumentada por la superficie (SERS)

La espectroscopía Raman es una rama de la espectroscopia vibracional que se basa en la detección de los cambios en la frecuencia o longitud de onda del haz de radiación incidente como consecuencia de la dispersión inelástica producida por la interacción entre fotones y las moléculas de la muestra. La intensidad y frecuencia de las vibraciones inducidas son sensibles tanto al entorno químico de los átomos individuales como al solvente^{48,49}.

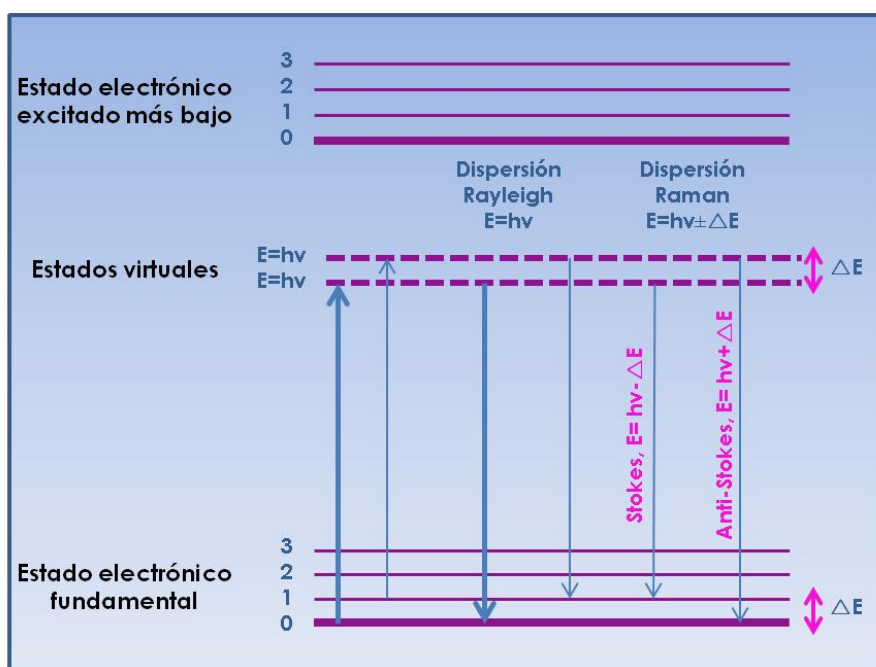


Figura 3.13.- Esquema del origen de la dispersión Rayleigh y Raman.

La Figura 3.13 muestra un diagrama de los niveles de energía que proporciona una visión cualitativa de la dispersión Raman y Rayleigh (la longitud de onda coincide con la fuente de excitación), donde el espesor de las flechas indica la probabilidad de que ocurran los procesos indicados. La flecha de la izquierda representa el cambio de energía de la molécula cuando interacciona con un fotón de la fuente. El estado virtual que alcanza el electrón no es necesariamente un estado cuántico real de la molécula y, por lo tanto, la molécula puede tomar cualquiera de los infinitos valores o estados virtuales entre

el estado electrónico fundamental y el primer estado excitado, que se muestra en la parte superior del diagrama, en función de la frecuencia de la radiación de la fuente de energía. La segunda flecha muestra el cambio de energía que ocurriría si la molécula alcanzada por el fotón estuviese en el primer nivel vibracional del estado electrónico fundamental. Este proceso es menos probable, dado que la fracción de moléculas en ese estado, a temperatura ambiente, es muy baja. Las flechas centrales representan los cambios que origina la dispersión Rayleigh. En este caso, no se pierde energía por lo que las colisiones fotón-muestra son elásticas. Finalmente, a la derecha se muestran las flechas que representan los cambios de energía que produce la emisión Stokes y anti-Stokes. Estas emisiones difieren de la radiación Rayleigh en la frecuencia correspondiente a $\pm\Delta E$, la diferencia de energía entre los primeros niveles vibracionales del estado electrónico fundamental, como se muestra en la Figura 3.13. Las poblaciones relativas de los dos estados de energía son tales, que la emisión Stokes está más favorecida que la anti-Stokes⁵⁰⁻⁵².

Un espectro Raman se obtiene representando la intensidad de la radiación dispersada como una función del desplazamiento Raman, $\Delta\nu$, y da información del estiramiento y la flexión de los modos de vibración, de forma similar a la proporcionada por un espectro de IR (absorción o transmisión de energía como función de la frecuencia)^{50,51,53,54}. Sin embargo, aunque tanto la absorción de IR como la dispersión Raman implican transiciones entre niveles vibracionales, sus espectros no son idénticos. Por lo tanto, las espectroscopías IR y Raman son complementarias^{52,55}. La absorción IR requiere un cambio en el momento dipolar intrínseco con la vibración molecular, mientras que la dispersión Raman depende de cambios en la polarizabilidad de grupos funcionales con la vibración⁵⁰. Por lo tanto, los grupos polares tales como C=O, -NH y -OH tienen fuertes vibraciones IR de estiramiento, mientras que los grupos no polares tales como C=C, C-C y S-S tienen bandas Raman intensas. El agua es una molécula polar que posee una fuerte absorción IR, por lo que esta técnica se aplica generalmente al análisis de muestras secas, no acuosas o en agua deuterada. En contraste, el agua tiene propiedades débiles de dispersión Raman y produce menos interferencia en la espectroscopia Raman. Como consecuencia, la espectroscopia Raman es

generalmente más adecuada para los experimentos *in vivo* o *in situ* de los sistemas biológicos^{50,52}.

Una de las desventajas de la espectroscopia Raman es que las señales producidas son muy débiles, por lo que existen diferentes alternativas para incrementar la señal. Una de ellas es la espectroscopía Raman aumentada por superficie (SERS), que supone la obtención de espectros Raman convencionales de muestras que se adsorben sobre (nano)partículas metálicas (plata, oro, cobre) o sobre sustratos rugosos de esos metales.

En este trabajo de Tesis Doctoral, se utilizó SERS para estudiar la adsorción de carboxilatos tiolados y conocer las conformaciones que adoptan las cadenas sobre la superficie. El análisis de los sustratos modificados con Fc no pudo llevarse a cabo debido a la descomposición térmica del mediador redox causada por la radiación láser.

3.2.1.5.- Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de la disipación (QCM-D)

La microbalanza de cristal de cuarzo, QCM, es un instrumento que permite estudiar procesos de adsorción en tiempo real⁵⁶. Esta técnica se basa en la propiedad piezoeléctrica del cuarzo que permite la deformación mecánica del material cuando es sometido a una diferencia de potencial. La microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación (QCM-D) permite analizar, además de la frecuencia de resonancia, la energía de disipación de un cristal de cuarzo⁵⁶.

Los sustratos (o sensores) para QCM-D consisten en un disco delgado de cuarzo entre dos electrodos. Dado que el cuarzo posee propiedades piezoeléctricas, es posible excitar el cristal de oscilación mediante la aplicación de un potencial a través de esos electrodos⁵⁷. Normalmente, los electrodos son de oro (Figura 3.14), y pueden estar recubierto con una amplia gama de otros materiales tales como oro, plata, titanio entre otros.^{7,57,58}. Estos discos de cuarzo, recubiertos de oro, permiten aplicar un campo electromagnético oscilante

perpendicular a la superficie. Esta perturbación genera en el cuarzo una onda acústica transversal que se propaga a través del espesor del cristal y se refleja en la superficie. El acoplamiento electromecánico y la deformación resultante del cuarzo dependen de la configuración, orientación y magnitud del campo eléctrico aplicado, de la simetría y el ángulo de corte del cuarzo empleado⁵⁹.

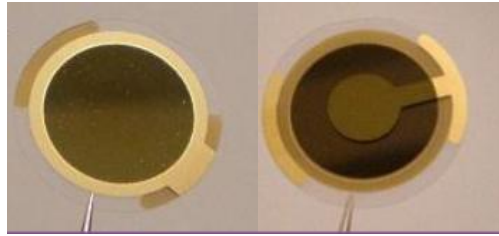


Figura 3.14.- Fotografía de la parte superior e inferior de un cristal de cuarzo recubierto con una película de oro.

A cierta frecuencia, la oscilación del cristal tiene un comportamiento armónico con un máximo de amplitud y baja pérdida de energía. Este valor se denomina frecuencia fundamental (f_0) y depende del espesor del cristal. La frecuencia de oscilación del cristal presenta resonancia a valores múltiplos enteros e impares llamados sobretonos (n) y se modifica por cambios de masa o por pérdidas de energía debidas a la fricción con el medio.

Durante la oscilación del cristal en un líquido, la pérdida de la energía puede deberse al acoplamiento del líquido al movimiento del cristal de cuarzo y/o a las propiedades viscoelásticas de las moléculas adsorbidas. Esta disminución en la oscilación del cristal, se denomina disipación y permite obtener información acerca de la viscosidad, densidad, módulo elástico y espesor de la película adsorbida⁵⁶.

La frecuencia de resonancia (f) del sensor depende de la masa total oscilante, incluyendo el agua acoplada a la oscilación. Cuando una película fina se adsorbe sobre el sensor, f disminuye. Si la película es delgada y rígida, la disminución de f es proporcional a la masa de la película y se puede determinar utilizando la ecuación de Sauerbrey (Ecuación 3.1)⁶⁰:

$$\Delta m = -\Delta f_n \times C / n \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde Δm es la masa de la película adsorbida, Δf es la variación de la frecuencia observada en el sobretono n , y C es una constante denominada sensibilidad de masa, que está directamente relacionada con las características del cristal de cuarzo utilizado⁶¹. Por otro lado, con el control de disipación se monitorean los cambios en la disipación a un dado sobretono (ΔD_n), relacionados con las propiedades viscoelásticas de la película adsorbida. La disipación corresponde al decaimiento de la intensidad de la oscilación con el tiempo debido a la pérdida de energía. La disipación se define según la Ecuación 3.2⁶⁰:

$$D = E(\text{disipada}) / 2\pi \times E(\text{almacenada}) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde $E(\text{disipada})$ y $E(\text{almacenada})$ son la energía disipada y la energía almacenada de la película adsorbida, respectivamente. Si bien los cambios de masa detectados pueden corresponder a moléculas de agua "atrapadas" en la película adsorbida, la combinación de las medidas de los cambios de la frecuencia y la disipación permiten obtener información respecto de la estructura y la rigidez de la película.

Debido a que los cambios de frecuencia pueden determinarse con alta precisión, QCM-D es una técnica muy sensible para estudiar la adsorción de una película delgada, permite determinar valores de masa adsorbida menores a 1 ng.cm^{-2} y analizar la cinética de adsorción/desorción de moléculas en una interface sólido/líquido. La masa adsorbida determinada por QCM-D es mayor que la obtenida con técnicas ópticas como la elipsometría o SPR (resonancia de plasmones superficiales), ya que detecta la masa total involucrada en el proceso de adsorción, es decir la masa correspondiente al agua y los iones asociados a la molécula adsorbida^{56,59,61-67}.

En este trabajo de Tesis Doctoral, se utilizó QCM-D para conocer los cambios de masa y disipación que se producen sobre los sustratos en cada etapa de la modificación. Para realizar los experimentos, se utilizaron cristales de cuarzo (AT-cut) con una capa de oro de 100 nm (QSX -301) adquiridos A Q -Sense, con

una frecuencia de resonancia fundamental de 4,95 MHz (Figura 3.14). Para calcular C se utilizaron los parámetros del cristal de cuarzo^{57,61} dando un valor de 17,70 ng.cm⁻².Hz⁻¹.

3.2.2.- Preparación de sustratos de oro

3.2.2.1.- Limpieza de sustratos de oro

Como sustratos de Au(111), se utilizaron placas de oro evaporado que son policristalinas. Por lo tanto, fue necesario someterlas a un tratamiento térmico conocido comúnmente, como recocido para obtener la orientación preferencial (111)^{23,68,69}. Las placas de oro limpias se expusieron a la llama de un mechero de butano y se calentaron por dos minutos hasta alcanzar un color rojo sombra, que corresponde a aproximadamente a 650 °C. Para finalizar, los electrodos se colocaron en atmósfera de nitrógeno por dos minutos. La limpieza de los sustratos de Au(111) consistió en sumergirlos con cuidado durante 30 segundos en solución piraña (H₂SO₄/H₂O₂ 70:30) ya que es un potente agente oxidante que reacciona violentamente con compuestos orgánicos. Luego de enjuagar con abundante agua deionizada, los sustratos de Au(111) se ciclaron en KOH 1,00 M utilizando 50 Voltamperogramas cíclicos en una ventana de potencial entre 0,600 V y -1,400 V y a una velocidad de barrido de 0,100 V.s⁻¹⁶⁹.

Como sustratos de Au policristalino, se utilizaron electrodos comerciales y láminas. Antes de la modificación, los electrodos se sumergieron en solución piraña durante 3 minutos, se pulieron en paño con alúmina 1,00 μm y se sumergieron nuevamente en solución piraña durante 2 minutos. A continuación, se pulieron en paño con alúmina 0,05 μm y se colocaron nuevamente en solución piraña por 2 minutos. Las láminas fueron lavadas en solución piraña caliente durante dos horas y posteriormente enjuagadas con abundante agua deionizada.

La limpieza de los sustratos de Au se culminó con 100 Voltamperogramas cíclicos realizados en medio ácido (H₂SO₄ 1,00 M) en una ventana de potencial entre -0,300 V y 1,700 V a una velocidad de barrido de 1,000 V.s⁻¹. Al finalizar, se

realizó un Voltamperogramas cíclicos en H_2SO_4 0,10 M (Figura 3.15). En el Voltamperogramas cíclicos de la Figura 3.15 pueden distinguirse 3 regiones características: la primera (entre 0,400 V y 0,600 V) presenta corrientes capacitivas asociadas al proceso de cargado de la doble capa eléctrica. En determinadas condiciones, pueden encontrarse señales específicas asociadas al plano cristalino expuesto o bien a la adsorción de iones del electrolito soporte⁷⁰. La segunda zona (entre 1,000 V y 1,700 V), está relacionada con la formación de óxidos de oro y la tercera (entre 0,600 V y 1,000 V) corresponde a la reducción de los óxidos formados⁷¹. A partir de la señal de reducción de óxido de oro, se calculó el área electroactiva, siguiendo un procedimiento descrito en la literatura⁷¹⁻⁷⁴. Con este propósito, se integró el área de ese pico y se calculó la densidad de corriente (j). Finalmente, se realizó un Voltamperogramas cíclicos en HClO_4 1,00 M entre 0,000 V y 0,900 V para evaluar la señal electroquímica de los sustratos limpios, previo a la modificación con SAMs.

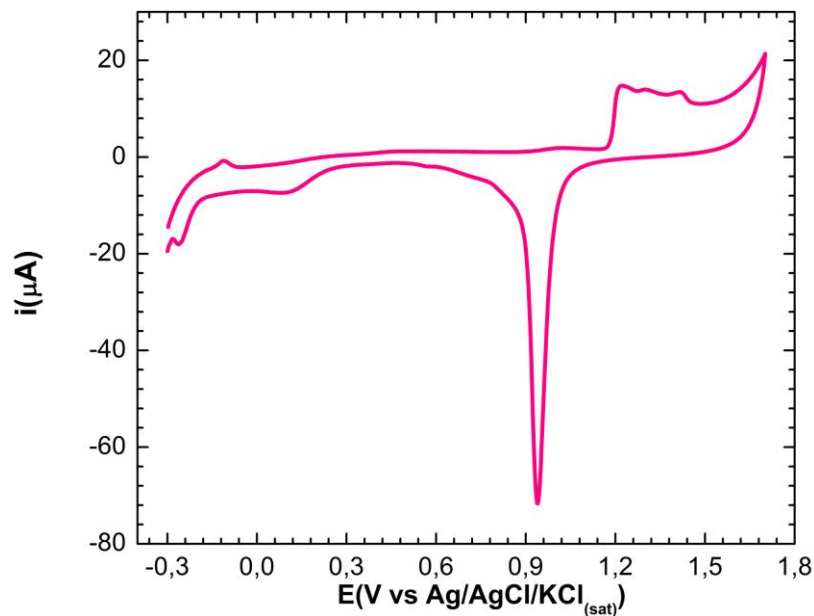


Figura 3.15.- Voltamperogramas cíclicos de Au obtenido a $0,100 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ en H_2SO_4 0,10 M.

3.2.2.2.- Estudios preliminares para la modificación de oro con SAMs electroactivas

Como se detalla a continuación, para incorporar ferroceno (Fc) como mediador redox a las superficies de Au(111) y Au se evaluaron siete estrategias de modificación basadas en la formación de SAMs,. Cada procedimiento, se realizó por lo menos por duplicado en cada una de las condiciones estudiadas y se evaluó su estabilidad en el tiempo.

Procedimiento 1

Se formaron SAMs por inmersión del electrodo de Au en una solución de cisteamina (cyst) 0,02 M en etanol absoluto durante 12 h a 25 °C (Au/cyst). Para unir el mediador redox, se incubó el electrodo Au/cyst con ferroceno aldehído (FcCHO) disuelto en tres medios (piridina 0,05 M pH 8,00, buffer fosfato 0,05 M pH 7,00 o KClO₄ 0,05 M), en presencia de un reductor (NaCNBH₃ o NaBH₄) durante distintos tiempos (entre 12 h y 72 h) a temperatura controlada (entre 4 °C y 37 °C) en ausencia de luz^{2,75,76}.

Procedimiento 2

Para esta estrategia, se utilizó ferroceno fluorado (FcF), cuya síntesis se realizó en el Laboratorio de Materiales Electroactivos del Instituto de Química de la Universidad de San Pablo (USP), Brasil. Para obtener FcF se preparó una solución de ferroceno carboxílico (FcCOOH) en piridina y CH₂Cl₂ que se dejó reaccionar con C₃N₃F₃ durante 1 h a 0 °C. La reacción se finalizó con el agregado de hielo molido⁷⁷. La solución se llevó a una ampolla de decantación donde se separaron las fases acuosa y orgánica. El FcF sólido se obtuvo por evaporación del solvente orgánico y el producto de la reacción se verificó por cromatografía en placa delgada (TLC). A continuación, se formó la SAMs según el procedimiento 1 en el cual el electrodo Au/cyst se incubó con una solución de FcF en THF a distintos tiempos (entre 1 h y 5 días) a 40 °C bajo atmósfera de argón⁷⁷.

Procedimiento 3

Esta estrategia, se basó en la formación de SAMs con ferroceno tiolado (FcSH-3). El mismo, se sintetizó a partir de la reacción de FcF con cyst en THF durante 5 días a 30 °C bajo atmósfera de argón y posterior evaporación del solvente⁷⁷. La formación del producto tiolado se verificó por TLC. Para modificar el sustrato, se colocó el electrodo de Au en una solución 0,02 M de FcSH-3 con CH₂Cl₂ durante 12 h a 25 °C en ausencia de luz.

Procedimiento 4

Esta estrategia, se basó en la formación de SAMs con ferroceno tiolado (FcSH-4), que se sintetizó a partir de la reacción de FcCHO con cyst en CH₂Cl₂ durante 24 h a 40 °C. La formación del producto tiolado se verificó por TLC. Para modificar el sustrato, se colocó el electrodo de Au en una solución 0,02 M de FcSH-4 con CH₂Cl₂ durante 15 h a 25 °C en ausencia de luz. La síntesis de FcSH-4 fue realizada en el Departamento de Química Orgánica (INFIQC), con la colaboración de la Dra. Laura Rossi.

Procedimiento 5

Esta estrategia, se basó en la formación de SAMs con ferroceno tiolado (FcSH-5). El mismo se sintetizó a partir de la reacción de FcCHO con cyst en CH₂Cl₂ durante 6 h a 40 °C. La formación del producto tiolado se verificó por TLC. Para modificar el sustrato, se colocó el electrodo de Au en una solución 0,02 M de FcSH-5 con CH₂Cl₂ durante 15 h a 25 °C en ausencia de luz. La síntesis de FcSH-5 fue realizada en el INFIQC, Departamento de Química Orgánica con la colaboración de la Dra. Laura Rossi.

Procedimiento 6

La estrategia en esta instancia, se basó en la formación de SAMs con ferroceno tiolado (FcSH-6), que se sintetizó a partir de la reacción de FcCHO con

cyst en CH_2Cl_2 durante 6 h a 40 °C. La formación del producto tiolado se verificó por TLC. Al producto formado se lo incubó nuevamente con un exceso de cyst en CH_2Cl_2 durante 5 h a 40 °C. Para modificar el sustrato, se colocó el electrodo de Au en una solución 0,02 M de FcSH-6 con CH_2Cl_2 durante 15 h a 25 °C en ausencia de luz. La síntesis de FcSH-4 fue realizada en el INFIQC, Departamento de Química Orgánica con la colaboración de la Dra. Laura Rossi.

Procedimiento 7

Esta estrategia, se basó en la formación de SAMs con 6-ferrocenil hexanotiol de origen comercial (Fc) disuelto en CH_2Cl_2 durante 15 h a 25 °C en ausencia de luz.

La Tabla 3.1 muestra los resultados obtenidos a partir del análisis de la señal de oxidación de ferroceno adsorbido determinadas por CV. La caracterización electroquímica, se realizó en buffer fosfato para los electrodos de Au/cyst incubados con FcCHO en piridina o en buffer fosfato, mientras que se utilizó KClO_4 0,05 M para los electrodos de Au/cyst incubados en KClO_4 . Las ventanas de potencial aplicadas fueron entre 0,000 V y 0,700 V a distintas velocidades de barrido. Para los demás electrodos de Au modificados, la caracterización electroquímica se realizó en HClO_4 1,00 M, utilizando ventanas de potencial entre 0,000 V y 0,900 V a distintas velocidades de barrido. La ausencia de la señal de oxidación del ferroceno adsorbido se indica como sin reacción en los resultados. Por otro lado, las señales poco estables se refieren a la pérdida de las ondas características del ferroceno durante el ciclado.

Procedimientos	Temperatura de incubación (°C)	Reductor	Solvente de Incubación	Tiempo de Incubación (h)	Resultados
1	4 y 37	NaBH ₄	Piridina	12 y 72	Sin reacción
1	25 y 37	NaBH ₄	Buffer fosfato	12 y 72	Sin reacción
1	25 y 37	NaCNBH ₃	KClO ₄	12 y 24	Reacción desde 24 h a 25 °C
2	40	NO	THF	1 - 120	Sin reacción
3	25	NO	CH ₂ Cl ₂	12	Reacción/Muy estable/Poco reproducible
4	25	NO	CH ₂ Cl ₂	15	Reacción/Poco estable/Poco reproducible
5	25	NO	CH ₂ Cl ₂	15	Reacción/Estable/Poco reproducible
6	25	NO	CH ₂ Cl ₂	15	Reacción/Muy estable/Poco reproducible
7	25	NO	CH₂Cl₂	15	Reacción/Muy estable/Reproducible

Tabla 3.1.- Procedimientos utilizados para la adsorción de ferroceno sobre sustratos de oro.



Debido a los inconvenientes surgidos de los procedimientos 1-6, se decidió utilizar ferroceno comercial (Fc) cuya disponibilidad es sólo reciente (para cadenas carbonadas cortas) y que permitió incorporar ferroceno a los sustratos de oro de forma estable y reproducible.

3.2.2.3.- Modificación de oro con SAMs simples de Fc y mixtas

Existen distintas maneras de preparar SAMs de alcanotioles sobre superficies metálicas por medio de reacciones espontáneas: a) adsorción desde una solución que contenga una mezcla de alcanotioles (coadsorción), b) adsorción desde solución de disulfuros asimétricos, c) reemplazo de los tioles adsorbidos por tioles en solución, d) desorción electroquímica selectiva de monocapas mixtas seguida por readsorción. Entre estas formas de preparación, la más utilizada es la que emplea el método de coadsorción desde soluciones que contienen una mezcla de alcanotioles^{78,11}.

El protocolo empleado en este trabajo de Tesis Doctoral para la preparación de las SAMs simples y mixtas, consistió en sumergir los sustratos de oro limpios en soluciones de distintas concentraciones de Fc solo o en combinación con el ácido 3-mercaptopropionico (3-COOH) o el ácido 6-mercaptophexanoico (6-COOH) preparadas en CH_2Cl_2 durante un período de 15-18 h a 25 °C en ausencia de luz (Figura 3.16). En otros trabajos, se elige al etanol como solvente para la formación de SAMs de alcanotioles⁷⁹⁻⁸¹. Sin embargo, en estudios previos realizados en el grupo de investigación con QCM-D, se observó la oxidación del oro cuando se trabajaba con este solvente⁶¹.

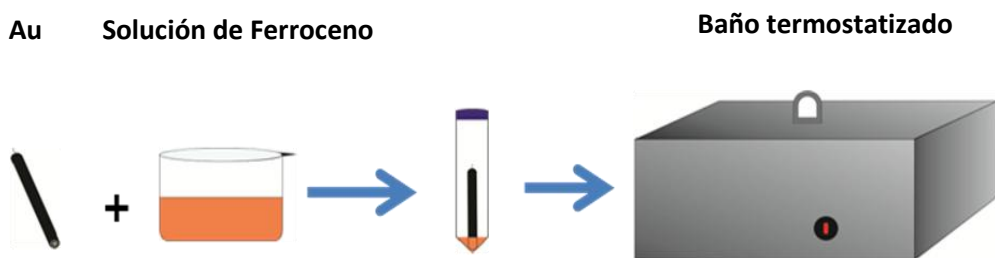


Figura 3.16.- Esquema del proceso de preparación de las SAMs

Luego de la modificación, los electrodos se lavaron con CH_2Cl_2 y con agua Milli-Q. Este procedimiento sistemático permitió optimizar la reproducibilidad de la modificación de los sustratos con las SAMs. Por medio de este método de preparación, se obtienen rápidamente cubrimientos densos de adsorbato

(milisegundos a minutos), aunque el proceso de reorganización resulta lento requiriendo tiempos del orden de horas para maximizar la densidad de las moléculas y minimizar los defectos en la SAMs⁸².

En todos los experimentos, se trabajó con tres electrodos: el ET de Au(111)/Au (limpio o modificado), un EC de Pt y un ER de Ag/AgCl/KCl_(sat). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Para estudiar el comportamiento redox del Fc adsorbido, se utilizó una ventana de potencial entre 0,000 V y 0,900 V en HClO₄ 1,00 M a distintas velocidades de barrido. El Fc adsorbido sobre el sustrato de oro, se encuentra en estado reducido; si se le aplica un barrido de potencial anódico a una determinada v, las moléculas adsorbidas de Fc se comienzan a oxidar exponiendo las cargas positivas (Figura 3.17). Un barrido de potencial, en sentido contrario vuelve a reducir a las especies oxidadas.

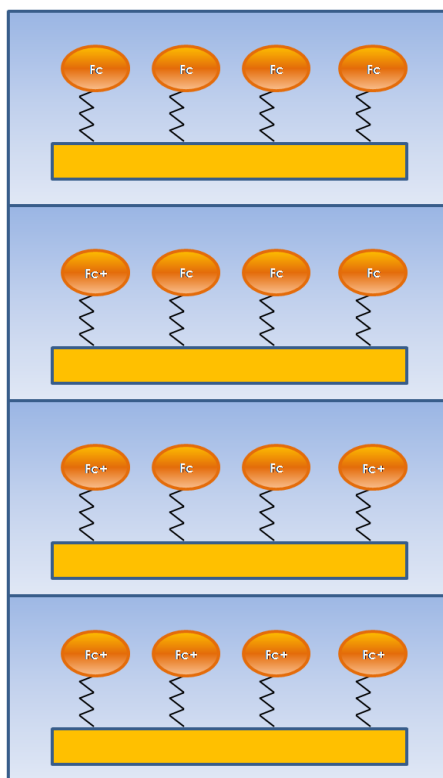


Figura 3.17.- Esquema de oxidación de las especies electroactivas adsorbidas sobre oro cuando se la aplica un barrido de E anódico. Al comenzar el barrido a 0,000 V (esquema superior) las especies electroactivas se encuentran reducidas. A medida que avanza el barrido, más especies electroactivas toman cargas positivas hasta completar toda la oxidación de las especies (esquema inferior).

Además, se analizó la respuesta de las SAMs electroactivas frente a distintos electrolitos. Los electrolitos seleccionados representan modificaciones graduales desde HClO_4 1,00 M, comúnmente utilizado en las determinaciones electroquímicas^{20-23,78,83-85}, hasta el buffer pirofosfato 0,10 M a pH 8,50 (BF) necesario para determinar la actividad enzimática de la DAAO^{60,86}. Además, estos aniones presentan distintas afinidades frente a la adsorción sobre oro⁸⁷: $\text{ClO}_4^- < \text{NO}_3^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{H}_2\text{PO}_4^-$. También, se utilizó la desorción reductiva para determinar el grado de cubrimiento de las SAMs simples y mixtas así como también evaluar el mezclado o segregación en fases para las SAMs mixtas. Las desorciones reductivas se realizaron entre 0,200 V y -1,600 V a una velocidad de barrido de 0,050 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ en KOH 0,10 M.

En todos los sustratos de oro modificados se realizó la caracterización electroquímica por CV. Asimismo, se complementaron estos resultados experimentales con SECM y SERS y utilizando además simulaciones digitales para Au(111). En el caso de Au, se siguió el proceso de formación de las SAMs mixtas por QCM-D.

3.3.- Referencias

1. Ahirwal GK, Mitra CK. Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor. *Biosens Bioelectron.* 2010;25(9):2016-2020. doi:10.1016/j.bios.2010.01.029.
2. Valenti LE, Herrera E, Stragliotto F, et al. Optimizing the Bioaffinity Interaction between His-Tag Proteins and Ni (II) Surface Sites. *Proteins Interfaces III State art.* 2012;(li):37-53. doi:10.1021/bk-2012-1120.
3. Love JC, Al E. *Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology.* Vol 4. 2005. doi:10.1021/cr0300789.
4. Uehara TM, de Aguiar HB, Bergamaski K, Miranda PB. Adsorption of Alkylthiol Self-Assembled Monolayers on Gold and the Effect of Substrate Roughness: A Comparative Study Using Scanning Tunneling Microscopy, Cyclic Voltammetry, Second-Harmonic Generation, and Sum-Frequency Generation. *J Phys Chem C.* 2014;140821071532009. doi:10.1021/jp5054919.

5. Wagner P, Hegner M, Guentherodt H-J, Semenza G. Formation and in Situ Modification of Monolayers Chemisorbed on Ultraflat Template-Stripped Gold Surfaces. *Langmuir*. 1995;11(10):3867-3875. doi:10.1021/la00010a043.
6. Valiokas R, Kienkar G, Tinazli A, et al. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: Characterization and application. *Langmuir*. 2008;24(9):4959-4967. doi:10.1021/la703709a.
7. Briand E, Gu C, Boujday S, Salmain M, Herry JM, Pradier CM. Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs: Topography/bioactivity relationship - A combined FT-RAIRS, AFM and QCM investigation. *Surf Sci*. 2007;601(18):3850-3855. doi:10.1016/j.susc.2007.04.102.
8. Carot ML. Estudio electroquímico y nanoscópico de la estructura y reactividad de monocapas autoensambladas de alcanotioles funcionalizados sobre Au (111). Inmovilización de proteínas María Lucrecia Carot. *Tesis Dr*. 2006.
9. Strutwolf J, O'Sullivan CK. Microstructures by selective desorption of self-assembled monolayer from polycrystalline gold electrodes. *Electroanalysis*. 2007;19(14):1467-1475. doi:10.1002/elan.200703894.
10. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications*. Vol 2da Editio. (JOHN WILEY & SONS I, ed.); 2001.
11. Vericat C, Vela ME, Benitez G, Carro P, Salvarezza RC. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem Soc Rev*. 2010;39(5):1805-1834. doi:10.1039/b907301a.
12. Azcárate JC, Corthey G, Pensa E, et al. Understanding the surface chemistry of thiolate-protected metallic nanoparticles. *J Phys Chem Lett*. 2013;4:3127-3138. doi:10.1021/jz401526y.
13. Brett C, Brett A. *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. Springer. 1993:427. doi:10.1002/anie.199419892.
14. Bagotsky VS. *Fundamentals of Electrochemistry*. Vol (John Wiley & Sons I, ed.); 2006.
15. Bard A, Inzelt G, Scholz F. *Electrochemical Dictionary*. Vol 54. 2012. doi:10.1007/978-3-340-74598-3.
16. Rogers JA, Maznev AA, Banet MJ, Nelson KA. Optical Generation and Characterization of Acoustic Waves in Thin Films: Fundamentals and Applications. *Annu Rev Mater Sci*. 2000;30(1):117-157.

17. Izutsu K, Gmbh WV, Isbns K. *Related Titles from WILEY-VCH Encyclopedia of Electrochemistry*, Volume VI *Supramolecular Electrochemistry Semiconductor Electrochemistry Handbook of Analytical Techniques*. Vol 5. WILEY-VCH Verlag GmbH; 2002. doi:10.1063/1.2218844.
18. Alonso Vante N. *Electroquímica Y Electrocatálisis*. Vol 2003rd ed. (Alonso Vante N, ed.). Buenos Aires
19. Bartlett PN. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*. *Bioelectrochemistry Fundam Exp Tech Appl*. 2008;1-478. doi:10.1002/9780470753842.
20. Orłowski G a., Chowdhury S, Kraatz HB. The effect of alkali metal ions on the electrochemical behavior of ferrocene-peptide conjugates immobilized on gold surfaces. *Electrochim Acta*. 2007;53(4):2034-2039. doi:10.1016/j.electacta.2007.09.014.
21. Lee LYS, Sutherland TC, Rucareanu S, Lennox RB. Ferrocenylalkylthiolates as a probe of heterogeneity in binary self-assembled monolayers on gold. *Langmuir*. 2006;22(9):4438-4444. doi:10.1021/la053317r.
22. Yokota Y, Yamada T, Kawai M. Ion-Pair Formation between Ferrocene-Terminated Self-Assembled Monolayers and Counteranions Studied by Force Measurements. *J Phys Chem C*. 2011;115(14):6775-6781. doi:10.1021/jp2001404.
23. Rudnev A V, Yoshida K, Wandlowski T. Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on low-index gold single crystal electrodes. *Electrochim Acta*. 2013;87:770-778. doi:10.1016/j.electacta.2012.09.090.
24. Méndez De Leo LP, de la Llave E, Scherlis D, Williams FJ. Molecular and electronic structure of electroactive self-assembled monolayers. *J Chem Phys*. 2013;138(11):114707. doi:10.1063/1.4795575.
25. Kiani A, Alpuche-Aviles M a., Eggers PK, et al. Scanning electrochemical microscopy. 59. Effect of defects and structure on electron transfer through self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2008;24(6):2841-2849. doi:10.1021/la702811t.
26. Ohtani M. Quasi-reversible voltammetric response of electrodes coated with electroactive monolayer films. *Electrochem Commun*. 1999;1(10):488-492. doi:10.1016/S1388-2481(99)00103-4.
27. Smalley JF, Finklea HO, Chidsey CED, et al. Heterogeneous electron-transfer kinetics for ruthenium and ferrocene redox moieties through alkanethiol

- monolayers on gold. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):2004-2013. doi:10.1021/ja028458j.
28. Balland V, Lecomte S, Limoges B. Characterization of the electron transfer of a ferrocene redox probe and a histidine-tagged hemoprotein specifically bound to a nitrilotriacetic-terminated self-assembled monolayer. *Langmuir.* 2009;25(11):6532-6542. doi:10.1021/la900062y.
 29. Zoski CG. *Handbook of Electrochemistry.* Vol Elsevier.; 2007. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
 30. Wang J. *ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY.* Vol 3RD ED.200 ed. WILEY-VCH Verlag GmbH
 31. Campàs M, Prieto-Simón B, Marty JL. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(1):3-9. doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.009.
 32. Vidal JC, Espuelas J, Castillo JR. Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. *Anal Biochem.* 2004;333(1):88-98. doi:10.1016/j.ab.2004.06.005.
 33. Polcari D, Kwan A, Van Horn MR, et al. Disk-shaped amperometric enzymatic biosensor for in vivo detection of D-serine. *Anal Chem.* 2014;86(7):3501-3507. doi:10.1021/ac404111u.
 34. Borgmann S, Hartwich G, Schulte A, Schuhmann W. Amperometric Enzyme Sensors based on Direct and Mediated Electron Transfer. *Perspect Bioanal.* 2005;1(C):599-655. doi:10.1016/S1871-0069(05)01017-7.
 35. Şenel M, Çevik E, Abasiyanik MF. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator. *Sensors Actuators, B Chem.* 2010;145(1):444-450. doi:10.1016/j.snb.2009.12.055.
 36. Ruan C, Yang R, Chen X, Deng J. A reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalently binding horseradish peroxidase and thionine using a thiol-modified gold electrode. *J Electroanal Chem.* 1998;455(1-2):121-125. doi:10.1016/S0022-0728(98)00153-3.
 37. Ferreira AAP, Colli W, Alves MJM, et al. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T. cruzi by AFM and amperometric measurements. *Electrochim Acta.* 2006;51(24):5046-5052. doi:10.1016/j.electacta.2006.03.061.

38. Qiu JD, Zhou WM, Guo J, Wang R, Liang RP. Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose. *Anal Biochem.* 2009;385(2):264-269. doi:10.1016/j.ab.2008.12.002.
39. Bard AJ, Mirkin M V. *Scanning Electrochemical Microscopy.*; 2012. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
40. Zoski CG. Review—Advances in Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). *J Electrochem Soc.* 2016;163(4):H3088-H3100. doi:10.1149/2.0141604jes.
41. Santana JJ, González S, Izquierdo J, Souto RM. Usos de la microscopía electroquímica de barrido (SECM) para la investigación de procesos localizados de corrosión. 2011:44-49.
42. Zoski CG, Aguilar JC, Bard AJ. Scanning electrochemical microscopy. 46. Shielding effects on reversible and quasireversible reactions. *Anal Chem.* 2003;75(13):2959-2966. doi:10.1021/ac034011x.
43. Zeradjanin AR, Schilling T, Seisel S, Bron M, Schuhmann W. Visualization of Chlorine Evolution at Dimensionally Stable Anodes by Means of Scanning Electrochemical Microscopy. | *Anal Chem.* 2011;83:7645-7650. doi:10.1021/ac200677g.
44. Mirkin M V., Richards TC, Bard AJ. Scanning electrochemical microscopy. 20. Steady-state measurements of the fast heterogeneous kinetics in the ferrocene/acetonitrile system. *J Phys Chem.* 1993;97(29):7672-7677. doi:10.1021/la904521w.
45. Fernández JL, Bard AJ. Scanning electrochemical microscopy. 47. Imaging electrocatalytic activity for oxygen reduction in an acidic medium by the tip generation-substrate collection mode. *Anal Chem.* 2003;75(13):2967-2974. doi:10.1021/ac0340354.
46. Smalley JF, Feldberg SW, Chidsey CED, Linford MR, Newton MD, Liu Y-P. The Kinetics of Electron Transfer Through Ferrocene-Terminated Alkanethiol Monolayers on Gold. *J Phys Chem.* 1995;99(35):13141-13149. doi:10.1021/j100035a016.
47. Bonazza HL, Fernandez JL. An efficient method for fabrication of disk-shaped scanning electrochemical microscopy probes with small glass-sheath thicknesses. *J Electroanal Chem.* 2010;650(1):75-81. doi:10.1016/j.jelechem.2010.09.004.


48. Ruan C, Wang W, Gu B. Surface-enhanced Raman scattering for perchlorate detection using cystamine-modified gold nanoparticles. *Anal Chim Acta*. 2006;567(1 SPEC. ISS.):114-120. doi:10.1016/j.aca.2006.01.097.
49. Murgida DH, Hildebrandt P. Disentangling interfacial redox processes of proteins by SERR spectroscopy. *Chem Soc Rev*. 2008;37(5):937-945. doi:10.1039/b705976k.
50. Windows M, Os M, When CP, et al. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy*. Vol XXXIII. 2014. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
51. Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry.*; 2009. doi:10.1002/9780470405840.
52. Zaera F. Probing Liquid / Solid Interfaces at the Molecular Level. *Chem Rev*. 2012;112:2920-2986. doi:10.1021/cr2002068.
53. Baik JM, Lee SJ, Moskovits M. Polarized surface-enhanced Raman spectroscopy from molecules adsorbed in nano-gaps produced by electromigration in silver nanowires. *Nano Lett*. 2009;9(2):672-676. doi:10.1021/n1803145d.
54. Seung JL, Jeong MB, Moskovits M. Polarization-dependent surface-enhanced raman scattering from a silver-nanoparticle-decorated single silver nanowire. *Nano Lett*. 2008;8(10):3244-3247. doi:10.1021/nl801603j.
55. Fan M, Andrade GFS, Brolo AG. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Anal Chim Acta*. 2011;693(1-2):7-25. doi:10.1016/j.aca.2011.03.002.
56. Dixon MC. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: Enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. *J Biomol Tech*. 2008;19(3):151-158.
57. Delcroix MF, Demoustier-Champagne S, Dupont-Gillain CC. Quartz crystal microbalance study of ionic strength and pH-dependent polymer conformation and protein adsorption/desorption on PAA, PEO, and mixed PEO/PAA brushes. *Langmuir*. 2014;30(1):268-277. doi:10.1021/la403891k.
58. Briand E, Humblot V, Landoulsi J, et al. Chemical modifications of Au/SiO₂ template substrates for patterned biofunctional surfaces. *Langmuir*. 2011;27(2):678-685. doi:10.1021/la101858y.
59. Irwin EF, Ho JE, Kane SR, Healy KE. Analysis of interpenetrating polymer networks via quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Langmuir*. 2005;21(12):5529-5536. doi:10.1021/la0470737.

60. Herrera E. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos. *Tesis Dr.* 2013.
61. Valenti LE, Martins VL, Herrera E, Torresi RM, Giacomelli CE. Ni(ii)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins. *J Mater Chem B.* 2013;1(38):4921. doi:10.1039/c3tb20769b.
62. Sedeva IG, Fetzer R, Fornasiero D, Ralston J, Beattie D a. Adsorption of modified dextrans to a hydrophobic surface: QCM-D studies, AFM imaging, and dynamic contact angle measurements. *J Colloid Interface Sci.* 2010;345(2):417-426. doi:10.1016/j.jcis.2010.01.075.
63. Hook F, Rodahl M, Brzezinski P, Kasemo B. QCM-measurements of ferritin monolayers on methyl-thiolated gold; Dependence of energy dissipation and saturation coverage on salt concentration. *Doktorsavhandlingar vid Chalmers Tek Hogsk.* 1997;67(1356):63-67. doi:10.1006/jcis.1998.5774.
64. Dubacheva G V, Van Der Heyden A, Dumy P, et al. Electrochemically controlled adsorption of Fc-functionalized polymers on β -CD-modified self-assembled monolayers. *Langmuir.* 2010;26(17):13976-13986. doi:10.1021/la102026h.
65. Dutta AK, Nayak A, Belfort G. Viscoelastic properties of adsorbed and cross-linked polypeptide and protein layers at a solid-liquid interface. *J Colloid Interface Sci.* 2008;324(1-2):55-60. doi:10.1016/j.jcis.2008.04.065.
66. Cao Z, Zhang L, Guo CY, et al. Evaluation on corrosively dissolved gold induced by alkanethiol monolayer with atomic absorption spectroscopy. *Mater Sci Eng C.* 2009;29(3):1051-1056. doi:10.1016/j.msec.2008.09.010.
67. Boujday S, Méthivier C, Beccard B, Pradier CM. Innovative surface characterization techniques applied to immunosensor elaboration and test: Comparing the efficiency of Fourier transform-surface plasmon resonance, quartz crystal microbalance with dissipation measurements, and polarization modulation-re. *Anal Biochem.* 2009;387(2):194-201. doi:10.1016/j.ab.2009.01.031.
68. Tognalli NG, Fainstein A, Vericat C, Vela ME, Salvarezza RC. Exploring three-dimensional nanosystems with Raman spectroscopy: methylene blue adsorbed on thiol and sulfur monolayers on gold. *J Phys Chem B.* 2006;110(1):354-360. doi:10.1021/jp054541s.
69. Pissinis DE, Linarez Pérez OE, Cometto FP, López Teijelo M. Preparation and characterization of self assembled monolayers of 2-mercaptosuccinic acid on Au(111). *J Electroanal Chem.* 2014;712:167-177. doi:10.1016/j.jelechem.2013.11.013.

70. Hamelin a., Martins a. M. Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 2. Behaviour of high-index faces. *J Electroanal Chem.* 1996;407:13-21. doi:10.1016/0022-0728(95)04500-7.
71. Carvalhal RF, Freire RS, Kubota LT. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanalysis.* 2005;17(14):1251-1259. doi:10.1002/elan.200403224.
72. Jarzabek G, Borkowska Z. On the real surface area of smooth solid electrodes. *Electrochim Acta.* 1997;42(19):2915-2918. doi:10.1016/S0013-4686(97)00112-6.
73. Baranski AS, Norouzi P. Voltammetric determination of surface active compounds at Au and Pt ultramicroelectrodes in flowing solutions. *Can J Chem.* 1997;75:1736-1749.
74. Hoogvliet J, Dijkema M, Kamp B, van Bennekom WP. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4. *Anal Chem.* 2000;72(9):2016-2021. doi:10.1021/ac991215y.
75. Stults NL, Lin P, Hardy M, et al. Immobilization of proteins on partially hydrolyzed agarose beads. *Anal Biochem.* 1983;135(2):392-400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6660514>.
76. Yi X, Huang-Xian J, Hong-Yuan C. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloid/cysteamine-modified gold electrode. *Anal Biochem.* 2000;278(1):22-28. doi:10.1006/abio.1999.4360.
77. Villoslada R, Alonso B, Casado CM, García-Armada P, Losada J. Anion receptor electrochemical sensing properties of poly(propyleneimine) dendrimers with ferrocenylamidoalkyl terminal groups. *Organometallics.* 2009;28(3):727-733. doi:10.1021/om8007019.
78. Chidsey CED, Bertozzi CR, Putvinski TM, Muijsce a M. Coadsorption of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold: electroactive self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc.* 1990;112(11):4301-4306. doi:10.1021/ja00167a028.
79. Chidsey CED, Bertozzi CR, Putvinski TM, Muijsce AM. Coadsorption of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold: electroactive self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc.* 1990;112(11):4301-4306. doi:10.1021/ja00167a028.
80. Rodenhausen KB, Duensing BA, Kasputis T, et al. In-situ monitoring of alkanethiol self-assembled monolayer chemisorption with combined

spectroscopic ellipsometry and quartz crystal microbalance techniques. *Thin Solid Films*. 2011;519(9):2817-2820. doi:10.1016/j.tsf.2010.11.081.

