



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física**

**"ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y MODELADO DE SISTEMAS  
ENZIMÁTICOS AUTOENSAMBLADOS PARA GENERACIÓN  
ELECTROQUÍMICA DE SEÑAL DE BIOSENSOR"**

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

**Victoria Flexer**

Director de Tesis: Ernesto J. Calvo  
Consejero de Estudios: Fernando Molina

Buenos Aires, 2007

# Estudios experimentales y modelado de sistemas enzimáticos autoensamblados para generación electroquímica de señal de biosensor

## Resumen

Se comparan datos experimentales de respuesta amperométrica para biosensores enzimáticos con modelos que acoplan procesos de difusión-reacción. Se trabajó con Glucosa Oxidasa (GOx, E.C. 1.1.3.4) y mediadores redox artificiales: el complejo  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$  en el caso homogéneo; y un análogo del mismo unido covalentemente a polialilamina (PAH-Os), que se autoensambla electrostáticamente capa-por-capita junto a GOx dando lugar a un biosensor totalmente integrado.

Se ajustaron datos experimentales para el sistema homogéneo a las fórmulas analíticas aproximadas del modelo de Albery (JEC, 323, (1992), 97). A baja concentración de glucosa se observaron voltogramas cíclicos no estacionarios, con desarrollo de un pico de corriente y marcada histéresis, contrariamente a lo predicho por el modelo. Se compararon voltogramas experimentales y simulados numéricamente, en el marco de un modelo más completo que considera el desarrollo de perfiles de concentración. Se reporta además inactivación de la enzima presente en solución de glucosa.

Se analizaron cambios en la estructura y la electrocatálisis de películas al variar la densidad de carga lineal de PAH-Os modificando el pH de las soluciones de autoensamblado.

La respuesta del sistema inmovilizado se analizó según el modelo de Pratt-Bartlett (JEC, 397, (1995), 61) con el objeto de validar el mismo. Se trabajó con películas de espesor variable y un amplio intervalo de concentraciones de glucosa. Los datos experimentales arrojaron un buen ajuste a las fórmulas aproximadas. También se ajustaron usando una rutina Simplex combinada con la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales sin emplear simplificaciones. Los parámetros de ajuste fueron acotados alrededor de los valores hallados con las fórmulas aproximadas.

El análisis combinado mediante fórmulas analíticas aproximadas y simulaciones numéricas resultó útil para la extracción de parámetros desconocidos y comprender mejor los factores que afectan la respuesta amperométrica.

**Palabras clave:** biosensor integrado, biosensor amperométrico, biosensor enzimático, modelos para sensores amperométricos, cinética de enzimas redox, acoplamiento de cinética y difusión, inmovilización de enzimas, autoensamblado electrostático, glucosa oxidasa, complejos de Os

# Modelling and Experiments on self-assembled enzyme systems for electrochemical generation of biosensor signal

## Abstract

Experimental data of amperometric response for enzyme biosensors is compared with models that couple diffusion-reaction processes. We have worked with Glucose Oxidase (GOx, E.C. 1.1.3.4) and artificial redox mediators: the complex  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$  for the homogeneous system, and a similar complex covalently attached to poly(allyl-amine), PAH-Os, which is electrostatically self-assembled layer-by-layer together with GOx to build up an integrated biosensor.

Experimental data for the homogeneous system was fitted to the approximate analytical equations given by Albery's model (JEC, 323, (1992), 97). At low glucose concentration non-steady state cyclic voltammograms with peak maximum and evident hysteresis were observed, contrary to the model's predictions. Cyclic voltammograms were simulated according to a more complete model that allows development of concentration profiles (not considered by Albery) and compared to the experimental voltammograms. We also report on enzyme inactivation when present in glucose solutions.

We studied changes in the structure and electrocatalysis of enzyme films when changing the polymer linear charge density by adjusting the PAH-Os adsorption solution pH.

The amperometric output of the system was studied according to Pratt-Bartlett's model (JEC, 397, (1995), 61) with the aim to validate such model. We studied films of varying thickness in a wide glucose concentration range. The fitting of the experimental data to the approximate analytical solutions showed good agreement. This data was in turn fitted using a Simplex routine coupled to the numerical simulation of the complete (unsimplified) differential equations. The fitting parameters were constrained around the values found with the analytical equations.

The combined analysis using approximate analytical solutions and numerical simulations proved useful for the extraction of unknown parameters and for a better understanding of the factors affecting the amperometric output.

**Key words:** integrated biosensor, amperometric biosensor, enzyme biosensor, models for amperometric sensors, redox enzyme kinetics, coupling of kinetics and diffusion, enzyme immobilization, electrostatic self-assembled, Glucose Oxidase, Os complexes

## Sinceros agradecimientos,

A la Educación Pública, Laica y Gratuita, de la que orgullosamente puedo decir que soy su fruto.

A mis viejos, porque todo lo bueno que hay en mí, se lo debo a ellos.

A mi abu Hilda, por seguir malcriándome como hace 29 años.

A Catalina, por cuidarme a veces como si fuese mi hermana mayor.

A mis tíos y primos, por los empachos en celebraciones de todo tipo, y por su insistencia en que le imprima rasgos más conservadores a mi vida, hasta el momento los he defraudado.

A mi director de tesis, el Dr. Ernesto J. Calvo, por su visión de conjunto y tratar de mostrarnos el mundo científico más allá de cada paper puntual. Por cada vez que me defendió frente a terceros. Y por sobre todas las cosas, porque siempre sentí libertad en el grupo para debatir sobre educación, política científica y vinculación con la sociedad, a sabiendas de nuestras coincidencias y diferencias.

A quienes hicieron lecturas críticas de esta tesis. No tengo palabras para agradecer el esfuerzo y lo que implica leer una tesis, así que el reconocimiento vendrá por otro lado:

a Doris Grumelli, como diría una amiga en común, por hacerme crecer y revalorar al mundo en nuestras diferencias y divergencias. Por todas las salidas conjuntas y los pañuelos alcanzados. Porque fue una de las primeras personas que me hizo sentir parte del grupo.

a Silvina Rothacher, por los cumpleaños pasados y futuros, por las salidas y los encuentros *infranganti* del portero. Sil y Doris, lo mínimo que podría hacer por ustedes es usar un celular, ¡les juro que trataré!

a Marcelo Otero, por ayudarme siempre con temas y consultas que no tenían nada que ver con lo suyo, particularmente en los albores de mi vida científica. Por las palabras sabias desde la distancia... del pabellón 1.

A mis compañeros del Laboratorio de Electroquímica Molecular de todos los tiempos. Gracias, muchas gracias, por tolerar mis cambiantes, hasta el límite de la impaciencia, estados de ánimo, enojos, malas caras, y varios. Muy particularmente gracias,

a quienes también son parte de mis afectos: Ceci, Pablito, Cinty y Andrea. A Ceci por las charlas acerca del sur, las caminatas y la buena vida, por los abrazos, por quedarse a los happy hour y a las fiestas de inorgánica. A Pablito por hacerme compañía, cuando mis chicas fueron dejando el labo. A Cinty, por la añoranza de nuestra tierra. A Andrea, por el aguante, y todos los ofrecimientos de ayuda.

A Marito, por ser una persona con conocimientos y criterio fuera de serie, pero jamás creersela (aunque tiene tanto, pero tanto con qué), por ayudarme siempre tan desinteresadamente y estar dispuesto a discutir todas mis dudas. A Migue y Edgar, por las complicidades, y la buena onda. A Néstor, por las soluciones y las síntesis, y porque es un gran tipo. A Ale Ricci, por sumar presencia femenina en el labo grande. A Maite, por su buena onda.

A los que hace mucho que ya no están. A Aleka, por ese compartido ateísmo militante. Por los viejos tiempos, cuando éramos las niñitas inexpertas y temerosas del LEM. A Erica Forzani, igual que a Doris, porque las cordobesas fueron las que mejor recibieron a esta porteña en el grupo. Por la ayuda en el labo, y los PDFs raros y respuestas elipsométricas que siguen llegando. A Ale W., por el legado de su tesis, y porque fue el primero en enseñarme a usar un EQMAT (conocimientos que por suerte, después no requerí demasiado). A Lili Trevani, por su buena onda a través de los años y del mail. A Mariano Bossi, por su gran criterio y su ayuda en los pocos meses que estuvo con nosotros. A Fede, por el teatro y las empanadas tucumanas. A Carlota, Churcas, Lean, José Luis, Jony, Ariel, Damián, Fran y Pablo.

A los gringos varios que nos visitaron. A Claudio, un tipazo con todas las letras. Ian, un pirata, también con todas las letras. Liz, por el reencuentro chelas mediante en el DF. Joaquín, por el acento gallego. Emma, porque cuando viaje a Finlandia, sabré cómo no hacer el ridículo.

A los que llegaron hace poco, Rafael y Lucila, por todas las veces que no los saludé en estos tiempos.

A la gente fuera del grupo, con quienes compartí cumpleaños, asados, maratones, habitaciones durante congresos y varios: Euge, Pana, Silvia, Sole, Pablo H., Betty, Yanina, Diego, Alci, Jose, Gustavo, Martín y Mati.

A las Gracielas, por un par de charlas útiles, y porque al fin y al cabo, las leyes de la electroquímica en el entropiso, son las mismas que en el Iro.

A Gabriel GG Gordillo, por los consejos electroquímicos de pasillo y por tanta charla acerca del universo.

A Fernando Battaglini, por su infinita memoria y voluntad para discutir experimentos ajenos.

A Luis Baraldo, por las ayudas sintéticas y un par de charlas acerca de los complejos de Os.

A Phil N. Bartlett de la Universidad de Southampton, Reino Unido, por las fructíferas discusiones y las semanas allá.

A Igal Szleifer, por todos los consejos para el futuro.

A Keith Pratt, por dejar una tesis tan claramente escrita y por los códigos que son perfectamente comprensibles, después de 10 años.

A los fotoquímicos, por tantos almuerzos compartidos.

A toda la gente con quienes compartí turnos de docencia, porque el trabajo compartido siempre fue más placentero y sencillo. Muy especialmente, a Mercedes, Marina, Mariela, Vinco, Doris Barbiric y a los tres que me sufrieron este último cuatrimestre: Martín, Ignacio y Euge.

A Nancy y Walter, por la paciencia.

Por allanar los caminos de los vericuetos burocráticos varios de este mundo, gracias, gracias, gracias:

a Alejandra (1er piso), Andrea, Alicia y Mirta (3er piso).

a las chicas de doctorado, Karen y Silvana, a ellas además por soportar mis 400 visitas en el último mes y medio.

a la siempre eficiente y solucionadora de problemas gente del Departamento de Alumnos, gracias por todos los quilombos que me resolvieron de Inorgánica I a esta parte.

A quienes en tardes/noches de cansancio infinito, me acercaron en auto desde las ricas y riverseñas tierras del norte, hacia los populares barrios del centro/sur.

A toda la gente del departamento que en estas últimas semanas de desvaríos, pérdida de cordura, falta de sueño, llanto y trastornos varios, me ofreció ayuda, sonrisas, abrazos, palmadas en la espalda, consuelos, y aliento en general. Con sus gestos, muchas veces cambiaron el transcurrir de mi día.

A mis amigas de hace más tiempo (y no por eso, mis amigas más viejas), Lala, Nati y Cari.

A los Amigos de Nina (en orden alfabético, ya que no se me ocurrió otro): Alita, Andresito, Blopa, Colton, Chelo, Jaka, Jim, Lean, Marianiten, Nati (de nuevo), Nicokei, Ro, Sasa, Silvita y Toni, por las fiestas y encuentros bacanales varios, por los cines de miércoles/martes, por los fines largos en Pinamar/Miramar, por los fines cortos en Ezeiza y Escobar, por alabar mis fallidos intentos de comida, y porque si hay gente con quien quiero festejar mis 40, esos son ustedes.

A Blopa, Andresito y Jaka además gracias por las ayudas informáticas.

A las chicas del norte, Marinita, Yanis y Marce.

A Victor, por estos meses.

Y volviendo a la facu, a los integrantes y simpatizantes de la Lista 10, Graduados al Frente, por compartir un proyecto de facultad distinto.

*A los más de 400 jóvenes de mi generación que  
aún viven en la mentira de la negación de su  
identidad, arrancados de los brazos de sus  
padres por la sangrienta dictadura militar.  
Porque todos ellos puedan recuperarla, y  
reencontrarse con sus familias.*

*“¡Ah, sí, la fuga! Es lo que me queda por contar. Huí para reforzar el valor de la denuncia de Vittlar. No hay fuga sin objetivo fijo, me dije. ¿A dónde piensas huir, Oskar?, me pregunté.” (...)*

*Así, pues, hube de borrar de la lista de objetivos las cuatro faldas de mi abuela Ana Koljaiczek, que aún hoy siguen hinchándose protectoras en los campos de patatas cachubas, pese a que me dijera que la única fuga con probabilidades de éxito era –si es que de fuga se trataba– la fuga en dirección de las faldas de mi abuela.*

*Dicho sea de paso, celebro hoy mi trigésimo aniversario. A los treinta está uno obligado a hablar del tema fuga como un hombre, y no como un mozalbete.”*

Günter Grass El tambor de hojalata

*“Ach ja, die Flucht! Das bleibt mir noch zu sagen. Ich floh, um den Wert der Vittlarschen Anzeige zu steigern. Keine Flucht ohne ein angenommenes Ziel, dachte ich mir. Wohin willst du fliehen, Oskar? fragte ich mich.” (...)*

*“So mußte ich also die vier Röcke meiner Großmutter Anna Koljaiczek, die sich heute noch schutzbietend auf kaschubischen Kartoffeläckern blähen, als Fluchziel streichen, obgleich ich mir –wenn schon Flucht– die Flucht in Richtung Großmutter Röcke als einzig außichtreiche Flucht nannte.*

*So nebenbei: Ich begehe heute meinem dreißigsten Geburtstag. Als Dreißigjähriger ist man verpflichtet, über das Thema Flucht wie ein Mann und nicht wie ein Jüngling zu sprechen”.*  
Die Blechtrommel

# Índice

	Capítulo 1. Introducción	1
1.1	Biosensores.....	1
1.2	Enzimas.....	1
1.2.1	Cinética Enzimática.....	2
1.2.2	Enzimas de dos sustratos.....	3
1.2.2.1	Cinética.....	3
1.2.2.2	Glucosa Oxidasa (E.C.1.1.3.4).....	4
1.3	Mediadores artificiales.....	7
1.3.1	Dos mediadores redox de interés.....	8
1.4	Electroquímica directa.....	9
1.5	Biosensores enzimáticos electroquímicos.....	9
1.6	Distintos diseños de electrodos enzimáticos.....	11
1.6.1	El sistema homogéneo.....	11
1.6.2	Enzimas inmovilizadas.....	12
1.6.2.1	Membrana-enzima-electrodo (mem).....	12
1.6.2.2	Electrodos de membrana-enzima (eme).....	13
1.6.3	Mediador inmovilizado.....	13
1.7	Modelado de biosensores.....	13
1.7.1	Ecuaciones analíticas aproximadas.....	17
1.7.1.1	Diagramas de casos.....	18
1.7.2	Simulaciones numéricas.....	19
1.7.2.1	Diferencias finitas.....	19
1.8	Variables adimensionales.....	22
1.9	Modelos de electrodos enzimáticos amperométricos reportados.....	23
1.9.1	El caso homogéneo.....	24
1.9.1.1	El modelo de Albery.....	24
1.9.1.1.1	Caso I.....	27
1.9.1.1.2	Caso IV.....	28
1.9.1.1.3	Caso VI.....	28
1.9.1.1.4	Caso VII.....	29
1.9.1.1.5	Caso VIII.....	29
1.9.1.2	Modelos no estacionarios del caso homogéneo.....	29
1.9.2	Electrodos de enzimas inmovilizadas.....	31
1.9.2.1	Monocapa de enzima y mediador soluble.....	32
1.9.2.2	Multicapas de enzima y mediador soluble.....	32
1.9.2.2.1	Mediador oxidado en la solución.....	32
1.9.2.2.2	Mediador reducido en la solución.....	32
1.9.2.3	Multicapas de enzima y mediador inmovilizados.....	33
1.9.2.3.1	El modelo de Pratt-Bartlett	33
1.9.2.3.1.1	Variables adimensionales	36
1.9.2.3.1.2	Condiciones de contorno y flujos	37
1.9.2.3.1.3	Soluciones analíticas aproximadas	39
1.10	Métodos de inmovilización de enzimas y mediadores	39
1.10.1	Autoensamblado electrostático.....	40
1.10.2	El sistema MPS/PAH-Os/GOx.....	42
1.10.3	El concepto de enzima cableada.....	44
1.11	Objetivos.....	46



	Capítulo 2. Materiales y métodos	49
2.1	Técnicas Instrumentales .....	49
2.1.1	Técnicas Electroquímicas .....	49
2.1.1.2	Voltametría Cíclica de barrido lineal .....	50
2.1.1.2.1	Voltametría cíclica de una especie electroactiva presente solución sobre un electrodo inerte .....	51
2.1.1.2.2	Voltametría cíclica de una especie electroactiva adsorbida sobre el electrodo .....	53
2.1.1.3	Cronoamperometría .....	54
2.1.1.4	Electrodo rotatorio .....	55
2.1.1.5	Instrumentación.....	
2.1.1.6	Materiales .....	55
2.1.1.6.1	Electrodos .....	55
2.1.1.6.1.1	Electrodos de trabajo.....	55
2.1.1.6.1.2	Contraelectrodo y Electrodo de referencia .....	56
2.1.1.6.2	Limpieza de electrodos .....	56
2.1.1.6.3	Celdas .....	57
2.1.2	Elipsometría .....	57
2.1.2.1	Instrumentación .....	60
2.1.2.2	Materiales .....	61
2.1.3	Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	61
2.1.3.1	Espectroscopía de fuerza atómica .....	64
2.1.3.2	Instrumentación.....	65
2.1.3.3	Materiales .....	66
2.1.4	Microbalanza de cristal de cuarzo .....	66
2.1.4.1	Instrumentación .....	68
2.1.4.2	Materiales .....	68
2.1.5	Preparación de electrodos modificados.....	68
2.1.6	Soluciones y reactivos empleados.....	69
2.2	Simulaciones numéricas .....	71
2.2.1	Simulación de voltametría cíclica para el sistema homogéneo .	71
2.2.2	Simulación de la respuesta amperométrica estacionaria para un electrodo totalmente integrado .....	71
2.2.2.1	Resolución de las ecuaciones diferenciales acopladas: el método de relajación .....	71
2.2.2.2	Ajuste de datos experimentales a las ecuaciones diferenciales resueltas en forma numérica: el método Simplex.....	72
	Apéndices al Capítulo 2	74
A.2.1	Simulación de voltametría cíclica para el sistema homogéneo .....	74
A.2.2	Resolución de ecuaciones diferenciales acopladas por método de relajación	77
A.2.2.1	Implementación del método de relajación .....	77
A.2.2.1.1	Representación de los perfiles de concentración ..	77
A.2.2.1.2	Malla adaptativa .....	78
A.2.2.1.3	Ecuaciones diferenciales .....	78
A.2.2.1.4	Representación en diferencias finitas .....	79
A.2.2.1.5	Solución de las ecuaciones .....	80
A.2.2.1.6	Condiciones de contorno.....	81
A.2.2.1.7	Flujos .....	82

	Capítulo 3. Determinación de constantes cinéticas para el sistema homogéneo $\beta$ -D-glucosa/GOx/[Os(bpy) <sub>2</sub> ClpyCOOH] <sup>+</sup>	83
3.1	Introducción .....	83
3.1.1	Modelo propuesto .....	83
3.1.2	Inactivación enzimática .....	85
3.2	Resultados experimentales.....	85
3.2.1	Obtención de $K_{MS}$ y $k_{cat}$ .....	87
3.2.2	Modificaciones al diseño experimental .....	90
3.2.3	Inactivación enzimática .....	95
3.3	Un nuevo diseño experimental .....	99
3.3.1	Obtención de $k$ .....	100
3.4	Comparación de datos experimentales con voltagramas simulados ....	101
3.5	Discusión .....	109
3.5.1	Acerca de las constantes cinéticas para el sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx .....	110
3.5.2	¿Contra qué valores comparamos? .....	113
3.6	Consideraciones finales acerca de la inactivación enzimática .....	115
	Apéndices al Capítulo 3	116
A.3.1	Decaimiento de la actividad enzimática en el sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx/ferrocenometanol	116
A.3.2	Curva de calibración para el sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx/ [Os(bpy) <sub>2</sub> ClpyCOOH] <sup>+</sup> y enzima de otro origen	116
	Capítulo 4. Dependencia del “cableado molecular” con la estructura	117
4.1	Introducción .....	117
4.2	Desarrollo experimental.....	121
4.2.1	Elipsometría .....	122
4.2.2	Microbalanza de cristal de cuarzo .....	124
4.2.3	Microscopía de fuerza atómica .....	125
4.2.4	Espectroscopía de fuerza atómica .....	127
4.2.5	Voltametría cíclica en ausencia de sustrato enzimático .....	132
4.3	Estructura de las películas	134
4.4	Electrocatalisis enzimática .....	135
4.5	Discusión	139
4.5.1	Enzima cableada .....	139
4.5.2	Constante de reoxidación $k$ .....	140
	Apéndices al Capítulo 4	143
A.4.1	Análisis de curvas de fuerza vs. distancia en espectroscopía de fuerza atómica	143
A.4.2	Permeabilidad de películas de MPS/(PAH-Os/GOx) <sub>3</sub>	144
A.4.3	Perfiles de concentración para validar el modelo de capa delgada .....	145

Capítulo 5. Análisis del sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os según el modelo cinético-difusional de Pratt-Bartlett para biosensores totalmente integrados	147
5.1	Introducción ..... 147
5.2	Una pequeña corrección al modelo de Bartlett y Pratt . 148
5.3	Casos cinéticos ..... 150
5.3.1	Diagrama de casos cinéticos ..... 152
5.4	El modelo de casos cinéticos y el sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os ... 153
5.4.1	Cinética limitada por la reacción enzima-mediador ..... 157
5.4.2	Cinética limitada por la reacción enzima-sustrato ..... 157
5.4.3	Inaccesibilidad de los casos III, IV y VI ..... 158
5.5	Resultados experimentales ..... 159
5.5.1	Análisis de los voltogramas cíclicos ..... 161
5.5.1.a	Cambios internos de pH ..... 162
5.5.1.b	Presencia de corrientes pseudo-capacitivas ..... 162
5.5.1.c.1	Agotamiento de sustrato dentro de la película ..... 163
5.5.1.c.2	Agotamiento de sustrato en la solución adyacente a la película ..... 165
5.5.2	Balance de ventajas y desventajas en el uso del electrodo rotatorio 168
5.5.3	Decisión acerca del diseño experimental definitivo y los datos a elegir para el análisis cinético posterior ..... 170
5.5.3.1	Respuesta amperométrica ..... 170
5.5.3.2	Espesores ..... 172
5.6	Análisis cinético de los resultados experimentales ..... 172
5.7	Ajuste de los datos experimentales al modelo de Pratt-Bartlett..... 174
5.7.1	Ajuste a las fórmulas analíticas aproximadas ... 176
5.7.1.1	Cinética limitada por la reacción enzima-mediador..... 176
5.7.1.2	Cinética limitada por la reacción enzima-sustrato .. 178
5.8	Ajuste de los datos a la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales 187
5.8.1	Validación del método ..... 188
5.8.2	Algunas consideraciones acerca del método Simplex ..... 189
5.8.3	Resultados de los ajustes ..... 191
5.9	Comparación de valores hallados por fórmulas analíticas y simulaciones 194
5.9.1	[E] ..... 194
5.9.2	$k$ ..... 196
5.9.3	$k[E]$ ..... 196
5.9.4	$k[E]D_e$ ..... 197
5.10	Perfiles de concentración en el interior de las películas . 197
5.11	Discusión final ..... 201
5.12	Perspectivas futuras 203
	Apéndices al Capítulo 5..... 205
A.5.1	Múltiples mínimos para un ajuste a tres parámetros 205
A.5.2	Una sutileza matemática en las fórmulas aproximadas 206
Capítulo 6. Conclusiones Generales	209
Referencias	215

## Listado de símbolos usados en esta tesis

Se listan a continuación los símbolos utilizados con frecuencia en esta tesis. Todos los símbolos se definen la primera vez que se introducen. Aquellos que solo se utilizan una única vez, no serán mencionados aquí dado que su definición se encuentra luego de su uso.

