

Trabajo de tesina de Licenciatura en Química

“Construcción y evaluación funcional de ensamblados supramoleculares electroactivos de poliaminas modificadas con centros de ferroceno”



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química

Director: Dr. Marmisollé, Waldemar A.

Co-directora: Dra. Cortez, M. Lorena

Florencia Ailín Fernández

2019

El presente Trabajo Final de la Carrera de Licenciatura en Química (Orientación Físicoquímica) se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Waldemar A. Marmisollé y la co-dirección de la Dra. M. Lorena Cortez.

La Plata, mayo de 2019.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis directores Lorena y Waldemar por brindarme su tiempo y paciencia, junto a su confianza y dedicación, para poder llevar a cabo este trabajo.

A mi familia, Eduardo, Silvia, Mailén y Nahuel, a Mavi, Víctor, Lucía y Nicolás por su incondicional cariño y apoyo.

Finalmente, a todos mis amigos y compañeros.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Técnicas y fundamentos.....	3
2.1 Voltamperometría cíclica.....	3
2.2 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis).....	7
2.3 Resonancia de plasmón superficial (SPR)	8
2.4 Potencial zeta.....	11
2.4.1 Velocimetría Doppler de Láser (LVD)	14
2.5 Dispersión dinámica de la luz (DLS)	15
2.6 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x (XPS)	18
3. Materiales y equipamientos	20
3.1 Sustancias y materiales utilizados	20
3.2 Equipamiento	20
4. Síntesis del polímero PAH-Fc	24
4.1 Purificación por diálisis	25
5. Caracterización del polímero PAH-Fc	26
5.1 Determinación del grado de modificación	26
5.2 Caracterización electroquímica	29
5.2.1 Formación de ensamblados.....	29
5.2.2 Estudio de la velocidad de barrido	33
6. Ensamblados de PAH-Fc y nanopartículas de oro	36
6.1 Síntesis de nanopartículas de oro	36
6.2 Caracterización de las nanopartículas de oro	36
6.3 Ensamblados LbL y determinaciones electroquímicas	37
6.4 Medidas de UV-visible sobre sustratos de vidrio	40
7. Ensamblados PAH-Fc y GOx	43
8. Efecto de fosfato sobre la respuesta voltamperométrica del polímero.....	48
8.1 Efecto de fosfato sobre electrodos de oro modificados con PAH-Fc.....	49
8.2 Efecto de fosfato sobre electrodos de grafito modificados con PAH-Fc.....	52

8.3 Efecto de fosfato sobre la respuesta bioelectroquímica de ensamblados con GOx	54
8.4 Análisis del efecto de fosfato sobre la respuesta de PAH-Fc.....	55
8.4.1 Medidas de SPR.....	56
8.4.2 Blanco de PAH-Os.....	59
8.4.3 Medidas de XPS.....	60
9. Conclusiones	64
10. Referencias	66

1. Introducción

Desde hace varios años la tecnología de los sensores electroquímicos ha adquirido gran importancia en la química analítica y en algunos otros campos de la investigación y desarrollo, como las ciencias biológicas, la medicina, biotecnología, medio ambiente, entre otros.¹ Debido a esto, surge el interés por el estudio de la formación de electrodos modificados a partir de diferentes materiales capaces de transformar la interacción con el analito en una señal útil de corriente.²

El presente trabajo está fundamentalmente orientado a la construcción de ensamblados supramoleculares de distintas configuraciones, a partir de un polímero electroactivo sobre superficies de electrodos de oro y grafito, empleando nanomateriales y enzimas rédox, dando lugar a materiales híbridos electroactivos.³

Para ello, se llevó a cabo la síntesis de un polímero a partir de polialilamina (PAH), que constituye un modelo sencillo de poliamina y ha sido empleado en una gran variedad de estudios básicos, modificando ésta con centros de ferroceno (PAH-Fc).

Se estudió, mediante la técnica electroquímica de voltamperometría cíclica, la mejor condición de adsorción de dicho polímero sobre los diferentes sustratos y, teniendo en cuenta ésta, se formaron distintos tipos de ensamblados.

Además, se llevó a cabo la construcción de ensamblados moleculares capa por capa (layer-by-layer, LbL) empleando el polímero sintetizado como parte positiva, y nanopartículas de oro (Au-NPs), así como también la enzima glucosa oxidasa (GOx), como contraparte negativa.

La GOx es una enzima que cataliza la oxidación de glucosa en ácido glucónico utilizando su grupo prostético, flavín adenín dinucleótido (FAD), como cofactor.⁴ Ha sido extensamente estudiada y utilizada en el diseño de biosensores debido a su robustez, además de la importancia que ésta tiene en la determinación de glucosa en ensayos clínicos.⁵ En este trabajo se escogió a la glucosa oxidasa como modelo enzimático rédox para evaluar la capacidad del PAH-Fc sintetizado como mediador de la transferencia de carga generada por la oxidación de glucosa, ya que la electroquímica y el mecanismo de acción de esta enzima son bien conocidos.

Por otro lado, se han reportado artículos sobre la elevada afinidad y especificidad de las superficies de poliamina para asociarse a iones fosfato a través de interacciones de puente

de hidrógeno, además de las interacciones electrostáticas.⁶ También se han observado efectos de reversión de carga en ensamblados LbL de PAH debido a la asociación con fosfato.⁷ En base a estos antecedentes, por último, se evaluó la respuesta voltamperométrica de los ensamblados construidos en contacto con soluciones de distintas concentraciones de fosfato de manera de evaluar la capacidad del PAH-Fc sintetizado como reportero de este anión. De esta manera se evaluaron los cambios en la respuesta electroquímica producida por la interacción entre los iones fosfato y la poliamina modificada.

2. Técnicas y fundamentos

En este capítulo se abordarán los fundamentos teóricos de las técnicas utilizadas en la realización de este trabajo. Éstas son:

- ✓ Voltamperometría cíclica
- ✓ Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis)
- ✓ Resonancia de plasmón superficial (SPR)
- ✓ Potencial zeta
- ✓ Determinación de tamaño de partícula
- ✓ Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

2.1 Voltamperometría cíclica

Es una técnica electroquímica en la que se aplica una variación lineal del potencial en función del tiempo. El potencial aplicado, E , responde a la siguiente expresión:

$$E = E_i + \nu t \quad (1)$$

donde E_i es el potencial inicial del sistema, ν es la velocidad de barrido del potencial y t es el tiempo.

El potencial se varía linealmente en forma de onda triangular desde un valor E_1 hasta un valor E_2 regresando generalmente al mismo valor inicial E_1 u otro valor E_3 . En la **Figura 2.1.1** se representa la onda de potencial aplicada en función del tiempo. La pendiente de ésta queda determinada por la velocidad de barrido escogida, la cual define la escala de tiempo en la que se examina el proceso electroquímico. Normalmente estos barridos se realizan a velocidades de entre 10 y 200 mV s^{-1} .

De esta manera, se obtiene como respuesta una gráfica de corriente (i) en función del E aplicado, llamada curva voltamperométrica o voltamperograma. La forma exacta de la curva depende principalmente del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo, dentro del rango de potenciales aplicados.

La voltamperometría cíclica se puede llevar a cabo en sistemas donde las especies electroactivas se encuentran en solución o adsorbidas sobre un electrodo modificado. Esta última condición es la que se utilizó a lo largo de este trabajo y, por lo tanto, se desarrollará con mayor detalle.

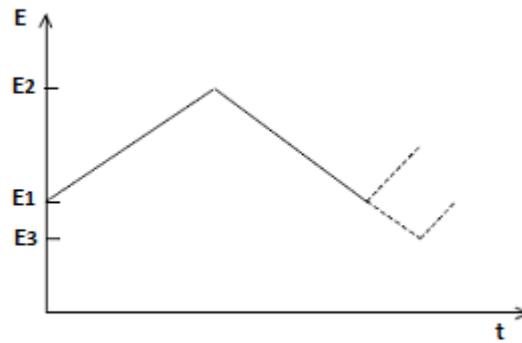
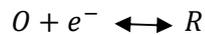


Figura 2.1.1. Perfil de potencial aplicado en función del tiempo para la técnica de voltamperometría cíclica. Tomado de la tesis doctoral de Lorena Cortez.²

Consideremos la siguiente reacción simplificada de óxido-reducción:



donde O es la especie oxidada y R , la reducida. Al considerar el caso más simple en el que ambas especies se encuentran adsorbidas sobre el electrodo y son electroquímicamente activas en el intervalo de potencial aplicado, se desprecian los efectos de transporte de masa ya que las especies están confinadas en la interfase.

Las propiedades del voltamperograma de especies adsorbidas sobre un electrodo están determinadas por el número de sitios electroactivos disponibles. En la **Figura 2.1.2** se puede observar la representación de una curva voltamperométrica para un sistema *reversible*. En ésta se identifican dos picos bien definidos, uno correspondiente a la oxidación del material disponible adsorbido sobre el electrodo, con sus correspondientes parámetros de pico (i_{pa} , E_{pa}) y el otro, observado al invertir el barrido de potencial aplicado, correspondiente a la reacción de reducción del material oxidado que se encuentra en la superficie del electrodo, en el que se especifican los parámetros de pico catódicos (i_{pc} , E_{pc}).

Las corrientes de pico determinan la máxima (o mínima) corriente alcanzada. También se observa una simetría respecto de ambos picos, esto se debe a que la cantidad de especies O y R sobre la superficie del electrodo son iguales, es decir, que todo el material que se oxide en la rama anódica del voltamperograma será reducido al invertir el barrido de potencial. Al considerar que durante estas reacciones no se adsorbe ni desorbe ninguna especie, se deduce la siguiente relación:

$$\Gamma_O(t) + \Gamma_R(t) = \Gamma_R^* \quad (2)$$

donde $\Gamma_O(t)$ y $\Gamma_R(t)$ son las cantidades de moles de las especies O y R , respectivamente, adsorbidos en el electrodo a un determinado tiempo expresado en moles/cm² y Γ_R^* corresponde a la cantidad de moles iniciales de la especie R sobre la superficie del electrodo.

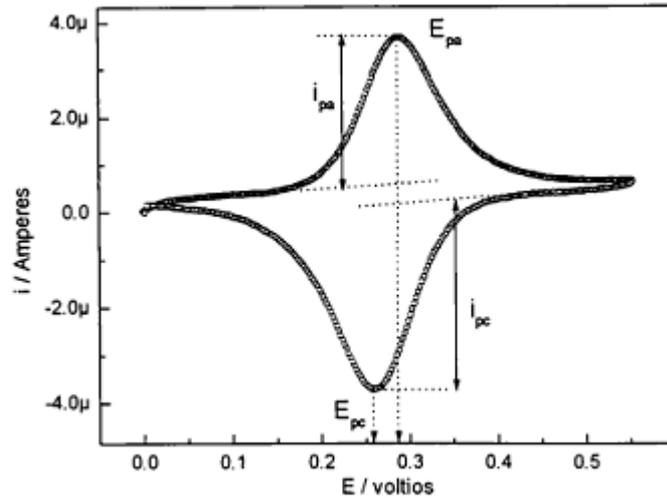


Figura 2.1.2. Voltamperograma típico de una especie electroactiva adsorbida sobre un electrodo de trabajo, bajo la condición de reversibilidad electroquímica. Se indican los parámetros de pico anódico y catódico. Tomada de la tesis doctoral de Eduardo Cortón.⁸

Frecuentemente y por simplicidad, para describir la adsorción sobre una superficie se utiliza el modelo de las isothermas de Langmuir. Este es un modelo teórico que describe el comportamiento experimental de la adsorción sobre superficies homogéneas, en el cual se considera que la superficie del adsorbente presenta sitios de igual energía, y solamente una molécula puede ser adsorbida por sitio, formando una monocapa en la cual no existe interacción entre las moléculas adsorbidas.⁹

Teniendo en cuenta estas aproximaciones, considerando que la reacción rédox en la que participa el ensamblado obedece la ecuación ideal de Nernst y suponiendo que la velocidad de transferencia de carga es muy grande, se obtiene las siguientes expresiones para los parámetros de pico:¹⁰

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_O^* \quad (3)$$

$$E_p = E^{0'} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{b_O}{b_R} \quad (4)$$

donde n es la cantidad de electrones intercambiados en la reacción rédox, F es la constante de Faraday, R la constante de los gases ideales, T la temperatura, A es el área expuesta del electrodo, v la velocidad de barrido, $E^{0'}$ es el potencial formal y b_O está dado por $b_O = \beta_O \Gamma_{O,s}$

donde $\beta_O = e^{-\frac{\Delta G_O^0}{RT}}$ y $\Gamma_{O,s}$ es la cantidad de moles de saturación de la especie O adsorbidos sobre el electrodo. Expresiones similares se tienen para la especie reducida b_R .

A partir de estas ecuaciones se puede visualizar la proporcionalidad de i_p con la velocidad de barrido, v , igual a la observada en respuestas voltamperométricas puramente capacitivas; además, se expresa la independencia de E_p respecto de v . También se tiene que la diferencia de potenciales entre i_{pa} e i_{pc} debe ser de 0 mV para una cupla rédox con una rápida transferencia electrónica, por lo que $E_{pa}=E_{pc}$.

La ubicación de E_p respecto de $E^{0'}$ depende de la fuerza con la que estén adsorbidas a la superficie las especies O y R . Si O se adsorbe con más fuerza que R , $b_O > b_R$ y el voltamperograma se desplaza hacia potenciales negativos respecto del $E^{0'}$. Si, de forma contraria, R se encuentra adsorbida con mayor fuerza, $b_O < b_R$ y la curva se corre a potenciales más positivos que $E^{0'}$. Finalmente, para $b_O = b_R$ se tiene $E_p = E^{0'}$.

La carga requerida para oxidar por completo la capa adsorbida (equivalente al área que encierra la rama anódica) es independiente de la velocidad de barrido e igual, por simetría, a la carga necesaria para reducir todo el material de la superficie del electrodo, $q_a = q_c$.

Teniendo en cuenta que el eje de potencial se transforma en un eje de tiempo al considerar la velocidad de barrido, la carga total intercambiada puede ser determinada mediante la integración de la corriente en función del tiempo. Con este valor y a partir de la Ley de Faraday de la electrólisis, se puede hallar la cantidad de moles de la sustancia electroactiva depositada (m):

$$m = \frac{Q}{nF} \quad (5)$$

Para reacciones *irreversibles*, el pico de ida no es simétrico y no se observa pico para el proceso inverso. Si el sistema fuera *cuasirreversible*, existe un pico de ida y otro de vuelta en el voltamperograma, pero éstos no son simétricos y no coinciden los potenciales de pico.

Las expresiones para los parámetros de pico dentro de sistemas cuasirreversibles son:

$$i_p = \frac{\alpha F^2 A v \Gamma_0^*}{2.718 RT} \quad (6)$$

$$E_p = E^{0'} - 2.303 \frac{RT}{\alpha F} \log \frac{\alpha F v}{RT k^0} \quad (7)$$

donde α es el coeficiente de transferencia y k° es la constante de velocidad estándar. A partir de estas ecuaciones se observa la dependencia lineal de i_p con v , además de que ahora E_p presenta una relación directamente proporcional con el $\log v$.

2.2 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis)

La espectroscopía UV-vis es una técnica en la que una solución absorbe radiación electromagnética comprendida entre 160 y 780 nm. Ésta se basa en la medida de la transmitancia (T) o de la absorbancia (A) de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes, con una longitud del camino óptico (b) igual a 1 cm.

El haz de luz incidente se encuentra atenuado por las reflexiones ocurridas en las interfases aire/pared y pared/disolución en la cubeta, también por la dispersión ocasionada por moléculas grandes que puedan estar presentes en la solución de medida y, en algunos casos por la absorción de las paredes del recipiente. De manera de compensar estos efectos se compara la potencia del haz transmitido por el analito a estudiar (disolución), con la potencia transmitida por el solvente. A partir de las siguientes ecuaciones se obtienen las absorbancias y transmitancias experimentales más próximas a los resultados verdaderos:¹¹

$$T = \frac{P_{\text{disolución}}}{P_{\text{disolvente}}} = \frac{P}{P_0} \quad (8)$$

$$A = \log \left(\frac{P_{\text{disolvente}}}{P_{\text{disolución}}} \right) = \log \frac{P_0}{P} \quad (9)$$

Esta técnica tiene como base y fundamento la Ley de Lambert-Beer:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (10)$$

donde ϵ es la absorptividad molar (o coeficiente de extinción molar), b es el camino óptico recorrido y c es la concentración del analito. A partir de ésta se observa una dependencia lineal de la absorbancia con la concentración.

La Ley de Lambert-Beer describe el comportamiento de absorción para un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas, siendo una de sus limitaciones. A concentraciones altas (>0.1 M) la distancia media entre las moléculas disminuye hasta el punto de que cada molécula distorsiona la distribución de cargas de las moléculas vecinas. Este efecto también se observa en medios que poseen una concentración muy alta de electrolitos, donde la proximidad de los iones a la especie absorbente es muy estrecha y altera su absorptividad molar por interacciones electrostáticas.

Debido a la dependencia de ϵ con el índice de refracción surgen desviaciones de la Ley de Lambert-Beer al variar éste con la concentración. Como consecuencia se puede hacer una corrección a través de la sustitución de ϵ por $\epsilon n / (n^2 + 2)^2$; sin embargo esta corrección nunca es muy grande y raramente significativa para concentraciones menores a 0.01 M.

2.3 Resonancia de plasmón superficial (SPR)

Cuando un haz de luz atraviesa una interfase entre dos medios con índices de refracción diferentes, ocurre una serie de fenómenos entre los que se encuentran la reflexión, la absorción y la refracción. Ésta última involucra un cambio en la dirección y velocidad de la onda al atravesar el nuevo medio, y se explica mediante la ley de Snell esquematizada en la **Figura 2.3.1**.

Si el rayo incidente atraviesa un medio con índice de refracción mayor al medio en el que se propaga ($n_1 < n_2$), entonces el rayo refractado se desviará acercándose a la normal. De lo contrario, si el rayo incidente se dirige desde un medio con índice de refracción mayor hacia uno de menor índice ($n_1 > n_2$), el rayo refractado se desviará alejándose de la normal. Para este último caso existe un ángulo de incidencia crítico, θ_c , en el cual se produce el fenómeno conocido como reflexión total interna, donde el haz refractado forma un ángulo de 90° con la normal. Para ángulos de incidencia mayores a θ_c el rayo se refleja por completo en la frontera de ambos medios. El θ_c es pequeño cuando n_1 es considerablemente mayor a n_2 . Además, θ_c es el máximo ángulo al cual es posible observar el fenómeno de refracción ($\sin \theta_c = 1$) y se denomina también θ_{TIR} (TIR: reflexión total interna).

En la condición de reflexión total interna se generan ondas evanescentes que se propagan a través del medio con índice de refracción n_2 . La amplitud de ese campo evanescente decae exponencialmente con la distancia a la interfase (**Figura 2.3.2**).

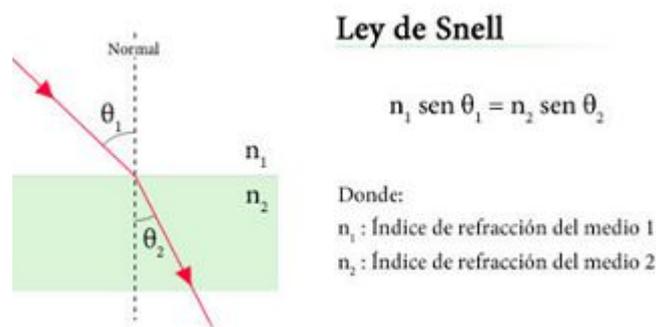


Figura 2.3.1. Ley de refracción de Snell. Figura tomada de artículo de internet.¹²

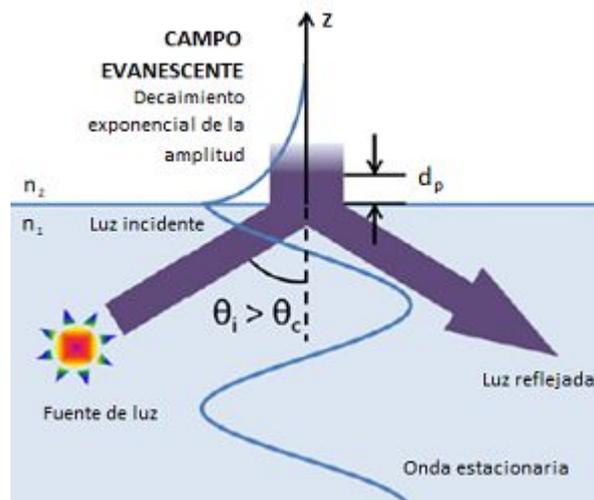


Figura 2.3.2. Representación de la formación de la onda evanescente bajo la condición de reflexión total interna. Imagen tomada de Tesina de Licenciatura en Química de Gregorio Laucirica.¹³

En el equipo empleado para las determinaciones, SPR Navi 210A de la marca BioNavis, se utilizó la configuración Kretschmann, la cual consiste en colocar un sustrato con una delgada lámina metálica (por lo general plata u oro) en el límite entre dos medios dieléctricos: por un lado el prisma y, del otro lado, aire o una solución de medida (como se ilustra en la **Figura 2.3.3**). Sobre el sustrato se coloca una celda de medida, a través de la cual se pueden inyectar distintas soluciones de interés.