81. Pensa E, Vericat C, Grumelli D, et al. New insight into the electrochemical desorption of alkanethiol SAMs on gold. *Phys Chem Chem Phys*. 2012;14(35):12355. doi:10.1039/c2cp41291h.
82. Newton L, Slater T, Clark N, Vijayaraghavan A. Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. *J Mater Chem C*. 2013;1(3). doi:10.1039/c2tc00146b.
83. Ferapontova E, Schmengler K, Börchers T, Ruzgas T, Gorton L. Effect of cysteine mutations on direct electron transfer of horseradish peroxidase on gold. *Biosens Bioelectron*. 2002;17(11-12):953-963. doi:10.1016/S0956-5663(02)00087-8.
84. Liu JQ, Paddon-Row MN, Gooding JJ. Heterogeneous Electron Transfer Study for Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) and Ferrocene through Pure and Mixed Aliphatic Alkyl SAMs on Gold Electrode. *J Phys Chem B*. 2004;108:8460-8466.
85. Uosaki K, Sato Y, Kita H. Electrochemical Characteristics of a Gold Electrode Modified with a Self -Assembled Monolayer of Ferrocenylalkanethiols. *Langmuir*. 1991;7(7):1510-1514. doi:10.1021/la00055a038.
86. Herrera E, Giacomelli CE. Surface coverage dictates the surface bio-activity of d-amino acid oxidase. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;117:296-302. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.050.
87. Silva F, Martins A. Surface structural effects on specific adsorption of oxoanions on gold single crystal electrodes. *J Electroanal Chem*. 1999;467(1-2):335-341. doi:10.1016/S0022-0728(99)00165-5.



Capítulo 4

Modificación y caracterización de sustratos sólidos de oro monocristalino (Au(111))

“Fue el tiempo que pasaste con tu rosa lo que la hizo tan importante”.

Antoine Saint Exupery



4.1.- Introducción

Existen numerosas variantes de SAMs sobre sustratos metálicos dependiendo de la combinación entre el bloque molecular y el tipo de sustrato sólido¹⁻⁸. El oro monocristalino, en particular el Au(111), presenta ciertas características que lo convierten en uno de los sustratos favoritos para el estudio de las SAMs. Este tipo de sustrato sólido brinda la posibilidad de lograr un mayor empaquetamiento. Además, permite formar SAMs de manera simple y en tiempos cortos. También, se lo usa como sistema para comprender la estructura y composición general de los sistemas tiol-metal. Este hecho, se debe a la naturaleza inerte del oro que facilita tanto la obtención de superficies limpias bien definidas, como la unión entre el azufre y el metal. Sin embargo, esto no significa que todo lo que se estudie en el sistema Au(111)-tiol pueda ser extrapolado a otros metales como Ag, Pd, Pt, Cu o Ni^{9,10} e incluso a sustratos de oro policristalino¹¹⁻¹⁴.

En este capítulo, se presenta el comportamiento electroquímico de sustratos de Au(111) modificados con SAMs de 6-ferrocenil hexanotiol (Fc) a partir del estudio de la respuesta voltamperométrica en diferentes electrolitos y su interpretación, utilizando modelos computacionales para ajustar los voltamperogramas cíclicos experimentales. Además, se analizan los voltamperogramas cíclicos de las SAMs simples de ácido 3- mercaptopropionico (3-COOH) y ácido 6-mercaptohexanoico (6-COOH) formadas sobre Au(111) y sus espectros SERS. A partir de los resultados obtenidos con las SAMs simples, se discuten las respuestas voltamperométricas de las SAMs mixtas en combinación con resultados obtenidos por SECM. En el contexto del objetivo general de esta Tesis Doctoral, el hecho de poder comprender el comportamiento de este sistema modelo permitirá sentar bases racionales sobre las cuales modificar los sustratos de Au policristalinos que serán utilizados para preparar la superficie biofuncional.

4.2.- Resultados y discusión

4.2.1.- Sustratos de Au(111) modificados con SAMs simples

4.2.1.1.- SAMs de 6-ferrocenil hexanotiol (Fc)

4.2.1.1.1.- Voltamperometría cíclica

Oxidación del Ferroceno adsorbido

Para comenzar, se modificaron los sustratos de Au(111) por inmersión en soluciones de Fc 1,00 mM preparadas en CH_2Cl_2 durante 15 h para estudiar el comportamiento redox del mediador electroquímico adsorbido. En la Figura 4.1 a, b y c, se muestran los voltamperogramas cíclicos (expresados como densidades de corriente, j , en función del potencial aplicado, E , determinado con un ER de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{sat})}$) de SAMs de Fc, realizados en HClO_4 1,00 M a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ para distintos ciclos (2 y 10). Estos voltamperogramas cíclicos se determinaron utilizando distintos sustratos de Au(111) modificados de igual manera. Evidentemente, el comportamiento observado en el ciclo 2 no es reproducible para distintos sustratos, mientras que el comportamiento converge a uno en común para el ciclo 10. Los voltamperogramas cíclicos de la Figura 4.1 representan las tres grandes familias en las cuales se pudo agrupar el total de los resultados experimentales obtenidos.

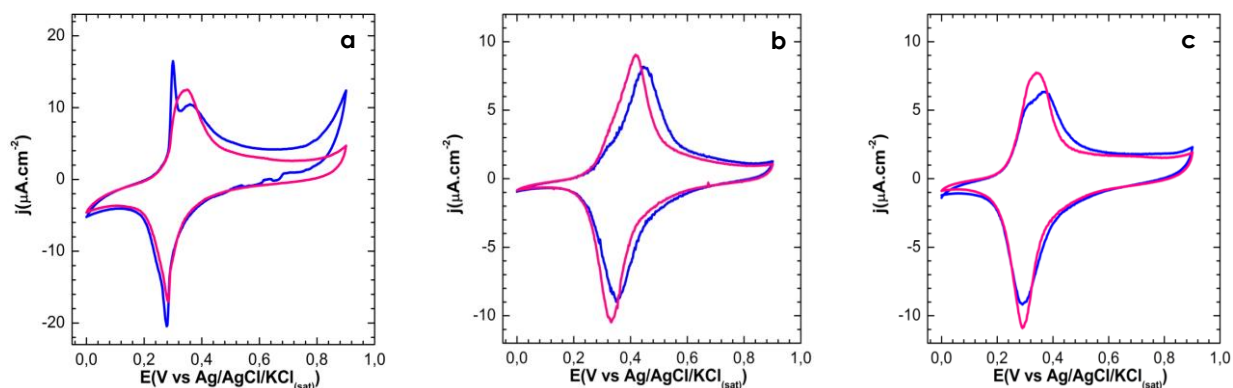


Figura 4.1.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 h) para los ciclos 2 (—) y 10 (—) registrados a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ en HClO_4 1,00 M para las familias a.-I, b.- II y c.- III.

En las tres familias de resultados, se observó que durante los primeros cinco barridos anódicos aparecen dos señales de oxidación (E_o) entre 0,30 V y 0,45 V que se desplazan en potencial durante los sucesivos ciclos. En la familia I, esas señales están claramente diferenciadas (Tabla 4.1) mientras que, en las otras la señal de menor potencial aparece como un hombro (familia II) o ambas señales se encuentran solapadas (familia III). A partir del ciclo 6, sólo se registra una señal de oxidación para las tres familias (Tabla 4.1). Al analizar los perfiles de reducción, se observa que el potencial (E_r) aparece entre 0,29 V y 0,34 V y se mantiene constante durante el ciclado.

Familias	E_o (Ciclo 2) (V)	E_o (Ciclo 6) (V)	E_o (Ciclo 10) (V)
I	0,30 ± 0,02 0,37 ± 0,05	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,02
II	0,32 ± 0,02 0,45 ± 0,05	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,02
III	0,31 ± 0,02 0,37 ± 0,05	0,34 ± 0,02	0,34 ± 0,02

Tabla 4.1.- Potenciales de oxidación (E_o) en las tres familias de resultados para los ciclos 2, 6 y 10 determinados con sustratos de Au(111) modificados con SAMs de Fc.

Sobre la base de estos resultados, se utilizó el ciclado (10 ciclos) en HClO_4 1,00 M a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ previo a las siguientes determinaciones experimentales ya que este procedimiento provoca una homogenización del comportamiento electroquímico del mediador redox adsorbido, permitiendo así continuar la modificación superficial a partir de sustratos con características reproducibles.

La Figura 4.2 muestra perfiles de j/E para los ciclos 2 y 10 determinados con el sustrato de Au(111) modificado con Fc (preparado por inmersión en una solución de Fc 10,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas), analizados bajo las mismas condiciones que los sustratos anteriores. En este caso, se puede ver la presencia de los dos picos de oxidación durante todo el ciclado. Un dato interesante surge al observar que el E_o que aparece a 0,30 V, permanece constante durante todo el ciclado mientras que el segundo E_o aparece en 0,40 V y se desplaza con el ciclado hasta 0,35 V.

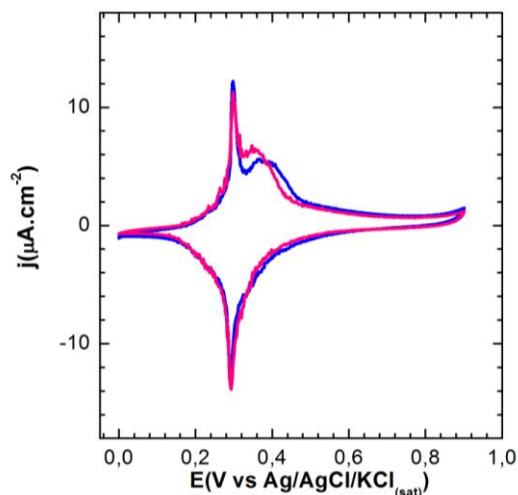


Figura 4.2.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de Fc adsorbido (preparado a partir de la inmersión en una solución 10,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) para los ciclos 2 (—) y 10 (—) registrados a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ en HClO_4 1,00 M.

La Figura 4.3 a muestra la respuesta voltamperométrica de un sustrato de Au(111) modificado con Fc (preparado por inmersión en una solución de Fc 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) luego del ciclado en HClO_4 1,00 M (10 Ciclos) a distintas velocidades de barrido. La Figura 4.3 b presenta la variación de las densidades de corriente de oxidación (j_o) y de reducción (j_r) en función de v , mientras que la Figura 4.3 c muestra los valores de E_o y E_r vs v . Los voltamperogramas cíclicos presentan una señal de oxidación y otra de reducción a distintos potenciales. Asimismo, estos voltamperogramas cíclicos dejaron ver un incremento lineal de los valores de j con las v estudiadas. De acuerdo a los criterios de diagnóstico discutidos en el capítulo anterior para caracterizar el proceso de transferencia de carga a partir del perfil j - E medido experimentalmente, esta respuesta es propia de especies redox adsorbidas sobre el sustrato. Sin embargo, el proceso redox del Fc adsorbido sobre el sustrato sólido de Au(111) no es reversible ya que la diferencia entre los valores de E_o y E_r es distinta de cero.

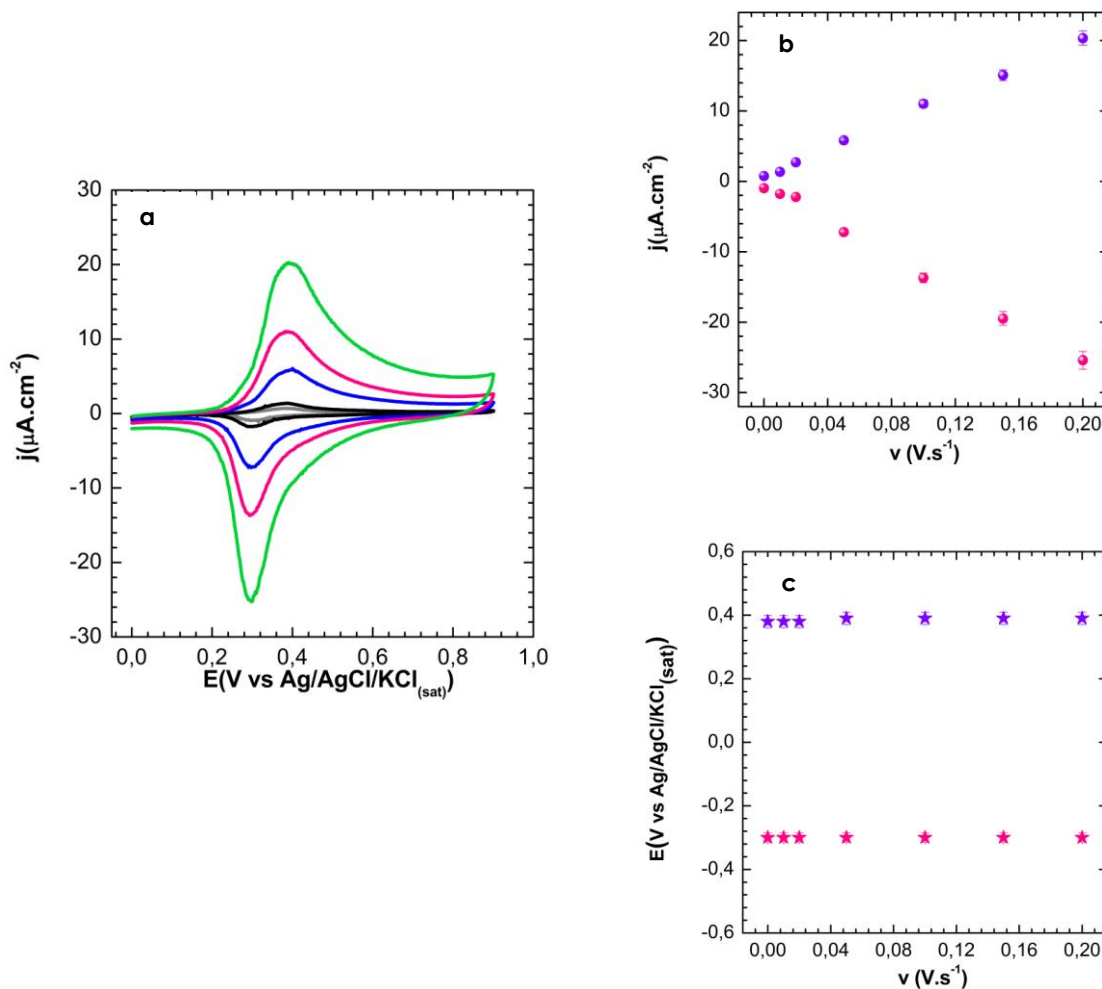


Figura 4.3 a.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas) en HClO₄ 1,00 M registrados a 0,005 V.s⁻¹ (—); 0,010 V.s⁻¹ (—); 0,050 V.s⁻¹ (—); 0,100 V.s⁻¹ (—) y 0,150 V.s⁻¹ (—). Dependencia de: b.- las densidades de corriente de oxidación (j_o) y de reducción (j_r) y c.- de los potenciales de oxidación (E_o) y reducción (E_r) con la velocidad de barrido (v).

La modificación de los sustratos sólidos con SAMs tiene como finalidad la preparación de superficies biofuncionales que serán evaluadas en presencia de electrolitos compatibles con la actividad enzimática. Por lo tanto, teniendo en cuenta el electrolito soporte que se utilizará en la última etapa de la preparación de las superficies biofuncionales, se evaluó la respuesta electroquímica de los sustratos Au(111) modificados con Fc en distintos electrolitos. Los electrolitos seleccionados representan modificaciones graduales desde el HClO₄ 1,00 M comúnmente utilizado en las determinaciones electroquímicas¹⁴⁻²¹ hasta buffer

pirofosfato 0,10 M a pH 8,50 (BF) necesario para determinar la actividad enzimática de la DAAO^{22,23}.

Las Figuras 4.4 y 4.5 muestran las señales registradas para los voltamperogramas cíclicos de los sustratos de Au(111) modificados con SAMs de Fc luego del ciclado en HClO₄ 1,00 M cuando se sumergen en solución de NaClO₄ 1,00 M y 0,10 M, respectivamente. Particularmente, en las Figuras 4.4 a y 4.5 a se muestran las respuestas voltamperométricas a distintas v , en las Figuras 4.4 b y 4.5 b se observa la dependencia de j_o y j_r con v mientras que en las Figuras 4.4 c y 4.5 c se presentan los valores de E_o y E_r vs. v .

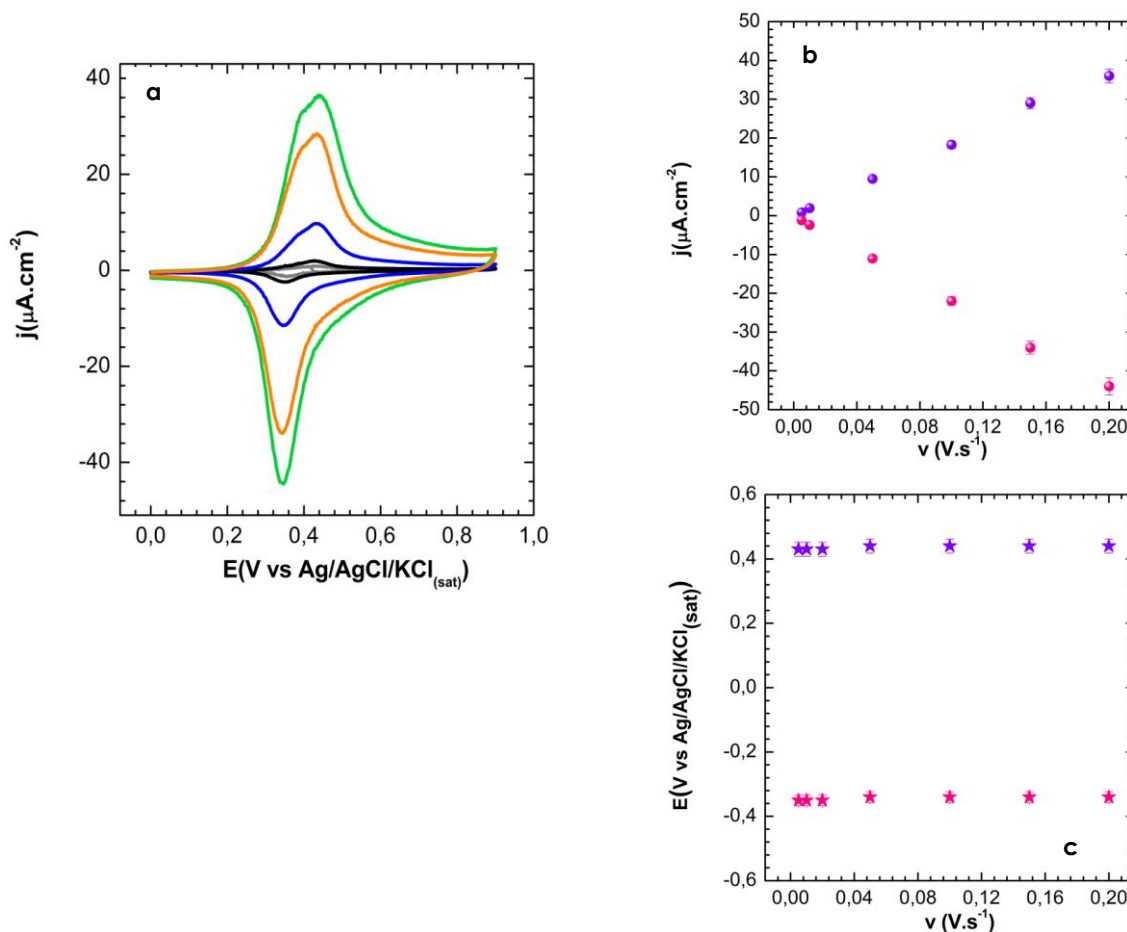


Figura 4.4 a.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas) en NaClO₄ 1,00 M registrados a 0,005 V.s⁻¹ (—); 0,010 V.s⁻¹ (—); 0,050 V.s⁻¹ (—); 0,150 V.s⁻¹ (—) y 0,200 V.s⁻¹ (—). Dependencia de: b.- las densidades de corriente de oxidación (j_o) y de reducción (j_r) y c.- de los potenciales de oxidación (E_o) y reducción (E_r) con la velocidad de barrido (v).

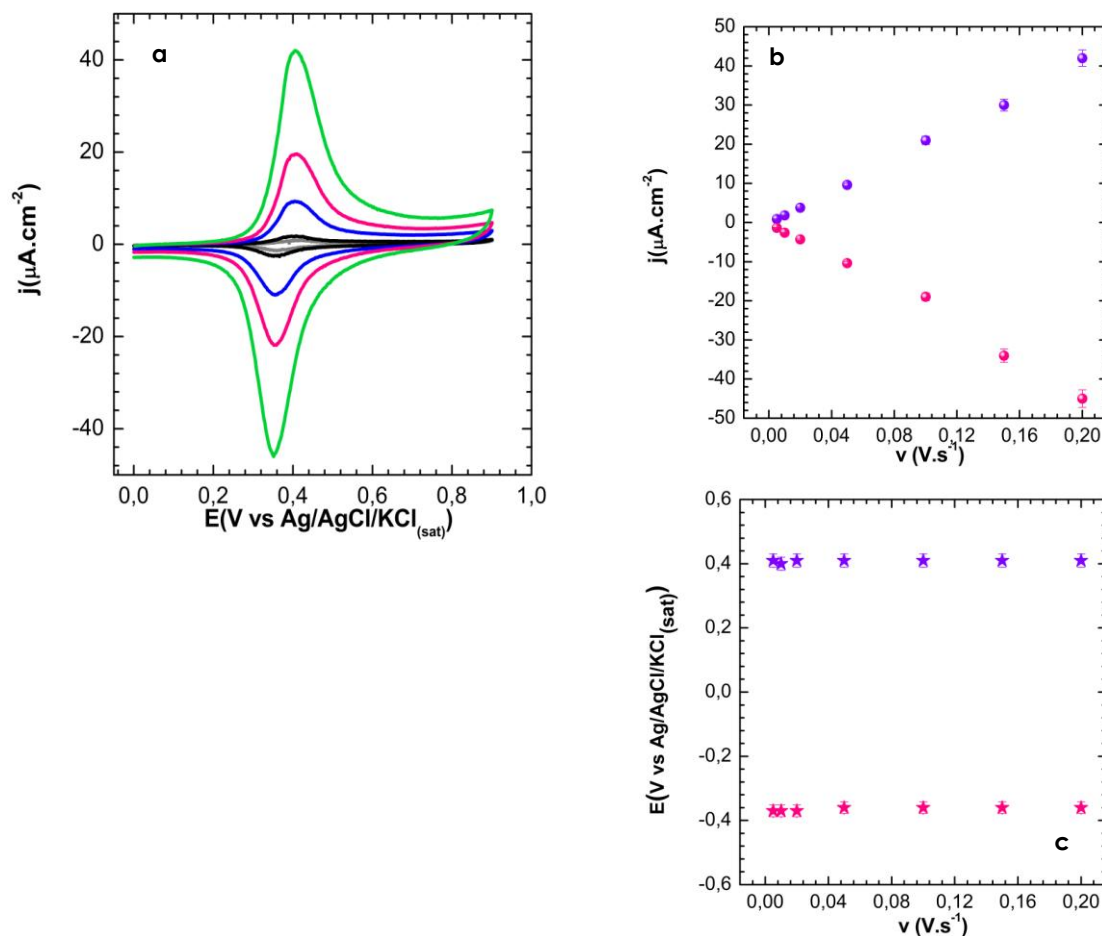


Figura 4.5 a.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas) en NaClO₄ 0,10 M registrados a 0,005 V.s⁻¹ (—); 0,010 V.s⁻¹ (—); 0,050 V.s⁻¹ (—); 0,100 V.s⁻¹ (—) y 0,200 V.s⁻¹ (—). Dependencia de: b.- las densidades de corriente de oxidación (j_o) y de reducción (j_r) y c.- de los potenciales de oxidación (E_o) y reducción (E_r) con la velocidad de barrido (v).

Las figuras revelan que la concentración del electrolito provoca cambios en la forma de los voltamperogramas cíclicos, efecto que se evidencia con la aparición de una segunda señal de oxidación en el barrido anódico en presencia de NaClO₄ 1,00 M. La relación lineal entre los valores de j y v , propia de las especies adsorbidas, se continúa observando con el cambio del electrolito y de la concentración. Además, se observa que los valores de E_o y E_r se mantienen constantes en un intervalo de v entre 0,005 V.s⁻¹ y 0,200 V.s⁻¹ aunque su diferencia continúa siendo distinta de cero. La Figura 4.6 muestra los respectivos voltamperogramas cíclicos a distintas v determinados en BF. En estas condiciones,

sólo se registra un pico de oxidación a 0,50 V y otro de reducción a 0,42 V. Durante el barrido anódico, se puede ver un aumento muy marcado de j_o en los valores de E más positivos debido a la interferencia de los aniones fosfatos. Como se mencionó en el Capítulo 3, muchos trabajos informan la adsorción de estos aniones sobre los sustratos de Au(111) provocando este tipo de respuestas^{24,25}.

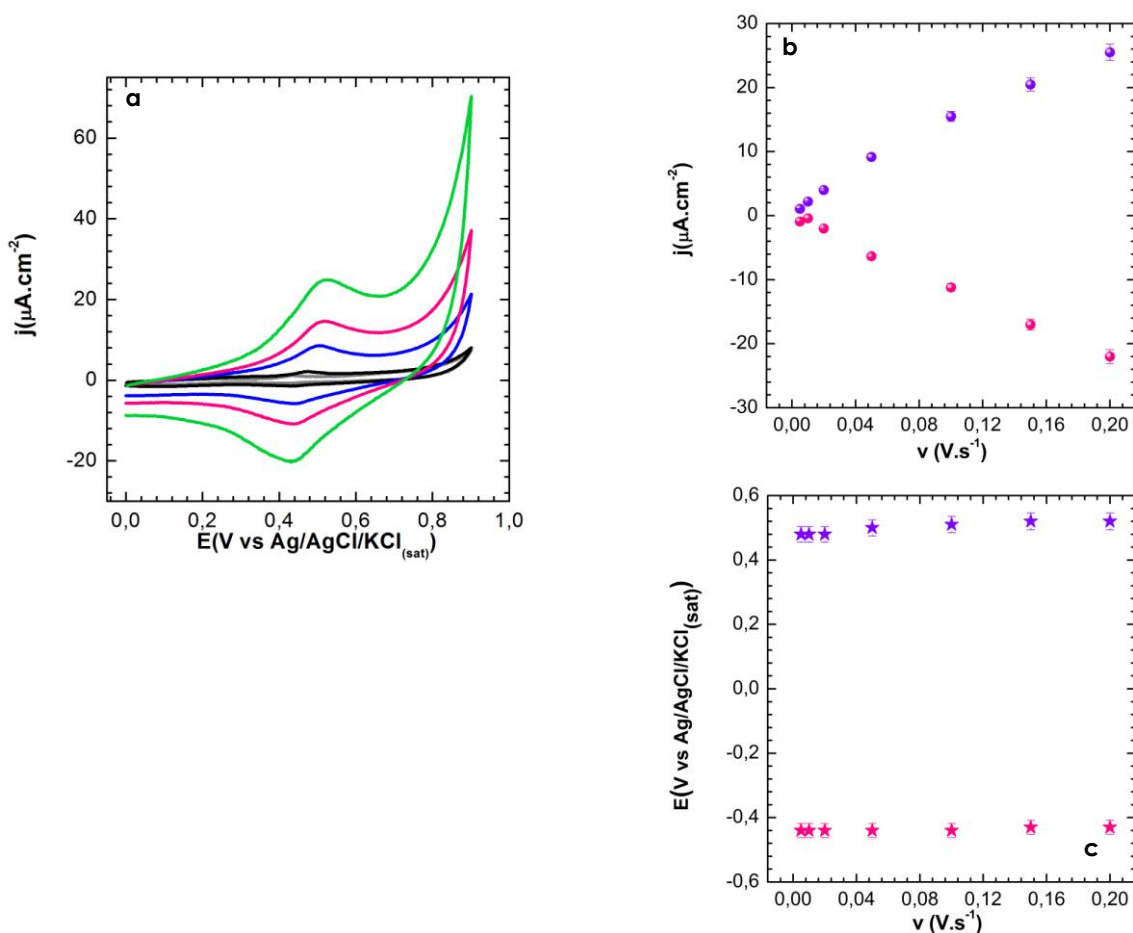


Figura 4.6 a.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) en BF 0,10 M registrados a 0,005 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—); 0,010 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—); 0,050 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—); 0,100 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—) y 0,200 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (—). Dependencia de: b.- las densidades de corriente de oxidación (j_o) y de reducción (j_r) y c.- de los potenciales de oxidación (E_o) y reducción (E_r) con la velocidad de barrido (v).

A partir de los resultados obtenidos de las relaciones entre j y v , se realizó un análisis de regresión lineal que se muestra en la Tabla 4.2 para las señales de oxidación (primera fila) y de reducción (segunda fila) de los sustratos de Au(111) modificados con SAMs de Fc luego del ciclado en HClO_4 1,00 M y sumergidos en distintos electrolitos.

Electrolito	Ordenada al origen ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Pendiente ($\mu\text{A}\cdot\text{s}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	R^2
HClO ₄ 1,00 M	0,8 ± 0,2	0,10 ± 0,02	0,9978
	-1,0 ± 0,1	-0,13 ± 0,03	0,9934
NaClO ₄ 1,00 M	-0,9 ± 0,1	0,19 ± 0,07	0,9951
	-0,10 ± 0,04	-0,22 ± 0,01	0,9986
NaClO ₄ 0,10 M	-0,15 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,9971
	-0,3 ± 0,1	-0,20 ± 0,01	0,9982
BF 0,10 M pH 8,5	1,0 ± 0,6	0,12 ± 0,05	0,9863
	0,4 ± 0,5	-0,11 ± 0,03	0,9961

Tabla 4.2.- Parámetros calculados a partir de la recta de regresión lineal entre j y v obtenidos de los Voltamperogramas cíclicos medidos en distintos electrolitos de Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas).

En todos los casos, como se indicó anteriormente, la variación de la respuesta de j con v es lineal, como lo muestra el buen ajuste de la recta (R^2). A partir de las diferencias significativas entre los valores de las pendientes calculadas, se muestra claramente que el tipo y concentración del electrolito son los responsables de las distintas formas que presentan los voltamperogramas cíclicos como se señala en bibliografía^{18,26,27}. Otro resultado relevante proviene de los valores de las ordenadas al origen, ya que son tan pequeños que permiten concluir que la contribución de la corriente no faradaica para analizar las señales de los voltamperogramas cíclicos es despreciable.

La Tabla 4.3 muestra el promedio de los valores de E_o y E_r determinados a las distintas v utilizando los distintos electrolitos. Tal como se mencionó anteriormente, el proceso redox del mediador adsorbido no es reversible y este efecto es más marcado cuando aumenta la concentración del electrolito.

Electrolito	E_o (V)	E_r (V)	$\Delta E = E_o - E_r$ (V)
HClO ₄ 1,00 M	0,39 ± 0,02	-0,30 ± 0,02	0,09 ± 0,04
NaClO ₄ 1,00 M	0,43 ± 0,02	-0,34 ± 0,02	0,09 ± 0,04
NaClO ₄ 0,10 M	0,41 ± 0,02	-0,37 ± 0,02	0,04 ± 0,04
BF 0,10 M pH 8,5	0,50 ± 0,02	-0,44 ± 0,02	0,06 ± 0,04

Tabla 4.3.- Promedio de los valores de E_o y E_r calculados a partir de los voltamperogramas cíclicos medidos en distintos electrolitos y a diferentes v de Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas).

Muchos trabajos han puesto su atención en el estudio de las formas de los voltamperogramas cíclicos para especies redox adsorbidas utilizando simulaciones computacionales y modelado digital^{11,18,19,21,27-29}. Por ejemplo, autores como Ohtani y colaboradores^{27,30}, han simulado respuestas voltamperométricas para sistemas de especies redox adsorbidas sobre sustratos metálicos para entender el cambio en las formas de los voltamperogramas cíclicos. Estas simulaciones, consideran el efecto de la doble capa eléctrica sobre la cinética de transferencia de electrones y la formación de pares iónicos entre las especies redox adsorbidas sobre la superficie del metal y los iones del electrolito soporte. La Figura 4.7 muestra un esquema del modelo utilizado para calcular el potencial interfacial de una SAMs con especies redox adsorbidas sobre un sustrato metálico homogéneo. Este modelo considera un electrodo metálico plano de área A situado en $x = 0$ en contacto con dos regiones de distintas constantes dieléctricas (ϵ_1 y ϵ_2), ubicadas a las distancias d_1 y d_2 . Las especies redox adsorbidas, en sus formas oxidadas (O^+_{ads}) o reducidas (R_{ads}), se localizan en d_1 y la velocidad de transferencia de carga puede modularse a través del valor de la constante de transferencia de carga (k) desde un proceso reversible hasta uno cuasi-reversible. La formación de pares iónicos entre las especies adsorbidas y los contraiones del electrolito soporte ocurre en la región comprendida entre d_1 y d_2 . En el caso del esquema mostrado, como lo es con la cupla Fc^+/Fc , esta formación de pares iónicos se origina por la interacción de la especie O^+_{ads} con el anión X^- del electrolito. La solución del electrolito, de concentración C , representa la tercera región con ϵ_3 . La densidad de carga sobre la superficie del electrodo

metálico para $x = 0$ está dada por Φ_M y en el plano de transferencia electrónica (PET) para $x = d_1$ por Φ_{PET} . Finalmente, la carga eléctrica neta de la capa difusa está dada por Φ_{dif} . Por lo tanto, este modelo permite la comparación de los resultados teóricos con los experimentales, debido a que todos los parámetros involucrados en los ajustes computacionales tienen una relación directa con parámetros obtenidos experimentalmente. Por otro lado, si bien este modelo permite simular voltamperogramas cíclicos cuyas formas dependen del tipo y concentración del electrolito (fundamentalmente por la formación de pares iónicos), es necesario suponer una gran cantidad de parámetros a los cuales no se accede experimentalmente. Por esta razón, en esta Tesis Doctoral se realizaron ajustes de los voltamperogramas cíclicos experimentales siguiendo los lineamientos propuestos por Wandlowski y colaboradores¹⁸. Este tema, actualmente está siendo discutido^{31,32,33}.

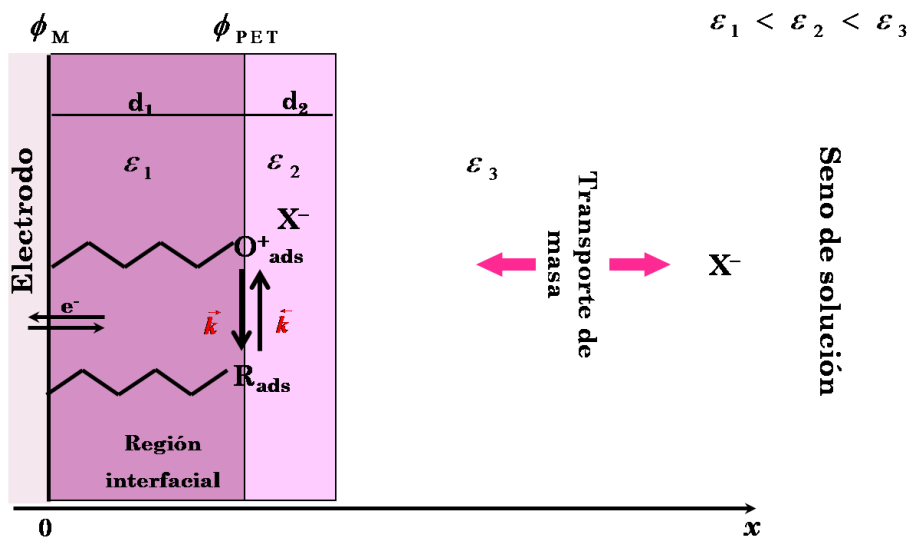


Figura 4.7.- Esquema del modelo de Ohtani para un electrodo metálico modificado con especies redox adsorbidas.

A diferencia de lo planteado por Ohtani³⁰ y colaboradores, Wandlowski¹⁸ y colaboradores consideran que las especies redox adsorbidas se encuentran sobre el sustrato metálico sin tener en cuenta las cadenas carbonadas. En particular, estos autores rescatan el procedimiento propuesto por Lennox y colaboradores²⁰ quienes utilizaron una sumatoria de funciones matemáticas (gaussianas) sin un

significado electroquímico explícito para ajustar las señales voltamperométricas. Sin embargo, este procedimiento les permitió postular la existencia de distintos dominios que contribuyen a la respuesta electroquímica global. El aporte de Wandlowski y colaboradores consistió en incorporar las ecuaciones emergentes del modelo electroquímico de Laviron²⁸ como las funciones matemáticas que determinan la corriente total del sistema. De este modo, es posible determinar las causas que dan lugar a voltamperogramas cíclicos con diferentes formas para especies redox adsorbidas. Para realizar estos ajustes, se considera que las especies redox se encuentran distribuidas al azar sobre el sustrato metálico y que existen interacciones atractivas o repulsivas entre las especies oxidadas, entre las especies reducidas y entre ambas. En este modelo, se define como parámetro vG al valor que representa el total de las interacciones (atractivas y repulsivas) presentes en el sistema durante un barrido de potencial:

$$vG = a_{OO} + a_{RR} - 2a_{OR} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde a_{OO} representa todas las interacciones de las especies oxidadas, a_{RR} a todas las interacciones de las especies reducidas y a_{OR} las interacciones entre ambas.

Los aportes del modelo de Laviron se reflejan en las Ecuaciones 4.2 y 4.3, y permiten la comparación directa con los datos experimentales obtenidos para un sistema formado por una única cupla redox con un único tipo de interacción sobre una superficie homogénea:

$$j = \frac{F^2 n^2}{RT} \Gamma_T \Psi v \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde j representa la densidad de corriente, Γ_T la cantidad total adsorbida de la especie redox, n es el número de electrones involucrados en el proceso de óxido/reducción y v es la velocidad de barrido. F , R y T representan la constante de Faraday, la constante universal de los gases y la temperatura absoluta, respectivamente. La función corriente adimensional, ψ , se define como:

$$\Psi = \frac{f(1-f)}{1-2\nu G\theta_T(1-f)} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

$$f = \theta_o / \theta_T \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Donde f representa la relación entre el grado de cubrimiento total (θ_T) y el de las especies oxidadas (θ_o). Es importante notar en este punto, que para una dada ψ , la ecuación 4.2 muestra la relación lineal entre j y ν discutida previamente a partir de los voltamperogramas cíclicos experimentales. Tal como se indicó, la pendiente de esa recta da cuenta de la forma de los voltamperogramas cíclicos que dependen de la función ψ . En la Figura 4.6 se observa, a modo de ejemplo, la dependencia de la función ψ con el potencial (normalizado respecto de E_o) para diferentes tipo de interacciones específicas para las especies adsorbidas: atracción ($\nu G > 0$), repulsión ($\nu G < 0$) o tipo Langmuir ($\nu G = 0$).

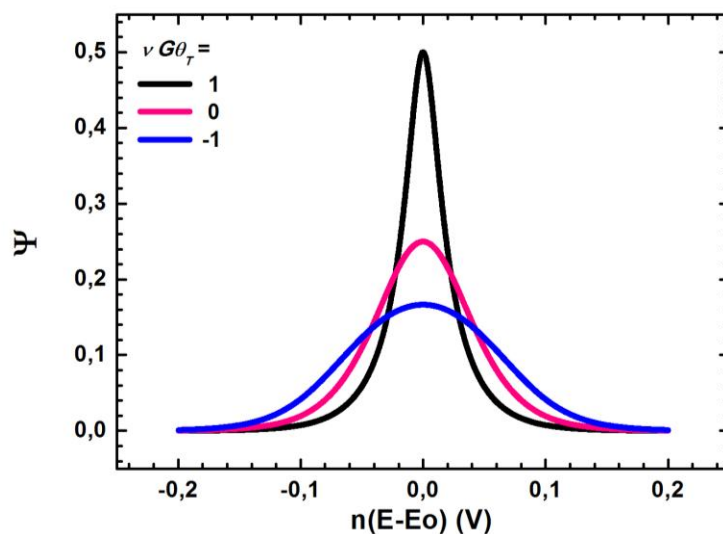


Figura 4.8.- Variación de la función ψ a 25°C. El valor de $\nu G\theta_T$ que se muestra en cada curva corresponde a interacciones atractivas (—), repulsivas (—) y tipo Langmuir (—).

Las interacciones globales atractivas o repulsivas dan lugar a procesos de oxidación que ocurren en intervalos de potencial más angostos o más anchos, respectivamente, respecto de las ondas con comportamiento tipo Langmuir. En consecuencia, los cambios de pendiente observados experimentalmente a partir de los gráficos j/v se relacionan con la presencia de distintas interacciones entre las especies adsorbidas que son moduladas por la concentración y tipo de electrolito.

Finalmente, Wandlowski y colaboradores¹⁸ consideraron que la función corriente total del sistema proviene de la sumatoria de las funciones corrientes parciales debidas a distintos dominios superficiales.

$$\psi_T = \sum_1^i \psi_i \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Es decir, el perfil voltamperométrico experimental es el resultado de varias contribuciones dadas por la presencia de dominios de una única cupla redox con distintas interacciones específicas. El ajuste de los voltamperogramas experimentales utilizando esta propuesta, se realizó en colaboración con el Dr. Sergio Dassie del INFIQC, Departamento de Físicoquímica. Para realizar el ajuste, se utilizó el mínimo conjunto de (ψ_i) que permitiera un buen acuerdo con los datos experimentales y se tomaron tres variables de ajuste para cada dominio: E_0 , vG y la contribución (porcentaje) de cada uno de ellos a la corriente total. Los resultados experimentales, fueron ajustados con la corriente total (Ecuación 4.5) del sistema propuesta mediante el método Simplex³⁴.

En la Figura 4.9 a, b y c se muestran los ajustes obtenidos de los barridos anódicos de los voltamperogramas cíclicos experimentales para los ciclos 2 y 10 (corregidos por la línea de base) de las tres familias encontradas para las de Fc sobre Au(111), analizadas en la Figura 4.1 (realizados en HClO_4 1,00 M a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$). Los símbolos corresponden a los datos experimentales (se muestran sólo algunos datos para permitir la comparación con el ajuste) mientras que las líneas de colores representan a los distintos dominios que dan cuenta del

proceso de oxidación del Fc adsorbido. Finalmente, las líneas negras representan la sumatoria de todas las contribuciones; es decir, el resultado del ajuste. Los ajustes obtenidos no se modifican para ninguno de los casos estudiados entre los ciclos 6 y 10.

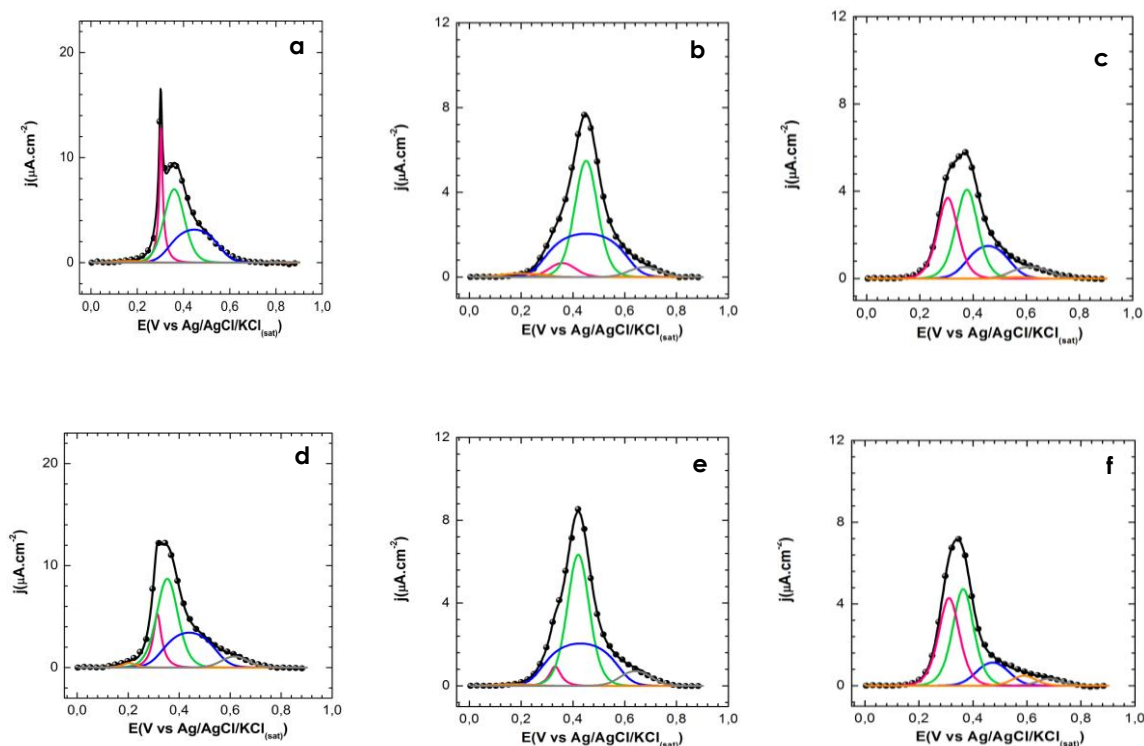


Figura 4.9 Voltamperogramas cíclicos experimentales (símbolos) registrados en HClO_4 1,00 M a $0,050 \text{ V.s}^{-1}$ y ajustados (—) para los ciclos 2 (a.-, b.- y c.-) y 10 (d.-, e.- y f.-) de las tres familias de resultados mostradas en la Figura 4.1 utilizando Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 h).

La Tabla 4.4 muestra los valores de E_0 y los signos de vG para los ciclos 2 y 10 de los tres dominios más importantes (representan más del 90% de todas las contribuciones) presentes en los voltamperogramas cíclicos de las tres familias discutidas previamente.

Contribución	Eo (V)	Ciclo 2	Ciclo 10
10%	$0,32 \pm 0,01$	$vG \gg 0$	$vG > 0$
45%	$0,39 \pm 0,03$	$vG \sim 0$	$vG \sim 0$
35%	$0,45 \pm 0,02$	$vG \ll 0$	$vG \ll 0$

Tabla 4.4.- Parámetros calculados a partir del ajuste de los Voltamperogramas cíclicos experimentales que dan cuenta del potencial de oxidación (Eo) y del tipo de interacciones (vG) entre las especies adsorbidas para las tres contribuciones mayoritarias.

En los barridos anódicos de los voltamperogramas cíclicos experimentales de las tres familias para todos los ciclos analizados, se observaron entre tres y cinco contribuciones. Sin embargo, en todos los casos se puede describir el comportamiento global con sólo tres dominios (indicados en la Tabla 4.4). El porcentaje de cada una de estas contribuciones así como los respectivos Eo no se modifican para las distintas familias ni ciclos: 10% se oxida con $E_o = (0,32 \pm 0,01)$ V, 45% lo hace con $E_o = (0,39 \pm 0,03)$ V y 35% con $E_o = (0,45 \pm 0,02)$ V. Del mismo modo, la densidad de carga total (Q_T), obtenida a partir de la integración de la señal de oxidación no depende del ciclo ni de la familia analizada. Los valores de Q_T calculados fueron de $(35 \pm 2) \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$, $(31 \pm 1) \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$ y $(26 \pm 2) \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$ para todos los ciclos de las familias I, II y III, respectivamente. Más aún, cuando se modificó el sustrato de Au(111) con Fc utilizando una solución 10,00 mM (Figura 4.2) se obtuvieron valores de $Q_T = (30 \pm 5) \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$. Dado que Q_T se relaciona directamente con la cantidad de moléculas de Fc adsorbido por unidad de área^{11,21}, se calculó que sobre el sustrato de Au(111) se adsorben $(3 \pm 1) \cdot 10^{-10}$ mol. cm^{-2} de Fc. Es decir, la cantidad adsorbida de Fc no se modifica con el ciclado ni aumentando la concentración de adsorbato. Estos valores concuerdan con los resultados publicados en bibliografía, si se tiene en cuenta que el largo de cadena de la SAMs se relaciona con las interacciones entre las cadenas y, en consecuencia, con el compactamiento de la monocapa. Rowe y colaboradores^{35,36} informan una Q_T de $46 \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$, calculada a partir de la integración manual de la señal de oxidación determinada en HClO_4 1,00 M, para sustratos de oro modificados con SAMs de Fc de cadenas carbonadas con seis

átomos de carbono. Por otro lado, Williams y colaboradores¹¹ informan valores de Q_T de $27 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ para sustratos de Au(111) modificados con el mismo tipo de SAMs aunque en este caso, fueron obtenidos a partir de la integración de la señal de oxidación de los voltamperogramas cíclicos en NaClO_4 1,00 M. Wandlowski y colaboradores¹⁸, también encontraron valores de Q_T de $43 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ aunque para sustratos modificados con Fc con cadenas de once átomos de carbono y calculados a partir de la señal de oxidación en HClO_4 0,10 M. Otros autores, como Porter y colaboradores²⁶ indican valores de Q_T de $(51\pm 10) \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $(38\pm 10) \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ para sustratos modificados con Fc de cadenas de once y ocho átomos de carbono, respectivamente.