Símbolo	Significado	Unidades
$A$	Área del electrodo	$\text{cm}^2$
$D_a$	Coefficiente de difusión adimensional	
$D_S, D_A, D_E, D_{O_S}, D_{e-}$	Coefficiente de difusión de S, A, E, Os o e- respectivamente	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
$E^0, E_{M/M}^0$	Potencial formal redox del mediador	V
$E_{1/2}$	Potencial de media onda	V
E	Enzima	
$E_{\text{ox}}$	Enzima en el estado oxidado	
$E_{\text{red}}$	Enzima en el estado reducido	
ES	Complejo enzima- sustrato	
GOx	Enzima Glucosa Oxidasa	
$[E]$	En el sistema homogéneo, concentración total de enzima (enzima oxidada, reducida o como complejo enzima-sustrato)	M
$[E]$	En el sistema inmovilizado, concentración de <i>enzima cableada</i> (en estado reducido, oxidado o como complejo enzima sustrato)	M
$[E_{\text{ox}}]$	Concentración de la enzima en estado oxidado	M
$[E_{\text{red}}]$	Concentración de la enzima en estado reducido	M
$[GOx]$	Concentración total de enzima Glucosa Oxidasa	M
$\Gamma_{\text{we}}$	Concentración superficial de enzima cableada (en estructuras autoensambladas)	$\text{pmol cm}^2$
$\Gamma_{\text{QCM}}$	Concentración superficial de enzima total determinada por QCM	$\text{pmol cm}^2$
$[E_{\text{QCM}}]$	Concentración de enzima total determinada por QCM (en estructuras autoensambladas)	M
$i$	Corriente	A
$i_{\text{cat}}$	Corriente catalítica	A
$i_{\text{dif}}$	Corriente de pico voltamétrica limitada por difusión (en ausencia de reacción enzimática)	A
$J_S, J_A$	Flujo de S o A respectivamente	$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$

$K_S$	Coefficiente de partición de S entre la película y la solución	
$K_{MS}$	Constante de Michaelis-Menten	M
$K_{MS,app}$	Constante aparente de Michaelis-Menten obtenida del análisis cinético del biosensor	M
$k_1$	Constante de velocidad de ida de la enzima	$M^{-1} s^{-1}$
$k_{-1}$	Constante de velocidad de vuelta de la enzima	$s^{-1}$
$k_2$	Constante de velocidad de ida de la reacción enzima-mediador	$M^{-1} s^{-1}$
$k_{-2}$	Constante de velocidad de vuelta de la reacción enzima-mediador	$s^{-1}$
$k_{cat}$	Constante de velocidad de ruptura de ES para producir E y P	$s^{-1}$
$k$	Constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre la enzima y el mediador	$M^{-1} s^{-1}$
$K_{is}$	Constante de inhibición enzimática por acción del sustrato	$M^{-1}$
$k_{red}$	Cociente entre $k_{cat}$ y $K_{MS}$ para una reacción enzima-sustrato	$M^{-1} s^{-1}$
$l$	Espesor de la película	nm
A	Mediador redox (en su forma activa)	
B	Mediador redox en su forma reducida (inactiva)	
PAH-Os	polímero polialilamina covalentemente unido a $Os(bpy)_2ClpyCOH$	
$[A]$	Concentración del mediador en la forma oxidada	M
$[B]$	Concentración del mediador en la forma reducida	M
$[B]_{\infty}$	Concentración del mediador en la forma reducida en el seno solución	M
$[A]_{\Sigma}$	Concentración total de mediador, tanto en la forma oxidada como reducida	M
$[Os_{\Sigma}]$	En el sistema homogéneo, concentración total de complejo $[Os(bpy)_2ClpyCOOH]^+$	M
$[Os_{\Sigma}]$	En el sistema inmovilizado, concentración total de Os como PAH-Os en la película	M
$[Os_{(III)}]$	Concentración de centros redox en estado oxidado para el sistema inmovilizado	M
P	Producto de la reacción enzimática	
S	Sustrato	
$[S]$	Concentración de S	M
$[S]_{\infty}$	Concentración de sustrato en el seno de la solución	M
$t$	Tiempo	s
$T$	Temperatura	K
$v$	Velocidad de la reacción enzimática	$M s^{-1}$

$v_{\max}$	Velocidad de reacción enzimática máxima alcanzable	$M s^{-1}$
$W$	Velocidad de rotación del electrodo de disco rotante	Hz
$X_D$	Espesor de la capa difusional	cm
$X_k$	Largo cinético	cm
$x$	Distancia desde un punto de la solución a un electrodo	cm
$\nu$	Viscosidad cinemática	$cm^2 s^{-1}$
$F$	Constante de Faraday	$C mol^{-1}$
$R$	Constante universal de los gases	$JK^{-1}mol^{-1}$
$e^-$	Electrón	
$\nu$	Velocidad de barrido en voltametría cíclica	$V s^{-1}$
$Q$	Carga redox adsorbida sobre un electrodo	C
$\zeta$	Coefficiente estequiométrico	
$\chi^2$	Parámetro estadístico estimativo del error en Simplex	
$R^2$	Parámetro estadístico de ajuste de datos a una función determinada	
$E_y$	Módulo de Young, en espectroscopía de fuerza	$Nm^{-2}$
$\delta$	Indentación, en espectroscopía de fuerza	nm
Letras griegas en general	Parámetros adimensionales	

# Capítulo 1.

## Introducción

En el presente capítulo, definiremos qué entendemos por biosensores. En relación con este concepto, haremos una breve introducción a las enzimas y a la cinética enzimática. Desarrollaremos la idea de electrodos enzimáticos amperométricos y la necesidad de avanzar en dirección de dispositivos totalmente integrados.

Analizaremos por qué es necesario disponer de modelos físico-químicos que describan cuantitativamente la respuesta de estos dispositivos y presentaremos los modelos más relevantes que han sido reportados a la fecha. Cerraremos el capítulo, discutiendo los objetivos del presente trabajo de tesis doctoral.

### **1.1 Biosensores**

Un biosensor podría ser definido como un dispositivo que detecta un analito y convierte un proceso bioquímico en una señal o respuesta mensurable. Como en todo tipo de sensores, suele buscarse alta especificidad en la respuesta para la sustancia de interés.

La biología nos provee de macromoléculas que interactúan con muy alta especificidad con otras moléculas más pequeñas: proteínas en general, enzimas, anticuerpos, ADN, entre otras. Es un gran desafío para nosotros utilizar estas moléculas como sensores y tratar de generar una señal cuantificable de su interacción con un analito de interés.

En esta tesis, trabajaremos con sensores electroquímicos. Estos basan su operación en la generación de una señal eléctrica, *i.e.* traducen el reconocimiento del analito en una señal eléctrica.

### **1.2. Enzimas**

Las enzimas son macromoléculas biológicas de estructura compleja que catalizan reacciones dentro de la célula. Son altamente específicas para un determinado sustrato (o a lo sumo, muy pocos sustratos).

Las enzimas son proteínas, con un centro catalítico o grupo prostético. La estructura alrededor de este centro es tal, que solo la molécula cuya reacción va a ser catalizada

puede acercarse al mismo y reaccionar (o en algunos casos, un grupo muy pequeño de moléculas), esta interacción selectiva suele denominarse modelo de llave-cerradura.

Por técnicas bioquímicas las enzimas pueden extraerse de los organismos que las sintetizan y trabajar con ellas *in vitro*, incorporándolas como sensores a nuestros sistemas de interés. Al día de hoy no se han sintetizado artificialmente catalizadores que alcancen la selectividad y eficiencia que alcanza una enzima.

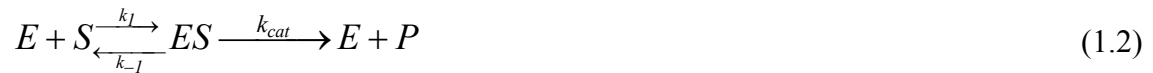
### 1.2.1 Cinética Enzimática

La descripción más sencilla de la cinética enzimática de estado estacionario está basada en los trabajos de Michaelis y Menten [1]. Este tratamiento asume que el sustrato forma un complejo con la enzima en un paso reversible y que la enzima, E, el sustrato, S, y este complejo enzima-sustrato, ES, mantienen un equilibrio. La ruptura irreversible de ES da lugar al producto, P.



La segunda suposición de este modelo es que puede aplicarse la aproximación del estado estacionario a la concentración de ES.

Un mecanismo un poco más general, donde se tienen en cuenta explícitamente las constantes de reacción de ida y vuelta para la formación de ES fue propuesto por Briggs y Haldane [2].



Asumiendo estado estacionario para ES y que la concentración de sustrato es mucho mayor que la de enzima (como suele ocurrir generalmente) se llega a la expresión para la velocidad de reacción, v, en medio homogéneo:

$$v = \frac{k_1 k_{cat} [E][S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_{cat}} \quad (1.3)$$

donde las expresiones entre corchetes denotan acá, y en el resto de esta tesis, concentraciones de las especies respectivas y donde particularmente [E] se refiere a la concentración total de enzima en cualesquiera de sus distintas formas.

La ecuación (1.3) puede reescribirse en la forma generalmente más conocida de ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{d[S]}{dt} = \frac{k_{cat} [E][S]}{K_{MS} + [S]} = k_E [E][S] \quad (1.4)$$



donde

$$k_E = \frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{MS}} + [S]} \quad (1.5)$$

y

$$K_{\text{MS}} = \frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1} \quad (1.6)$$

es la constante de Michaelis-Menten.

El modelo se reduce al modelo inicial de Michaelis-Menten si

$$K_{\text{MS}} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (1.7)$$

cuando  $k_{-1} \gg k_{\text{cat}}$ .

De la ecuación (1.4) podemos ver que a bajas concentraciones de sustrato ( $[S] \ll K_{\text{MS}}$ ) la velocidad de reacción aumenta linealmente con la concentración de sustrato si aproximamos por:

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E][S]}{K_{\text{MS}}} \quad (1.8)$$

También observamos que cuando  $[S] = K_{\text{MS}}$  la velocidad de reacción es exactamente la mitad de la velocidad de reacción máxima. Esta se alcanza a alta concentración de sustrato, y es igual a  $k_{\text{cat}}[E]$ . Es decir, la respuesta general predicha por (1.4) es no lineal en la concentración de sustrato.

Esta no linealidad, acarreará consecuencias muy importantes en el tratamiento acoplado del problema de difusión-reacción que describiremos en breve.

Para los casos donde  $k_{-1} \gg k_{\text{cat}}$ ,  $K_{\text{MS}}$  puede tomarse como una medida de la fuerza de unión entre la enzima y el sustrato. Un alto valor de  $K_{\text{MS}}$  se corresponde con un complejo ES débil.

El comportamiento descrito hasta acá corresponde a la cinética de enzimas de un único sustrato. En estos casos la enzima se comporta como un catalizador, es decir, permanece en la misma forma antes y después de la reacción con el sustrato. En la siguiente sección trataremos el caso de las enzimas *ping-pong* o redox.

## 1.2.2 Enzimas de dos sustratos

### 1.2.2.1 Cinética

Un grupo muy importante de enzimas son las denominadas *enzimas redox*, u *óxido-reductasas*. Estas son enzimas que catalizan reacciones redox, donde una molécula se

oxida o se reduce. Luego de la reacción, la enzima queda con un exceso o defecto de electrones, del cual debe liberarse para reconvertirse a su estado inicial y poder reaccionar con otra molécula. Para este fin se necesita una segunda especie, conocida como *mediador*. El mediador también es una especie redox, que tomará o cederá electrones de la enzima para reconvertirla a su estado de oxidación original.

Estas enzimas también son conocidas como enzimas de dos sustratos, conociéndose comúnmente al mediador como segundo sustrato. Un ejemplo de enzima redox es la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), a la cual de ahora en más nos referiremos como GOx. Describiremos más adelante un poco más detalladamente las características de esta enzima. Adelantemos por ahora que cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico según:



$C_6H_{12}O_6$  y  $C_6H_{12}O_7$  representan a la glucosa y al ácido glucónico respectivamente. FAD representa flavina adenina dinucleótido, que es el grupo prostético de GOx.  $FADH_2$  es la forma reducida de FAD.

Se observa que luego de la reacción enzimática y la generación de producto, la enzima no se encuentra en su estado inicial y disponible para oxidar otra molécula de glucosa. La enzima se regenera por la acción del mediador natural,  $O_2$ , *in vivo* o *in vitro* la reacción de regeneración es:



Las reacciones (1.9) y (1.10) son un ejemplo del mencionado mecanismo de *ping-pong*, o de dos sustratos.

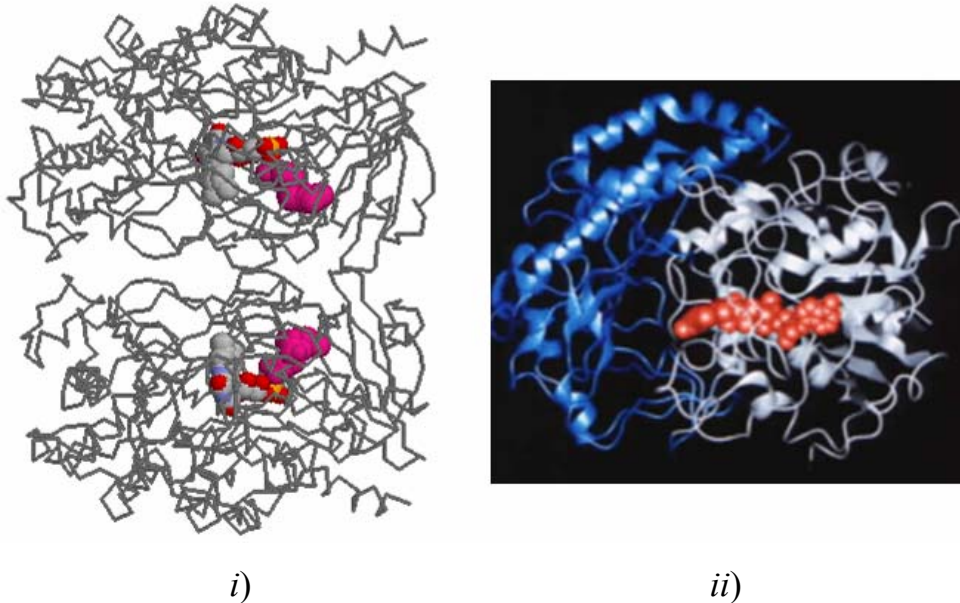
Ejemplos análogos pueden plantearse para reductasas, es decir, enzimas que catalizan reducciones. Como en la presente tesis trabajaremos con una oxidasa, en general nos referiremos preferentemente a las oxidasas, a que los sustratos se oxidan y los mediadores se reducen. Recuérdese sin embargo que el caso inverso también podría ocurrir.

### 1.2.2.2 Glucosa Oxidasa (E.C.1.1.3.4)

Mencionamos recién a la enzima Glucosa oxidasa (GOx).

GOx es una proteína dimérica, representada en la figura 1.1. El peso molecular reportado fluctúa entre 151 y 186 KDa. Contiene un grupo FAD (flavina adenina dinucleótido) por subunidad, fuertemente unido ( $K_a = 10^{-10}$ ) como cofactor (dos sitios totales por enzima).

El FAD no se encuentra covalentemente unido, con lo cual puede perderse por desplegamiento parcial de la proteína. La enzima está glicosilada con un contenido de hidratos de carbono de aproximadamente el 16% según la fuente, de los cuales aproximadamente un 80% está constituido por manosa [3].



**Figura 1.1:** *i)* Estructura de rayos X del dímero de GOx deglicosilado en un 95%. *ii)* Estructura de una subunidad de GOx, esquematizando el FAD, las  $\alpha$ -hélices y las hojas- $\beta$ .

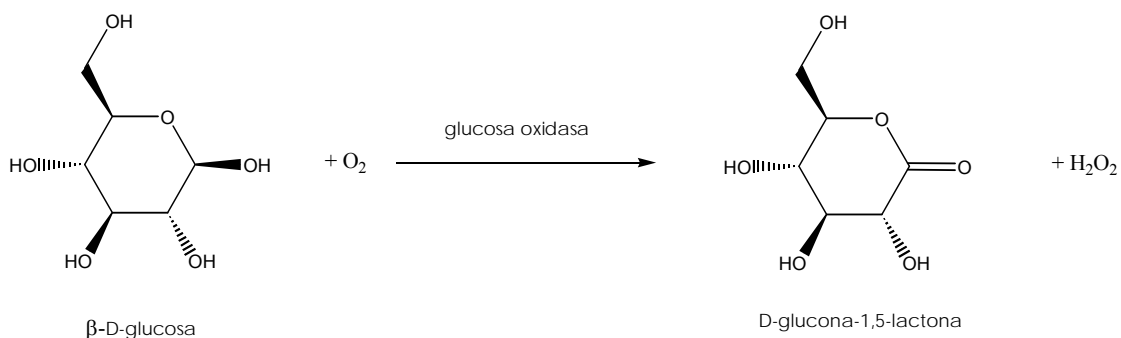
Los dos monómeros son idénticos, y están unidos no-covalentemente por 120 puntos de contacto. Cada monómero es un esferoide compacto, de dimensiones aproximadas 60 Å x 52 Å x 37 Å. Las dimensiones correspondientes al dímero son 70 Å x 55 Å x 80 Å, mostrando una geometría elipsoidal con un alto contenido de estructura secundaria (28%  $\alpha$  hélices, 15% hojas  $\beta$ ). La estructura terciaria está caracterizada por dos sistemas diferenciados de hojas  $\beta$ , uno de ellos forma parte del sistema que mantiene unido al FAD [3].

La mínima distancia entre el FAD y la superficie de la enzima es de 13 Å. Las dos unidades de isoaloxazina (parte activa del FAD) están separadas por aproximadamente 40 Å, lo que impide la comunicación eléctrica entre las mismas. Además este grupo prostético se encuentra cerca del fondo de una cavidad profunda [3].

GOx tiene un coeficiente de difusión de  $4.97 \times 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  a 20°C y un coeficiente de sedimentación de 8.0S a pH 5.5. Su espectro de absorción posee máximos en 278, 382 y

452nm, con relación de absorbancia 12.7:0.92:1.0. El coeficiente de extinción molar a 450nm es de  $1.41 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [3]. Su punto isoeléctrico es 4.2.

En la sección anterior nombramos a GOx como la enzima que cataliza la oxidación de la glucosa. Estrictamente hablando, GOx cataliza únicamente la oxidación del anómero  $\beta$ -D-glucosa [3]:



**Figura 1.2:** reacción de oxidación de  $\beta$ -D-glucosa catalizada por GOx

GOx no reacciona con ninguna forma de L-glucosa.

En solución, la D-glucosa puede encontrarse en cualquiera de cinco formas: 2 anillos de 6 centros,  $\alpha$ -D-glucopiranososa, y  $\beta$ -D-glucopiranososa; 2 anillos de 5 centros,  $\alpha$ -D-glucofuranosa, y  $\beta$ -D-glucofuranosa y la forma abierta, D-glucosa aldehído. Una solución acuosa de D-glucosa alcanzará una composición estable de las distintas formas después de aproximadamente un día, dependiendo la temperatura. Esta lenta interconversión se denomina mutarrotación. Las formas más abundantes son las piranosas, con abundancias aproximadas del 63% y 36% para las formas  $\beta$  y  $\alpha$  respectivamente. Las otras tres formas en conjunto no superan el 1% del total [3].

GOx reacciona con el anómero  $\alpha$  una velocidad igual al 0.64% de su velocidad de reacción del anómero  $\beta$ , o dicho de otra forma tiene una especificidad mucho más alta para el anómero  $\beta$  [3].

Se han reportado cientos de trabajos en el campo de biosensores basados en GOx. Las principales razones de esta tan amplia difusión son, entre otras:

- i) bajo costo de la enzima y su sustrato;
- ii) su alta especificidad;
- iii) su alta estabilidad, particularmente a temperatura ambiente, lo que permite por un lado su utilización en electrodos que requieren varias horas de preparación (debido al método de inmovilización elegido, por ejemplo); y por otro lado, estudiar la performance y respuesta del electrodo a lo largo de varios días;

- iv) su alta estabilidad en un amplio intervalo de pH;
- v) alta velocidad de reacción;
- vi) alta solubilidad en agua.

Estas son también las razones por las que nosotros decidimos trabajar con esta enzima.

La alta estabilidad de la enzima parece estar asociada al recubrimiento hidrocarbonado. Casualmente, este recubrimiento parecería actuar como barrera para la transferencia directa [4] de electrones entre la enzima y el electrodo en un electrodo enzimático amperométrico.

### 1.3 Mediadores artificiales

Hemos mencionado que las enzimas son altamente específicas para sus sustratos. No solo muestran velocidad de reacción insignificantes con otras moléculas distintas de la molécula con la que actúan preferentemente, sino que por lo general también son altamente específicas frente a uno de dos isómeros cuando se da esta posibilidad.

En contraste, las enzimas no son específicas para con un mediador. Pueden usarse *in vitro* muchas otras especies redox alternativas en reemplazo del mediador natural.

Volviendo al caso de GOx, en el campo de los biosensores es muy común reemplazar al mediador natural, O<sub>2</sub>, por un mediador otro mediador redox, usualmente denominado, mediador artificial. Las razones de este cambio son variadas.

Las concentración de O<sub>2</sub> en soluciones acuosas no es constante y está limitada por la baja solubilidad de los gases en general y del O<sub>2</sub> en particular en agua.

La detección amperométrica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiere potenciales bastante altos, aproximadamente 850mV (vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> 3M). Esto puede resultar un problema cuando especies interferentes están presentes, como ser el caso de muestras biológicas de matrices complejas, sangre, orina, etc. ácido ascórbico, paracetamol (acetamidafenol), o ácido úrico podrían estar presentes en las mismas en concentraciones variables y contribuirían a una corriente de fondo este elevado potencial.

Finalmente se han asociado efectos inactivantes del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre GOx [5, 6].

Si se utiliza un mediador artificial, se puede operar el sistema a potenciales 300mV (vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> 3M) o inferiores, lograr solubilidades mucho más altas que con O<sub>2</sub>, se evitan las interferencias [7], y los efectos deletéreos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ha reportado una enorme cantidad de especies redox que actúan efectivamente en la mediación de GOx: ferrocenos sustituidos, ferrocianuro, quinonas, complejos de rutenio y de Os, viológenos y tetratiofulvaleno, entre otros [3, 8, 9].

### 1.3.1 Dos mediadores redox de interés

En esta tesis se trabajó con dos mediadores redox. Ambos sintetizados en el Laboratorio de Electroquímica Molecular.

En la figura 1.3.a se muestra la estructura del complejo  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$ . Este compuesto podrá actuar como mediador soluble. En la figura 1.3.b se muestra un polímero modificado con un complejo de Os que a partir de ahora y en el resto de la tesis denominaremos PAH-Os.

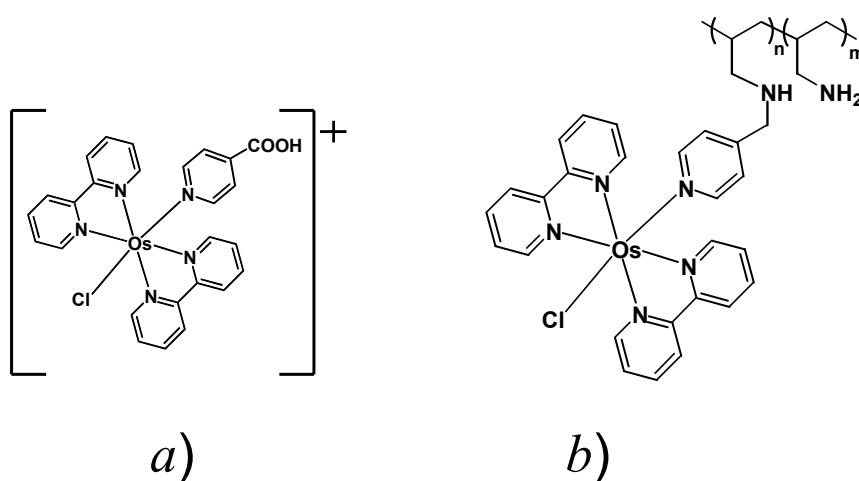


Figura 1.3: a) Fórmula del complejo  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$   
b) Fórmula molecular del polímero PAH-Os

PAH-Os se sintetiza por unión del complejo  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOH}]^+$  a los grupos amino de la polialilamina (mediante la formación de una imina y posterior reducción;  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOH}]^+$  representa al mismo complejo mostrado en 1.3.a, pero con un aldehído, en lugar de un ácido). El complejo de Os anclado al polímero tiene la suficiente movilidad como para mediar la oxidación de GOx [10] (volveremos sobre este punto al discutir el concepto de enzima cableada en la sección 1.10.3). Como resultado, PAH-Os actúa como un mediador redox, pero además, al formar parte de una cadena polimérica, la macromolécula de conjunto muestra otras propiedades de interés, como ser la capacidad de formar estructuras por autoensamblado electrostático, como veremos más adelante. Así como se muestran, en ambos compuestos el Os se encuentra en estado de oxidación +2. Este centro de Os, puede oxidarse a estado +3.

#### **1.4 Electroquímica directa**

Una última alternativa para reconvertir a una enzima de dos sustratos a su estado natural, es producir la oxidación o reducción electroquímicamente.

Con proteínas o enzimas pequeñas, como citocromo-C o L-aminoácido oxidasa (E.C. 1.3.4.2) esto puede lograrse oxidando la proteína directamente y sin intermediarios sobre la superficie de un electrodo inerte [11].

Como mencionamos recién, esta estrategia no es factible con moléculas del tamaño de GOx, donde no importa en qué posición se adsorba la enzima sobre el electrodo, el grupo prostético queda demasiado lejos de la superficie del mismo como para que se produzca transferencia electrónica directa.

#### **1.5 Biosensores enzimáticos electroquímicos**

Procesos como la catálisis enzimática, donde el analito de interés es convertido a producto, pueden generar una corriente eléctrica sobre un electrodo, producir cambios de potencial o de conductividad.

Los métodos electroquímicos más sencillos que pueden aplicarse al diseño de biosensores son los amperométricos y los potenciométricos [12, 13].

Los métodos amperométricos conllevan la medición de la corriente eléctrica que circula al mantener el electrodo de trabajo a un potencial constante y conocido.

Los métodos potenciométricos implican la medición del potencial que se desarrolla debido a la presencia de las distintas cuplas redox, en ausencia de circulación de corriente [14-21]. El potencial queda establecido por la relación de concentraciones en la superficie del electrodo mediante la ecuación de Nernst. Una desventaja importante de este tipo de sensores es que la respuesta es logarítmica, no lineal, debido justamente a la ecuación de Nernst. En el caso de GOx, podría por ejemplo detectarse el potencial que se desarrolla por la generación de una especie electroactiva como  $H_2O_2$ , como se muestra en la ecuación (1.10).

También pueden fabricarse sensores que hagan uso de cambios en la conductividad [22], o de cambios en el estado de oxidación de un polímero conductor [23]. Estos enfoques han sido los menos estudiados.

En los métodos amperométricos, por lo general se mide la corriente generada por el mediador redox al regenerarse sobre el electrodo. La corriente,  $i$ , es proporcional al flujo o gradiente del perfil de concentración del mediador en la superficie del electrodo:

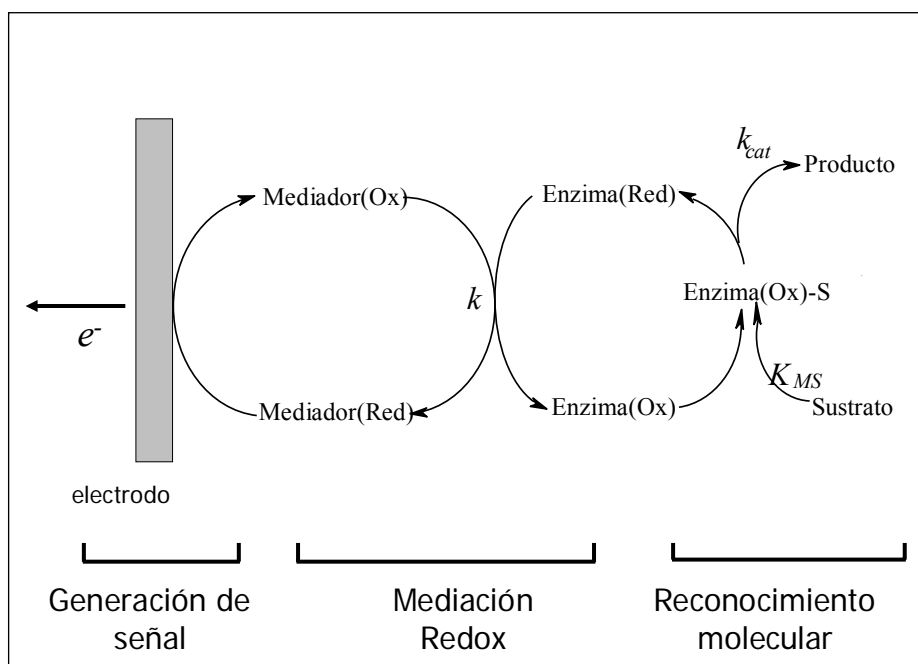
$$i = nFAJ_z = -nFAD_z \left( \frac{d[Z]}{dx} \right)_{x=0} \quad (1.11)$$

donde  $n$  es el número de electrones que intercambia la especie  $Z$  sobre el electrodo,  $F$  el Faraday,  $A$  el área del electrodo,  $J_z$  el flujo de  $Z$  en la dirección normal al electrodo,  $D_z$  su coeficiente de difusión y  $x$  la distancia en la dirección normal al electrodo.