La onda evanescente producida induce la generación de un “gas de electrones” en la superficie del metal denominado comúnmente como plasmón superficial (SP), el cual se puede interpretar como una onda electromagnética ligada a la interfase.

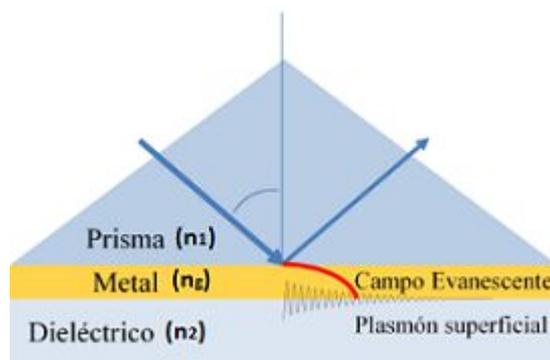


Figura 2.3.3. Representación de la configuración Kretschmann utilizada en el equipo de SPR. Imagen tomada del Tesis doctoral de Sonia Herranz de Andrés.¹⁴

Normalmente, la intensidad de la luz reflejada (reflectancia) no debería cambiar con el ángulo incidente por encima de la condición de TIR. Sin embargo, en ciertas condiciones, las ondas evanescentes excitan los plasmones de la película de oro, causando la resonancia del

plasmón superficial. Como consecuencia, en este punto la intensidad de la luz reflejada disminuye bruscamente.¹³

El ángulo de resonancia del plasmón (θ_{SPR}) se puede definir como aquel donde se produce un mínimo de reflectancia producto de la excitación plasmónica y, bajo esta configuración, se le atribuye la siguiente expresión:¹⁵

$$\theta_{SPR} = \text{sen}^{-1} \left(\frac{1}{n_1} \sqrt{\frac{n_2^2 n_g^2}{n_2^2 + n_g^2}} \right) \quad (11)$$

donde se observa que el ángulo al cual se da la excitación depende únicamente de n_2 cuando se mantienen fijos n_1 y n_g .

Debido a que el fenómeno de plasmón superficial ocurre en la interfase dieléctrico- metal, es posible obtener información sobre la muestra de interés.

Esta técnica es generalmente utilizada para el estudio de adsorciones y desorciones sobre la superficie de oro, ya que éstas generan una fluctuación en el ángulo de resonancia del plasmón que es identificado por el detector. También es empleada en el estudio de biosensores ya que el θ_{SPR} es especialmente sensible a la constante dieléctrica del medio n_2 .

El equipo empleado cuenta con dos láseres de diferentes longitudes de onda y además posee dos tipos diferentes de celdas de medida. En este trabajo se utilizó una celda que permite realizar medidas electroquímicas de manera simultánea a las medidas de SPR, la cual consta de un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de platino, donde la lámina de oro del sustrato actúa como electrodo de trabajo. Estos electrodos se conectan a un potencióstato.

Si bien se pueden obtener distintos gráficos durante la medida, los que brindan información de relevancia sobre el comportamiento en la superficie del electrodo en contacto con la solución de interés son los gráficos de los ángulos TIR y θ_{SPR} (o *PeakMin Angle*) en función del tiempo, denominados sensograma.

El ángulo TIR refleja los cambios en el índice de la refracción de la solución que está pasando por la celda y, por lo tanto, permite conocer exactamente el momento en que la solución de interés comenzó a pasar. El ángulo *PeakMin* refleja el corrimiento del plasmón. Si bien depende del índice de refracción de la solución, es más sensible a los cambios que se dan en la interfase y permite seguir la adsorción y desorción de distintos compuestos.

2.4 Potencial zeta

Una partícula cargada en una solución de electrolito se rodea de contraiones, generando una variación en la densidad de iones cerca de la interfase, con un perfil determinado. Si se pudieran separar las dos fases, ambas contendrían una carga igual pero de distinto signo. A estas dos porciones cargadas de la región interfacial se las denomina *doble capa eléctrica*.

Existen numerosos modelos que buscan explicar la estructura y el comportamiento de la doble capa eléctrica, dentro de ellos se encuentran la doble capa de Helmholtz, la de Gouy y Chapman y el modelo de Stern. Éste último presenta un desarrollo apropiado para superficies metálicas en medio acuoso. Su estructura se esquematiza en la **Figura 2.4.1**, en la que se propone la superficie de un metal cargada negativamente (debido a la disolución de cationes o por la aplicación de un potencial) sobre la cual se unen fuertemente algunos aniones junto con moléculas de agua que muestran una orientación preferencial, formando el plano interno de Helmholtz (IHP). A continuación se encuentra una capa de contraiones no específicamente adsorbidos, con su respectiva capa de hidratación, componiendo el plano externo de Helmholtz (OHP). El volumen ubicado entre ambos planos de Helmholtz se denomina capa de Stern. Finalmente se encuentra una capa difusa en la cual la interacción ya no es lo suficientemente fuerte como para producir una adsorción firme.¹⁶

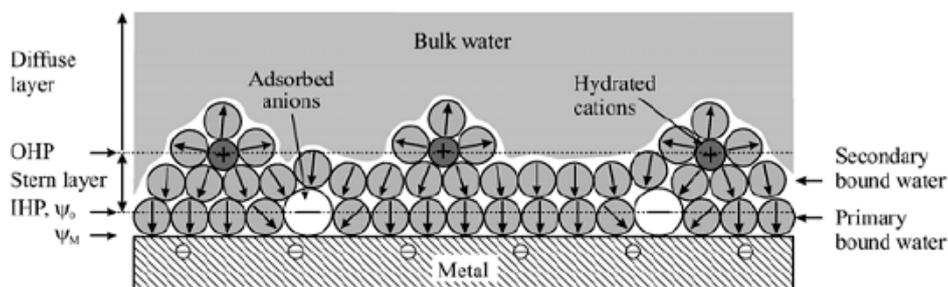


Figura 2.4.1. Modelo de doble capa de Stern para la superficie de un metal en medio acuoso. Imagen tomada del libro "Physics and Chemistry of Interfaces - Hans-Jürgen Butt, Karlheinz Graf, Michael Kappl".¹⁶

Si consideramos que la superficie es una partícula esférica cargada, al aplicar un campo eléctrico en una solución de partículas, éstas experimentarán una serie de efectos definidos colectivamente como efectos electrocinéticos, moviéndose a favor del campo. Los iones que se encuentran a una distancia δ de la superficie (*slippingplane*), se moverán junto con la partícula debido a las fuertes interacciones. Más allá de ese límite, los iones

se moverán de manera independiente. Dicho límite se denomina superficie hidrodinámica de corte. Aunque es difícil conocer con precisión su ubicación, se supone que se encuentra a unos pocos diámetros moleculares de la superficie del coloide. El potencial correspondiente a esta distancia respecto del seno de la solución se lo denomina potencial zeta (ζ), bajo la consideración del modelo teórico de Stern. En la **Figura 2.4.2** se observa el esquema de una partícula en el cual se indican los potenciales en función de la distancia a su superficie.

La medida del potencial zeta es de gran utilidad principalmente para determinar la estabilidad de un sistema coloidal. De esta manera, si las partículas en suspensión poseen un potencial muy negativo o muy positivo, mayor a [30mV], tenderán a repelerse generando un sistema estable con baja probabilidad de floculación.

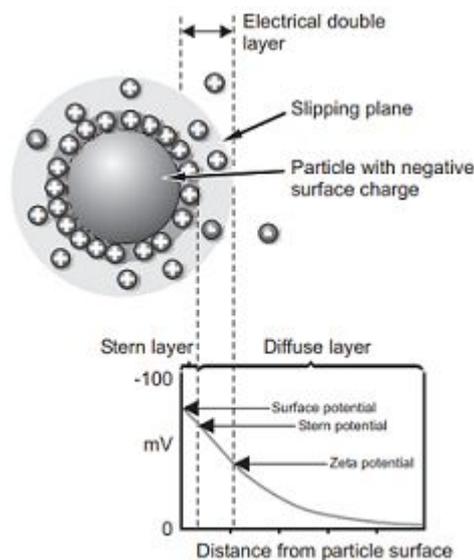


Figura 2.4.2. Potencial eléctrico en función de la distancia a la superficie de la partícula. Imagen tomada de "Zetasizer Nano Series User Manual. Man0317. Issue 1.1. Feb. 2004.".¹⁷

Al aplicar un campo eléctrico a una solución compuesta por partículas esféricas cargadas, estas se moverán con una velocidad V_0 debido a la fuerza eléctrica ejercida por el campo, $F_{\text{eléctrica}}=q.E$, que se igualará, en condiciones estacionarias, a la fuerza viscosa, $F_{\text{viscosa}}=f.V_0$. Considerando la Ley de Stokes para una partícula de radio R_s , su velocidad se expresa como:

$$V_0 = \frac{qE}{6\pi\eta R_s} \quad (12)$$

donde q es la carga de la partícula, E es el campo eléctrico y η la viscosidad del medio.

A partir de esta expresión, y considerando que la carga se puede escribir como $q=ze$, se

puede obtener una ecuación para la movilidad electroforética, U_e , siendo ésta la velocidad de partículas cargadas respecto al líquido en el cual están dispersadas por la aplicación de un campo eléctrico:

$$U_e = \frac{V_0}{E} = \frac{ze}{6\pi\eta R_s} \quad (13)$$

Debido a que las distancias dentro de la doble capa pueden ser consideradas grandes o pequeñas dependiendo de su magnitud relativa a la longitud de Debye, λ_D (κ^{-1}), existen dos modelos que relacionan el potencial zeta (ζ) con la movilidad electroforética (U_e); uno es el de Hückel y el otro el de Smoluchowski.

El modelo de Hückel describe el comportamiento de partículas esféricas en soluciones de electrolitos diluidas donde la longitud de Debye (κ^{-1}) es grande en comparación al radio de curvatura de la partícula. Esta situación corresponde a $\kappa R_s < 0.1$ y sus expresiones para el potencial zeta y la movilidad electroforética son las siguientes:

$$\zeta = \frac{q}{4\pi\epsilon\epsilon_0 R_s} \quad (14)$$

$$U_e = \frac{2\epsilon\epsilon_0\zeta}{3\eta} \quad (15)$$

donde ϵ y ϵ_0 son la permitividad del medio y del vacío, respectivamente. El modelo de Helmholtz-Smoluchowski describe el otro límite, donde κ^{-1} es despreciable respecto al radio de curvatura de la superficie de la partícula en cuestión. Esta situación es típica en soluciones concentradas de electrolito, cuyos iones apantallan intensamente la carga superficial y el potencial cae rápidamente a cero. Esta situación corresponde a $\kappa R_s > 1$ y la expresión para la movilidad es la siguiente:

$$U_e = \frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta} \quad (16)$$

Lamentablemente, la mayoría de los sistemas de interés en ciencia de coloides no se corresponde con ninguno de los dos casos límite. Debido a esto, Henry dedujo una ecuación que responde a la zona de interés y que recupera la forma de las ecuaciones de Hückel y de Helmholtz-Smoluchowski en los límites:

$$U_e = \frac{2\epsilon\epsilon_0\zeta}{3\eta} f(\alpha) \quad (17)$$

donde $f(\alpha)$ es una función polinómica que se introduce al utilizar la expresión de Debye-Hückel y tiene en cuenta los efectos de retardo electroforético. Ésta tiene una expresión para el límite $\alpha = \kappa R_s < 1$ que difiere de la expresión para el otro límite, donde $\kappa R_s > 1$. A fines prácticos, $f(\alpha) \rightarrow 1$ para el límite de Hückel y $f(\alpha) \rightarrow 1.5$ en el límite de Smoluchowski.¹⁸

En este trabajo se utilizó el límite de Smoluchowski ya que esta técnica se empleó para determinar el potencial zeta en condiciones de alta fuerza iónica.

Todas estas expresiones se conocen como ecuaciones de Henry y para deducirlas se supone que la atmosfera iónica no es deformada por el campo externo aplicado y que el potencial es lo suficientemente bajo tal que $e\psi/kT < 1$, donde e es la carga del electrón, ψ el potencial electrostático, k la constante de Boltzmann y T la temperatura del sistema. Es decir, la energía proveniente del movimiento térmico es considerablemente mayor a la energía de interacción electrostática.

2.4.1 Velocimetría Doppler de Láser

La técnica utilizada para medir la movilidad electroforética se denomina Velocimetría Doppler de Láser (LDV). Ésta consiste en la utilización de un láser proveedor de un haz de luz coherente y monocromática que irradia las partículas suspendidas del fluido transparente contenido dentro de la celda (**Figura 2.4.1.1**) de manera de producir un fenómeno de dispersión. La luz dispersada se combina con un haz de referencia, cuya interferencia es colectada por la óptica que lo enfoca en un detector fotodiodo de avalancha (APD). La señal producida es de intensidad fluctuante debido al efecto Doppler que modifica las frecuencias entre la luz incidente y la dispersada, a partir de la cual se puede obtener la movilidad de las partículas que responden al potencial aplicado. De esta forma, la frecuencia de la luz que percibe el detector no solo dependerá de la frecuencia con la que irradia el láser sino también de la velocidad a la que se mueven los objetos dispersores.

La cubeta está formada por un capilar curvo en cuyos extremos se encuentran dos electrodos, los cuales se ponen en contacto con la solución a medir, y a través de los que se aplica un potencial a la solución. El arreglo instrumental del equipo utilizado se muestra en la **Figura 2.4.1.2**.

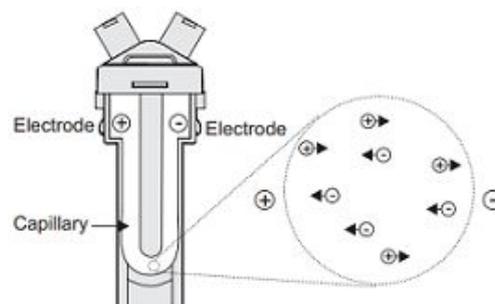


Figura 2.4.1.1. Celda de micro-electroforesis utilizada para medir potencial zeta. Imagen tomada de "Zetasizer Nano Series User Manual. Man0317. Issue 1.1. Feb. 2004".¹⁷

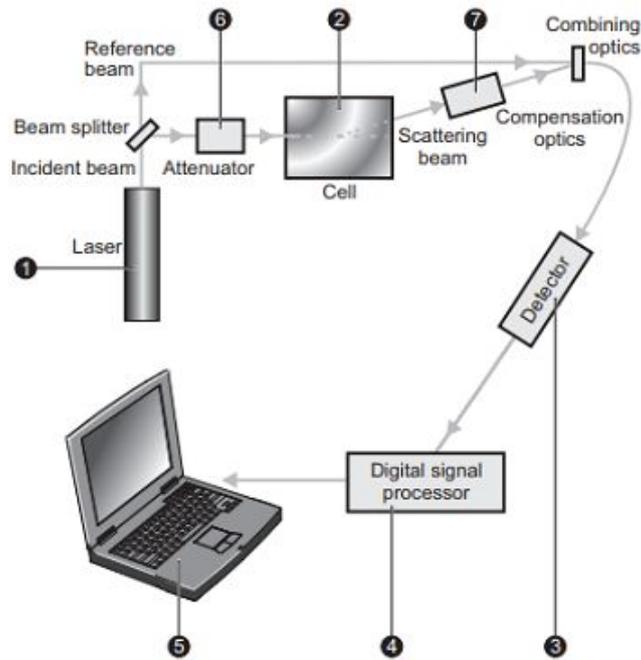


Figura 2.4.1.2. Esquema representativo del equipo Zetasizer Nano ZS. Imagen tomada de "Zetasizer Nano Series User Manual Man0317. Issue 1.1. Feb. 2004".¹⁷

2.5 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La distribución del tamaño de partícula es una propiedad fundamental para caracterizar sistemas de partículas en suspensión.¹⁹

Existen diversos equipamientos para medir el tamaño de partícula de una muestra. En el presente trabajo se utilizará la técnica de dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS). Ésta permite caracterizar sistemas coloidales en un rango aproximado de entre 1 nm y 5 μm , además de ser una técnica no invasiva. A diferencia de la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas la dispersión de luz dinámica no tiene en cuenta la dependencia con el ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo. Los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada.²⁰

Al hacer incidir un haz de luz láser polarizada sobre un sistema de partículas en suspensión se formará un patrón de *scattering* cuyas características dependerán del tamaño de partícula y de la relación entre este último parámetro y la longitud de onda incidente (λ). Se pueden distinguir tres tipos de patrones:

- Rayleigh: describe un patrón de dispersión similar en todas las direcciones, es decir isotrópico, y se obtiene para partículas menores a 50 nm.

- Mie: describe un patrón anisotrópico, se obtiene para partículas de tamaño intermedio, entre 50 y 500 nm.
- Fraunhofer: se caracteriza por una fuerte dispersión hacia adelante y débil hacia atrás. Se observa para partículas mayores a 1 μm .

En este trabajo se utilizó la técnica DLS para determinar la distribución de tamaño partículas en la escala nanométrica, donde solo se registran patrones de dispersión del tipo Rayleigh y Mie.

Las partículas suspendidas en un líquido poseen un mínimo de energía cinética que les permite desplazarse, producto de colisiones aleatorias con otras partículas del solvente que las rodea; este comportamiento se denomina movimiento Browniano. Las partículas de mayor tamaño tenderán a moverse más lentamente que las de menor tamaño. Dicha circunstancia se ve plasmada en la ecuación de Stokes-Einstein para partículas esféricas de radio R_s y coeficiente de difusión traslacional D :²¹

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_s} \quad (18)$$

donde k es la constante de Boltzmann, η la viscosidad del medio dispersante y T la temperatura del sistema.

El movimiento Browniano de las partículas en suspensión origina fluctuaciones temporales en la intensidad de la luz dispersada que son inversamente proporcionales al coeficiente de difusión traslacional de las partículas en ese medio. La fluctuación es mayor para partículas pequeñas que se mueven rápidamente, como se puede observar en la **Figura 2.5.1**, a diferencia de partículas grandes cuyos movimientos son más lentos.

La técnica de DLS consiste en determinar las fluctuaciones temporales de la luz dispersada y, a través de la ecuación de Stokes-Einstein, encontrar una distribución de tamaño de partícula representativa de toda la muestra.

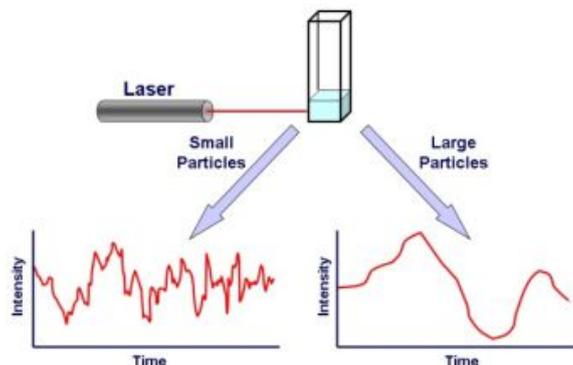


Figura 2.5.1. Fluctuación de la intensidad de la luz dispersada a lo largo del tiempo para partículas grandes y pequeñas. Imagen tomada de página de internet.²²

Estas fluctuaciones son detectadas mediante una función de correlación, la cual presenta un decaimiento exponencial. Ésta compara la intensidad de la señal a un tiempo τ y lo correlaciona con la intensidad a un tiempo $\tau+\Delta\tau$, donde el $\Delta\tau$ es del orden de los nanosegundos y la correlación perfecta es 1, así como el resultado de la no correlación se identifica con el 0. Un esquema de esta función para los dos extremos de partículas grandes y pequeñas se puede observar en la **Figura 2.5.2**.

El arreglo instrumental del equipo utilizado en este trabajo se muestra en la **Figura 2.5.3**.