Por otro lado, el parámetro vG que da cuenta del total de las interacciones presentes en el sistema durante el barrido de potencial, cambia a medida que se ciclan los sustratos modificados, particularmente en el dominio que se oxida a 0,32 V. Las interacciones atractivas ($vG \gg 0$) que se observan para el dominio de menor E_o en el ciclo 2, disminuyen durante los ciclos sucesivos. Este dominio es el mayoritariamente responsable de las diferentes familias observadas experimentalmente, ya que el parámetro de interacción es muy positivo para la familia I. Este comportamiento, se observa experimentalmente como dos señales claramente diferenciadas para esta familia mientras que en las otras, ambas señales se encuentran más solapadas (Tabla 4.1). El ciclado provoca una reorganización de este dominio tal que el valor de vG se hace menos positivo para las tres familias luego del ciclo 6. Por otra parte, los dominios a mayores E_o cuyos parámetros de interacción son tipo Langmuir y repulsivo, no se modifican sustancialmente con el ciclado. En consecuencia, los resultados ajustados permitieron concluir que el cambio en la forma de los voltamperogramas cíclicos que se observa durante el ciclado en HClO_4 1,00 M se debe a un reordenamiento superficial de los dominios de Fc adsorbido, en el cual van disminuyendo las interacciones atractivas. Una extensión lógica de este análisis debe incluir el efecto del cambio de v y del electrolito sobre los distintos dominios superficiales, ya que ambos podrían modificar tanto la cantidad adsorbida del mediador redox, como la distribución de dominios y su comportamiento electroquímico.

Usando las mismas herramientas, se analizaron los barridos anódicos de los voltamperogramas cíclicos experimentales realizados a distintas v y en los diferentes electrolitos soporte luego del ciclado en HClO_4 1,00 M. La Figura 4.10 muestra la respuesta electroquímica de Fc adsorbido sobre el sustrato de Au(111) en HClO_4 1,00 M para dos v : $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ y $0,200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Es importante resaltar en este punto que, si bien se realizaron los ajustes para todas las v estudiadas, la corrección por la línea de base es menos precisa para los voltamperogramas cíclicos determinados a v bajas ($v < 0,020 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$) debido a la menor densidad de corriente observada en estos casos. Por lo tanto, para realizar este análisis se decidió tomar los resultados obtenidos a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ y $0,200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ para mostrar tendencias generales del efecto de v en las formas de los voltamperogramas cíclicos para los distintos electrolitos. La Tabla 4.5 muestra las tres contribuciones más importantes presentes en los voltamperogramas cíclicos determinados a esas dos v en HClO_4 1,00 M.

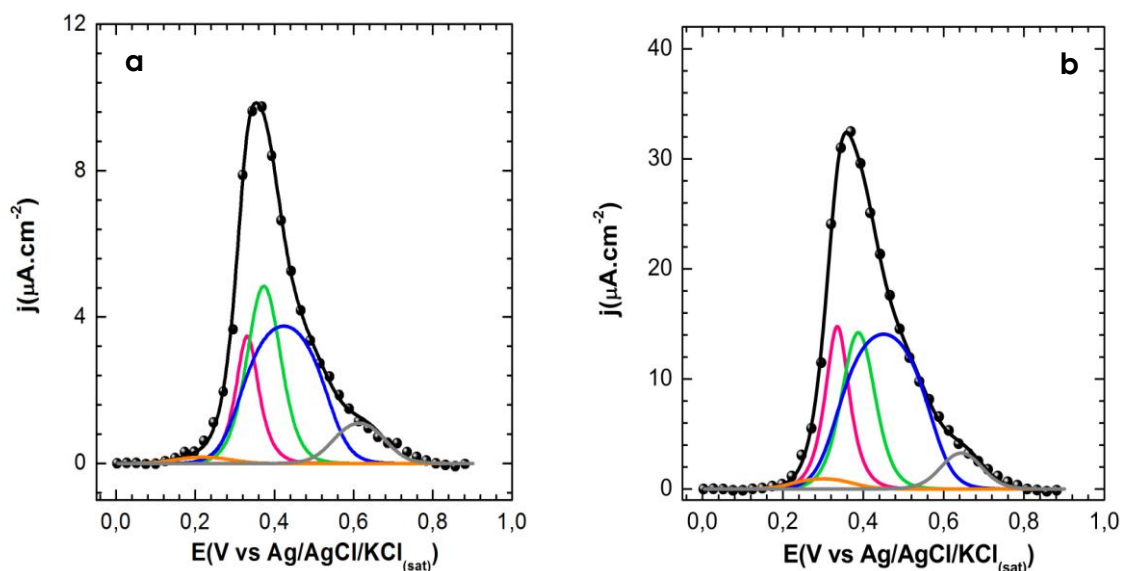


Figura 4.10.- Voltamperogramas cíclicos experimentales (símbolos) registrados en HClO_4 1,00 M y ajustados (—) utilizando Au(111)/Fc adsorbido (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) para dos v : a.- $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ y b.- $0,200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

HClO ₄ 1,00 M Contribución	0,050 V.s ⁻¹	0,200 V.s ⁻¹
1 (%)	15 ± 3	18 ± 3
E_o (V)	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,02
vG	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
2A (%)	30 ± 5	25 ± 5
E_o (V)	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,03
vG	-0,2 ± 0,1	-0,10 ± 0,05
3 (%)	45 ± 5	50 ± 5
E_o (V)	0,42 ± 0,02	0,45 ± 0,02
vG	-2,0 ± 0,5	-2,5 ± 0,5

Tabla 4.5.- Parámetros calculados a partir del ajuste de los voltamperogramas cíclicos experimentales que dan cuenta del potencial de oxidación (E_o) y tipo de interacciones (vG) entre las especies adsorbidas para las tres contribuciones mayoritarias presentes en sustratos de Au(111)/Fc en HClO₄ 1,00 M cuando v es 0,050 V.s⁻¹ y 0,200 V.s⁻¹.

Estos resultados muestran que v no provoca cambios en la distribución de los dominios, ni en sus respectivos valores de E_o ni en las interacciones específicas. Las pequeñas diferencias que se observan se deben a errores experimentales, en las correcciones de las líneas de base y a la heterogeneidad propia del sistema. Es decir, luego del ciclado en HClO₄ 1,00 M la modificación superficial, si bien heterogénea, es estable frente a los sucesivos cambios de v en el mismo electrolito.

La Figura 4.11 muestra las ondas anódicas determinadas en las mismas condiciones experimentales utilizando NaClO₄ 1,00 M como electrolito soporte y la Tabla 4.6 muestra las tres contribuciones más importantes presentes en los respectivos voltamperogramas cíclicos.

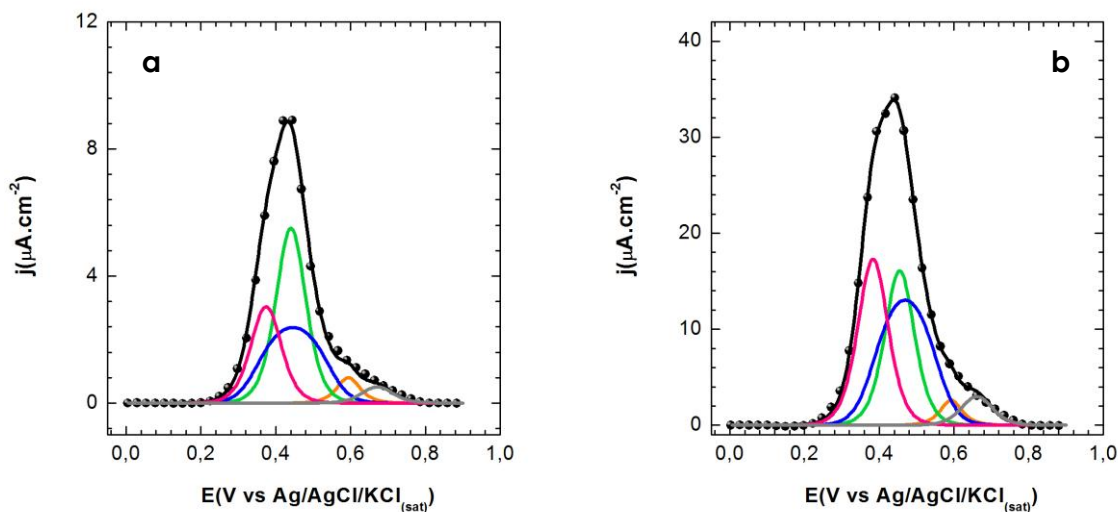


Figura 4.11.- Voltamperogramas cíclicos experimentales (símbolos) registrados en NaClO_4 1,00 M y ajustados (—) utilizando Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) para dos v : a.- $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ y b.- $0,200 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Si bien en NaClO_4 1,00 M también se observan tres dominios mayoritarios, ninguno de ellos presenta interacciones específicas de atracción. En estas condiciones, los valores de E_0 para las contribuciones mayoritarias, se presentan a potenciales más positivos que en el electrolito anterior y el valor de vG tiende a cero; es decir, presentan comportamiento tipo Langmuir. Por otra parte, el dominio con un valor de E_0 de aproximadamente 0,45 V no se modifica por el cambio de pH. Tampoco en este electrolito, se observan cambios en la distribución, en los valores de E_0 o en los parámetros de interacción cuando se modifica v . Estos resultados muestran que el cambio de pH del electrolito no afecta la heterogeneidad de la modificación superficial, aunque cambia el tipo de interacciones específicas, dando cuenta de la importancia del electrolito en el comportamiento electroquímico de las SAMs. Finalmente, la modificación superficial es estable frente al cambio de v también para los experimentos realizados en NaClO_4 1,00 M.

NaClO₄ 1,00 M Contribución	0,050 V.s⁻¹	0,200 V.s⁻¹
2A (%)	20 ± 5	30 ± 5
E_o (V)	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,02
vG	-0,10 ± 0,03	-0,08 ± 0,03
2B (%)	40 ± 5	25 ± 5
E_o (V)	0,44 ± 0,02	0,45 ± 0,02
vG	-0,08 ± 0,03	-0,06 ± 0,03
3 (%)	30 ± 5	35 ± 5
E_o (V)	0,45 ± 0,02	0,47 ± 0,02
vG	-1,5 ± 0,5	-1,5 ± 0,5

Tabla 4.6.- Parámetros calculados a partir del ajuste de los voltamperogramas cíclicos experimentales que dan cuenta del potencial de oxidación (E_o) y tipo de interacciones (vG) entre las especies adsorbidas para las tres contribuciones mayoritarias presentes en sustratos de Au(111)/Fc en NaClO₄ 1,00 M cuando v es 0,050 V.s⁻¹ y 0,200 V.s⁻¹.

Cuando el electrolito es menos concentrado, Figura 4.12 y Tabla 4.7, nuevamente se observan tres poblaciones mayoritarias con valores de E_o más positivos respecto de los encontrados con los experimentos realizados en NaClO₄ 1,00 M, aunque con una importante disminución en el dominio con interacciones repulsivas. Estos resultados indican que tanto el pH como la concentración de iones modifican el tipo de interacciones en los distintos dominios superficiales. Tampoco en este caso, se observa un efecto de v sobre la distribución y comportamiento electroquímico de los dominios, dando cuenta de la estabilidad de la modificación superficial.

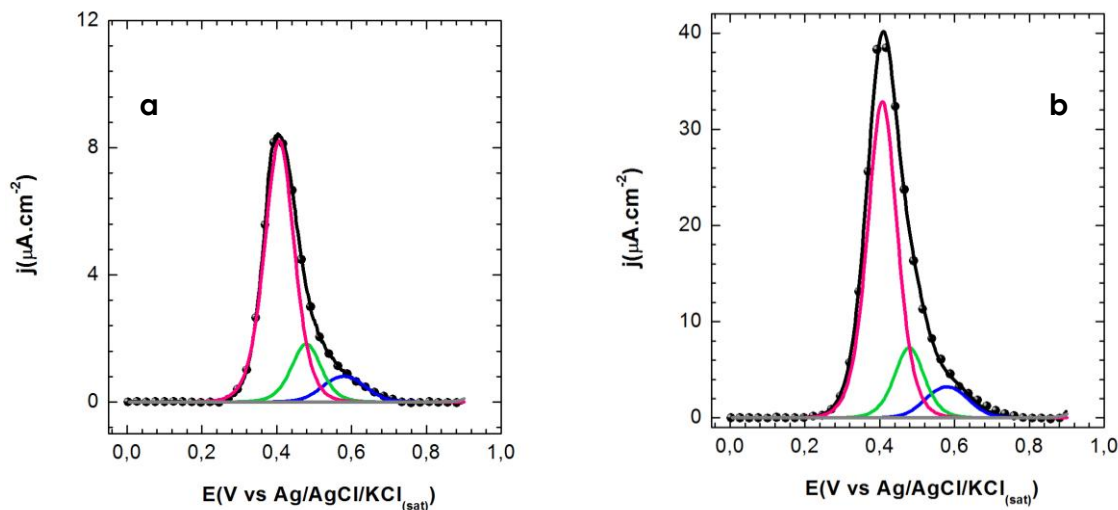


Figura 4.12.- Voltamperogramas cíclicos experimentales (símbolos) registrados en NaClO_4 0,10 M y ajustados (—) utilizando Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) para dos v: a.- $0,050 \text{ V.s}^{-1}$ y b.- $0,200 \text{ V.s}^{-1}$.

NaClO_4 0,10 M Contribución	$0,050 \text{ V.s}^{-1}$	$0,200 \text{ V.s}^{-1}$
2A (%)	75 ± 5	73 ± 5
E_o (V)	$0,41 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$
vG	$-0,05 \pm 0,03$	$-0,16 \pm 0,03$
2B (%)	15 ± 5	16 ± 5
E_o (V)	$0,48 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,03$
vG	$-0,06 \pm 0,03$	$-0,19 \pm 0,03$
3 (%)	10 ± 5	10 ± 5
E_o (V)	$0,58 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,02$
vG	$-1,0 \pm 0,5$	$-1,3 \pm 0,5$

Tabla 4.7.- Parámetros calculados a partir del ajuste de los voltamperogramas cíclicos experimentales que dan cuenta del E_o y tipo de interacciones (vG) entre las especies adsorbidas para las tres contribuciones mayoritarias presentes en sustratos de Au(111)/Fc en NaClO_4 0,10 M cuando v es $0,050 \text{ V.s}^{-1}$ y $0,200 \text{ V.s}^{-1}$.

Los valores de Q_T calculados para estos sistemas fueron $(31 \pm 1) \mu\text{C.cm}^{-2}$ cuando el electrolito fue NaClO_4 1,00 M y $(26 \pm 2) \mu\text{C.cm}^{-2}$ cuando se utilizó solución de NaClO_4 0,10 M. La cantidad de especies redox detectadas en estas

mediciones es de $(3 \pm 1) \cdot 10^{-10}$ mol.cm⁻², indicando que el cambio de pH y concentración del electrolito no producen la desorción del mediador redox.

Finalmente, se analizaron los barridos anódicos de los voltamperogramas cíclicos experimentales realizados en BF (buffer fosfato 0,10 M pH 8,50) a 0,050 V.s⁻¹ y 0,200 V.s⁻¹, tal como se muestra en la Figura 4.13 y la Tabla 4.8. Cabe recordar que este electrolito es el que se utilizará en la última etapa de la preparación de la superficie biofuncional en presencia de la enzima DAO.

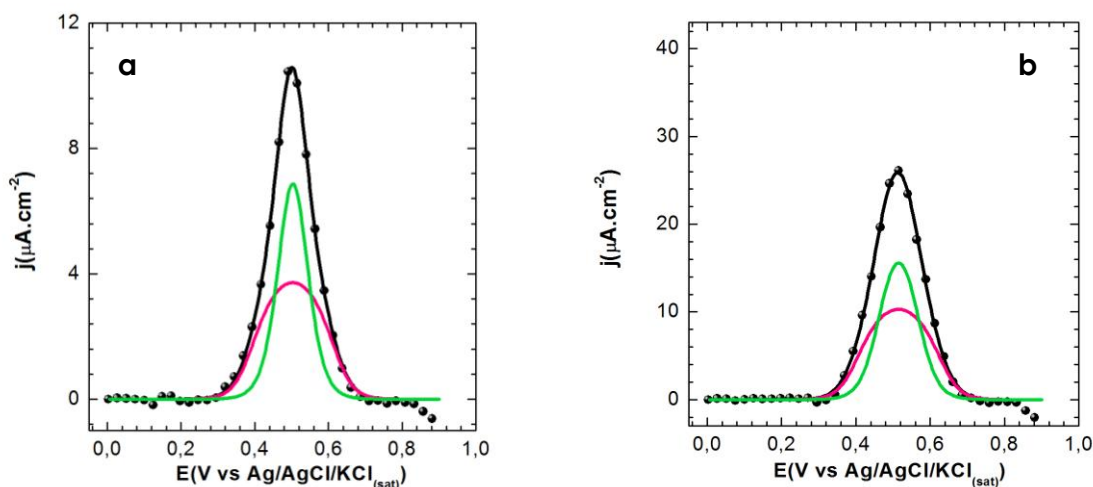


Figura 4.13.- Voltamperogramas cíclicos experimentales (símbolos) registrados en BF 0,10 M y ajustados (—) utilizando Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas) para dos v: a.- 0,050 V.s⁻¹ y b.- 0,200 V.s⁻¹.

BF 0,10 M Contribución	0,050 V.s ⁻¹	0,200 V.s ⁻¹
2B (%)	52 ± 5	48 ± 5
E _o (V)	0,52 ± 0,02	0,52 ± 0,02
vG	-0,11 ± 0,05	-0,6 ± 0,1
3 (%)	48 ± 5	52 ± 5
E _o (V)	0,52 ± 0,02	0,52 ± 0,02
vG	-2,2 ± 0,5	-2,2 ± 0,5

Tabla 4.8.- Parámetros calculados a partir del ajuste de los voltamperogramas cíclicos experimentales que dan cuenta del potencial de oxidación (E_o) y tipo de interacciones (vG) entre las especies adsorbidas para las tres contribuciones mayoritarias presentes en sustratos de Au(111)/Fc en BF 0,10 M cuando v es 0,050 V.s⁻¹ y 0,200 V.s⁻¹.

Los ajustes realizados a ambas v muestran la presencia de dos contribuciones que se oxidan al mismo E_0 y cuyo valor es más positivo que los encontrados en presencia de ClO_4^- . Las interacciones para una contribución son repulsivas mientras que para la otra, el parámetro vG tiende a cero. Este resultado no es sorprendente si se tiene en cuenta el cambio que se produce en el electrolito entre NaClO_4 y BF: no sólo se modifica el tipo de iones sino también el pH de la solución. Además, como se mencionó anteriormente, los iones del buffer se adsorben específicamente sobre los sustratos de oro²⁴, aspecto que podría afectar aun más el comportamiento electroquímico del mediador redox adsorbido. Al igual que en los casos anteriores, la v no produce cambios en los dominios de Fc adsorbido. El valor de Q_T calculado en estas condiciones fue de $(30 \pm 2) \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$, indicando que la presencia de BF no afecta a la cantidad de Fc adsorbido. En consecuencia, el análisis de los resultados experimentales y de sus ajustes permitió determinar que la cantidad de especies electroactivas sobre el sustrato sólido no depende del pH ni de la concentración y tipo de iones. Además, estos resultados claramente indican que esta modificación de sustrato es estable y compatible con los electrolitos que habitualmente se utilizan como medios para determinar la actividad enzimática superficial. Finalmente, estos valores de grado de cubrimiento muestran que las monocapas formadas no son tan compactas como se observa con cadenas carbonadas más largas³⁷.

La Tabla 4.9 presenta un resumen de los valores promedios de los parámetros electroquímicos para las contribuciones mayoritarias cuando se realiza el ciclado a distintas v en los electrolitos estudiados.

Contribución	HClO ₄ 1,00 M	NaClO ₄ 1,00 M	NaClO ₄ 0,10 M	BF 0,10 M
1 (%)	15 ± 3			
E _o (V)	0,32 ± 0,01			
vG	0,4 ± 0,1			
2A (%)	35 ± 5	30 ± 5	75 ± 5	
E _o (V)	0,39 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,41 ± 0,01	
vG	-0,10 ± 0,05	-0,10 ± 0,05	-0,10 ± 0,05	
2B (%)		25 ± 5	15 ± 5	45 ± 5
E _o (V)		0,45 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,52 ± 0,02
vG		-0,10 ± 0,05	-0,10 ± 0,05	-0,30 ± 0,05
3 (%)	45 ± 5	35 ± 5	10 ± 5	50 ± 5
E _o (V)	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,58 ± 0,02	0,52 ± 0,02
vG	-2,0 ± 0,5	-1,5 ± 0,5	-1,0 ± 0,5	-2,2 ± 0,3

Tabla 4. 9.- Parámetros calculados a partir del ajuste de los voltamperogramas cíclicos experimentales determinados a distintas velocidades de barrido que dan cuenta del potencial de oxidación (E_o) y tipo de interacciones (vG) entre las especies adsorbidas para las contribuciones mayoritarias presentes en sustratos de Au(111)/Fc en los distintos electrolitos.

Como ya se mencionó, el tipo de interacciones condiciona las formas de los voltamperogramas cíclicos, generando formas de ondas agudas ($vG \gg 0$) en los primeros ciclos sólo cuando el pH del electrolito es ácido^{18,27}. Este comportamiento, se puede vincular cualitativamente con el modelo de formación de pares iónicos originados por la interacción de la especie O^{+_{ads}} con el anión X⁻ del electrolito, propuesto por Ohtani²⁷ y discutido anteriormente (Figura 4.7). La formación de estos pares iónicos, favorece el proceso de oxidación de las moléculas de Fc adsorbido a pH ácidos y alta concentración de ClO₄⁻. En HClO₄, el dominio que se oxida a potenciales más bajos, lo hace de manera cooperativa (en un intervalo estrecho de potencial) debido a las interacciones favorables entre las especies adsorbidas oxidadas (Fc⁺) y los aniones del electrolito. A potenciales intermedios, el proceso de oxidación no depende del pH, aunque se hace menos favorable cuando disminuye la concentración de aniones en solución. El mismo comportamiento se observa con el dominio que se oxida a mayores potenciales. La presencia de iones H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ de la solución buffer

afecta tanto a la formación de pares iónicos como al sustrato metálico, dando lugar a dos dominios que se oxidan al mismo potencial.

Estos resultados indican que el efecto de los iones del electrolito soporte en el comportamiento redox del Fc adsorbido se puede minimizar utilizando al medidor redox en su estado reducido acoplado al analito en su estado oxidado. Para el caso particular de la determinación de actividad biológica de enzimas oxidoreductasas que producen H_2O_2 , es posible trabajar en condiciones tales que el mediador redox se mantenga en su forma reducida aplicando el potencial adecuado a la superficie biofuncional para generar la reducción del producto de la reacción enzimática.

Desorción reductiva de tioles

Una determinación electroquímica convencional utilizada para la caracterización de SAMs de tioles sobre superficies metálicas, es la curva de electrodesorción reductiva (barrido catódico en el voltamperograma cíclico) que proporciona información cualitativa acerca de los grupos tiol adsorbidos sobre el metal y cuantitativa para estimar el cubrimiento superficial³⁸. La Figura 4.14 muestra el Voltamperograma cíclico en KOH 0,10 M a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ desde 0,200 V hasta -1,600 V (primer ciclo) para un sustrato de Au(111) modificado con SAMs de Fc adsorbido (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) luego del ciclado en $HClO_4$ 1,00 M (10 Ciclos). Se puede observar a $(-1,07 \pm 0,01)$ V un pico de corriente que está asociado a la desorción reductiva del Fc tiolado quimisorbido sobre el Au(111)^{20,39}. La densidad de carga de desorción (Q_{Td}), se calculó a partir de la integración de esta señal de reducción. Para estos sustratos de Au(111)/Fc, se encontró que la Q_{Td} es de $(5 \pm 2) \cdot 10^1 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$, a partir del promedio de cuatro medidas independientes. Porter y colobaradores²⁶, encontraron valores de Q_{Td} de $(81 \pm 15) \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $(107 \pm 14) \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ para SAMs de Fc de cadena carbonada con ocho y once átomos de carbono, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, las discrepancias se deben fundamentalmente a los distintos largos de cadena que controlan las

interacciones intermoleculares y, en consecuencia, el compactamiento de la monocapa. La diferencia entre los valores de Q_T y Q_{Td} se debe a que este último tiene en cuenta todos los grupos tiol desorbidos del sustrato mientras que en la oxidación sólo se analiza las señales generadas por las especies electroactivas¹¹.

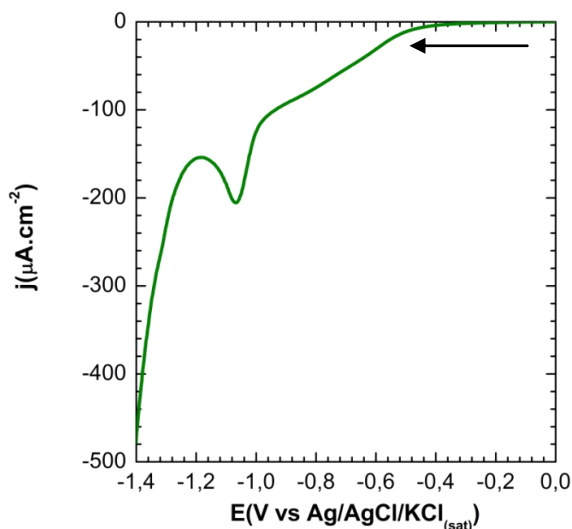


Figura 4.14.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) en KOH 0,10 M registrados a $0,005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

4.2.1.1.2.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)

La SECM, como se mencionó en el Capítulo 3, es una técnica que permite el análisis de la topografía y la determinación de las variaciones en la reactividad superficial⁴⁰. Los sustratos de Au(111)/Fc, se analizaron con esta técnica por el método de *feedback* (Capítulo 3 Figura 3.7 a, b y c), empleando ferroceno metanol (FcMeOH) disuelto en NaClO_4 0,10 M como sonda redox. Cabe recordar que en este modo de operación, se monitorea la corriente del tip (i_T) a un potencial (E_T) constante que causa la reacción de la sonda redox presente en solución ($\text{FcMeOH} \rightarrow \text{FcMeOH}^+ + e^-$) a medida que el tip se acerca al sustrato (Au(111)/Fc). El aspecto más importante, es que el sustrato regenera al FcMeOH a una dada velocidad que depende del potencial del sustrato (E_s), dando lugar al *feedback* local de esta especie y estableciéndose un circuito $\text{FcMeOH}^+/\text{FcMeOH}$ en el espacio (d) entre el tip y el sustrato.

La forma usual de evaluar estos procesos mediante SECM es a través del ajuste de curvas de aproximación medidas a diferentes valores de E_s ^{40,41}. Esto permite obtener la dependencia de la constante de transferencia de electrones (k_T) con E_s , y a partir de esta la constante de velocidad estándar (k_T^0) y el coeficiente de transferencia (α), suponiendo que:

$$k_T = k_T^0 e^{\alpha F(E_s - E^0)/RT} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde E^0 representa el potencial formal de la reacción, R y T representan la constante universal de los gases y la temperatura absoluta.

En primera instancia, se evaluó la posibilidad de utilizar este método para caracterizar la transferencia de electrones a través de las SAMs. Así, la Figura 4.15 muestra curvas de aproximación en las cuales se representa el cambio en los valores de i_T para un $E_T = 0,450$ V (vs. Ag/AgCl/KCl_(sat)) a medida que el tip se acerca al sustrato de Au(111)/Fc cuando se aplican distintos valores de potenciales de sustrato (E_s). En la figura, la distancia recorrida por el tip (Δz) varía desde cero cuando el tip y el sustrato no interactúan entre ellos hasta valores positivos, en los cuales el tip se acerca al sustrato. Se registra un incremento de i_T al disminuir la distancia debido a un aumento del proceso de *feedback*, siendo este incremento dependiente del valor de E_s . Es importante remarcar que el *feedback*, a una misma distancia recorrida por el tip, es mayor cuando se aplica un potencial más negativo, indicando una mayor velocidad de reacción en el sustrato Au(111)/Fc a -0,600 V. No obstante, también debe notarse que la diferencia entre las curvas no es significativa, aun cuando el salto de potencial entre ambos casos extremos es muy grande.

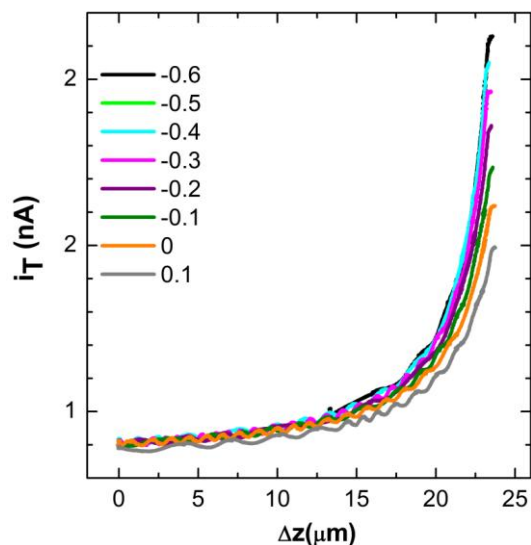


Figura 4.15.-Curvas de aproximación del tip al sustrato de Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) registradas en presencia de la sonda redox FcMeOH/ NaClO_4 0,10 M con $E_T = 0,450$ V, para distintos valores de E_s . ER: Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{(\text{sat})}$.

En este contexto, se optó por usar una estrategia de análisis poco explorada en general y nunca usada para estudiar SAMs, basada en el análisis de resultados de voltamperometría tip sustrato (VTS)⁴². La principal ventaja de esta técnica es que, como se detallará más adelante, el tratamiento de datos permite la incorporación de un modelo cinético general. La aplicación de la metodología descrita en la bibliografía para procesar estas curvas de aproximación y obtener los parámetros cinéticos, no considera los efectos que podría causar la presencia de *pinholes* (defectos en la formación de las SAMs) operando en forma paralela a la transferencia electrónica a través de la SAMs de Fc (Capítulo 3) ni la posible heterogeneidad superficial. Esto lleva a que por lo general la consideración de estos procesos, en el tratamiento de datos, sea bastante arbitraria⁴¹. Por otro lado, el modelo cinético que describe la transferencia de carga es sumamente sencillo (reacción irreversible de primer orden⁴³, y no considera los mecanismos de transferencia de electrones a través de la SAMs de Fc utilizadas en esta Tesis.

La Figura 4.16 muestra curvas VTS medidas utilizando $E_T = 0,450$ V en una ventana de E_s entre 0,400 V y -0,600 V (vs. Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{(\text{sat})}$) a $0,050$ V. \cdot s⁻¹ para un

sustrato de Au(111) modificado con SAMs de Fc (preparada a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) luego del ciclado con 10 Ciclos en HClO_4 1,00 M. En estas condiciones, el tip oxida a la sonda redox mientras que el mediador redox adsorbido puede estar oxidado o reducido dependiendo del valor de E_s . En la figura se muestran distintos VTS obtenidos variando la distancia tip-sustrato normalizada respecto al radio del tip (Capítulo 3). Tal como se indicó previamente, los valores de i_T aumentan cuando disminuye la distancia debido a un aumento del proceso de *feedback*.

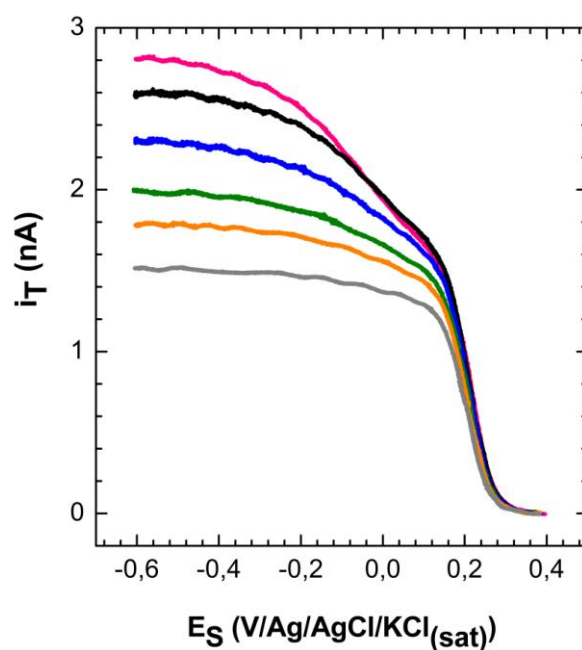


Figura 4.16.- Voltamperometrías tip sustrato (VTS) de Au(111)/Fc (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) registradas a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ en presencia de la sonda redox FcMeOH 1 mM en NaClO_4 0,10 M con un tip de radio $a = 3,1 \mu\text{m}$ a $E_T = 0,450 \text{ V}$ ($i_{T,\infty} = 0,84 \text{ nA}$) a distintas distancias tip-sustrato ($L = d/a$); 0,24 (—), 0,29 (—), 0,34 (—), 0,41 (—), 0,48 (—) y 0,62 (—). ER: Ag/AgCl/KCl_(sat).

En la figura se puede observar la presencia de dos procesos simultáneos y que se aprecian mejor cuando disminuye la distancia, que se manifiesta con la presencia de un hombro en la respuesta $i_T(E_s)$. Uno de estos procesos, ocurre mayormente en el intervalo $0,300 \text{ V} \leq E_s \text{ vs. Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat})} \leq 0,000 \text{ V}$ mientras que el otro, se observa mejor a potenciales más negativos. La presencia de estos dos procesos indica que la regeneración de la sonda redox ocurre sobre un sustrato

heterogéneo que da lugar a distintas velocidades de *feedback* local de FcMeOH. Como se trató en el Capítulo 3 (Figura 3.14), la actividad electroquímica de los sustratos de Au(111) modificados con SAMs de Fc para una reacción de una especie en solución proviene tanto del proceso redox del mediador adsorbido como de los *pinholes*. El proceso que se da sobre los *pinholes*, que tiende a alcanzar una corriente límite a $E_s > 0,000$ V, corresponde a una reducción rápida del FcMeOH⁺ 41. El otro proceso, que aún a -0,600 V no alcanza la respuesta límite, corresponde a una reducción mucho más lenta de la sonda redox. En consecuencia, el proceso rápido proviene de la reducción reversible de FcMeOH⁺ sobre Au(111) sin modificar y el proceso lento, se debe a la transferencia de electrones a través de la SAMs. De ahí que estos datos deberían ser tratados con un modelo que tenga en cuenta estos dos procesos simultáneos.

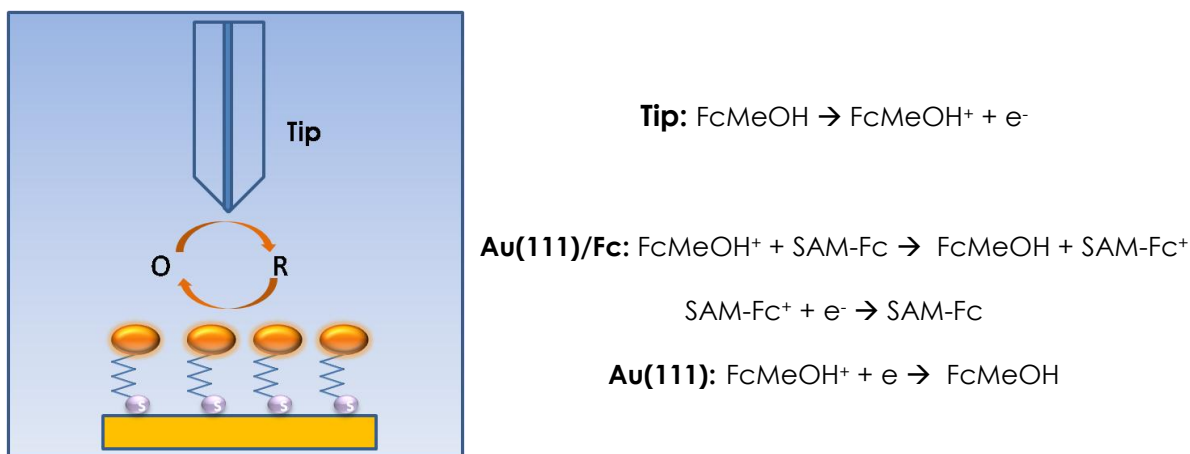


Figura 4.17.- Esquema de los procesos de oxidación- reducción en el tip y en el sustrato Au(111)/Fc.

A modo de resumen, la Figura 4.17 muestra un esquema de los procesos de oxidación-reducción de la sonda redox que deben ser incluidos en el modelo. El FcMeOH se consume en el tip por electro-oxidación a FcMeOH⁺, proceso que ocurre a 0,450 V. La regeneración de la especie reducida puede ocurrir por dos vías: a) por reacción con los grupos del mediador redox adsorbido en su forma reducida (Au(111)/Fc), los cuales luego de ser oxidados por FcMeOH⁺ proveniente

del tip son regenerados por electro-reducción con aporte de electrones desde el sustrato, manteniendo el *feedback* a una velocidad controlada por la transferencia de electrones a través de la SAMs. b) por electro-reducción directa de FcMeOH⁺ sobre los *pinholes*, que es una reacción muy rápida (reversible)¹².

Debe decirse que no se ha reportado hasta el presente un modelo analítico de SECM que permita el tratamiento de respuestas VTS completas. En las propuestas potencialmente más promisorias^{42,44,45} se intenta modelar la dependencia $i_T(E_S, L)$ como la contribución de una celda de capa delgada formada entre el tip y el sustrato (TLC, por las siglas en inglés de *thin-layer cell*) afectada por factores que tienen en cuenta la desviación de SECM a la TLC ideal. En base a estas propuestas se puede escribir la dependencia de I_T dada por la Ecuación 4.7, donde I_{TLC} es la corriente en una celda de capa delgada ideal, I^{NF} es la corriente del tip en condición de *feedback* negativo, y c es la concentración local de la sonda redox (en este caso FcMeOH).

$$I_T(E_S, L) = I_{TLC}(E_S, L) + c(E_S, L)I^{NF}(L) \quad \text{Ecuación 4.7}$$

El modelo cinético de la reacción en el sustrato es incorporado tanto en $I_{TLC}(E_S, L)$ como en $c(E_S, L)$. En este caso se trata de un sustrato con dos zonas diferenciadas de reacción, el cual puede ser modelado como un ensamble de nanoelectrodos con geometría de disco (*pinholes*)^{46,47} donde la reacción es reversible, disperso sobre una superficie electroactiva (Au(111)/Fc) donde la reacción ocurre a través de una dada ley cinética. De este modo, si se supone que sobre la Au(111)/Fc la velocidad de reacción puede representarse mediante una dependencia tipo Butler-Volmer, las expresiones resultantes para I_{TLC} y c quedan definidas por las ecuaciones 4.8 y 4.9:

$$I_{TLC} = \frac{(\pi/4) f_{ph}}{L(1+\Theta)} \left[1 + \frac{(1/f_{ph}) - 1}{1 + \frac{\Theta^\alpha}{L\kappa(1+\Theta)}} \right] \quad \text{Ecuación 4.8}$$

$$c = \frac{1 + \frac{L\Theta}{f_{ph} \left(\pi R_{ph} / 4 + \sqrt{\pi\tau} \right)}}{1 + \Theta} \quad \text{Ecuación 4.9}$$

donde f_{ph} es la fracción de área afectada por los *pinholes*, R_{ph} es el radio promedio de los *pinholes* relativo al radio del tip ($R_{ph} = r_{ph}/a$), $\Theta = \exp[F(E_S - E^0)/RT]$ $\kappa = k^0\tau/a/D$ (D es el coeficiente de difusión de $FcMeOH$), y τ es el tiempo t normalizado ($\tau = Dt/a^2$).

En estas ecuaciones, además de los parámetros cinéticos κ (o $k^0\tau$) y α , también son parámetros ajustables R_{ph} y f_{ph} . Se ha reportado que en este tipo de SAMs r_{ph} puede ser del orden de los 10 nm⁴¹, con lo cual al comprobarse que las respuestas VTS son poco sensibles a este valor se adoptó un valor arbitrario de $R_{ph} = 0,001$. Asimismo, ya que el transporte de masa hacia los *pinholes* es radial, es esperable que el área proyectada por los mismos (y por ende f_{ph}) se incremente al aumentar L . Una funcionalidad semiempírica que tiene en cuenta esta dependencia es

$$f_{ph} = 1 + (f_{ph}^0 - 1)/(1 + BL) \quad \text{Ecuación 4.10}$$

donde f_{ph}^0 y B son parámetros ajustables, pudiéndose asociar f_{ph}^0 a la fracción del área real ocupada por *pinholes* (ya que en el límite para $L \rightarrow 0$, $f_{ph} \rightarrow f_{ph}^0$). Las respuestas VTS mostradas en la Figura 4.16 fueron ajustadas con el modelo descrito y con un único set de parámetros cinéticos para todas las curvas, obteniéndose las correlaciones que se muestran en la Figura 4.18. Puede observarse que la calidad de los ajustes fue buena, siendo remarcable el hecho que todas fueron hechas con un único set de parámetros ajustables. Así, los parámetros cinéticos resultantes fueron $k^0\tau = 0,92 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ y $\alpha = 0,18$, siendo los otros dos parámetros $f_{ph}^0 = 0,001$ y $B = 2,4$. Intervalo esperado para $k^0\tau$ y α ($\alpha = 0,5$ para un proceso reversible)³⁸.

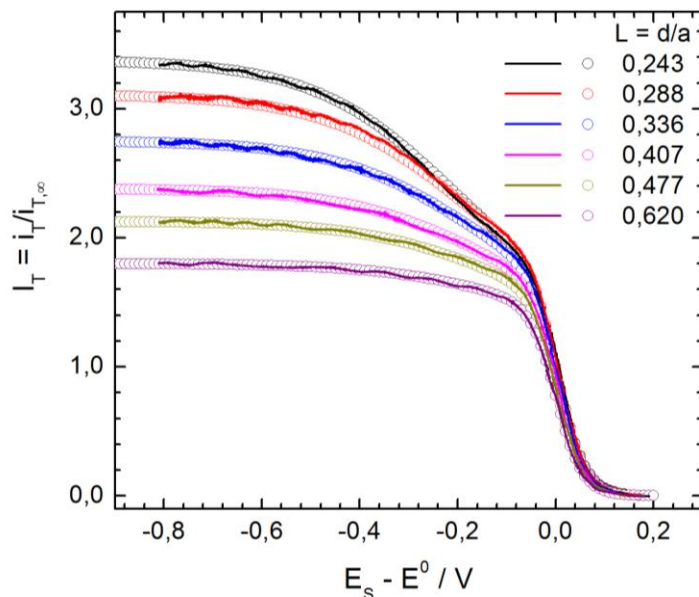


Figura 4.18.- Ajuste de las respuestas VTS de Au(111)/Fc adsorbido mostradas en la figura 4.16 (líneas continuas) con las ecuaciones 4.6-4.8 (símbolos). $L = d/a$: $E^0_{FcMeOH^+/FcMeOH} = 0,218$ V vs. Ag/AgCl/KCl_(sat).

Con los parámetros ajustados es posible visualizar las contribuciones separadas de los *pinholes* y de la SAMs, tal como se muestra en la Figura 4.19 para los dos valores extremos de L analizados. Aquí puede observarse claramente que a distancias mayores la respuesta de los *pinholes* es mayoritaria, pero al disminuir L la respuesta de la SAMs adquiere importancia y la curva VTS se ve fuertemente afectada por su contribución.

Tal como se desprende del relativamente alto valor de k^0_T y de las respuestas puras de las SAMs que se ven en la Figura 4.19, puede decirse que la cinética de transferencia de electrones a través de la SAMs es rápida, aunque se ve ralentizada por el llamativamente bajo valor de α . Este hecho ya fue reportado para este tipo de SAMs, causado probablemente por un efecto de los *pinholes* en las respuestas⁴¹. Sin embargo, dado que en el tratamiento de los VTS realizado en este trabajo se separó la contribución de los *pinholes*, claramente el motivo de este valor anormalmente bajo es la descripción irreal del proceso de transferencia de electrones a través de la SAM mediante una ecuación de Butler-Volmer regular. La misma no tiene en cuenta una serie de fenómenos, por ejemplo las interacciones laterales entre los grupos Fc adsorbidos que fueron detectados y

modelados por voltamperometría cíclica. Para mejorar el modelo y los valores de los parámetros de ajuste, se debería desarrollar un modelo cinético que pueda ser incorporado en I_{TLC} , tal como se hizo para interpretar los resultados de voltamperometría cíclica.

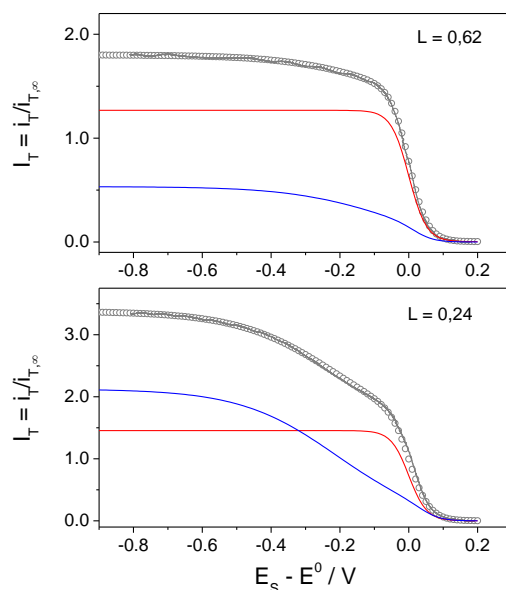


Figura 4.19.- Simulaciones de las contribuciones a las respuestas VTS de Au(111)/Fc de los *pinholes* (líneas rojas) y de la SAM (líneas azules) para dos diferentes valores de L . Se incluyen también las respuestas VTS completas experimentales (líneas grises) y ajustadas (símbolos).

Además de realizar un análisis cinético de la oxidación/reducción de la sonda redox, el análisis por SECM de los sustratos de Au(111) modificados con SAMs permite detectar regiones con diferentes actividades electroquímicas causadas por inhomogeneidades de la SAM, y evaluar así la homogeneidad del cubrimiento superficial. Con este propósito, se realizaron barridos de los sustratos Au(111)/Fc manteniendo al tip a una distancia constante y registrando i_r . La Figura 4.20 muestra las imágenes obtenidas sobre los sustratos de Au(111)/Fc aplicando diferentes valores de E_s y manteniendo constante el E_r (0,450 V) para barridos realizados sobre un área de $50 \times 50 \mu\text{m}$. La escala de colores (indicada a la derecha de las imágenes) provee el intervalo en el cual varía i_r (expresada en nA).