En los sensores amperométricos, las cantidades relativas de mediador oxidado y reducido en la superficie del electrodo son controladas por el potencial aplicado.

En lo que resta de esta tesis, nos concentraremos únicamente en sensores electroquímicos de tipo amperométrico.

La figura 1.4 muestra los tres pasos fundamentales en el funcionamiento de un biosensor enzimático amperométrico: reconocimiento molecular, mediación redox y generación de señal.



**Figura 1.4:** 3 pasos fundamentales en el funcionamiento de un biosensor enzimático amperométrico: Reconocimiento molecular, mediación redox y generación de señal.

Para sensores enzimáticos amperométricos, donde la respuesta del sensor está limitada por la cinética enzimática, la corriente es una medición directa de la velocidad de reacción. El conocimiento de  $K_{MS}$  permite operar el sensor en la región donde la respuesta será lineal, es decir, para concentraciones inferiores a  $K_{MS}$ .

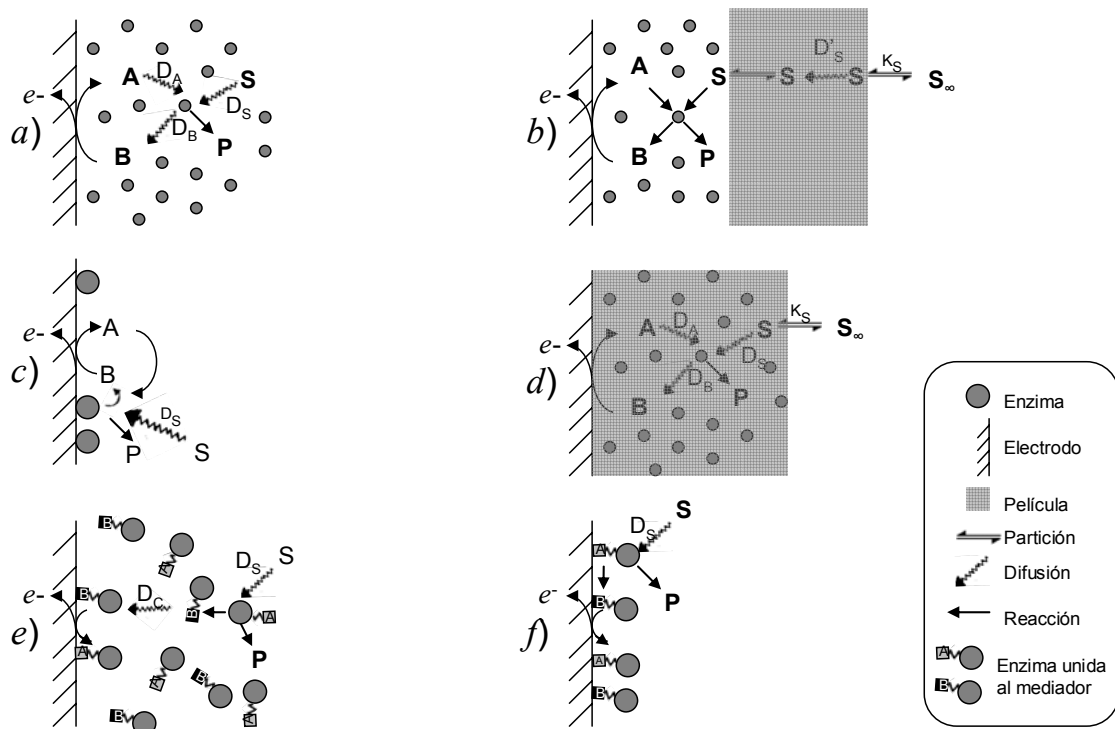
El otro uso de  $K_{MS}$  es con el propósito de comparar entre distintas condiciones experimentales para un mismo sensor o entre distintos sensores sometidos a las mismas



condiciones experimentales. Podemos definir el parámetro  $K_{MS, app}$ , o constante aparente como el valor de concentración de sustrato para el cual se obtiene una respuesta en corriente igual a la respuesta máxima alcanzable a saturación de sustrato con el mismo sensor. Entonces si la constante aparente que se obtiene del análisis del sensor es igual a  $K_{MS}$  de la enzima, puede concluirse que la respuesta amperométrica está limitada por la cinética enzimática. Si difiere, entonces otros procesos están limitando total o parcialmente la respuesta.

### 1.6 Distintos diseños de electrodos enzimáticos

La figura 1.5 esquematiza los distintos diseños posibles en la construcción de un electrodo enzimático amperométrico.



**Figura 1.5:** Distintos diseños posibles en la construcción de un electrodo enzimático amperométrico. *a)* sistema homogéneo; *b)* membrana-enzima-electrodo (enzima atrapada entre una membrana y el electrodo); *c)* monocapa de enzima; *d)* enzima atrapada-electrodo (enzima atrapada en la membrana sobre el electrodo); *e)* enzima unida al mediador redox en solución; *f)* enzima unida al mediador redox y unidos al electrodo. (En estos dos últimos casos la unión puede ser covalente o la enzima se modifica por técnicas de biología molecular).

#### 1.6.1 El sistema homogéneo

El diseño más sencillo es disponer de las tres especies, sustrato, enzima y mediador en solución y usar un electrodo inerte, para registrar la corriente, usualmente, Pt, carbono vítreo u Au, entre otros [24-28]. Este diseño se muestra en el panel *a)* de la figura 1.5.

Un segundo diseño posible consiste en modificar a la enzima de forma tal que el mediador esté *unido* a ella (puede ser una unión covalente inespecífica o puede producirse una enzima modificada por técnicas de biología molecular[29-39]). Este caso se muestra esquemáticamente en el panel *e*). Su tratamiento cinético es distinto al de la enzima en su estado natural.

### **1.6.2 Enzimas inmovilizadas**

El sistema homogéneo no resulta práctico para ser usado como biosensor.

Idealmente un biosensor no debería requerir la adición de ningún reactivo, más allá de la muestra incógnita de analito (por ejemplo unas gotas de sangre, orina, etc.). Además debería ser reutilizable. Esto requeriría que todos los reactivos estén autocontenidos en el electrodo. De esta forma, soluciones que contengan el analito de interés pueden ser alternativamente puestas en contacto con el electrodo, se generará la señal esperada, y luego podrá reutilizarse el electrodo, poniéndolo en contacto con una nueva muestra incógnita.

El primer paso para diseñar este tipo de dispositivos autocontenidos es inmovilizar o atrapar la enzima sobre la superficie del electrodo de alguna forma [40].

Beneficios secundarios de este tipo de diseños son la utilización de una menor cantidad de enzima y eventualmente la obtención de mayores concentraciones locales de enzima, dado que la inmovilización concentra a la enzima.

#### **1.6.2.1 Membrana-enzima-electrodo (mem)**

Los primeros intentos de inmovilización consistieron en el atrapamiento de una solución concentrada de enzima detrás de una membrana. Este diseño se muestra en el panel *b*) de la figura 1.5. El atrapamiento puede lograrse mezclando la enzima con un gel o mojando una red de nylon poroso en solución concentrada de enzima y sosteniéndola contra el electrodo con una membrana de celofán [41]. Puede considerarse que la enzima está en un ambiente acuoso, con lo cual su comportamiento cinético debería ser el mismo que se determina en solución. La membrana debe ser lo suficientemente porosa para permitir la entrada del analito. Aquí reside la desventaja de este diseño, dado que esta porosidad normalmente no permitirá retener al mediador redox y formar un electrodo totalmente autocontenido. Otra desventaja es la posible pérdida parcial de la enzima a través de la membrana.

### **1.6.2.2 Electroodos de membrana-enzima (eme)**

Este diseño implica inmovilizar de alguna manera a la enzima en una membrana sobre la superficie del electrodo. Pueden construirse membranas o películas muy delgadas donde se adsorbe una única monocapa de enzima (aproximadamente); o películas de espesores mucho mayores a los de las dimensiones de la enzima. Varios métodos de atrapamiento pueden utilizarse para inmovilizar solo una monocapa o mucha más cantidad de enzima. Estos diseños se muestran esquemáticamente en los paneles *c*) y *d*) (monocapa y películas más gruesas, respectivamente) de la figura 1.5. Si bien estos dos diseños parecen similares, el modelado de los mismos es muy distinto. En el panel *f*) se muestra finalmente el caso análogo a *e*), enzima unida al mediador, pero para una monocapa inmovilizada sobre el electrodo.

Las distintas posibilidades reportadas para la inmovilización de enzimas serán discutidas con detenimiento en la sección 1.10.

Con los electroodos membrana-enzima (eme) se han obtenido las mejores performances al día de hoy y es por eso que es la configuración más popular y reportada.

### **1.6.3 Mediador inmovilizado**

Inmovilizar la enzima es sólo un paso para el diseño de un biosensor amperométrico totalmente integrado. El segundo paso, es lograr coinmovilizar al mediador redox. Además será necesario conseguir que a pesar del movimiento limitado impuesto por la inmovilización, el mediador logre comunicarse efectivamente con la enzima de forma tal de producir la mediación redox. Las técnicas para lograr este objetivo serán discutidas en la sección 1.10.

La clasificación de *totalmente integrado* será utilizada en esta tesis para referirnos siempre a este tipo de sensores (coinmovilización de enzima y mediador).

## **1.7 Modelado de biosensores**

El objetivo de modelar el comportamiento cinético de un biosensor es identificar los factores experimentales clave (como velocidades de reacción, de transferencia de masa, concentraciones de moléculas de reconocimiento, etc.) que determinan la respuesta o señal. A su vez, se desea tratar de establecer una relación entre estos factores, la concentración de analito y la respuesta del sensor.

Si se tiene un modelo robusto para un dado electrodo enzimático o biosensor podemos valernos de este modelo en varios sentidos.

Está claro que varios factores cinéticos distintos estarán involucrados en el funcionamiento general de cualquier biosensor amperométrico. Esto incluye las reacciones entre la enzima y su sustrato, entre la enzima y el mediador redox, y entre el mediador redox y el electrodo. A estos factores debemos sumar los distintos procesos de transferencia de masa que acercarán los reactivos al electrodo y dispersarán a los productos, que también jugarán su rol.

Ninguna medición única de la respuesta de un electrodo puede por sí misma arrojar luz sobre el importancia relativa de cada uno de los distintos procesos cinéticos. Sin embargo, si comparamos una buena cantidad de datos, obtenidos a lo largo de un intervalo lo suficientemente grande de condiciones diferentes, con un modelo cinético para este tipo particular de electrodo, podremos obtener un conocimiento más detallado del sistema, de qué forma trabaja y qué características controlan su performance. A su vez, este conocimiento será de gran utilidad para el científico experimental. A futuro podrá usar estas herramientas para diseñar nuevos experimentos o para mejorar racionalmente el funcionamiento de un sensor ya existente para una aplicación específica.

Por el contrario, en la ausencia de un modelo cinético adecuado, será necesario realizar una gran cantidad de ensayos *a ciegas*, para mejorar por prueba y error la performance de un dado sensor. Este acercamiento al problema consume tiempo y recursos. Y deberá ser repetido cada vez que un sistema similar quiera ser ensayado.

Postular y probar un modelo cinético no es únicamente una útil aproximación experimental al sistema en materia de tiempo y recursos. Como mencionamos anteriormente, también arroja evidencia sobre los mecanismos involucrados en el funcionamiento del sistema. Resulta intelectualmente desafiante y eventualmente se llega a nuevos conocimientos acerca de un sistema determinado [42].

Para desarrollar un modelo cinético es necesario describir los distintos procesos físico-químicos que ocurren dentro del sistema en la forma de ecuaciones matemáticas.

Comencemos por analizar un sistema sustrato-enzima-mediador genérico, es decir, no especifiquemos por el momento las condiciones de contorno (sistema homogéneo, enzima y/o mediador inmovilizados, etc.).

Asumiendo cinética de tipo Michaelis-Menten, las reacciones más generales que pueden escribirse para un electrodo enzimático amperométrico son:





Insistimos en que la simbología introducida en este capítulo será mantenida a lo largo de toda esta tesis. S y P representan al sustrato y el producto de la reacción enzimática.  $E_{\text{ox}}$  y  $E_{\text{red}}$  son las formas oxidada y reducida de la enzima, respectivamente. El mediador reducido B, es reoxidado para producir A solo en la superficie del electrodo.  $\zeta$  es un coeficiente estequiométrico y  $n$  es el número de electrones intercambiado por B sobre el electrodo.

Recordemos la expresión de velocidad para una cinética en fase homogénea de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E_{\Sigma}] [S]}{K_{\text{MS}}} \quad (1.8)$$

En el caso homogéneo, la concentración de sustrato S es sólo función del tiempo, explícitamente:

$$v = \frac{d[S](t)}{dt} = \frac{k_{\text{cat}} [E_{\Sigma}] [S](t)}{K_{\text{MS}}} \quad (1.15)$$

Contrariamente, en el caso heterogéneo, las concentraciones de todas las especies serán función tanto del tiempo como de la posición en el espacio.

Las variaciones de concentración producto de la cinética enzimática, estarán dados por:

$$\frac{\partial [A]}{\partial t} = -k\zeta [E_{\text{red}}] [A] \quad (1.16)$$

$$\frac{\partial [S]}{\partial t} = -\frac{k_{\text{cat}} [E_{\text{ox}}] [S]}{K_{\text{MS}} + [S]} \quad (1.17)$$

$$\frac{\partial [E_{\text{ox}}]}{\partial t} = k [E_{\text{red}}] [A] - \frac{k_{\text{cat}} [E_{\text{ox}}] [S]}{K_{\text{MS}} + [S]} \quad (1.18)$$

La expresión utilizada a la derecha de (1.16) y (1.18) para expresar la cinética de reoxidación de la enzima por parte del mediador no es arbitraria. La reacción entre el mediador y la enzima no ocurre en un solo paso sino que procede a través de una forma semiquinóidea de la enzima (ver la propuesta de mecanismo de Bourdillon *y col.* [25]). Puede demostrarse que la reacción de reoxidación puede estudiarse cinéticamente como una reacción de orden 1 en el mediador, teniendo en cuenta el coeficiente estequiométrico  $\zeta$  [25, 43, 44].

Además de la cinética enzimática, debemos considerar el transporte de masa para cada una de estas especies, regido por la segunda ley de Fick.

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} \quad (1.19)$$

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} \quad (1.20)$$

$$\frac{\partial[E_{ox}]}{\partial t} = D_E \frac{\partial^2[E_{ox}]}{\partial x^2} \quad (1.21)$$

Donde  $D_A$ ,  $D_S$  y  $D_E$  son los coeficientes de difusión para el mediador, el sustrato y la enzima respectivamente. En el caso de que la enzima se encuentre inmovilizada en una película, no corresponderá usar (1.21). De todas formas, como los coeficientes de difusión de enzimas suelen ser aproximadamente un orden de magnitud más pequeños que sus análogos para moléculas más pequeñas (como sustratos o mediadores redox), es práctica común despreciar la difusión de la enzima frente a la del sustrato y mediador, aún en el caso homogéneo. Señalemos finalmente, que en el caso de que la enzima se encuentre atrapada dentro de una película, los coeficientes  $D_A$  y  $D_S$  a utilizar deberán ser los coeficientes de difusión en este nuevo medio, que podrán diferir respecto a los valores reportados en solución.

Entonces en el caso más sencillo, podemos combinar las expresiones que describirán la variación temporal de las concentraciones

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} - \zeta k[E_{red}][A] \quad (1.22)$$

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}[E_{ox}][S]}{K_{MS} + [S]} \quad (1.23)$$

$$\frac{\partial[E_{ox}]}{\partial t} = D_E \frac{\partial^2[E_{ox}]}{\partial x^2} + k[E_{red}][A] - \frac{k_{cat}[E_{ox}][S]}{K_{MS} + [S]} \quad (1.24)$$

donde asumimos transporte de masa solo debido a difusión en una dimensión en dirección a un electrodo plano. Pese a no explicitarlo, en (1.22) a (1.24), todas las concentraciones son función del tiempo y de la posición en el espacio (distancia a la superficie del electrodo).

En el caso de una enzima inmovilizada, no se incluye el primer término a la derecha de la igualdad (1.24).

En el estado estacionario,

$$\frac{\partial [E_{ox}]}{\partial t} = \frac{\partial [A]}{\partial t} = \frac{\partial [S]}{\partial t} = 0 \quad (1.25)$$

A partir de (1.25) tenemos entonces que

$$[E_{red}] = \frac{k_{cat} [S] [E]}{k [A] (K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (1.26)$$

donde  $[E] = [E_{red}] + [E_{ox}]$  es la concentración total de enzima. Y haciendo uso de (1.26) y considerando estado estacionario:

$$D_A \frac{d^2 [A]}{dx^2} = \frac{\zeta k k_{cat} [A][S][E]}{k [A] (K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (1.27)$$

$$D_S \frac{d^2 [S]}{dx^2} = \frac{k k_{cat} [A][S][E]}{k [A] (K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (1.28)$$

Donde no consideramos la difusión de la enzima (o bien porque se encuentra inmovilizada, o bien por su bajo coeficiente de difusión, de forma tal de simplificar este tratamiento inicial).

En las ecuaciones (1.26) a (1.28), todas las concentraciones son función de la distancia al electrodo (pese a no escribirlo explícitamente), pero no son función del tiempo.

Las ecuaciones (1.27) y (1.28) son el centro del problema para el modelado de electrodos enzimáticos amperométricos. Estas ecuaciones son ecuaciones diferenciales acopladas de segundo orden no lineales. No existe una resolución analítica para las mismas.

Observando las ecuaciones (1.22) a (1.24) vemos que el problema en el caso no-estacionario tampoco tiene solución analítica.

A la largo de aproximadamente 40 años, se han desarrollado dos líneas generales de aproximación al problema: el uso de fórmulas analíticas aproximadas y métodos de resolución numérica. En ambos casos, resulta indispensable validar los resultados del modelo contra resultados experimentales para poder hablar de la calidad del modelo.

Las condiciones de contorno para cada tipo de diseño de electrodo (enzima y mediador en solución, enzima en solución modificada y asociada al mediador, monocapa de enzima, multicapas de enzima, etc.) deben ser especificadas en cualquiera de los dos casos, para llegar a una solución para el sistema.

### **1.7.1 Ecuaciones analíticas aproximadas**

Uno de los métodos para encarar el problema de las ecuaciones diferenciales no lineales y sin solución es simplificarlas para llegar a expresiones más sencillas que pueden ser integradas. Las funciones solución fruto de la integración son expresiones matemáticas que expresan los perfiles de concentraciones en la cercanía del electrodo y los flujos o gradientes respectivos a partir de los cuales se podrá calcular la señal amperométrica según la ecuación (1.11).

Podemos suponer por ejemplo, que en una situación determinada la concentración de una especie será constante; o que una reacción determinada será mucho más lenta que las demás y será el paso limitante de reacción, etc.

Haciendo uso de distintas aproximaciones, podrán obtenerse distintas soluciones aproximadas, cada una válida bajo las condiciones supuestas.

Las fórmulas analíticas aproximadas proveen una relación funcional directa entre los distintos parámetros que hacen a la físico-química de un electrodo (concentraciones, constantes cinéticas, coeficientes de difusión, etc.) y la respuesta amperométrica. Al ver una expresión analítica aproximada, podemos decir qué efecto tendrá la modificación de una determinada variable sobre la respuesta del biosensor.

Esta enfoque del problema nunca describirá todas las situaciones experimentales posibles, dado que no habrá ecuaciones que describan el comportamiento del sistema, por ejemplo, cerca de la frontera entre dos casos límite.

Un modelo cinético, será mucho más completo cuanto mayor cantidad de casos cinéticos límite estén analizados dentro del marco propuesto.

#### **1.7.1.1 Diagramas de casos**

Un diagrama de casos es una suerte de mapa que muestra cómo cambia el comportamiento del sistema conforme se modifican las distintas variables experimentales [8, 24, 45-50]. Muestra la interrelación entre los distintos casos límite, por ejemplo qué casos tienen fronteras comunes y cuáles no; si al estar dentro de un caso, modificamos una dada variable (por ejemplo la concentración de sustrato), hacia qué caso nos acercamos, etc. Como tal, puede ser usado para optimizar la performance de un dispositivo particular.

Por lo general, la construcción de un diagrama de casos es el paso final en la construcción de un modelo donde se han derivado formulas analíticas aproximadas para distintos casos límite. Es la presentación condensada de las predicciones del modelo.



Por lo general no se dejan *espacios en blanco* al construir un diagrama. Debemos recordar sin embargo, que conforme nos acercamos a las fronteras entre dos casos límite las fórmulas aproximadas pierden exactitud rápidamente. Se muestran varios ejemplos de diagramas de casos al describir el modelo de enzima y mediador coinmovilizados en una película de Bartlett-Pratt [49] en la sección 5.3.

### **1.7.2 Simulaciones numéricas**

La segunda herramienta para resolver ecuaciones diferenciales sin solución analítica, es la resolución numérica de las mismas.

Estas técnicas pueden dar soluciones muy precisas del problema matemático para toda combinación de parámetros imaginable. Es decir, no solo brinda una solución bajo condiciones acotadas como en el caso de las fórmulas analíticas aproximadas. La desventaja de este tratamiento, es que no permite un análisis directo de los distintos procesos que tienen lugar dentro de la película como sí lo hace una fórmula analítica. Las simulaciones no permiten relacionar directamente el efecto de los distintos parámetros en la respuesta.

El tipo de simulación numérica que más se adecua a un problema dependerá de la complejidad de la cinética y de la calidad de resultado requerida.

Los métodos de simulación pueden muy ampliamente ser divididos en dos categorías: transitorios y de estado estacionario. Como el nombre lo sugiere, en las técnicas transitorias se comienza con perfiles de concentración conocidos y se aplican los efectos de transporte de masa y cinética para encontrar las nuevas concentraciones un intervalo de tiempo más tarde.

Las técnicas de estado estacionario, resuelven las ecuaciones combinadas de cinética y difusión en conjunto con las condiciones de contorno y llegan a la situación de equilibrio o estado estacionario.

Muy generalmente podemos decir que los métodos transitorios son más fáciles de implementar y modificar que las técnicas de estado estacionario.

#### **1.7.2.1 Diferencias finitas**

Los primeros usos de simulaciones numéricas en electroquímica están basados en el uso de diferencias finitas, para lo cual Feldberg [51] fue un pionero. En muchos aspectos este es el método más sencillo de entender e implementar. El primer paso consiste en discretizar el problema. Las diferencias finitas explícitas tratan el problema como un

arreglo de *cajas* discretas, lo suficientemente pequeñas como para que la concentración de cada especie dentro de una caja pueda considerarse constante. Analicemos como ejemplo un caso transitorio. Se muestra un esquema en la figura 1.6.

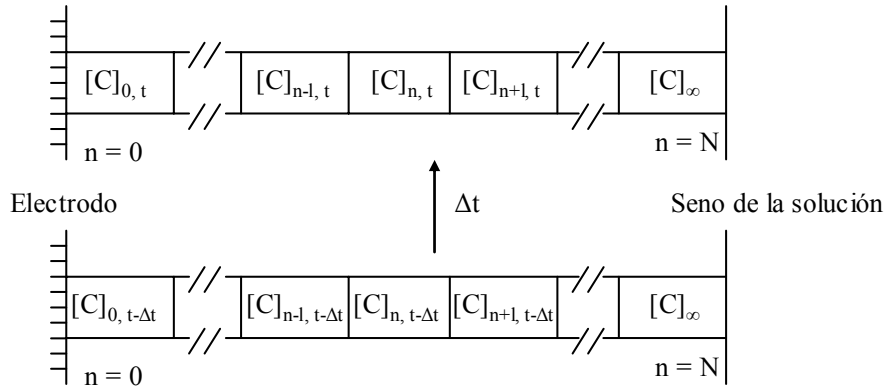


Figura 1.6: Representación esquemática de las diferencias finitas en simulaciones numéricas. Se muestra cómo se relaciona el cambio de concentraciones ( $[C]_{t+\Delta t} - [C]_t$ ), a través de un intervalo de tiempo discreto  $\Delta t$ .

Supongamos que el problema puede considerarse unidimensional, es decir, el electrodo es mucho más grande que la capa difusional.

Consideremos también que el transporte de masa está gobernado por la ley de Fick:

$$\frac{\partial [C]}{\partial t} = D_C \frac{\partial^2 [C]}{\partial x^2} \quad (1.29)$$

para una especie genérica C, entonces en diferencias finitas, (1.29) se expresa:

$$\frac{\Delta [C]}{\Delta t} \Big|_n = D_C \frac{\Delta (\Delta [C] / \Delta x)_n}{\Delta x} \quad (1.30)$$

En diferencias finitas, el gradiente de una variable  $\Psi$ , en el centro de una caja puede calcularse como la diferencia de esa variable a los dos lados de la caja, dividido el ancho de la caja:

$$\frac{\Delta \Psi}{\Delta x} \Big|_n \approx \frac{\Psi_{n+1/2} - \Psi_{n-1/2}}{\Delta x} \quad (1.31)$$

Aplicando (1.31) a (1.30):

$$\frac{\Delta [C]}{\Delta t} \Big|_n = D_C \frac{(\Delta [C] / \Delta x)_{n+1/2} - (\Delta [C] / \Delta x)_{n-1/2}}{\Delta x} \quad (1.32)$$

Aplicando (1.31) una vez más:

$$\left. \frac{\Delta[C]}{\Delta x} \right|_n = D_C \frac{[C]_{n+1} - [C]_n}{\Delta x} \quad (1.33)$$

Como  $\Delta t$  y  $\Delta x$  no son funciones de  $n$ , podemos reescribir (1.29) como:

$$(\Delta[C])_n = \frac{D_C \Delta t}{\Delta x} \left[ ([C]_{n+1,t-\Delta t} - [C]_{n,t-\Delta t}) - ([C]_{n,t-\Delta t} - [C]_{n-1,t-\Delta t}) \right] \quad (1.34)$$

Donde  $[C]_{n,t-\Delta t}$  es la concentración de la especie C en la caja número  $n$  a tiempo  $(t-\Delta t)$ .

Para simular una cinética sencilla, por ejemplo



$$\frac{\partial [C]}{\partial t} = -k[C] \quad (1.36)$$

y en diferencias finitas

$$(\Delta[C])_n = -k[C]_n \Delta t \quad (1.37)$$

Generalmente, el cambio de concentración debido a la reacción química se calcula *a posteriori* del cambio debido a transporte de masa, en cada paso de cálculo (equivalente a un intervalo de tiempo). Es decir, el valor de  $(\Delta[C])_n$  que se obtuvo en (1.34) se usa en (1.37).