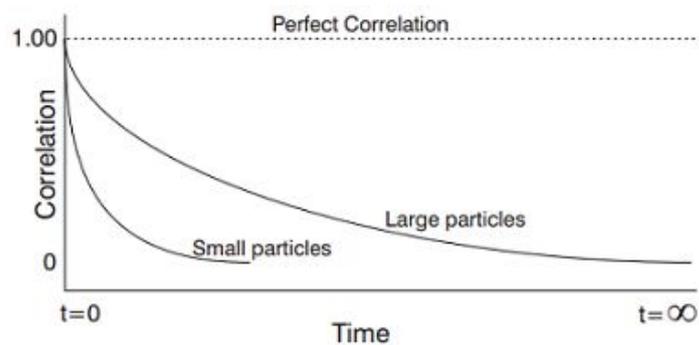


Figura 2.5.2. Dependencia de la función de correlación con el tamaño de partícula. Gráfico tomado de "Zetasizer Nano Series User Manual. Man0317. Issue 1.1. Feb. 2004".¹⁷

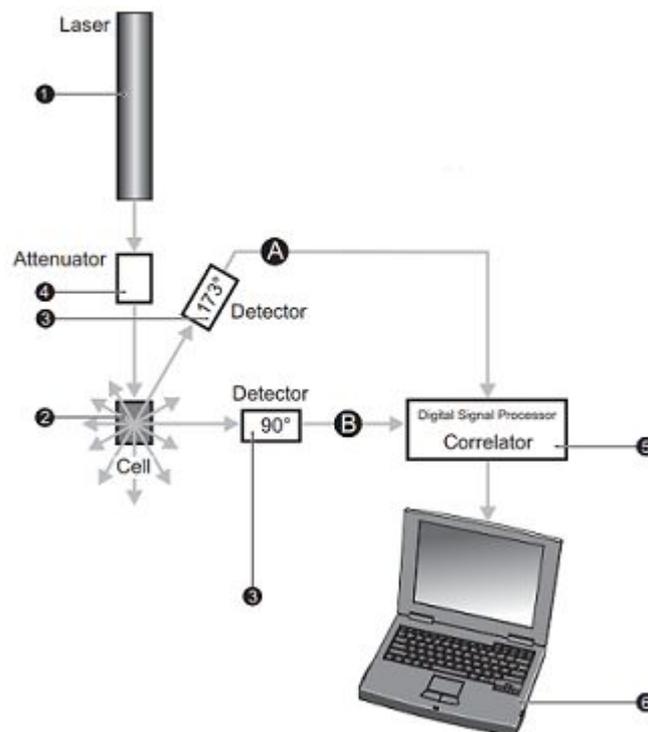


Figura 2.5.3. Esquema de los módulos que se utilizan para medir el tamaño de partícula. Diagrama tomado de "Zetasizer Nano Series User Manual. Man0317. Issue 1.1. Feb. 2004".¹⁷

2.6 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, conocida como XPS por su sigla en inglés, es una técnica analítica, principalmente de superficie, que se basa en el efecto fotoeléctrico. Permite la caracterización química de superficies de materiales con una profundidad máxima de análisis de hasta 10 nm, proporcionando información acerca de la distribución y población de los niveles de energía electrónicos con lo que es posible determinar qué elementos se encuentran en la muestra, qué estados químicos presentan y en qué cantidades están presentes.

Esta técnica consiste en irradiar un material determinado con fotones de energía $h\nu$, los cuales interactúan con electrones ubicados en niveles de energía determinados, correspondientes a los átomos que constituyen la muestra de estudio. Si la energía del fotón es mayor que la energía de enlace E_B (*Binding Energy*, BE) del electrón en la especie química analizada, se produce la emisión de un fotoelectrón con una energía cinética E_k .

La relación entre la energía de los fotones irradiados y la energía cinética de los fotoelectrones es la siguiente:

$$E_k = h\nu - E_B - \Phi \quad (19)$$

donde ϕ es la función trabajo. Esta ecuación permite interpretar el proceso de fotoemisión como un proceso elástico.

Esta técnica se realiza en condiciones de alto vacío, normalmente mayor a 10^{-7} Pa.²³ Los fotoelectrones emitidos pertenecen a niveles electrónicos cercanos al núcleo debido a la exposición de la muestra a radiación de rayos X.²⁴ Dependiendo del nivel electrónico involucrado en la emisión variará la energía de enlace. De esta manera cuanto más interno sea el electrón emitido, mayor será la energía de enlace, por lo que la energía del fotón incidente deberá ser más elevada.

Una vez que el fotoelectrón es emitido, el hueco generado se ocupa por la transición de un electrón de un nivel más externo, donde la diferencia de energía entre los estados de dicha transición es o bien emitida como un fotón o bien utilizada para emitir un segundo electrón denominado electrón Auger o secundario (**Figura 2.6.1**).

Por otra parte, los espectros de XPS están formados por una serie de picos, sobre un *background* (o fondo), producido por los choques inelásticos de los electrones que pierden la mayor parte de su energía antes de abandonar la muestra. La energía de los rayos X utilizados limita los niveles electrónicos de cada elemento que pueden sufrir fotoionización, por lo que

solo fotoemiten los niveles con mayor sección eficaz de absorción de los fotones incidentes. Para cada elemento químico se observa siempre un conjunto de picos a unas energías características que permiten identificarlo claramente, utilizando habitualmente el pico fotoelectrónico más intenso o pico principal, para realizar el análisis cuantitativo y de estado químico. Además de este tipo de picos, pueden aparecer otros debidos a diferentes procesos haciendo que el espectro XPS y, por tanto su análisis, sean en ocasiones complejos.²⁵

La capacidad de la técnica para distinguir entre estados químicos de un mismo elemento y su sensibilidad superficial (primeras capas atómicas de un sólido) han hecho que sea una técnica muy empleada en el área de química de superficies. A pesar de ser reconocida como una técnica no destructiva, en el caso de materia blanda puede observarse daño por radiación si el tiempo de análisis es prolongado.

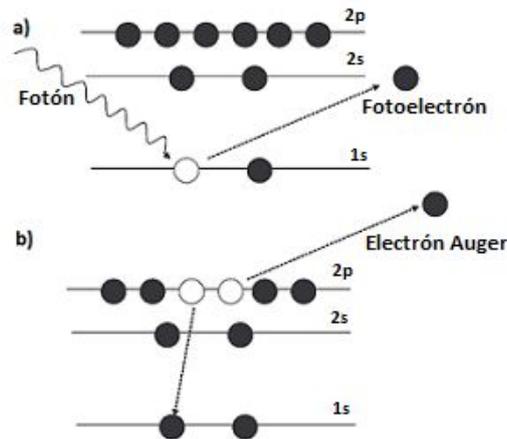


Figura 2.6.1. a) Esquema del efecto fotoeléctrico en un átomo cuando $h\nu \gg E_B$ que crea un hueco en el nivel electrónico. b) Fenómeno Auger en un átomo. Esquema tomado del trabajo "Caracterización química de nanosuperficies. Introducción a la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)".²⁶

3. Materiales y equipamiento

3.1 Sustancias y materiales utilizados

- ✓ KCl (Anedra).
- ✓ Soluciones HCl y NaOH para llevar a pH.
- ✓ Polietilenimina (PEI) para modificar sustratos de vidrio (Sigma-Aldrich).
- ✓ Buffer HEPES (Sigma-Aldrich).
- ✓ Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) (Cicarelli).
- ✓ GOx, enzima utilizada para la construcción de ensamblados (Calzyme).
- ✓ Dextrosa anhidra (Anedra).
- ✓ OsPAH (sintetizado por la Dra. Lorena Cortez).
- ✓ MPS para modificar los electrodos de oro (Anedra).
- ✓ Metanol anhidro (Dorwil).
- ✓ Citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) utilizado para la síntesis de nanopartículas de Au (Anedra).
- ✓ PAH utilizado en la síntesis del PAH-Fc (Sigma-Aldrich).
- ✓ Borohidruro de sodio, NaBH_4 (Sigma-Aldrich).
- ✓ Ferrocencarboxaldehído (Fc-COH) utilizado como reactivo en la síntesis del PAH-Fc (Sigma-Aldrich).
- ✓ Trietilamina (TEA) (Sintorgan).
- ✓ Ácido cloroáurico (HAuCl_4) como precursor en la síntesis de nanopartículas de oro (Sigma-Aldrich).
- ✓ Alúmina $0.5 \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich).

3.2 Equipamiento

- ✓ Potenciostato

La respuesta electroquímica de los ensamblados construidos en este trabajo se evaluó a través de la técnica de voltamperometría cíclica. Todas las medidas electroquímicas se llevaron a cabo utilizando un potenciostato Reference 600 de la marca Gamry.²⁷ Para estas medidas se utilizó una celda de teflón con un arreglo de 3 electrodos. El área del electrodo de trabajo que se encuentra en contacto con la solución de medida es de 0.15 cm^2 . El potenciostato y la celda se muestran en la **Figura 3.2.1**:



Figura 3.2.1. A la izquierda se presenta una imagen de la celda utilizada con sus respectivos electrodos y conexiones. A la derecha se muestra el potenciostato utilizado. Imagen tomada del "Reference 600 - Operators Manual".²⁷

✓ Espectrómetro ultravioleta-visible (UV-vis)

Con el objetivo de determinar la cantidad de centros de ferroceno presentes en el polímero sintetizado e identificar el crecimiento de una serie de bicapas de ensamblados construidos a través de la técnica LbL mediante absorción, se utilizó un espectrómetro UV-visible Agilent 8453, que se observa en la **Figura 3.2.2**, en el que se midieron las muestras a través de una cubeta de vidrio.²⁸



Figura 3.2.2. Espectrómetro UV-vis Agilent 8453. Imagen tomada del manual del equipo.²⁸

✓ Equipo de resonancia de plasmón superficial (SPR)

Para la medida de SPR se utilizó el equipo SPR Navi 210A de la firma BioNavis (**Figura 3.2.3**).²⁹ Este equipo cuenta con dos fuentes láser. La utilizada en este trabajo fue la de 785

nm. Además, cuenta con la posibilidad de inyectar soluciones de forma manual a través de la celda de medida.

Los sensores de oro utilizados fueron provistos por BioNavis. Para su modificación, fueron inmersos en una solución 20 mM de MPS en 10 mM de H₂SO₄. Posteriormente se los lavó con agua destilada y se los modificó con PAH-Fc dejando que se sequen al aire.



Figura 3.2.3.SPRNavis 210A. Imagen tomada del manual del equipo.²⁹

✓ Zetasizer (Equipo de potencial zeta y DLS)

Las técnicas de DLS y potencial zeta se utilizaron para determinar tamaño y carga de las nanopartículas de oro sintetizadas en este trabajo. El equipo utilizado fue un Zetasizer Nano ZS 3600 de la firma Malvern, que se observa en la **Figura 3.2.4.**¹⁷

Este equipo posee una fuente láser de 633 nm y un ángulo de medida de 17°. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C.



Figura 3.2.4. Equipo utilizado en la determinación de potencial zeta y DLS. Imagen tomada del manual del equipo.¹⁷

La celda utilizada para la medida de potencial zeta fue una celda DTS1060 (**Figura 3.2.5**) la cual consta de un volumen mínimo de 0.75 ml, a la que se le aplicó un voltaje de celda de 30 V entre sus electrodos de manera de llevar a cabo la determinación. Para las medidas de tamaño de partícula se utilizó una celda DTS0012 como la que se muestra en la **Figura 3.2.5**.



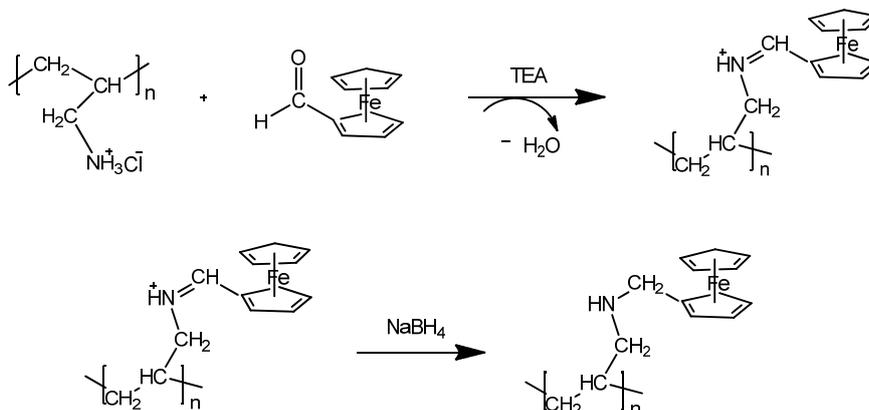
Figura 3.2.5. A la izquierda se observa la celda DTS1060 utilizada en la determinación de potencial zeta, con solución de nanopartículas de Au. A la derecha se encuentra la celda DTS0012 utilizada en la medida de tamaño de partícula. Imagen tomada de "Zetasizer Nano Series User Manual. Man0317. Issue 1.1. Feb. 2004".¹⁷

✓ Equipo de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Las determinaciones fueron realizadas por personal técnico de un laboratorio colaborador en el instituto BiomaGune (España). Estas medidas fueron realizadas utilizando un equipo SPECS SAGE HR 100. Se utilizó una fuente de rayos X de Mg K α (1253.6 eV), a 12.5 kV y 10 mA. Los espectros se hicieron a 30 y 15 eV. El ángulo "take off" fue de 90° y operado a una presión de 8.10⁻⁸ mBar.

4. Síntesis del polímero PAH-Fc

A fin de crear distintas configuraciones de ensamblados electroactivos, se sintetizó un polímero con centros rédox, según las siguientes reacciones:



Para ello se colocaron 200 ml de metanol anhidro y 150 mg de PAH en un balón de 500 ml con un buzo magnético. Se le agregaron 2.6 ml de trietilamina (TEA) y se dejó agitando hasta su disolución. La TEA es una amina terciaria que se agrega para desprotonar las aminas del polímero, de manera de activar la PAH para la siguiente reacción.

Seguidamente se realizaron dos agregados más de 50 mg de PAH disueltos en metanol y se dejó agitando durante tres horas.

En paralelo, se colocó un balón de 100 ml sobre un agitador al que se le agregaron 50 ml de metanol anhidro y 80 mg de ferrocencarboxaldehído (Fc-COH), bajo agitación magnética.

Transcurridas las tres horas de agitación, se transfirió la solución Fc-COH/Metanol a una ampolla de compensación de 100 ml y se goteó sobre la solución de PAH/metanol lentamente (aproximadamente 1 gota por segundo) bajo agitación, como se ilustra en la **Figura 4.1**, de manera de obtener la base de Schiff correspondiente. Este sistema se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente.

Al cabo de 24 horas, se colocó el balón sobre un baño de hielo y luego de unos minutos se adicionaron 400 mg de NaBH_4 , como agente reductor, de a



Figura 4.1. Síntesis de Fc-PAH. Fc-COH en ampolla de compensación y PAH + TEA en balón.

pequeñas porciones dejando en baño de hielo *overnight*. En este paso se observó un pequeño burbujeo luego de cada agregado.

Luego de 24 horas, una vez obtenida la solución del polímero deseada, se procedió a eliminar el solvente en un rotavapor, aplicando una presión de 35 mBar y utilizando un baño de agua destilada a 30°C.

Finalmente, se obtuvo un producto sólido que se redisolvió en una solución de 100 ml de agua destilada y 3 ml de ácido clorhídrico (HCl) 1M. El pH de esta solución de polímero arrojó un valor entre 5 y 5.5.

4.1 Purificación por diálisis

En la solución obtenida como producto de la síntesis se encuentran, además del polímero deseado, trazas de reactivos que no reaccionaron y también restos de reactivos colocados en exceso. Por este motivo se procedió a realizar una purificación del producto mediante diálisis.

Para ello, se utilizaron tres tubos de membrana de celulosa de tamaño de poro de 14 kDa y 20 cm de longitud, los cuales fueron lavados exhaustivamente con agua corriente y luego con agua destilada, de manera de retirar de su superficie la capa de glicerina que actúa como humectante. Además, se los dejó en agua destilada a 80°C por 1 h para lograr la hidratación adecuada, y finalmente se volvieron a enjuagar con agua destilada.

Una vez acondicionadas las membranas se vertió dentro de ellas aproximadamente 35 ml de solución del polímero sintetizado. Seguidamente se las sumergió en agua destilada con agitación durante 5 días, renovando el agua día a día. Trascurrido este tiempo se observó un precipitado dentro de las tres membranas, atribuido al exceso de Fc-COH. Por lo tanto, se procedió a centrifugar estas soluciones en tubos Falcon, a 7000 RPM durante 35 minutos, recolectando el sobrenadante y descartando el pellet del fondo del tubo. El volumen final de solución obtenida fue de 108 ml, y su pH de 5.5.

Esta solución de polímero fue la que se utilizó a lo largo de este trabajo. De manera de determinar su concentración en la solución producto de la síntesis, se tomó un mililitro de solución y se colocó en una estufa hasta secado completo. Al cabo de algunas horas se pesó la capsula y por diferencia de pesada se determinó el peso correspondiente a los sólidos presentes en el mililitro de solución, obteniendo como resultado una concentración gravimétrica de 2.3 mg ml⁻¹.

5. Caracterización del polímero PAH-Fc

A fin de obtener mayor información sobre el polímero sintetizado se procedió a caracterizarlo. Por un lado, se determinó el contenido total de hierro, con la finalidad de especificar el grado de modificación del PAH-Fc sintetizado. También se realizaron estudios electroquímicos utilizando la técnica de voltamperometría cíclica.

5.1 Determinación del grado de modificación

Una forma de determinar la cantidad de residuos de PAH que reaccionaron con Fc-COH formando enlaces covalentes para dar origen al polímero electroactivo PAH-Fc, es determinar la proporción de hierro (Fe) y nitrógeno (N) presente en el polímero, mediante espectrofotometría UV-visible.

Con este propósito, se prepararon soluciones de Fc-COH de distintas concentraciones en una mezcla 3:1 metanol:agua, a las que se les midió la absorbancia a 440 nm, longitud de onda aproximada a la cual absorbe el hierro en el entorno del ferroceno.³⁰ De esta manera se realizó una curva de calibración, graficando la absorbancia medida en función de las correspondientes concentraciones (**Figura 5.1.1**), a partir de la cual se determinó el valor del coeficiente de extinción molar, ϵ , utilizando la Ley de Lambert-Beer. Esta Ley expresa una relación lineal entre la absorbancia medida y la concentración de la muestra (Ecuación 10). El valor del coeficiente de extinción molar se obtuvo a partir de la pendiente de la gráfica de la **Figura 5.1.1**, arrojando un valor de $\epsilon=611.15$ L/cm mol.

Por otro lado, se realizaron diluciones a partir de la solución de PAH-Fc obtenida en la síntesis, en una mezcla 3:1 metanol:agua, y se determinó su correspondiente absorbancia a 440 nm, corroborando un comportamiento lineal a medida que se incrementa la concentración del polímero en la solución de medida.

A partir de los correspondientes valores de absorbancia determinados, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y utilizando el valor de ϵ hallado anteriormente, se utilizó la Ley de Lambert-Beer para hallar la concentración molar de hierro presente en la solución de PAH-Fc sintetizada.

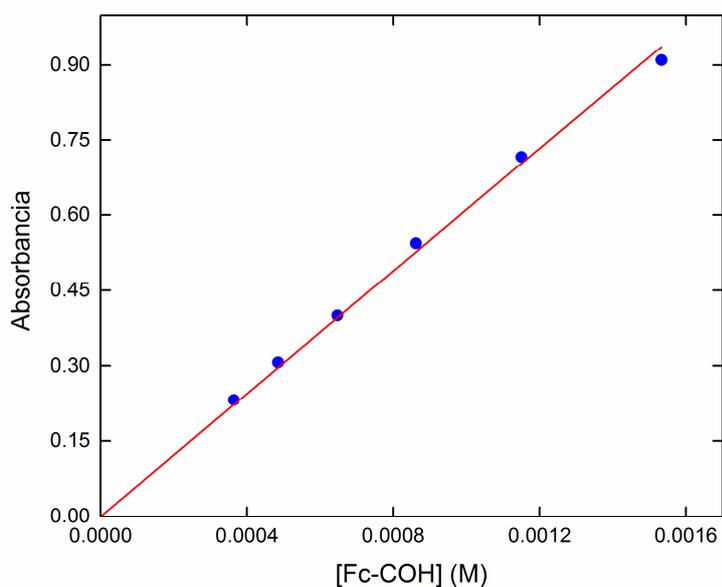


Figura 5.1.1. Absorbancia de soluciones de distintas concentraciones de Fc-COH.

Los resultados de absorbancia para cada una de las diluciones de la solución de PAH-Fc en función de la concentración de Fe calculada se muestran en la **Figura 5.1.2**, donde puede comprobarse que el rango de absorbancias medido corresponde al rango en el que se verificó el cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer.

Teniendo en cuenta estos resultados, y considerando los pesos moleculares de los residuos modificados con ferroceno y sin modificar (**Figura 5.1.3**), se determinó el grado de modificación porcentual de la PAH tal como se expresa en la Ecuación (20). Para ello, se determinó previamente la concentración gravimétrica de la solución de polímero mediante su peso seco, resultando ser de 2.3 mg ml⁻¹.