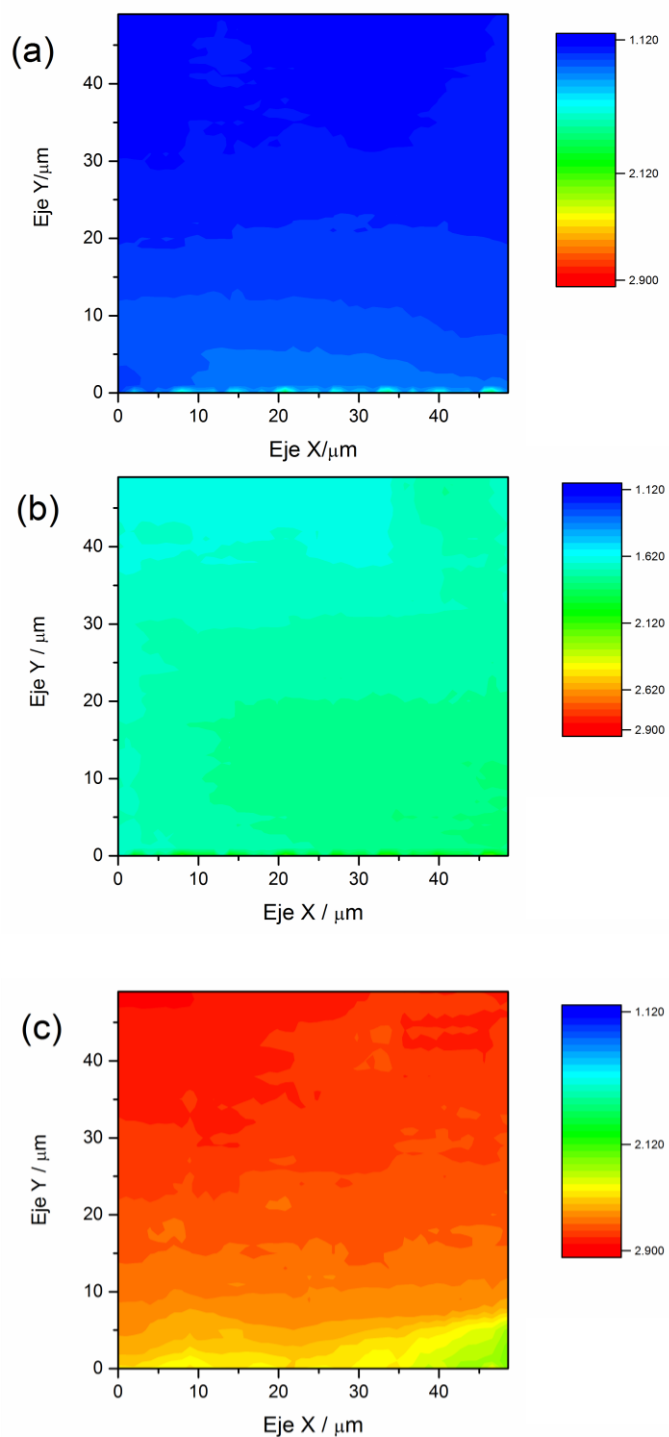


Figura 4.20.- Imágenes SECM obtenidas sobre Au(111)/Fc adsorbido (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) empleando FcMeOH en NaClO_4 0,10 M como sonda redox utilizando un valor de E_T constante (0,450 V) y aplicando tres E_s diferentes a.- 0,000 V, b.- -0,400 V y c.- -0,600 V. ER: Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{(\text{sat})}$. La escala de colores indica el registro de i_T desde 1,12 nA (azul) hasta 2,9 nA (rojo).

En estas imágenes, se observan zonas donde los registros de i_T son bajos (azul) indicando que en esa zona, la actividad electroquímica es baja. Por otra parte, las zonas de mayor actividad electroquímica presentan valores de i_T más altas (rojo). Dado que se utilizaron tres valores de E_s , i_T varía en distintos intervalos dependiendo del proceso que de lugar al *feedback*, como se discutió anteriormente al analizar los VTS. Particularmente, cuando se aplica $E_s = 0,000$ V, el cambio en los valores de i_T registrados en la imagen (Δi_T) es de 0,26 nA con un valor promedio de 1,25 nA. El valor promedio de i_T aumenta ligeramente cuando $E_s = -0,400$ V ($\Delta i_T = 0,20$ nA con un valor promedio de 1,71 nA), mientras que para $E_s = -0,600$ V lo hacen ambos valores ($\Delta i_T = 0,60$ nA con un valor promedio de 2,60 nA). Este resultado no es sorprendente cuando se tienen en cuenta los procesos descritos en las figuras anteriores ya que se favorece el *feedback* por la contribución de los grupos Fc de las SAMs a potenciales más negativos. Por otra parte, los cambios de actividad electroquímica en la ventana de E_s correspondientes a la transferencia de carga mayoritariamente a través de los *pinholes* ($E_s = 0,000$ V) se pueden vincular directamente con la homogeneidad superficial. La imagen determinada a $E_s = 0,000$ V indica que el cubrimiento del sustrato es relativamente homogéneo ya que se registró un cambio de i_T menor a 0,30 nA en la región analizada.

Globalmente, los resultados obtenidos con SECM del sustrato Au(111)/Fc están de acuerdo con el comportamiento electroquímico observado en ambas ventanas de potencial que indican que la SAMs de Fc es homogénea pero no lo suficientemente compacta, razón por la cual la transferencia de carga a través de los *pinholes* no es despreciable.

4.2.1.2.- SAMs de 3-mercaptopropionico (3-COOH) y de ácido 6-mercaptophexanoico (6-COOH)

Se modificaron los sustratos de Au(111) con las respectivas soluciones de n-COOH de concentración 1,00 mM disueltos en Cl_2CH_2 por inmersión durante 15 horas. Los sustratos sólidos Au(111)/n-COOH, se ciclaron en $HClO_4$ 1,00 M al igual

que los sustratos modificados con monocapas simples de Fc para estudiar las modificaciones en las mismas condiciones experimentales.

4.2.1.2.1.- Voltamperometría cíclica

La Figura 4.21 muestra los voltamperogramas cíclicos (en la ventana de potencial correspondiente a la oxidación de Fc) en HClO_4 1,00 M para Au(111)/3-COOH y Au(111)/6-COOH, respectivamente. En ambos casos, se observa que el ciclado sucesivo provoca la aparición de señales electroquímicas, aun en ausencia de un proceso faradaico. Algunos autores, como Calvente y colaboradores^{48,49}, mencionan que en este tipo de SAMs con grupos COOH, al aplicar potenciales anódicos altos, se deprotona el grupo funcional y el ión COO^- resultante se adsorbe sobre la superficie metálica. Este proceso provoca la aparición de picos a potenciales altos, tanto en el barrido anódico como en el catódico de los voltamperogramas cíclicos⁴⁹.

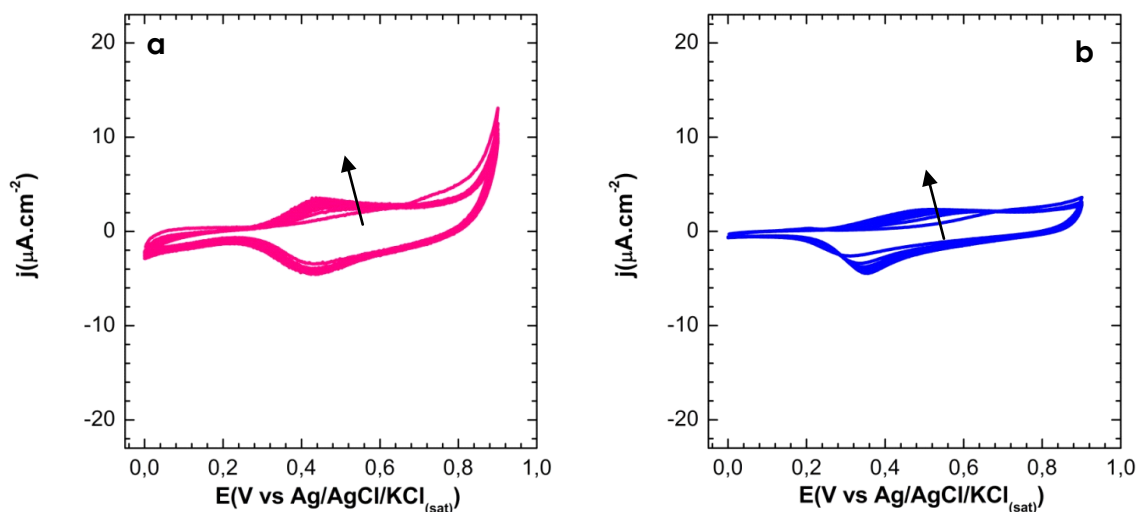


Figura 4.21.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de n-COOH adsorbido (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) en HClO_4 1,00 M registrados a 0,005 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ para: a.- Au(111)/3-COOH y b.- Au(111)/6-COOH.

La Figura 4.22 muestra voltamperogramas cíclicos para sustratos de Au(111)/3-COOH y Au(111)/6-COOH en KOH 0,10 M. Como se mencionó para el

caso de las SAMs simples de Fc, en esta ventana de potencial se produce la desorción reductiva de la monocapa.

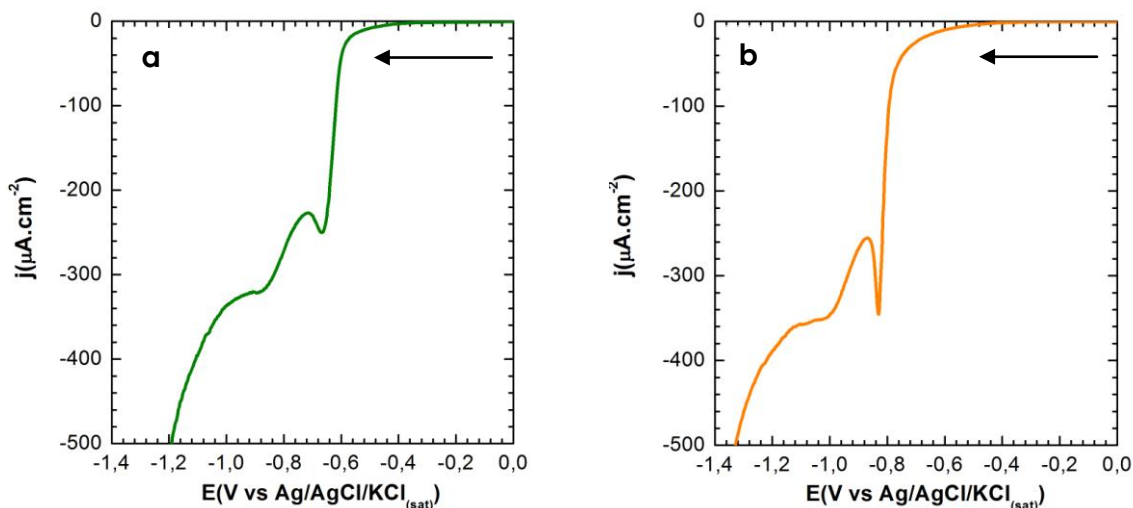


Figura 4.22.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs de n-COOH adsorbido (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH_2Cl_2 durante 15 horas) en KOH 0,10 M registrados a $0,005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ para: a.- Au(111)/3-COOH y b.- Au(111)/6-COOH.

Para ambos sustratos, se pueden observar dos picos de desorción, que aparecen a $(-0,65 \pm 0,01) \text{ V}$ y a $(-0,84 \pm 0,02) \text{ V}$ para Au(111)/3-COOH y a valores ligeramente más negativos para Au(111)/6-COOH: $(-0,85 \pm 0,01) \text{ V}$ y $(-1,00 \pm 0,01) \text{ V}$. En ambos casos, el valor calculado para Q_{td} es de $(13 \pm 2) \cdot 10^1 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$. Resultados similares han sido informados por Nishizawa y colaboradores⁵⁰ para las SAMs Au/3-COOH. Imabayashi y colaboradores³⁹ también informaron valores similares a los obtenidos para SAMs con cadenas carbonadas de entre cinco y nueve átomos de carbono. Los valores de E_r se desplazan a potenciales más positivos a medida que disminuye el largo de la cadena del tiol. Esta misma tendencia ha sido observada por otros autores y ha sido atribuida principalmente a la energía de Gibbs involucrada en la adsorción^{39,51}, al efecto de las interacciones de van der Waals entre cadenas adyacentes^{26,39,52-54} y a la afinidad de los tioles por el electrolito soporte, los cuales dependen del largo de la cadena hidrocarbonada⁵⁰.

4.2.1.2.2.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)

La Figura 4.23 a y b muestra distintos VTS realizados con sustratos sólidos de Au(111)/3-COOH y Au(111)/6-COOH en FcMeOH/NaClO₄ 0,10 M en una ventana de E_s entre 0,400 V y -0,400 V (vs. Ag/AgCl/KCl_(sat)) a 0,050 V.s⁻¹. Los VTS se obtuvieron con sustratos de Au(111) modificados con SAMs de COOH (preparado a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas) luego de 10 Ciclos de ciclado en HClO₄ 1,00 M (realizados previos al análisis por SECM) para tres condiciones: antes y después de aplicar un tratamiento a -0,600 V por 5 minutos y luego de realizar el segundo VTS. Se decidió utilizar este tratamiento catódico con el fin de explorar cualitativamente la presencia de procesos de transferencia de carga que ocurren a potenciales negativos. Este aspecto cobra mayor importancia cuando se estudia el comportamiento de la monocapas mixtas formadas por n-COOH y Fc.

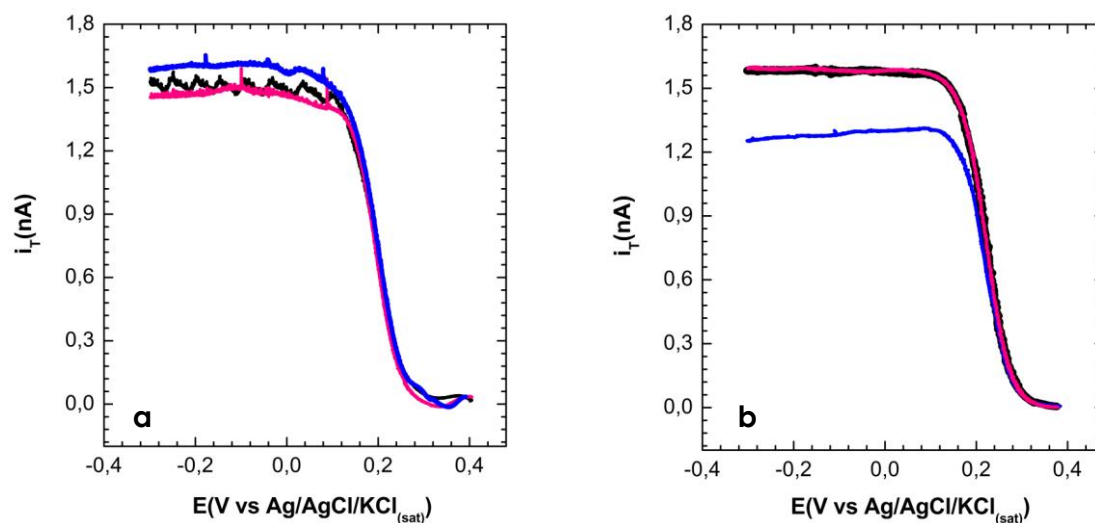


Figura 4.23.- VTS en sustratos de: a.- Au(111)/3-COOH adsorbido y b.- Au(111)/6-COOH adsorbido, (ambos sustratos fueron preparados a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM en CH₂Cl₂ durante 15 horas) previo al tratamiento catódico (—), luego de aplicar E_s = -0.600 V por 5 minutos (—) y luego de realizar el VTS postratamiento (—). v=0,050 mV.s⁻¹.ER: Ag/AgCl/KCl_(sat).

Con ambos sustratos, se observan respuestas muy similares a las encontradas en procesos reversibles⁴⁴ que, como se discutió anteriormente, provienen de los *pinholes*. Como era de esperar, no se detecta transferencia de electrones a través de la SAM. Sin embargo, se encontraron comportamientos dependientes del largo de cadena de la SAMs luego del tratamiento catódico. Para Au(111)/3-COOH no se detectó cambio en la actividad electroquímica debido a este tratamiento, mientras que con el sustrato Au(111)/6-COOH i_r disminuye. Sin embargo, la actividad electroquímica se restituye luego de realizado el VTS, indicando que el proceso que causa la disminución de i_r es reversible. La disminución en los valores de i_r debería estar relacionado al bloqueo de los *pinholes* en los sustratos de Au(111) modificados con tioles carboxilados, únicos responsables de la actividad electroquímica. Por lo tanto, la pérdida de actividad electroquímica observada con el sustrato Au(111)/6-COOH se relaciona con un bloqueo reversible de esos . Estos resultados indican que el tratamiento catódico causa una reorganización reversible de la SAMs cuando la cadena carbonada es de seis átomos de carbono.

La Figura 4.24 a y b muestra las imágenes de SECM obtenidas sobre sustratos de Au(111)/3-COOH en FcMeOH/NaClO₄ 0,10 M aplicando un E_T de 0,450 V para dos valores de E_s (0,000 V y -0,600 V) para barridos realizados sobre un área de 50x50 μm .

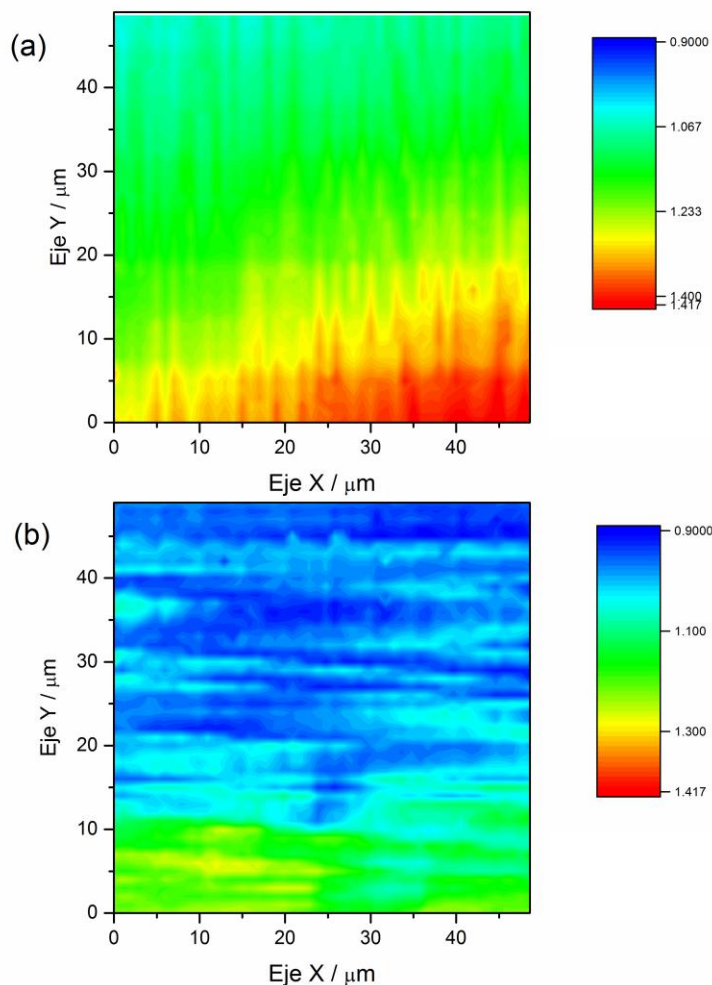


Figura 4.24.- Imágenes SECM obtenidas sobre Au(111)/3-COOH (ciclado previo en HClO_4 1,00 M) empleando FcMeOH en NaClO_4 0,10 M como sonda redox utilizando un valor de E_r constante (0,450 V) y aplicando dos E_s diferentes a.- 0,000 V, b.- -0,600 V. La escala de colores indica el registro de i_r (nA) desde valores bajos (azul) hasta altos (rojo). ER: Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{(\text{sat})}$.

Las imágenes muestran también, en una escala de colores las distintas i_r registradas cuando se le aplican ambos E_s . En la primera imagen, se observa que Δi_r es de 0,38 nA (con un promedio de 1,23 nA) al aplicar un $E_s = 0,000$ V. Dado que en estos casos, el único proceso de transferencia de carga ocurre a través de los *pinholes*, estos resultados indican una superficie relativamente homogénea con zonas de baja actividad electroquímica y otras de inactividad, por el bloqueo de la SAMs. Cuando el valor de E_s aplicado es más negativo (-0,600 V), Δi_r es de 0,40 nA (con un promedio de 1,10 nA), se observa un comportamiento similar, en contraposición a las imágenes de SECM obtenidas con Au(111)/Fc

(Figura 4.20). Evidentemente, la ausencia del mediador redox impide el aumento de i_r a potenciales más negativos.

La Figura 4.25 a y b muestra las imágenes obtenidas de sustratos de Au(111)/6-COOH en FcMeOH/NaClO₄ 0,10 M.

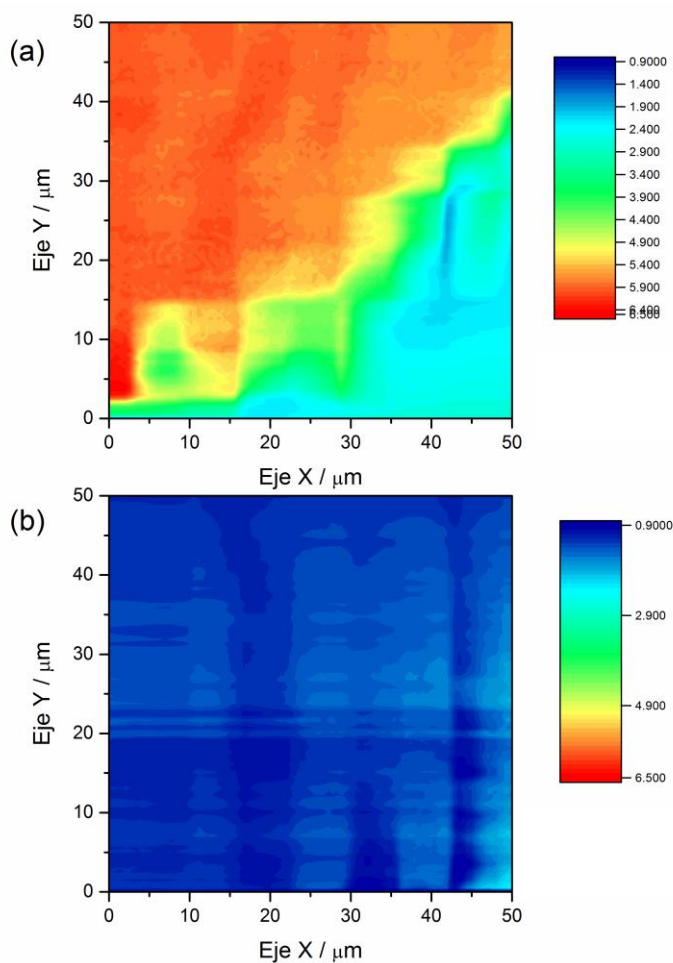


Figura 4.25.- Imágenes SECM obtenidas sobre Au(111)/6-COOH (ciclado previo en HClO₄ 1,00 M) empleando FcMeOH en NaClO₄ 0,10 M como sonda redox utilizando un valor de E_T constante (0,450 V) y aplicando dos E_s diferentes a.- 0,000 V, b.- -0,600 V. La escala de colores indica el registro de i_r (nA) desde valores bajos (azul) hasta altos (rojo). ER: Ag/AgCl/KCl_(sat).

En la primera imagen, obtenida con $E_s = 0,000$ V, Δi_r es de 1,10 nA (con un promedio de 1,45 nA), se ve un cubrimiento heterogéneo con zonas más activas por los *pinholes* y otras menos activas debido a una SAM más compacta, mientras que a -0,600 V se ve más homogéneo porque los *pinholes* se bloquean, como lo

indican los VTS. Cuando el valor de E_s aplicado es más catódico (-0,600 V), Δi_r es de 4,70 nA (con un promedio de 4,15 nA). En este caso particular, la superficie es muy heterogénea, con zonas bien definidas, de menor registro de corriente (zonas cubiertas con la SAMs) y zonas con mayor i_r .

Con el objeto de comprender el efecto del largo de cadena en la topografía superficial, también se realizaron imágenes SECM con sustratos modificados con n-COOH previo al ciclado en HClO₄ 1,00 M.

La Figura 4.26 a y b muestra las correspondientes imágenes obtenidas sobre los sustratos de Au(111)/3-COOH y Au(111)/6-COOH, respectivamente, en presencia de FcMeOH/NaClO₄ 0,10 M aplicando un E_T de 0,450 V para $E_s = 0,000$ V. Los Δi_r fueron de 0,40 nA (con un promedio de 1,4 nA), para los sustratos modificados con 3-COOH y de 0,80 nA (con un promedio de 2,5 nA) para los sustratos modificados con 6-COOH. La Tabla 4.10 resume los valores promedio de i_r y el cambio observado en las imágenes de SECM para todas las condiciones estudiadas con las SAMs de n-COOH.

	Previo ciclado en HClO ₄ 1,00 M ES = 0,000 V	Post ciclado en HClO ₄ 1,00 M ES = 0,000 V	Post ciclado en HClO ₄ 1,00 M ES = -0,600 V
3-COOH	(1,4 ± 0,2) nA	(1,2 ± 0,2) nA	(1,1 ± 0,2) nA
6-COOH	(2,5 ± 0,4) nA	(1,5 ± 0,6) nA	(4 ± 5) nA

Tabla 4.10.- Valores promedio de i_r y el cambio observado en las imágenes de SECM para todas las condiciones estudiadas con los sustratos Au(111)/n-COOH.

Evidentemente, ninguno de los tratamientos utilizados cambia la organización superficial en los sustratos de Au(111) modificados con 3-COOH. Es importante destacar, que el comportamiento observado con las monocapas simples de Fc a $E_s = 0,000$ V (Figura 4.20) es similar al de Au(111)/3-COOH, reforzando la idea de que a este potencial la transferencia de carga es a través de los *pinholes*. Sin embargo, tanto el ciclado como el tratamiento catódico afectan a las monocapas de 6-COOH. En el primer caso, se observa un bloqueo

de los *pinholes* y un ligero aumento en la heterogeneidad superficial. En el segundo caso, disminuye drásticamente la heterogeneidad superficial ya que las regiones que previamente tenían el mayor registro de i_T causado por *pinholes* se bloquean por el tratamiento catódico.

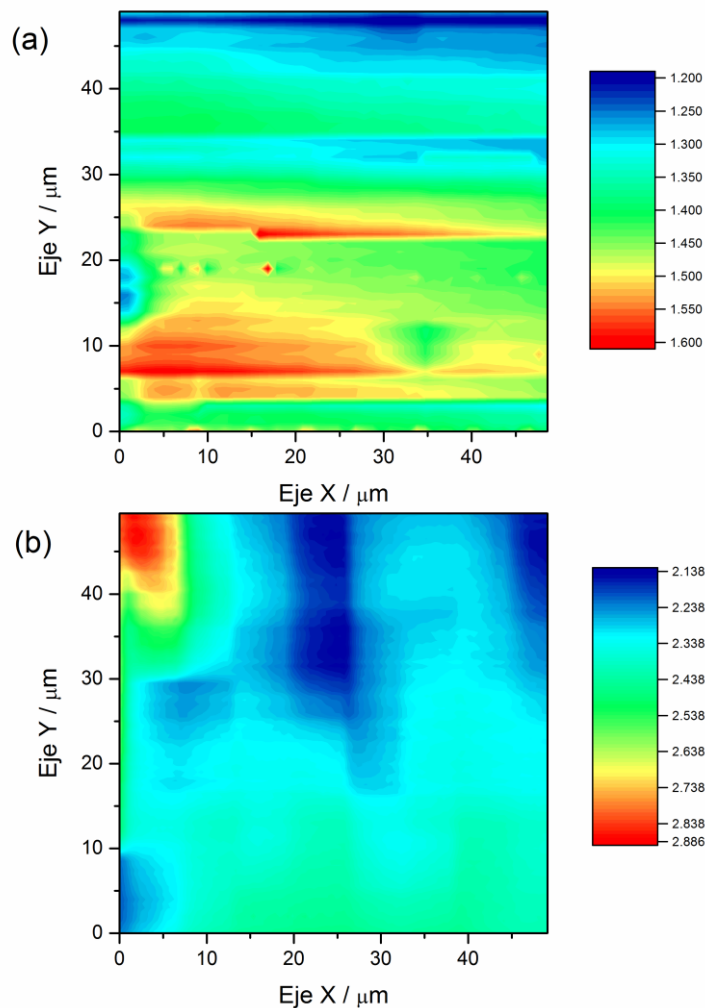


Figura 4.26.- Imágenes SECM obtenidas sobre a.- Au(111)/3-COOH y b.- Au(111)/6-COOH (sin ciclado previo en $HClO_4$ 1,00 M), empleando FcMeOH en $NaClO_4$ 0,10 M como sonda redox. ER: Ag/AgCl/ $KCl_{(sat)}$.

4.2.1.2.3- Espectroscopía Raman aumentada en superficie (SERS)

Los sustratos sólidos de Au(111)/Fc no pudieron ser analizados por esta técnica por la descomposición térmica de Fc causada por la radiación láser durante la determinación experimental. Sin embargo, los sustratos sólidos de

Au(111)/n-COOH pudieron ser estudiadas por SERS. Antes de cada análisis, los sustratos sólidos modificados fueron ciclados en HClO₄ 1,00 M en las condiciones experimentales previamente establecidas. La Figura 4.27 a muestra los espectros SERS para los sustratos sólidos de Au(111) previo y posterior a la modificación con los respectivos alcanotioles. Además, la Figura 4.27 b muestra los espectros SERS en el mismo intervalo tomados con sustratos Au(111)/6-COOH en distintas zonas.

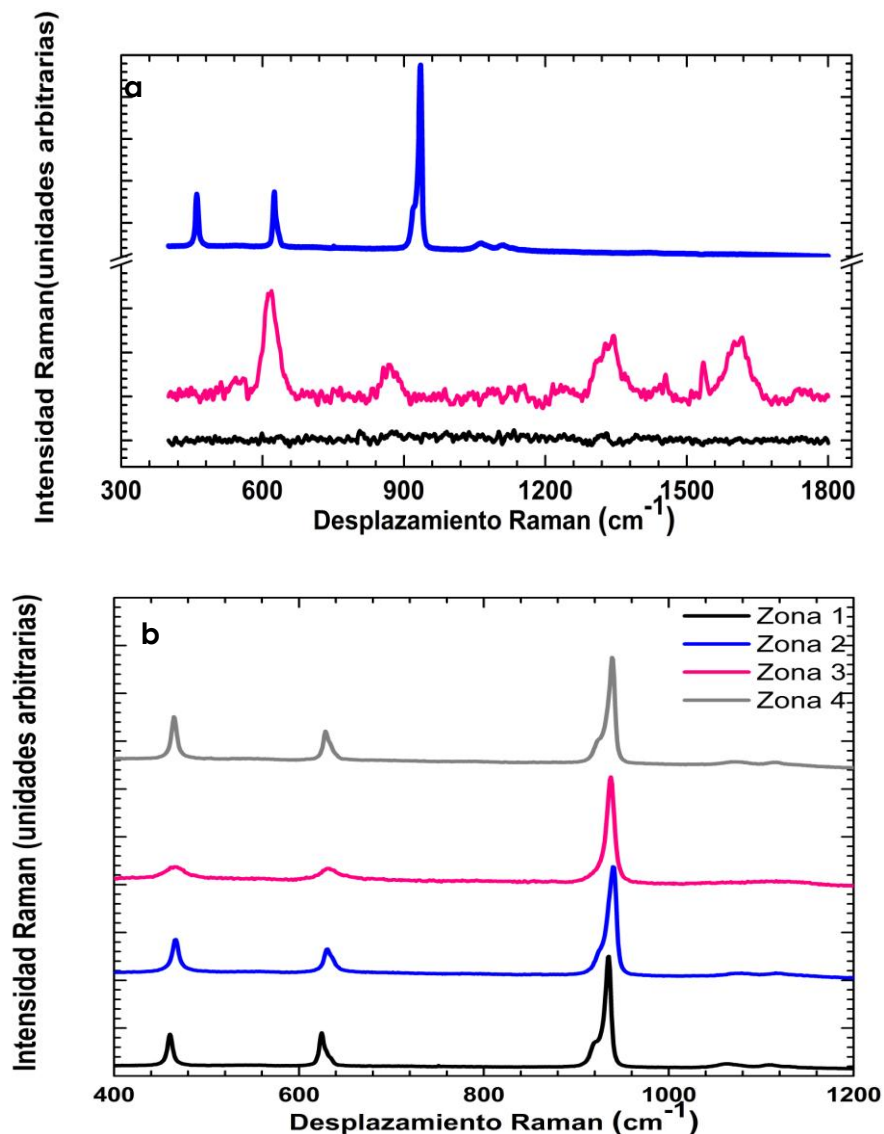


Figura 4.27 a.- Espectros SERS para Au(111) sin modificar (—) y modificado con Au(111)/3-COOH (—) y con Au(111)/6-COOH (—). b.- Espectros de Au(111)/6-COOH en distintas zonas del sustrato. Los espectros se separaron en el eje Y para mayor claridad.

En la Tabla 4.11 se presentan las posiciones de las bandas observadas para los sustratos de Au(111) modificados con ambos alcanotioles y sus respectivas asignaciones⁵⁵⁻⁵⁹.

Bandas	Au(111)/3-COOH (cm⁻¹)	Au(111)/6-COOH (cm⁻¹)
S-C		465 ± 2
S-Au	614 ± 4	634 ± 4
COOH	868 ± 4	
COO⁻		938 ± 2
C-C C-S		1075 ± 5
C-C		1120 ± 5
C-C-H	1341 ± 5	
C=O	1617 ± 5	

Tabla 4.11.- Posiciones de las bandas Raman observadas para los sustratos de Au(111)/3-COOH y Au(111)/6-COOH.

Estos resultados permiten ver, la ausencia de cualquier tipo de señal para los sustratos de Au(111) previo a la modificación. Además, en ambos espectros de los sustratos modificados, se pone en evidencia la señal del enlace S-Au entre 614 cm⁻¹ y 634 cm⁻¹ demostrando que los carboxilatos tiolados están efectivamente unidos al sustrato de oro y no son desorbidos por el ciclado previo en HClO₄. La comparación entre las intensidades Raman también revela, a simple vista, una señal mayor para los sustratos sólidos de Au(111) modificados con 6-COOH aunque para ambos sustratos, el espectro muestra bandas angostas y bien definidas. La intensidad de las bandas en estos espectros se vincula fuertemente con la cercanía de cada uno de los grupos funcionales al sustrato de Au(111) debido al efecto de aumento de señal causado por la presencia del sustrato metálico^{58,60}. Es importante notar el cambio en la relación de intensidades entre las bandas correspondientes al enlace Au-S y al grupo funcional de las monocapas. Para el sustrato Au(111)/3-COOH la intensidad de la banda a 614

cm^{-1} es mayor que la banda a 868 cm^{-1} . Sin embargo, esta relación se invierte drásticamente para Au(111)/6-COOH dando cuenta de una mayor cercanía del grupo funcional al sustrato en este último caso. Asimismo, la cercanía con la superficie da lugar a la deprotonación del grupo carboxílico en el sustrato Au(111)/6-COOH. Más aun, esta banda es tan intensa que no permite detectar todas las bandas de menor intensidad a mayores corrimientos Raman. Por lo tanto, los estudios de Raman permitieron ver que el largo de la cadena carbonada condiciona las conformaciones (trans/gauche) que adoptan los alcanotioles sobre los sustratos sólidos de Au(111)^{61,62}. La conformación gauche observada con la modificación realizada con 6-COOH es homogénea ya que se observaron espectros similares en distintas zonas del sustrato. Este cambio conformacional dependiente del largo de cadena también se refleja en los cambios en el corrimiento Raman observado en otras bandas, como la correspondiente al enlace Au-S.

A partir de todos los resultados obtenidos, tanto de CV como de SECM y SERS, se puede afirmar que en los sustratos de Au(111)/n-COOH, los grupos COO^- pueden estar cercanos al sustrato. Esto se pone en evidencia en la CV, con la aparición de una onda en los barridos anódicos y catódicos, en SERS con la intensidad de la banda asignada al grupo COO^- y en SECM, con la dependencia de la actividad electroquímica con los tratamientos superficiales. En particular, los tioles carboxilados de cadena más larga (Au(111)/6-COOH), adoptan principalmente una conformación gauche en la cual los grupos COO^- interactúan con la superficie del sustrato de Au(111)^{58,61}. La disponibilidad de los grupos COO^- es de suma importancia para incluir sitios Ni(II) y así adsorber proteínas His tag con orientación preferencial. En consecuencia, conocer la conformación de las cadenas tioladas con grupos COO^- es fundamental para el desarrollo de las superficies biofuncionales.

4.2.2.- Sustratos de Au(111) modificados con SAMs mixtas

4.2.2.1.- SAMs mixtas de ferroceno (Fc) y 3-mercaptopropionico (3-COOH) y ferroceno (Fc) y ácido 6-mercaptophexanoico (6-COOH)

Los sustratos sólidos modificados con SAMs mixtas de Fc y n-COOH se prepararon a partir de la inmersión de los sustratos en soluciones 1,00 mM de cada componente en CH_2Cl_2 durante 15 horas. Se trabajó en las mismas condiciones experimentales y de ciclado previo que para las SAMs simples.

4.2.2.1.1.- Voltamperometría cíclica (CV)

En la Figura 4.28 se presentan las señales de reducción para sustratos modificados con tioles con grupos Fc y COOH con largo de cadena de tres (a) o de seis átomos de carbono (b) registrados en KOH 0,10 M a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. A modo comparativo, se incluyen los resultados de las respectivas SAMs simples de n-COOH.

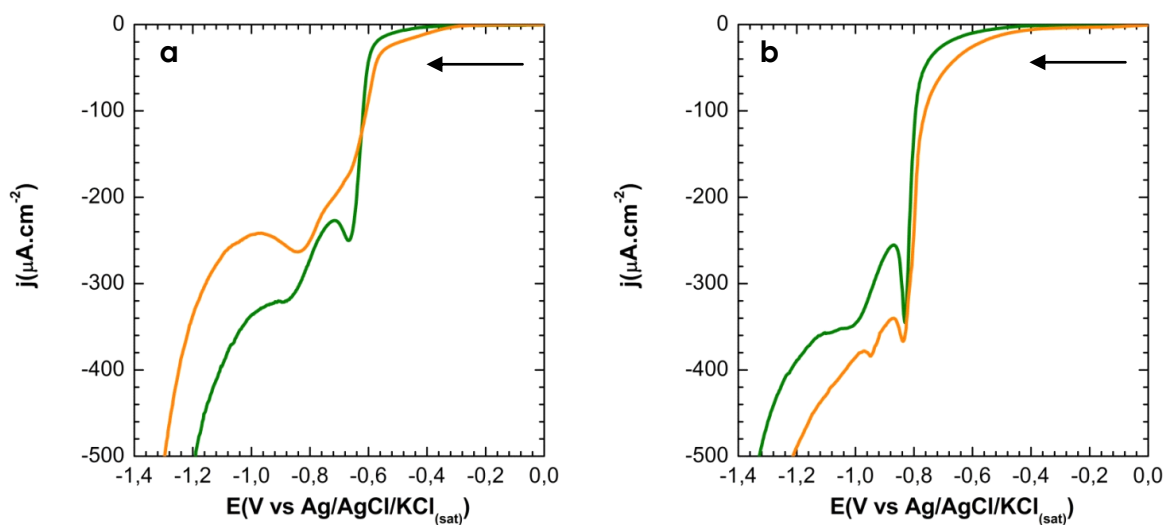


Figura 4.28.- Voltamperogramas cíclicos de SAMs simples de n-COOH y mixtas de Fc y n-COOH (preparadas a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM de cada componente en CH_2Cl_2 durante 15 horas) en KOH 0,10 M registrados a $0,005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ para: a.- Au(111)/3-COOH (—) y Au(111)/3-COOH+Fc (—) y b.- Au(111)/6-COOH (—) y Au(111)/6-COOH+Fc (—).

En la Tabla 4.11 se muestran los valores de potencial de reducción promedio (calculados a partir de tres o más repeticiones por experimento) correspondientes a la desorción para cada tipo de SAM estudiado.

Modificación	Er1 (V)	Er2 (V)
Au(111)/6-COOH	-0,85 ± 0,01	-1,00 ± 0,01
Au(111)/6-COOH+Fc	-0,83 ± 0,02	-1,00 ± 0,06
Au(111)/3-COOH	-0,65 ± 0,01	-0,84 ± 0,02
Au(111)/3-COOH+Fc	-0,66 ± 0,01	-0,84 ± 0,01
Au(111)/Fc	-1,07 ± 0,01	

Tabla 4.11.- Valores de potencial de reducción promedio (calculados a partir de tres o más repeticiones por experimento) correspondientes a la desorción (Er) para cada tipo de SAM estudiado.

Como puede observarse tanto en las figuras como en la tabla, las SAMs mixtas al igual que las simples de n-COOH presentaron dos picos de reducción^{4,26,50,51,63}. El valor calculado de Q_{Td} para todos los casos fue de $(16 \pm 4) \cdot 10^1 \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$, de igual magnitud (dentro del error experimental) que el encontrado para monocapas simples $(13 \pm 2) \cdot 10^1 \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$. Resultados similares han sido reportados por Sevilla y colaboradores⁴ para SAMs mixtas de carboxilatos tiolados con seis átomos de carbono donde la Q_{Td} fue de $(12 \pm 3) \cdot 10^1 \mu\text{C} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Además de las cargas, el análisis de la posición de los picos es de mucha utilidad para identificar a los componentes de las monocapas mixtas. A diferencia de las SAMs simples de n-COOH, las monocapas de Fc presentan un solo pico de desorción reductiva que aparece a potenciales más negativos. Los resultados mostrados en la tabla indican que la presencia de Fc prácticamente no modifica los voltamperogramas cíclicos de las monocapas de n-COOH, tanto en la ventana de potencial correspondiente a la desorción reductiva como en la utilizada para la oxidación del mediador redox adsorbido (datos no mostrados). Estos resultados indican que si las monocapas mixtas se autoensamblan lo hacen sin segregar los componentes y con una muy baja proporción de Fc adsorbido a la superficie. Es decir, aun cuando la concentración en solución de ambos

componentes es la misma en la solución de inmersión de los sustratos de Au(111), la composición superficial debe estar enriquecida en n-COOH.

4.2.2.1.2.- Microscopía electroquímica de barrido (SECM)

La Figura 4.29 muestra distintos VTS realizados con sustratos sólidos de Au(111)/3-COOH+Fc en FcMeOH/NaClO₄ 0,10 M aplicando una ventana de E_s entre 0,400 V y -0,400 V (vs. Ag/AgCl/KCl_(sat)) a 0,050 V.s⁻¹. Los VTS se obtuvieron con sustratos de Au(111) modificados con las SAMs mixtas (preparadas por la inmersión de los sustratos en soluciones 1,00 mM de cada componente en CH₂Cl₂ durante 15 horas) luego del ciclado con 10 Ciclos en HClO₄ 1,00 M (realizados previos al análisis por SECM) para tres condiciones: antes y después de aplicar un tratamiento a -0,600 V por 5 minutos y luego de realizar el segundo VTS.

Los resultados de SECM muestran que el comportamiento del sustrato de Au(111) modificado con la SAMs mixta es similar al observado con la monocapa simple de 3-COOH antes del tratamiento catódico (Figura 4.26 a). Sin embargo, el tratamiento a -0,600 V disminuye el valor de i_r para Au(111)/3-COOH+Fc, indicando que la desactivación parcial del feedback causada por este tratamiento se relaciona con la presencia del mediador redox adsorbido. Este resultado muestra claramente la presencia del mediador redox adsorbido, aspecto que no pudo comprobarse por CV. Luego de realizar el VTS, la actividad original se recupera, indicando que el proceso de desactivación-activación es reversible. Es importante notar en este punto que el VTS realizado luego del tratamiento catódico, evidencia más claramente la presencia de dos contribuciones dadas por los pinholes y el Fc adsorbido, como se discutió anteriormente para los sustratos de Au(111) modificados con SAMs simples de Fc.

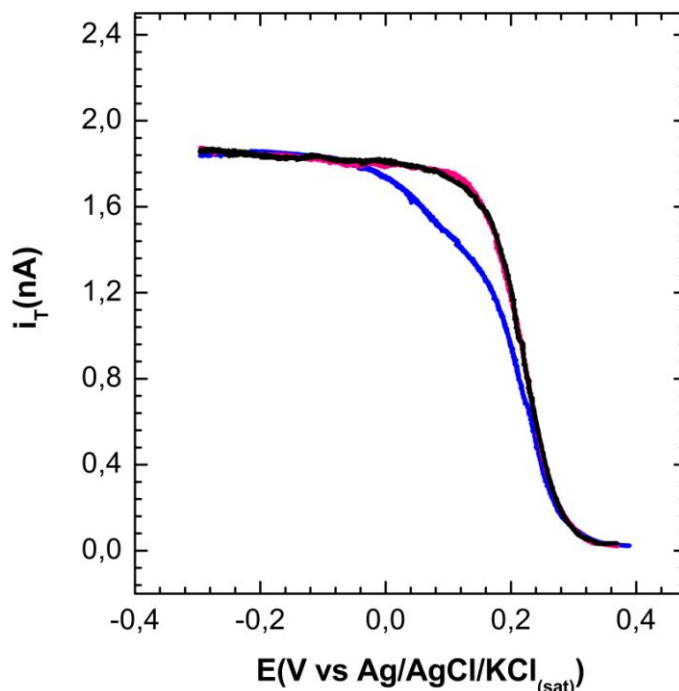


Figura 4.29.- VTS de SAMs mixtas de Fc y 3-COOH (preparadas a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM de cada componente en CH_2Cl_2 durante 15 horas) registradas a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ en presencia de la sonda redox FcMeOH 1 mM en NaClO_4 0,10 M previo al tratamiento catódico (—), luego de aplicar $E_s = -0,600 \text{ V}$ por 5 minutos (—) y luego de realizar el VTS postratamiento (—). ER: Ag/AgCl/ $\text{KCl}_{(\text{sat})}$.

Para este mismo sustrato, se registraron imágenes a $E_s = 0,000 \text{ V}$ y a $E_s = -0,600 \text{ V}$ como se muestra en la Figura 4.30, obtenidas en FcMeOH/ NaClO_4 0,10 M aplicando un E_T de 0,450 V para distintos valores de E_s . Las imágenes muestran también, en una escala de colores, las distintas i_T registradas cuando se le aplican ambos E_s . En ambas imágenes, se observa que Δi_T es de 0,90 nA (con un promedio de 1,6 nA), valores similares a los encontrados en las respectivas monocapas simples aunque con un mayor grado de heterogeneidad. Esta heterogeneidad indica nuevamente la presencia del mediador redox adsorbido.