Se observa que podemos calcular un cambio de concentración  $(\Delta[C])_n$  en el tiempo usando concentraciones conocidas un intervalo de tiempo antes. Por esta razón, el método se denomina *explícito*, define explícitamente una concentración a partir de concentraciones previas.

El método comienza a fallar cuando la cinética se vuelve muy rápida y las concentraciones cambian muy rápidamente. En este caso es conveniente usar un método *más implícito*. Un método se define como *totalmente implícito* cuando calcula las concentraciones a tiempo  $t$  haciendo uso únicamente de otras concentraciones a tiempo  $t$  (igual tiempo).

Por ejemplo el método de Crank Nicholson [52, 53] calcula las concentraciones a tiempo  $(t+\Delta t/2)$  por interpolación lineal entre la concentración conocida a tiempo  $t$  y la concentración desconocida a tiempo  $(t+\Delta t)$ . Otros métodos que han sido utilizados en simulaciones numéricas en electroquímica son los métodos *hopscotch* y *Alternating Directions Implicit Method (ADI)*.

La discretización de un problema estacionario es análoga a la mostrada para el caso transitorio.

### 1.8 Variables adimensionales

El estudio de sistemas complejos, como ser el problema acoplado cinético-difusional que estamos introduciendo en este capítulo, involucra el uso de un gran número de concentraciones y de constantes físicas y cinéticas.

Ocurre con frecuencia que la modificación de una de estas variables produce el mismo efecto que cambiar otra.

Analicemos un ejemplo relativamente sencillo, la cinética homogénea de Michaelis-Menten, ecuación (1.4):

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_{cat} [E][S]}{K_{MS} + [S]} \quad (1.4)$$

Observamos que aumentar  $[E]$  produce el mismo efecto en la velocidad que aumentar  $k_{cat}$ . De igual manera, aumentar  $[S]$  produce el mismo efecto que disminuir  $K_{MS}$ . Variables distintas que producen el mismo efecto, pueden agruparse algebraicamente en una única y nueva variable, reduciendo de esta forma el número total de variables. En este sencillo ejemplo, podemos introducir:

$$\mu = \frac{[S]}{K_{MS}} \quad \text{y} \quad \xi = k_{cat} [E] \quad (1.38)$$

resultando:

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{\xi}{1/\mu + 1} \quad (1.39)$$

Vemos que hemos reducido un problema de 6 variables a uno de 4, sin perder precisión en el análisis.

Por lo general, al usar variables adimensionales se adimensionalizan todas las ecuaciones y variables que describen al problema.

La adimensionalización compacta el exceso de información que muchas veces acarrearán los sistemas complejos. Por sobre todas las cosas, el uso de variables adimensionales vuelve más sencilla la resolución de las ecuaciones diferenciales en forma aproximada, así como la escritura de algoritmos que resolverán las mismas en forma numérica. Cuando las variables adimensionales se elijen correctamente, también simplifican la construcción de diagramas de casos.

## 1.9 Modelos de electrodos enzimáticos amperométricos reportados

Para una revisión de los primeros trabajos sobre electrodos enzimáticos amperométricos, sugerimos la lectura de la trabajo de investigación bibliográfica de Bartlett y Pratt [42].

La tabla 1.1 muestra los trabajos publicados a partir del año 1992.

Autores, año	Modelo	tipo exp.	¿sistema real?	método	Ref.
Albery, Kalia y Magner, 1992	<i>mee</i>	EE	Sí	SA	[54]
Bartlett, Tebbutt y Tyrrell, 1992	<i>eme</i>	EE	Sí	SA	[55]
Bacha, Bergel y Comtat, 1993	<i>eme</i>	EE/T	No	SN	[56]
Calvo, Danilowicz y Diaz, 1993	<i>eme</i>	EE	Sí	SA	[57]
Marchesiello y Genies, 1993	<i>eme</i>	EE	Sí	SA	[58]
Ryriamahazaka y Nigretto, 1993	<i>eme</i>	CV	No	SN	[59]
Schulmeister y Pfeiffer, 1993	<i>mee (multicapa)</i>	EE	No	SN	[60]
Tatsuma y Watanabe, 1993	<i>eme</i>	EE	No	SN	[61]
Bourdillon, Demaille, Moiroux y Savéant, 1993	<i>H</i>	CV	Sí	SA	[25]
Bourdillon, Demaille, Gueris, Moiroux y Savéant, 1993	<i>eme</i>	CV	Sí	SA	[62]
Badia, Carlini, Fernyez, Battaglini, Mikkelsen y English, 1993	<i>H (mediator unido a enzima)</i>	CV	Sí	SA	[35]
Lyons, Lyons, Fitzgerald y Bartlett, 1994	<i>eme</i>	T	Sí	SA	[63]
Battaglini y Calvo, 1994	<i>eme</i>	EE	Sí	SA/SN	[64]
Martens y Hall, 1994	<i>eme</i>	EE	No	SN	[65]
Rhodes, Shults y Updike, 1994	<i>mee (multicapa)</i>	EE/T	Sí	SN	[66]
Albery, Driscoll y Kalia, 1995	<i>mee</i>	EE	Sí	SA	[67]
Bourdillon, Demaille, Moiroux y Savéant, 1995	<i>eme</i>	CV	Sí	SA/SN	[68]
Bacha, Bergel y Comtat, 1995	<i>eme/mee</i>	EE/T	Sí	SN	[56]
Gros y Bergel, 1995	<i>eme</i>	EE	Sí	SN	[69]
Bartlett y Pratt, 1995	<i>H</i>	EE	Sí	SA	[24]
Bartlett y Pratt, 1995	<i>eme</i>	EE	No	SA/SN	[49]
Martens, Hindle y Hall, 1995	<i>mee</i>	EE	Sí	SA	[65]
Kong, Liu y Deng, 1995	<i>eme</i>	CV	Sí	SN	[70]
Chen y Tan, 1995	<i>mee (multicapa)</i>	EE	Sí	SA	[71]
Lyons, Greer, Fitzgerald, Bannon y Bartlett, 1996	<i>eme</i>	EE	Sí	SA	[48]
Cambiaso, Delfino, Grattarola, Verreschi, Ashworth, Maines y Vadgama, 1996	<i>mee (multicapa)</i>	EE/T	No	SN	[72]
Gooding y Hall, 1996	<i>eme (electrodo permeable)</i>	EE	Sí	SN	[73]
Jobst, Moser y Urban, 1996	<i>mee (multicapa)</i>	EE	No	SN	[74]
Desprez y Labbe, 1996	<i>eme</i>	EE	No	SA	[75]
Chen y Tan, 1996	<i>mee (multicapa)</i>	T	Sí	SN	[76]
Krishnan, Atanasov y Wilkins, 1996	<i>eme</i>	EE	No	SA/SN	[77]
Bourdillon, Demaille, Moiroux y Savéant, 1996	<i>eme (mono y multicapa)</i>	CV	Sí	SA	[43]
Somasundrum, Tongta, Tanticharoen y Kirtikara, 1997	<i>eme/H</i>	EE	No	SA	[78]
Zhu y Wu, 1997	<i>eme</i>	EE	No	SA	[79]
Gooding, Hall y Hibbert, 1998	<i>eme</i>	EE	Sí	SA capa delgada/ SN película gruesa	[80]
Neykov y Georgiev, 1998	<i>eme</i>	EE	No	SN	[81]
Yokoyama y Kayanuma, 1998	<i>H</i>	CV	Sí	SN	[28]
Bourdillon, Demaille, Moiroux y Savéant, 1999	<i>eme (incluye inhibición por producto)</i>	CV	Sí	SN	[82]
Gajovic, Warsinke, Huang, Schulmeister y Scheller, 1999	<i>eme</i>	EE	Sí	SA	[83]
Anne, Demaille y Moiroux, 1999	<i>eme (difusión elástica de M)</i>	CV	Sí	SA	[84]

Anicet, Bourdillon, Moiroux y Savéant, 1999	<i>eme (multicapa bienzimática)</i>	<i>EE</i>	<i>Sí</i>	<i>SA</i>	[85]
Coche-Guerente, Desprez, Diard y Labbe, 1999	<i>eme</i>	<i>EE</i>	<i>No</i>	<i>SA</i>	[86]
Coche-Guerente, Desprez, Labbe y Therias, 1999	<i>eme</i>	<i>EE</i>	<i>Sí</i>	<i>SA</i>	[87]
Gooding, Erokhin, Hibbert, 2000	<i>eme</i>	<i>EE</i>	<i>Sí</i>	<i>SA</i>	[88]
Galceran, Taylor y Bartlett, 2001	<i>H (microelectrodo)</i>	<i>EE</i>	<i>No</i>	<i>SN</i>	[89]
Limoges, Moiroux y Savéant, 2002	<i>H (cinética M-M para S y M)</i>	<i>CV</i>	<i>No</i>	<i>SA</i>	[90]
Limoges, Moiroux y Savéant, 2002	<i>eme (cinética M-M para S y M)</i>	<i>CV/E</i> <i>E</i>	<i>No</i>	<i>SA</i>	[91, 92]
Dequaire, Limoges, Moiroux y Savéant, 2002	<i>H (incluye inhibición)</i>	<i>CV</i>	<i>Sí</i>	<i>SA</i>	[90]
Matsumoto, Kano y Ikeda, 2002	<i>H</i>	<i>EE</i>	<i>No</i>	<i>SA</i>	[93]
Calvo, Danilowicz y Wolosiuk, 2002	<i>eme</i>	<i>EE</i>	<i>Sí</i>	<i>SA</i>	[94]
Rosca y Popescu, 2002	<i>eme</i>	<i>EE</i>	<i>Sí</i>	<i>SA</i>	[95]
Lyons, 2003	<i>eme</i>	<i>EE</i>	<i>No</i>	<i>SA</i>	[96]
Calvente, Naráez, Domínguez y Yreu, 2003	<i>eme</i>	<i>CV/E</i> <i>E</i>	<i>Sí</i>	<i>SA</i>	[97]
Baronas, Kulys y Ivanauskas, 2004	<i>eme</i>	<i>EE</i>	<i>No</i>	<i>SN</i>	[98]
Honeychurch y Bernhardt, 2004	<i>eme</i>	<i>CV</i>	<i>Sí</i>	<i>SN</i>	[99]
Honeychurch y Bernhardt, 2005	<i>eme</i>	<i>CV</i>	<i>No</i>	<i>SN</i>	[100]

**Tabla 1.1:** Resumen de los reportes sobre modelado de electrodos enzimáticos amperométricos a partir de 1992. Siglas usadas en la tabla:

**Tipos de electrodo** (ver sección 1.4) *eme*: enzima-membrana|electrodo; *mee*: membrana|enzima|electrodo; *H*: caso homogéneo

**Tipo de experimento:** *T*: respuesta transitoria; *EE*: estado estacionario; *CV*: voltametría cíclica

**Sistema real?:** Indica si se compararon datos experimentales contra las predicciones del modelo.

**Método:** *SN*: Simulación numérica; *SA*: Soluciones analíticas aproximadas

Vemos que la literatura en el tema es amplia. Desarrollaremos a continuación solo los resultados de algunos trabajos puntuales con cuyos modelos trabajaremos en la presente tesis. Mencionaremos al pasar otros trabajos que consideramos particularmente importantes en el área. Para mayor información acerca de los mismos sugerimos remitirse a la bibliografía citada.

Cabe destacar que si bien la cantidad de trabajos publicados acerca del modelado de electrodos enzimáticos amperométricos es mucho mayor que para otros tipos de sensores enzimáticos electroquímicos (como ser los potenciométricos), los principios que se aplican para el modelado de esos otros tipos son los mismos.

## 1.9.1 El caso homogéneo

### 1.9.1.1 El modelo de Albery [54]

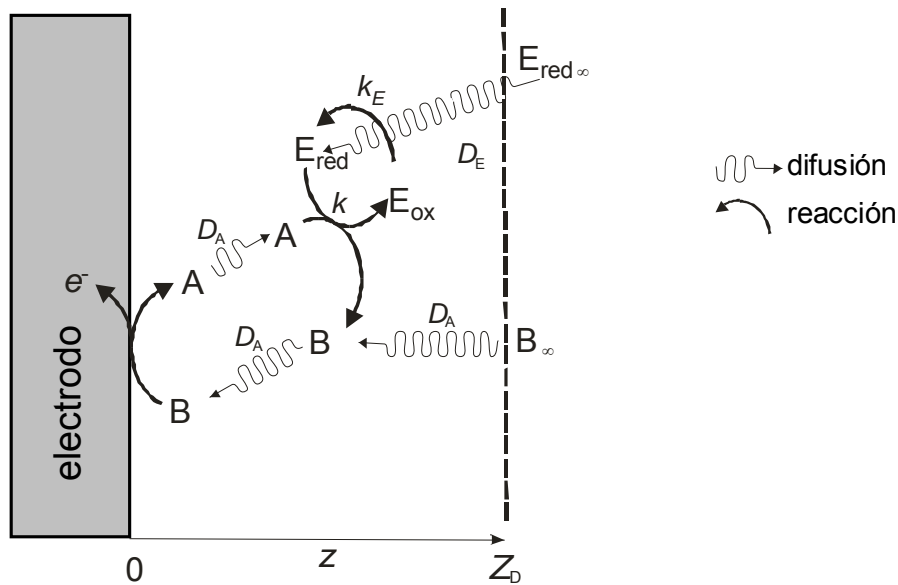
Para el caso donde tanto el mediador, la enzima y el sustrato se encuentran libres de difundir en solución, Albery *y col.* [54] han desarrollado una completa teoría para el comportamiento en el estado estacionario, en un electrodo rotatorio.

La publicación original trata dos situaciones distintas para el mediador redox. La primera considera que el mediador no está presente (en ninguno de sus dos estados) en el

seno de la solución sino que se produce en su forma oxidada en el electrodo, por ejemplo, si el electrodo en sí mismo está formado por una sal orgánica conductora [101]. La segunda situación, que se encuentra mucho más frecuentemente, es la del mediador presente en el seno de la solución en su forma reducida, reaccionando sobre el electrodo para dar la forma activa, oxidada.

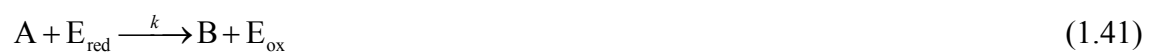
Este último caso, es el que se aplicará a nuestro sistema de interés, y por ser además el más frecuente, será tratado en más extensión que el primero.

La figura 1.7 muestra esquemáticamente los procesos considerados por Alberly *y col.*



**Figura 1.7:** Esquema del sistema homogéneo según referencias [24, 54]. A y B representan las formas oxidadas y reducidas del mediador. E<sub>ox</sub> y E<sub>red</sub> representan las formas oxidada y reducida de la enzima. S, el sustrato de la enzima, no se representa dado el modelo supone concentración constante en todo el volumen de la solución. Su efecto en la cinética se considera a partir de  $k_E = [S]k_{cat} / (K_{MS} + [S])$ . Los subíndices ∞ representan concentraciones en el seno de la solución. D<sub>E</sub>, y D<sub>A</sub> son los coeficientes de difusión en solución de la enzima y el mediador. El mediador oxidado solo se genera en el electrodo por oxidación de B. Z<sub>D</sub> es la capa límite difusional, z representa la distancia a la superficie del electrodo.

El modelo considera una simplificación del esquema cinético dado por las reacciones (1.12) a (1.14). Las reacciones que ocurren en la solución y las constantes cinéticas que las caracterizan son:



y en la superficie del electrodo



El tratamiento propuesto incluye el transporte de masa para la enzima, proceso que muchos otros modelos omiten como comentamos más arriba.

Por el contrario, introduce una simplificación importante, para allanar el tratamiento matemático: no incluye la posibilidad de que se desarrollen perfiles de concentración para el sustrato,  $[S]=[S]_{\infty}$  a cualquier distancia del electrodo. Esta es la principal falencia del modelo.

La reacción enzima-sustrato tiene lugar en todo el volumen de la solución, pero la mediación redox solo se lleva a cabo en la solución adyacente al electrodo, donde el mediador B (reducido) es oxidado a su forma activa A. Se asume regeneración nernstiana del mediador sobre el electrodo.

Tanto para la enzima, como para el mediador el modelo asume que los coeficientes de difusión para las especies oxidadas y reducidas son iguales.

Con esas suposiciones, las ecuaciones en estado estacionario son:

$$D_A \frac{\partial^2 [B]}{\partial x^2} = -k[E_{red}][B] \quad (1.43)$$

$$D_A \frac{\partial^2 [A]}{\partial x^2} = k[E_{red}][A] \quad (1.44)$$

$$D_E \frac{\partial^2 [E_{ox}]}{\partial x^2} = -k[E_{red}][A] + \frac{k_{cat}[E_{ox}][S]_{\infty}}{K_{MS} + [S]_{\infty}} \quad (1.45)$$

$$D_E \frac{\partial^2 [E_{red}]}{\partial x^2} = k[E_{red}][A] - \frac{k_{cat}[E_{ox}][S]_{\infty}}{K_{MS} + [S]_{\infty}} \quad (1.46)$$

Albery y *col.* simplifican las ecuaciones (1.43) a (1.46) reduciéndolas a variables adimensionales. El sistema acoplado carece de solución analítica exacta. Por simplificaciones adecuadas se llega a 8 expresiones válidas para 8 casos límite distintos, con los cuales es posible construir un diagrama de casos y encontrar las fronteras entre ellos [54]. La corriente en función de las distintas variables en cada uno de estos casos se muestra en la tabla 1.2

Como puede observarse introdujimos la variable  $X_D$ , capa difusional para un electrodo rotatorio:

$$X_D = 0.643\nu^{1/6} D_M^{1/3} W^{1/2} \quad (1.47)$$

donde  $\nu$  ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ) es la viscosidad cinemática de la solución y  $W$  (Hz) la velocidad de rotación del electrodo. El resto de la simbología se corresponde con la definida hasta ahora. Recordemos que  $A$  (en *cursiva* y fuera de corchetes) representa el área del



electrodo y no debe confundirse con A, (representación del mediador oxidado) ni con [A] o [A<sub>Σ</sub>] que representa concentraciones de A.

caso	expresión para la corriente	B en solución	A sobre el electrodo
$k[A] < k_E$			
CASO I	$i = nFA[A_{\Sigma}](D_M k[E])^{1/2}$ (1.48)	sí	sí
CASO II	$i = \frac{1}{3}nFAk[A_o][E]X_D$ (1.49)	no	sí
$k[A] < k_E$			
CASO III	$i = nFA \frac{D_E [E]}{X_D}$ (1.50)	no	sí
CASO IV <sup>1</sup>	$i = nFA \frac{D_E [E]}{X_D}$ (1.51)	sí	sí
CASO V	$i = \frac{1}{2}nFAk_E [E]X_D$ (1.52)	no	sí
CASO VI	$i = nFA(2D_M k_E [E][A_{\Sigma}])^{1/2}$ (1.53)	sí	sí
CASO VII	$i = nFA[E](D_E K_{MS})^{1/2}$ (1.54)	sí	sí
CASO VIII	$i = nFA \frac{D_M [A_{\Sigma}]}{X_D}$ (1.55)	sí	no

Tabla 1.2: Expresiones para la corriente en los distintos casos límite del modelo de sistema homogéneo estacionario según Albery y col. [54].

Nótese que algunos casos se aplican tanto al caso del mediador proveniente del electrodo como para el mediador reducido presente en el seno de la solución; mientras que otros se aplican solo a una de las dos situaciones.

Los fórmulas correspondientes al mediador reducido presente en el seno de la solución han sido validadas por Bartlett y Pratt [24] para el sistema β-D-glucosa/GOx/ferroceno monocarboxílico. Analicemos brevemente estos casos.

### 1.9.1.1.1 Caso I

El caso I corresponde a la cinética limitada por la reacción enzima-mediador donde el mediador A se consume dentro de la capa difusional. A reacciona con la forma reducida de la enzima, E<sub>red</sub>, en una capa de reacción de primer orden de espesor  $(D_M/k[E])^{1/2}$ ,

<sup>1</sup> Efectivamente se llega a la misma fórmula aproximada para los casos límite III y IV.

adyacente al electrodo. La corriente resultante es lineal con la concentración de mediador, tiene una dependencia cuadrática con la concentración de enzima, y es independiente de la concentración de sustrato. Tampoco hay dependencia con la velocidad de rotación (encender o apagar la rotación es indistinto).

Este comportamiento es idéntico a un mecanismo de tipo EC' (ver sección 1.7.2). La ecuación (1.48) también fue verificada experimentalmente Liaudet *y col.* [27] para ferroceno monosulfonato y GOx.

#### 1.9.1.1.2 Caso IV

En el caso IV la corriente está limitada por la difusión de la enzima a través de la capa difusional. La reacción entre A y E<sub>red</sub> resulta en un agotamiento de E<sub>red</sub> con respecto a su concentración en el seno de la solución.

#### 1.9.1.1.3 Caso VI

El caso VI corresponde a la cinética limitada por la reacción enzima-sustrato.

Nótese que en este caso tampoco existe dependencia funcional de la corriente con la velocidad de rotación.

En este caso, el mediador redox difunde en una capa de reacción cercana al electrodo donde el paso limitante de reacción no es la reacción mediador-enzima reducida, sino la generación de esta enzima reducida, que está presente en una concentración mucho menor que en el seno de la solución,  $[E_{ox}] \approx [E]$ . La capa de reacción de orden cero,  $X_k$ , está dada por la ecuación (1.56):

$$X_k = \left[ \frac{D_E}{k_{cat}} \left( \frac{K_{MS}}{[S]_{\infty}} + 1 \right) \right]^{1/2} \quad (1.56)$$

Bajo ciertas condiciones el mediador en su forma oxidada, A, solo penetra la solución una cierta distancia a través de la capa difusional, dando lugar al desarrollo de un perfil de concentración parabólico. A cierta distancia del electrodo  $[A] = d[A]/dx = 0$ . La corriente tiene una dependencia de raíz cuadrada con el mediador y la enzima. Este es el caso normalmente usado para averiguar constantes cinéticas para mediadores artificiales, como se verá en el capítulo 3.

Usando simulaciones por diferencias finitas en modo explícito, Battaglini y Calvo [102], mostraron que los gráficos de Lineweaver Burke son no lineales, a diferencia de las cinéticas simples de Michaelis-Menten. Esto es producto de la interrelación entre la

cinética y la difusión en las cercanías del electrodo. El gráfico que daría una dependencia lineal sería entonces  $1/i^2$  vs.  $1/[S]_{\infty}$ .

#### **1.9.1.1.4 Caso VII**

El paso determinante de reacción es la regeneración de la enzima  $E_{ox}$ . Es un caso de transición (o de titulación, como se discutirá más ampliamente para electrodos de enzimas inmovilizadas), donde la reacción se lleva a cabo en una fina capa en algún punto intermedio de la capa difusional donde se consumen rápidamente  $E_{red}$  proveniente de la solución y A proveniente del electrodo.

Los casos IV y VII predichos por el diagrama son difíciles de observar experimentalmente dado que ocupan una región muy pequeña del diagrama de casos.

#### **1.9.1.1.5 Caso VIII**

Conforme decrece la velocidad de reacción enzima-mediador, el efecto de la reacción dentro de la capa difusional se vuelve insignificante y la corriente simplemente se encuentra limitada difusionalmente.

Notemos finalmente que para los casos I, IV, VI y VII la corriente que se obtiene es inferior a la corriente límite difusional (dada por el caso VIII).

Resaltemos además que para los casos límite I, VI y VII el modelo predice una respuesta tal que la voltametría cíclica será estacionaria debido al balance entre la cinética y la difusión en la capa difusional.

Para una descripción más detallada del modelo se sugiere ver la publicación original de Albery *y col.* [54] o la más reciente de Pratt y Bartlett [24] donde se repasa el mismo, se presenta evidencia experimental que lo avala y se discuten algunas de sus limitaciones.

#### **1.9.1.2 Modelos no estacionarios del caso homogéneo**

El tratamiento del estado no estacionario requiere la resolución de las ecuaciones (1.22) a (1.24).

Battaglini y Calvo consideraron el transitorio de la cronoamperometría [102] y la relajación a circuito abierto después del estado estacionario controlado por la reacción enzima-mediador [103].

Por otro lado, la técnica de voltametría cíclica ha sido ampliamente utilizada para caracterizar el caso homogéneo.

Cass *y col.* [26] fueron los primeros en reportar en 1984 un sensor de glucosa que utilizaba ferroceno carboxilato soluble para mediar la transferencia de electrones de GOx al electrodo inerte. Los autores explicaron la onda catalítica obtenida experimentalmente por la reacción (1.13). Asumiendo que la reacción del ferroceno sobre el electrodo (regeneración del mediador) es lo suficientemente rápida (y solamente limitada por difusión), en comparación con la velocidad de reacción entre el ferriceno y GOx reducida. El voltagrama obtenido puede aproximarse por un mecanismo de tipo EC' como lo describen Nicholson y Shain [104]. Esto es suponiendo enzima saturada en sustrato, de manera tal que se encuentra totalmente reducida en el seno de la solución. EC' es la sigla para *electrochemical-chemical reaction*, en inglés, que puede traducirse por reacción electroquímica-química.

El tratamiento de Nicholson y Shain predice para un esquema EC' que el cociente entre la corriente catalítica ( $i_{cat}$ ) y la corriente límite difusional ( $i_{dif}$ ) está dada por:

$$\frac{i_{cat}}{i_{dif}} = \frac{1}{0.4463} \left( \frac{k_f RT}{Fv} \right)^{1/2} \quad (1.57)$$

donde  $k_f = k[E]$ , es la constante de *pseudo*-primer orden,  $v$  es la velocidad de barrido de la voltametría,  $T$  la temperatura y  $R$ , la constante universal de los gases.

Este tratamiento, fue usado en trabajos pioneros por varios grupos (Green [105], Rusling [106], Frede [107]) para extraer valores de  $k$ .

Bourdillon *y col.* [25] mostraron los inconvenientes que presenta (1.57), dado que una alta concentración de sustrato no es la única condición para conseguir condiciones de *pseudo*-primer orden. La condición  $k[A_S]/k_{cat} \ll 1$  también es necesaria. Estos autores llegaron a una fórmula para la corriente del *plateau* en un voltagrama cíclico producido por catálisis enzimática cuando un mediador de un electrón reoxida a la enzima GOx(FADH<sub>2</sub>), suponiendo que no hay agotamiento de sustrato y una concentración de sustrato como mínimo 50 veces superior a la de mediador soluble.