Teniendo en cuenta que la PAH se encuentra protonada y con su respectivo contraión en solución alrededor de un pH neutro, y que el pH determinado en la síntesis del PAH-Fc fue de 5.5, se asume una configuración protonada para el residuo de PAH sin modificar.

$$\text{Grado de modificación} = \frac{\text{molesFc}}{\text{molesFc} + \text{molesPAH}(\text{sin modificar})} \times 100 \quad (20)$$

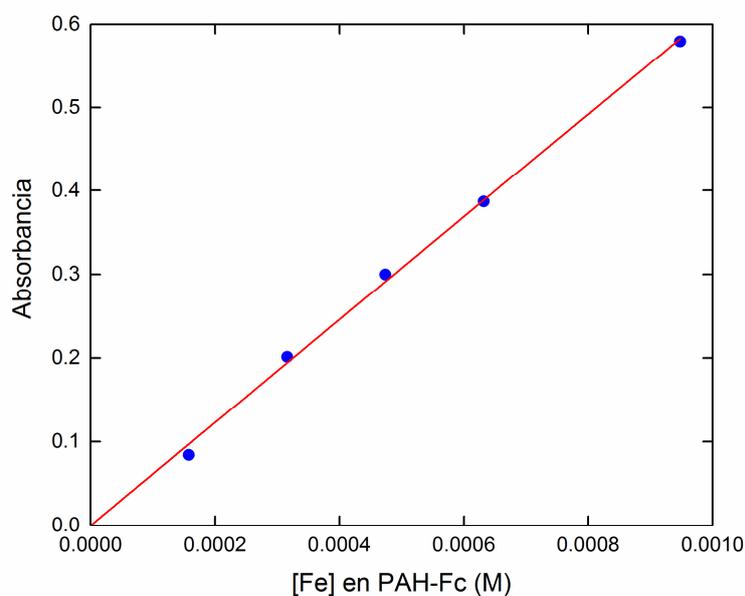


Figura 5.1.2. Absorbancia de Fe a 440 nm para distintas soluciones del polímero PAH-Fc sintetizado en función de la concentración calculada de Fe.

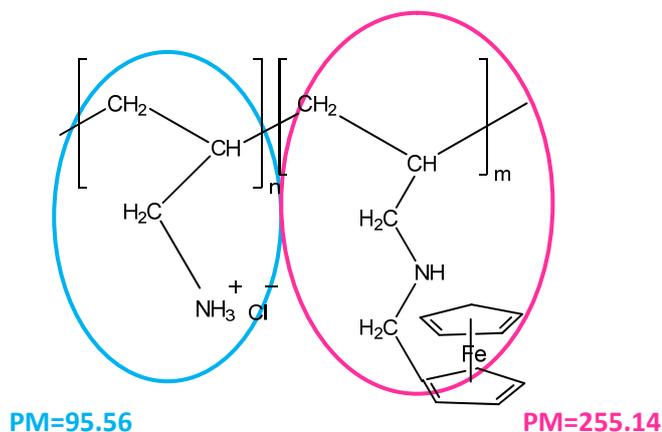


Figura 5.1.3. Distinción de pesos moleculares para los residuos modificados y sin modificar del polímero sintetizado PAH-Fc.

El grado de modificación promedio determinado a partir de los valores para cada una de las soluciones de PAH-Fc a las que se les midió la absorbancia, fue de 21.02 %. Es decir que de cada 100 residuos de PAH, aproximadamente 20 reaccionaron con Fc-COH para formar el polielectrolito con centros rédox deseado.

El porcentaje de modificación alcanzado mediante dicha síntesis fue relativamente alto considerando el impedimento estérico ocasionado por el voluminoso grupo ferroceno.

5.2 Caracterización electroquímica

De manera de estudiar la respuesta electroquímica del PAH-Fc sintetizado, se realizaron varios ensamblados sobre sustratos de oro y grafito.

5.2.1 Formación de ensamblados

Para lograr la adsorción del polímero sobre sustratos de oro, se tuvo en cuenta la capacidad de los tioles para formar monocapas autoensambladas sobre superficies de oro.³¹ En este trabajo se empleó el compuesto MPS (*3-mercaptopropanoico ácido sodio sal*) para funcionalizar los sustratos. Éstos se pusieron en contacto con una solución 20 mM de MPS en 10 mM de H₂SO₄ durante 14 horas aproximadamente. Trascurrido este tiempo, se los lavó tres veces sumergiéndolos en agua destilada y se los dispuso en una placa de Petri donde se procedió a modificarlos con el polímero. Las soluciones de MPS fueron preparadas siempre al momento de su utilización a fin de evitar la oxidación del tiol en el aire.

La interacción MPS/PAH-Fc es de tipo electrostática ya que el MPS, por tener un grupo sulfonato, posee carga negativa en solución, y el PAH-Fc sintetizado se encuentra mayormente protonado a un pH de 5.5. Con la finalidad de encontrar la mejor forma de pegado del PAH-Fc sobre la superficie Au/MPS se evaluaron diferentes condiciones de fuerza iónica. Para ello se colocaron, sobre la superficie de los sustratos, soluciones de PAH-Fc con diferentes concentraciones de KCl: 0, 0.02, 0.05 y 0.1 M (**Figura 5.2.1.1**). Al cabo de 15 minutos, el exceso de estas soluciones fue retirado con pipeta automática para luego dejarlos secar al aire durante algunos minutos.

De esta manera se construyeron ensamblados [Au/MPS/PAH-Fc] variando la fuerza iónica, los cuales fueron evaluados electroquímicamente mediante la técnica de voltamperometría cíclica.

La celda utilizada consta de un arreglo de tres electrodos empleando el sustrato modificado como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como referencia. El electrolito de medida para estas determinaciones fue una solución 5 mM de buffer HEPES preparada a partir de solución 0.1 M de KCl, llevado a pH 7.4. Este buffer no es quelante, regula en pH 7 y no interacciona con proteínas, es por lo que se utiliza frecuentemente en ensayos biológicos.



Figura 5.2.1.1. Modificación de sustratos de Au con PAH-Fc.

Normalmente, al inicio del ciclado se observan señales de corriente voltamperométricas importantes, que van disminuyendo al aumentar la cantidad de ciclos medidos. Considerando esto, se cicló cada electrodo en solución buffer hasta lograr una señal estable a una velocidad de barrido (v) de 200 mV s^{-1} (aproximadamente 100 ciclos), seguidos por 2 ciclos a 10 mV s^{-1} .

Superponiendo los últimos voltamperogramas obtenidos a 200 mV s^{-1} para cada condición de modificación, se puede observar en la **Figura 5.2.1.2** que la condición óptima de fuerza iónica para la cual se obtuvo la mayor corriente de pico fue la de concentración 0.1 M de KCl.

También se preparó una solución de PAH-Fc con una concentración 0.5 M de KCl, la cual a los pocos minutos reveló un precipitado, por lo que no se llevó a cabo la modificación del sustrato.

Una vez determinada la mejor condición de fuerza iónica para la modificación del electrodo, se evaluó el pegado del polímero llevándolo a pH 8. Se compararon los siguientes ensamblados en el buffer de medida:

- ✓ [Au/MPS/PAH-Fc + 0.1 M KCl]
- ✓ [Au/MPS/PAH-Fc + 0.1 M KCl+ pH 8]
- ✓ [Au/MPS/PAH-Fc + pH 8]

En esta ocasión se extendió el tiempo de modificación de los sustratos con PAH-Fc, dejándolos en contacto por 14 horas, de manera de evaluar si la variación de este parámetro tiene influencia en el pegado del polímero. También se los dejó secar al aire por al menos 2 horas para evitar desprendimiento de material durante el ciclado del electrodo.

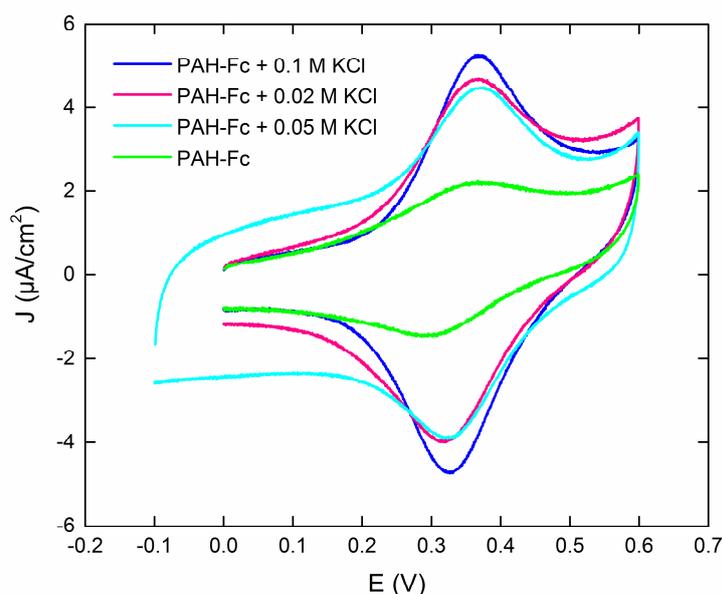


Figura 5.2.1.2. Voltamperogramas del sistema Au/MPS/PAH-Fc en distintas condiciones de fuerza iónica, medido en solución 5 mM de buffer HEPES preparada a partir de solución 0.1 M de KCl, llevado a pH 7.4. $v=200 \text{ mV s}^{-1}$.

Comparando todos los voltamperogramas obtenidos a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} para cada ensamblado (**Figura 5.2.1.3**), se puede observar que la señal de corriente mayor corresponde a la condición de fuerza iónica dada por una concentración de 0.1 M de KCl sin alcalinizar. Ésta fue adoptada para las siguientes modificaciones de sustratos en este trabajo.

Al comparar el voltamperograma correspondiente al ensamblado [Au/MPS/PAH-Fc] en 0.1 M de KCl de las **Figuras 5.2.1.2** y **5.2.1.3**, se puede observar una señal de corriente mayor para el ensamblado que permaneció más tiempo modificándose con PAH-Fc. Por lo que se concluye que el tiempo de modificación en contacto con el polímero es un factor a tener en cuenta. A partir de este análisis, los próximos ensamblados se dejaron modificar por 14 horas.

Además, de manera de evaluar la respuesta electroquímica del polímero en otra superficie, se construyeron ensamblados sobre electrodos de grafito.

En el grafito los átomos de carbono están unidos covalentemente en el mismo plano formando estructuras hexagonales cuyas laminas interactúan principalmente a través de fuerzas de Van Der Waals por medio de orbitales π . Esta estructura le confiere una serie de características dentro de las cuales se encuentra su capacidad como conductor de la corriente y el calor, además de atribuirle una alta rugosidad y porosidad a su superficie. Debido a esto, no es necesario realizar una funcionalización inicial de dichos sustratos para la construcción de

los ensamblados, ya que el polímero queda adsorbido sobre su superficie al ponerlos en contacto.

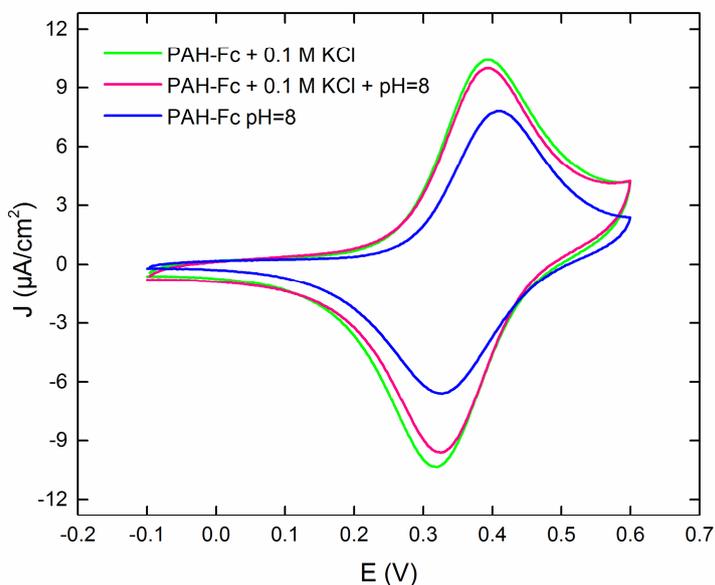


Figura 5.2.1.3. Voltamperogramas del sistema Au/MPS/PAH-Fc formado en condiciones de 0.1 M de KCl, 0.1 M de KCl + pH=8 y pH=8, medidos en solución 5 mM de buffer HEPES en 0.1 M de KCl, pH 7.4. $v=200 \text{ mV s}^{-1}$.

Con la finalidad de evaluar la mejor condición de modificación de estos electrodos con PAH-Fc se construyeron ensamblados en las últimas tres condiciones evaluadas anteriormente (0.1 M de KCl, pH=8 y 0.1 M de KCl + pH=8). Para esto, se pulió la superficie del electrodo de grafito con alúmina de $0.5 \mu\text{m}$ de manera de homogeneizar la superficie y retirar cualquier impureza que pueda interferir tanto en la modificación como en las medidas electroquímicas posteriores. Seguidamente, se colocaron $10 \mu\text{L}$ de solución de polímero en cada condición de modificado, sobre tres electrodos respectivamente, cubriendo uniformemente su superficie y dejando secar al aire. Este procedimiento se repitió 4 veces con la finalidad de lograr un alto grado de modificación.

A cada uno de estos electrodos se los cicló a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} en solución 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl, a pH 7.4, y finalmente se midieron 2 ciclos a 10 mV s^{-1} . Comparando los voltamperogramas obtenidos para cada electrodo a esta última velocidad (**Figura 5.2.1.4**), se puede observar que, al igual que para los electrodos de Au, la mejor condición de modificado es PAH-Fc + 0.1 M de KCl.

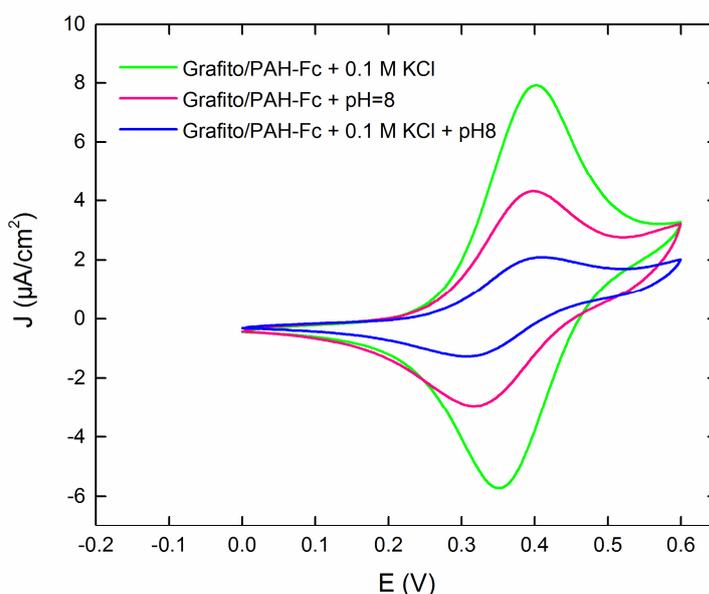


Figura 5.2.1.4. Voltamperogramas del sistema Grafito/PAH-Fc en condiciones de 0.1 M de KCl, pH=8 y 0.1 M de KCl + pH=8, medidos en solución 5 mM de buffer HEPES en 0.1 M de KCl, pH 7.4. $v=10 \text{ mV s}^{-1}$.

5.2.2 Estudio de la velocidad de barrido

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la construcción de ensamblados, se procedió a estudiar el comportamiento del sistema Au/MPS/PAH-Fc frente a la variación de la velocidad de barrido.

Se observa que a bajas velocidades de barrido ($v=10 \text{ mV s}^{-1}$) se obtienen voltamperogramas cuyas características responden a un sistema reversible, tomando la forma de la **Figura 2.1.2** del capítulo 2. Sin embargo, a medida que la velocidad de barrido va aumentando, la velocidad de transferencia de carga se va haciendo más lenta respecto del cambio de potencial, por lo que el voltamperograma comienza a distorsionarse perdiendo su simetría. Éste es el caso de reacciones cuasireversibles, cuyas expresiones para los parámetros de pico se indicaron en las Ecuaciones (6) y (7) del capítulo 2, donde la i_p posee una dependencia lineal con la velocidad de barrido, v , y el E_p depende linealmente con el $\log v$.

Bajo la consideración de reacciones cuasireversibles, se midió una secuencia de voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido, desde 20 hasta 700 mV s^{-1} , cuya respuesta se muestran en la **Figura 5.2.2.1**, donde la flecha indica la dirección de aumento de la velocidad de barrido.

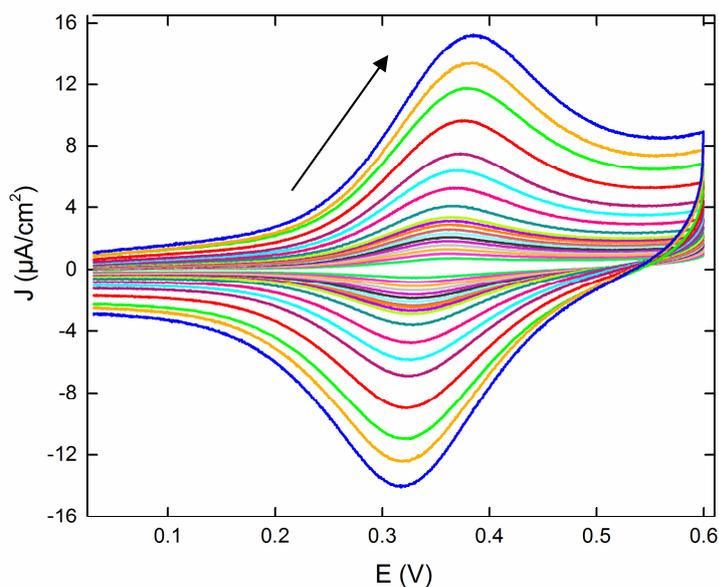


Figura 5.2.2.1. Voltamperogramas del sistema Au/MPS/PAH-Fc medido a distintas velocidades de barrido, desde 20 hasta 700 mV s^{-1} , en solución 5 mM de buffer HEPES en 0.1 M de KCl, pH 7.4. $v=200 \text{ mV s}^{-1}$.

En la **Figura 5.2.2.2** se muestra la dependencia de las corrientes de pico con la velocidad de barrido, donde se evidencia el comportamiento lineal tanto para el pico anódico como para el catódico, siendo las pendientes similares en ambos casos.

También se representaron en un mismo gráfico los valores de E_{pa} , E_{pc} y $E_{p1/2}$ frente al $\log v$ (**Figura 5.2.2.3**), donde los valores de $E_{p1/2}$ fueron determinados como el promedio de ambos potenciales de pico para cada velocidad.

Bajo la condición de reversibilidad, observada a bajas velocidades de barrido en las cuales se identifica la simetría de las ramas anódicas y catódicas de los voltamperogramas, se puede determinar el valor del potencial formal $E^{0'}$ a partir del promedio de los $E_{p1/2}$. De esta manera, se promediaron los valores de $E_{p1/2}$ obtenidos experimentalmente para las velocidades de barrido entre 20 y 300 mV s^{-1} (región lineal representada en la **Figura 5.2.2.3**) obteniendo un valor de $E^{0'} = 346 \text{ mV}$.

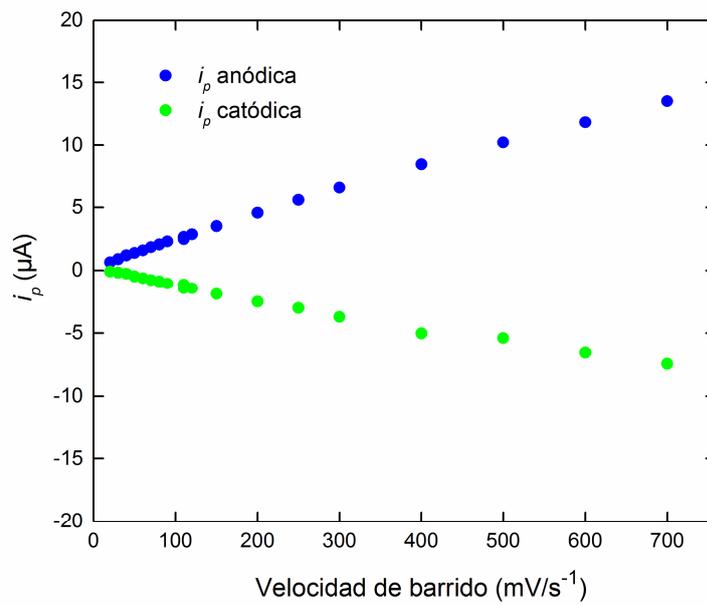


Figura 5.2.2.2. Representación de las corrientes de pico anódicas y catódicas en función de las diferentes velocidades de barrido.

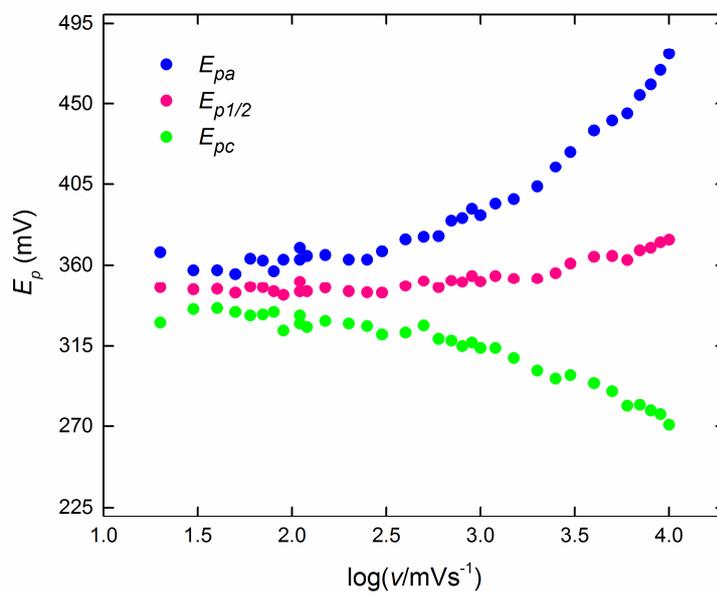


Figura 5.2.2.3. Representación de los valores para E_{pa} , E_{pc} y $E_{p1/2}$ en función del $\log v$.