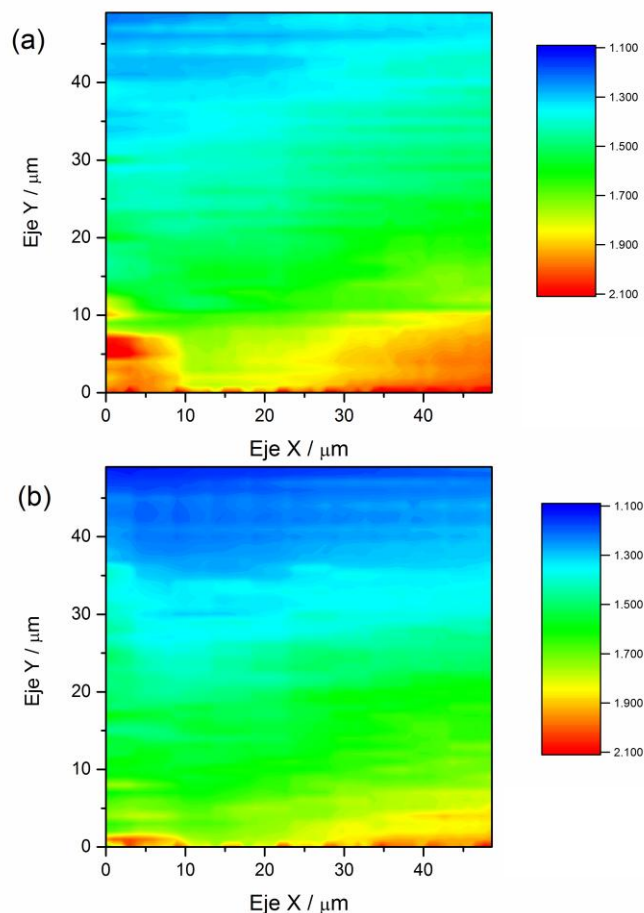


Figura 4.30.- Imágenes SECM obtenidas sobre Au(111)/3-COOH+Fc (ciclado previo en HClO₄ 1,00 M) empleando FcMeOH en NaClO₄ 0,10 M como sonda redox y aplicando dos E_s diferentes a.- 0,000 V, b.- -0,600 V. La escala de colores indica el registro de *i*_r desde valores bajos (azul) hasta altos (rojo). ER: Ag/AgCl/KCl_(sat).

La Figura 4.31 muestra distintos VTS realizados con sustratos sólidos de Au(111)/6-COOH+Fc en FcMeOH/NaClO₄ 0,10 M aplicando una ventana de E_s entre 0,400 V y -0,400 V (vs. Ag/AgCl/KCl_(sat)) a 0,050 V.s⁻¹. Los VTS se obtuvieron con sustratos de Au(111) modificados con las SAMs mixtas (preparadas por la inmersión de los sustratos en soluciones 1,00 mM de cada componente en CH₂Cl₂ durante 15 horas) luego del ciclado con 10 Ciclos en HClO₄ 1,00 M (realizados previos al análisis por SECM) para tres condiciones: antes y después de aplicar un tratamiento a -0.600 V por 5 minutos y luego de realizar el segundo VTS. En este caso, el comportamiento observado con las SAMs mixtas es muy similar al encontrado con el sustrato de Au(111) modificado con 6-COOH (Figura 4.25 b),

indicando que el bloqueo de los *pinholes* que se observa en este caso domina la desactivación de la actividad electroquímica frente al tratamiento catódico.

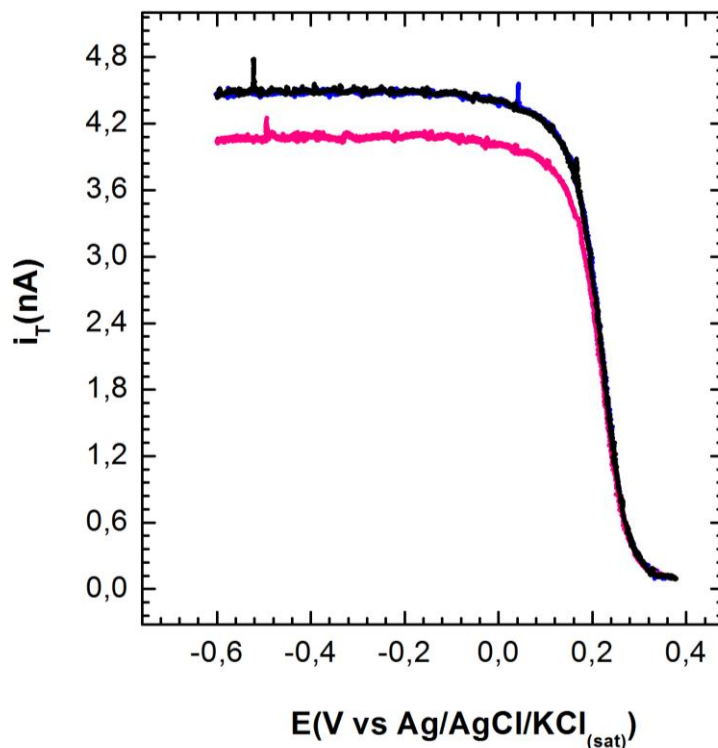


Figura 4.31.- VTS de SAMs mixtas de Fc y 6-COOH (preparadas a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM de cada componente en CH_2Cl_2 durante 15 horas) previo al tratamiento catódico (—), luego de aplicar $E_s = -0.600$ V por 5 minutos (—) y luego de realizar el VTS posttratamiento (—). ER: Ag/AgCl/KCl_(sat).

4.3.- Conclusiones

En este capítulo se estudiaron comparativamente SAMs simples y SAMs mixtas de alcanotioles sobre Au(111) en función del largo de cadena del adsorbato de tres y seis átomos de carbono con el objetivo de conocer las respuestas de los sustratos de Au(111) modificados. A partir de los resultados experimentales y teóricos expuestos en este capítulo se puede arribar a las siguientes conclusiones:

Ⓢ Durante el ciclado en HClO_4 , los sustratos sólidos de Au(111) modificados con Fc presentan un reordenamiento superficial (producto de todas las interacciones presentes) no reversible que le brinda mayor homogeneidad. Esta propiedad permite tener sustratos de Au(111)/Fc con características reproducibles para el desarrollo de la superficie biofuncional.

Ⓢ La cantidad de especies electroactivas en la superficie no depende del pH, ni de la concentración de los aniones perclorato y fosfato. Las interacciones laterales de las distintas contribuciones dependen del pH y de la concentración del electrolito: las monocapas sólo presentan interacciones atractivas ($G > 0$) a bajos pH, mientras que el comportamiento es tipo Langmuir ($G \sim 0$) a bajas fuerzas iónicas.

Ⓢ Se confirmó por SERS la presencia de las bandas correspondientes a la interacción S-Au(111) para sustratos modificados con carboxilatos tiolados observándose una orientación *gauche* en sustratos de Au(111)/6-COOH y *trans* en los sustratos de Au(111)/3-COOH.

Ⓢ A través de SECM, se observó que el bloqueo observado en SAMs de carboxilatos y SAMs mixtas se ve afectado por los *pinholes*. Estos últimos dominan la respuesta VTS a potenciales menos negativos, pero al realizar el análisis en potenciales más negativos, la respuesta correspondiente a los *pinholes* disminuye notablemente y se logra distinguir, en los VTS, la respuesta de los grupos Fc, especialmente en sustratos de Au(111)/Fc. La presencia de especies redox en la superficie provoca intensidades de corrientes más altas mostrando un efecto del mediador redox además del menor bloqueo de los *pinholes*. Se nota que este proceso de inhibición es lento en las SAMs mixtas, y parece ser más pronunciado cuanto más negativo es el potencial. En sustratos de Au(111)/3-COOH no se detectó bloqueo al aplicar el potencial de reducción mientras que en sustratos Au(111)/-6COOH se comprobó claramente la desactivación.

4.4.- Bibliografía

1. Calvente JJ, Luque AM, Andreu R, Mulder WH, Olloqui-Sariego JL. Analytical Expressions for Proton Transfer Voltammetry: Analogy to Surface Redox Voltammetry with Frumkin Interactions. *Anal Chem*. 2013;85:4475+4482. doi:10.1021/ac303661g.
2. Zhang J, Chi Q, Nielsen JU, Friis EP, Andersen JET, Ulstrup J. Two-dimensional cysteine and cystine cluster networks on Au(111) disclosed by voltammetry and in situ scanning tunneling microscopy. *Langmuir*. 2000;16(18):7229-7237. doi:10.1021/la000246h.
3. Carvalhal RF, Freire RS, Kubota LT. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanalysis*. 2005;17(14):1251-1259. doi:10.1002/elan.200403224.
4. Madueño R, Sevilla JM, Pineda T, Román AJ, Blázquez M. A voltammetric study of 6-mercaptopurine monolayers on polycrystalline gold electrodes. *J Electroanal Chem*. 2001;506(2):92-98. doi:10.1016/S0022-0728(01)00482-X.
5. Sun Y, Yan F, Yang W, Sun C. Multilayered construction of glucose oxidase and silica nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Biomaterials*. 2006;27(21):4042-4049. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.014.
6. Valenti LE, Herrera E, Stragliotto F, et al. Optimizing the Bioaffinity Interaction between His-Tag Proteins and Ni (II) Surface Sites. *Proteins Interfaces III State art*. 2012;(li):37-53. doi:10.1021/bk-2012-1120.
7. Valenti LE, Martins VL, Herrera E, Torresi RM, Giacomelli CE. Ni(ii)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins. *J Mater Chem B*. 2013;1(38):4921. doi:10.1039/c3tb20769b.
8. Kahsar KR, Schwartz DK, Medlin JW. Stability of self-assembled monolayer coated Pt/Al₂O₃ catalysts for liquid phase hydrogenation. *J Mol Catal A Chem*. 2015;396:188-195. doi:10.1016/j.molcata.2014.10.004.
9. Newton L, Slater T, Clark N, Vijayaraghavan A. Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. *J Mater Chem C*. 2013;1(3). doi:10.1039/c2tc00146b.
10. Love JC, Al E. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev*. 2005;105:1103-1169. doi:10.1021/cr0300789.

11. Méndez De Leo LP, de la Llave E, Scherlis D, Williams FJ. Molecular and electronic structure of electroactive self-assembled monolayers. *J Chem Phys.* 2013;138(11):114707. doi:10.1063/1.4795575.
12. Smalley JF, Feldberg SW, Chidsey CED, Linford MR, Newton MD, Liu Y-P. The Kinetics of Electron Transfer Through Ferrocene-Terminated Alkanethiol Monolayers on Gold. *J Phys Chem.* 1995;99(35):13141-13149. doi:10.1021/j100035a016.
13. Katz E, Itzhak N, Willner I. Electron Transfer in Self -Assembled Monolayers of N-Methyl-N-carboxyalkyl-4,4'-bipyridinium Linked to Gold Electrodes. *Langmuir.* 1993;(7):1392-1396.
14. Ferapontova E, Schmengler K, Börchers T, Ruzgas T, Gorton L. Effect of cysteine mutations on direct electron transfer of horseradish peroxidase on gold. *Biosens Bioelectron.* 2002;17(11-12):953-963. doi:10.1016/S0956-5663(02)00087-8.
15. Chidsey CED, Bertozzi CR, Putvinski TM, Mujsc a M. Coadsorption of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold: electroactive self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc.* 1990;112(11):4301-4306. doi:10.1021/ja00167a028.
16. Liu JQ, Paddon-Row MN, Gooding JJ. Heterogeneous Electron Transfer Study for Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) and Ferrocene through Pure and Mixed Aliphatic Alkyl SAMs on Gold Electrode. *J Phys Chem B.* 2004;108:8460-8466.
17. Orlowski GA, Chowdhury S, Kraatz HB. The effect of alkali metal ions on the electrochemical behavior of ferrocene-peptide conjugates immobilized on gold surfaces. *Electrochim Acta.* 2007;53(4):2034-2039. doi:10.1016/j.electacta.2007.09.014.
18. Rudnev A V, Yoshida K, Wandlowski T. Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on low-index gold single crystal electrodes. *Electrochim Acta.* 2013;87:770-778. doi:10.1016/j.electacta.2012.09.090.
19. Yokota Y, Yamada T, Kawai M. Ion-Pair Formation between Ferrocene-Terminated Self-Assembled Monolayers and Counteranions Studied by Force Measurements. *J Phys Chem C.* 2011;115(14):6775-6781. doi:10.1021/jp2001404.
20. Lee LYS, Sutherland TC, Rucareanu S, Lennox RB. Ferrocenylalkylthiolates as a probe of heterogeneity in binary self-assembled monolayers on gold. *Langmuir.* 2006;22(9):4438-4444. doi:10.1021/la053317r.

21. Uosaki K, Sato Y, Kita H. Electrochemical Characteristics of a Gold Electrode Modified with a Self -Assembled Monolayer of Ferrocenylalkanethiols. *Langmuir*. 1991;7(7):1510-1514. doi:10.1021/la00055a038.
22. Herrera E. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos. *Tesis Dr.* 2013.
23. Herrera E, Giacomelli CE. Surface coverage dictates the surface bio-activity of d-amino acid oxidase. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;117:296-302. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.050.
24. Cuesta A, Kleinert M, Kolb DM. The adsorption of sulfate and phosphate on Au (111) and Au (100) electrodes : an in situ STM study. *Current*. 2000;(111):5684-5690.
25. Nakamura M, Aramata A, Yamagishi A, Taniguchi M. Underpotential deposition of zinc ions on Au(111) in phosphate solution (pH 4.6): kinetic and STM studies. *J Electroanal Chem*. 1998;446(1-2):227-231. doi:10.1016/S0022-0728(97)00632-3.
26. Walczak M, Popenoe DD, Deinhammer RS, Lamp BD, Chung C, Porter MD. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage. *Langmuir*. 1991;7:2687-2693. doi:10.1021/la00059a048.
27. Ohtani M. Quasi-reversible voltammetric response of electrodes coated with electroactive monolayer films. *Electrochem commun*. 1999;1(10):488-492. doi:10.1016/S1388-2481(99)00103-4.
28. Laviron E. Surface linear potential sweep voltammetry. *Electroanal Chem Interfacial Electrochem*. 1974;52:395-402.
29. Balland V, Lecomte S, Limoges B. Characterization of the electron transfer of a ferrocene redox probe and a histidine-tagged hemoprotein specifically bound to a nitrilotriacetic-terminated self-assembled monolayer. *Langmuir*. 2009;25(11):6532-6542. doi:10.1021/la900062y.
30. Ohtani M, Kuwabata S, Yoneyama H. Voltammetric response accompanied by inclusion of ion pairs and triple ion formation of electrodes coated with an electroactive monolayer film. *Anal Chem*. 1997;69(6):1045-1053. doi:10.1021/ac960952g.
31. Aleveque O, Blanchard PY, Gautier C, Dias M, Breton T, Levillain E. Electroactive self-assembled monolayers: Laviron's interaction model extended to non-random distribution of redox centers. *Electrochem commun*. 2010;12(11):1462-1466. doi:10.1016/j.elecom.2010.07.039.

32. Aleveque O, Levillain E. A generalized lateral interactions function to fit voltammetric peaks of self-assembled monolayers. *Electrochem commun.* 2016;67:73-79. doi:10.1016/j.elecom.2016.04.003.
33. Aleveque O, Levillain E. Electroactive mixed self-assembled monolayers: Lateral interactions model updated to interactions between redox and non-redox species. *Electrochem commun.* 2013;34:165-169. doi:10.1016/j.elecom.2013.06.009.
34. Walters F. *Sequential Simplex Optimization*. MultiSimplex AB; 1999.
35. Rowe GK, Creager SE. Redox and Ion-Pairing Thermodynamics in Self - Assembled Monolayers. *Langmuir.* 1991;7(10):2307-2312. doi:10.1021/l1a00058a055.
36. Creager SE, Rowe GK. Competitive self-assembly and electrochemistry of some ferrocenyl-n-alkanethiol derivatives on gold. *J Electroanal Chem.* 1994;370(1-2):203-211. doi:10.1016/0022-0728(93)03173-M.
37. Walczak M, Popenoe DD, Deinhammer RS, Lamp BD, Chung C, Porter MD. Gold A Measure of Surface Coverage. *Langmuir.* 1991;7:2687-2693.
38. Bard AJ, Faulkner LR, Bagotsky VS. *Electrochemical Methods Fundamentals of Electrochemistry*. Vol 2da Editio. (JOHN WILEY & SONS I, ed.); 2001.
39. Shin-ichiro I, Iida M, Hobara D, Feng ZQ, Niki K, Kakiuchi T. Reductive desorption of carboxylic-acid-terminated alkanethiol monolayers from Au(111) surfaces. *J Electroanal Chem.* 1997;428(1-2):33-38. doi:10.1016/S0022-0728(97)00006-5.
40. Bard A, Mirkin M V. *Scanning Electrochemical Microscopy*. Marcel Dekker, Inc.; 2001.
41. Kiani A, Alpuche-Aviles MA, Eggers PK, et al. Scanning electrochemical microscopy. 59. Effect of defects and structure on electron transfer through self-assembled monolayers. *Langmuir.* 2008;24(6):2841-2849. doi:10.1021/l1a702811t.
42. Zoski CG, Luman CR, Fernandez JL, Bard AJ. Scanning electrochemical microscopy. 57. SECM tip voltammetry at different substrate potentials under quasi-steady-state and steady-state conditions. *Anal Chem.* 2007;79(13):4957-4966. doi:10.1021/ac070021c.
43. Bard AJ, Mirkin M V. *Scanning Electrochemical Microscopy*; 2012.

44. Zoski CG, Aguilar JC, Bard AJ. Scanning electrochemical microscopy. 46. Shielding effects on reversible and quasireversible reactions. *Anal Chem.* 2003;75(13):2959-2966. doi:10.1021/ac034011x.
45. Bonazza HL, Vega LD, Fernández JL. Analysis of the hydrogen electrode reaction mechanism in thin-layer cells. 2. Study of hydrogen evolution on microelectrodes by scanning electrochemical microscopy. *J Electroanal Chem.* 2014;713:9-16. doi:10.1016/j.jelechem.2013.11.027.
46. Fardad F, Bard AJ, Mirkin M V. Voltammetric and Scanning Electrochemical Microscopic Studies of the Adsorption Kinetics and Self-Assembly of n-Alkanethiol Monolayers on Gold. *Isr J Chem.* 1997;37:155-163.
47. Amatore C, Savéant JM, Tessier D. Charge Transfer at Partially Blocked Surfaces - A Model for the Case of Microscopic Active and Inactive Sites. *J Electroanal Chem.* 1983;147:39-51. doi:10.1016/S0022-0728(83)80055-2.
48. Luque AM, Mulder WH, Calvente JJ, Cuesta A, Andreu R. Proton transfer voltammetry at electrodes modified with acid thiol monolayers. *Anal Chem.* 2012;84(13):5778-5786. doi:10.1021/ac301040r.
49. Paik WK, Han S, Shin W, Kim Y. Adsorption of carboxylic acids on gold by anodic reaction. *Langmuir.* 2003;19(31):4211-4216. doi:10.1021/la026836s.
50. Nishizawa M, Sunagawa T, Yoneyama H. Selective desorption of 3-mercaptopropionic acid from a mixed monolayer with hexadecanethiol assembled on a gold electrode. *J Electroanal Chem.* 1997;436(1-2):213-218. doi:10.1016/S0022-0728(97)00329-X.
51. Hobara D, Ota M, Imabayashi S, Niki K, Kakiuchi T. Phase separation of binary self-assembled thiol monolayers composed of 1-hexadecanethiol and 3-mercaptopropionic acid on Au(111) studied by scanning tunneling microscopy and cyclic voltammetry. *J Electroanal Chem.* 1998;444(1):113-119. doi:10.1016/S0022-0728(97)00553-6.
52. Strutwolf J, O'Sullivan CK. Microstructures by selective desorption of self-assembled monolayer from polycrystalline gold electrodes. *Electroanalysis.* 2007;19(14):1467-1475. doi:10.1002/elan.200703894.
53. Pensa E, Vericat C, Grumelli D, et al. New insight into the electrochemical desorption of alkanethiol SAMs on gold. *Phys Chem Chem Phys.* 2012;14(35):12355. doi:10.1039/c2cp41291h.
54. Sawaguchi T, Sato Y, Mizutani F. In situ STM imaging of individual molecules in two-component self-assembled monolayers of 3-mercaptopropionic acid and 1-decanethiol on Au(111). *J Electroanal Chem.* 2001;496(1-2):50-60. doi:10.1016/S0022-0728(00)00430-7.

55. Ossowski J, Wächter T, Silies L, et al. Thiolate versus Selenolate: Structure, Stability, and Charge Transfer Properties. *ACS Nano*. 2015;9(4):4508-4526. doi:10.1021/acsnano.5b01109.
56. Freeman RG, Grabar KC, Allison KJ, et al. Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates. *Science (80-)*. 1995;267(8):1629-1632.
57. Garrett NL, Vukusic P, Ogrin F, Sirotkin E, Winlove CP, Moger J. Spectroscopy on the wing: Naturally inspired SERS substrates for biochemical analysis. *J Biophotonics*. 2009;2(3):157-166. doi:10.1002/jbio.200810057.
58. Michota A, Bukowska J. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *J Raman Spectrosc*. 2003;34(1):21-25. doi:10.1002/jrs.928.
59. Michota A, Kudelski A, Bukowska J. Chemisorption of cysteamine on silver studied by surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir*. 2000;16(26):10236-10242. doi:10.1021/la000707z.
60. Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry.*; 2009. doi:10.1002/9780470405840.
61. Tognalli NG, Fainstein A, Vericat C, Vela ME, Salvarezza RC. Exploring three-dimensional nanosystems with Raman spectroscopy: methylene blue adsorbed on thiol and sulfur monolayers on gold. *J Phys Chem B*. 2006;110(1):354-360. doi:10.1021/jp054541s.
62. Razmote-Razme I, Kuodis Z, Eicher-Lorka O, Niaura G. SERS observation of soft C-H vibrational mode of bifunctional alkanethiol molecules adsorbed at Au and Ag electrodes. *Phys Chem Chem Phys*. 2010;12(18):4564-4568. doi:10.1039/b921291d.
63. Dubacheva G V, Van Der Heyden A, Dumy P, et al. Electrochemically controlled adsorption of Fc-functionalized polymers on β -CD-modified self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2010;26(17):13976-13986. doi:10.1021/la102026h.



Capítulo 5

Modificación y caracterización de sustratos sólidos de oro policristalino (Au)

*“La diferencia entre imposible y posible es un
corazón con voluntad”.*

Lolly Daskal

5.1.- Introducción

La adsorción de biomoléculas tales como proteínas, enzimas y ácidos nucleicos sobre los sustratos sólidos es un tema de interés tanto en el campo científico como en el tecnológico¹⁻¹³. Cuando se ponen en contacto moléculas de proteína con un sustrato sólido, se establecen múltiples sitios de interacción física entre ellos, pudiendo causar, en consecuencia, la desnaturalización de las biomoléculas sobre la superficie del sustrato sólido^{5,14-16}. Un modo de evitar este proceso, es inducir interacciones específicas entre ellos a partir de la modificación del sustrato sólido, de la proteína o de ambos. Entre los diversos métodos desarrollados para la modificación del sustrato sólido, los basados en la formación de monocapas autoensambladas (SAMs) de alcanotioles bifuncionales son los métodos más prometedores y los más estudiados hasta el momento, como se mencionó en los capítulos anteriores¹⁷⁻²³. Si bien los sustratos de oro monocristalinos han sido las más utilizadas para la formación y estudio de SAMs, en los últimos años el empleo de sustratos policristalinos ha experimentado un creciente interés debido a su fácil manipulación y menor costo^{17,24-29}. En este marco, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral es la modificación de los sustratos sólidos para formar superficies biofuncionales. Los pasos en la formación de estas superficies biofuncionales incluyen la formación de un enlace de coordinación entre el elemento de biorreconocimiento y el sustrato sólido modificado, por lo cual es muy importante la disponibilidad de los grupos COO⁻ para incluir sitios Ni(II) y así adsorber proteínas His tag con orientación preferencial. En el presente capítulo, se presenta el comportamiento electroquímico de sustratos de oro policristalino (Au) modificados con SAMs mixtas de 6-ferrocenil hexanotiol (Fc), ácido 3-mercaptopropionico (3-COOH) y ácido 6-mercaptophexanoico (6-COOH) en distintos electrolitos para establecer las condiciones experimentales adecuadas para el desarrollo de la superficie biofuncional. Este estudio toma como punto de partida los resultados presentados en el capítulo anterior utilizando el sistema modelo con sustratos de Au(111) modificados con monocapas mixtas de n-COOH+Fc. Además, se avanza en la modificación del sustrato en cuanto a la incorporación de cationes Ni(II), proceso

que se estudia *in situ* por microbalanza de cristal de cuarzo con control de disipación (QCM-D).

5.2.- Resultados y discusión

5.2.1.- Sustratos de Au modificados con SAMs mixtas

Antes de cada modificación, los sustratos sólidos de Au, fueron pulidos y evaluados según el procedimiento descrito en el Capítulo 3. Las SAMs mixtas de n-COOH+Fc se formaron incubando los sustratos en soluciones conteniendo ambos componentes (con distintas relaciones y concentración total 2,00 mM) disueltos en CH₂Cl₂, en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas con los sustratos de Au(111).

5.2.1.1.- Voltamperometría cíclica

5.2.1.1.1.- Tratamiento de ciclado previo en HClO₄ 1,00 M

La Figura 5.1 compara el comportamiento electroquímico de los sustratos de Au modificados con soluciones de n-COOH+Fc con distintas relaciones de sus componentes durante el ciclado (10 Ciclos) en HClO₄ 1,00 M a 0,050 V.s⁻¹.

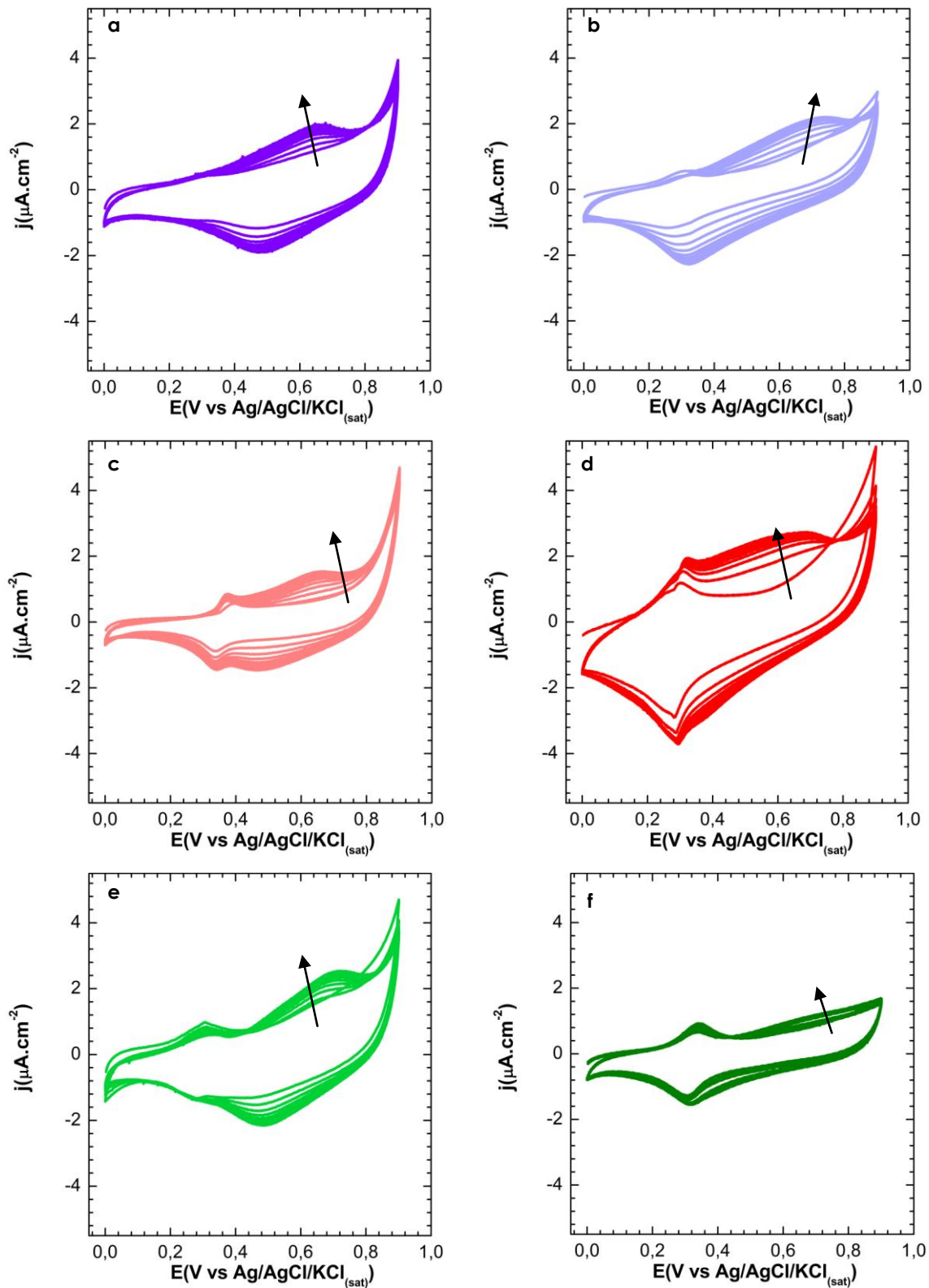


Figura 5.1.- Ciclado (10 Ciclos) en HClO_4 1,00 M a $0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ de los sustratos de Au modificados con SAMs mixtas de $n\text{-COOH}+\text{Fc}$ para: a.- 1,75 mM/0,25 mM; c.- 1,50 mM /0,50 mM y e.- 1,00 mM/1,00 mM de Au/3-COOH +Fc y b.- 1,75 mM/0,25 mM; d.- 1,50 mM/0,50 mM y f.- 1,00 mM/1,00 mM Au/6-COOH +Fc. ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y EC: alambre de Pt.

En los perfiles voltamperométricos de los sustratos de Au modificados con SAMs mixtas predomina la respuesta de los grupos n-COOH frente a los grupos Fc adsorbidos en todas las relaciones estudiadas. Como se observó en el Capítulo 4 (Figura 4.21), los sustratos de Au/n-COOH registran, con el ciclado en HClO₄ 1,00 M, ondas de oxidación y de reducción que incrementan sus valores de j con los barridos de potencial. Calvente y colaboradores³⁰ establecen que esta señal se produce por la deprotonación de los grupos COOH como consecuencia del ciclado en una ventana muy amplia de potencial. La presencia del mediador redox se observa más claramente cuando se comparan las distintas relaciones. En los voltamperogramas cíclicos obtenidos con Au/n-COOH+Fc 1,75 mM/0,25 mM no se distingue la respuesta de oxido-reducción del grupo Fc, mientras que los E_o del mediador redox adsorbido se presentan entre 0,30 V y 0,35 V y los E_r entre 0,23 V y 0,32 V en los sustratos de Au modificados con soluciones de Fc más concentradas. Esta respuesta es similar al comportamiento observado con los sustratos de Au(111) modificados con monocapas simples de Fc (Tabla 4.1). El ciclado en HClO₄ 1,00 M no produce un marcado efecto en las respuestas electroquímicas sucesivas de oxido-reducción del grupo Fc, aunque se decidió utilizarlo como un tratamiento previo a las determinaciones electroquímicas posteriores con el objeto de lograr la mayor homogeneidad posible del sustrato modificado, tal como se discutió en el Capítulo 4.

5.2.1.1.2.- Desorción reductiva de tioles

Las Figuras 5.2 y 5.3 muestran los voltamperogramas cíclicos realizados en la ventana de potencial correspondiente a la desorción reductiva de la monocapa obtenidos con sustratos de Au con distintas modificaciones: monocapas simple (Fc o n-COOH) y mixtas preparadas con dos relaciones de componentes (1,50 mM /0,50 mM y 1,00 mM/1,00 mM). En la primera figura se muestran los voltamperogramas cíclicos para SAMs preparadas con 3-COOH mientras que en la segunda, aquellos correspondientes a las SAMs con carboxilatos de cadena

larga. Todos los voltamperogramas cíclicos fueron realizados en KOH 0,100 M a 0,050 V.s⁻¹.

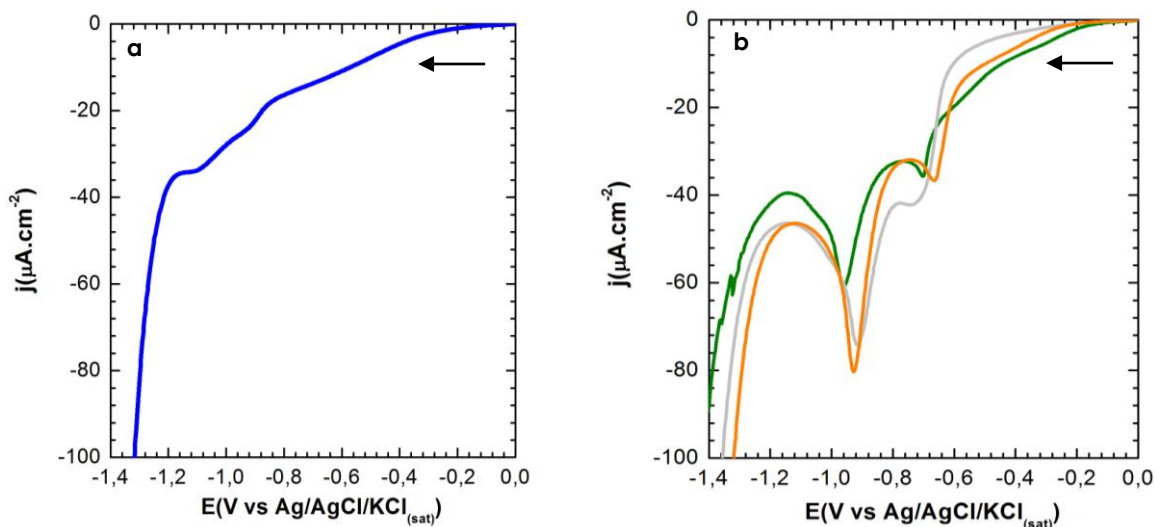


Figura 5.2 Voltamperogramas cíclicos realizados en KOH 0,10 M a 0,050 V.s⁻¹ de los sustratos de Au modificados con SAMs de: a.- Au/Fc (—) y b.- Au/3-COOH (—), Au/3-COOH+Fc 1,00 mM/1,00 mM (—) y Au/3-COOH+Fc 1,5 mM/0,5 mM (—).

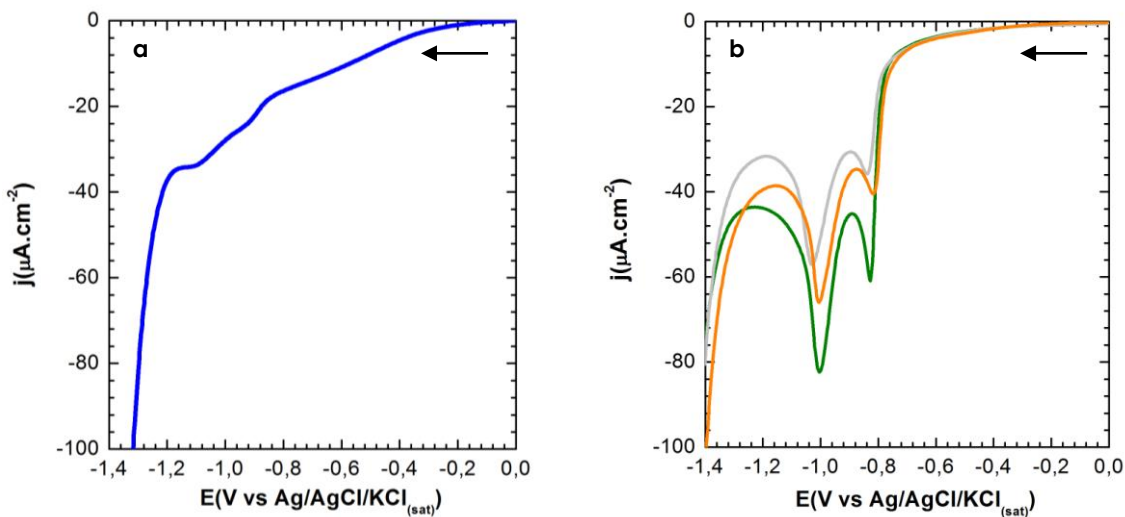


Figura 5.3 Voltamperogramas cíclicos realizados en KOH 0,10 M a 0,050 V.s⁻¹ de los sustratos de Au modificados con SAMs de: a.- Au/Fc (—), Au/6-COOH (—), Au/6-COOH+Fc 1,00 mM/1,00 mM (—) y Au/6-COOH+Fc 1,5 mM/0,5 mM (—). ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y EC: alambre de Pt.

En primer lugar, los voltamperogramas cíclicos de los sustratos de Au modificados con monocapas simples de Fc muestran dos señales de reducción

(Er1 y Er2), característica que no se observa sobre Au(111). Por lo tanto, este comportamiento está asociado a la policristalinidad del sustrato, es decir a la orientación cristalográfica del sustrato de Au al momento de la adsorción³¹. Esta orientación condiciona fuertemente la fuerza de interacción Au-S y por lo tanto da lugar a señales voltamperométricas muy anchas³². Es importante notar la diferencia de las ondas voltamperométricas obtenidas con el sustrato Au(111)(Figura 4.28) y aquellas con oro policristalino (Figuras 5.2 y 5.3). Los sustratos de Au modificados con SAMs simples de n-COOH y mixtas, para ambos largos de cadena, también presentan dos señales de reducción. Este comportamiento es semejante al observado con los sustratos de Au(111) y a los resultados publicados en la bibliografía^{24,26,33-36}. Los valores de Er1 y Er2 dependen del largo de cadena aunque son independientes de la composición de la monocapa. En la Tabla 5.1, se presentan los valores de Er1 y Er2 promedios (calculados a partir de tres o más repeticiones por experimento) correspondientes a la desorción reductiva para cada tipo de SAMs estudiada.

Modificación	Er1 (V)	Er2 (V)
Au/6-COOH	-0,83 ± 0,03	-1,02 ± 0,02
Au/6-COOH+Fc*	-0,81 ± 0,02	-1,00 ± 0,02
Au/3-COOH	-0,66 ± 0,09	-0,96 ± 0,01
Au/3-COOH+Fc*	-0,66 ± 0,01	-0,93 ± 0,01
Au/Fc	-0,96 ± 0,05	-1,09 ± 0,09

Tabla 5.1.- Potenciales de reducción promedio (Er1 y Er2) correspondientes a la desorción para cada tipo de SAM estudiado. *Estos valores de Er1 y Er2 corresponden al promedio obtenido de todas las composiciones estudiadas.

Como ya se mencionó, la única señal de desorción reductiva que se observa a (-1,07±0,01) V en las monocapas simples de Fc sobre Au(111), se desdobra en dos señales en el sustrato policristalino. En SAMs simples y mixtas de n-COOH, ambos valores de Er aparecen a potenciales más positivos a medida que disminuye el largo de la cadena del tiol. Esta misma tendencia ha sido observada

por autores como Strutwolf³³ o Porter³⁷ para SAMs simples de carboxilatos y discutida en el Capítulo 4^{33,35,37-39}.

A continuación, se presentan los valores promedios de las densidades de carga de desorción (Q_{Td}) y de la cantidad adsorbida (Γ) para las SAMs formadas a partir de distintas relaciones de concentración entre Fc y 6-COOH (Tabla 5.2) o 3-COOH (Tabla 5.3).

Concentración inicial de cada componente		Q_{Td} ($10^1 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Γ ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)
6-COOH (mM)	Fc (mM)		
2,00	0	(13 ± 3)	1,3 ± 0,2
1,75	0,25	(12 ± 2)	1,2 ± 0,1
1,50	0,50	(12 ± 3)	1,2 ± 0,1
1,00	1,00	(10 ± 2)	1,0 ± 0,1
0,25	1,75	(10 ± 2)	0,8 ± 0,1
0	2,00	(1,0 ± 0,5)	0,2 ± 0,1

Tabla 5.2.- Valores de Q_r y Γ promedios, calculados a partir de los voltamperogramas cíclicos de desorción reductiva en KOH 0,10 M, $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Concentración inicial de cada componente		Q_{Td} ($10^1 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Γ ($\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$)
3-COOH (mM)	Fc (mM)		
2,00	0	(6 ± 2)	0,6 ± 0,1
1,75	0,25	(6 ± 2)	0,6 ± 0,1
1,50	0,50	(5 ± 2)	0,6 ± 0,1
1,00	1,00	(6 ± 2)	0,6 ± 0,1
0	2,00	(1,0 ± 0,5)	0,2 ± 0,1

Tabla 5.3.- Valores de Q_r y Γ promedios, calculados a partir de los voltamperogramas cíclicos de desorción reductiva en KOH 0,10 M, $v = 0,050 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

A partir de los resultados presentados en las Tablas 5.2 y 5.3, se observó que los sustratos de Au modificadas con SAMs mixtas de Fc y 6-COOH presentaron el

doble en los valores de Q_{Td} con respecto a SAMs mixtas de Fc y 3-COOH. Resultados similares han sido informados en el Capítulo 4 para sustratos de Au(111)/6-COOH+Fc, comparándose dicho valor con lo reportado por Sevilla y colaboradores⁴⁰ para SAMs mixtas de carboxilatos tiolados con seis átomos de carbono donde la Q_{Td} fue de $(12 \pm 3) \cdot 10^1 \mu C \cdot cm^{-2}$.

Por otro lado, los valores de Q_{Td} obtenidos en estos sustratos, son menores a los obtenidos en sustratos de Au(111) donde los valores observados fueron de Q_{Td} $(5 \pm 2) 10^1 \mu C \cdot cm^{-2}$. Williams y colaboradores²³ informan en sus trabajos valores de Q_{Td} de $33,9 \mu C \cdot cm^{-2}$ para sustratos de oro modificados con grupos Fc tiolados con cadenas carbonadas de seis átomos de carbono. De acuerdo a estos autores, este valor corresponde a un 75% de una monocapa completa.

Al igual que los resultados presentados en el Capítulo 4, se puede observar que en los sustratos de Au modificados con SAMs mixtas, la presencia de Fc no modifica prácticamente los voltamperogramas cíclicos de las monocapas de n-COOH. Por lo tanto, aun cuando la concentración en la solución de inmersión de ambos componentes es la misma, la composición superficial está enriquecida en n-COOH.

5.2.2.- Sustratos de Au modificados con SAMs mixtas y sitios Ni(II)

Una vez analizadas las respuestas de los sustratos de Au modificados con las distintas SAMs mixtas, se seleccionó la relación 1,00 mM/1,00 mM n-COOH y Fc que es la combinación más precisa desde el punto de vista experimental. Por lo tanto se utilizó esta relación para desarrollar la superficie biofuncional con la incorporación de grupos superficiales Ni(II) que finalmente permitan la unión de His₆-RgDAAO.

A continuación se presentan los voltamperogramas cíclicos experimentales realizados en NaClO₄ 0,10 M luego del ciclado en HClO₄ 1,00 M y de la incubación de los sustratos de Au modificado con SAMs mixtas en Ni(II).

La Figura 5.4 muestra voltamperogramas cíclicos obtenidos con sustratos de Au/3-COOH+Fc y Au/6-COOH+Fc, ciclados en HClO₄ 1,00 M y posteriormente en NaClO₄ 0,10 M a 0,050 V.s⁻¹.

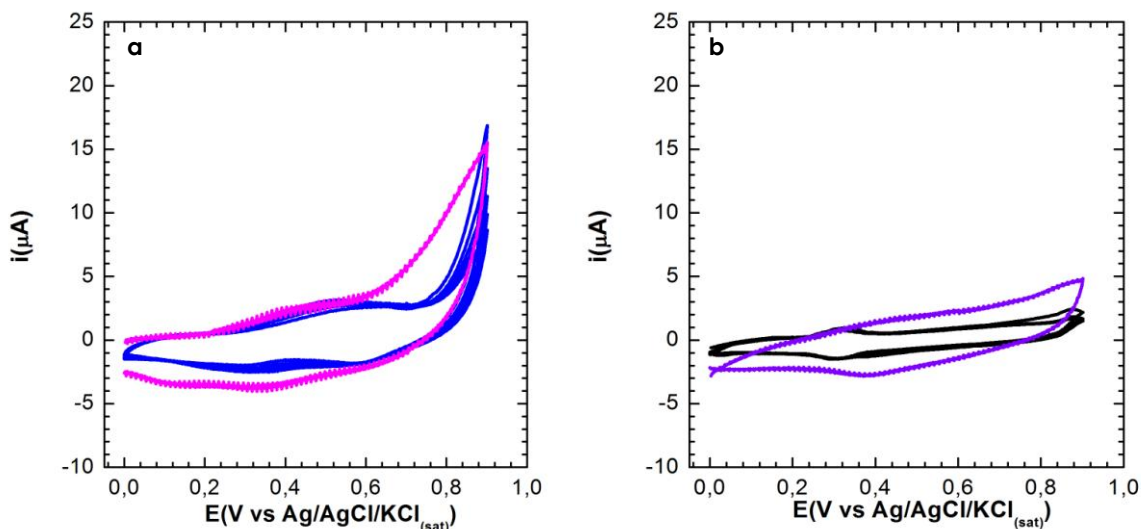


Figura 5.4 Voltamperogramas cíclicos a 0,050 V.s⁻¹ para a.- Au/3-COOH+Fc en HClO₄ 1,00 M (—) y en NaClO₄ 0,10 M (—) y b.- Au/6-COOH+Fc en HClO₄ 1,00 M (—) y en NaClO₄ 0,10 M (—). ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y EC: alambre de Pt.

Como puede observarse en la Figura 5.4 a, el cambio de electrolito soporte y de pH cambia ligeramente la forma del voltamperogramas cíclicos en la zona capacitiva y en la zona donde aparecen las señales, producto de las interacciones entre los grupos COOH con el sustrato de Au a través de los H⁺³⁰. Probablemente, esto ocurre por la deprotonación de estos grupos funcionales cuando se produce el cambio de electrolito soporte y de pH. Al aplicar las mismas condiciones experimentales en sustratos de Au/6-COOH+Fc y considerando los resultados de SERS presentados en el Capítulo 4 para este tipo de sustratos modificados, se observa, en la Figura 5.4 b, que el cambio de electrolito soporte modifica en menor medida la señal que se genera por la interacción de los grupos COOH con el sustrato de Au vía el H⁺³⁰. Además, esta característica estructural que presentan estos sustratos permitiría ver más claramente la señal de los grupos Fc adsorbido. Por otro lado, estas SAMs mixtas con COOH de cadenas carbonadas más largas presentarían interacciones más

fuerzas con el sustrato de Au y el cambio de electrolito soporte no rompería completamente la conformación *gauche* presente.

Teniendo en cuenta la modificación de sustratos sólidos de oro propuesta en el Capítulo 2, para anclar sitios Ni(II) es necesario tener grupos COO⁻ superficiales. Las Figuras 5.5 muestra voltamperogramas cíclicos de Au/3-COOH+Fc+Ni(II) y Au/6-COOH+Fc+Ni(II) obtenidos en NaClO₄ 0,10 M a 0,050 V.s⁻¹.