Recordemos que Albery [54] y Bartlett [8] mostraron que además del caso EC' para enzima-mediador hay otros dos casos para enzima-sustrato que también muestran un comportamiento estacionario debido al balance entre la difusión y la cinética en la capa difusional. Estos son los casos que se corresponden con las fórmulas (1.53) y (1.54) del discutido modelo de Albery *y col.* [54].

Probablemente el trabajo más completo para el caso no estacionario sea el de Limoges, Moiroux y Savéant [90]. Los autores consideran gran cantidad de situaciones

experimentales posibles distintas, cinética de tipo Michaelis-Menten tanto para el sustrato como para el mediador y fundamentalmente, tienen en cuenta la posibilidad de desarrollo de perfiles difusionales en la cercanía del electrodo tanto para el mediador como para el sustrato.

En una publicación posterior, Ikeda *y col.* arribaron a fórmulas similares [93].

### 1.9.2 Electroodos de enzimas inmovilizadas

La cinética enzimática en películas heterogéneas puede verse afectada por una serie de factores como ser:

- transporte de masa del sustrato o el mediador tanto dentro de la película como en la solución adyacente;
- partición del sustrato y/o el mediador entre la película y la solución adyacente [108];
- cambios locales de pH y fuerza iónica en el interior de la película [109];
- movilidad de cargas y electron-hopping en películas con propiedades redox o polímeros conductores en general;
- variación de la actividad enzimática debido al proceso de inmovilización.

Para electroodos de enzimas inmovilizadas, tanto la reacción enzima-sustrato, como la reacción enzima-mediador (reacciones (1.12) y (1.13)), tendrán lugar únicamente en el volumen de la película, que es donde se encuentra inmovilizada la enzima.

En este caso las ecuaciones diferenciales que describen al sistema son las ecuaciones (1.22) y (1.23), mientras que como la enzima está inmovilizada, reescribiremos (1.24):

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} - \zeta k[E_{red}][A] \quad (1.22)$$

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat}[E_{ox}][S]}{K_{MS} + [S]} \quad (1.23)$$

$$\frac{\partial[E_{ox}]}{\partial t} = k[E_{red}][A] - \frac{k_{cat}[E_{ox}][S]}{K_{MS} + [S]} \quad (1.58)$$

Entonces para el estado estacionario recordemos:

$$D_A \frac{d^2[A]}{dx^2} = \frac{\zeta k k_{cat}[A][S][E]}{k[A](K_{MS} + [S]) + k_{cat}[S]} \quad (1.27)$$

$$D_S \frac{d^2[S]}{dx^2} = \frac{k k_{cat}[A][S][E]}{k[A](K_{MS} + [S]) + k_{cat}[S]} \quad (1.28)$$

### 1.9.2.1 Monocapa de enzima y mediador soluble

Para una monocapa de enzima puede despreciarse en general el agotamiento de concentración de A y S dentro de la película (no se desarrollan perfiles de concentración). Por el contrario, es factible el desarrollo de perfiles de concentración en la solución adyacente al electrodo.

En este caso un tratamiento bastante completo fue publicado por Lyons [96] para el estado estacionario. También es digno de mencionarse el tratamiento de Bourdillon y *col.* [62].

El tratamiento del problema puede complicarse más si se incluye cinética reversible para la reacción enzima-mediador, una segunda cinética de tipo Michaelis-Menten [91, 110], reemplazando la reacción (1.13) por



donde

$$K_{\text{MS},2} = \frac{k_{-2} + k_{\text{cat}}}{k_2} \quad (1.60)$$

### 1.9.2.2 Multicapas de enzima y mediador soluble

Destaquemos primeramente que los modelos desarrollados para multicapas pueden naturalmente usarse también para el análisis cinético de películas de monocapa.

Podemos pensar dos situaciones distintas:

#### 1.9.2.2.1 Mediador oxidado en la solución

En este caso, el mediador difunde dentro de la película para reaccionar con la enzima que se encuentra reducida. Como ejemplo podemos tomar la utilización de O<sub>2</sub> como mediador para GOx [111].

Bartlett y Whitaker resolvieron esta situación suponiendo que no se desarrollan perfiles difusionales para el mediador dentro de la película [112].

#### 1.9.2.2.2 Mediador reducido en la solución

En este caso, el mediador reducido debe difundir como tal a través de la película enzimática, para generar mediador oxidado (*i.e.* activo) sobre la superficie del electrodo y recién después poder mediar la reacción enzimática. Este caso es mucho más común

que 1.92.2.1. Como ejemplo podemos mencionar la mediación de GOx a través de ferrocenos modificados, complejos de Os, quinonas, etc.

Limoges *y col.* [91, 92] analizaron sistemáticamente este problema tanto en el estado estacionario como para voltametría cíclica. Los autores incluyen cinética de Michaelis-Menten tanto para el sustrato como para el mediador (reacciones (1.59) y (1.60)), dando lugar a una tabla completa de soluciones analíticas aproximadas para las ecuaciones (1.27) y (1.28). También tienen en cuenta la posibilidad de desarrollo de perfiles difusionales dentro de la película.

### **1.9.2.3 Multicapas de enzima y mediador inmovilizados**

#### **1.9.2.3.1 El modelo de Bartlett-Pratt**

Bartlett y Pratt [49] presentaron un tratamiento teórico completo del caso estacionario para el problema acoplado de difusión y cinética enzimática para electrodos donde tanto la enzima como el mediador se encuentran inmovilizados.

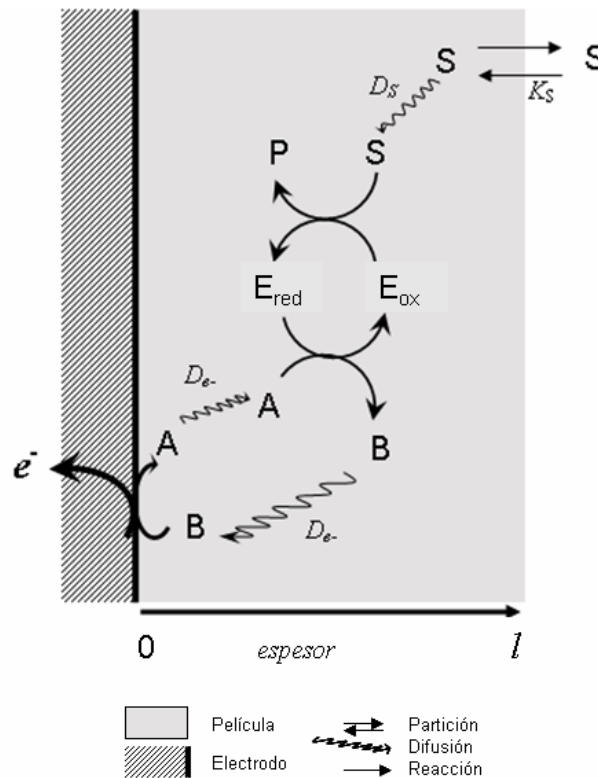
Nos detendremos particularmente en la descripción de este modelo, dado que es nuestro objetivo poner a prueba sus predicciones en el capítulo 5 de la presente tesis.

El modelo de Bartlett-Pratt es único desde dos puntos de vista. Primeramente, define un gran número de casos cinéticos límites para distintas combinaciones de los parámetros cinéticos, difusionales y concentraciones, que a nuestro entender, cubre todas las posibles situaciones experimentales que pueden plantearse o incluso que podrían presentarse a futuro. Todos estos casos son tratados con las mismas herramientas matemáticas (resolución de ecuaciones diferenciales simplificadas y uso de variables adimensionales), y presentados en un esquema común que facilita la identificación del caso límite, dado un determinado conjunto de variables particulares. En segundo lugar, Bartlett y Pratt proponen no solo la resolución algebraica de las ecuaciones diferenciales simplificadas, sino que además sugieren corroborar los resultados por resolución numérica de las ecuaciones. Las resoluciones numéricas resultan válidas en cualquier caso cinético límite e incluso cerca o en las fronteras entre casos. Además proponen un tratamiento computacional adecuado que simplifica el problema (ver capítulo 2).

La figura 1.8 muestra esquemáticamente los procesos considerados por Bartlett y Pratt.  $E_{ox}$  y  $E_{red}$  representan a la enzima en sus estados oxidado y reducido, respectivamente. A y B son las formas oxidada y reducida del mediador redox. Estas cuatro especies se encuentran todas inmovilizadas en la película sobre el electrodo. El modelo es genérico para cualquier método de inmovilización, aunque sí supone que este produce

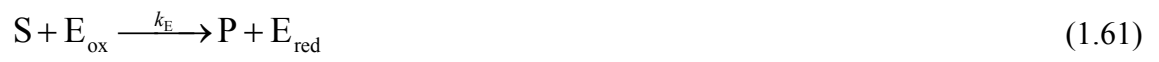
concentraciones homogéneas en todo el volumen de la película (concentraciones totales, enzima total y mediador en cualquiera de sus dos formas).

S y P son el sustrato y el producto de la reacción enzimática. S se encuentra disuelto en solución y sufre un proceso de partición en la interfase película-solución, con coeficiente de partición  $K_S$ . El sustrato es libre de difundir a través de la película con coeficiente de difusión  $D_s$ , cuyo valor no necesariamente coincide con el valor del coeficiente de difusión en solución. Como el mediador está físicamente inmovilizado, el coeficiente de difusión  $D_e$  no describe difusión física de este a través de la película, sino interconversión entre la forma oxidada y reducida por difusión de carga, por ejemplo a través de salto de electrones (*electron hopping*).



**Figura 1.8:** Esquema de un electrodo típico de enzima y mediador inmovilizados en una película como lo consideran Bartlett y Pratt [24]. La difusión del mediador redox (A, en su forma oxidada, B en su forma reducida) y el sustrato, S ocurre con coeficientes de difusión  $D_e$  (electron hopping) y  $D_s$  respectivamente. La partición del sustrato entre la película y la solución se describe por el coeficiente de partición  $K_S$ . La cinética enzimática ocurre homogéneamente en todo el volumen de la película, desde 0 hasta  $l$ . El mediador reducido B, es reoxidado para producir A solo en la superficie del electrodo.  $E_{ox}$  y  $E_{red}$  son las formas oxidada y reducida de la enzima respectivamente.

Asumiendo cinética de tipo Michaelis-Menten, Bartlett y Pratt escriben las reacciones que ocurren en la película como:







y en la superficie del electrodo



El modelo asume que no se desarrollan perfiles difusionales para la concentración del sustrato en la solución en contacto con la película. Experimentalmente esto puede lograrse utilizando convección forzada, por ejemplo, mediante el empleo de un electrodo rotatorio.

Las ecuaciones diferenciales que describen los procesos acoplados de difusión-reacción en la película pueden entonces escribirse como:

$$\frac{\partial [A]}{\partial t} = D_{e^-} \frac{\partial^2 [A]}{\partial x^2} - k[E_{red}][A] \quad (1.64)$$

$$\frac{\partial [S]}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat} [E_{ox}][S]}{K_{MS} + [S]} \quad (1.65)$$

$$\frac{\partial [E_{ox}]}{\partial t} = k[E_{red}][A] - \frac{k_{cat} [E_{ox}][S]}{K_{MS} + [S]} \quad (1.66)$$

En el estado estacionario,

$$\frac{\partial [E_{ox}]}{\partial t} = \frac{\partial [A]}{\partial t} = \frac{\partial [S]}{\partial t} = 0 \quad (1.67)$$

A partir de (1.67) tenemos entonces que

$$[E_{red}] = \frac{k_{cat} [S] [E]}{k[A] (K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (1.68)$$

donde  $[E] = [E_{red}] + [E_{ox}]$  es la concentración total de enzima inmovilizada. Y haciendo uso de (1.68) y también en el estado estacionario:

$$D_{e^-} \frac{d^2 [A]}{dx^2} = \frac{kk_{cat} [A][S][E]}{k[A](K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (1.69)$$

$$D_S \frac{d^2 [S]}{dx^2} = \frac{kk_{cat} [A][S][E]}{k[A](K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (1.70)$$

### 1.9.2.3.1.1 Variables adimensionales

El modelo introduce siete variables adimensionales.

$$a = \frac{[A]}{[A_\Sigma]} \quad (1.71)$$

$$s = \frac{[S]}{K_S [S]_\infty} \quad (1.72)$$

$$\chi = \frac{x}{l} \quad (1.73)$$

$$\kappa = l \sqrt{\left( \frac{k[E]}{D_{e^-}} \right)} \quad (1.74)$$

$$\eta = \frac{D_S k K_{MS}}{D_{e^-} k_{cat}} \quad (1.75)$$

$$\gamma = \frac{k [A_\Sigma] K_{MS}}{k_{cat} K_S [S]_\infty} \quad (1.76)$$

$$\mu = \frac{K_S [S]_\infty}{K_{MS}} \quad (1.77)$$

donde  $[A_\Sigma] = [A] + [B]$ ; y  $[S]_\infty$  es la concentración de sustrato en la solución en contacto con la película (vimos que no se desarrollan perfiles difusionales en la solución en las cercanías del electrodo).

$a$  y  $s$  representan las concentraciones adimensionales de mediador y sustrato respectivamente.  $a$  está normalizada respecto a la concentración total de mediador y  $s$  respecto a la concentración de sustrato en la solución,  $[S]_\infty$ .  $a$  y  $s$  son función de la distancia respecto al electrodo, es decir, describen los perfiles de concentración respectivos.  $\chi$  es la distancia normaliza en cualquier punto de la película respecto al electrodo.

$\kappa$  describe el balance entre la difusión del mediador, y la velocidad de reacción con la enzima. Cuando  $\kappa \ll 1$ , A puede difundir una gran distancia a través de la película antes de reaccionar con la enzima.

$\eta$  describe los consumos relativos de sustrato y mediador dentro de la película. Si  $\eta \ll 1$ , el consumo de sustrato es mayor; por el contrario si  $\eta \gg 1$ , el consumo de mediador será mayor.

$\gamma$  describe el balance entre las dos formas de la enzima. Si  $\gamma \ll 1$ , toda la enzima está en la forma reducida.

$\mu$  es el cociente entre la concentración de sustrato máxima dentro de la película (a la concentración presente en la interfase) y la constante de Michaelis-Menten, es decir, da idea si la cinética está saturada ( $\mu > 1$ ), o insaturada ( $\mu < 1$ ).

La sustitución de (1.71) a (1.77) en (1.27) y (1.28) arroja:

$$\frac{d^2 a}{d\chi^2} = \frac{\kappa^2 a s}{\gamma a(1 + \mu s) + s} \quad (1.78)$$

$$\frac{d^2 s}{d\chi^2} = \frac{\gamma \eta^{-1} \kappa^2 a s}{\gamma a(1 + \mu s) + s} \quad (1.79)$$

que son las ecuaciones a resolver, con las condiciones de contorno adecuadas, para hallar una solución al problema.

### 1.9.2.3.1.2 Condiciones de contorno y flujos

Las condiciones de contorno para el mediador en la superficie del electrodo dependen del potencial y de la cinética de electrodo. Por lo general, si se realizan mediciones amperométricas es práctica común mantener el potencial de electrodo a un valor lo suficientemente oxidante para que el mediador esté totalmente en su forma oxidada en la superficie del electrodo. Sin embargo, podríamos querer variar este potencial para obtener también información mecanística. Si asumimos una cinética reversible, podemos aplicar la ecuación de Nernst, considerando  $[A]_0$  y  $[B]_0$  las concentraciones en la superficie del electrodo:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[A]_0}{[B]_0} \quad (1.80)$$

El potencial adimensional  $\varepsilon$  se define como:

$$\varepsilon = \frac{(E - E^0)nF}{RT} \quad (1.81)$$

lo que permite encontrar una expresión para  $a$  en la superficie del electrodo en función del potencial, que es la primera condición de contorno para resolver (1.78) y (1.79):

$$a_\varepsilon = \frac{1}{1 + e^{-\varepsilon}} \quad (1.82)$$

La tabla 1.3 reúne todas las condiciones de contorno:

condición de contorno	condición adimensional	condición dimensionalizada
$\chi = 1$ interfase película/solución	$s = 1$	$[S] = K_S [S]_\infty$
$\chi = 1$ interfase película/solución	$\frac{da}{d\chi} = 0$	$\frac{d[A]}{dx} = \frac{d[B]}{dx} = 0$
$\chi = 0$ superficie del electrodo	$a = a_\varepsilon$	$\frac{[A]_0}{[B]_0} = e^{(E-E^0)nF/RT}$
$\chi = 0$ superficie del electrodo	$\frac{ds}{d\chi} = 0$	$\frac{d[S]}{dx} = 0$

Tabla 1.3: condiciones de contorno para resolver (1.78) y (1.79) suponiendo comportamiento reversible de la cupla redox sobre el electrodo.

El flujo que se mide en el electrodo es el flujo de la especie B que llega al mismo:

$$j_{obs} = -D_{e-} \left( \frac{d[A]}{dx} \right)_{x=0} \quad (1.83)$$

o en forma adimensional:

$$J_{obs} = \frac{lj_{obs}}{D_{e-} [A_\Sigma]} = - \left( \frac{da}{d\chi} \right)_{\chi=0} \quad (1.84)$$

Igualando (1.27) y (1.28), integrando entre los dos extremos de la película y aplicando las condiciones de contorno de la tabla 1.3 llegamos a que el flujo de sustrato que reacciona en todo el volumen de la película,  $J_S$ , es igual al flujo de mediador que reacciona sobre el electrodo.

$$J_{obs} = J_S \quad (1.85)$$

donde

$$J_S = \frac{lj_S}{D_{e-} [A_\Sigma]} = \frac{\eta}{\gamma} \left( \frac{ds}{d\chi} \right)_{\chi=1} \quad (1.86)$$

y  $j_S$  es el flujo dimensionalizado:

$$j_S = D_S \left( \frac{d[S]}{dx} \right)_{x=l} \quad (1.87)$$

### 1.9.2.3.1.3 Soluciones analíticas aproximadas

Las ecuaciones (1.78) y (1.79) son ecuaciones diferenciales de segundo orden no lineales, sin solución analítica cerrada. Bartlett y Pratt consideraron distintos casos límite aproximados. La tabla 1.4 resume los 7 casos límite.

Caso	Proceso limitante	Fórmula aproximada
I	reacción enzima-mediador película delgada	$i = nFAa_{\varepsilon} [A_{\Sigma}] k [E] l$ (1.88)
II	reacción enzima-mediador película gruesa	$i = nFAa_{\varepsilon} D_{e-}^{1/2} [A_{\Sigma}] k^{1/2} [E]^{1/2}$ (1.89)
III	agotamiento de sustrato y de mediador	$i = nFA \frac{D_{e-} [A_{\Sigma}] a_{\varepsilon} + D_s K_s [S]_{\infty}}{l}$ (1.90)
IV	reacción enzima-sustrato película gruesa	$i = nFA K_s [S]_{\infty} \sqrt{\frac{k_{cat} [E] D_s}{K_{MS} + 1/2 K_s [S]_{\infty}}}$ (1.91)
V	reacción enzima-sustrato película delgada	$i = nFA \frac{l [E] k_{cat} K_s [S]_{\infty}}{K_{MS} + K_s [S]_{\infty}}$ (1.92)
VI	caso de transición	$i = nFA \sqrt{2a_{\varepsilon} [A_{\Sigma}] k [E] D_s K_s [S]_{\infty}}$ (1.93)
VII	caso de transición	$i = nFA \sqrt{\frac{2a_{\varepsilon} D_{e-} [A_{\Sigma}] k_{cat} [E] K_s [S]_{\infty}}{K_{MS} + K_s [S]_{\infty}}}$ (1.94)

Tabla 1.4: Fórmulas analíticas aproximadas para los distintos casos límite según el modelo de Bartlett-Pratt [49].

## 1.10 Métodos de inmovilización de enzimas y mediadores

Debemos mencionar que la inmovilización de enzimas es un proceso que no está libre de inconvenientes. El más habitual, es la pérdida parcial o total de actividad enzimática.

No todas las técnicas aseguran la misma reproducibilidad en los resultados.

También debe tenerse en cuenta que dependiendo de la técnica de inmovilización se conseguirá distinto grado de heterogeneidad del sistema soporte-enzima, donde podrían existir distintas fracciones de enzimas inmovilizadas con distinto número de uniones al soporte. En el mismo sentido, la mayoría de las técnicas no logran control sobre la orientación de la enzima adsorbida.

Se han utilizado distintas técnicas para depositar enzimas en monocapas, entre otras podemos mencionar:

- monocapas autoensambladas [80, 88, 113-116];
- adsorción electrostática [117];

- anclado covalente [80, 118];
- películas de Langmuir-Blodgett [119-121];
- películas de surfactantes [122];
- bioafinidad [123], incluyendo antígeno anticuerpo [62] y avidina biotina [124];
- entrecruzamiento [125, 126];
- apoenzima reconstituida [127, 128].

Por otro lado, las técnicas más usadas para depositar multicapas son:

- atrapamiento en un hidrogel [57, 76, 129-133];
- atrapamiento en un polímero conductor electropolimerizado [134];
- autoensamblado electrostático capa-por-capas [135-140];
- multicapas con dendrímeros redox, a través de uniones covalentes [141];
- bioafinidad, reacciones antígeno-anticuerpo [68, 142] y avidina biotina [85, 124].

Nótese que varias de las técnicas mencionadas han sido utilizadas tanto para la inmovilización de monocapas como de multicapas.

Todas las técnicas listadas permiten la coinmovilización conjunta del mediador redox con la enzima.

La técnica de atrapamiento en un hidrogel ha sido ampliamente utilizada debido a la simplicidad de su implementación y a que fue una de las primeras reportadas para la coinmovilización de enzima y mediador. Sin embargo, no permite control sobre el diseño de la estructura. Lo mismo ocurre el atrapamiento en polímeros conductores mencionado.

Por el contrario, las técnicas de autoensamblado electrostático capa-por-capas, y las técnicas de construcción de multicapas por reacciones de bioafinidad, permiten un preciso control en el diseño y ordenamiento de la estructura de las multicapas, permitiendo ajustar a voluntad el espesor y el contenido de enzima y de mediador redox de las mismas.

### **1.10.1 Autoensamblado electrostático**

La técnica de autoensamblado electrostático fue introducida por Decher *y col.* [143, 144]. La figura 1.9 representa esquemáticamente los procesos involucrados en el autoensamblado electrostático capa-por-capas. Se comienza con un sustrato que posee una cierta carga superficial (producida por oxidación química, autoensamblado

electrostático de tioles o silanos cargados, etc.), en el esquema mostrado, esta es negativa.

Al sumergir el sustrato cargado en una solución de polielectrolito de carga opuesta, este se adsorberá sobre el mismo (paso 1). Por lavado (pasos 2 y 4) se desorben las moléculas que no están adsorbidas específicamente. El proceso de autoensamblado produce sobrecompensación de carga, por lo que luego del primer paso de adsorción, la carga inicial se revierte. Si sumergimos el sustrato en una solución de polielectrolito de carga opuesta (paso 3) se producirá un nuevo paso de adsorción, también con sobrecompensación de carga.

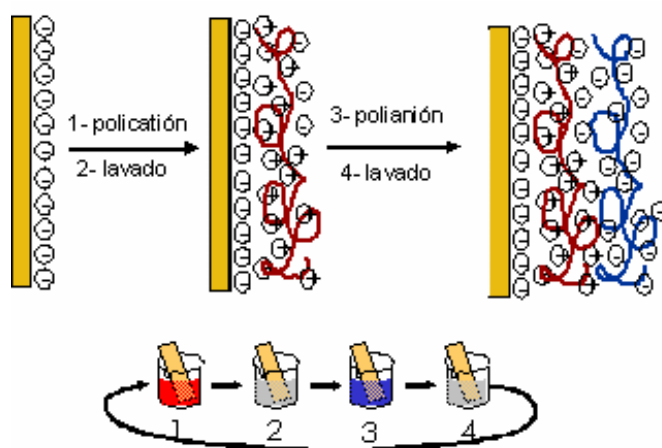


Figura 1.9: Representación esquemática del proceso de autoensamblado electrostático capa por capa. Figura adaptada de referencia [145].

Alternando soluciones de polielectrolitos de carga opuesta y pasos de lavado, pueden construirse estructuras del espesor deseado. También pueden alternarse distintos componentes, a razón de un componente por paso de adsorción (y respetando las cargas opuestas en pasos sucesivos). Se han reportado estructuras de multicapas depositadas electrostáticamente capa-por-capas de polímeros lineales [146, 147], proteínas y enzimas en general [148, 149], moléculas de ADN [150], coloides [151], virus [152], entre otras macromoléculas.

Existe evidencia experimental de una avanzada interpenetración de las distintas capas individuales [145, 153], lo que confiere particulares propiedades a las películas.

Esta estrategia de formación de películas delgadas es muy valiosa dado que permite diseñar películas con funcionalidades muy diversas, en la escala de los nanómetros a costos irrisorios. Todo lo que se necesita para fabricar estas películas es un sustrato, las

moléculas de reactivos, vasos de precipitados o recipientes análogos para contener las soluciones y agua ultrapura para preparar las soluciones y para los lavados intermedios.

### 1.10.2 El sistema MPS/PAH-Os/GOx

Vimos que la técnica de autoensamblado electrostático es una muy interesante alternativa para la inmovilización de enzimas con el objetivo de fabricar biosensores integrados.

La enzima GOx tiene un punto isoeléctrico de 4.2. Es decir, si trabajamos a un pH lo suficientemente lejos de 4.2, tendremos una macromolécula cargada. A pH cercano a 7, el pH de los medios biológicos, GOx estará cargada negativamente.

Calvo, Wolosiuk *y col.* [10] han reportado la fabricación y caracterización de biosensores totalmente integrados por autoensamblado electrostático alternando capas de GOx y un polielectrolito débil modificado con un complejo de Os, PAH-Os.

En la sección 1.3.1 presentamos la estructura de PAH-Os. Dijimos que los centros de Os podían actuar como mediadores redox. La estructura polimérica, por su parte, sirve como *cemento o pegamento* para formar las multicapas del autoensamblado. Los grupos amino, son bases débiles que en solución se protonan gradualmente. PAH se comporta como un polielectrolito débil, su grado de protonación (y su densidad de carga lineal) aumenta conforme disminuye el pH de la solución en la cual está disuelto. Si trabajamos a pH inferior a aproximadamente 10, la macromolécula presentará carga positiva, es decir, carga opuesta a GOx. Podremos entonces formar estructuras por autoensamblado electrostático de ambas macromoléculas.