6. Ensamblados de PAH-Fc y nanopartículas de oro

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de interacción del polímero con otros bloques de construcción y su integración electroquímica en el diseño de materiales de electrodo, se construyeron ensamblados capa a capa utilizando nanopartículas de oro como contraparte negativa. Para esto, previamente se llevó a cabo la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro.

6.1 Síntesis de nanopartículas de oro

Con la finalidad de sintetizar nanopartículas de oro, se empleó un protocolo adaptado de métodos reportados basados principalmente en la reducción de Au con citrato a temperatura de ebullición. Este método es uno de los más utilizados para llevar a cabo dicha síntesis.³²

Para esta síntesis, se colocaron en un balón 100 ml de agua milliQ con 50 μ l de una solución 30% de ácido cloroáurico (HAuCl_4). Seguidamente, el balón, al que se le acopló un refrigerante con reflujo, se puso en contacto con un baño de silicona sobre una platina calefactora, de manera de generar una distribución homogénea de la temperatura. Mientras la solución llegaba a ebullición, se mantuvo una agitación magnética vigorosa. La temperatura alcanzada por el baño para lograr la ebullición de la mezcla fue de 127 °C. En ese momento se agregaron rápidamente con jeringa, a través de un septum de goma directamente al balón, 4 ml de solución 1 % de citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). Se disminuyó la agitación y se dejó en ebullición por 10 minutos. En el transcurso de este tiempo la coloración de la solución viró de amarillo a un violáceo similar al color del vino tinto. Finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente. El valor final de pH de esta solución fue de 6.

6.2 Caracterización de las nanopartículas de oro

En esta síntesis, el tamaño de partícula depende principalmente de la proporción de sus reactivos.³³ Debido a esto la concentración utilizada de citrato fue aproximadamente un orden de magnitud mayor que la correspondiente a HAuCl_4 , obteniendo partículas de tamaño nanométrico. Además, el excedente de citrato les confiere estabilidad en solución. Por otra

parte, la disminución de la temperatura durante la síntesis y la fluctuación del pH son variables que pueden afectar la morfología de las nanopartículas.

Una vez sintetizadas, se procedió a caracterizar las nanopartículas. Para ello se midió la distribución del tamaño de partícula, mediante la técnica de DLS, así como también se determinó su potencial zeta. Para ambas determinaciones se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS 3600 de la firma Malvern, a 25°C.

Para la determinación de tamaño de partícula se colocó la solución de las nanopartículas en una cubeta de vidrio. Como resultado de esta medida se obtuvo una función de distribución que se puede observar en la **Figura 6.2.1**, la cual indica que la mayor cantidad de partículas en la muestra presentan un tamaño alrededor de 15 - 30 nm.

Por otra parte, para la determinación del potencial zeta de las nanopartículas, se colocó solución de éstas en una celda en forma de U, la cual cuenta con dos electrodos metálicos en sus extremos a través de los que se aplicó una diferencia de potencial de 30 V, detectando un patrón de dispersión de luz fluctuante a partir del que se determina la movilidad electroforética de las partículas según el potencial aplicado. Tomando un promedio de cinco medidas sucesivas de potencial zeta realizadas, se obtuvo un valor de potencial de -30.24 mV, lo que nos indica que el sistema es estable con baja probabilidad de floculación.

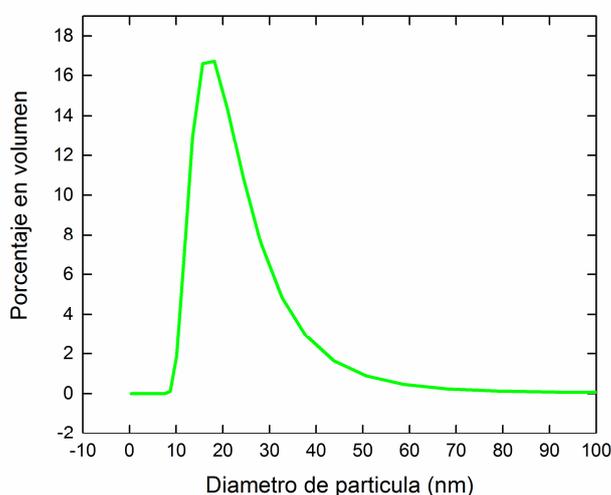


Figura 6.2.1. Función de distribución de tamaño de partículas. Medida a 25 °C.

6.3 Ensamblado LbL y determinaciones electroquímicas

Se construyó una serie de ensamblados moleculares mediante la técnica LbL a partir de PAH-Fc + 0.1 M de KCl y nanopartículas de oro como contraparte negativa, sobre sustratos de Au. De esta forma se buscó incorporar una mayor cantidad de centros rédox y asegurar una

buena conectividad electroquímica en todo el material depositado. El método de autoensamblado capa por capa permite la modificación de electrodos con un control sobre el espesor, la composición interna y la carga superficial de la película. La construcción de estos ensamblados tiene su base en la adsorción electroestática, donde se va invirtiendo la carga superficial a medida que se van formando las distintas capas.

Este ensamblado se construyó dentro de la celda electroquímica de manera de registrar el crecimiento de cada capa mediante la técnica de voltamperometría cíclica. Para ello se funcionalizó un sustrato de Au sumergiéndolo en una solución 20 mM de MPS en 10 mM de H₂SO₄ durante 14 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se lo lavó, sumergiéndolo tres veces en agua destilada, se lo colocó en la celda, y se le realizó un voltamperograma en solución 5 mM de buffer HEPES preparado a partir de solución 0.1 M de KCl llevada a pH 7.4, a fin de corroborar que su superficie se encuentre completamente limpia, de manera de evitar la interferencia de cualquier impureza. Finalmente, se retiró el electrolito de la celda lavando ésta cuidadosamente con agua destilada y se llevó a cabo la construcción del ensamblado. El procedimiento fue el siguiente:

- Se colocó solución de PAH-Fc + 0.1 M de KCl durante 10 minutos.
 - Se retiró la solución, enjuagando la celda con A.D.
 - Se colocó solución de Au-NPs durante 10 minutos.
 - Se retiró la solución enjuagando la celda con A.D.
- } 1 BICAPA

Una vez formada la primera bicapa se procedió a realizar la determinación electroquímica. Para esto se colocó dentro de la celda 1 ml de solución de buffer HEPES utilizada anteriormente, y se realizaron 70 ciclos voltamperométricos a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹ de manera de lograr una estabilización de la señal, seguidos por 2 ciclos a 10mV s⁻¹.

Con la finalidad de generar un ensamblado multicapa [Au/MPS/ (PAH-Fc /Au-NPs)_n] donde n especifica la cantidad de bicapas, se repitió este procedimiento 8 veces.

Al comparar el último ciclo a 200 mV s⁻¹ correspondientes a cada bicapa (**Figura 6.3.1**) se puede observar un crecimiento progresivo de la señal electroquímica a medida que el número de bicapas de material electroactivo depositado sobre el electrodo fue aumentando.

A partir de los voltamperogramas obtenidos se tomaron los valores correspondientes a las corrientes de pico anódicas y catódicas para cada uno, con las cuales se construyó un gráfico de i_p en función del número de bicapas formadas, como se puede ver en la **Figura 6.3.2**.

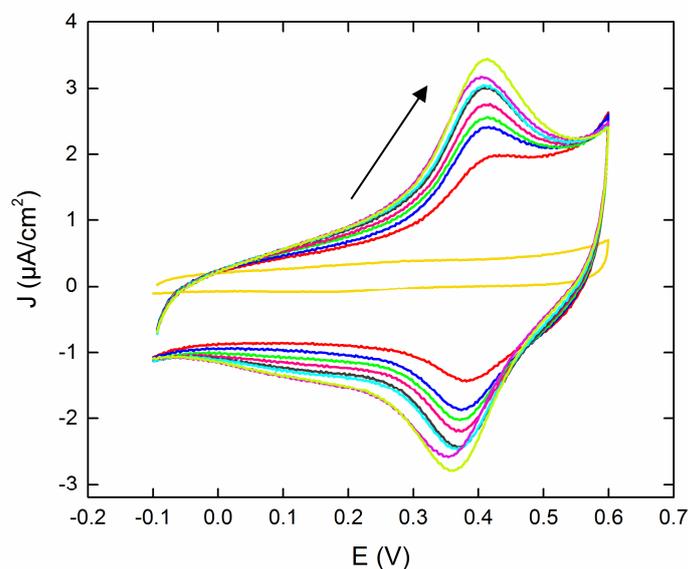


Figura 6.3.1. Voltamperogramas del sistema Au/MPS/ (PAH-Fc/Au-NPs)_n, donde n va desde 1 hasta 8. Medidos en solución 5mM de buffer HEPES en 0.1 M de KCl, pH 7.4. $v=200 \text{ mV s}^{-1}$.

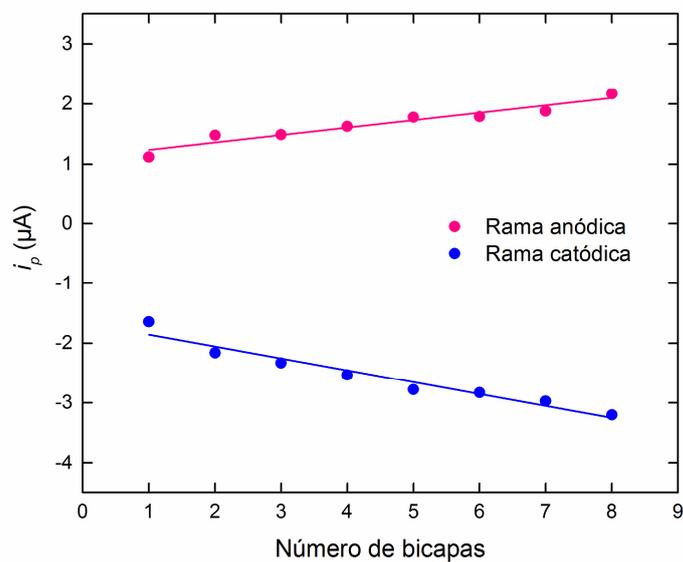


Figura 6.3.2. Representación de las corrientes anódicas (rosa) y catódicas (azul) en función del número de bicapas, para el sistema Au/MPS/ (PAH-Fc/Au-NPs)_n, donde n va desde 1 hasta 8. Medidas realizadas en solución 5 mM de buffer HEPES en 0.1 M de KCl, pH 7.4. $v=200 \text{ mV s}^{-1}$.

6.4 Medidas de UV-visible sobre sustratos de vidrio

Teniendo en cuenta que tanto los centros de Fc como las Au-NPs presentan absorción en el visible, se construyeron ensamblados LbL a partir de PAH-Fc + 0.1 M de KCl y Au-NPs sobre sustratos de vidrio, a fin de seguir el crecimiento mediante espectroscopía UV-Visible.

Para la construcción de estos ensamblados se funcionalizaron varios sustratos de vidrio sumergiéndolos en una solución de polietilenimina (PEI) durante 30 minutos aproximadamente. Este polímero está constituido por aminas primarias y secundarias, además de encontrarse protonado en un rango de pH alrededor de 7. Dichas características le confieren al sustrato funcionalizado la capacidad de unirse a distintas moléculas a través de interacciones electrostáticas, lo que le permite la formación de distintos tipos de ensamblados.

Una vez funcionalizados los sustratos, se sumergieron en agua destilada a fin de retirar el exceso de PEI y se procedió a construir los ensamblados de la siguiente manera:

- Se sumergió el sustrato en una solución de Au-NPs durante 10 minutos.
 - Se retiró la solución, enjuagando la celda con A.D.
 - Se sumergió el sustrato en solución de PAH-Fc + 0.1 M KCl durante 10 minutos.
 - Se retiró la solución enjuagando la celda con A.D.
- } 1 BICAPA

Debido a que los sustratos funcionalizados con PEI tienen una carga superficial positiva, se los puso en contacto inicialmente con solución de Au-NPs que brinda la contraparte negativa y luego con PAH-Fc cargada positivamente.

De esta manera se construyeron ensamblados [vidrio/PEI/ (Au-NPs/PAH-Fc)_n] donde n es la cantidad de bicapas. En nuestro caso, n toma los valores 1, 2, 4, 6, 8 y 10. En la **Figura 6.4.1** se muestran fotografías de los distintos sustratos modificados, donde se puede observar a simple vista la variación de la coloración.

Con la finalidad de evaluar el crecimiento de las distintas bicapas mediante espectroscopía UV-visible, se midieron los espectros de cada uno de los ensamblados (**Figura 6.4.2**).

El espectrómetro UV-visible utilizado para estas determinaciones fue un equipo Agilent 8453.

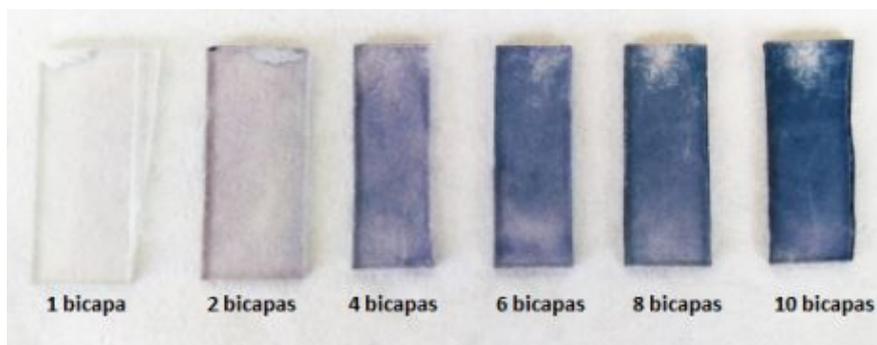


Figura 6.4.1. Ensamblados [vidrio/PEI/ (Au-NPs/PAH-Fc)_n] en los que n toma los valores 1, 2, 4, 6, 8 y 10.

A partir de los espectros de la **Figura 6.4.2** se determinó que la longitud de onda (λ) de máxima absorbancia corresponde a 620 nm. Tomando los valores de absorbancia correspondientes a esta longitud de onda, se graficaron en función del número de bicapas como se muestra en la **Figura 6.4.3**, donde se observa un crecimiento lineal entre la absorbancia del material depositado con el número de bicapas.

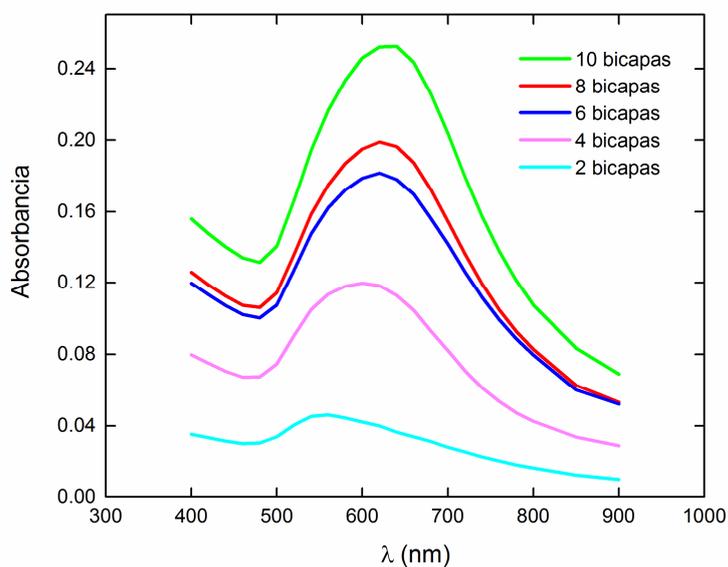


Figura 6.4.2. Espectros UV-visible correspondientes al sistema vidrio/PEI/ (Au-NPs/PAH-Fc)_n, donde n es la cantidad de bicapas, y va desde 2 hasta 10.

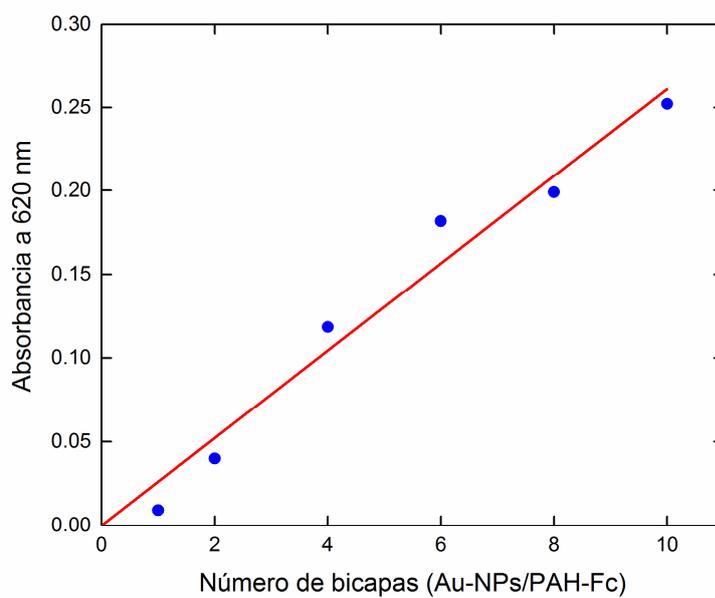


Figura 6.4.3. Absorbancia a la longitud de onda correspondiente al máximo de los espectros UV-visible de los distintos ensamblados ($\lambda=620$ nm) en función del número de bicapas.

7. Ensamblados de PAH-Fc y GOx

El polímero sintetizado, PAH-Fc, puede ser utilizado en diversos estudios dentro del área de electrocatálisis al estar constituido por un polielectrolito con un centro rédox. Una de las aplicaciones más relevantes involucra la incorporación de enzimas en el sistema. Éstas son proteínas especializadas en la catálisis de reacciones biológicas. Un grupo muy importante de enzimas son las denominadas enzimas rédox, las cuales catalizan reacciones de óxido-reducción a través de un mediador. Este último es una especie rédox que toma o cede electrones a la enzima de manera de que ésta regrese a su estado de oxidación original, luego de una reacción de catálisis, permitiéndole reaccionar con una nueva molécula. Un ejemplo de éste grupo es la enzima glucosa oxidasa (GOx).²

La GOx es una enzima dimérica constituida por dos grupos prostéticos flavín adenín dinucleótido (FAD), uno por subunidad, que utiliza para catalizar la reacción de oxidación de glucosa a ácido glucónico según:³⁴



Un grupo prostético es una coenzima que se halla fuertemente ligada a la enzima propiamente dicha; por lo general, de forma no covalente. Las coenzimas están constituidas por moléculas orgánicas que transfieren grupos funcionales o electrones a la reacción enzimática global.

En condiciones naturales la GOx utiliza el oxígeno como mediador o co-sustrato para oxidar la glucosa, generando como productos H₂O₂ y D-glucano-1,5lactona, que se hidroliza dando como producto final ácido glucónico. A pesar de que el oxígeno es el oxidante más efectivo, la enzima es eficaz con otros aceptores de electrones o mediadores que son capaces de comunicar el electrodo con la enzima, como el ferroceno, quinonas, complejos de osmio, etc. El empleo de estos compuestos como co-sustratos permite independizarse de la concentración de oxígeno en las medidas ya que ésta puede fluctuar. Además, este tipo de mediadores poseen potenciales rédox marcadamente menores que el oxígeno, por lo que constituyen un sistema de gran importancia al trabajar con medios biológicos, donde las muestras se pueden deteriorar fácilmente debido a la oxidación de sus componentes por la aplicación de potenciales apreciables.

Teniendo en cuenta este análisis, en este trabajo se utilizó GOx como modelo enzimático rédox para evaluar la capacidad del PAH-Fc como mediador de la transferencia de

carga producida por la oxidación de glucosa en ensamblados construidos mediante la técnica LbL formados por PAH-Fc y GOx. De esta manera, se buscó estudiar la capacidad del polímero sintetizado para “cablear” la enzima al electrodo.

Un esquema representativo de la catálisis llevada a cabo por la enzima GOx utilizando el PAH-Fc como mediador se puede observar en la **Figura 7.1**, donde el grupo prostético de la enzima, FAD, se reduce al reaccionar con la glucosa (el sustrato) obteniendo como productos ácido glucónico y el grupo prostético reducido, FADH₂. Éste último se oxida al transferirle los electrones al compuesto que actúa como mediador, en este caso el PAH-Fc, obteniendo nuevamente como producto, el grupo prostético FAD en la enzima y la especie ferroceno (Fc) como producto de la reducción del ferricenio (Fc⁺). De esta manera, se vuelve a regenerar el grupo prostético FAD en la GOx, que le permite a la enzima reaccionar con una nueva molécula de glucosa, cerrando el ciclo de la catálisis. Además, debido a que el polímero electroactivo se encuentra adsorbido sobre un electrodo de oro, se pueden cuantificar los electrones correspondientes a la reacción de óxido-reducción de la glucosa mediada por la especie rédox presente en el polímero sintetizado (Fc⁺ + e⁻ ↔ Fc), a través de medidas electroquímicas.