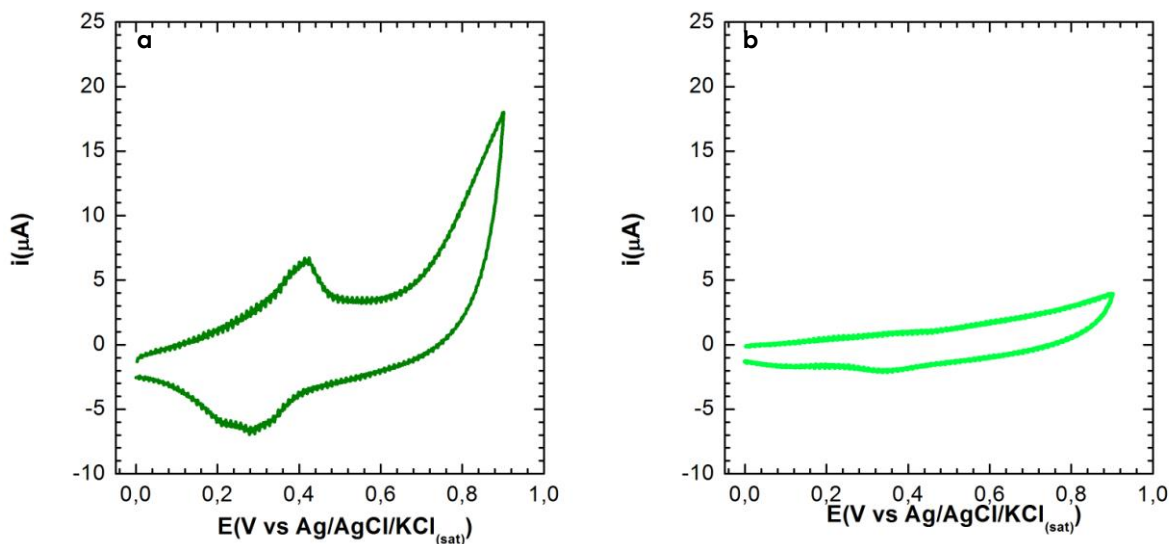


Figura 5.5 a.- Voltamperogramas cíclicos en NaClO₄ 0,10 M a 0,050 V.s⁻¹ para a.- Au/3-COOH+Fc+Ni(II) en NaClO₄ 0,10 M (—) y b.- Voltamperogramas cíclicos para Au/6-COOH+Fc+Ni(II) (—). ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y EC: alambre de Pt.

Los voltamperogramas cíclicos obtenidos con sustratos de Au/3-COOH+Fc+Ni(II), realizados en NaClO₄ 0,10 M, Figura 5.5 a, muestran ondas de oxidación y reducción que corresponden a los Fc tiolados adsorbidos, probablemente la interacción entre los cationes Ni(II) con los COO⁻ superficiales genere algún orden que permite observar esa señal. Por el contrario, los voltamperogramas cíclicos obtenidos con sustratos de Au/6-COOH+Fc+Ni(II), no presentaron las señales de oxidación y reducción de los Fc adsorbidos, probablemente como consecuencia de que la conformación *gauche* impidió la formación de los complejos entre los grupos COO⁻ y los cationes Ni(II).

5.2.1.2.- Microbalanza de cristal de cuarzo con disipación (QCM-D)

En el desarrollo de la superficie biofuncional planteada en este trabajo, la modificación de los sustratos sólidos con sitios Ni(II) es uno de los pasos fundamentales para lograr la biofuncionalización del sustrato modificado.

Como primer análisis, se estudió la incorporación *in situ* de Ni(II) sobre sustratos de Au/n-COOH+Fc, empleando QCM-D. Para su preparación, estos sustratos de Au fueron lavados en solución piraña y enjuagados exhaustivamente con agua deionizada. A continuación, estos sustratos sólidos, se modificaron según el procedimiento descrito en el Capítulo 3, por el cual las SAMs mixtas se formaron a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM de cada componente en CH₂Cl₂ durante 15 horas. Los sustratos de Au utilizados para los análisis en QCM-D no fueron ciclados previamente en HClO₄ 1,00 M, debido a que este tratamiento previo desprendió la capa de metal depositada sobre el cristal de cuarzo.

Una vez colocados en la celda para QCM-D, los sustratos de Au/n-COOH+Fc fueron lavados con agua deionizada y puestos en contacto con una solución de Ni(NO₃)₂ a flujo constante por 1:00 hora. Posteriormente, los sustratos modificados se lavaron con agua deionizada.

La Figura 5.6 y la Figura 5.7 muestran los cambios de frecuencia (Δf_n), en líneas sólidas en el eje izquierdo, y de la disipación (ΔD_n), con símbolos más líneas en el eje derecho, para los sobretonos (n) 3, 5, 7 y 9 en función del tiempo de exposición de la solución de Ni(II) para sustratos Au/3-COOH+Fc y Au/6-COOH+Fc, respectivamente.

Como ya se mencionó en el Capítulo 3, la disminución en los registros de Δf_n , indica que la masa se incrementa sobre el sustrato sólido, si los valores de ΔD_n son constantes, a diferentes valores de n, la película formada sobre el sustrato es acústicamente rígida. En estas condiciones puede utilizarse la ecuación de Sauerbrey (Ecuación 3.1) para calcular la masa del adsorbato sobre el sustrato a partir del cambio en Δf_n . Por otro parte, cuando el proceso es acústicamente

viscoelástico los valores de ΔD_n se separan para los distintos sobretonos y la ecuación de Sauerbrey pierde validez^{41,42}.

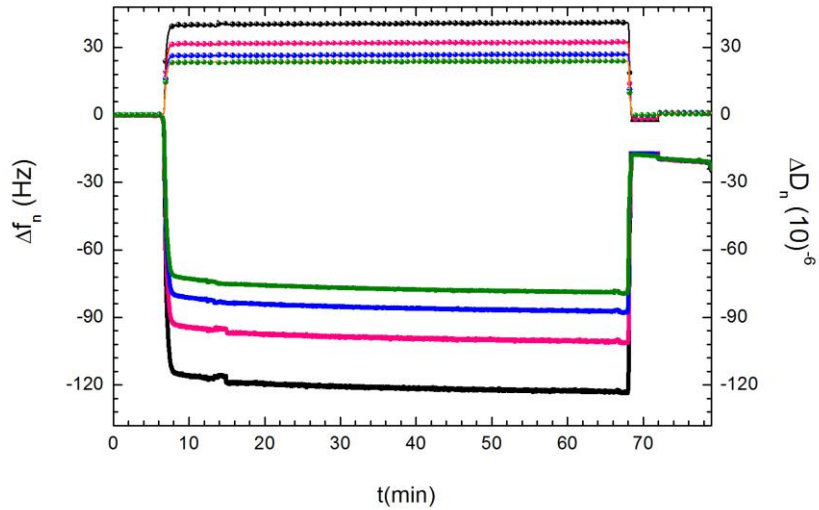


Figura 5.6.- Δf_n (líneas, eje izquierdo) y ΔD_n (líneas + símbolos, eje derecho) a valores de sobretonos (n) de: 3 (negro), 5 (fucsia), 7 (azul), y 9 (verde) para la modificación del sustrato sólido de Au/3-COOH+Fc+Ni(II) en solución acuosa.

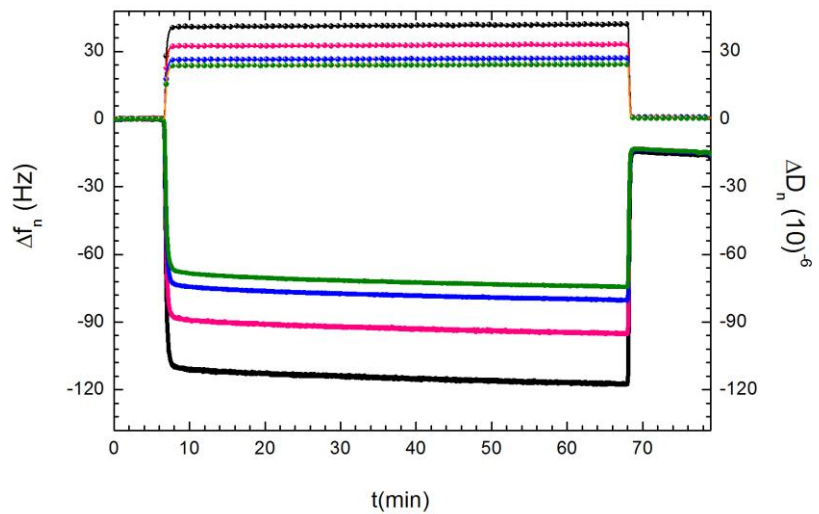


Figura 5.7.- Δf_n (líneas, eje izquierdo) y ΔD_n (líneas + símbolos, eje derecho) a valores de sobretonos (n) de: 3 (negro), 5 (fucsia), 7 (azul), y 9 (verde) para la modificación del sustrato sólido de Au/6-COOH+Fc+Ni(II) en solución acuosa.

Los resultados observados, tanto en sustratos sólidos de Au/3-COOH+Fc (Figura 5.6) como en los sustratos de Au/6-COOH+Fc (Figura 5.7) muestran una disminución muy marcada de la Δf_n cuando estos sustratos modificados se ponen en contacto con una solución acuosa de Ni(II). Por otro lado, también puede observarse que los valores de ΔD_n se separan para los distintos sobretonos. Estos cambios en la frecuencia de resonancia y la disipación indican que existe un aumento de la masa sobre el sustrato y que el proceso de anclaje de los cationes Ni(II) es acústicamente viscoelástico. Sin embargo, la película resultante se vuelve rígida después del lavado con agua deionizada y Δf_n se estabiliza en un valor constante. Para conocer la masa depositada de Ni(II) se comparó el cambio neto de Δf_n registrados antes de poner en contacto los sustratos de Au/n-COOH+Fc con la solución acuosa de Ni(II) y luego del lavado con agua deionizada. El valor promedio registrado para este cambio de frecuencia neto es de -18 Hz para ambos sustratos que representa un aumento de masa de 0,32 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de Ni(II) ó (5 ± 1) $\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ de Ni(II). Comparando estos resultados con los obtenidos por CV para sustratos modificados con Au/n-COOH, se puede observar que la relación entre los grupos carboxilatos presentes y los sitios Ni(II) están en el mismo orden de magnitud.

Una vez finalizados los lavados, los cationes Ni(II), inmovilizados sobre la superficie permanecen formando complejos con los carboxilatos y con moléculas de agua, las cuales serán reemplazadas por los residuos de histidina unidos al extremo de la proteína recombinante durante el proceso de biofuncionalización superficial⁴¹.

5.3.- Conclusiones

En este capítulo, se estudió por CV, el comportamiento de las SAMs simples de Fc, de 3-COOH y de 6-COOH y el de las SAMs mixtas sobre sustratos de oro policristalino. Los resultados obtenidos y sus similitudes a lo analizado en el capítulo anterior, permitieron concluir:

- Ⓢ El ciclado en HClO_4 1,00 M no produce un marcado efecto en las respuestas electroquímicas sucesivas de oxido-reducción del grupo Fc. Por otro lado, el ciclado en HClO_4 1,00 M de sustratos de Au/6-COOH+Fc provoca una interacción muy fuerte con los sustratos de Au, irreversible frente al cambio de electrolito soporte impidiendo así el anclaje de sitios Ni(II).
- Ⓢ En los sustratos de Au modificados con SAMs mixtas, aún cuando la concentración en la solución de inmersión de ambos componentes es la misma, la composición superficial está enriquecida en n-COOH.
- Ⓢ El tipo de sustrato no condiciona la energética del proceso de desorción en las SAMs simples y mixtas de n-COOH, ambos valores de E_r aparecen a potenciales más positivos a medida que disminuye el largo de la cadena del tiol.
- Ⓢ Los resultados obtenidos por QCM-D, permitieron observar el anclaje de los cationes Ni(II) a los grupos COO^- disponibles de las SAMs mixtas, dando lugar a la formación de complejos superficiales.

5.4.- Bibliografía

1. Valenti LE, Herrera E, Stragliotto F, et al. Optimizing the Bioaffinity Interaction between His-Tag Proteins and Ni (II) Surface Sites. *Proteins Interfaces III State art.* 2012;(li):37-53. doi:10.1021/bk-2012-1120.
2. Carot ML, Torresi RM, Garcia CD, Esplandiu MJ, Giacomelli CE. Electrostatic and Hydrophobic Interactions Involved in CNT Biofunctionalization with Short ss-DNA. *J Phys Chem C.* 2010;114(10):4459-4465. doi:10.1021/jp9085359.
3. Briand E, Gu C, Boujday S, Salmain M, Herry JM, Pradier CM. Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs: Topography/bioactivity relationship - A combined FT-RAIRS, AFM and QCM investigation. *Surf Sci.* 2007;601(18):3850-3855. doi:10.1016/j.susc.2007.04.102.
4. Giacomelli CE, Valenti LE, Carot ML. Biomolecules and Solid Substrate Interaction: Key Factors in Developing Biofunctional Surfaces. In: *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Second Edition.* Vol ; 2007:1-16. doi:10.1081/E-ESCS-120047144.

5. Briand E, Humblot V, Landoulsi J, et al. Chemical modifications of Au/SiO₂ template substrates for patterned biofunctional surfaces. *Langmuir*. 2011;27(2):678-685. doi:10.1021/la101858y.
6. Knopp D, Tang D, Niessner R. Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal Chim Acta*. 2009;647(1):14-30. doi:10.1016/j.aca.2009.05.037.
7. Sarma AK, Vatsyayan P, Goswami P, Minteer SD. Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. *Biosens Bioelectron*. 2009;24(8):2313-2322. doi:10.1016/j.bios.2008.09.026.
8. Ahirwal GK, Mitra CK. Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(9):2016-2020. doi:10.1016/j.bios.2010.01.029.
9. Siqueira JR, Caseli L, Crespilho FN, Zucolotto V, Oliveira ON. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(6):1254-1263. doi:10.1016/j.bios.2009.09.043.
10. Gulaboski R, Mirčeski V, Bogeski I, Hoth M. Protein film voltammetry: Electrochemical enzymatic spectroscopy. A review on recent progress. *J Solid State Electrochem*. 2012;16(7):2315-2328. doi:10.1007/s10008-011-1397-5.
11. Zhang YQ, Tao ML, Shen W De, et al. Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*. 2004;25(17):3751-3759. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.019.
12. Haynes CA, Norde W. Structures and Stabilities of Adsorbed Proteins. *J Colloid Interface Sci*. 1995;169(2):313-328. doi:10.1006/jcis.1995.1039.
13. Aissaoui N, Bergaoui L, Boujday S, Lambert JF, Méthivier C, Landoulsi J. Enzyme immobilization on silane-modified surface through short linkers: Fate of interfacial phases and impact on catalytic activity. *Langmuir*. 2014;30(14):4066-4077. doi:10.1021/la404935q.
14. Mena ML, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal Biochem*. 2005;336(1):20-27. doi:10.1016/j.ab.2004.07.038.
15. Karimi Shervedani R, Samiei Foroushani M. Comparative Electrochemical Behavior of Proteins; Cytochrome c, Agaricus Bisporus Laccase, and Glucose Oxidase, Immobilized onto Gold-Thiol Self-Assembled Monolayer via Electrostatic, Covalent, and Covalent Coordinate Bond Methods. *Electrochim Acta*. 2016;187:646-654. doi:10.1016/j.electacta.2015.11.080.

16. Karimi Shervedani R, Samiei Foroushani M, Bagheri Dehaghi S. Functionalization of gold mercaptopropionic acid self-assembled monolayer with 5-amino-1,10-phenanthroline: Interaction with iron(II) and application for selective recognition of guanine. *Electrochim Acta*. 2015;164:344-352. doi:10.1016/j.electacta.2015.02.170.
17. Rudnev A V, Yoshida K, Wandlowski T. Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on low-index gold single crystal electrodes. *Electrochim Acta*. 2013;87:770-778. doi:10.1016/j.electacta.2012.09.090.
18. Pensa E, Vericat C, Grumelli D, et al. New insight into the electrochemical desorption of alkanethiol SAMs on gold. *Phys Chem Chem Phys*. 2012;14(35):12355. doi:10.1039/c2cp41291h.
19. Uehara TM, de Aguiar HB, Bergamaski K, Miranda PB. Adsorption of Alkylthiol Self-Assembled Monolayers on Gold and the Effect of Substrate Roughness: A Comparative Study Using Scanning Tunneling Microscopy, Cyclic Voltammetry, Second-Harmonic Generation, and Sum-Frequency Generation. *J Phys Chem C*. 2014;140821071532009. doi:10.1021/jp5054919.
20. Rodenhausen KB, Duensing BA, Kasputis T, et al. In-situ monitoring of alkanethiol self-assembled monolayer chemisorption with combined spectroscopic ellipsometry and quartz crystal microbalance techniques. *Thin Solid Films*. 2011;519(9):2817-2820. doi:10.1016/j.tsf.2010.11.081.
21. Sedeva IG, Fetzer R, Fornasiero D, Ralston J, Beattie DA. Adsorption of modified dextrans to a hydrophobic surface: QCM-D studies, AFM imaging, and dynamic contact angle measurements. *J Colloid Interface Sci*. 2010;345(2):417-426. doi:10.1016/j.jcis.2010.01.075.
22. Fick J, Wolfram T, Belz F, Roke S. Surface-specific interaction of the extracellular domain of protein L1 with nitrilotriacetic acid-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2010;26(2):1051-1056. doi:10.1021/la902320b.
23. Méndez De Leo LP, de la Llave E, Scherlis D, Williams FJ. Molecular and electronic structure of electroactive self-assembled monolayers. *J Chem Phys*. 2013;138(11):114707. doi:10.1063/1.4795575.
24. Carvalhal RF, Freire RS, Kubota LT. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanalysis*. 2005;17(14):1251-1259. doi:10.1002/elan.200403224.
25. Hoogvliet J, Dijkema M, Kamp B, van Bennekom WP. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible

- surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4. *Anal Chem.* 2000;72(9):2016-2021. doi:10.1021/ac991215y.
26. Madueño R, Sevilla JM, Pineda T, Román AJ, Blázquez M. A voltammetric study of 6-mercaptopurine monolayers on polycrystalline gold electrodes. *J Electroanal Chem.* 2001;506(2):92-98. doi:10.1016/S0022-0728(01)00482-X.
 27. Cancino J, Machado SAS. Microelectrode array in mixed alkanethiol self-assembled monolayers: Electrochemical studies. *Electrochim Acta.* 2012;72:108-113. doi:10.1016/j.electacta.2012.04.009.
 28. Hong YK, Yu H, Lee TG, et al. Highly-ordered self-assembled monolayer of alkanethiol on thermally annealed polycrystalline gold films. *Chem Phys.* 2014;428:105-110. doi:10.1016/j.chemphys.2013.10.019.
 29. Henry OYF, Maliszewska A, O'Sullivan CK. DNA surface nanopatterning by selective reductive desorption from polycrystalline gold electrode. *Electrochem commun.* 2009;11(3):664-667. doi:10.1016/j.elecom.2008.12.063.
 30. Luque AM, Mulder WH, Calvente JJ, Cuesta A, Andreu R. Proton transfer voltammetry at electrodes modified with acid thiol monolayers. *Anal Chem.* 2012;84(13):5778-5786. doi:10.1021/ac301040r.
 31. Strutwolf J, O'Sullivan CK. Microstructures by selective desorption of self-assembled monolayer from polycrystalline gold electrodes. *Electroanalysis.* 2007;19(14):1467-1475. doi:10.1002/elan.200703894.
 32. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications.* Vol 2da Edifio. (JOHN WILEY & SONS I, ed.); 2001.
 33. Strutwolf J, O'Sullivan CK. Microstructures by selective desorption of self-assembled monolayer from polycrystalline gold electrodes. *Electroanalysis.* 2007;19(14):1467-1475. doi:10.1002/elan.200703894.
 34. Valiokas R, Kienkar G, Tinazli A, et al. Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid groups: Characterization and application. *Langmuir.* 2008;24(9):4959-4967. doi:10.1021/la703709a.
 35. Nishizawa M, Sunagawa T, Yoneyama H. Selective desorption of 3-mercaptopropionic acid from a mixed monolayer with hexadecanethiol assembled on a gold electrode. *J Electroanal Chem.* 1997;436(1-2):213-218. doi:10.1016/S0022-0728(97)00329-X.
 36. Imabayashi S, Hobara D, Kakiuchi T. Selective replacement of adsorbed alkanethiols in phase-separated binary self-assembled monolayers by electrochemical partial desorption. *Langmuir.* 1997;7463(14):4502-4504. doi:10.1021/la970447u.

37. Walczak M, Popenoe DD, Deinhammer RS, Lamp BD, Chung C, Porter MD. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage. *Langmuir*. 1991;7:2687-2693. doi:10.1021/la00059a048.
38. Wong EHJ, May GL, Wilde CP. Oxidative desorption of thiols as a route to controlled formation of binary self assembled monolayer surfaces. *Electrochim Acta*. 2013;109:67-74. doi:10.1016/j.electacta.2013.07.072.
39. Shin-ichiro I, Iida M, Hobarra D, Feng ZQ, Niki K, Kakiuchi T. Reductive desorption of carboxylic-acid-terminated alkanethiol monolayers from Au(111) surfaces. *J Electroanal Chem*. 1997;428(1-2):33-38. doi:10.1016/S0022-0728(97)00006-5.
40. Madueño R, Sevilla JM, Pineda T, Román a. J, Blázquez M. A voltammetric study of 6-mercaptopurine monolayers on polycrystalline gold electrodes. *J Electroanal Chem*. 2001;506(2):92-98. doi:10.1016/S0022-0728(01)00482-X.
41. Valenti LE, Martins VL, Herrera E, Torresi RM, Giacomelli CE. Ni(ii)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins. *J Mater Chem B*. 2013;1(38):4921. doi:10.1039/c3tb20769b.
42. Delcroix MF, Demoustier-Champagne S, Dupont-Gillain CC. Quartz crystal microbalance study of ionic strength and pH-dependent polymer conformation and protein adsorption/desorption on PAA, PEO, and mixed PEO/PAA brushes. *Langmuir*. 2014;30(1):268-277. doi:10.1021/la403891k.



Capítulo 6

Expresión y caracterización del elemento de biorreconocimiento

“Todos somos muy ignorantes, lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas”.

Albert Einstein

6.1.- Introducción

His₆-RgDAAO recombinante como elemento de biorreconocimiento

En el desarrollo de superficies biofuncionales, muchos trabajos, elijen como elemento de biorreconocimiento a la enzima D-aminoácido oxidasa (DAAO) proveniente de levadura¹⁻⁴. Esta enzima, cataliza la oxidación de D-aminoácidos a sus correspondientes cetoácidos, en presencia de oxígeno, formando H₂O₂ y amonio⁵⁻⁷. Algunos autores, postulan que la enzima proveniente de levadura *Rhodotorula gracilis*, (RgDAAO), tiene mayor eficiencia catalítica, especificidad de sustrato, estabilidad, mecanismo de unión sustrato-enzima, modo y efectividad de unión al cofactor⁸⁻¹⁰ que la correspondiente enzima de mamífero. Por estas características, la RgDAAO representa una mejor elección como elemento de biorreconocimiento. Además, la RgDAAO puede obtenerse fácilmente por técnicas recombinantes^{5,11}, lo cual permite incorporar modificaciones en su estructura primaria para lograr una buena unión con el sustrato sólido de la superficie biofuncional. Como se mencionó en los Capítulos 1 y 2, un diseño adecuado de estos sistemas implica promover una interacción fuerte y estable con el sustrato y orientación preferencial sin pérdida de actividad biológica del elemento de biorreconocimiento. Para cumplir con estos requisitos, es necesario modificar el sustrato, el elemento de biorreconocimiento o ambos. Tal como ya se indicó, una estrategia para modificar el elemento de biorreconocimiento, es utilizar técnicas de ADN recombinante, para fusionar un hexapéptido de histidina (His₆) a la enzima y generar las denominadas proteínas His tag^{12,13}. Esta marca de His₆ puede fusionarse en distintas posiciones de la estructura primaria de la proteína para inducir orientación preferencial sobre el sustrato sólido. En particular, el hexapéptido se puede incorporar en el C- o N-terminal o en un *loop* expuesto de la proteína. La elección del N-terminal, para fusionar la marca de His₆ a RgDAAO, se vincula con la capacidad de formación de complejos con cationes Ni(II)^{14,15}.

Con este propósito, se expresó y purificó la enzima His₆-RgDAAO en *Escherichia coli*. Asimismo, se determinó amperométricamente la actividad

enzimática de la His₆-RgDAAO en solución, utilizando concentraciones similares a las que se espera obtener cuando la enzima forme parte de la superficie biofuncional.

6.1.- Parte experimental

6.2.1.- Materiales

La transformación, expresión y purificación de la enzima recombinante His₆-RgDAAO se realizó en el CIQUIBIC, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Dr. Javier Valdez Taubas. Se utilizó el plásmido pET-15b (Novagen), que contiene un sistema de expresión dependiente del promotor viral T7, presenta múltiples sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para el clonado y agrega la secuencia que codifica para His-tag que se fusiona al extremo 5' del gen (N-terminal de la proteína).

El isopropil- β -Dtiogalactósido (IPTG) se adquirió en Invitrogen así como la resina de purificación de la proteína recombinante "ProBond" (QUIAGEN). El medio de cultivo fue Luria-Bertani (LB: peptona 10 g.L⁻¹, extracto de levadura 5 g.L⁻¹ y NaCl 10 g L⁻¹). Además, se le adicionó ampicilina al 0,1 % y glucosa al 0,5 %. El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico sin purificaciones posteriores: D-alanina (Fluka), CaCl₂, K₄P₂O₇, HClO₄ y KOH (Baker). Se emplearon tres cepas bacterianas de *Escherichia coli* (Genscript).

6.2.2.- Métodos

6.2.2.1.- Transformación, expresión y purificación

6.2.2.1.1.- Transformación

A partir de los plásmidos 398 y 399, obtenidos según el procedimiento descrito en la Tesis Doctoral de la Dra. Herrera¹⁰, se procedió a realizar la transformación de células competentes. Para la obtención de células competentes, se preparó un cultivo de la cepa de *E. coli* por dilución 1/20 en medio LB, a partir de un cultivo saturado y se incubó con agitación durante dos horas a 37 °C¹³. Cumplida la primera hora de incubación, se monitoreó el crecimiento bacteriano mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Cuando el cultivo se encontró en fase exponencial, se tomó una alícuota del cultivo y se lo centrifugó a 7000 rpm durante un minuto a 4 °C en condiciones de esterilidad. Luego, las células se colectaron, se resuspendieron en $CaCl_2$ estéril y se incubaron en hielo por 15 minutos. Nuevamente, se centrifugó la suspensión a 7000 rpm durante un minuto a 4 °C. Para finalizar, las células se resuspendieron en $CaCl_2$ y se las conservó a 4 °C.

Para la transformación, se tomó una alícuota de células competentes y otra de plásmido. Inmediatamente se colocaron en hielo por 15 minutos, luego en baño a 42 °C por 2 minutos y finalmente, en hielo por 5 minutos. A continuación, se agregó medio de cultivo LB y se incubó con agitación durante 45 minutos a 37 °C para permitir la expresión del gen que confiere la resistencia al antibiótico. Posteriormente, se sembraron las bacterias transformadas en un medio sólido LB-Agar suplementado con ampicilina (100 mg.L^{-1}) y glucosa (500 mg.L^{-1}) y se incubaron 16 h a 37 °C.

6.2.2.1.2.- Expresión de His₆-RgDAAO recombinante

La expresión de la enzima recombinante se comenzó colocando una colonia simple de bacterias transformadas en medio de cultivo líquido LB-ampicilina-glucosa. Las bacterias crecieron por 16 h a 37 °C con agitación constante. Se tomó una alícuota del cultivo líquido LB-ampicilina-glucosa y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} igual a 0,60. Se agregó IPTG 1,00 mM y se incubó durante 3 horas a 37 °C con agitación. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm

durante cinco minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* celular fue conservado a -20 °C hasta la purificación de la enzima recombinante.

6.2.2.1.3.- Purificación de His₆-RgDAAO recombinante

Para la purificación mediante cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC), las células congeladas se mezclaron con solución de lavado (glicerol 15 % V/V, NaCl 0,50 M, Tris-HCl 0,02 M pH 7,00). Para obtener un extracto proteico, las células se lisaron en un equipo Emulsiflex durante 4 minutos. Los extractos celulares se centrifugaron a 10000 rpm durante 40 minutos a 6 °C. Se separó el sobrenadante y se lo dejó en contacto con la resina "ProBond" (1,00 mL de resina cada 2 L de cultivo celular) en agitación toda la noche a 4 °C para la unión de la enzima His₆-RgDAAO a la resina.

Luego, se empaquetó la columna con la resina "ProBond" y se adicionó solución de lavado en ausencia y presencia de imidazol utilizando un gradiente de concentración: 20 mM, 40 mM y 200 mM. Todas las fracciones fueron recolectadas y analizadas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Las fracciones que contenían proteínas según las corridas electroforéticas se sometieron a una purificación mediante cromatografía.

En la purificación de His₆-RgDAAO mediante cromatografía de exclusión molecular, realizada para purificar la proteína recombinante, se equilibraron dos columnas Sephadex G25 con 25 mL de agua cada una, se sembraron la fracciones a purificar (2,5 mL cada una) y luego se lavó y eluyó la proteína con 3,5 mL de agua por columna. Todas las fracciones se recolectaron y se determinó en qué fracciones eluidas había una mayor concentración de proteína mediante la medición de la absorbancia a 280 nm. Esas fracciones fueron liofilizadas durante 24 horas. Finalmente, se guardó la proteína a -20 °C hasta su uso.

6.2.2.1.- Caracterización electroquímica

La reacción enzimática de la His₆-RgDAAO es tan rápida que la velocidad inicial puede determinarse *in situ* a partir de la intensidad de corriente originada por la producción de H₂O₂ en función del tiempo^{4,10,12,15}. Para evaluar la actividad enzimática de la His₆-RgDAAO, se empleó amperometría utilizando una celda electroquímica convencional de tres electrodos (ET: electrodo comercial de Au; ER: Ag/AgCl/KCl_(sat); EC: alambre de platino) con un volumen de electrolito soporte (BF) de 9,0 mL. A partir de los resultados previos^{4,15}, las determinaciones de H₂O₂ se realizaron aplicando un potencial de 0,450 V. En primer lugar, se estableció la línea de base con BF y D-alanina 10,00 mM y luego se adicionó una alícuota de la solución de la His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹ en BF a pH 8,50. Una vez adicionada la enzima, se determinó el cambio de intensidad de corriente en función del tiempo para evaluar la actividad de la His₆-RgDAAO y así el éxito de la expresión enzimática. En todas las medidas de amperometría, se emplearon soluciones de H₂O₂ estandarizadas mediante titulaciones de óxido-reducción con KMnO₄, previamente valorado con Na₂C₂O₄.

6.3.- Resultados y Discusión

6.3.1.- Expresión y purificación

La expresión del gen recombinante puede ser inducida luego de que las células han alcanzado un estado metabólico tal que la expresión de un gen foráneo resulte lo menos tóxico posible para la célula⁴. Para ello, es necesario crecer bacterias en un medio de cultivo líquido suplementado con glucosa y ampicilina. La glucosa inhibe la expresión basal del gen foráneo durante el crecimiento de la bacteria para evitar la posible toxicidad de la proteína recombinante sobre la célula, mientras que la ampicilina permite sólo el crecimiento de las bacterias transformadas. Cuando la absorbancia del medio

de cultivo alcanza un valor de 0,6 a 600 nm, se agrega IPTG como inductor de la expresión génica.

La Figura 6.1 muestra el análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida del producto de la expresión de His₆-RgDAAO. En el carril 1, se sembró un extracto proteico de células competente a modo de control. En los carriles siguientes, 2 y 4, se colocó una alícuota de extractos proteicos obtenidos de distintas colonias transformadas que fueron inducidas con IPTG mientras que en los carriles 3, 6 se colocó una alícuota de las mismas colonias sin inducir. El IPTG induce la expresión de la His₆-RgDAAO que se verifica por el aumento en la intensidad de una banda correspondiente a 40 kDa.

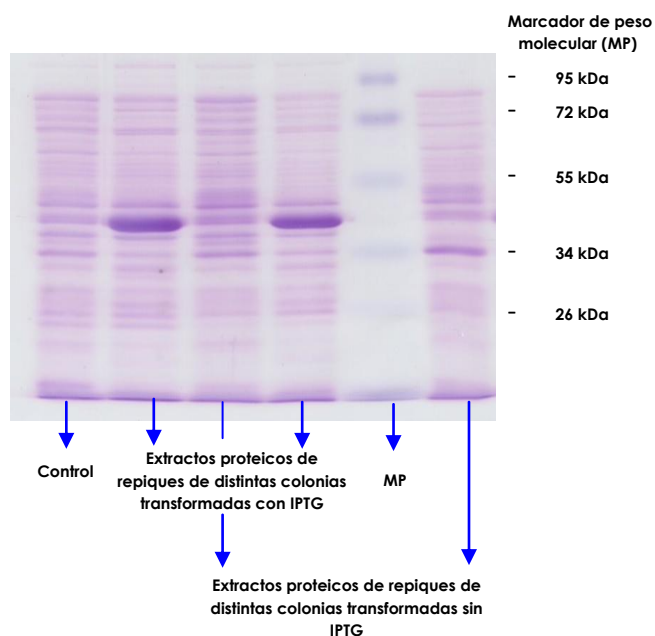


Figura 6.1.- Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida del producto de la expresión de His₆-RgDAAO. De izquierda a derecha, carril 1: extracto proteico de células competentes, carriles 2 y 4: extracto proteico de repiques de distintas colonias transformas con IPTG, carriles 3 y 6: extracto proteico de repiques de distintas colonias transformas sin IPTG y carril 5: marcador de peso molecular.

Al finalizar la expresión, la proteína recombinante se encuentra impurificada con una mezcla de proteínas. La purificación se llevó a cabo en tres etapas que se realizaron a 4 °C a fin de prevenir la degradación proteica. En primer lugar, se utilizó la resina "ProBond", en la cual ocurre la adsorción de la proteína recombinante por la interacción de los residuos de histidina de la proteína con los sitios Ni(II) de la resina. Posteriormente, se comenzó con los lavados para eliminar las proteínas no unidas y las adsorbidas débilmente a la resina. En una última etapa, se eluyeron las proteínas mediante el agregado de un gradiente de concentración de imidazol (20, 40 y 200 mM). En esta instancia, las moléculas de imidazol compiten con la proteína recombinante His tag por los iones Ni(II) de la superficie⁴.

La Figura 6.2 muestra el análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida del producto de la purificación de His₆-RgDAAO. En el carril 1, se inyectó una alícuota del primer eluido de la columna con solución de lavado, en los carriles 2 y 3 se inyectó una alícuota del segundo y tercer eluido con solución de lavado. En el carril 4 se inyectó el marcador de peso molecular y en los tres carriles siguientes (5, 6 y 7), se inyectaron alícuotas de muestras de lavado con imidazol de 20 mM, 40 mM y 200 mM, respectivamente observándose la banda correspondiente a la His₆-RgDAAO en 40 kDa. Luego de la elución de la columna cromatográfica, la proteína recombinante se encontraba impurificada con una alta concentración de imidazol que puede competir con His₆-RgDAAO por los sitios Ni(II) de los sustratos modificados para la preparación de la superficie biofuncional. En consecuencia, para eliminar el imidazol, se volvió a purificar mediante cromatografía de exclusión molecular. Este proceso permitió la obtención de 12 mg de la enzima.

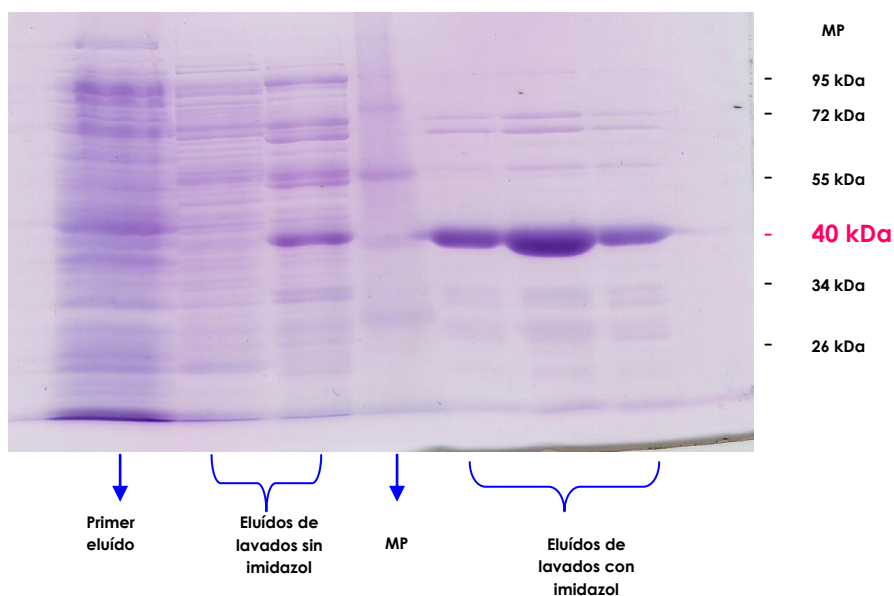


Figura 6.2.- Análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida del producto de la purificación de His₆-RgDAAO. De izquierda a derecha, carril 1: Primer eluido con solución de lavado, carriles 2 y 3: eluidos 2 y 3, respectivamente. Carril 4: marcador de peso molecular y carriles 5, 6 y 7: eluidos con 20 mM, 40 mM y 200 mM de imidazol, respectivamente.

6.3.2.- Caracterización electroquímica

Las primeras determinaciones amperométricas, como se mencionó anteriormente, tuvieron como objetivo evaluar el proceso de recombinación y la capacidad de reconocimiento específico que tienen las enzimas.

La Figura 6.3 muestra un experimento típico para la determinación de la actividad enzimática *in situ* de His₆-RgDAAO, en el cual se registra la corriente en función del tiempo una vez adicionada la enzima a la celda electroquímica conteniendo la solución de D-alanina. En particular, este experimento se realizó con una concentración de D-alanina 10,00 mM frente al agregado de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹ en BF pH 8,50.

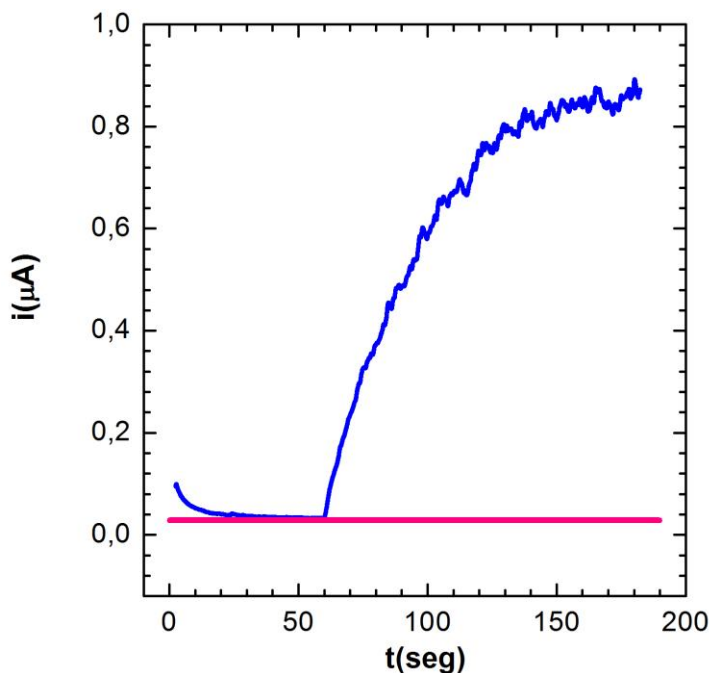




Figura 6.3.- Intensidad de corriente (i) en función del tiempo (t) para el agregado de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹ (—) a una solución de D-alanina 10,00 mM en BF a pH 8,50 (—). Potencial de trabajo: 0,450 V. ET: Au, ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y EC: alambre de Pt.

Como se describió en los primeros Capítulos y en la Introducción, en el desarrollo de una superficie biofuncional, se pretende lograr una orientación preferencial del elemento de biorreconocimiento cuando se une al sustrato modificado para mantener la capacidad natural de reconocer estructuras específicas a nivel molecular. Este evento de biorreconocimiento se puede determinar a partir de las cantidades de H₂O₂ producidas.

Tal como muestra la figura, la corriente registrada por la producción de H₂O₂ aumenta rápidamente con el agregado de la enzima, evidenciando el éxito del evento de biorreconocimiento^{10,13}. Es importante destacar, que en estas condiciones la D-alanina no bloquea la detección de H₂O₂ sobre el electrodo de Au, es decir, el cambio de señal observado en la Figura 6.3 sólo se debe a la aparición de H₂O₂.

6.4.- Conclusiones

-  Se logró expresar y purificar a la enzima His₆-RgDAAO con la marca de histidina fusionada a la estructura primaria mediante técnicas recombinantes.

-  La His₆-RgDAAO presenta actividad biológica en solución, de manera que esta enzima resulta ser una alternativa viable como el elemento de biorreconocimiento.

6.5.- Referencias

1. Alim I, Haskew-Layton RE, Aleyasin H, Guo H, Ratan RR. *Spatial, Temporal, and Quantitative Manipulation of Intracellular Hydrogen Peroxide in Cultured Cells*. Vol 547. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-801415-8.00014-X.
2. Cappelletti P, Piubelli L, Murtas G, et al. Structure-function relationships in human d-amino acid oxidase variants corresponding to known SNPs. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(9):1150-1159. doi:10.1016/j.bbapap.2015.02.005.
3. Hou J, Jin Q, Du J, Li Q, Yuan Q, Yang J. A rapid in situ immobilization of D-amino acid oxidase based on immobilized metal affinity chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(5):857-864. doi:10.1007/s00449-013-1056-6.
4. Herrera E, Valdez Taubas J, Giacomelli CE. D-Amino acid oxidase bio-functionalized platforms: Toward an enhanced enzymatic bio-activity. *Appl Surf Sci*. 2015;356:679-686. doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.121.
5. Zheng H, Wang X, Chen J, et al. Expression, purification, and immobilization of His-tagged D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis* in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;70(6):683-689. doi:10.1007/s00253-005-0158-8.
6. Kuan I, Liao R, Hsieh H, Chen K, Yu C. Properties of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase immobilized on magnetic beads through his-tag. *J Biosci Bioeng*. 2008;105(2):110-115. doi:10.1263/jbb.105.110.
7. Mora MF, Giacomelli CE, Garcia CD. Interaction of D-amino acid oxidase with carbon nanotubes: Implications in the design of biosensors. *Anal Chem*. 2009;81(3):1016-1022. doi:10.1021/ac802068n.

8. Pilone Simonetta M, Pollegioni L, Casalin P, Curti B, Ronchi S. Properties of D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Eur J Biochem*. 1989;180(1):199-204. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14634.x.
9. Pollegioni L, Molla G, Sacchi S, Rosini E, Verga R, Pilone MS. Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;78(1):1-16. doi:10.1007/s00253-007-1282-4.
10. Herrera E. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos. *Tesis Dr*. 2013.
11. Pollegioni L, Pilone MS. Purification of *Rhodotorula gracilis* d-amino acid oxidase. *Protein Expr Purif*. 1992;3(2):165-167. doi:10.1016/S1046-5928(05)80101-9.
12. Valenti LE, Herrera E, Stragliotto F, et al. Optimizing the Bioaffinity Interaction between His-Tag Proteins and Ni (II) Surface Sites. *Proteins Interfaces III State art*. 2012;(li):37-53. doi:10.1021/bk-2012-1120.
13. Herrera E, Giacomelli CE. Surface coverage dictates the surface bio-activity of d-amino acid oxidase. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;117:296-302. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.050.
14. Valenti LE, De Pauli CP, Giacomelli CE. The binding of Ni(II) ions to hexahistidine as a model system of the interaction between nickel and His-tagged proteins. *J Inorg Biochem*. 2006;100(2):192-200. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.11.003.
15. Valenti LE, Martins VL, Herrera E, Torresi RM, Giacomelli CE. Ni(ii)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins. *J Mater Chem B*. 2013;1(38):4921. doi:10.1039/c3tb20769b.



Capítulo 7

Biofuncionalización de sustratos de Au con His₆-RgDAAO

“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela”.

Albert Einstein

7.1.- Introducción

El estudio de superficies biofuncionales con enzimas como elemento de biorreconocimiento es de gran importancia en el área de los biosensores, en la administración de fármacos, sistemas de descontaminación, en el tratamiento de residuos, en el diseño de biorreactores, etc¹⁻³. El gran desafío que enfrentan estas superficies biofuncionales es mantener la capacidad de reconocimiento específica que presentan las enzimas nativas⁴. En consecuencia, el desarrollo de nuevas estrategias para la adsorción de enzimas que no afecten a la actividad catalítica o a la conformación de la proteína, es una tarea de investigación indispensable en las aplicaciones que involucren sistemas de reacción heterogéneos⁵. Uno de los enfoques más prometedores para la adsorción controlada de biomoléculas, se basa en el principio utilizado en la cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), originalmente desarrollado para la purificación de proteínas⁵⁻⁸. Una de las ventajas de esta estrategia, es la posibilidad de inducir una orientación preferencial de las proteínas adsorbidas a partir de una elección adecuada del sitio de unión de la marca de histidina a la estructura primaria de la biomolécula. La orientación de las proteínas adsorbidas juega un rol clave en la eficiencia del reconocimiento entre la enzima y su sustrato (analito), así como en el proceso de transferencia directa de electrones entre la biomolécula adsorbida y el sustrato sólido⁹.

En el presente capítulo, se analizan los resultados obtenidos por QCM-D, los cuales están relacionados con el proceso de biofuncionalización de los sustratos de Au. A partir de estos estudios, es posible optimizar la interacción entre la His₆-RgDAAO y el sustrato de Au antes y después de la modificación con SAMs mixtas en ausencia y presencia de sitios Ni(II). Particularmente, se evalúan los distintos tipos de adsorción, tales como interacciones físicas (hidrofóbicas, electrostáticas, etc.) y de bioafinidad entre el elemento de biorreconocimiento y los sitios Ni(II) superficiales. Además, se presentan los resultados de actividad enzimática obtenidos por amperometría de la His₆-RgDAAO en la superficie de Au limpio y modificado con SAMs simple de n-COOH y mixtas de Fc y n-COOH, en presencia y ausencia de Ni(II). De esto modo, es posible evaluar el efecto sobre la actividad

enzimática superficial tanto del modo de interacción enzima sustrato como de la presencia del mediador redox.

7.2.- Resultados y Discusión

7.2.1.- Microbalanza de cristal de cuarzo con monitoreo de la disipación (QCM-D)

7.2.1.2.- Biofuncionalización de sustratos de oro con His₆-DAAO.

Adsorción física

La QCM-D es una técnica muy sensible que permite registrar los cambios en la frecuencia de resonancia y en la disipación de manera no invasiva. En el desarrollo de las superficies biofuncionales, es importante conocer la cantidad adsorbida de His₆-RgDAAO sobre el sustrato modificado, así como las interacciones involucradas en el proceso. Por lo tanto, se estudió la adsorción de la enzima sobre sustratos de Au mediante QCM-D en distintas condiciones, previo a la modificación de Au y luego de la modificación con SAMs mixtas de Fc+n-COOH en ausencia y presencia de Ni(II). Previo a cada experimento, los cristales de Au de la QCM-D, se limpiaron según lo descrito en el Capítulo 3.