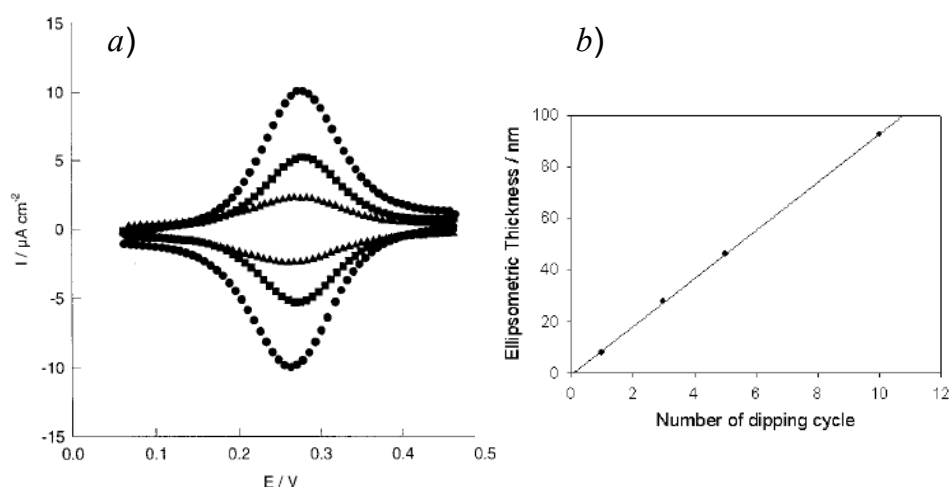
Señalamos que para empezar a construir una estructura de multicapas era necesario cargar primeramente a un sustrato. Los grupos tioles tienen una gran afinidad por Au, Ag y Cu. Soluciones acuosas o etanólicas de tioles forman películas delgadas de alto ordenamiento sobre estos metales [154]. Eligiendo una cadena hidrocarbonada con un grupo terminal (opuesto al tiol) adecuado, puede imprimirse carga (o funcionalidad en general) a la superficie con facilidad.

Volviendo al sistema que estamos describiendo, Calvo, Wolosiuk *y col.* [10], proponen trabajar con sustratos de Au y un tiol corto que expone un grupo funcional negativo: mercaptopropansulfonato (MPS, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na).

Calvo, Wolosiuk *y col.* han caracterizado muy bien el sistema MPS/PAH-Os/GOx como biosensor amperométrico [10, 94, 155-161]. Estos estudios son un excelente punto de

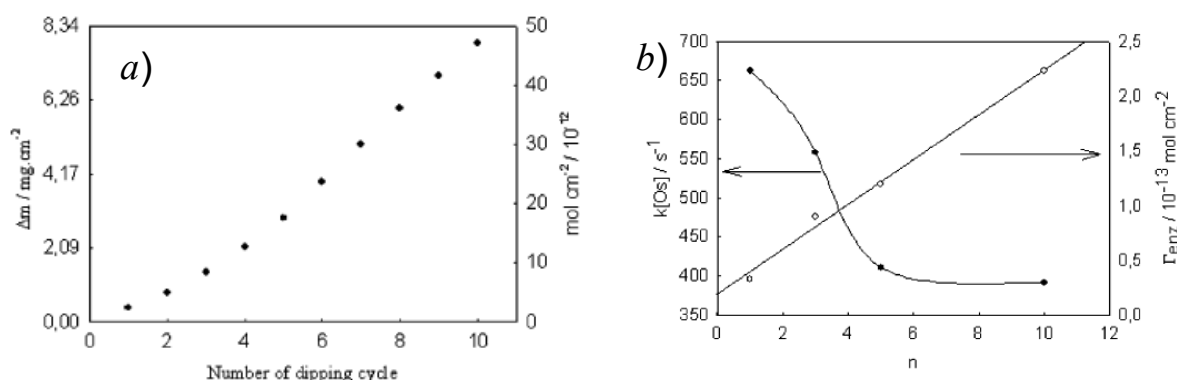


partida para utilizar este sistema para estudiar modelos de electrodos enzimáticos. Las figuras 1.10 a 1.12 muestran las principales características del sistema.



**Figura 1.10:** a) Voltagramas cíclicos de multicapas de  $(\text{PAH-Os/GOx})_n$ , en ausencia de sustrato. Triángulos,  $n = 2$ ; Cuadrados,  $n = 4$ ; Círculos,  $n = 6$ . Por la integración del pico anódico (o del catódico) puede averiguarse la carga de Os sobre el electrodo. Figura extraída de referencia [10]. b) Espesor elipsométrico en función del número de pasos de adsorción para multicapas de  $(\text{PAH-Os/GOx})_n$  de número de pasos de adsorción ( $n$ ) variables. Figura extraída de la información suplementaria de referencia [155].

La figura 1.10.a muestra voltagramas cíclicos en ausencia de sustrato para número de pasos de adsorción crecientes. Se observa cómo aumenta el área bajo el pico anódico, indicación de que crece la carga redox en las películas. En 1.10.b se observa un aumento del espesor elipsométrico también con el número de pasos de adsorción.

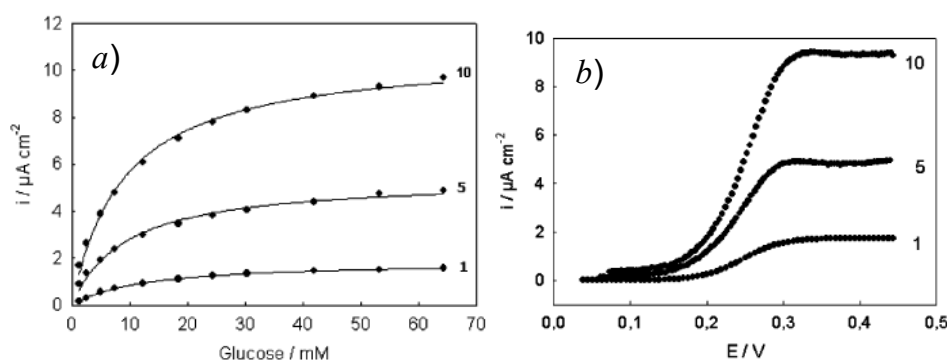


**Figura 1.11:** a) Masa de GOx adsorbida (a partir de una solución acuosa  $1\mu\text{M}$ ) medida por QCM para multicapas de  $(\text{PAH-Os})_n(\text{GOx})_m$  en función del número de pasos de adsorción. b) Parámetros extraídos de un ajuste no lineal de la curva de corriente en función de la concentración de sustrato a la ecuación de capa delgada. Izquierda, parámetro  $k[\text{Os}]$ , derecha, concentración superficial de enzima. Ambas figuras extraídas de referencia [155].

La figura 1.11.a muestra el aumento de la masa total de enzima adsorbida determinado por microbalanza de cristal de cuarzo. En este caso se trata de una técnica que determina

cantidad de proteína total, y no discrimina si la enzima está activa o *cableada* por el mediador redox (definiremos mejor estos términos en breve). En 1.11.b se observan los parámetros que se obtienen por ajuste no lineal de las curvas mostradas en la figura 1.12.b al modelo de capa delgada [49, 135],  $k[Os]$  (un parámetro cinético) y  $\Gamma_{enz}$ , la concentración superficial de *enzima cableada*.

La figura 1.12.a muestra curvas de calibración (respuesta amperométrica en función de la concentración de sustrato) para películas de número de pasos de adsorción variables. En 1.12.b se observan los voltagramas cíclicos estacionarios a saturación de sustrato para estas mismas películas. Se observa en todos los casos que la corriente catalítica crece al aumentar el número de pasos de adsorción, para todo el intervalo de concentraciones de glucosa.



**Figura 1.12:** a) Curvas de corriente en función de la concentración de glucosa. b) voltagrama cíclico estacionario (sólo barrido en sentido anódico) en solución 50mM de glucosa. En ambos casos, películas de (PAH-Os/GOx)<sub>m</sub> con m variable, según se indica en las figuras al lado de cada curva (1, 5 y 10 bicapas). Ambas figuras extraídas de referencia [155].

### 1.10.3 El concepto de *enzima cableada*

Todos los electrodos amperométricos totalmente integrados muestran un denominador común. Hasta la fecha, nadie ha reportado trabajos donde se logre *cablear* todas las moléculas de enzima que se encuentran inmovilizadas con la superficie del electrodo [10, 124, 135].

En la jerga de electrodos enzimáticos amperométricos los términos *cablear* o *cableado molecular*, suelen utilizarse para describir la interacción efectiva entre el mediador redox y la enzima. A partir de esta idea, surgen los conceptos de *cable molecular*, como sinónimo de mediador redox y de *enzima cableada*, que tiene un significado distinto a *enzima total* o *enzima inmovilizada*.

Desarrollemos un poco más este problema.

Al preparar electrodos inmovilizados, la cantidad de enzima total que se adsorbe o deposita puede determinarse por distintas técnicas, por ejemplo por microbalanza de cristal de cuarzo, QCM<sup>2</sup> [10], o por marcación radioactiva con <sup>125</sup>I [62]. Se trata de determinaciones físicas, que no distinguen si la enzima que se adsorbe está activa o no, o si está *cableada*.

Bajo determinadas condiciones, puede predecirse cuál sería la respuesta del biosensor si todas las moléculas de enzima inmovilizadas participaran activamente de ciclos catalíticos. Se encuentra que la corriente medida en estas circunstancias es muy inferior a la corriente esperada (normalmente, inferior al 10 %). Distintos autores han presentado pruebas que llevan siempre a las mismas conclusiones. Si bien algunas moléculas de enzima a veces pierden su actividad enzimática, la mayor parte permanece activa. Las enzimas simplemente no pueden comunicarse eléctricamente con el electrodo, no están *cableadas*. La persistencia de la actividad enzimática ha sido comprobada por agregado de un mediador soluble, capaz de difundir dentro de la película y producir un muy importante aumento de la corriente [124, 135]. Estos ejemplos indicarían que la no comunicación de las enzimas con el electrodo se produce por una incapacidad del mediador inmovilizado de acercarse a algunas enzimas y mediar la transferencia de electrones. Aparentemente los centros redox tendrían muy menor movilidad al estar anclados a una matriz y de no estar adecuadamente posicionados cerca del grupo prostético de la enzima, no se producirá *cableado*.

Tomemos como ejemplo los datos mostrados en la figura 1.11. Los paneles *a* y *b* muestran la concentración de enzima total determinada por QCM y la concentración de enzima cableada, determinada por ajuste a un modelo para películas delgadas. La cantidad de *enzima cableada*, es aproximadamente el 1% de la enzima total depositada.

### 1.11 Objetivos

Como objetivo general de la presente tesis doctoral, nos proponemos validar un modelo ya reportado para biosensores amperométricos [49], donde tanto la enzima como el mediador se encuentran inmovilizados.

Para llevar adelante este objetivo contamos con el sistema PAH-Os/GOx. La técnica de autoensamblado electrostático capa-por-capla ofrece control sobre el espesor y la

---

<sup>2</sup> Para más detalles, ver capítulo 2 de esta tesis.

estructura de la película formada. Esto nos permite diseñar cuidadosamente la arquitectura del autoensamblado.

Al presentar el modelo de Bartlett-Pratt [49], vimos que proponía un análisis muy exhaustivo de todos los procesos involucrados y que analizaba una gran cantidad de casos cinéticos límite. El modelo presenta fórmulas analíticas aproximadas que predicen la señal del biosensor en función de distintos parámetros y además propone un método de resolución de las ecuaciones diferenciales en forma numérica. De esta forma, alienta a un análisis combinado del problema cinético-difusional. Las fórmulas analíticas aproximadas brindan una relación directa entre los distintos parámetros y la señal del biosensor, las simulaciones no. Sin embargo, las primeras tienen una aplicación restringida, mientras que las simulaciones son válidas siempre.

Tener la capacidad de predecir la respuesta de un biosensor enzimático amperométrico sin necesidad de calibración del dispositivo sería de un enorme valor.

Es en este sentido, que resaltamos la necesidad de contar con modelos de comportamiento para los mismos que lleven a expresiones matemáticas que permitan cuantificar la respuesta en función de los parámetros de construcción: concentraciones, espesores, constantes cinéticas y coeficientes de difusión.

Hemos descrito en esta introducción el problema inherente al modelado de estos sistemas. La descripción matemática de todos los procesos lleva a ecuaciones diferenciales sin solución analítica cerrada. Distintos autores han llegado a distintas expresiones analíticas aproximadas, otros han tratado de resolver el problema numéricamente, mientras que unos pocos combinaron ambas estrategias.

Desarrollar modelos cinéticos sin verificarlos experimentalmente resulta un ejercicio teórico muy interesante pero de poco valor para aplicaciones reales. La validación experimental no puede soslayarse. Por lo general, la comparación de las predicciones del modelo contra datos reales es de gran ayuda para refinar el modelo y así lograr un mejor entendimiento de los procesos que ocurren en el sistema real.

Cuando un modelo ha sido probado bajo distintas condiciones y validado, puede obtenerse mucha información del ajuste de uno o unos pocos datos experimentales al mismo. Sin embargo, cuando un modelo no ha sido aún puesto a prueba, uno o unos pocos resultados experimentales no son suficientes para validarlo.

Antes de apresurarse a realizar experimentos, resulta necesario pensar detenidamente el diseño de los mismos. Para encarar la tarea de validación de un modelo, será necesario llevar a cabo una serie de experimentos para probar la dependencia de la señal con cada

una de las variables experimentales, en un intervalo de valores tan grande como la física o química del problema nos lo permitan. Por ejemplo, será necesario estudiar cuál es la dependencia de la señal que arroja el biosensor al variar la concentración de sustrato, y comparar esta respuesta con la predicha por el modelo. Y así sucesivamente, para cada variable que aparezca en las fórmulas analíticas aproximadas: otras concentraciones, constantes cinéticas, espesores, coeficientes de difusión y partición, etc. Será necesario, intentar moverse a través de la mayor cantidad de casos límite experimentalmente alcanzables.

Para allanar el camino, será bueno empezar por las condiciones más cercanas a electrodos ya descritos en la literatura, si estos existiesen.

Si el modelo inicial no parece ajustarse a los datos, naturalmente deberá ser modificado, revisando qué suposiciones fueron hechas o qué factores no fueron tenidos en cuenta originalmente. El modelo mejorado deberá ser, una vez más puesto a prueba frente a los datos reales.

Una vez que estemos satisfechos con un modelo y que sus predicciones parezcan ajustarse al comportamiento de un sistema real, debemos comparar críticamente y analizar la consistencia de los parámetros obtenidos del ajuste al nuevo modelo, con valores de estos mismos parámetros ya reportados.

Inmediatamente vemos que para llevar a cabo este objetivo será necesario contar con un método de fabricación de electrodos que sea reproducible. De lo contrario, resultados provenientes de distintos electrodos no podrán ser comparados cuantitativamente entre sí. Hemos visto que el estado del arte en técnicas de preparación de electrodos de enzima (o de enzima y mediador) está muy avanzado. Existen varias técnicas reportadas y probadas que permiten preparar en forma reproducible películas que coinmovilizan al mediador y a la enzima. Estas técnicas son lo suficientemente versátiles como para permitirnos, además variar el diseño del biosensor, manteniendo los mismos *ladrillos* de construcción. En este punto, nosotros nos decidimos por la mencionada técnica de autoensamblado electrostático.

Como primer objetivo parcial, estudiamos el sistema homogéneo análogo a PAH-Os/GOx. Trabajamos con  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClpyCOOH}]^+$ , el complejo soluble análogo al complejo unido a PAH, midiendo la señal amperométrica sobre un electrodo inerte. Analizamos en primer término, el comportamiento general del sistema. En segundo lugar, intentamos la extracción de las constantes cinéticas características para el mismo a partir del ajuste de los datos experimentales a un modelo ya validado.

Como segundo objetivo parcial, estudiamos un aspecto de las estructuras de enzima y polielectrolito débil depositados electrostáticamente capa-por-capas que aún no había sido reportado. El efecto de la densidad de carga lineal sobre el polielectrolito en las soluciones de autoensamblado era un factor desconocido que intentamos comprender. Estos estudios nos permitieron además familiarizarnos con técnicas experimentales de gran utilidad para la caracterización de películas delgadas, como ser la microbalanza de cristal de cuarzo, la elipsometría, la microscopía y espectroscopía de fuerza atómica, además de las técnicas electroquímicas ya empleadas para el sistema homogéneo. Esos dos primeros trabajos nos brindaron nuevos conocimientos acerca del sistema, además de despertar otros interrogantes. Gracias a ambos aportes, encaramos la etapa final de validación del modelo.

## Capítulo 2.

### Materiales y Métodos

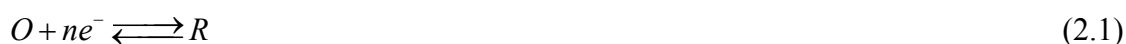
#### 2.1. Técnicas Instrumentales

Muchas de las técnicas instrumentales empleadas en esta tesis son de gran aplicación en otras ramas de la Físico-Química y de las Ciencias Exactas y Naturales en general. Sin embargo, para no extendernos en exceso, nos centraremos en la descripción de las aplicaciones y usos específicos que son de particular implicancia para este trabajo de tesis.

##### 2.1.1. Técnicas Electroquímicas

De todas las técnicas instrumentales usadas en la presente tesis, las técnicas electroquímicas son seguramente las más antiguas, conocidas, estudiadas y versátiles. En general son de fácil implementación y el instrumental asociado a las mismas es relativamente económico. Se utilizan normalmente para estudiar procesos de óxido-reducción en fase heterogénea, es decir, especies que reaccionan sobre la superficie de un electrodo, tomando o liberando electrones. Una de las grandes ventajas de las técnicas electroquímicas es su selectividad para distintas especies químicas.

Una reacción de electrodo de la forma general



involucra una secuencia de pasos que puede incluir transporte de reactivos hasta la superficie del electrodo, adsorción de reactivos, transferencia de electrones, remoción del producto de la superficie del electrodo, reacciones homogéneas acopladas en la solución, etc. La velocidad global del proceso estará determinada por la velocidad del paso más lento de la secuencia.

Las técnicas electroquímicas más usadas requieren del uso de tres electrodos. El *electrodo de trabajo* es aquel en el cual se producen los cambios electroquímicos de interés. La corriente circula siempre entre el electrodo de trabajo y un *electrodo auxiliar* o *contraelectrodo*, de área mucho mayor que el electrodo de trabajo para evitar la polarización y que la reacción en este interfiera en la respuesta del electrodo de trabajo

(el circuito se cierra a través de la solución de electrolito). El tercer electrodo es el *electrodo de referencia* por el que no circula corriente debido a su alta impedancia y que controla el potencial del electrodo de trabajo.

En la figura 2.1 se aprecia un esquema sencillo de una celda de tres electrodos conectada a un potenciostato.

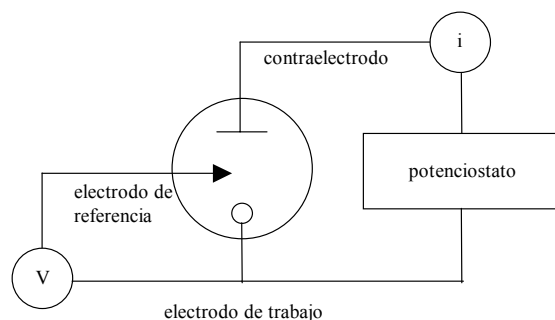


Figura 2.1: Esquema de una celda electroquímica de tres electrodos con un potenciostato.

Un potenciostato permite controlar la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo respecto a un electrodo de referencia con una mínima interferencia de la caída óhmica  $IR$ . No hay circulación de corriente a través del electrodo de referencia.

Actualmente, los potenciostatos comerciales vienen provistos de generadores de rampas y funciones de potencial en función del tiempo diversas. Además de controlar el potencial, miden con precisión la corriente que circula entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo.

Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de las reacciones de electrodo. Dependiendo del sistema químico y de la información que se quiera obtener, se utilizará la técnica, o combinación de técnicas, adecuada. En la presente tesis se trabajó únicamente con *técnicas amperométricas*, basadas en mediciones de intensidad de corriente.

### **2.1.1.2 Voltametría Cíclica de barrido lineal**

En una voltametría cíclica de barrido lineal, el potencial del electrodo de trabajo aumenta o disminuye a una velocidad de barrido constante, para luego regresar al potencial inicial a la misma velocidad, como se muestra en el perfil de potencial de la figura 2.2. Se registra la intensidad de corriente a través del electrodo de trabajo. Un gráfico de esta corriente en función del potencial (que recordemos es función del tiempo), se denomina voltagrama cíclico, voltagrama o voltamperograma. Es el espectro



electroquímico de una sustancia, muestra a qué potenciales ocurren los procesos redox, pueden detectarse reacciones químicas acopladas y hasta es posible identificar fenómenos de adsorción.

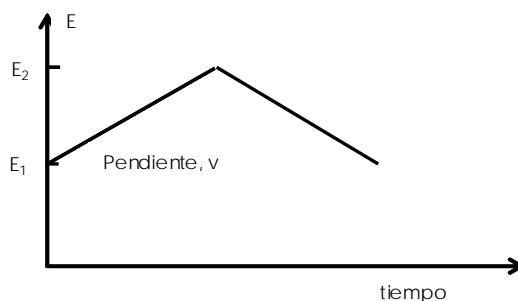


Figura 2.2: Perfil de potencial en función del tiempo para voltametría cíclica de barrido lineal

Generalmente los límites de potencial entre los cuales puede trabajarse están dados por la ausencia de picos de óxido-reducción del material del electrodo en sí mismo (cuando el electrodo se utiliza como una plataforma de reacción inerte), la descomposición del solvente, la reacción de especies concomitantes cuya señal no se quiere analizar (impurezas, muchas veces), y en el caso de películas adsorbidas, por los límites de estabilidad de las mismas.

Dependiendo de la forma del voltagrama, se puede determinar si se trata de una reacción reversible, irreversible, si se trata de una especie adsorbida electroquímicamente activa o si existen reacciones químicas acopladas.

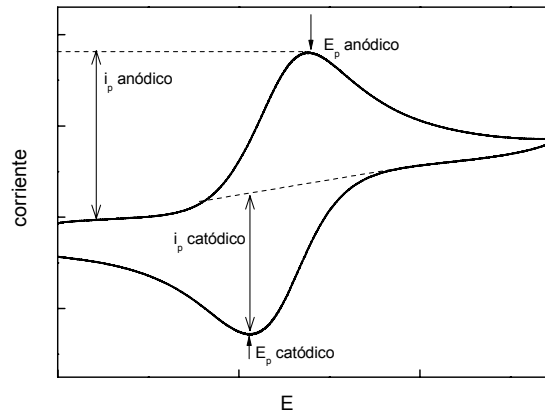
Para un proceso reversible, la velocidad de transferencia de electrones a cualquier potencial es significativamente mayor que la velocidad de transporte de masa y por lo tanto se mantiene sobre la superficie del electrodo un equilibrio nernstiano (para todas las cuplas redox, las concentraciones cumplen la ecuación de Nernst).

Analicemos por separado la respuesta de especies en solución y las de especies adsorbidas sobre un electrodo.

#### **2.1.1.2.1 Voltametría cíclica de una especie electroactiva presente solución sobre un electrodo inerte**

En la figura 2.3 se muestra un voltagrama cíclico característico para una cupla electroactiva reversible presente en solución. Al acercarse al potencial redox de la cupla, la corriente empieza a crecer y luego de pasar por un pico, cae nuevamente, aunque no

hasta cero, sino al valor límite que impone la difusión, que limita la llegada de especie activa desde el seno de la solución.



**Figura 2.3:** Voltograma cíclico para una cupla reversible presente en solución sobre un electrodo inerte. En la figura se señalan los potenciales de pico anódico y catódico, y la forma de determinar las corrientes de pico.

Para una cupla reversible, la corriente de pico responde a la ecuación (2.2):

$$i_p = -0.4463nFA \left( \frac{nF}{RT} \right)^{1/2} C_R^\infty D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (2.2)$$

donde  $i_p$  (A) es la corriente de pico;  $n$ , el número de electrones involucrados en la reacción sobre el electrodo;  $A$ , el área del electrodo;  $D$  ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) el coeficiente de difusión de la especie electroactiva;  $\nu$  ( $\text{V s}^{-1}$ ) es la velocidad de barrido y  $C_R^\infty$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución (en este caso, se presupone que se trata de una especie en estado reducido que se oxida sobre el electrodo).

Podemos ver que la corriente de pico es proporcional a la concentración de la especie electroactiva y a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y del coeficiente de difusión. Un gráfico de corriente de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido se utiliza por lo general como diagnóstico de la reversibilidad de la cupla. La respuesta debe ser lineal y el gráfico pasar por el origen. Si esto es así, de la pendiente del gráfico se puede averiguar el coeficiente de difusión.

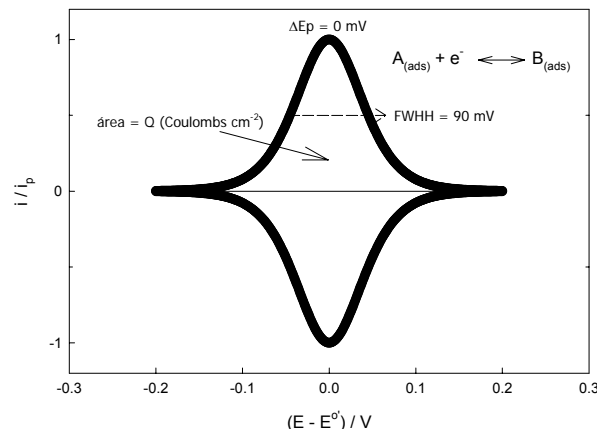
Otros parámetros diagnósticos de la reversibilidad de una reacción son (a  $25^\circ\text{C}$ ):

a) la diferencia entre el potencial de pico anódico y catódico debe ser de 59 mV dividido el número de electrones que intercambia la cupla:  $\Delta E_p = E_p^a - E_p^c = 59\text{mV} / n$ ;

- b) el módulo de la diferencia entre el potencial de pico y el potencial a media altura de pico debe ser de 59 mV dividido por el número de electrones.  $|E_p - E_{p/2}| = 59mV / n$ ;
- c) la relación de las corriente de pico debe ser 1,  $|i_p^a / i_p^c| = 1$  ;
- d)  $E_p$  es independiente de  $v$ ;
- e) a potenciales mayores de  $E_p$  se cumple que  $i^{-2}$  es proporcional a  $t$ .

### 2.1.1.2.2 Voltametría cíclica de una especie electroactiva adsorbida sobre el electrodo

El ejemplo más sencillo constituye el caso donde la especie oxidada y/o la reducida se encuentran adsorbidas e inmobilizadas sobre el electrodo. La voltametría cíclica para el caso ideal y reversible se muestra en la figura 2.4.



**Figura 2.4:** Voltagrama cíclico para una especie reversible adsorbida sobre el electrodo ( $n = 1$ ). En la figura se señala el ancho de pico a media altura (FWHH), la nula separación entre picos catódico y anódico y se indica cómo calcular la carga a partir del área.

En el caso ideal, los picos anódico y catódico aparecen al mismo potencial, *i.e.*  $E_p^a = E_p^c$ .