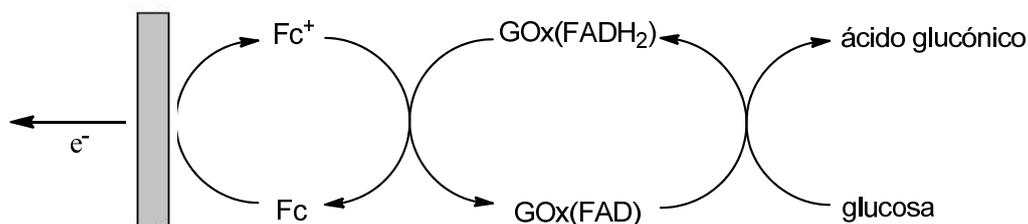


Figura 7.1. Representación esquemática de la reacción de catálisis enzimática de oxidación de la glucosa utilizando como mediador PAH-Fc adsorbido sobre un electrodo de Au.

Esta configuración del electrodo utilizada para cuantificar, mediante técnicas electroquímicas, especies bioquímicas se denomina biosensor enzimático amperométrico cuando, como resultado de la aplicación de una diferencia de potencial, se observa una respuesta de corriente.

La elección de la GOx para llevar a cabo dicho ensayo se basa en su robustez, alta estabilidad, alta velocidad de reacción y alta solubilidad en agua, además de la relevancia de la determinación de glucosa en ensayos clínicos. Por otra parte, la GOx ha sido extensamente estudiada y utilizada en el diseño de biosensores,⁵ además de conocerse muy bien sus mecanismos de acción.

La interacción entre PAH-Fc y GOx es de naturaleza electroestática ya que la GOx nativa presenta un punto isoeléctrico de 4.05, por lo que, por encima de este pH tiene una carga superficial negativa.³⁵

La construcción de este ensamblado se llevó a cabo sumergiendo un sustrato de Au *overnight* en una solución 20 mM de MPS en 10 mM de H₂SO₄. Transcurrido este tiempo, el sustrato se lavó con agua destilada y se procedió a modificar su superficie en una placa de Petri de la siguiente manera:

- El sustrato funcionalizado con el tiol se puso en contacto con una solución de PAH-Fc + 0.1 M de KCl durante 20 minutos.
 - Se retiró esta solución y se realizó un lavado con agua destilada.
 - Se colocó sobre la superficie del sustrato solución 1 mg ml⁻¹ de GOx durante 20 minutos.
 - Se retiró esta solución y se realizó un lavado con agua destilada.
- } 1 BICAPA

Este procedimiento se repitió de manera de formar un ensamblado de 3 bicapas.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento electroquímico de este sistema en presencia de glucosa, se realizaron medidas de voltamperometría cíclica.

Inicialmente se midieron 4 ciclos voltamperométricos a 10 mV s⁻¹ en el buffer de medida, solución 5 mM de HEPES preparada a partir de solución 0.1 M de KCl llevada a pH 7.4. A continuación se retiró este electrolito de la celda y se midió en distintas soluciones de glucosa de concentración creciente, desde 1 hasta 50 mM preparadas a partir de la solución buffer de medida HEPES, a una velocidad de barrido de 10 mV s⁻¹. En la **Figura 7.2** se muestran los voltamperogramas obtenidos a partir de estas mediciones, en los que se observan las curvas de electrocatálisis correspondientes a las distintas concentraciones de glucosa.

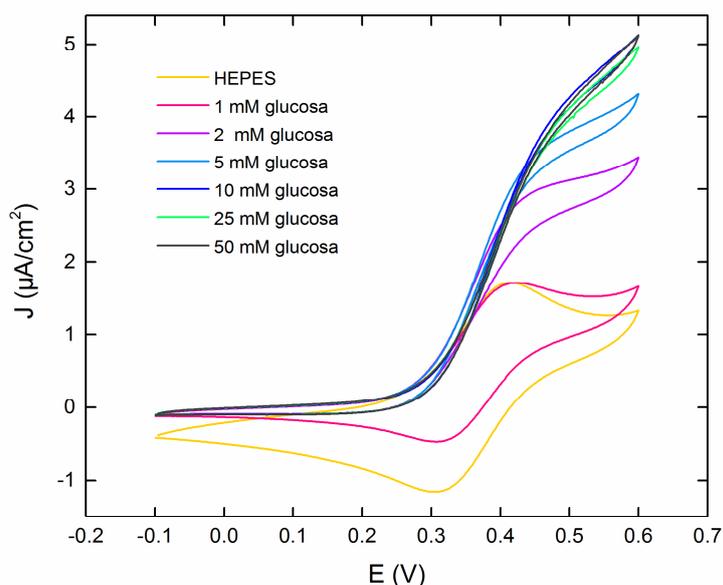


Figura 7.2. Respuesta bioelectrocatalítica (corriente versus potencial aplicado) para el sistema Au/MPS/ (PAH-Fc/GOx)₃ en presencia de concentraciones crecientes de glucosa. Medidas realizadas en buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl, a pH 7.4. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir del gráfico de la **Figura 7.2** se determinaron los valores de corrientes de las ramas de barrido anódico, i_a , correspondientes a cada curva catalítica para un potencial determinado de 542 mV. De esta manera, se graficaron los valores de i_a en función de las respectivas concentraciones de glucosa (**Figura 7.3**), observando un crecimiento de la corriente electrocatalítica hasta la concentración de 10 mM de glucosa. Luego, en las dos últimas concentraciones medidas, 25 y 50 mM, se observó una disminución leve y estancamiento de la corriente. Este comportamiento se debe a las características propias de las reacciones enzimáticas. En éstas, aunque se aumente la concentración de sustrato, la velocidad catalítica no aumenta linealmente, sino que aparece un efecto de saturación. La saturación se debe a que todos los centros activos están ocupados. La velocidad de catálisis depende de la cantidad de enzima con suficiente cantidad de sustrato; sin embargo, cuando aumentamos la concentración de sustrato, la enzima se satura y alcanza su velocidad máxima, que no aumentará en ningún caso, independientemente de la concentración de sustrato.

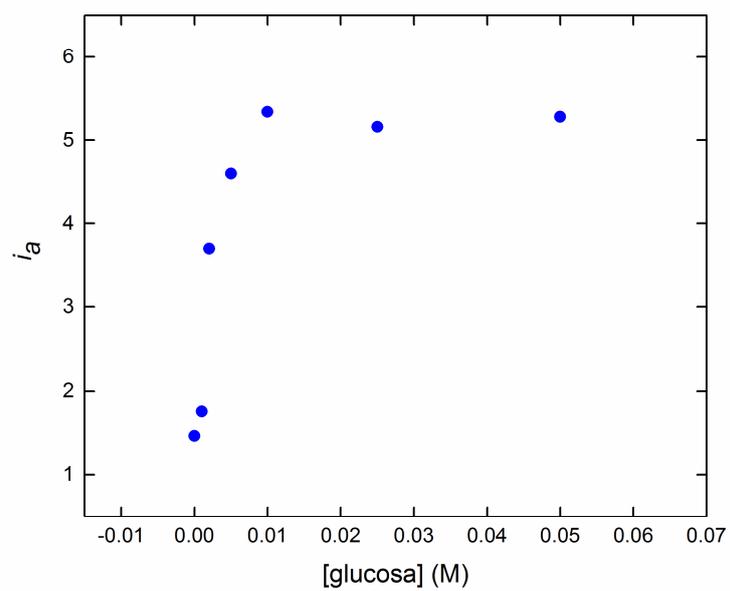


Figura 7.3. Corrientes catalíticas en función de la concentración de glucosa, para el sistema [Au/MPS/ (PAH-Fc/GOx)₃], en buffer HEPES 5 mM, pH 7.4 + KCl 0.1 M. $v=10 \text{ mV s}^{-1}$.

8. Efecto de fosfato sobre la respuesta voltamperométrica del polímero

La interacción amino-fosfato constituye un ejemplo de asociación no covalente presente en muchos medios biológicos y es de gran importancia en esta área ya que ambos grupos se encuentran habitualmente de manera simultánea en distintos compartimentos. El anión ortofosfato, por ejemplo, es una de las especies inorgánicas de mayor relevancia biológica debido al rol estructural que tiene en muchas biomacromoléculas (ADN, ARN, proteínas fosforiladas); también participa en una gran diversidad de reacciones metabólicas y es un elemento de construcción supramolecular muy importante. Un ejemplo lo representan las poliaminas en diatomeas que cumplen un papel muy importante en la biogénesis de estructuras silíceas,³⁶ formando agregados con fosfatos y silicatos que actúan como promotores de patrones minerales determinados.³⁷

Se ha mostrado recientemente que la agregación de PAH y fosfatos puede emplearse para la formación reversible de películas supramoleculares sobre diferentes sustratos.³⁸ Además de las interacciones electrostáticas que, según estudios de ³¹P-RMN se encuentran en todo el rango de pH en el que la amina está protonada ($4 < \text{pH} < 9$), la posibilidad de generar una red tridimensional de puentes de hidrógeno parece ser esencial para inducir la agregación microscópica.³⁹

Estudios en ensamblados LbL de PAH han probado la capacidad de los fosfatos para revertir la carga superficial de las aminas protonadas a través de enlaces con estos aniones.⁷ Debido a que esta asociación es específica de iones fosfato, no puede explicarse sólo en términos electrostáticos, sino que la formación de puentes de hidrógenos sería un factor muy importante.

Por otra parte, se ha reportado que la asociación supramolecular de iones fosfato a citocromo c, una hemoproteína con una alta densidad de grupos amina superficiales, conduce a una alteración del comportamiento electroquímico de su centro rédox de Fe.⁴⁰ En este caso, se considera que, además de los efectos electrostáticos producidos por las interacciones entre el centro rédox y el ion en cuestión, los efectos estructurales causados por la incorporación del ion al ensamblado supramolecular pueden ser muy importantes en la modificación del potencial formal.⁴¹

A partir de estos antecedentes, en este trabajo se estudió el efecto producido por

iones fosfato sobre diferentes configuraciones de ensamblados construidos a partir del polímero sintetizado, PAH-Fc. De esta manera se buscó correlacionar los cambios en las corrientes voltamperométricas con la presencia de iones fosfato en solución.

8.1 Efecto de fosfato sobre electrodos de oro modificados con PAH-Fc

Con la finalidad de analizar el efecto del ion fosfato en contacto con PAH-Fc, inicialmente se construyeron ensamblados [Au/MPS/PAH-Fc], para los cuales se funcionalizaron sustratos de Au sumergiéndolos en una solución 20 mM de MPS en 10 mM de H₂SO₄ *overnight*. Transcurrido este tiempo, los sustratos se lavaron sumergiéndolos tres veces en agua destilada, y se colocaron en una placa de Petri donde se modificaron colocando 0.5 ml de PAH-Fc + 0.1 M de KCl sobre la superficie de cada uno, de manera de cubrir toda el área expuesta, durante 14 horas aproximadamente, dejándolos secar al aire durante una noche.

Una vez modificados, se procedió a realizar las correspondientes determinaciones electroquímicas. Inicialmente, para cada ensamblado, se midieron 100 ciclos voltamperométricos a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹ en solución 5 mM de buffer HEPES preparada a partir de solución 0.1 M de KCl a pH 7.4, de manera de lograr la estabilización de la señal, seguidos por 2 ciclos a 10 mV s⁻¹. A continuación se llevaron a cabo las determinaciones en presencia de iones fosfato. Para esto, se preparó una solución madre 10 mM de dihidrógeno de fosfato de potasio (KH₂PO₄) en el buffer de medida, cuyo pH fue ajustado a 7.4 con una solución de NaOH. A partir de ésta se realizaron sucesivas diluciones en buffer HEPES de medida, con la finalidad de obtener una serie de soluciones de fosfato desde una concentración 0.1 nM aumentando de a un orden de magnitud hasta 1mM, donde cada una posee el mismo valor de pH 7.4. Se midieron, en cada una de ellas, 50 ciclos voltamperométricos a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹ seguidos por 2 ciclos a 10 mV s⁻¹, desde la más diluida hasta la más concentrada.

Por último, de manera de analizar el comportamiento de los ensamblados luego de los sucesivos ciclados en presencia de iones fosfato, se midió nuevamente una serie de ciclos voltamperométricos en la solución buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4, enjuagando la celda cuidadosamente con dicha solución.

Comparando en un mismo gráfico todos los voltamperogramas obtenidos en cada solución de medida para un ensamblado (**Figura 8.1.1**), se observa una progresiva disminución de la señal de corriente de pico, tanto para la rama anódica como para la catódica, a medida que la concentración de iones fosfato en solución aumenta, sin cambios notables en el

potencial formal de la cupla rédox. Debido a este comportamiento, se encuentra que la respuesta voltamperométrica resulta sensible a la presencia de iones fosfato en la solución de medida, aun cuando su concentración es apreciablemente baja como 0.1 nM. Por otro lado, se observa que la respuesta voltamperométrica no se recupera al volver a medir en un medio sin fosfatos.

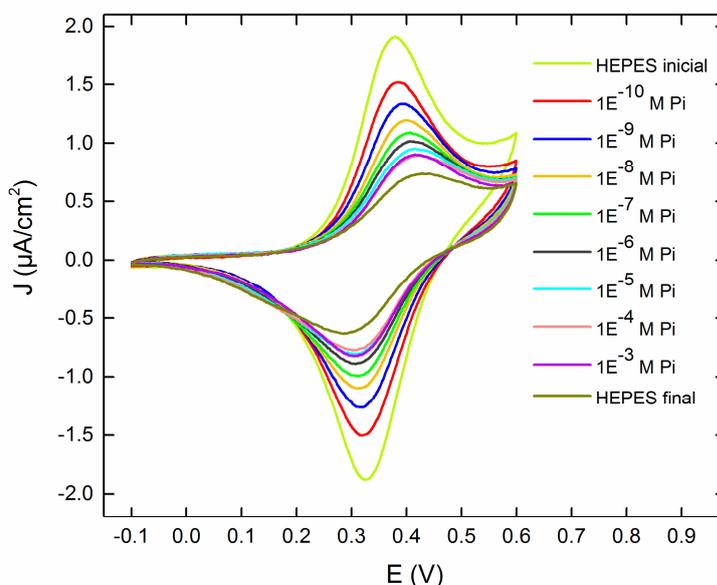


Figura 8.1.1. Voltamperogramas correspondientes al ensamblado [Au/MPS/PAH-Fc] ciclado inicialmente en buffer 5 mM de HEPES en solución 0.1 M de KCl a pH 7.4, medido en concentraciones crecientes de fosfato desde 0.1 nM hasta 1 mM y, por último, nuevamente en buffer HEPES. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir de la serie de voltamperogramas medidos en las diferentes concentraciones de fosfato para dos áreas distintas en dos ensamblados [Au/MPS/PAH-Fc] se determinaron las corrientes de pico anódicas relativas (i_{pa} relativa) correspondientes a cada voltamperograma, de manera de independizarse del valor neto de la corriente. Éstas últimas se calcularon dividiendo las corrientes de pico anódicas por el valor estacionario de la corriente de pico en HEPES antes de medir en las soluciones de fosfato.

Los valores de i_{pa} relativas obtenidos se graficaron en función del log [Pi] para cada área medida de ambos ensamblados, donde [Pi] es la concentración de fosfato. Superponiendo estos gráficos (**Figura 8.1.2**), se puede observar una dependencia lineal entre la variación de la corriente de pico y el logaritmo de la concentración de iones fosfato en solución. Además, en la **Figura 8.1.2** se identifican los correspondientes ajustes lineales a partir de los puntos experimentales obtenidos para cada área medida, cuyas pendientes se indican con la letra b.

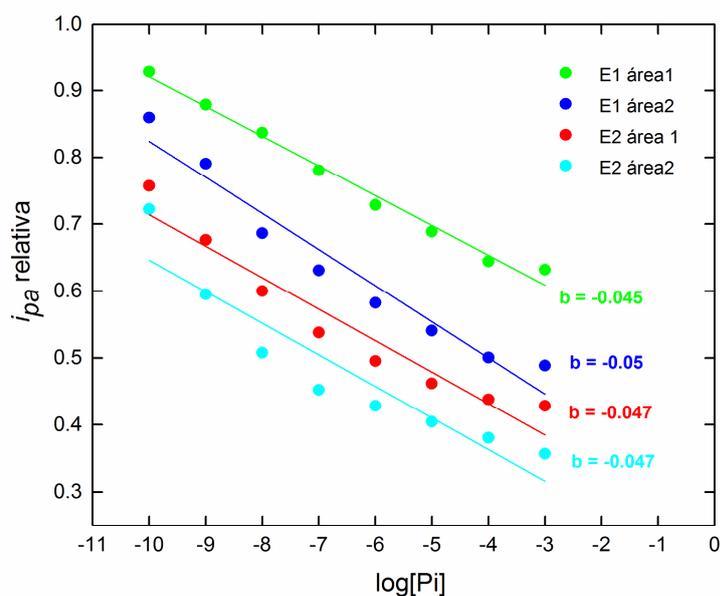


Figura 8.1.2. Representación de las i_{pa} relativas versus $\log [Pi]$ para 2 áreas distintas (área 1 y 2) de dos electrodos de Au diferentes (E1 y E2), modificados con MPS/PAH-Fc. También se muestran sus respectivos ajustes lineales acompañados del valor de su pendiente (b).

También, se construyó un ensamblado a partir del polímero sintetizado y nanopartículas de oro, $[Au/MPS/ (PAH-Fc/Au-NPs)_4]$, con la finalidad de evaluar el efecto de los fosfatos sobre éste.

Para la construcción de dicho ensamblado se utilizó la técnica LbL procediendo de igual manera que en la sección 6.3 del capítulo 6 de esta tesina, con la diferencia de que este sustrato se modificó fuera de la celda, sumergiéndolo durante 10 minutos en la solución de PAH-Fc + 0.1 M de KCl, seguido por otros 10 minutos en contacto con solución de Au-NPs, respectivamente. Se procedió de esta manera sucesivas veces, hasta la formación de 4 bicapas.

Una vez construido este ensamblado, se cicló a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} en solución 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4 hasta lograr la estabilización de la señal (aproximadamente 100 ciclos). Luego, se midieron 50 ciclos a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} , seguidos por 2 ciclos a 10 mV s^{-1} en las distintas soluciones de fosfato preparadas anteriormente.

Al determinar los parámetros de pico de los voltamperogramas obtenidos se graficaron las i_{pa} y i_{pc} relativas en función del $\log [Pi]$ junto con sus respectivos ajustes lineales cuyos valores de las pendientes se indican con la letra b (**Figura 8.1.3**), obteniendo un comportamiento similar al descrito anteriormente, para el ensamblado $[Au/MPS/PAH-Fc]$, a pesar de que las corrientes iniciales en este ensamblado son menores a las del ensamblado solo con PAH-Fc.

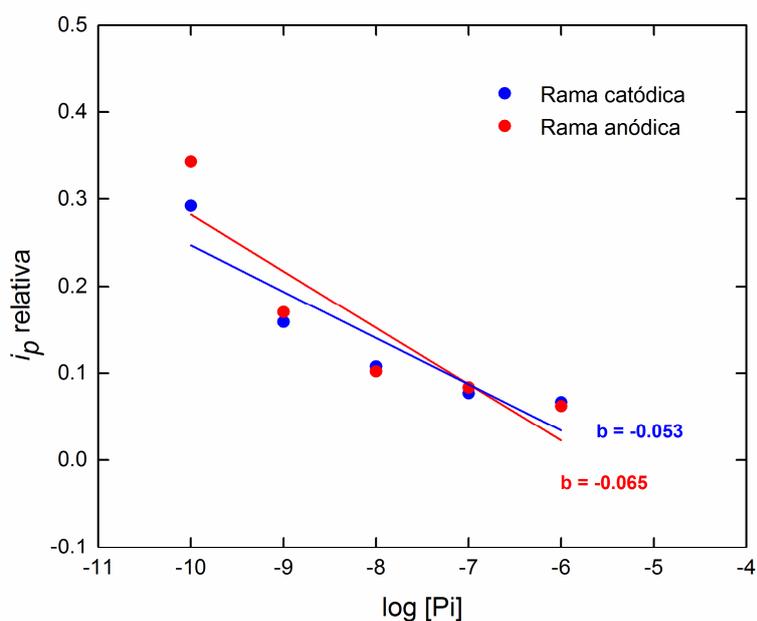


Figura 8.1.3. Representación de las i_{pa} y i_{pc} relativas versus $\log [Pi]$ para un ensamblado [Au/MPS/ (PAH-Fc/Au-NPs)₄], con sus respectivos ajustes lineales acompañados del valor de su pendiente (b).