En el desarrollo de superficies biofuncionales, muchas estrategias incluyen etapas para eliminar la adsorción inespecífica, controlada mayoritariamente por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. En este contexto, cualquier estudio tendiente a optimizar una estrategia de biofuncionalización debe necesariamente incluir un primer estudio de adsorción física^{10,11}. En consecuencia, en un primer análisis, se estudió *in situ* la adsorción inespecífica de la His₆-RgDAAO sobre los sustratos de Au perfectamente limpios.

La Figura 7.1 muestra los cambios en la frecuencia (Δf_n) y en la disipación (ΔD_n) determinados a distintos sobretonos ($n = 5, 7$ y 9) en función del tiempo (t), en el eje izquierdo y en el derecho, respectivamente, obtenidos durante el

proceso de adsorción de His₆-RgDAAO sobre sustratos de Au realizados en BF 0,10 M, pH 8,50. Las flechas en la figura indican los momentos en los cuales se agregan distintas soluciones a la celda de QCM-D (velocidad de la bomba peristáltica: 455 rpm), permitiendo estudiar tres etapas del proceso. En el comienzo de la medición, la flecha 1 indica el agregado de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹, mientras que la flecha 2 (36 minutos) muestra el comienzo del lavado del sustrato de Au con BF 0,10 M, pH 8,50. Por último, la flecha 3 indica el lavado con imidazol 0,50 M (48 minutos). Por simplicidad, no se señalan los agregados de H₂O correspondientes a los lavados posteriores a cada etapa del proceso. De este modo, se estudió *in situ* el proceso de adsorción-desorción de His₆-RgDAAO en sustratos de Au a pH 8,5.

Los valores negativos de Δf_n conjuntamente con los pequeños cambios en ΔD_n luego del agregado de His₆-RgDAAO, indican que se produce la adsorción física de la enzima sobre estos sustratos de Au limpio. Este proceso da lugar a la formación de películas acústicamente rígidas, que se pone en evidencia con los pequeños cambio ΔD_n , cuyos valores no dependen de los sobretonos. En estas condiciones, es posible calcular la cantidad adsorbida a partir de Δf_n utilizando la ecuación de Sauerbrey (Capítulo 3, Ecuación 3.1).

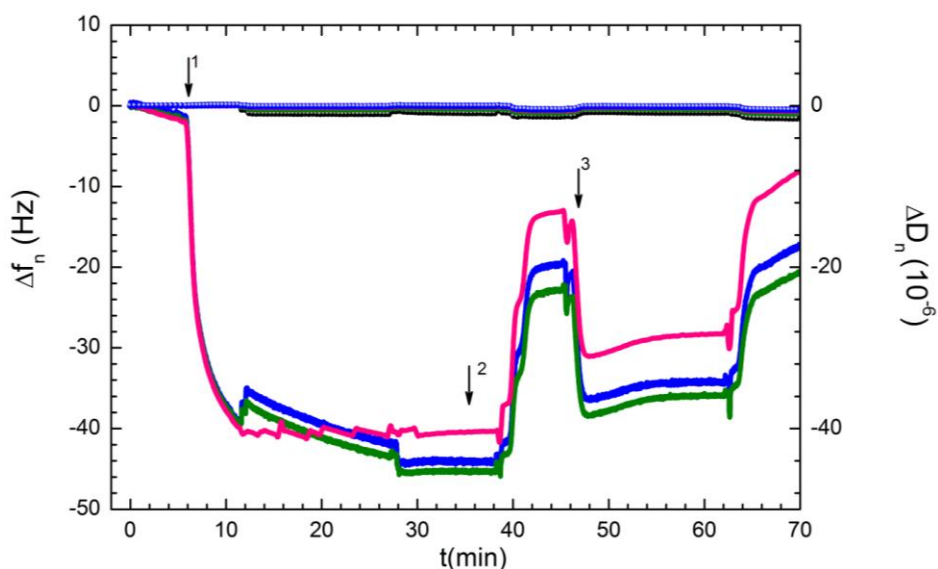


Figura 7.1.- Δf_n (líneas, eje izquierdo) y ΔD_n (líneas + símbolos, eje derecho) en función del tiempo (t) para el proceso de biofuncionalización con His₆-RgDAAO de sustratos limpios de Au a distintos sobretonos (n): 5 (rosa), 7 (azul), y 9 (verde). Las flechas indican el agregado de solución de enzima 0,10 mg.mL⁻¹ preparada en BF 0,10 M pH 8,50 (flecha 1), lavado con BF 0,10 M pH 8,50 (flecha 2) y lavado con imidazol 0,50 M (flecha 3).

A partir de estos resultados, se analizaron los valores en Δf_n y ΔD_n a tiempos cortos para sustratos de Au en contacto con distintas concentraciones de His₆-RgDAAO (0,10 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 1,0.10⁻³ mg.mL⁻¹ preparadas en BF 0,10 M pH 8,50). La Figura 7.2 muestra Δf_n (eje izquierdo) y ΔD_n (eje derecho) durante los primeros minutos del proceso de adsorción para los distintos sobretonos. En el panel superior (a), se observan los cambios provocados cuando se ponen en contacto una solución de His₆-RgDAAO de 0,10 mg.mL⁻¹ mientras que en los paneles b y c, muestran los respectivos resultados para las concentraciones de enzima 0,01 mg.mL⁻¹ y 1,0.10⁻³ mg.mL⁻¹.

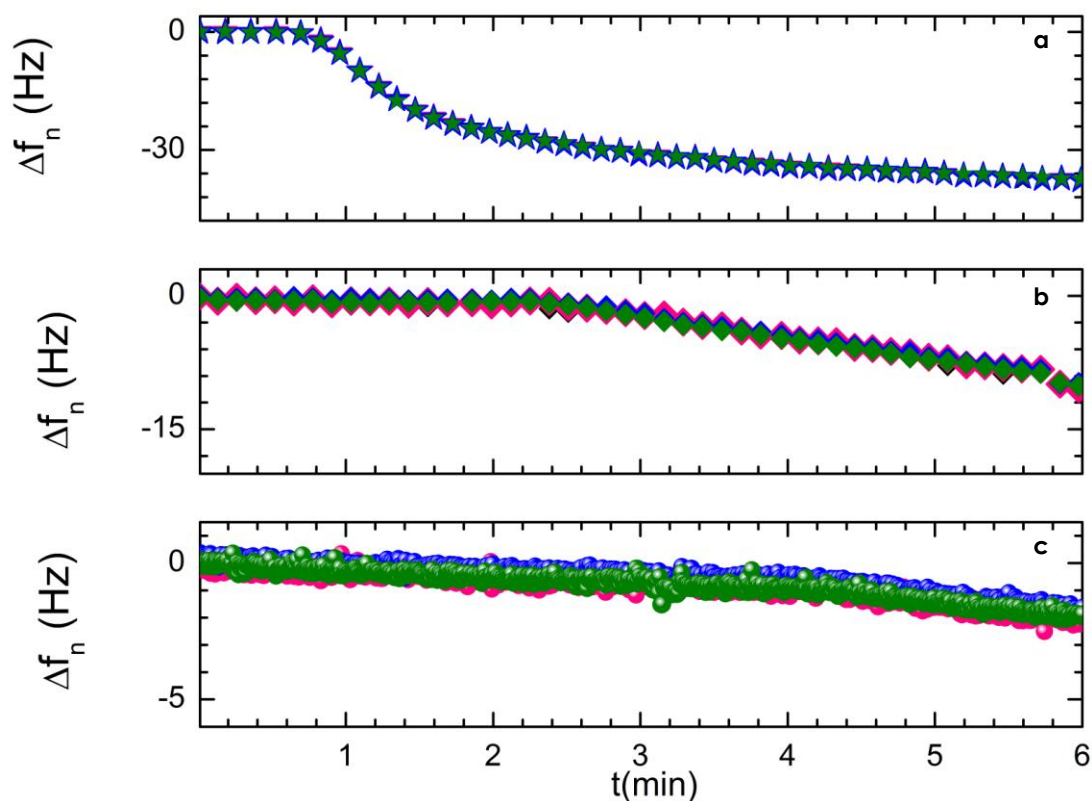


Figura 7.2.- Δf_n (símbolos, eje izquierdo) y ΔD_n a valores de sobretonos (n) de: 5 (rosa), 7 (azul), y 9 (verde) para tres sustratos de Au biofuncionalizados con soluciones de His₆-RgDAAO de distintas concentración inicial preparadas en BF 0,10 M pH 8,50: a.- 0,10 mg.mL⁻¹, b.- 0,01 mg.mL⁻¹ y c.- 1,0 10⁻³ mg.mL⁻¹

Cuando se puso en contacto la solución de enzima más concentrada con el sustrato de Au, se observó una rápida disminución de la frecuencia. Este resultado es consistente con la adsorción rápida de las enzimas a la superficie

limpia del Au¹². Por otra parte, los cambios en Δf_n son menos pronunciados cuando disminuye la concentración de proteína, registrando valores de saturación de aproximadamente -40 Hz, -30 Hz y -12 Hz para 0,10 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 1,0.10⁻³ mg.mL⁻¹, respectivamente. Estos valores surgen de la meseta alcanzada para Δf_n luego de 30/60 minutos de adsorción, dependiendo de la concentración inicial de enzima (valores no mostrados en la Figura 7.2). En base a los resultados experimentales que muestran cambios pequeños en los valores de ΔD_n durante la adsorción, se calculó la cantidad adsorbida (Γ) de la His₆-RgDAAO sobre los sustratos de Au limpio empleando la ecuación de Sauerbrey^{11,13} (Capítulo 3, Ecuación 3.1). Para las respectivas concentraciones iniciales, se obtuvieron valores de (0,7±0,1) $\mu\text{g.cm}^{-2}$, (0,53±0,08) $\mu\text{g.cm}^{-2}$ y (0,21±0,03) $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Autores como Delcroix y colaboradores¹⁴ informan en sus trabajos valores de Δf_n y Γ similares para la adsorción de albúmina sérica bovina sobre sustratos de Au limpio.

Los resultados de la Figura 7.1 además, permiten analizar el comportamiento de la His₆-RgDAAO adsorbida sobre los sustratos de Au limpio frente al agregado de diferentes agentes de desorción. Durante la primera etapa de lavado con BF (flecha 2), se registraron ligeros cambios en Δf_n y ΔD_n , que se hacen más evidentes luego del agregado de agua deionizada a los 40 minutos. Es importante recordar en este punto, que los cambios observados en los experimentos de QCM-D responden a un cambio global en la masa y en las propiedades viscoelásticas de la película adsorbida. En consecuencia, el agregado de BF no produce la desorción de la enzima. Es decir, la biofuncionalización mediada por interacciones físicas es estable frente a la dilución^{15,16}. Por otra parte, frente al agregado de agua deionizada se eliminan los iones del BF que podrían interactuar con la película adsorbida. Frente al agregado de imidazol, nuevamente disminuye Δf_n dando cuenta de la incorporación de este agente de desorción en la película adsorbida. Sin embargo, teniendo en cuenta los cambios de Δf_n netos entre las etapas de desorción, se puede observar que la incorporación de imidazol es un proceso reversible ya que se lava completamente frente al agregado de agua deionizada

a los 65 minutos. Se observaron comportamientos similares con las soluciones menos concentradas de His₆-RgDAAO (resultados no mostrados).

La adsorción física de la His₆-RgDAAO utilizando soluciones de enzima de diferentes concentraciones, se analizó también a partir del estudio de los valores de Δf_n y ΔD_n en función del tiempo con sustratos de Au modificados con SAMs mixtas de Fc y n-COOH (preparados a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM de cada componente en CH₂Cl₂ durante 15 horas). Es importante recordar que no fue posible realizar el ciclado en HClO₄, aplicado previo a los experimentos electroquímicos, utilizando los sustratos de Au de la QCM-D ya que es un procedimiento demasiado agresivo. A modo de ejemplo, la Figura 7.3 a y b muestra los experimentos de QCM-D completos donde se presentan los valores de Δf_n (eje izquierdo) y ΔD_n (eje derecho) determinados para n = 3, 5, 7 y 9 en función del tiempo, obtenidos durante el proceso de adsorción-desorción de His₆-RgDAAO (concentración inicial 0,10 mg.mL⁻¹ en BF 0,10 M pH 8,50) sobre sustratos de Au/3-COOH+Fc y Au/6-COOH+Fc, respectivamente. Las flechas en la figura indican los momentos en los cuales se agregan distintas soluciones a la celda de QCM-D, permitiendo estudiar las tres etapas del proceso: adsorción (flecha 1 que indica el agregado de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹) y desorción frente a BF 0,10 M pH 8,50 (flecha 2) y frente a imidazol 0,50 M (flecha 3). Por simplicidad, tampoco se señalan los agregados de H₂O correspondientes a los lavados posteriores a cada etapa del proceso. De manera general, los resultados mostrados en la figura 7.3 indican que la His₆-RgDAAO se adsorbe sobre ambos sustratos, dando lugar a una película acústicamente rígida que prácticamente no se desorbe frente a los lavados. A continuación, se presenta un análisis más detallado de cada uno de los procesos para las distintas concentraciones iniciales de enzima estudiadas.

La Figura 7.4 muestra $-\Delta f_n$ (I) para los distintos sobretonos vs t y los respectivos valores de Γ (II) calculados con la ecuación de Sauerbrey para la adsorción de His₆-RgDAAO (0,10 mg.mL⁻¹ y 1,0 10⁻³ mg.mL⁻¹) sobre Au/3-COOH+Fc (a) y Au/6-COOH+Fc (b).

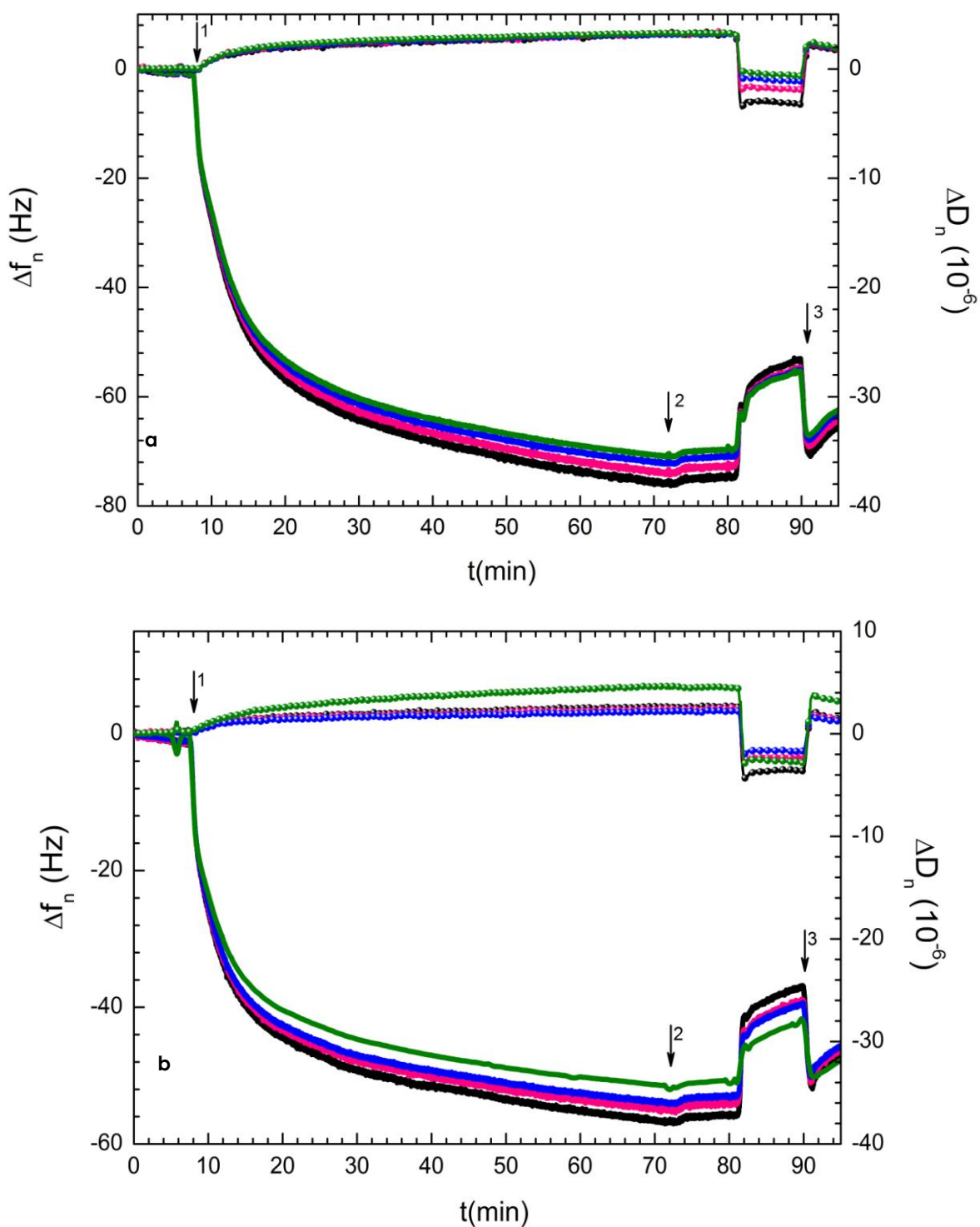


Figura 7.3.- Δf_n (líneas, eje izquierdo) y ΔD_n (líneas + símbolos, eje derecho) en función del tiempo (t) para el proceso de biofuncionalización con His₆-RgDAAO de sustratos a.-Au/3-COOH+Fc y b.-Au/6-COOH+Fc a distintos sobretonos (n): 3 (negro), 5 (rosa), 7 (azul), y 9 (verde). Las flechas indican el agregado de solución de enzima 0,10 mg.mL⁻¹ preparada en BF 0,10 M pH 8,50 (flecha 1), lavado con BF 0,10 M pH 8,50 (flecha 2) y lavado con imidazol 0,50 M (flecha 3).

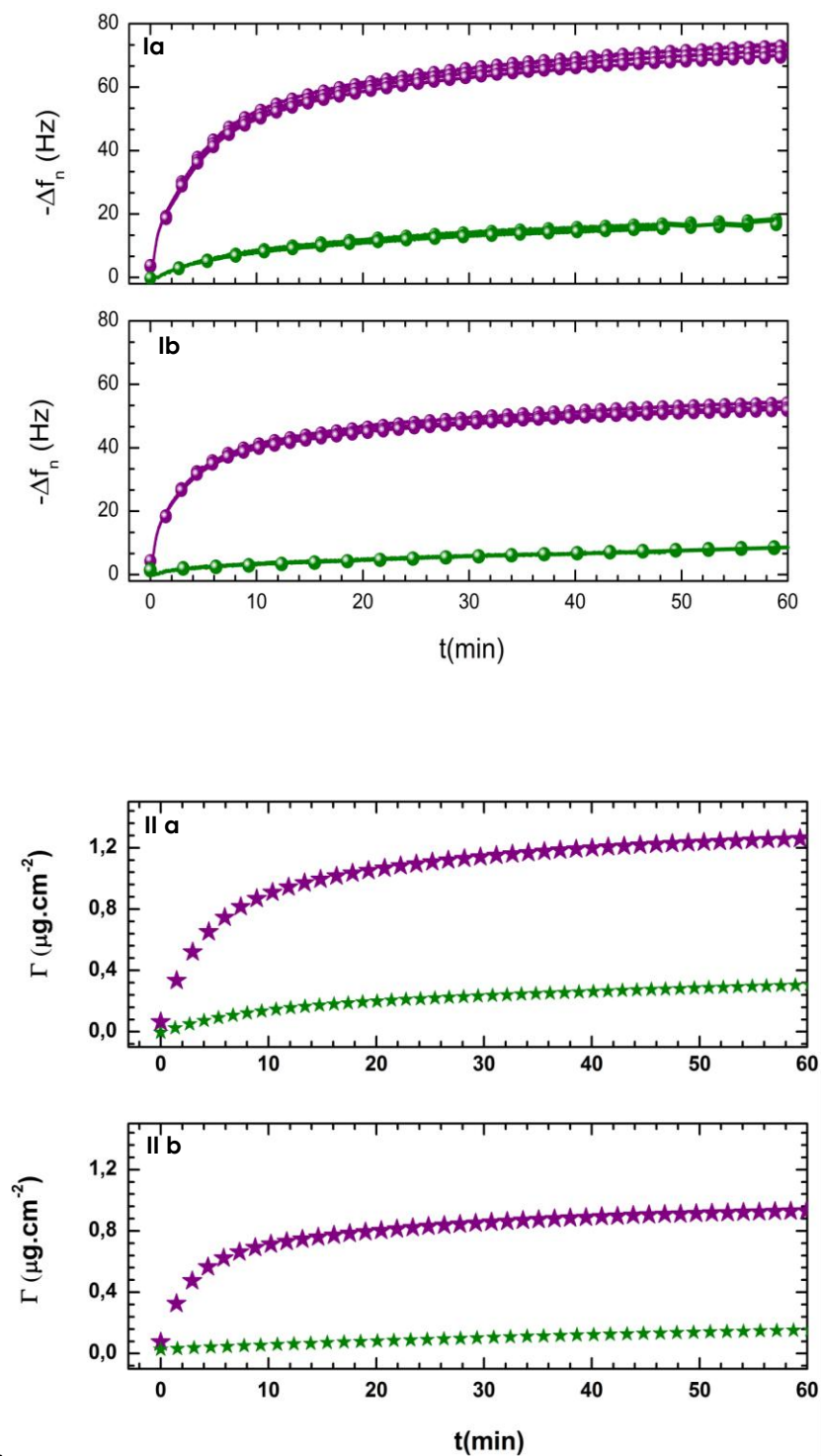


Figura 7.4 $-\Delta f_n$ (I) y Γ (II) vs t determinados durante el proceso de adsorción de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹ (violeta) y 1,0 10⁻³ mg.mL⁻¹ (verde) sobre sustratos de a.- Au/3-COOH+Fc y b.- Au/6-COOH+Fc.

Los resultados obtenidos con los sustratos de Au modificados con SAMs mixtas muestran nuevamente una rápida disminución de los valores de Δf_n durante el proceso de biofuncionalización. Como se discutió anteriormente, estos resultados están relacionados con la rápida adsorción de la His₆-RgDAAO que provoca un cambio en la frecuencia hasta alcanzar un valor estacionario de aproximadamente de -70 Hz para sustratos de Au/3-COOH+Fc y de -50 Hz para sustratos de Au/6-COOH+Fc en contacto con una solución de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹. Estos valores de $-\Delta f$, corresponden a una cantidad adsorbida de $(1,2 \pm 0,2)$ $\mu\text{g.cm}^{-2}$ y de $(0,9 \pm 0,1)$ $\mu\text{g.cm}^{-2}$, respectivamente. Esta pequeña diferencia en Γ podría vincularse con el largo de cadena carbonada en las SAMs. Por otro lado, se registraron bajos valores de $-\Delta f$ durante el proceso de biofuncionalización de los sustratos Au/3-COOH+Fc y Au/6-COOH+Fc con soluciones de His₆-RgDAAO menos concentradas ($1,0 \cdot 10^{-3}$ mg.mL⁻¹). En estos casos, se calcularon valores de Γ de $(0,32 \pm 0,03)$ $\mu\text{g.cm}^{-2}$ y $(0,15 \pm 0,02)$ $\mu\text{g.cm}^{-2}$, respectivamente. En conclusión, el proceso de biofuncionalización mediado por interacciones físicas sobre Au limpio o modificado con SAMs mixtas de n-COOH+Fc no se ve modificado por las propiedades superficiales. De igual modo, la película de enzimas adsorbidas no se desorbe frente a la dilución con BF o por el agregado de imidazol. Nuevamente, los cambios notables en Δf_n y ΔD_n frente al agregado de H₂O deionizada se debe a la salida de los iones del buffer. Es importante notar en este punto, que los valores de Δf_n determinados en todos estos casos frente al agregado de H₂O es de alrededor de 20 Hz, independientemente de la concentración de enzima, de la presencia de las SAMs o del largo de cadena carbonada. En consecuencia, en todos los casos se trata del mismo proceso de intercambio de BF por agua en contacto con la película proteica.

Adsorción de bioafinidad

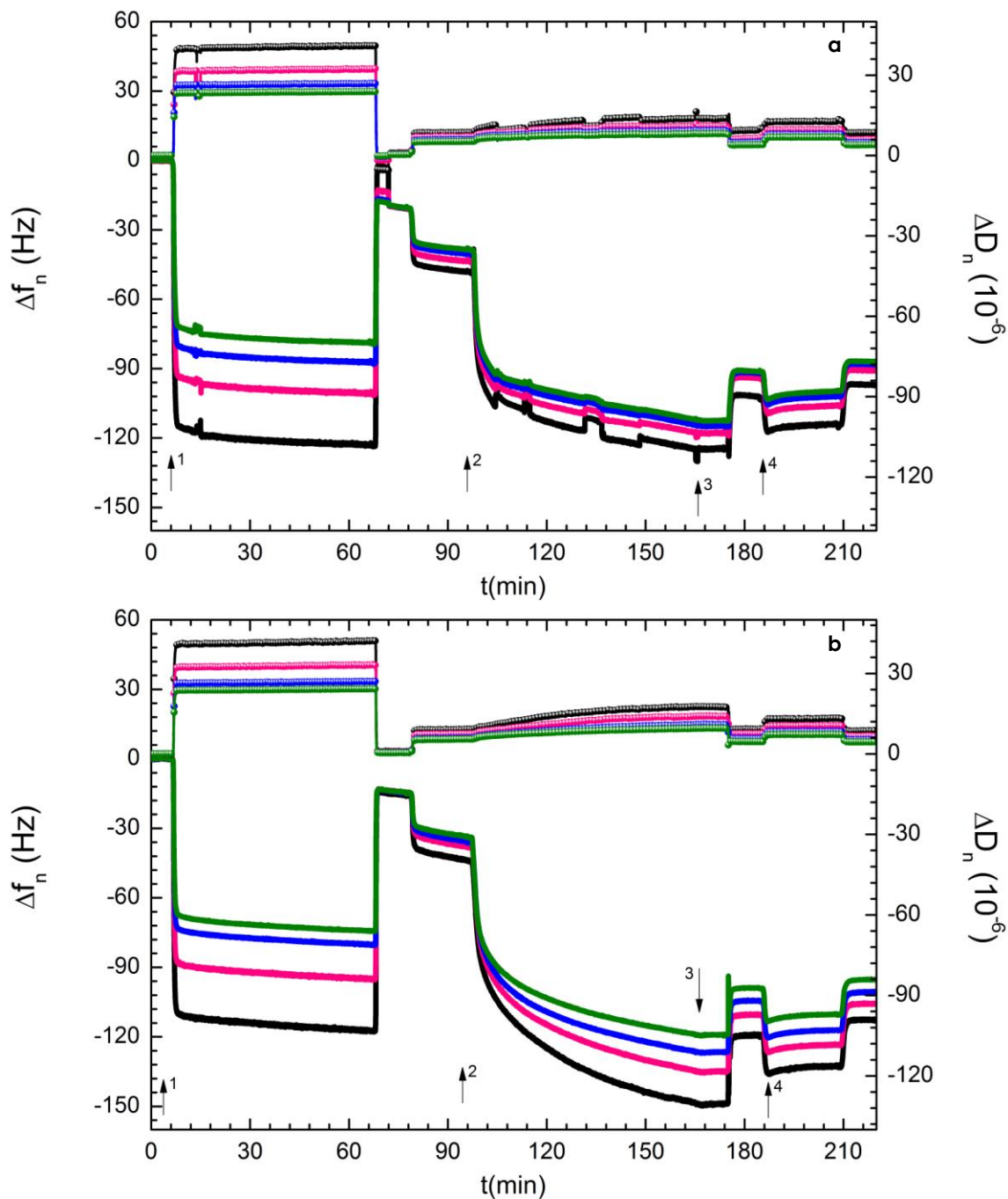


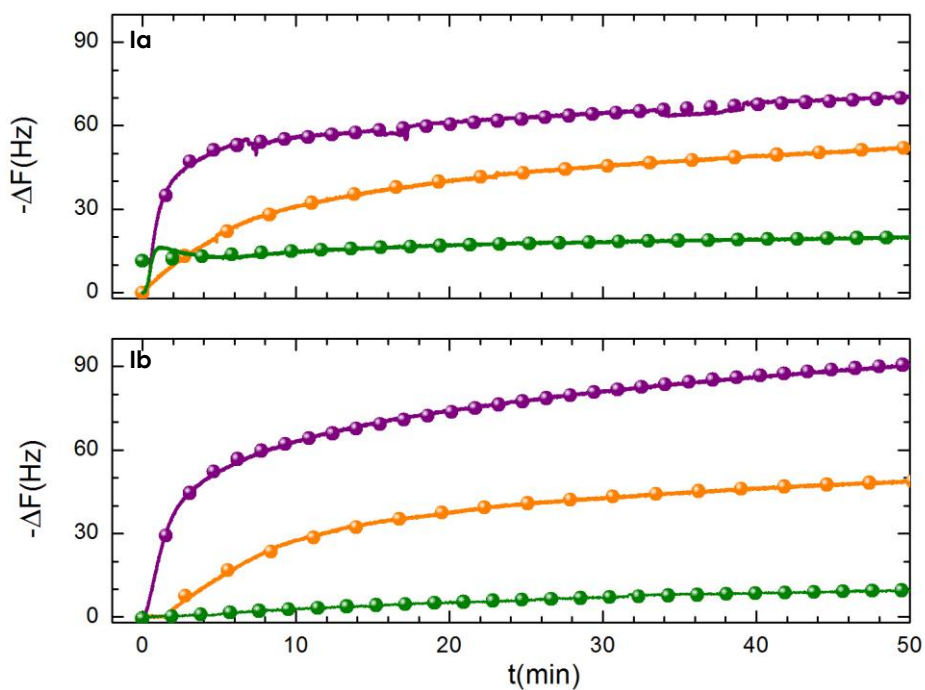
Figura 7.5.- Δf_n (líneas, eje izquierdo) y ΔD_n (líneas + símbolos, eje derecho) en función del tiempo (t) para el proceso de biofuncionalización con His₆-RgDAAO de sustratos a.-Au/3-COOH+Fc y b.-Au/6-COOH+Fc a distintos sobretonos (n): 3 (negro), 5 (rosa), 7 (azul), y 9 (verde). Las flechas indican el agregado de Ni(NO₃)₂ (flecha 1), solución de enzima 0,10 mg.mL⁻¹ preparada en BF 0,10 M pH 8,50 (flecha 2), lavado con BF 0,10 M pH 8,50 (flecha 3) y lavado con imidazol 0,50 M (flecha 4).

La Figura 7.5 muestra los experimentos de QCM-D completos donde se presentan los valores de Δf_n (eje izquierdo) y ΔD_n (eje derecho) determinados para $n = 3, 5, 7$ y 9 en función de t , obtenidos durante el proceso de adsorción-desorción de His₆-RgDAAO (concentración inicial $0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en BF $0,10 \text{ M}$ pH $8,50$) sobre sustratos de Au/3-COOH+Fc y Au/6-COOH+Fc, respectivamente. Las flechas en la figura indican los momentos en los cuales se agregan distintas soluciones a la celda de QCM-D, permitiendo estudiar las cuatro etapas del proceso: inclusión de sitios Ni(II) (flecha 1, discutida en el Capítulo 5), adsorción (flecha 2 que indica el agregado de His₆-RgDAAO $0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y desorción frente a BF $0,10 \text{ M}$ pH $8,50$ (flecha 3) y frente a imidazol $0,50 \text{ M}$ (flecha 4). Por simplicidad, tampoco se señalan los agregados de H₂O correspondientes a los lavados posteriores a cada etapa del proceso. De manera general, en ambos casos se observa el proceso de adsorción de His₆-RgDAAO luego de la incorporación de los sitios Ni(II), dando lugar a una película cuyas propiedades viscoelásticas dependen del largo de la cadena carbonada de las SAMs. Si bien la separación de Δf_n para los diferentes sobretonos no es tan marcada y los valores de ΔD_n no son altos, claramente estas películas de proteína son acústicamente menos rígidas que las producidas por la mera interacción física. Este efecto, es más evidente cuando se produce la biofuncionalización sobre el sustrato Au/6-COOH+Fc+Ni(II) (Figura 7.5 b). Este primer análisis sugiere un modo de interacción distintos de la His₆-RgDAAO en presencia de los sitios superficiales Ni(II) que podría deberse al modo de anclaje de las moléculas de enzima. En la adsorción física, la His₆-RgDAAO puede interactuar con el sustrato sólido a través de distintos residuos dando lugar a múltiples puntos de unión, mientras que la interacción de bioafinidad entre los residuos de histidina y los cationes superficiales ocurre por un único modo^{11,17}.

Por otra parte, estas películas no se desorben frente al agregado de ninguno de los agentes utilizados. Aspecto remarcable ya que el imidazol es un agente específico que compite con las proteínas His tag por los sitios superficiales Ni(II)¹⁷⁻¹⁹. Estos resultados revelan así la formación de una película con uniones muy fuertes y estables entre los residuos de histidina de la His₆-RgDAAO y los cationes Ni(II) anclados a los sustratos de oro modificados con SAMs mixtas de Fc

y n-COOH^{5,10,11,19-22}. Finalmente, es interesante notar el valor de Δf_n cuando se agrega BF a la celda de la QCM-D (en 70 minutos luego de iniciado el experimento) ya que nuevamente se encuentra un cambio de aproximadamente 20 Hz debido a la interacción de los iones del buffer con el sustrato sólido. Tal como se realizó en el caso de la adsorción física, a continuación, se presenta un análisis más detallado de cada uno de los procesos para las distintas concentraciones iniciales de enzima estudiadas.

La Figura 7.6 muestra $-\Delta f_n$ (I) para los distintos sobretonos vs t y los respectivos valores de Γ (II) calculados con la ecuación de Sauerbrey para la adsorción de His₆-RgDAAO (0,10 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹ y 1,0 10⁻³ mg.mL⁻¹) sobre Au/3-COOH+Fc+Ni(II) (a) y de Au/6-COOH+Fc+Ni(II) (b).



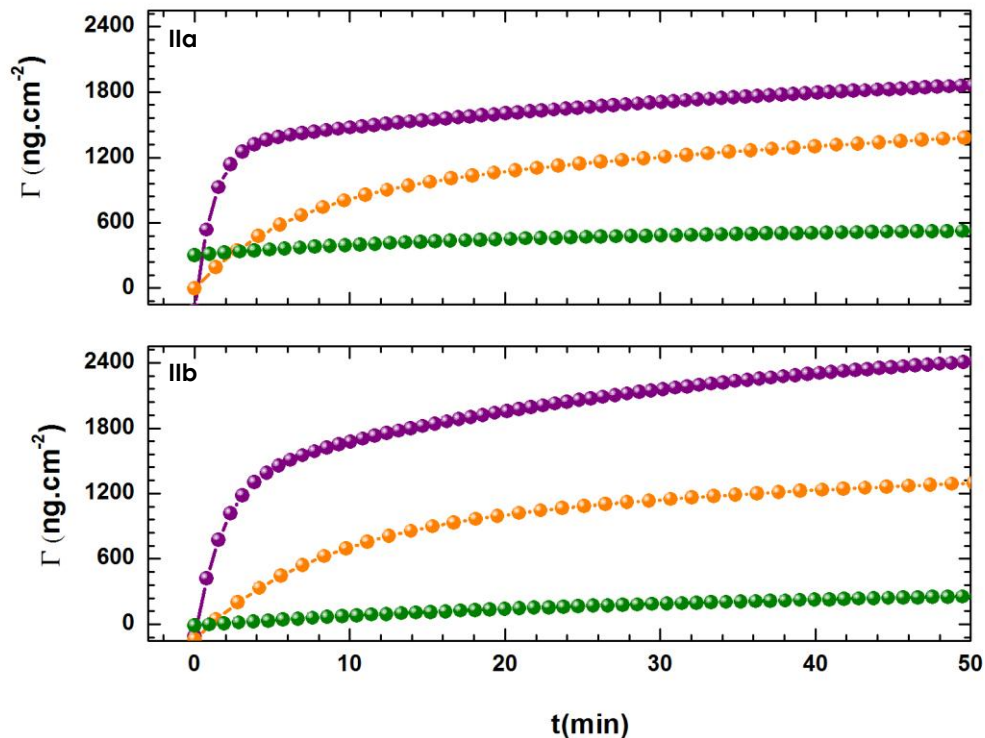


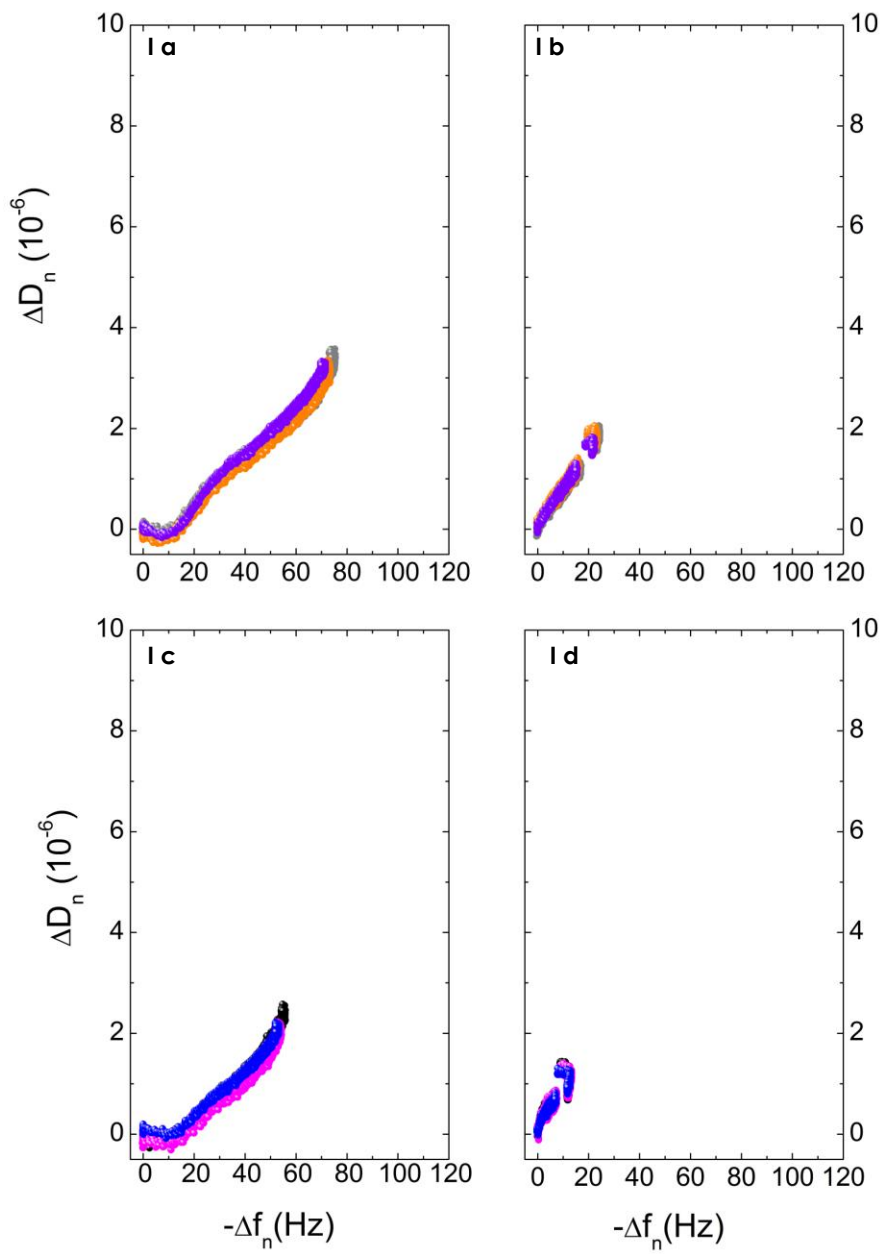
Figura 7.6 - Δf (I) y Γ (II) vs t determinados durante el proceso de adsorción de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹ (violeta), 0,01 mg.mL⁻¹ (naranja) y 1,0 10⁻³ mg.mL⁻¹ (verde) sobre sustratos de a.- Au/3-COOH+Fc+Ni(II) y b.- Au/6-COOH+Fc+Ni(II).

La tabla 7.1 presenta las cantidades de His₆-RgDAAO adsorbida durante el proceso de biofuncionalización de los sustratos de Au/n-COOH+Fc+Ni(II) utilizando soluciones de enzima de distintas concentraciones. En primer lugar, los valores de Γ calculados son sustancialmente mayores a los observados cuando sólo son posibles interacciones físicas. Este resultado sugiere que en presencia de sitios Ni(II) existe un modo de interacción distinto al observado con Au limpio o modificado en ausencia de estos cationes. Este comportamiento es similar al observado con la biofuncionalización con otras proteínas utilizando estrategias similares²³⁻²⁵.

Sustrato	(His ₆ -RgDAAO) mg.mL ⁻¹	Γ μg.cm ⁻²
Au/3-COOH+Fc+Ni(II)	0,100	2,0±0,3
	0,050	2,1±0,3
	0,010	1,1±0,2
	0,001	0,44±0,07
Au/6-COOH+Fc+Ni(II)	0,100	2,3±0,3
	0,050	2,3±0,3
	0,010	1,0±0,1
	0,001	0,46±0,07

Tabla 7.1.- Cantidades de His₆-RgDAAO adsorbida (Γ) durante el proceso de biofuncionalización de los sustratos de Au/n-COOH+Fc+Ni(II) utilizando soluciones de enzima de distintas concentraciones.

Atendiendo a los diferentes comportamientos viscoelásticos observados en ausencia y presencia de sitios Ni(II), se correlacionaron los valores de Δf_n con los de ΔD_n a un dado sobretodo determinados con los distintos sustratos sólidos. De esta manera, los parámetros registrados durante los experimentos en QCM-D se representan de una manera alternativa a las presentaciones convencionales. La Figura 7.7 a y b muestra ΔD_n en función de $-\Delta f_n$ (directamente proporcional a Γ) registrados para $n = 5$ durante el proceso de adsorción de la His₆-RgDAAO sobre sustratos de Au, Au/n-COOH+Fc y Au/n-COOH+Fc+Ni(II). Es importante notar que en estos gráficos el tiempo que transcurre durante la biofuncionalización está implícito ya que tanto ΔD_n como Δf_n se llevaron a cero en el momento del agregado de la enzima.



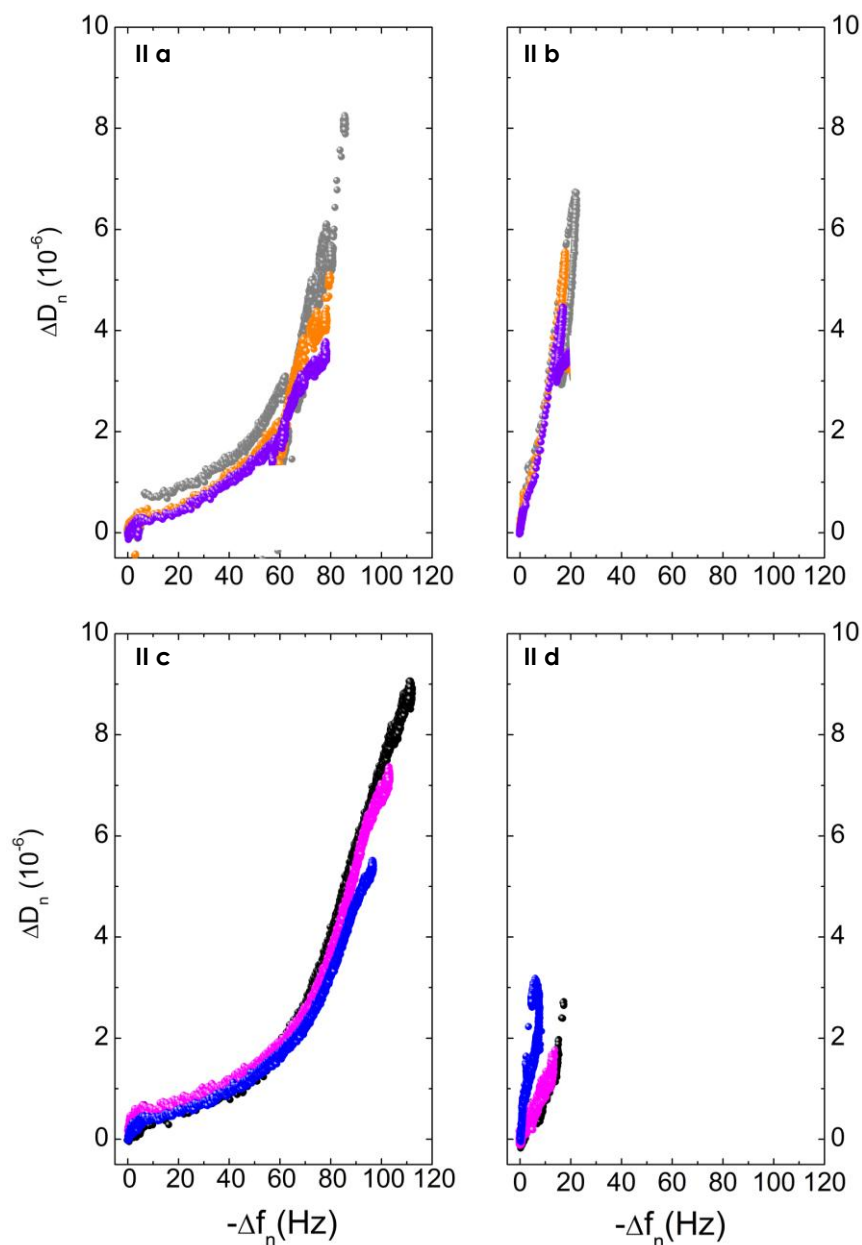


Figura 7.7.- ΔD_n vs $-\Delta f_n$ para $n = 3, 5$ y 7 durante el proceso de adsorción: I En ausencia de Ni(II) a.- Au/3-COOH+Fc+His₆-RgDAAO ($0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), b.- Au/3-COOH+Fc+His₆-RgDAAO ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) c Au/6-COOH+Fc+His₆-RgDAAO ($0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y d.- Au/6-COOH+Fc+His₆-RgDAAO ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). II En presencia de Ni(II) a.- Au/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO ($0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), b.- Au/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), c Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO ($0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y d.- Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Esta forma de representar los datos experimentales, que elimina el tiempo como un parámetro explícito, permite comparar directamente la relación entre Δf_n y ΔD_n ; es decir, la disipación de energía inducida por unidad de masa

acoplada²⁶. A partir de estos gráficos, es posible analizar con un poco más de detalle el comportamiento de la película adsorbida. Por ejemplo, Feiler y colaboradores²⁷ y Briand y colaboradores²⁸ observaron que, cuando se registraban relaciones pequeñas entre $\Delta D_n/\Delta f_n$ durante los procesos de adsorción, las películas formadas tenían características de un film rígido. Por el contrario, valores más altos de $\Delta D_n/\Delta f_n$ se relacionaban con la formación de una película más flexible. Finalmente, Pengxiang y colaboradores²⁹ a partir de estas relaciones encontraron la presencia de dos procesos bien diferenciados durante la biofuncionalización.