Se observa que la corriente crece al acercarse al potencial de la cupla, llega a un máximo y luego cae hasta cero, debido al agotamiento de moléculas sobre el electrodo que pueden oxidarse/reducirse (en este caso, no llegan más moléculas desde el seno de la solución). Las áreas de los picos catódicos y anódicos son iguales, igual que el módulo de la corriente de pico ( $|i_p^a| = |i_p^c|$ ). El ancho a media altura del pico es igual a  $90.6mV/n$ .

La respuesta amperométrica de una cupla reversible adsorbida sobre un electrodo está dada por:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma^0}{4RT} v \tag{2.3}$$

donde  $\Gamma^0$  es la concentración superficial de sitios redox y los demás símbolos tienen su significado habitual.

El área bajo el pico de oxidación corresponde a la carga asociada a la especie adsorbida ( $Q$ ), por lo que es posible obtener  $\Gamma^0$  según:

$$\Gamma^0 = \frac{Q}{nF} \quad (2.4)$$

### 2.1.1.3 Cronoamperometría

En la cronoamperometría el potencial del electrodo de trabajo se cambia instantáneamente y se mantiene constante mientras se registra la corriente en función del tiempo. Es posible aplicar saltos de potencial sucesivos, donde el nuevo potencial se mantiene por igual o distinto intervalo de tiempo que el valor anterior.

La figura 2.5 muestra una señal de perturbación típica de cronoamperometría.

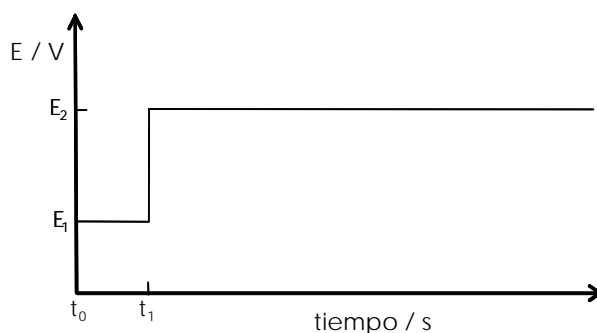


Figura 2.5: Perfil de potencial en función del tiempo para una cronoamperometría donde se aplican dos potenciales distintos

Para una especie redox R presente en solución, si se aplica un salto de potencial, tal que  $E_{\text{aplicado}} \gg E_R^0$ , la concentración de R sobre la superficie del electrodo y la corriente en función del tiempo está controlada difusionalmente y dada por la ecuación de Cottrell:

$$i = \frac{nFD_R^{1/2} C_R^\infty}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.5)$$

Para el caso de una especie electroactiva adsorbida sobre el electrodo, al aplicar un salto de potencial tal que  $E_{\text{aplicado}} \gg E_R^0$ , la corriente resultante decaerá también en el tiempo, hasta llegar a cero, una vez más producto del agotamiento del material reactivo sobre el electrodo que no es repuesto. La integración del área bajo la curva de corriente en función del tiempo será igual a la concentración superficial de especie electroactiva  $\Gamma^0$ .

#### **2.1.1.4 Electrodo rotatorio**

La utilización de un electrodo de disco rotante, o electrodo rotatorio es una herramienta muy importante cuando se desea controlar y variar el transporte de masa hacia el electrodo. El transporte de masa se ve acelerado fruto de la aplicación de una fuerza mecánica externa que produce una convección forzada.

El electrodo rotatorio es una forma sencilla de producir convección forzada donde las condiciones hidrodinámicas estén bien definidas.

#### **2.1.1.5 Instrumentación**

En la presente tesis se utilizaron indistintamente dos equipos comerciales, AUTOLAB PGSTAT 30 potentiostat/galvanostat, capaz de trabajar también como bipotenciostato, y un equipo más sencillo de fabricación nacional, TEQ 02.

Para los experimentos con electrodo rotatorio se utilizó un controlador de velocidad de fabricación artesanal en el laboratorio y un motor Micro Switch DC Control, FREEPORT.

#### **2.1.1.6 Materiales**

##### **2.1.1.6.1 Electroodos**

###### **2.1.1.6.1.1 Electroodos de trabajo**

Para los experimentos con electrodos estáticos (no rotatorios) se trabajó con dos tipos de electrodos de Au y con electrodos de Carbono vítreo.

Los electrodos de Au macizos son electrodos de forma rectangular de 0.5 x 1.0 cm, de 0.5mm de espesor. A los mismos se les suelda un alambre de Au de aproximadamente 5 cm de largo para realizar la conexión eléctrica.

Estos electrodos son reutilizables, lavándose cuidadosamente para quitar todo resto de rastro de especies adsorbidas durante el experimento previo.

También se trabajó con electrodos de Au preparados por evaporación de Au sobre obleas de Si provistas por Motorola<sup>®</sup>. Las obleas son tratadas en un equipo de limpieza Soxhlet durante un día con acetona para desgrasarlas; luego sumergidas en HF 10% para quitar todo resto de SiO<sub>2</sub>; y finalmente introducidas en una evaporadora BOC Edwards Auto 306 donde se depositan en forma sucesiva Ti (15 nm), Pd (20 nm) y Au (200 nm). El espesor de metal es controlado por una microbalanza de cristal de cuarzo acoplada a la evaporadora.

Estos electrodos son para uso único, descartándose luego de cada experimento.

Se trabajó preferentemente con los electrodos de Au macizo, dado que los mismos se pueden limpiar más exhaustivamente, lo que se evidencia en voltametrías del metal sin modificar mejor definidas.

Los electrodos de Au sobre Si se utilizaron en todas las mediciones donde se disponía de poca cantidad de reactivo para adsorber. El hecho de que estos electrodos puedan montarse en la celda previa modificación, permite realizar los procesos de autoensamblado únicamente sobre la pequeña área que será estudiada.

Los electrodos de C vítreo se prepararon pegando una barra cilíndrica de C vítreo de 0.5cm de diámetro y 4mm de espesor a un soporte de bronce, mediante pintura Epoxi Plata, y posterior recubrimiento del electrodo con Araldit®. La superficie del electrodo fue lijada hasta poner al descubierto la superficie del C.

Los electrodos de C vítreo son reutilizables, previo pulido luego de cada experimento.

El electrodo rotatorio consistió en un pequeño cilindro de Au encapsulado en Kel-F con las conexiones eléctricas adecuadas.

#### **2.1.1.6.1.2 Contraelectrodo y Electrodo de referencia**

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

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

#### **2.1.1.6.2 Limpieza de electrodos**

Los electrodos de Au macizos se trataron luego de cada experimento con solución saturada de  $\text{KMnO}_4$  en medio ácido, durante toda la noche y posteriormente con solución 10% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  acidulada.

Los electrodos de Au sobre Si se enjuagaron previo a su uso en isopropanol y posteriormente se tratan con solución de piraña ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$  3:1) recién preparada durante 1 minuto.

En ambos casos se comprobó la limpieza de los electrodos por voltametría cíclica a  $0.1\text{Vs}^{-1}$  entre 0.2 y 1.6 V en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M. En el caso de observar trazas de otras especies,

se cicla el electrodo entre 1 y 10  $\text{Vs}^{-1}$  por un mínimo de 50 ciclos y hasta tanto se observe la ausencia de contaminantes superficiales.

Los electrodos de C vítreo y el electrodo rotatorio de Au se pulieron en una pulidora metalográfica PRAZIS PUL-01 sobre paños embebidos en soluciones de alúmina en agua sucesivamente sobre distintos paños utilizando soluciones de partículas de tamaño decreciente,  $1\mu\text{m}$ ,  $0.3\mu\text{m}$  y  $0.05\mu\text{m}$ . Después de cada paso de pulido, se sonicó el electrodo en una solución de agua calidad Milli-Q<sup>®</sup> durante 1 minuto.

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

### **2.1.1.6.3 Celdas**

Se utilizaron tres tipos de celdas distintas.

Para los electrodos de Au macizos y para los electrodos de C vítreo se utilizó una celda convencional de vidrio para tres electrodos provista con entrada y salida de gases. Para los electrodos de Au sobre Si se utilizó una celda de Teflon<sup>®</sup> para tres electrodos, provista con entrada y salida de gases.

En los casos en los que se necesitó atmósfera controlada se utilizó una celda hermética de vidrio. Con entrada para gas inerte ( $\text{N}_2$  o Ar), entrada sellada para electrodo de referencia y tapa hermética con conexión para electrodos de trabajo y contra, y salida a través de un burbujeo de los gases en agua.

Todas las celdas se limpiaron con el mismo tratamiento de  $\text{KMnO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  acidulada descrito previamente para la limpieza de electrodos.

### **2.1.2 Elipsometría**

La elipsometría es una técnica óptica que resulta de gran utilidad para estudiar el crecimiento de películas poliméricas sobre electrodos. Su alta sensibilidad permite evaluar cuantitativamente espesores muy delgados a partir de la escala del nanómetro.

En el estudio de películas adsorbidas y en el análisis de cambios en interfases superficiales, resulta de especial interés el estudio de la reflexión de la luz sobre estas superficies.

La reflexión se entiende mejor si se analiza dentro del marco del modelo ondulatorio de la luz. El vector campo eléctrico (**E**) oscila en un plano perpendicular a la dirección de propagación de la onda, la intensidad de la luz es proporcional al cuadrado de la

amplitud del campo eléctrico. El vector campo magnético (**B**) oscila en un plano perpendicular al del vector **E**, pero no nos ocuparemos del mismo para el presente análisis. La luz no polarizada está compuesta por muchos haces cuyos vectores **E** oscilan en planos al azar, y no puede distinguirse ningún ángulo preferencial. Por otro lado, la luz linealmente polarizada, está compuesta por haces de luz donde el vector **E** siempre oscila en un mismo plano respecto a la dirección de propagación del haz.

Si tomamos como referencia el plano de incidencia de la luz, podemos descomponer el vector **E** en sus componentes en ejes perpendiculares, en nomenclatura habitual, *p* el plano paralelo al de incidencia del haz y *s*, el perpendicular al mismo. En el caso de luz linealmente polarizada, las componentes *s* y *p* tienen siempre la misma fase, de manera que el ángulo de polarización se conserve.

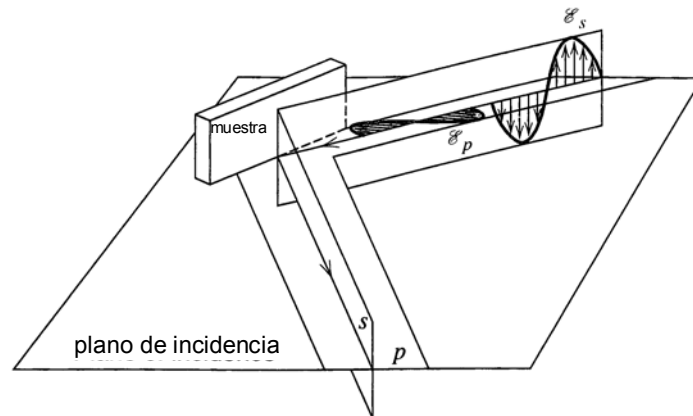
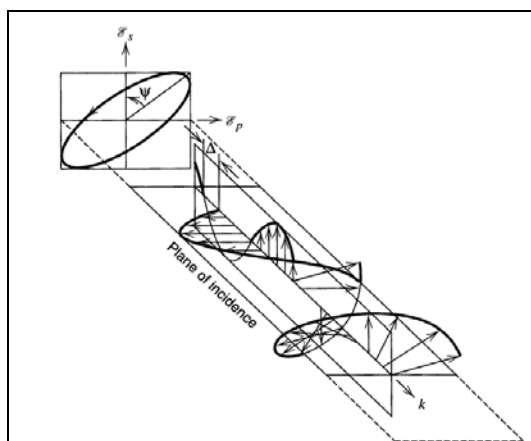


Figura 2.6: Esquema de un haz de luz polarizado incidente y los planos mencionados en el texto. Figura adaptada de referencia [12, 162].

La reflexión de un haz de luz sobre una superficie es generalmente más eficiente con respecto a algunas direcciones en particular. La superficie funciona como un polarizador y como un retardador de fase simultáneamente, cambiando el estado de polarización del haz incidente. Las componentes *s* y *p* tendrán distinta amplitud y estarán desfasadas en un determinado ángulo. Por ejemplo, si el haz incidente estaba linealmente polarizado, el haz reflejado, estará elípticamente polarizado. La magnitud de estos dos cambios es función de las propiedades de la superficie sobre la cual incide el haz. Entonces, distintos materiales y distintos espesores de materiales provocarán distintos cambios en el haz reflejado. La elipsometría se ocupa del estudio de estos cambios en la polarización de la luz para caracterizar recubrimientos superficies [12].





**Figura 2.7:** Representación esquemática de las variables que describen el cambio en la polarización de un haz de luz luego de incidir sobre una superficie. Extraída de referencias [12, 162].

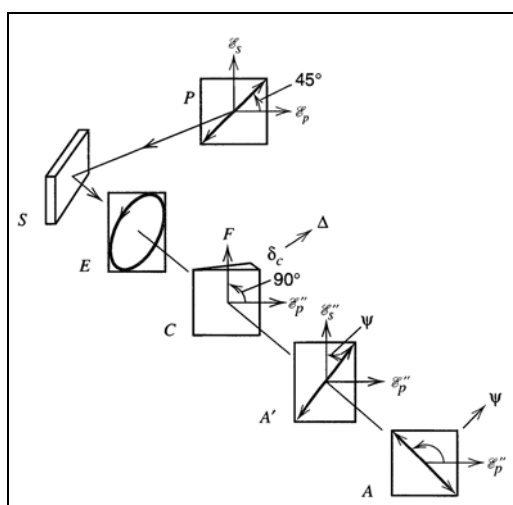
Los dos parámetros a registrar en un experimento elipsométrico son  $\Delta$  y  $\Psi$ .

$\Delta$  es la medida del desfase entre las dos componentes reflejadas ( $s$  y  $p$ ). La tangente del ángulo  $\Psi$  es el cociente entre las amplitudes de estas dos componentes.

$$\tan \Psi = \frac{|\mathcal{E}_p|}{|\mathcal{E}_s|}$$

En la figura 2.7 se muestran esquemáticamente  $\Delta$  y  $\Psi$ . Los cambios en  $\Psi$  y  $\Delta$  son producidos tanto por la película como por el sustrato sobre el cual está adsorbida la misma. Las constantes ópticas que caracterizan ópticamente a la película son: el índice de refracción,  $n$  y el coeficiente de extinción,  $k$ .

Existen distintos métodos para evaluar  $\Delta$  y  $\Psi$ . El que se considera más confiable e incorporado en el equipo usado en este trabajo de tesis se denomina método de balance nulo, y está esquematizado en la figura 2.8.



**Figura 2.8:** Representación esquemática del funcionamiento del sistema compensador para la evaluación del cambio en la polarización de la luz. Imagen extraída de [12, 162].

Un haz linealmente polarizado a  $45^\circ$  (con respecto al plano de incidencia, *i.e.*,  $\Delta = 0^\circ$  y  $\Psi = 90^\circ$ , dado que  $|\varepsilon_p| = |\varepsilon_s|$ ) incide sobre la muestra, *S*. El haz reflejado es pasado a través de un *compensador*, *C* que se ajusta para restaurar la condición original de  $\Delta = 0^\circ$ . Este haz se pasa a través de un segundo polarizador, el *analizador*, *A'*, que es rotado hasta que su ángulo de transmisión se encuentra a  $90^\circ$  del ángulo de polarización del haz y por lo tanto la intensidad de luz en el *detector*, es nula y se alcanza la condición de *extinción*.

Las posiciones del compensador y del analizador son medidas de los ángulos  $\Delta$  y  $\Psi$  respectivamente provocados por la reflexión.

Cabe aquí aclarar que  $\Delta$  y  $\Psi$  no son mediciones directas del espesor de una película delgada. El modelo matemático que se utilizará para relacionar estos ángulos con el espesor, resulta tan importante como el arreglo experimental para obtener  $\Delta$  y  $\Psi$ . El análisis matemático, basado en las ecuaciones de reflexión de Fresnel, relaciona los parámetros elipsométricos  $\Delta$  y  $\Psi$  con los parámetros ópticos  $n$  y  $k$  de sustrato, película y medio en que está inmerso el sistema y con  $d$ , el espesor de la película.

La ecuación básica de la elipsometría es:

$$\tan \Psi e^{i\Delta} = f(\lambda, \phi_0, n_p, k_p, d, n_s, k_s, n_m, k_m) \quad (2.6)$$

Siendo  $\lambda$  la longitud de onda del haz incidente,  $\phi_0$  el ángulo de incidencia del haz con respecto a la muestra.  $f$  es la función matemática cuya forma específica dependerá del modelo que se tome para el sistema en estudio. El modelo más sencillo consiste en una película con propiedades ópticas isotrópicas que se halla entre el sustrato (que se supone infinito) y el medio ambiente.

Una nota final merece el análisis de datos provenientes de películas rugosas, o irregulares. En este caso, la superficie sobre la cual incide el haz, se asemeja a una superficie mixta, que se caracteriza tanto por las propiedades ópticas de la película como por las del medio donde está inmersa.

### 2.1.2.1 Instrumentación

Las mediciones elipsométricas se realizaron con un elipsómetro comercial SENTECH SE 400 de Sentech Instruments GmbH provisto con un láser He-Ne (longitud de onda de 632,8 nm) y 10 mW de potencia como fuente lumínica. El equipo es totalmente

automático y se controla a través de una computadora. Si bien el equipo es versátil en el sentido que permite trabajar variando el ángulo de incidencia, todas las mediciones de esta tesis se llevaron a cabo a un ángulo de incidencia de  $70^\circ$ . Los parámetros elipsométricos ( $\Psi$  y  $\Delta$ ) se colectan y los valores de espesor se obtienen a partir de ajustes no lineales con software provisto por el fabricante del equipo.

### **2.1.2.2 Materiales**

Se utilizaron como sustratos obleas de Si recubiertas con Au preparadas siguiendo el mismo protocolo descrito en el caso de los electrodos de trabajo para técnicas electroquímicas.

Todas las mediciones de elipsometría fueron realizadas bajo líquido (para mantener condiciones similares a las del funcionamiento de los biosensores) en una celda provista de ventanas de acrílico que permite que el haz de láser del elipsómetro incida sobre el sustrato con un ángulo de  $70^\circ$ .

### **2.1.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**

La microscopía de fuerza atómica (también conocida por la sigla de su nombre en inglés, Atomic Force Microscopy, AFM) es una de las varias técnicas conocidas como microscopías de barrido por sonda (SPM). Estas se desarrollaron desde principios de los años '80, revolucionando la física y la química de superficies permitiendo tomar imágenes y medir propiedades de superficies en escalas muy por debajo de lo que permite cualquier microscopía óptica. La microscopía de fuerza atómica en particular, permite el estudio de muestras de casi cualquier naturaleza, no limitándose, como la microscopía de efecto túnel, a muestras conductoras de la corriente eléctrica.

La técnica de AFM mide la fuerza de interacción entre la muestra y una pequeña punta de prueba. Las dimensiones de la punta son agudas, unos pocos micrones de largo, y generalmente una decena de nanómetros de espesor. La punta se encuentra adosada a un fleje (más conocido en la jerga como *cantilever*, por su nombre en inglés), de aproximadamente  $100\text{-}200\mu\text{m}$  de largo. El cantilever funciona como un pequeño dinamómetro, que se dobla o deflecta debido a la fuerza de interacción punta-muestra. La figura 2.10.b muestra una micrografía SEM de un cantilever con la punta adosada. Un sensor mide estas deflexiones mientras el cantilever se mueve sobre la muestra. Con software adecuado (siempre provisto por el fabricante del microscopio) pueden traducirse las deflexiones del cantilever en un mapa topográfico de la muestra.

La medición en AFM corresponde a la fuerza de interacción entre los átomos de la superficie de la muestra y los de la punta de prueba. Conforme la punta se acerca a la muestra, comienza por experimentar una fuerza atractiva (genéricamente, fuerza de van der Waals). Conforme los átomos se acercan, sus nubes electrónicas se solapan, y comienzan a experimentar fuerzas repulsivas.

Existen distintos modos de operación en AFM, según la distancia de la muestra a la que se trabaje. En el modo *contacto*, la punta se acerca a la muestra a distancia por debajo del Angstrom y las fuerzas que se miden son fuerzas repulsivas. En el modo *no-contacto* la punta se mantiene a decenas o cientos de Angstroms de la superficie, el cantilever se hace vibrar y se detectan cambios en la frecuencia resonante de vibración debido a fuerzas atractivas, según se barre la muestra.

Las fuerzas repulsivas son algunos órdenes de magnitud mayores que las atractivas. Por lo cual, la operación en modo contacto requiere instrumental más sencillo y menos sensible. La desventaja de este modo de operación es que si la muestra no es lo suficientemente dura, podría dañarse por el contacto y la fuerza ejercida por la punta durante el arrastre sobre la superficie.

El modo no-contacto no daña la muestra, pero requiere instrumentación mucho más sensible, más costosa, y por lo general, condiciones más extremas, como trabajar en ultra alto vacío (UAV). Sin embargo, esta es la técnica elegida para los barridos en las escalas más pequeñas, por debajo del nanómetro.

El modo de *contacto intermitente* (más conocido por su nombre en inglés, *tapping-mode*) se ha vuelto una técnica muy importante para el análisis de muestras blandas o muestras biológicas en general. Se sobrepone a varias de las limitaciones de los otros dos modos. El cantilever se hace vibrar sobre la muestra, pero en este caso más cerca de la superficie, de manera tal, de ligeramente *tocar*, la superficie al acercarse a la misma. La amplitud de la oscilación del cantilever se modifica de acuerdo a la distancia punta-muestra o a la fuerza medida. Como la punta solo entra en contacto intermitentemente con la muestra, es menos probable que esta se dañe por la interacción, dado que no hay arrastre ni fricción por parte de la punta, como ocurría en el modo contacto.

La resolución lograda por este modo es menor a la del modo no-contacto. Sin embargo, se vuelve viable una vez más trabajar con instrumental más sencillo y no necesariamente hay que hacerlo en condiciones extremas, como el UAV. Esta técnica resulta la más adecuada para el análisis de superficies amplias, con mayores cambios topográficos, como podrían ser las muestras biológicas, o poliméricas. Este fue el modo de operación

elegido para el análisis de la topografía de los electrodos modificados, muestran blandas, que no deseábamos destruir por la interacción punta-muestra.

Otra fuerza que también actúa y afecta los resultados en la microscopía de fuerza atómica es la conocida como fuerza capilar. En condiciones ambiente normales, la mayoría de las superficies se recubren por una delgada película de unas pocas moléculas de agua. El agua rodea a la punta y ejerce una fuerza atractiva muy fuerte. Por esta razón las aplicaciones más sensibles requieren trabajar en vacío, o incluso en ultra alto vacío.

Todas nuestras mediciones fueron realizadas bajo agua, de manera tal de asegurarnos que las fuerzas capilares serán siempre iguales y afectarán todo el barrido y todas las imágenes por igual. Otra ventaja de sumergir las muestras bajo líquido, es que de esta forma nos acercamos más a las condiciones de operación de los mismos como biosensores.

Los microscopios de barrido por sonda suelen tener diseños muy similares. El barrido de la sonda sobre la muestra (o de la muestra, bajo la sonda, según el diseño del equipo) en la escala del micrón o inferiores es posible gracias a *barredores* (más conocidos como scanners, por su nombre en inglés) *piezoeléctricos*. Estos materiales tienen la particularidad de sufrir deformaciones ante la aplicación de un voltaje. Mediante un cuidadoso calibrado y control por software, pueden utilizarse para barrer el área de estudio deseada. Se trabaja también en presencia de un *lazo de retroalimentación*, que permite ajustar la distancia de la sonda respecto de la muestra de acuerdo a la señal que se está midiendo en ese mismo instante.

La gran mayoría de los equipos de AFM detectan la posición del cantilever con técnicas ópticas. En los dispositivos más comunes, un haz de láser incide sobre la parte superior del cantilever, y el haz reflejado es recibido en un fotodetector sensible a la posición. Cuando el cantilever se defleca, cambia la posición del haz de láser reflejado en el fotosensor. Estos sistemas pueden detectar cambios por debajo del Angstrom en la posición vertical. La figura 2.9 muestra los principales componentes de un microscopio AFM y la figura 2.10.a esquematiza el modo de detección de la deflexión.

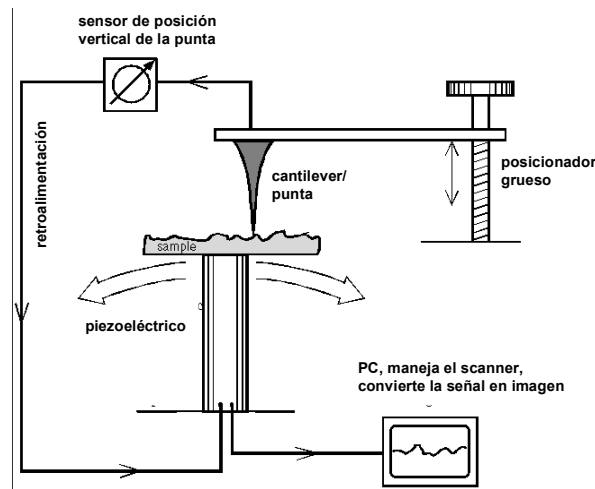


Figura 2.9: Esquema de los principales componentes de un microscopio AFM. Adaptada de [163].

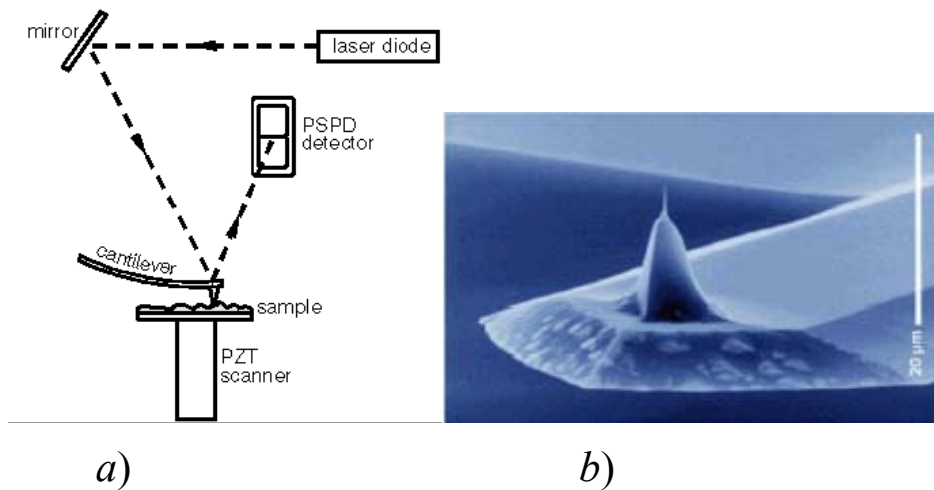


Figura 2.10: a) Detector de deflexión del cantilever, figura extraída de referencia [163]; b) Micrografía SEM de un cantilever con la punta de prueba adosada, figura extraída de referencia [164].