8.2 Efecto de fosfato sobre electrodos de grafito modificados con PAH-Fc

Además de los ensamblados sobre sustratos de Au, se modificaron electrodos de grafito con PAH-Fc para estudiar el efecto de la presencia de iones fosfato.

Con el objetivo de analizar la respuesta de estos electrodos modificados en contacto con soluciones de fosfato, se realizó una serie de medidas voltamperométricas, ciclando el electrodo inicialmente en solución 5 mM de buffer HEPES en 0.1 M de KCl llevada a pH 7.4 a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} , hasta alcanzar la estabilización de la señal y luego, se procedió a medir en las soluciones de fosfato preparadas como se indicó anteriormente desde la más diluida hasta la más concentrada. En cada una de estas soluciones se corrieron 50 ciclos voltamperométricos a una velocidad de barrido de 200 mV s^{-1} seguidos por 2 ciclos a 10 mV s^{-1} . Comparando los voltamperogramas de un electrodo de grafito en las diferentes soluciones de medida y, a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} , se obtiene el gráfico de la **Figura 8.2.2**.

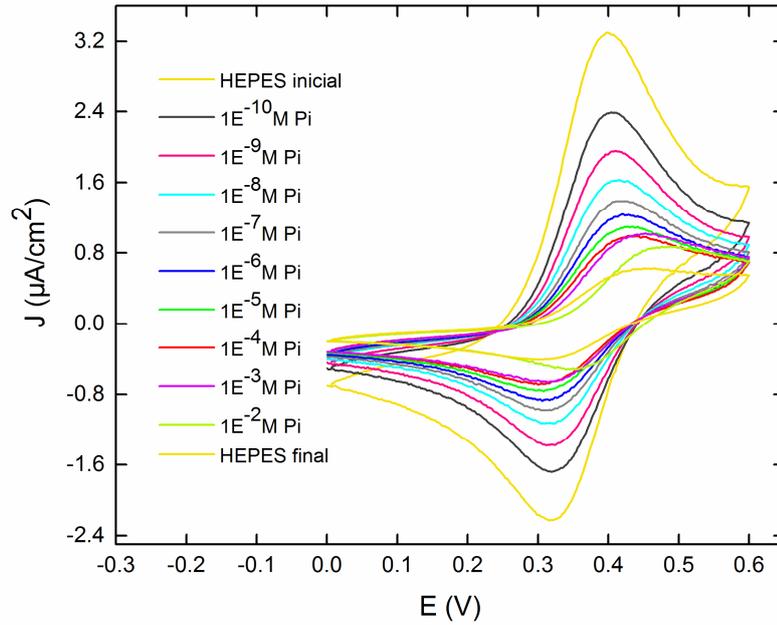


Figura 8.2.2. Voltamperogramas correspondientes al ensamblado [grafito/PAH-Fc] ciclado en buffer HEPES 5 mM en KCl 0.1 M, pH 7.4, medido en concentraciones crecientes de fosfato desde 0.1 nM hasta 10 mM. $\nu=10 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir de los voltamperogramas obtenidos, correspondientes a dos ensamblados medidos en las diferentes concentraciones de fosfato, se hallaron los parámetros de pico de cada curva para ambos electrodos. Estos valores se utilizaron para construir un gráfico de i_{pa} relativas en función del $\log [Pi]$, que se puede observar en la **Figura 8.2.3**, la cual evidencia un comportamiento lineal decreciente de la corriente de pico anódica relativa a medida que se aumenta la concentración de fosfato en la solución.

Por otro lado, al igual que sucede en la determinación del efecto de fosfato en electrodos de Au, se observa que la respuesta voltamperométrica no se recupera al volver a medir en un medio sin fosfatos.

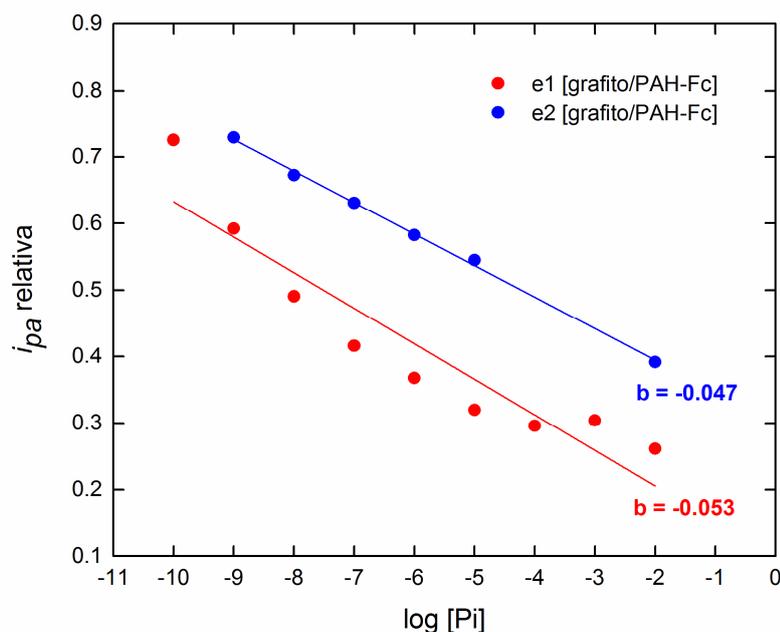


Figura 8.2.3. Representación de las i_{pa} relativas versus $\log [Pi]$ para 2 electrodos de grafito (e1 y e2) con sus respectivos ajustes lineales acompañados del valor de su pendiente (b).

8.3 Efecto de fosfatos sobre la respuesta bioelectroquímica de ensamblados con GOx

La respuesta voltamperométrica en presencia de iones fosfatos fue estudiada también en ensamblados [Au/MPS/ (PAH-Fc/GOx)₃].

Este ensamblado fue construido tal como se indicó en el capítulo 7 de esta tesina mediante la técnica de LbL a partir de PAH-Fc y la enzima GOx. Este electrodo se midió inicialmente en solución 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4, a través de voltamperometría cíclica, y luego en soluciones de distintas concentraciones de glucosa (1, 2, 5, 10, 25 y 50 mM) preparadas a partir del buffer de medida HEPES, como se explicó detalladamente en el capítulo 7. Finalmente, luego de medir en la última concentración de glucosa 50 mM, se agregaron 15 μ L de solución 10 nM de Pi de manera de obtener una concentración 0.1 nM de Pi en un volumen final de 1.5 ml en la celda, donde seguidamente se midieron 2 ciclos voltamperométricos a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} . De esta forma se midió en presencia de la concentración más baja de fosfatos, al mismo tiempo que en la solución de glucosa más concentrada. Además, con el objetivo de identificar una tendencia en el comportamiento del ensamblado en presencia de iones fosfato, se incorporaron a la anterior solución de medida, 13.5 μ L de solución 100 nM de fosfato de manera de generar una concentración de Pi en la celda de 1 nM. A continuación también se midieron 2 ciclos a 10 mV s^{-1} .

Comparando la respuesta electrocatalítica del ensamblado en solución de 50 mM de glucosa con la respuesta obtenida en presencia de las dos concentraciones más bajas de fosfato 0.1 y 1 nM, se obtiene el gráfico de la **Figura 8.3.1**.

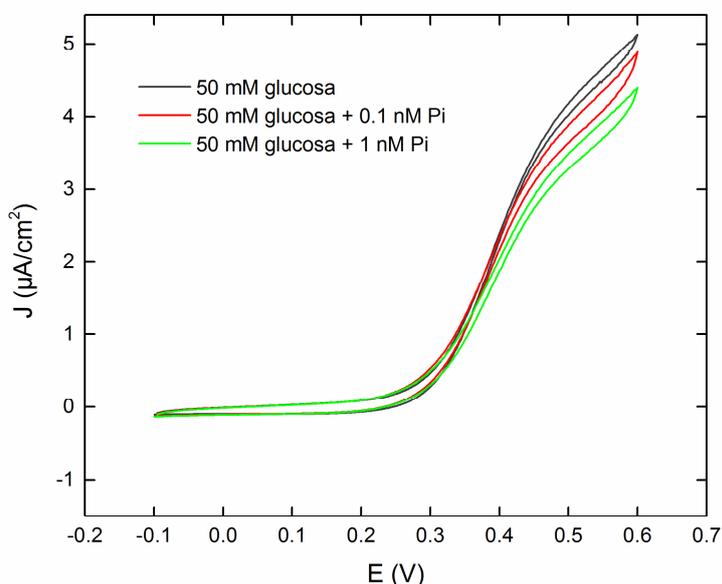


Figura 8.3.1. Respuesta bioelectrocatalítica para el sistema [Au/MPS/ (PAH-Fc/GOx)₃] en presencia de una solución 50 mM de glucosa sin Pi, con 0.1 nM y 1 nM de Pi. $v=10 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir de estos resultados se puede decir que la señal electrocatalítica es sensible a la presencia de iones fosfato incluso en concentraciones del orden nanomolar.

8.4 Análisis del efecto de fosfatos sobre la respuesta de PAH-Fc

Al observar los resultados de todas las medidas realizadas en presencia de iones fosfato se identifica una marcada tendencia a la disminución de la señal voltamperométrica al aumentar la concentración de fosfato en las sucesivas soluciones de medida.

Por otro lado, un aspecto muy interesante de este sistema es la sensibilidad que posee frente a concentraciones de fosfato significativamente pequeñas como 0.1 y 1 nM. Es decir que el PAH-Fc podría funcionar como reportero de trazas nanomolares de este anión, que es de gran interés en el área de las ciencias biológicas y aplicaciones biotecnológicas, ya que el fosfato se encuentra presente y es de gran importancia en distintos procesos a nivel celular.

Una hipótesis que podría explicar este comportamiento es que la interacción con los grupos fosfato conduce a un desprendimiento del polímero de la superficie del electrodo

causando una disminución irreversible de la respuesta electroquímica, tal como se observa en los experimentos voltamperométricos. Esta hipótesis es puesta a prueba en el punto siguiente.

8.4.1 Medidas de SPR

Con la finalidad de comprender mejor la respuesta voltamperométrica del ensamblado [Au/MPS/PAH-Fc] en presencia de fosfato se realizaron medidas de SPR, a partir de las cuales se puede obtener información sobre el comportamiento del material adsorbido en la superficie del electrodo, al ponerlo en contacto con una solución de fosfato.

Para esto, se llevó a cabo la funcionalización de un sustrato de Au (BioNavis) con solución de MPS 20 mM en H₂SO₄ 10 mM por 24 horas. Al transcurrir este tiempo se lo enjuagó con agua destilada sucesivas veces y se lo colocó en un soporte que se introduce dentro del equipo. Luego se conectó sobre el sustrato una celda cuadrada con capacidad de realizar determinaciones electroquímicas, mientras el equipo de SPR realiza las medidas. A través de la disposición de un sistema de capilares que posee el equipo, se introduce (mediante una jeringa) solución de PAH-Fc + 0.1 M KCl, la que se deja en contacto con el electrodo por 1 hora mientras el equipo de SPR mide sin interrupciones hasta finalizar el ensayo. Seguidamente se inyectan aproximadamente entre 20 y 25 ml de HEPES 5 mM preparado en solución 0.1 M de KCl a pH 7.4, de manera de retirar el exceso de polímero no adsorbido, dejando el electrodo en contacto con esta solución para realizar la primera medida electroquímica. Una vez que la señal de SPR alcanzó un valor estable, se midieron 100 ciclos voltamperométricos a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹ con la finalidad de estabilizar la señal electroquímica. A continuación se inyectó solución 1 μM de Pi preparada a partir del buffer de medida y llevada a pH=7.4 en la que se midieron dos secuencias voltamperométricas de 30 ciclos cada una a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹ seguida de dos ciclos a 10 mV s⁻¹. Finalmente se volvió a inyectar solución de HEPES 5 mM preparado en solución 0.1 M de KCl a pH 7.4 de manera de desplazar la solución de fosfato anterior y, se realizó un último ciclado a 200 mV s⁻¹.

La respuesta electroquímica de este ensamblado coincide con la descrita anteriormente para otros electrodos en presencia de iones fosfato, como se muestra en la **Figura 8.4.1.1**, donde se comparan los voltamperogramas obtenidos a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹. En esta figura se muestra cómo el ciclado en presencia de iones fosfato conduce a una disminución irreversible de la respuesta voltamperométrica.

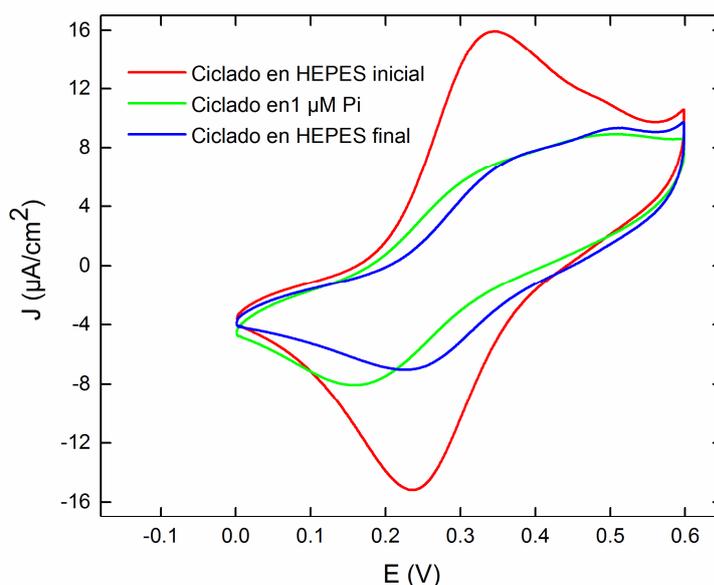


Figura 8.4.1.1. Voltamperogramas del sistema Au/MPS/PAH-Fc, medido en buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4 y, en solución 1 μM Pi. $v=200 \text{ mV s}^{-1}$.

Por otro lado, la representación del ángulo de resonancia de SPR (θ_{SPR} o *PeakMin*) en función del tiempo obtenida a través de las medidas de SPR (sensograma), en simultáneo con las medidas electroquímicas, se muestra en la **Figura 8.4.1.2**. Allí, las medidas electroquímicas se identifican como pequeñas fluctuaciones en la señal. Debido a la sensibilidad que posee este ángulo a los cambios que se dan en la interfase, permite seguir la adsorción y desorción de distintos compuestos. Así, un aumento θ_{SPR} corresponde a un aumento de la cantidad de material depositado en la interfase y viceversa. Al analizar la **Figura 8.4.1.2** se pueden identificar tres regiones correspondientes a la inyección de las distintas soluciones, en cada una de las cuales se indican las características de los ciclados voltamperométricos medidos. Principalmente, se observa un incremento en el ángulo θ_{SPR} al introducir solución de fosfato, que disminuye a valores cercanos a los iniciales con el agregado de solución buffer de HEPES. Este fenómeno refleja la adsorción de fosfatos en la estructura del polímero sobre la superficie del electrodo, introduciendo un cambio en el índice de refracción n_2 que genera un aumento del valor de θ_{SPR} , seguido de una desorción de estos aniones por el agregado de solución de HEPES que provoca una disminución del θ_{SPR} .

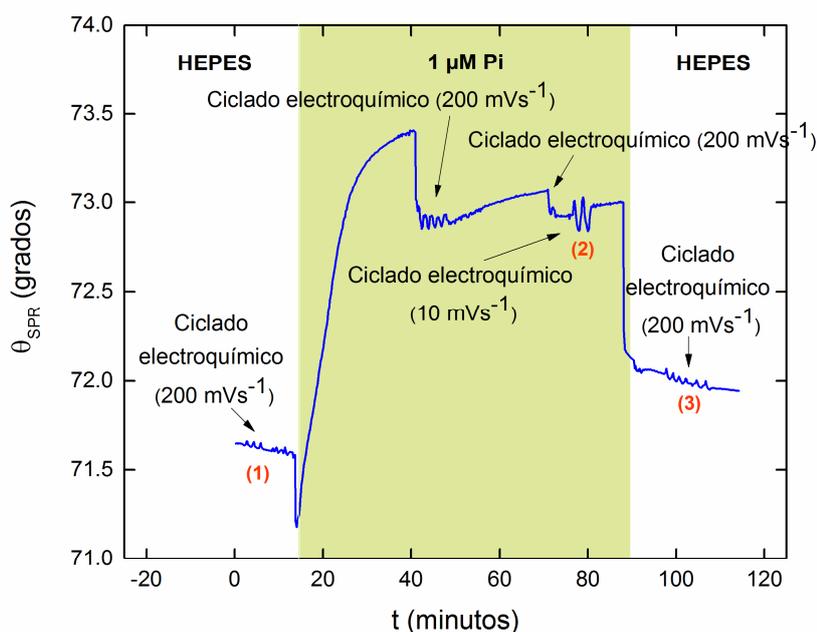


Figura 8.4.1.2. Representación del sensograma obtenido a partir de la técnica SPR para un ensamblado [Au/MPS/PAH-Fc] medido electroquímicamente en solución de HEPES 5 mM preparado en solución 0.1 M de KCl a pH 7.4 y, en solución 1 μM Pi.

Sin embargo, al comparar los valores de θ_{SPR} al inicio y final de la medida, donde el electrodo se encuentra en contacto con solución de HEPES, se observa que la señal es incluso apenas mayor que al inicio, descartando la idea de que la interacción con iones fosfato conduce a una desorción del polímero de la interfase. Por el contrario, este comportamiento podría indicar que no todos los fosfatos que se habían adsorbido sobre el polímero son removidos por la incorporación de solución de HEPES.

A partir de estos resultados se puede concluir que el polímero PAH-Fc no se despegaba de la superficie del electrodo por el ciclado electroquímico en presencia de iones fosfato; por el contrario, se encuentra que una fracción de éstos es adsorbida sobre el polímero. Sin embargo, la señal electroquímica del polímero se pierde al ponerse en contacto con iones fosfato y no es posible recuperarla al medir nuevamente en solución de buffer.

Una posible explicación para este comportamiento podría ser que la fuerte asociación de los aniones fosfato a los grupos amino libres del polímero PAH-Fc genere un agregado supramolecular en el que la transferencia de carga a los centros de Fc se vea impedida, dando como resultado una disminución de la señal electroquímica. Esta hipótesis es evaluada en el siguiente punto.

8.4.2. Blanco de PAH-Os

Para poner a prueba la idea de que la disminución en la señal de corriente a medida que aumenta la concentración de fosfato se debe a la interacción de los aniones fosfato con los grupos amino libres del polímero, se estudió mediante voltamperometría cíclica el comportamiento en presencia de iones fosfato de un polímero de PAH modificado con un centro redox diferente. Para estos se utilizó un polímero modificado con centros de osmio: PAH-Os. En este polímero, parte de los grupos amino son modificados con un complejo de Os como se muestra en la **Figura 8.4.2.1**. Este centro de osmio sufre una transición redox entre estados Os(II) y Os(III), confiriéndole actividad electroquímica al PAH-Os.



Figura 8.4.2.1. Estructura química del polímero con centro de osmio, PAH-Os. Tomado de M. Lorena Cortez *et al.*, *Anal. Chem.*, 2013.⁴²

Para estos estudios se construyó un ensamblado a partir de un polímero de polialilamina modificado con centros de osmio (PAH-Os). Se funcionalizó un sustrato de Au sumergiéndolo en solución 20 mM de MPS en 10 mM de H₂SO₄ durante una noche. Luego, éste se enjuagó con agua destilada y se modificó con PAH-Os durante aproximadamente 14 horas, dejándolo secar al aire. A continuación se procedió a realizar las determinaciones electroquímicas, donde se midieron 100 ciclos en solución de buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl llevada a pH 7.4 a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹ para estabilizar la señal, seguido de 2 ciclos a 10 mV s⁻¹. A continuación se midieron 50 ciclos voltamperométricos a 200 mV s⁻¹ y 2 ciclos a 10 mV s⁻¹ en cada una de las soluciones de fosfato desde la más diluida hasta la más concentrada.

Superponiendo todos los voltamperogramas obtenidos a partir de estas determinaciones a una velocidad de barrido de 10 mV s⁻¹ se observa que prácticamente no se producen variaciones en el voltamperograma por el agregado de iones fosfato, como muestra la **Figura 8.4.1.2**. Los parámetros de pico se mantienen casi constantes al ir aumentando la

concentración de fosfato. Es decir que el polímero no sufre ninguna transformación en contacto con estos aniones.