Los resultados de la Figura 7.7 muestran respuestas muy distintas en cuanto a la relación $\Delta D_n/\Delta f_n$, dependiendo del tipo de sustrato y de la concentración de enzima utilizados para el proceso de adsorción de His₆-RgDAAO. Por un lado, en el caso de la adsorción puramente física se observa una muy baja relación $\Delta D_n/\Delta f_n$ (aproximadamente 0,06 (Hz⁻¹)) de acuerdo con la formación de una película acústicamente rígida tanto a altas como bajas concentraciones de enzima para ambas cadenas carbonadas. Sin embargo, cuando se genera la biofuncionalización utilizando His₆-RgDAAO más concentrada, el proceso de adsorción ocurre en dos etapas. En la primera, aumenta la cantidad adsorbida sin que se modifique la disipación, mientras que en la segunda aumenta ligeramente cuando transcurre el tiempo. Por otro lado, tal como muestra la Tabla 7.2, en presencia de sitios Ni(II) la relación $\Delta D_n/\Delta f_n$ depende de la concentración de la enzima y del largo de cadena de las SAMs, como se discutió previamente. Nuevamente, para bajas concentraciones existe una sola etapa cuya relación $\Delta D_n/\Delta f_n$ es mayor que en el caso de la adsorción física, dando cuenta de la formación de una película menos rígida en presencia de Ni(II). Cuando aumenta la concentración, se evidencian dos procesos: uno que transcurre a tiempos cortos, similar en la relación $\Delta D_n/\Delta f_n$ a la adsorción física, y otro de mayor relación a medida que transcurre el tiempo.

(His ₆ -RgDAAO) mg.mL ⁻¹	Etapas	Au/3-COOH+Fc+Ni(II) $\Delta D/\Delta f$ (Hz ⁻¹)	Au/6-COOH+Fc+Ni(II) $\Delta D/\Delta f$ (Hz ⁻¹)
0,100	Etapa 1	0,01	0,01
	Etapa 2	0,11	0,12
0,050	Etapa 1	0,02	0,03
	Etapa 2	0,07	0,07
0,010	Etapa 1	0,01	-0
	Etapa 2	0,11	0,11
0,001	Etapa 1	0,25	0,11

Tabla 7.2.- Valores de pendiente calculados de los gráficos de ΔD_n vs Δf_n (Figura 7.7) para los sustratos de Au/3-COOH+Fc+Ni(II) y de Au/6-COOH+Fc+Ni(II) durante la formación de la película de His₆-RgDAAO.

Todos estos resultados indican que el mecanismo de adsorción en ausencia de sitios Ni(II) es diferente al que ocurre en presencia de estos cationes. De este modo, cuando las interacciones de bioafinidad son posibles se forma una película proteica cuya rigidez depende de la dinámica del proceso de adsorción. Cuando llegan pocas moléculas de enzima a la superficie mayoritariamente se unen a los sitios Ni(II) superficiales, mientras que cuando se aumenta el suministro de His₆-RgDAAO primero ocurre la adsorción física y luego la interacción de bioafinidad. Estos mecanismos en dos etapas producto de una interacción física (mayoritariamente electrostática) seguida de la formación del quelato histidina-Ni(II) han sido observados con otros sistemas^{4,10}. Finalmente, el aumento en la relación $\Delta D_n/\Delta f_n$ en el caso de los sustratos de Au modificados con tioles de cadena más larga indican que estas películas proteicas son menos rígidas que las preparadas con las SAMs de tres átomos de carbono.

Los sustratos de Au modificados con SAMs mixtas de Fc y n-COOH, luego de ser evaluados frente a la incorporación de sitios Ni(II), posterior adsorción de la enzima His₆-RgDAAO y lavados con BF₃, H₂O deionizada e imidazol fueron sometidos a barridos de potencial catódico monitoreados por la QCM-D. Como se mencionó en los Capítulos 4 y 5, estas curvas de electrodesorción reductiva

proporcionan información cualitativa acerca de los grupos tioles adsorbidos sobre el metal y cuantitativa para estimar el cubrimiento superficial³⁰.

La Figura 7.8 a y b muestra Δf_n (izquierda) y ΔD_n (derecha) registrados durante 10 Ciclos realizados en KOH 0,10 M a 0,050 V.s⁻¹ desde 0,200 V hasta -1,600 V para los sustratos de Au/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO y de Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO, respectivamente. En la figura se observa que Δf_n aumenta principalmente en los primeros barridos, mientras que ΔD_n se mantiene prácticamente constante. En particular, se puede observar que durante el primer Ciclo de desorción reductiva, los sustratos de oro modificados con SAMs de carboxilatos de tres átomos de carbono provocan un Δf_n de 60 Hz mientras que los sustratos modificados con carboxilatos de seis átomos de carbono presentan un Δf_n de 80 Hz. Estos valores representan una pérdida de masa de 1,1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ y 1,4 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. Obsérvese además que, después del cuarto Ciclo, los valores de Δf_n se mantienen constantes en ambos sustratos (registrándose 90 Hz y 100 Hz), lo cual indica la remoción completa de la película adsorbida.

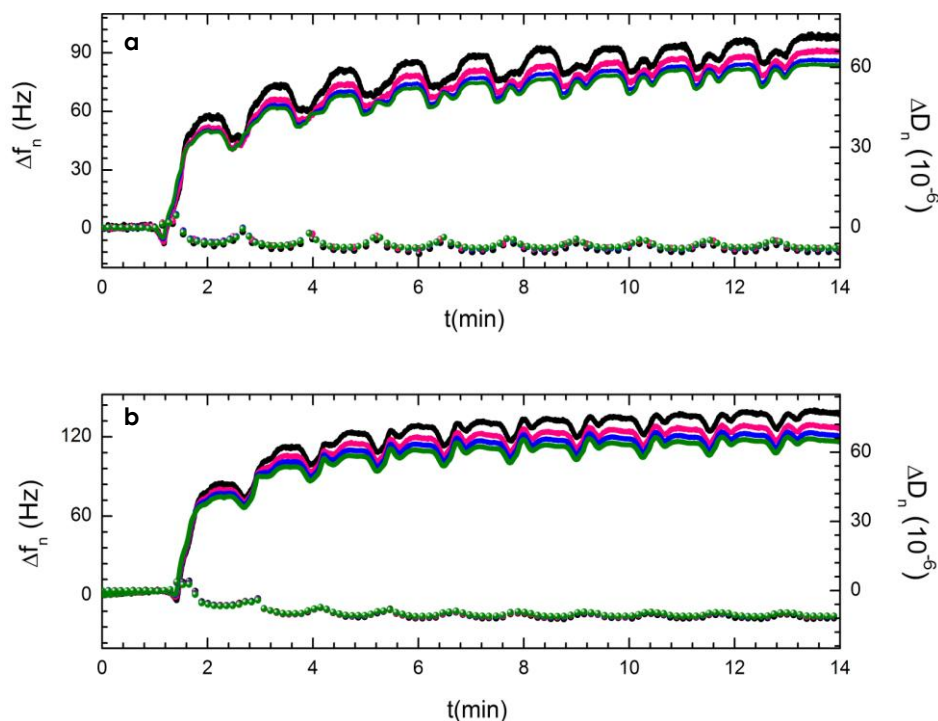


Figura 7.8.- Δf_n y ΔD_n registrados durante 10 Ciclos para un sustrato de: a.- Au/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO y b.-Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+ His₆-RgDAAO. Solución de KOH 0,10 M a $v = 0,050$ V.s⁻¹.

7.2.2.- Amperometría

7.2.2.1.- Determinación de la actividad biológica superficial

La caracterización de la actividad enzimática de la His₆-RgDAAO adsorbida sobre los sustratos de Au modificados, se realizó por amperometría ya que es una técnica muy utilizada en las determinaciones de bioactividad superficial^{4,31-34}. Los experimentos fueron realizados en una celda electroquímica convencional de tres electrodos con agitación utilizando BF 0,10 M pH 8,50 como electrolito soporte. Como se mencionó en el Capítulo 3, todos los sustratos de Au fueron preparados de acuerdo al protocolo de limpieza establecido. Se utilizaron las superficies biofuncionales formadas a partir de sustratos de Au modificados con SAMs mixtas como ET, Ag/AgCl/KCl_(sat) como ER y alambre de platino como CE. En particular, los ET se prepararon a partir de sustratos de Au modificados con SAMs mixtas de Fc y n-COOH (formadas a partir de la inmersión en una solución 1,00 mM de cada componente en CH₂Cl₂ durante 15 h). Una vez formadas las SAMs mixtas, para ciertos experimentos se realizó el ciclado previo en HClO₄ 1,00 M, utilizado tanto con el sustrato monocristalino (Capítulo 4) como policristalino (Capítulo 5). Estos sustratos de Au/n-COOH+Fc se incubaron en una solución acuosa de Ni(II) por 1,0 h a temperatura ambiente. A continuación, luego de numerosos lavados en H₂O deionizada y en BF, los sustratos Au/n-COOH+Fc+Ni(II) fueron incubados en una solución de His₆-RgDAAO 0,10 mg.mL⁻¹ en BF 0,10 M a pH 8,50 a temperatura ambiente por 1,0 h. Esta concentración de enzima, se seleccionó a partir de los resultados obtenidos por QCM-D, en los cuales se registraba la mayor cantidad de enzima adsorbida (Figura 7.5).

Los potenciales aplicados para la determinación de la bioactividad superficial fueron seleccionados teniendo en cuenta los resultados presentados en el capítulo 4, donde se comprobó la formación de pares iónicos entre el mediador redox en su estado oxidado (Fc⁺) y los iones del electrolitos soporte³⁵⁻³⁷. Para evitar la formación de estos pares iónicos, se decidió trabajar a potenciales menores que 0,350 V, en los cuales el mediador redox se encuentra en su estado

reducido (Fc). A modo de resumen, la Figura 7.9 muestra esquemáticamente las reacciones redox acopladas entre una enzima óxidorreductasa, sus productos de oxidación y el mediador redox en su estado reducido. Estas reacciones pueden tener lugar en solución o en superficie; las combinaciones posibles son: enzima + mediador redox en solución, enzima adsorbida + mediador redox en solución, enzima en solución + mediador redox adsorbido o enzima + mediador redox adsorbidos. En cualquier caso, con este esquema de trabajo la transferencia electrónica que da cuenta de la intensidad de corriente determinada experimentalmente por amperometría corresponde a la reducción del mediador redox causada por el potencial aplicado al electrodo. Por otra parte, no es posible utilizar potenciales negativos ya que comienza el proceso de desorción de la monocapa. Para lograr estas condiciones, la mayoría de las determinaciones de bioactividad superficial se realizaron fijando el potencial de trabajo en 0,200 V ya que el mediador redox adsorbido se encuentre en su estado reducido, se evita la desorción de la monocapa y se minimiza las posibles interferencias presentes en la muestra. A modo comparativo, se realizaron algunas determinaciones aplicando un potencial de trabajo de -0,200 V.

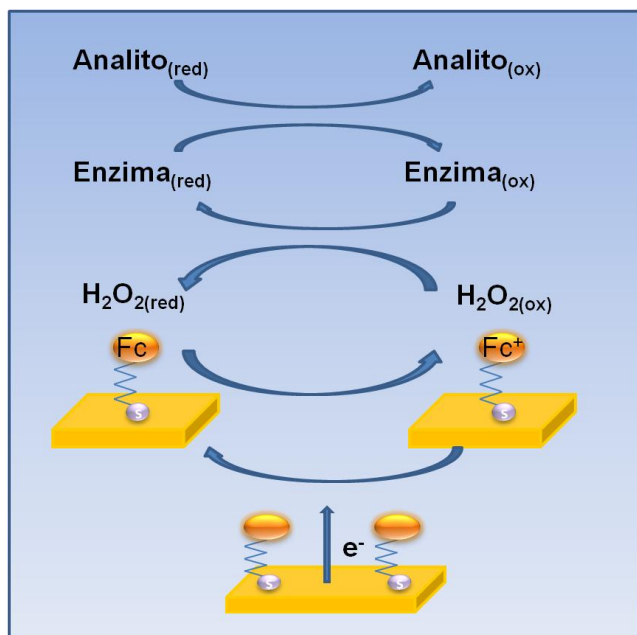


Figura 7.9.- Esquema de las reacciones redox acopladas entre enzimas óxidorreductasas y ferroceno (Fc) para la determinación de la actividad biológica.

En la superficie biofuncional en particular estudiada, formada por la His₆-RgDAAO y los grupos Fc adsorbidos, la intensidad de corriente depende de la concentración del analito (D-alanina) que condiciona la formación de H₂O₂. Por lo tanto, para conocer las concentraciones de H₂O₂ producido a partir de las determinaciones amperométricas, se realizaron curvas de calibración para cada una de las superficies biofuncionales estudiadas. En todos los casos, se adicionaron alícuotas de 10 µL, 50 µL y 100 µL de H₂O₂ 1,00 mM (preparado en BF 0,10 M pH 8,50) utilizando como ET los sustratos de Au modificados de acuerdo a las distintas etapas en el desarrollo de la superficie biofuncional. Es importante recordar, como se mencionó en el Capítulo 6, que todas las determinaciones amperométricas, se realizaron con soluciones de H₂O₂ estandarizadas mediante titulaciones de óxido-reducción con KMnO₄, previamente valorado con Na₂C₂O₄. Por otro lado, en las medidas de bioactividad superficial, se trabajó con soluciones de D-alanina 10,0 mM, adicionando alícuotas de 20 µL, 100 µL y 200 µL. Es importante remarcar que todas las medidas amperométricas de actividad enzimática, se realizaron sin burbujear oxígeno para simplificar el procedimiento en cuanto a la detección de D-aminoácidos. Resultados previos, muestran que no existen diferencias en las determinaciones en presencia o ausencia del burbujeo de oxígeno¹⁷.

Teniendo en cuenta las conclusiones arribadas en los Capítulos 4 y 5, se evaluaron los cambios de intensidad de corriente generados durante la calibración con H₂O₂ y durante el evento de biorreconocimiento para SAMs mixtas (con y sin ciclado previo), en ausencia y presencia de sitios Ni(II). Las curvas de calibración fueron realizadas inyectando distintas alícuotas de una solución de H₂O₂ y se determinaron los cambios de corriente medidas a 0,200 V y -0,200 V en una celda electroquímica convencional con agitación mecánica. Las condiciones seleccionadas para realizar las curvas de calibración pretenden reproducir tanto como sea posible la determinación amperométrica de D-aminoácidos en cuanto a concentración de H₂O₂ y otras condiciones de la celda electroquímica. La Tabla 7.3 muestra las rectas de calibración obtenidas a partir del agregado de distintas alícuotas de una solución de H₂O₂ sobre las superficies

biofuncionales preparadas en ausencia (Au/3-COOH+Fc+His₆-RgDAAO y Au/6-COOH+Fc+His₆-RgDAAO) y presencia (Au/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO y Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO) de sitios Ni(II) con y sin ciclado previo en HClO₄ 1,00 M. Con estas curvas de calibración, es posible determinar la bioactividad superficial como consecuencia del proceso de adsorción física o de bioafinidad así como el efecto del ciclado previo en la respuesta amperométrica.

Por otro lado, la Tabla 7.4 muestra las rectas de calibración sobre las superficies biofuncionales preparadas con sitios Ni(II) en presencia y ausencia de grupos ferroceno adsorbidos.

	$i = a * (C_{H_2O_2}) + b$	
Modificación	Sin Ciclar	Ciclado previo
Au/3-COOH+Fc	$i = (12,2 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) + (14 \pm 3)$	$i = (6,67 \pm 0,01) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) + (9,6 \pm 0,4)$
Au/3-COOH+Fc+Ni(II)	$i = (10,2 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) - (6 \pm 1)$	$i = (9,7 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) - (7 \pm 2)$
Au/6-COOH+Fc	$i = (3,2 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) - (5 \pm 3)$	$i = (32,4 \pm 0,2) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) + (18 \pm 8)$
Au/6-COOH+Fc+Ni(II)	$i = (3,0 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) - (1 \pm 1)$	$i = (32,4 \pm 0,2) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) + (18 \pm 8)$

Tabla 7.3.- Rectas de calibración obtenidas a partir del agregado de distintas alícuotas de una solución de H₂O₂ con las diferentes superficies biofuncionales preparadas a partir de SAMs mixtas en presencia y en ausencia de sitios Ni(II) y con y sin ciclado previo en HClO₄ 1,00 M. La intensidad de corriente (i) está expresada en nA y la concentración de H₂O₂ ([H₂O₂]) en mM. En todos los casos R² > 0,99

Modificación	Con ferroceno	Sin ferroceno
Au/3-COOH+Ni(II) Ciclado	$i = (9,7 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) - (7 \pm 2)$	$i = (5,9 \pm 0,01) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) + (2 \pm 1)$
Au/6-COOH+Ni(II) Sin ciclar	$i = (3,0 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) - (1 \pm 1)$	$i = (2,7 \pm 0,1) 10^{3*} (C_{H_2O_2}) - (9 \pm 4)$

Tabla 7.4.- Rectas de calibración obtenidas a partir del agregado de distintas alícuotas de una solución de H₂O₂ con las diferentes superficies biofuncionales preparadas a partir de SAMs mixtas en presencia y en ausencia de grupos ferroceno con y sin ciclado previo en HClO₄ 1,00 M. La intensidad de corriente (i) está expresada en nA y la concentración de H₂O₂ ([H₂O₂]) en mM. En todos los casos R² > 0,98

Estos resultados indican que las pendientes de las curvas de calibración dependen ligeramente de la presencia de sitios Ni(II), mientras que se observa un efecto del largo de cadena y del ciclado, especialmente en los sustratos de Au modificados con SAMs mixtas de cadenas largas. Es importante notar en este punto que se observó poca reproducibilidad e inestabilidad en las determinaciones amperométricas realizadas con los sustratos Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO ciclados. Nuevamente, estos resultados indican que el tratamiento previo modifica la conformación de la SAMs de cadena larga. Es notable la poca dependencia de la pendiente con la presencia de grupos Fc, sugiriendo que mayoritariamente la señal producida por el agregado de H₂O₂ proviene de los pinholes, aun cuando el potencial óptimo para las determinaciones de H₂O₂ es de 0,450 V¹⁷.

La Figura 7.10 a y b muestra la concentración de H₂O₂ formado luego de agregar 50 μM, 260 μM, y 520 μM de D-alanina sobre los sustratos de Au/3-COOH+Fc+His₆-RgDAAO en ausencia (rosa) y presencia de sitios Ni(II) (verde) sin tratamiento previo (sólido) y luego del ciclado en HClO₄ 1,00 M (cuadriculado). Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir de diez repeticiones en las determinaciones de biorreconocimiento para los distintos sustratos modificados.

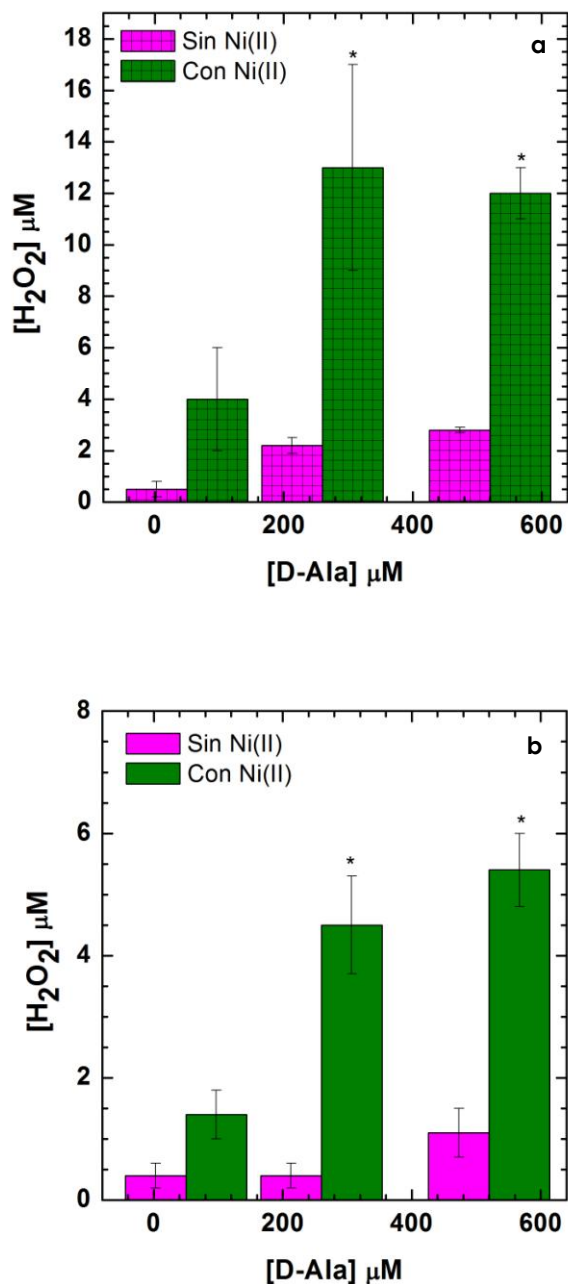


Figura 7.10.- Actividad biológica superficial determinada a partir de la concentración de H₂O₂ formado como producto de la reacción enzimática en presencia de distintas concentraciones de D-alanina para sustratos de Au/3-COOH+Fc+His₆-RgDAAO en solución de BF 0,10 M pH 8,50 aplicando un E = 0,200 V. a.- con ciclado y b.- sin ciclado previo en ausencia (rosa) y presencia de Ni(II) (verde) . ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y EC: alambre de platino.

La comparación de los resultados obtenidos en las detecciones amperométricas de la bioactividad superficial, utilizando sustratos de Au/3-

COOH+Fc+His₆-RgDAAO, mostraron la fuerte dependencia de las cantidades detectadas de H₂O₂ formado en sustratos con sitios Ni(II). Independientemente del tratamiento previo, las interacciones de bioafinidad entre la enzima His₆-RgDAAO y los sitios Ni(II) superficiales resultan en una mejor respuesta en cuanto al evento de biorreconocimiento de D-alanina, aun teniendo en cuenta que la cantidad de enzima adsorbida por interacciones de bioafinidad es mayor a la observada por interacciones físicas. Este resultado, indica que el sitio activo de la enzima se encuentra más preservado cuando se induce la interacción de bioafinidad, ya sea como consecuencia de la ausencia de cambios estructurales y/o de una adecuada orientación del elemento de biorreconocimiento. Por otro lado, también se observó que con los sustratos de Au/3-COOH+Fc ciclados previamente (antes del anclaje de los sitios Ni(II) y de la biofuncionalización superficial), se registraron cantidades más elevadas de H₂O₂ formado. Este efecto puede estar relacionado con el reordenamiento superficial que provoca el ciclado (discutido en el Capítulo 4 y 5) que permite un mejor anclaje de los cationes Ni(II) y la unión de la enzima recombinante de forma tal que se mantiene su capacidad de biorreconocimiento natural. Este reordenamiento superficial también tiene cierto efecto sobre las enzimas adsorbidas físicamente, ya que la actividad prácticamente se duplica en ausencia de Ni(II). Sin embargo, no puede descartarse una mayor cantidad adsorbida de enzima luego del ciclado, efecto que no pudo estudiarse por QCM-D.

La Figura 7.11 a y b muestra la concentración de H₂O₂ formado luego de agregar 50 μM, 260 μM, y 520 μM de D-alanina sobre los sustratos de Au/6-COOH+Fc+His₆-RgDAAO en ausencia (rosa) y presencia de sitios Ni(II) (verde) sin tratamiento previo (sólido) y luego del ciclado en HClO₄ 1,00 M (cuadrado) . Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir de diez repeticiones en las determinaciones de biorreconocimiento para los distintos sustratos modificados.

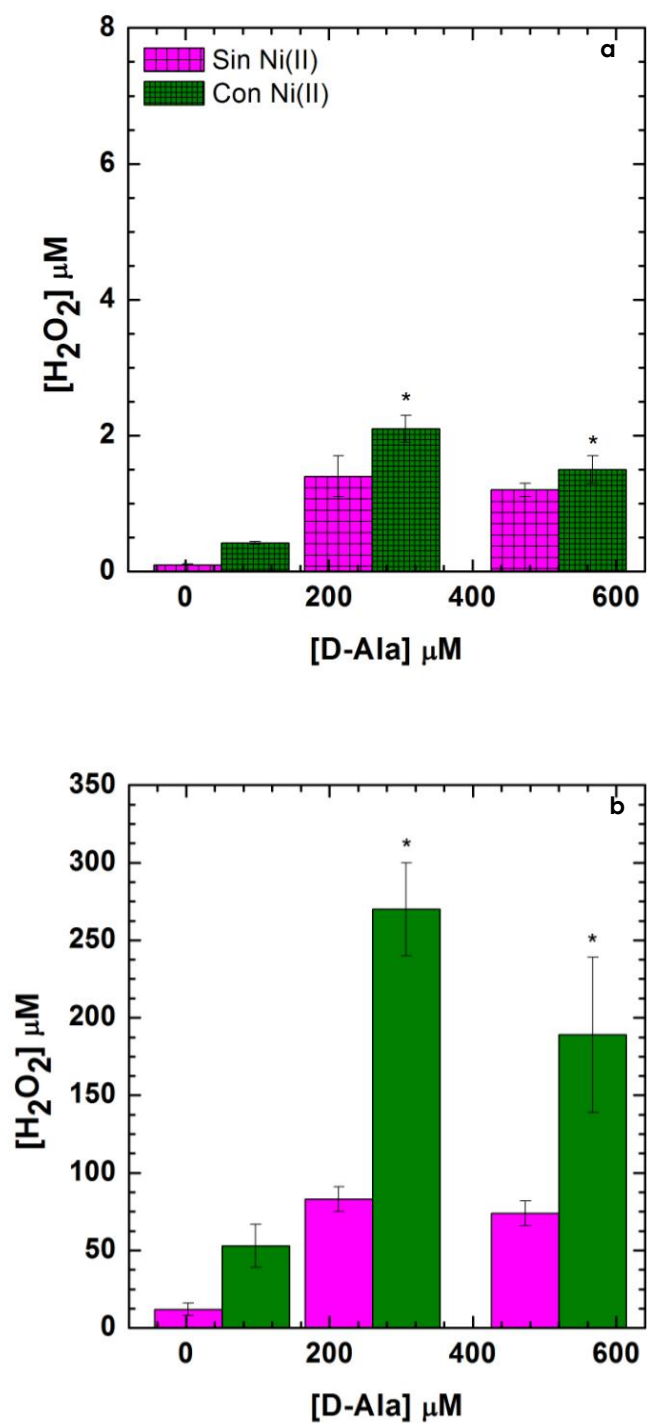


Figura 7.11 Actividad biológica superficial determinada a partir de la concentración de H₂O₂ formado como producto de la reacción enzimática en presencia de distintas concentraciones de D-alanina para sustratos de Au/δ-COOH+Fc+His₆-RgDAAO en solución de BF 0,10 M pH 8,50 aplicando un E = 0,200 V. a.- con ciclado y b.- sin ciclado previo en ausencia (rosa) y presencia de Ni(II) (verde) . ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y EC: alambre de platino.

Las superficies biofuncionales desarrolladas sobre sustratos de Au modificados con SAMs mixtas de Fc y 6-COOH mostraron una fuerte dependencia con el ciclado previo en HClO₄ frente al evento de biorreconocimiento. Como se discutió en el Capítulo 5, el ciclado previo en estos sustratos impide el anclaje de los cationes Ni(II) por no encontrarse disponibles los grupos COO⁻ para la coordinación. Como consecuencia, la His₆-RgDAAO no logra una unión al sustrato a través de interacciones de bioafinidad, dando lugar a registros amperométricos similares a los observados con la enzima físicamente adsorbida. Por otro lado, los registros de H₂O₂ muestran comportamientos similares con ambos sustratos en ausencia de sitios Ni(II), indicando que las enzimas adsorbidas por interacciones físicas mantienen en alguna medida la capacidad de biorreconocimiento. Las mejores respuestas para detectar el evento de biorreconocimiento superficial, se observaron con los sustratos de Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO no ciclados previamente, donde los agregados de D-alanina mayores que 200 μM provocaron la formación de H₂O₂ de (230±40) μM (aproximadamente 20 veces más que lo registrado con sustratos de Au/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO luego del pretratamiento de ciclado).

Claramente, las diferencias observadas entre las superficies biofuncionales de Au/3-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO con ciclado previo y de Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO no ciclados, se deben a la conformación de la monocapa resultante en cada caso. Como se observó en los resultados presentados en los Capítulos 4 y 5 utilizando diversas técnicas experimentales (CV, SECM y SERS), cuando se utilizan los tioles carboxilados de cadena carbonada más larga la conformación de la monocapa compromete la disponibilidad de los grupos COO⁻, necesarios para el anclaje de cationes Ni(II). Finalmente, las diferencias observadas entre ambas superficies biofuncionales con respecto a las cantidades de H₂O₂ detectadas, se pueden vincular con las propiedades viscoelásticas de cada una de las películas proteica. La modificación de sustratos de Au con SAMs de 6-COOH da lugar a películas menos rígidas, sugiriendo una mejor accesibilidad de los sitios activos de la His₆-RgDAAO durante el evento de biorreconocimiento.

A partir de los resultados presentados en el Capítulo 4, se observó por SECM, que los potenciales más negativos favorecen la transferencia de electrones por parte de los grupos Fc adsorbidos sobre los sustratos de Au modificados, cuando se utiliza FcMeOH como sonda redox. La Figura 7.12 muestra la concentración de H₂O₂ formada luego de agregar 50 μM, 260 μM y 520 μM de D-alanina sobre los sustratos de Au/6-COOH+Fc+His₆-RgDAAO en presencia de sitios Ni(II) sin ciclado previo aplicando un potencial fijo de -0,200 V. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir de tres repeticiones en las determinaciones de biorreconocimiento con los sustratos Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO

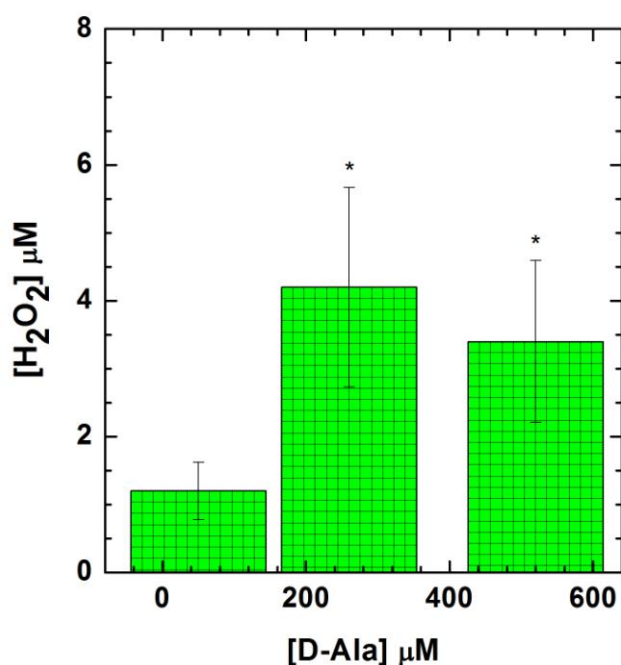


Figura 7.12.- Actividad biológica superficial determinada a partir de la concentración de H₂O₂ formado como producto de la reacción enzimática en presencia de distintas concentraciones de D-alanina para sustratos de Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO sin ciclado previo en solución de BF 0,10 M pH 8,50 aplicando un E = -0,200 V. ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y CE: alambre de platino.

Estos resultados muestran que, aun cuando es posible registrar el evento de biorreconocimiento a este potencial de trabajo, la concentración de H₂O₂ detectada es menor que a 0,200 V. Este comportamiento puede relacionarse con

dos hechos: desorción parcial de la SAMs a -0,200 V y/o mejor respuesta de los grupos Fc adsorbidos frente a este mediador redox a 0,200 V.

A través de la modificación de los sustratos sólidos con grupos Fc se pretende mejorar la detección del evento de biorreconocimiento. La Figura 7.13 a y b muestra las señales de corriente cuando se realizaron agregados de 260 μM de D-alanina en función del tiempo a sustratos de Au/3-COOH+Ni(II)+His₆-RgDAAO con ciclado previo y Au/6-COOH+Ni(II)+His₆-RgDAAO sin ciclado previo respectivamente, realizando las determinaciones en BF 0,10 M pH 8,50 aplicando un E = 0,200 V. Dado que la cantidad de grupos Fc en las SAMs mixtas es minoritaria respecto a la de carboxilatos, se supone que la cantidad adsorbida y el modo de interacción de la enzima con el sustrato de Au no se modifica con las SAMs simples de n-COOH.

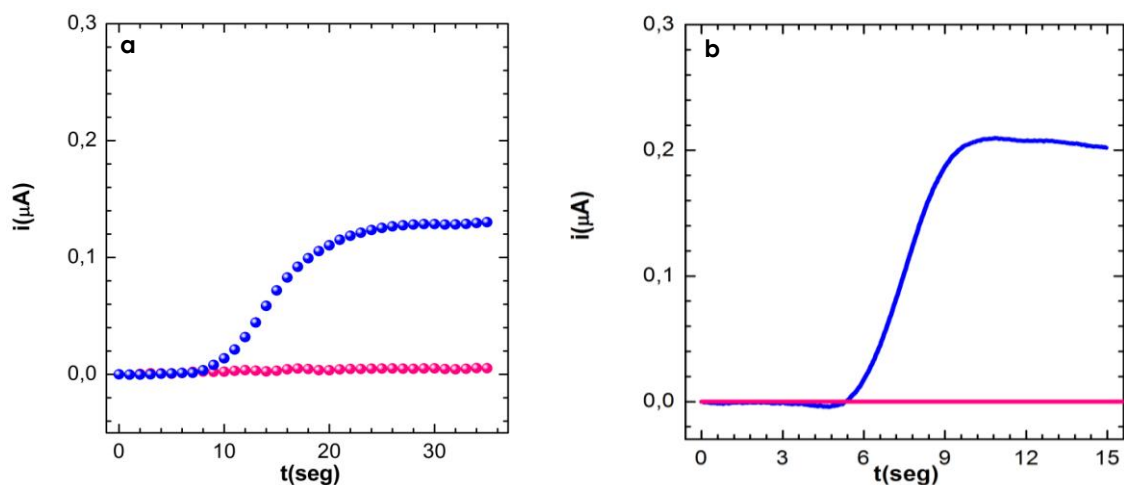


Figura 7.13.- Intensidad de corriente (i) en función del tiempo (t) para el agregado de D-alanina 260 μM y de en solución de BF 0,10 M pH 8,50 aplicando un E = 0,200 V. ET: a.- Au/3-COOH+Ni(II)+ His₆-RgDAAO, con ciclado previo en presencia (—) y en ausencia (—) de grupos Fc y b.- Au/6-COOH+Ni(II)+ His₆-RgDAAO sin ciclado previo en presencia (—) y en ausencia (—) de grupos Fc, ER: Ag/AgCl/KCl_(sat) y CE: alambre de platino.

Estos resultados muestran, por un lado, que la presencia de los grupos Fc adsorbidos en este tipo de sustratos, es necesaria para detectar el evento de biorreconocimiento con los agregados de D-alanina. En consecuencia, destacan la importancia de los mediadores redox adsorbidos para la detección

amperométrica de H₂O₂. Por otra parte, indican que la transferencia electrónica ocurre a través de los grupos Fc adsorbidos, tal como se planteó en la discusión de los resultados mostrados en la Figura 7.9.

7.3.- Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo permitieron concluir con los dos últimos objetivos planteados para este trabajo de Tesis Doctoral.

- ☉ Se optimizó la interacción entre la His₆-RgDAAO y los sustratos modificados SAMs mixtas de Fc y n-COOH y sitios Ni(II).
- ☉ La biofuncionalización de sustratos de Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO da lugar a una película proteica con orientación adecuada para el biorreconocimiento.
- ☉ La detección del evento de biorreconocimiento se favorece por la presencia de los grupos redox, Fc, anclados a la superficie. Las superficies biofuncionales formadas a partir de sustratos de Au/6-COOH+Fc+Ni(II)+His₆-RgDAAO sin ciclado previo permitieron detectar concentraciones más elevadas de H₂O₂ con respecto a las demás superficies biofuncionales estudiadas.

7.4.- Referencias

1. Ahirwal GK, Mitra CK. Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor. *Biosens Bioelectron.* 2010;25(9):2016-2020. doi:10.1016/j.bios.2010.01.029.
2. Xu J, Shang F, Luong JHT, Razeeb KM, Glennon JD. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a monolayer modified nanowire array electrode. *Biosens Bioelectron.* 2010;25(6):1313-1318. doi:10.1016/j.bios.2009.10.018.
3. Frattini L, Rosini E, Pollegioni L, Piloni MS. Analyzing the D-amino acid content in biological samples by engineered enzymes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(29):3235-3239. doi:10.1016/j.jchromb.2011.02.036.
4. Herrera E, Valdez Taubas J, Giacomelli CE. D-Amino acid oxidase bio-functionalized platforms: Toward an enhanced enzymatic bio-activity. *Appl Surf Sci.* 2015;356:679-686. doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.121.

5. Ley C, Holtmann D, Mangold KM, Schrader J. Immobilization of histidine-tagged proteins on electrodes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;88(2):539-551. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.044.
6. Segura MDLM, Levin G, Miranda M V, Mendive FM, Targovnik HM, Cascone O. High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture. *Process Biochem*. 2005;40(2):795-800. doi:10.1016/j.procbio.2004.02.009.
7. Hou J, Jin Q, Du J, Li Q, Yuan Q, Yang J. A rapid in situ immobilization of D-amino acid oxidase based on immobilized metal affinity chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(5):857-864. doi:10.1007/s00449-013-1056-6.
8. Dixon DD, Yu VY, Doyle RP. Recombinant expression of His-tagged saposin B and pH-dependent binding to the lipid coenzyme Q10. *Anal Biochem*. 2011;419(2):145-152. doi:10.1016/j.ab.2011.08.042.
9. Ranieri A, Battistuzzi G, Borsari M, Bortolotti CA, Rocco G Di, Sola M. PH and solvent H/D isotope effects on the thermodynamics and kinetics of electron transfer for electrode-immobilized native and urea-unfolded stellacyanin. *Langmuir*. 2012;28(42):15087-15094. doi:10.1021/la303363h.
10. Valenti LE, Martins VL, Herrera E, Torresi RM, Giacomelli CE. Ni(ii)-modified solid substrates as a platform to adsorb His-tag proteins. *J Mater Chem B*. 2013;1(38):4921. doi:10.1039/c3tb20769b.
11. Valenti LE, Herrera E, Stragliotto F, et al. Optimizing the Bioaffinity Interaction between His-Tag Proteins and Ni (II) Surface Sites. *Proteins Interfaces III State art*. 2012;(li):37-53. doi:10.1021/bk-2012-1120.
12. Dib I, Stanzer D, Nidetzky B. *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase: Control of protein quality and opportunities for biocatalysis through production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(1):331-333. doi:10.1128/AEM.01569-06.
13. Dixon MC. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: Enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. *J Biomol Tech*. 2008;19(3):151-158.
14. Delcroix MF, Demoustier-Champagne S, Dupont-Gillain CC. Quartz crystal microbalance study of ionic strength and pH-dependent polymer conformation and protein adsorption/desorption on PAA, PEO, and mixed PEO/PAA brushes. *Langmuir*. 2014;30(1):268-277. doi:10.1021/la403891k.
15. Messina GML, Satriano C, Marletta G. A multitechnique study of preferential protein adsorption on hydrophobic and hydrophilic plasma-modified polymer surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2009;70(1):76-83. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.12.013.
16. Teo A, Dimartino S, Lee SJ, et al. Interfacial structures of whey protein isolate (WPI) and lactoferrin on hydrophobic surfaces in a model system monitored by quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and their formation on nanoemulsions. *Food Hydrocoll*. 2016;56:150-160. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.12.002.

17. Herrera E. Diseño y desarrollo de superficies bio-funcionales para la determinación de D-aminoácidos. *Tesis Dr.* 2013.
18. Holmberg M, Hansen TS, Lind JU, Hjortø GM. Increased adsorption of histidine-tagged proteins onto tissue culture polystyrene. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2012;92:286-292. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.001.
19. Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv*. 2012;30(3):489-511. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
20. Campàs M, Prieto-Simón B, Marty JL. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(1):3-9. doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.009.
21. Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*. 2007;8(6):1775-1789. doi:10.1021/bm061197b.
22. Valenti LE, De Pauli CP, Giacomelli CE. The binding of Ni(II) ions to hexahistidine as a model system of the interaction between nickel and His-tagged proteins. *J Inorg Biochem*. 2006;100(2):192-200. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.11.003.
23. Giacomelli CE, Valenti LE, Carot ML. Biomolecules and Solid Substrate Interaction: Key Factors in Developing Biofunctional Surfaces. In: *Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Second Edition*. Vol ; 2007:1-16. doi:10.1081/E-ESCS-120047144.
24. Valenti LE, Fiorito P a., Garcia CD, Giacomelli CE. The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes. *J Colloid Interface Sci*. 2007;307(2):349-356. doi:10.1016/j.jcis.2006.11.046.
25. Mora MF, Valenti LE, García CD, Giacomelli CE. Driving Forces and Consequences of the Adsorption of Proteins to Carbon Nanotubes. *Key Eng Mater*. 2010;441:75-94. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.441.75.
26. Hahn Berg IC, Lindh L, Arnebrant T. Intraoral lubrication of PRP-1, statherin and mucin as studied by AFM. *Biofouling*. 2004;20(March 2015):65-70. doi:10.1080/08927010310001639082.
27. Feiler A a., Sahlholm A, Sandberg T, Caldwell KD. Adsorption and viscoelastic properties of fractionated mucin (BSM) and bovine serum albumin (BSA) studied with quartz crystal microbalance (QCM-D). *J Colloid Interface Sci*. 2007;315(2):475-481. doi:10.1016/j.jcis.2007.07.029.
28. Briand E, Gu C, Boujday S, Salmain M, Herry JM, Pradier CM. Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs: Topography/bioactivity relationship - A combined FT-RAIRS, AFM and QCM investigation. *Surf Sci*. 2007;601(18):3850-3855. doi:10.1016/j.susc.2007.04.102.
29. Jia P, He M, Gong Y, Chu X, Yang J, Zhao J. Probing the adjustments of macromolecules during their surface adsorption. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(12):6422-6429. doi:10.1021/acsami.5b01138.

30. Walczak M, Popenoe DD, Deinhammer RS, Lamp BD, Chung C, Porter MD. Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage. *Langmuir*. 1991;7:2687-2693. doi:10.1021/la00059a048.
31. Qiu JD, Zhou WM, Guo J, Wang R, Liang RP. Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose. *Anal Biochem*. 2009;385(2):264-269. doi:10.1016/j.ab.2008.12.002.
32. Polcari D, Kwan A, Van Horn MR, et al. Disk-shaped amperometric enzymatic biosensor for in vivo detection of D-serine. *Anal Chem*. 2014;86(7):3501-3507. doi:10.1021/ac404111u.
33. Şenel M, Çevik E, Abasiyanik MF. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator. *Sensors Actuators, B Chem*. 2010;145(1):444-450. doi:10.1016/j.snb.2009.12.055.
34. Van Staden JF, Stefan RI, Aboul-Enein HY. Amperometric biosensor based on D-aminoacid oxidase for the R-perindopril assay. *Fresenius J Anal Chem*. 2000;367(2):178-180. doi:10.1007/s002160051620.
35. Ohtani M. Quasi-reversible voltammetric response of electrodes coated with electroactive monolayer films. *Electrochem commun*. 1999;1(10):488-492. doi:10.1016/S1388-2481(99)00103-4.
36. Laviron E. Surface linear potential sweep voltammetry. *Electroanal Chem Interfacial Electrochem*. 1974;52:395-402.
37. Rudnev A V, Yoshida K, Wandlowski T. Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on low-index gold single crystal electrodes. *Electrochim Acta*. 2013;87:770-778. doi:10.1016/j.electacta.2012.09.090.

Capítulo 8

Conclusiones y perspectivas futuras



“Contempla cada camino de cerca, entonces hazte esta pregunta: ¿ me lleva el corazón por esta ruta?. Si lo hace, entonces el camino es bueno”.

Carlos Castaneda

8.1.- Conclusiones

El objetivo general de esta tesis fue el estudio de la interacción enzima-sustrato modificado: diseño y desarrollo de superficies biofuncionales. La superficie biofuncional se basa en la actividad enzimática de la His₆-RgDAAO que cataliza la conversión de los D-aminoácidos a cetoácidos y H₂O₂ que puede determinarse amperométricamente. En este sentido, se propuso como estrategia de trabajo la modificación de sustratos sólidos de oro con SAMs mixtas formadas a partir de grupos ferroceno y grupos COOH de distinto largo de cadena carbonada (3 y 6 átomos de carbono). Por SERS se conoció la conformación de las estructuras de los sustratos de Au(111)/3-COOH y de Au(111)/6-COOH. Además, se estudió por VC y SECM la respuesta de los sustratos modificados con SAMs simples y mixtas para anclar sitios Ni(II). Para la biofuncionalización se utilizó la enzima His₆-RgDAAO obtenida por técnicas recombinantes con una marca de His₆ (proteína His-tag), para biofuncionalizar por interacciones de bioafinidad. Por esta razón, en una primera instancia, se transformó, se expresó y purificó la His₆-RgDAAO y se evaluó su actividad en solución. Para inducir la interacción de bioafinidad entre los residuos de histidina de la marca proteica y los sitios Ni(II) anclados a la superficiales de los sustratos sólidos modificados, se estudió la interacción enzima-sustrato sólido a partir del estudio del proceso de adsorción-desorción con tres sustratos sólidos (sin modificar y modificados con COO⁻ en ausencia y presencia de Ni(II)) para evaluar tanto la adsorción física como la interacción de bioafinidad a través de la QCM-D. Finalmente, se determinó la actividad biológica superficial a partir de la caracterización enzimática de la His₆-RgDAAO adsorbida y se evaluó la capacidad de biorreconocimiento. A partir de los resultados obtenidos del evento de biorreconocimiento se corroboró que la presencia de los grupos ferroceno anclados al sustrato otorgan mayor sensibilidad a la detección de la eficacia catalítica de la enzima His₆-RgDAAO, de manera que el sistema oro/n-COOH+Fc+Ni(II)+ His₆-RgDAAO aparece como una buena

alternativa para ser incorporada en la detección amperométrica de D-aminoácidos.

8.2. Perspectivas futuras

En términos generales, el impacto de este proyecto se relaciona con la generación de nuevos conocimientos desde el aspecto fundamental y con la transferencia de esos resultados al diseño de superficies biofuncionales con capacidad de reconocimiento específico. Por un lado, la modificación de sustratos permitió incorporar a las proteínas en condiciones óptimas para inducir una interacción fuerte y estable, mantener las propiedades de reconocimiento biológico, preservar la accesibilidad de los sitios reactivos de la macromolécula, evitar la adsorción inespecífica de otros componentes y mejorar la detección del evento de reconocimiento. Por otro lado, el estudio sistemático de las interacciones entre las proteínas y la superficie y la evaluación de la conformación y orientación de las moléculas adsorbidas permitirá seleccionar nuevas estrategias para mantener la capacidad de biorreconocimiento superficial.

El estudio sistemático del proceso de adsorción de la His₆Rg-DAAO y la optimización de su actividad biológica superficial, permitirán comprender en detalle las distintas interacciones entre esta enzima y la superficie, con lo cual será factible optimizar el evento de biorreconocimiento superficial de D-aminoácidos para el diagnóstico de enfermedades y para determinaciones de calidad en alimentos. Además, los resultados de este estudio podrán ser incluidos en un contexto más general, que involucra a las enzimas oxidoreductasas, para contribuir a mejorar la respuesta de diversos biosensores.