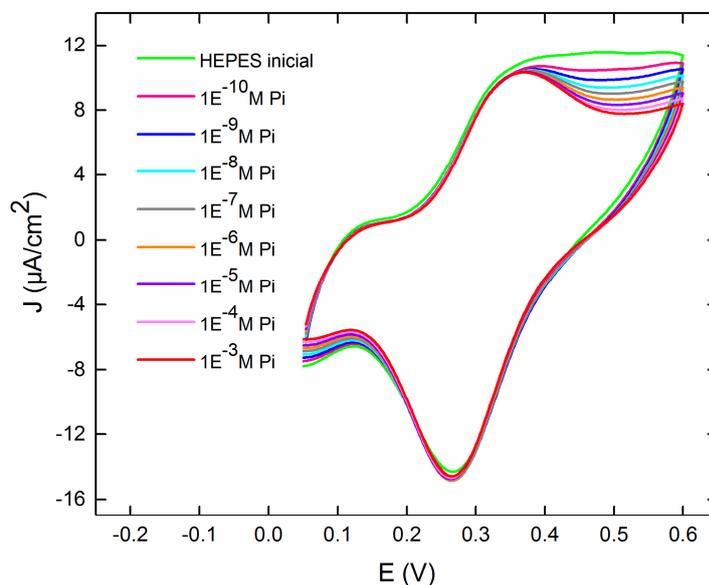


Figura 8.4.1.2. Voltamperogramas correspondientes al ensamblado [Au/MPS/PAH-Os] ciclado en buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4, medido en concentraciones crecientes de fosfato desde 0.1 mM hasta 1 mM. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Teniendo en cuenta el comportamiento del ensamblado [Au/MPS/PAH-Os] al ponerse en contacto con soluciones de diferentes concentraciones de fosfato, y considerando la respuesta del ensamblado [Au/MPS/PAH-Fc] evaluado en las mismas condiciones de medida, se encuentra que el efecto observado en el polímero PAH-Fc no es meramente consecuencia de la naturaleza de los grupos no funcionalizados del polímero, sino que la cupla rédox de Fc (en el entorno del PAH) es sensible a la presencia de grupos fosfatos. Además, esta interacción, que conduce a una pérdida de la electroactividad, es específica para el centro de Fc.

8.4.3 Medida de XPS

Al observar la respuesta voltamperométrica del ensamblado [Au/MPS/PAH-Fc] en soluciones de concentración creciente de fosfato se evidencia una disminución progresiva e irreversible de la señal, a pesar de no perder polímero durante el ciclado, e incluso incorporar más masa a su superficie según muestran los resultados de SPR. Además, se comprobó que este efecto era específico de los centros de Fc.

A partir de estos resultados, y con la finalidad de comprender el proceso por el cual la respuesta voltamperométrica del ensamblado disminuye en presencia de fosfato, se realizaron ensayos de XPS para obtener información sobre la composición química superficial de ensamblados con distinto tratamiento electroquímico.

Para facilitar las medidas de XPS se modificó de forma uniforme el área total de tres sustratos de Au con PAH-Fc. Los ciclados voltamperométricos se llevaron a cabo en un vaso de precipitado (de manera de ciclar toda la superficie de los sustratos) en el que se armó una celda electroquímica compuesta por un arreglo de tres electrodos, donde se utilizó el electrodo modificado como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como referencia.

De esta manera se funcionalizaron tres sustratos de oro con solución 20 mM de MPS en 10 mM de H₂SO₄ durante 24 horas, seguido por la modificación de éstos con PAH-Fc + 0.1 M KCl. Una vez secos, uno de estos ensamblados se guardó para realizar la medida de XPS, mientras los otros dos se ciclaron en solución 5 mM de buffer HEPES preparada a partir de 0.1 M de KCl a pH 7.4. En cada uno se midieron 50 ciclos a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹, seguido por dos ciclos a 10 mV s⁻¹. Al finalizar estos ciclados se guardó uno de los ensamblados para realizar XPS, continuando con las mediciones electroquímicas sobre el ensamblado restante en una solución de fosfato preparada a partir de la solución de buffer HEPES. Éste último electrodo se midió en una solución 10 mM de fosfato, en la que se llevaron a cabo 50 ciclos voltamperométricos a una velocidad de barrido de 200 mV s⁻¹, seguido por dos ciclos a 10 mV s⁻¹.

En resumen, se obtuvieron tres ensamblados diferentes que se enviaron a San Sebastián (España) para su medición en el equipo de XPS:

- a) [Au/MPS/PAH-Fc] sin ciclar.
- b) [Au/MPS/PAH-Fc] ciclado en buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4.
- c) [Au/MPS/PAH-Fc] ciclado inicialmente en buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4, y luego en solución 10 mM de fosfato.

Como resultado de las medidas de XPS, en la **Figura 8.4.3.1** se pueden observar los picos correspondientes al doblete de los orbitales 2p del Fe, para cada uno de estos ensamblados. En esta figura, también se muestra la relación Fe/N determinada a partir de la integración de los picos correspondientes al Fe y al N, la cual brinda información sobre la cantidad de ferroceno presente por aminas en el polímero.

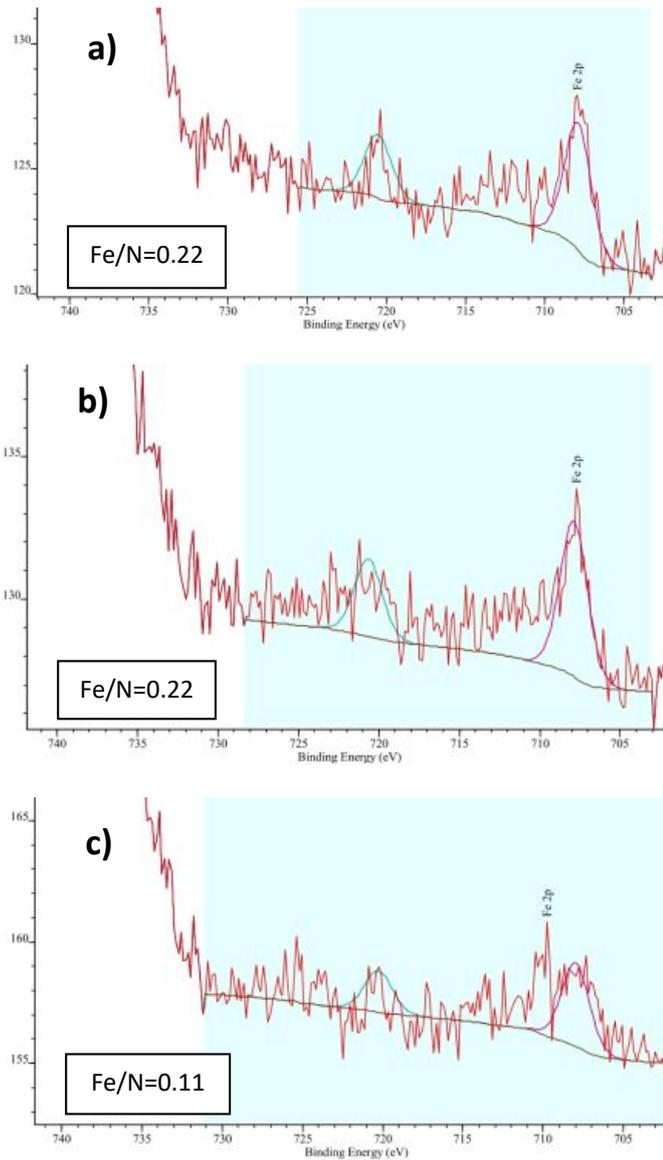


Figura 8.4.3.1. Espectros XPS correspondientes al nivel Fe2p de los ensamblados [Au/MPS/PAH-Fc] a) sin ciclar b) ciclado en buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4 c) ciclado en buffer 5 mM de HEPES en 0.1 M de KCl a pH 7.4 y en solución 10 mM de Pi.

A partir de estos resultados se puede observar que para el ensamblado sin ciclar y para el que se cicló en buffer HEPES el valor de la relación Fe/N es el mismo, 0.22, por lo que se puede decir que no hay cambios en la estructura del polímero por el ciclado en este medio. Sin embargo, al ciclar el electrodo en solución 10 mM de fosfato, la relación Fe/N disminuye a la mitad, obteniendo un valor de 0.11, por lo que se puede pensar que el centro de ferroceno se desarma por el ciclado en presencia de iones fosfato, perdiendo al Fe de la estructura del polímero.

Por lo tanto, podría decirse que el ciclado voltamperométrico en presencia de iones fosfato conduce a una disminución de la señal de corriente como consecuencia de una desestabilización del centro de ferroceno (presumiblemente en el estado oxidado) que conduce a la liberación del Fe del ensamblado. Además, los resultados voltamperométricos indican que la proporción de Fe que se libera del ensamblado depende de la concentración del fosfato del medio en el que se produce el ciclado.

9. Conclusiones

A lo largo de este trabajo se estudió, principalmente, el comportamiento electroquímico del polímero electroactivo sintetizado, PAH-Fc, mediante la técnica de voltamperometría cíclica, a través de la construcción de ensamblados de distinta configuración sobre sustratos conductores de oro y grafito.

A partir de los voltamperogramas obtenidos en las diferentes configuraciones de los ensamblados se evidenció que la mejor condición de pegado del PAH-Fc sobre los sustratos fue en presencia de fuerza iónica otorgada por una concentración 0.1 M de KCl en la solución del polímero, en la que se identificaron las mayores corrientes de pico. Es por eso, que esta condición de modificación de los electrodos se extendió al resto de las determinaciones.

También se encontró que el tiempo de modificación de los sustratos, así como el tiempo de secado, es muy importante para la construcción de ensamblados estables con una buena señal de corriente. De esta manera se asignó aproximadamente 14 horas para cada uno de estos pasos en la construcción de ensamblados.

Además, se comprobó que el PAH-Fc puede ensamblarse capa a capa con nanopartículas de oro recubiertas de citrato, logrando una buena conectividad electroquímica entre los distintos bloques, como se evidencia por el aumento lineal de la corriente voltamperométrica con la cantidad de ciclos de ensamblado.

Por otra parte, en el capítulo 7 se demostró que el PAH-Fc sintetizado, es capaz de actuar como mediador rédox de la reacción enzimática de la GOx con glucosa, en condiciones de baja concentración de oxígeno. Este resultado es muy interesante debido a que el polímero cablea la enzima a pesar de poseer los grupos prostéticos FAD protegidos en su interior. Los resultados obtenidos a partir del ensamblado LbL (PAH-Fc/GOx)₃ indican que el sistema puede ser promisorio en el desarrollo de sensores bioelectroquímicos.

Finalmente, al estudiar el efecto producido por iones fosfato en los distintos ensamblados construidos en este trabajo, se llevaron a cabo una serie de medidas con la finalidad de encontrar el mecanismo por el cual la corriente voltamperométrica disminuye a medida que aumenta la concentración de fosfato en la solución de medida. De esta manera, a partir del estudio de ensamblados construidos con PAH-Os se identificó que dicho efecto es independiente de la interacción de los aniones fosfato con los grupos amino libres del polímero, relacionándolo principalmente con la sensibilidad de la cupla rédox del Fc en el

entorno de PAH. Por otro lado, se encontró, mediante ensayos de SPR, que el polímero no se despegaba del electrodo por el ciclado en presencia de soluciones con fosfato, por el contrario, una fracción de estos iones quedan adsorbidos sobre el polímero. Por último, a través del estudio de distintos ensamblados por XPS, se halló que el centro de ferroceno se desarma debido al ciclado en solución de fosfato, liberando Fe de la estructura del ensamblado. También se encontró, a través de medidas voltamperométricas, que la proporción de Fe cedida al medio es proporcional a la concentración de fosfato en la solución en la que fue ciclado el ensamblado.

Estos últimos resultados son consistentes con el hecho de que la señal voltamperométrica no se recupera luego del ciclado en un medio que contiene iones fosfatos y explican la irreversibilidad del efecto. De todas maneras, debido a que el anión ortofosfato es una especie inorgánica de gran relevancia biológica ya que participa de una gran variedad de reacciones metabólicas, además de cumplir un rol estructural en muchas macromoléculas (ADN, ARN, proteínas fosforiladas),⁴³ la sensibilidad de la respuesta electroquímica de estos ensamblados en presencia de bajas concentraciones de fosfato, deja abierta la posibilidad de utilizar este efecto en el desarrollo de sensores ultrasensibles para este analito basados en PAH-Fc.

10. Referencias

- (1) M.T. Cortés, T.F. Otero M.A. Méndez, M. F. Suárez, M. Díaz, E. V. DESARROLLO DE SENSORES ELECTROQUIMICOS. *Rev. Colomb. Fis.* **2006**, *62* (1), 27–40.
- (2) Cortez, M. L. *Materiales Compuestos Para La Construcción De Sensores*, Universidad de Buenos Aires, 2011.
- (3) Cortez, M. L.; Ceolín, M.; Azzaroni, O.; Battaglini, F. Electrochemical Sensing Platform Based on Polyelectrolyte–Surfactant Supramolecular Assemblies Incorporating Carbon Nanotubes. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (20), 8011–8018. <https://doi.org/10.1021/ac202213t>.
- (4) Wilson, R.; Turner, A. P. F. Glucose Oxidase: An Ideal Enzyme. *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7* (3), 165–185. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(92\)87013-F](https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)87013-F).
- (5) Wang, J. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 814–825. <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50005-2>.
- (6) Laucirica, G.; Marmisollé, W. A.; Azzaroni, O. Dangerous Liaisons: Anion-Induced Protonation in Phosphate-Polyamine Interactions and Their Implications for the Charge States of Biologically Relevant Surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (12), 8612–8620. <https://doi.org/10.1039/c6cp08793k>.
- (7) Irigoyen, J.; Moya, S. E.; Iturri, J. J.; Llarena, I.; Azzaroni, O.; Donath, E. Specific ζ -Potential Response of Layer-by-Layer Coated Colloidal Particles Triggered by Polyelectrolyte Ion Interactions. *Langmuir* **2009**, *25* (6), 3374–3380. <https://doi.org/10.1021/la803360n>.
- (8) Cortón, E. *Development and Applications of Enzymatic and Microbial Biosensors*. **2000**.
- (9) Herrejón Figueroa, M. L.; Limón Rodríguez, B.; Martínez Miranda, V. Cinética e Isotermas de Adsorción de Pb(II) En Suelo de Monterrey. *Ingenierías* **2008**, *XI* (41), 24–31.
- (10) Allen J. Bard, L. R. F. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Editio.; Wiley & Sons: New York, 2001.
- (11) Skoog, D. A.; James Holler, F.; Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*, 5ed ed.; McGrawHill, 2001.
- (12) Salcoba, J. L. Especial Comunicaciones ópticas (II): Qué es una fibra óptica y cómo funciona <https://www.xatakamovil.com/conectividad/especial-comunicaciones-opticas-ii-que-es-una-fibra-optica-y-como-funciona>.
- (13) Laucirica, G. “ La Interacción Amina-Fosfato : Efectos de Inversión de Carga Superficial En La Micro y Nano-Escala ,” Universidad Nacional de La Plata, 2018.
- (14) Andrés, S. H. de. *NUEVAS HERRAMIENTAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN EL MEDIO AMBIENTE Y EN ALIMENTOS*, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, 2019.
- (15) Tang, Y.; Zeng, X.; Liang, J. Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique. *J. Chem. Educ.* **2010**, *87* (7), 742–746. <https://doi.org/10.1021/ed100186y>.

- (16) Butt, H.; Graf, K.; Kappl, M. *Physics and Chemistry of Interfaces*; WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, 2003.
- (17) instruments, M. Zetasizer Nano Series User Manual. *Malvern Instruments Ltd.* 2004, pp 213–224. [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(99\)80105-7](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(99)80105-7).
- (18) Hiemenz, Paul C, R. R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Third Edit.; MARCELD EKKERIN, C.: New York, 1997.
- (19) Diaz, Carlos; Vallejo William; Miranda, J. Tetracarboxifenilporfirina de Hierro (III) Adsorbida Sobre Dióxido de Silicio Por Dispersión Dinámica de Luz. *Rev. Elem.* **2013**, NUMERO 3 (Iii), 187–195.
- (20) Cuadros-Moreno, A.; Pimentel, R. C.; Martín-martínez, E. S.; Yañez Fernandez, J. Light Scattering Dynamics in Determining Size of Polymeric Nanoparticles. *Lat. Am. J. Phys. Educ.* **2014**, 8 (4), 4314-1-4314–4315.
- (21) Lewandowski, A. Construcción de Películas Nanoestructuradas Mediante Ensamblado Electroestático Capa por Capa de Nanotubos de Carbono sobre Superficies Sólidas.
- (22) Between Weight Diffusion Relationship And Molecular <https://airfreshener.club/quotes/between-weight-diffusion-relationship-and-molecular.html>.
- (23) Bluhm, H. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) for in Situ Characterization of Thin Film Growth. *Situ Charact. Thin Film Growth* **2011**, 75–98. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-934-5.50004-7>.
- (24) Herrán, M. Comparación de La Química de Superficies Para Un Cambio de Escala En Materiales Nanoestructurados de Paladio: Caracterización Avanzada Por Espectroscopía Fotoelectrónica, Universidad Nacional de La Plata, 2018.
- (25) Martínez, M. del V. Aplicaciones de La Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X En La Caracterización de Materiales Funcionales, Universidad de Málaga, 2015.
- (26) Feliu, S. CARACTERIZACION QUÍMICA DE NANOSUPERFICIES. INTRODUCCION A LA ESPECTROSCPIA FOTOELECTRONICA DE RAYOS X (XPS). Madrid, Spain pp 1–18.
- (27) Gamry Instruments. Potentiostat / Galvanostat / ZRA Operator 's Manual Reference 600. 2005.
- (28) Technologies, A. Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System. 2007.
- (29) BioNavis. SPR Navi 200 User Manual; 2015; p 38.
- (30) Wang, Z.; Mohwald, H.; Gao, C. Preparation and Redox-Controlled Reversible Response of Ferrocene-Modified Poly(Allylamine Hydrochloride) Microcapsules. *Langmuir* **2011**, 27 (4), 1286–1291. <https://doi.org/10.1021/la103758t>.
- (31) Rocha, Q. J. M. Diseño y Construcción de Superficies de Oro Modificadas Electroestáticamente Con Materiales Dendriticos, Centro de Investigacion y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica sc, México, 2002.
- (32) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.

- (33) Lucioni, A. C. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS POR REDUCCIÓN DE H[AuCl₄]. *Soc. Química del Perú* **2012**, 78 (2), 79–90.
- (34) Wilson, R.; Elizabeth, Q. Glucose Oxidase : An Ideal Enzyme Review Article Glucose Oxidase. **2016**, 5663 (November), 165–185. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(92\)87013-F](https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)87013-F).
- (35) Hodak, J.; Ethenique, R.; Calvo, E. J.; Singhal, K.; Bartlett, P. N. Layer-by-Layer Self-Assembly of Glucose Oxidase with a Poly(Allylamine)Ferrocene Redox Mediator. *Langmuir* **2002**, 13 (10), 2708–2716. <https://doi.org/10.1021/la962014h>.
- (36) Kröger, N.; Lorenz, S.; Brunner, E.; Sumper, M. Self-Assembly of Highly Phosphorylated Silaffins and Their Function in Biosilica Morphogenesis. *Science (80-.)*. **2002**, 298 (5593), 584–586. <https://doi.org/10.1126/science.1076221>.
- (37) Kröger, N.; Deutzmann, R.; Bergsdorf, C.; Sumper, M. Species-Specific Polyamines from Diatoms Control Silica Morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (26), 14133–14138. <https://doi.org/10.1073/pnas.260496497>.
- (38) Marmisollé, W. A.; Irigoyen, J.; Gregurec, D.; Moya, S.; Azzaroni, O. Supramolecular Surface Chemistry: Substrate-Independent, Phosphate-Driven Growth of Polyamine-Based Multifunctional Thin Films. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, 25 (26), 4144–4152. <https://doi.org/10.1002/adfm.201501140>.
- (39) Lutz, K.; Gröger, C.; Sumper, M.; Brunner, E. Biomimetic Silica Formation: Analysis of the Phosphate-Induced Self-Assembly of Polyamines. *PCCP* **2005**, 7 (14), 2812–2815. <https://doi.org/10.1039/b505945c>.
- (40) Capdevila, D. A.; Marmisolle, W. A.; Tomasina, F.; Demicheli, V.; Portela, M.; Radi, R.; Murgida, D. H. Specific Methionine Oxidation of Cytochrome c in Complexes with Zwitterionic Lipids by Hydrogen Peroxide: Potential Implications for Apoptosis. *Chem. Sci.* **2015**, 6 (1), 705–713. <https://doi.org/10.1039/C4SC02181A>.
- (41) Beer, P. D.; Gale, P. A.; Chen, G. Z. Mechanisms of Electrochemical Recognition of Cations, Anions and Neutral Guest Species by Redox-Active Receptor Molecules. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 185–186 (C), 3–36. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00246-X).
- (42) Cortez, M. L.; Pallarola, D.; Ceolín, M.; Azzaroni, O.; Battaglini, F. Electron Transfer Properties of Dual Self-Assembled Architectures Based on Specific Recognition and Electrostatic Driving Forces: Its Application to Control Substrate Inhibition in Horseradish Peroxidase-Based Sensors. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (4), 2414–2422. <https://doi.org/10.1021/ac303424t>.
- (43) PATIÑO, P. RENE; BARRAGAN, H. W. V.; OSCAR; MAZA, L. Mecanismos Reguladores de La Absorción de Fósforo. *Rev. Colomb. Ciencia Anim.* **2012**, 4 (2), 473–497.