La rugosidad superficial se define como:

$$R_{ms} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (z_i - \bar{z})^2} \quad (2.7)$$

donde  $R_{ms}$  es la raíz de la rugosidad promedio,  $z_i$  es el valor de la altura para un pixel dado,  $\bar{z}$  es el valor promedio de alturas en el área seleccionada y el  $N$  el número total de pixels en esa área (el área seleccionada puede no coincidir con el área total del barrido).

El parámetro  $R_{ms}$  se calculó utilizando software provisto por el fabricante del equipo.

### 2.1.3.1 Espectroscopía de fuerza atómica

Las microscopías de barrido por sonda muchas veces son consideradas como técnicas para conseguir imágenes de alta resolución de superficies. Sin embargo también son una

poderosa herramienta para medir propiedades de materiales en un único punto (x, y) de la superficie de la muestra.

Las curvas de fuerza en función de la distancia punta-muestra brindan información de las propiedades elásticas locales de una superficie. Una curva de fuerza vs. distancia es un gráfico de la fuerza medida en el cantilever de AFM en la dirección z en función de la posición del tubo piezoeléctrico.

La figura 2.11 compara dos curvas fuerza en función de distancia (o deflexión vs. altura) para una muestra rígida no deformable, y una muestra blanda. Cuando la punta no está en contacto con la muestra (puntos 1 a 2) la deflexión es nula para ambos tipos de muestra. Para una muestra rígida, cuando la punta entra en contacto con la muestra, la deflexión del cantilever es proporcional al desplazamiento en altura del tubo piezoeléctrico. Para una muestra blanda, debido a que la muestra es capaz de deformarse, la deflexión será menor que el desplazamiento en altura. De hecho la respuesta elástica provocará una respuesta no-lineal entre deflexión y altura. Esta penetración de la punta en la muestra y la consiguiente deformación de la misma se denomina en la jerga de la espectroscopía de fuerza, *indentación*.

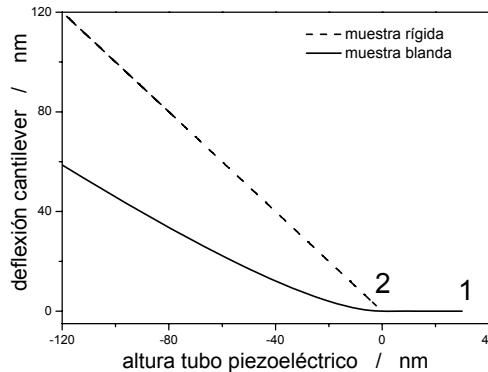


Figura 2.11: Curvas de fuerza sobre muestras rígidas (línea de trazo cortado) y blandas (trazo continuo).

Más allá del análisis de una muestra rígida, estas curvas son bastante complejas y muy específicas de cada sistema en estudio, el análisis de las mismas se centrará únicamente en las muestras analizadas y continúa en el capítulo 4 al analizar los datos experimentales.

### 2.1.3.2 Instrumentación

Todas las mediciones de AFM se realizaron en el Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Las mediciones se

realizaron en un microscopio AFM con el sistema de control multimodo NanoScope IIIa SPM (Digital Instrument -Veeco). El mismo permite el uso de varias técnicas de microscopía de fuerza atómica (AFM): modo contacto, contacto intermitente (tapping-mode), fase, volumen de fuerza, y las variantes derivadas de la combinación de contacto intermitente y la electrónica extendida. El scanner piezoeléctrico J utilizado tiene un intervalo lateral de 150  $\mu\text{m}$ . Los cantilevers fueron de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  con una constante elástica de 0.32N/m (Nano Devices, Veeco Metrology, Santa Barbara, California). Se adquirieron simultáneamente imágenes de topografía y deflexión o amplitud según el modo de operación usado. Las imágenes adquiridas fueron procesadas con el software del equipo NANOSCOPE.

### **2.1.3.3 Materiales**

Se utilizaron sustratos comerciales conocidos como *oro Robax*. Se trata de oro depositado sobre vidrio extremadamente plano (Berliner Glass). Previo a la adsorción de moléculas, la superficie de oro se flameó con llama de butano/propano, para producir la fundición de la capa de átomos más superficial de oro, y la formación de terrazas atómicamente planas.

Las mediciones bajo líquido se realizaron colocando el sustrato en la celda comercial provista por el fabricante del equipo.

### **2.1.4 Microbalanza de cristal de cuarzo**

Las propiedades piezoeléctricas del cuarzo son la base de su utilización como sensor gravimétrico. La aplicación de una tensión eléctrica oscilante sobre un cristal de este material produce una deformación periódica en su estructura cristalina. Como cualquier otro oscilador, los cristales de cuarzo también presentan una frecuencia (resonancia) para la cual la amplitud de la oscilación es máxima. Al depositar cualquier material sobre la superficie de un cristal de cuarzo, esta frecuencia resonante varía, y la magnitud de esta variación es la señal que se utiliza para detectar cambios de masa.

La microbalanza de cristal de cuarzo permite medir cambios de masa en el orden de los  $\text{ng cm}^{-2}$ , lo cual la vuelve muy útil para realizar estudios de cinética de adsorción de moléculas a nivel de monocapa o películas muy delgadas.

La figura 2.12.a muestra un esquema de un cristal de cuarzo con electrodos conductores que permiten la aplicación de un potencial oscilante y de la perturbación aplicada sobre todo el volumen del mismo.



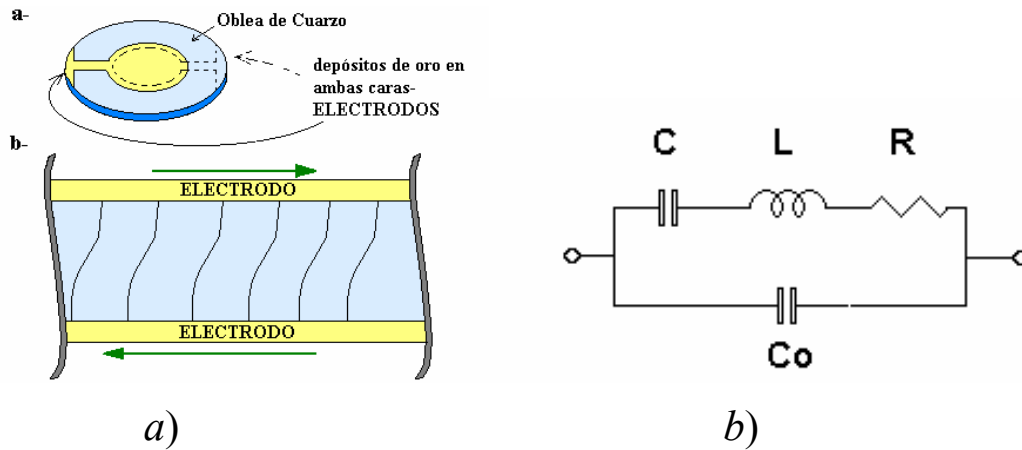


Figura 2.12: a) Esquema de un cristal de cuarzo y de la perturbación aplicada al mismo por un potencial oscilante. b) Representación equivalente del circuito de Butterworth-Van Dyke.

La ecuación de Sauerbrey [165] relacionan los cambios en la frecuencia resonante  $\Delta f$  con los cambios de masa adsorbida,  $\Delta m$  por unidad de área  $A$ .

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{\sqrt{\mu_Q \rho_Q}} \frac{\Delta m}{A} \quad (2.8)$$

donde  $f_0$  es la frecuencia resonante del cristal antes de su modificación,  $\rho_Q = 2659 \text{kgm}^{-3}$ , su densidad y  $\mu_Q = 2.957 \times 10^{-10} \text{Nm}^{-2}$ , su coeficiente elástico (o módulo de corte). La fórmula es válida solo para  $\Delta f \ll f_0$  y para el caso de películas rígidas y delgadas. Se entiende por película rígida, aquella que se mueve de manera sincronizada con el cristal de cuarzo (acompaña el movimiento), dado que la onda acústica se propaga a igual velocidad que dentro del cristal.

Las propiedades eléctricas de un cristal de cuarzo sin carga se explican claramente con la utilización de un circuito equivalente, conocido como Butterworth-Van Dyke y representado en la figura 2.12.b. Este circuito equivalente se haya formado por dos ramas, una variable, RLC en paralelo con una capacidad estática  $C_0$  (ver figura 2.12.b).

Se puede trazar una equivalencia entre este modelo eléctrico y el mecánico: L, la inductancia, se relaciona con la masa inercial; C, la capacidad, con la respuesta elástica (energía que guarda el cristal durante la oscilación), y R, la resistencia, con las pérdidas por fricción del cristal de cuarzo.  $C_0$ , posee tres contribuciones, la capacidad eléctrica del capacitor de placas paralelas (que forman los dos electrodos a ambos lados del cristal); la capacitancia parásita de pérdida debido a los conectores; y la capacidad de la doble capa eléctrica cuando el metal de uno de los electrodos está en contacto con una solución electrolítica.

Para analizar películas autoensamblados los parámetros que tomaremos en cuenta únicamente serán la resistencia y la inductancia. El análisis de impedancia electroacústico permite descomponer la variación de la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo en dos componentes:  $\Delta X_L$  y  $\Delta R$ . Cuando la película adsorbida se comporta de manera rígida, se observa que  $\Delta X_L \gg \Delta R$  y su masa puede ser obtenida a partir de la ecuación de Sauerbrey, eq. (2.8). De no cumplirse esta condición, se pueden calcular propiedades viscoelásticas de las películas, pero no la masa adsorbida.

#### **2.1.4.1 Instrumentación**

Se trabajó con una microbalanza construida en el Laboratorio de Electroquímica Molecular. La frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo fue medida con un frecuencímetro Hewlett Packard 5334B, conectado a una PC 386 a través de una placa IEEE con una resolución de 0.1Hz y estabilidad superior a  $1\text{Hz min}^{-1}$ . La adquisición y análisis de datos se realizó mediante software escrito en Quick Basic 4.5. Las mediciones de impedancia del cristal de cuarzo fueron reducidas al circuito equivalente de Butterworth-Van Dyke descrito anteriormente utilizándose una regresión no lineal para determinar los parámetros equivalentes [166].

#### **2.1.4.2 Materiales**

Se utilizaron cristales de cuarzo comerciales (ICM, Oklahoma City, OK) de corte AT, con los siguientes metales depositados (Pd, 100nm, Ti, 200nm, Au  $1\mu\text{m}$ ). Diámetro del cuarzo 14mm, diámetro del centro de Au, 5mm (área activa  $0.196\text{cm}^2$ ). Los cristales de cuarzo tienen electrodos de oro depositados en ambas caras, dado que es a través de estos electrodos que se aplica la perturbación eléctrica. Para las mediciones de procesos de adsorción, uno solo de estos electrodos se utiliza para el análisis, quedando el segundo al aire, del otro lado de la celda.

Se utilizaron celdas de Teflon(R) y de acrílico de fabricación artesanal.

#### **2.1.5 Preparación de electrodos modificados**

Se siguió paso a paso la técnica reportada por Hodak, *y col.* [135].

Para iniciar la construcción de electrodos modificados se partió siempre de sustratos de Au tratados como se describió en la sección 2.1.1.5.2.

El primer paso consistió siempre en la inmersión del electrodo en solución de MPS 20mM en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10mM durante 30 minutos. Después de esta primer modificación los electrodos fueron lavados con abundante agua Milli-Q<sup>®</sup>.

Los electrodos modificados con MPS fueron sumergidos en solución acuosa de PAH-Os, (concentración de complejo de Os, entre 2 y 3 mM) durante 10 minutos. A continuación fueron lavados nuevamente con abundante agua Milli-Q<sup>®</sup>. Posteriormente el electrodo fue sumergido en una solución de GOx 1mg ml<sup>-1</sup> en agua. Este esquema se repitió alternadamente hasta obtener el número de capas deseado.

En todos los casos, la respuesta amperométrica de los electrodos modificados fue medida dentro de las 24 horas posteriores a la fabricación del electrodo.

El pH de las soluciones de PAH-Os fue ajustado mediante agregados de HCl o NaOH.

La concentración de Os en las soluciones de polímero PAH-Os se calculó por espectrofotometría UV-Vis a partir del máximo de absorción de 480 nm [167, 168].

La concentración de FAD unido a GOx se calculó por igual técnica a partir del máximo de absorción a 451 nm por diferencia de absorbancia de soluciones de GOx con y sin agregados de D-glucosa [3].

### 2.1.6 Soluciones y reactivos empleados

- Todas las soluciones fueron preparadas con agua de calidad Milli-Q<sup>®</sup> (sistema Millipore).
- El material de vidrio fue siempre lavado con solución de KMnO<sub>4</sub> en medio ácido durante un mínimo de 12 horas y luego con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% en medio ácido por 30 minutos.
- El material de Teflon<sup>®</sup> fue lavado por enjuagues sucesivos con abundante agua calidad Milli-Q<sup>®</sup> después de cada uso.
- Se emplearon las siguientes soluciones reguladoras:  
TRIS, pH= 7.2, 0.1M + 0.12M KNO<sub>3</sub>.  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , pH= 7.2, 0.1M + 0.1M NaCl.  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , pH= 7.2, 0.1M + 0.1M NaCl.  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , pH= 7.2, 0.5M + 0.1M NaCl.  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , pH= 7.2, 0.5M + 0.1M KCl.
- El polímero PAH-Os fue sintetizado como se describe en la bibliografía [168]. Respecto a este procedimiento de síntesis, es importante destacar, que no siempre se obtiene la misma relación de sustitución de complejos de Os por unidad de monómero.

(i.e., la relación n/m no es reproducible, ver fórmula desarrollada, sección 1.3.1). Durante este trabajo de tesis se trabajó con dos lotes de polímero distintos. El primero se utilizó únicamente para los experimentos del capítulo 4, mientras que el segundo solo para los del capítulo 5. El primer lote tenía una relación Os/monómero aproximadamente un 30% mayor que el segundo. Ambos lotes a su vez tienen la misma diferencia con otros lotes usados en otras publicaciones referidas a PAH-Os.

- Para la síntesis del complejo soluble  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$ , se siguieron todos los pasos sugeridos en la referencia [167], pero se cambió el ion precipitante por  $[\text{PF}_6]^-$ .
- Salvo que se especifique lo contrario, todos los experimentos con GOx fueron llevados a cabo con Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, Fluka, PM = 186 KDa.

La excepción es un ensayo (sección A.3.2) donde se trabajó con Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, proveniente de una generosa donación de MediSense, UK, PM = 156 KDa. En ambos casos, los pesos moleculares reportados por los proveedores fueron confirmados por electroforesis en gel de acrilamida contra patrones de peso molecular conocido, siguiendo el método de Laemmli [169].

Un punto muy importante a tener en cuenta respecto a GOx es que la actividad enzimática varía con el tiempo. Además, distintos lotes de enzima siempre tienen distinta actividad. Siempre que se realizaron ensayos donde se medía catálisis enzimática y se muestran resultados cuantitativos, se trató de minimizar el lapso de tiempo en el cual se llevaron a cabo experimentos que se iban a comparar. Experimentos realizados con enzima del mismo lote muy separados en el tiempo (por ejemplo, unos dos años) pueden arrojar resultados no comparables.

Esto no se aplica para experimentos donde solo importa la morfología de las películas, por ejemplo AFM o elipsometría, dado que para los mismos solo importa la morfología de la enzima, y no su actividad.

- En todos los ensayos donde se determinó respuesta amperométrica de los biosensores (tanto para sistema homogéneo como heterogéneo) se burbujeó Ar (libre de  $\text{O}_2$ ) en las soluciones de medida durante los 20 minutos previos a cada medición y luego en los intervalos entre mediciones sucesivas.
- Todas las soluciones de glucosa fueron preparadas al menos 24hs antes de su uso y mantenidas entre 2°C y 8°C para permitir que se alcance el equilibrio entre los distintos anómeros.

- Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica salvo que se especifique lo contrario. Se utilizaron como fueron recibidos, sin pasos extra de purificación.

Procedencia de los reactivos utilizados:

Reactivos Merck: D (+) glucosa, NaCl, KNO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, HCl.

Reactivos Aldrich: MPS

Reactivos Sigma: TRIS.HCl, TRIZMA base

Reactivos Fluka: L(-) glucosa

- A menos que se especifique lo contrario, todas las celdas y electrodos utilizados en esta tesis son de fabricación artesanal en el laboratorio donde se realizó el trabajo de tesis o en alguno de los talleres del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

## **2.2 Simulaciones numéricas**

Todos los algoritmos y códigos de los programas ya escritos utilizados para resolver las ecuaciones diferenciales sin solución analítica cerrada vistas en el capítulo 1 fueron cedidos a través de una colaboración científica establecida con el grupo dirigido por el Dr. P.N. Bartlett de la Universidad de Southampton, Inglaterra.

### **2.2.1 Simulación de voltametría cíclica para el sistema homogéneo**

El algoritmo utilizado en este caso resuelve las ecuaciones diferenciales que describen los perfiles de concentración para cada una de las especies durante la voltametría cíclica. El algoritmo completo fue diseñado por el Dr. K.F.E. Pratt [44], el problema se resuelve con el uso de diferencias finitas en modo explícito. En el apéndice A.2.1 se mencionarán los puntos salientes del mismo, siguiendo los lineamientos dados por el autor.

El programa fue escrito en Borland<sup>®</sup> Turbo Pascal v5.5. La versión ejecutable puede correrse en cualquier PC de escritorio.

## 2.2.2 Simulación de la respuesta amperométrica estacionaria para un electrodo totalmente integrado

### 2.2.2.1 Resolución de las ecuaciones diferenciales acopladas: el método de relajación

El problema a analizar describe una situación en estado estacionario y por lo tanto no fue necesario utilizar una simulación que describa estados transitorios y se utilizó un método de estado estacionario.

El algoritmo utilizado para resolver este problema hace uso del método de relajación [170] para resolver las ecuaciones diferenciales acopladas. Esto resultó algo novedoso para el tratamiento de sistemas electroquímicos [49].

El método de relajación ofrece varias ventajas respecto de otras técnicas más comúnmente utilizadas para problemas de este tipo. Las ecuaciones diferenciales ordinarias son reemplazadas por ecuaciones escritas en diferencias finitas sobre una grilla de puntos que se expande todo a lo largo de la película enzimática. El método de relajación comienza probando con una solución al problema. Calcula luego los errores resultantes de usar esta solución en cada punto y utiliza estos errores para conseguir una mejor solución de prueba. Este procedimiento se repite hasta que se consigue el grado de precisión deseado para la respuesta. La solución inicial se ajusta iterativamente (*relaja*) hasta llegar a la solución correcta.

Este método puede usarse para resolver cualquier número de ecuaciones diferenciales acopladas de primer orden, asumiendo que existe el mismo número de condiciones de contorno.

Las ecuaciones (5.5) y (1.79) son de segundo orden, y consecuentemente deben ser rescritas como ecuaciones diferenciales de primer orden.

Para mejorar la eficiencia del método se utiliza una malla irregular, es decir, las *cajas* en que se divide la película no son de espesor fijo, sino que se concentra el esfuerzo computacional en los puntos donde los flujos cambian más rápidamente.

Para el caso de cinética y difusión acopladas, no es posible conocer *a priori*, en qué sección de la película se necesitará un espaciado de puntos más cercano, analizar por ejemplo el caso límite número 3, o caso de titulación. El algoritmo hace uso entonces de una *malla adaptativa*. Se incorpora una ecuación más al sistema que relaciona la densidad de la malla con los perfiles de concentración, y se resuelve en simultáneo con las otras ecuaciones diferenciales que describen el problema. De esta manera, mientras

se resuelve el problema se encuentra automáticamente el espaciado requerido para la óptima resolución del mismo.

Este algoritmo completo también fue diseñado por el Dr. K.F.E. Pratt [44], haciendo uso de subrutinas publicadas por Press y *col.* [170]. En el apéndice A.2.2 se mencionarán los puntos salientes del mismo, siguiendo los lineamientos dados por Pratt.

### **2.2.2.2 Ajuste de datos experimentales a las ecuaciones diferenciales resueltas en forma numérica: el método Simplex**

El algoritmo Simplex [170] se utilizó para ajustar datos experimentales a la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales.

Este algoritmo calcula cuán cerca se halla la simulación numérica a los puntos experimentales usando una ecuación de cuadrados mínimos:

$$Chi^2 = \sum_{i=1}^{\Omega} (Data_{exp\ i} - Data_{teo\ i})^2 \quad (2.9)$$

donde  $\Omega$  representa el número de datos experimentales,  $Data_{exp\ i}$  el valor de cada punto y  $Data_{teo\ i}$  el valor simulado para cada punto.  $Chi^2$  es la función que el algoritmo trata de minimizar. El programa de ajuste varía distintos parámetros necesarios para la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales, por ejemplo, las constantes cinéticas, los coeficientes de difusión, etc.

Esta parte del trabajo fue realizada gracias a una nueva colaboración científica establecida con el Dr. Fernando Garay de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

El algoritmo Simplex fue combinado entonces con el algoritmo que resuelve numéricamente las ecuaciones diferenciales.

Un nuevo programa fue diseñado y escrito por el Dr. Fernando Garay, juntando los dos algoritmos y haciendo uso de rutinas publicadas por Press y *col.* [170]. Para la resolución de las ecuaciones diferenciales usando método de relajación y malla adaptativa, el nuevo código sigue todos los lineamientos del código original de K.F.E. Pratt [44]. El nuevo programa fue escrito en FORTRAN<sup>®</sup> 77. Puede correrse en cualquier PC de escritorio.

## Apéndices al Capítulo 2

### A.2.1 Simulación de voltametría cíclica para el sistema homogéneo

Se utilizan diferencias finitas (en forma explícita) [51, 52].

La cinética está descrita por las reacciones (1.12) y (1.13).

En notación de diferencias finitas, los cambios de concentración debido a la cinética homogénea se escriben:

$$\frac{\Delta[A]}{\Delta t} = -\zeta k[A][E_{red}] \quad (\text{A.2.1})$$

Para la enzima se asume estado estacionario, entonces,

$$\frac{\Delta[E_{ox}]}{\Delta t} = k[A][E_2] - k_E[S][E_1] = 0 \quad (\text{A.2.2})$$

La concentración de enzima total en cualquier punto se considera constante,

$$[E_{\Sigma}] = [E_{ox}] + [E_{red}] \quad (\text{A.2.3})$$

entonces

$$[E_{red}] = \frac{[E_{\Sigma}]}{1 + \left( \frac{k[A]}{k_E[S]} \right)} \quad (\text{A.2.4})$$

Combinando (A.2.3) y (A.2.4), y aplicando cinética de tipo Michaelis-Menten, se obtienen las expresiones para sustrato y mediador:

$$\Delta[A] = \frac{-\zeta k_{cat}[E_{\Sigma}]\Delta t}{1 + \frac{K_{MS}}{[S]} + \left( \frac{k_{cat}}{k[A]} \right)} \quad (\text{A.2.5})$$

$$\Delta[S] = \frac{\Delta[A]}{\zeta} \quad (\text{A.2.6})$$

Recordemos que las concentraciones son función de la distancia al electrodo.

El algoritmo hace uso de variables adimensionales para facilitar la resolución del problema:

$$\lambda = \frac{\zeta k[E_{\Sigma}]RT}{nFv} \quad (\text{A.2.7})$$

$$\gamma = \frac{k[A_{\Sigma}]}{k_{cat}} \quad (\text{A.2.8})$$



$$\eta = \frac{[S]}{K_{MS}} \quad (\text{A.2.9})$$

$$\theta = \frac{\beta D_S k K_{MS}}{D_A k_{cat}} \quad (\text{A.2.10})$$

$$D_a = \frac{D_A \Delta t}{(\Delta x^2)} \quad (\text{A.2.11})$$

donde  $\beta$  es la fracción de anómeros que reacciona efectivamente en la reacción enzimática.  $D_a$  es un coeficiente de difusión adimensional, de forma análoga se definen  $D_b$  y  $DS$ .

Y las concentraciones adimensionales en cada punto de la grilla:

$$a = \frac{[A]_n}{[A_\Sigma]} \quad (\text{A.2.12})$$

$$s = \frac{[S]_n}{[S]_\infty} \quad (\text{A.2.13})$$

$$e_1 = \frac{[E_{ox}]_n}{[E_\Sigma]} \quad (\text{A.2.14})$$

$$e_2 = \frac{[E_{red}]_n}{[E_\Sigma]} \quad (\text{A.2.15})$$

A partir de la velocidad de barrido

$$\Delta t = \frac{t_v}{U} ; \quad \Delta x = \frac{l}{N} ; \quad t_v = \frac{E_{\max} - E_{\min}}{v} \quad (\text{A.2.16})$$

$N$  es el número de puntos en la distancia  $l$ ;  $U$  el número de escalones en un barrido de potencia;  $t_v$  el tiempo total de la voltametría y  $E_{\max}$  y  $E_{\min}$  los potenciales límite del barrido.

La difusión se considera a partir de la segunda Ley de Fick, y en términos adimensionales y de diferencias finitas queda:

$$\Delta a_n = D_a \left[ (a_{n+1,t-\Delta t} - a_{n,t-\Delta t}) - (a_{n,t-\Delta t} - a_{n-1,t-\Delta t}) \right] \quad (\text{A.2.17})$$

De forma análoga se escribe la difusión del mediador reducido y del sustrato. No se considera difusión de la enzima debido a que su coeficiente de difusión es un orden de magnitud menor que el de sustrato y mediador.  $D_a$  no puede ser mayor que 0.45 (ver Britz [52]).

La simulación contiene una subrutina que ajusta automáticamente la cantidad de puntos o cajas que son necesarias considerar. Además se utiliza una malla adaptativa, es decir, puntos no equiespaciados (las cajas tienen ancho variable).

Se considera concentraciones nernstianas en la superficie del electrodo. Se define una velocidad de barrido adimensional,  $V$ :

$$V = \frac{nF}{RT} vt_v \quad (\text{A.2.18})$$

La corriente es igual al flujo de mediador en la superficie del electrodo (1.11).

La corriente se adimensionaliza ( $I$ ) por la corriente de pico en ausencia de sustrato (ecuación de Randles Sevcik):

$$i_d = 0.4463nFA \left( \frac{nF}{RT} \right)^{1/2} [B]_{\infty} D_B^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{A.2.19})$$

$$I = \frac{i}{i_d} \quad (\text{A.2.20})$$

Entonces en términos adimensionales, (1.11) queda:

$$I = \left( \frac{D_a U}{0.2V} \right)^{1/2} (\Delta a)_{x=0} \quad (\text{A.2.21})$$

La aproximación de 7 puntos se utilizó para todos los flujos de electrodo en estas simulaciones.

En forma adimensional, en cada punto  $n$ , las ecuaciones (A.2.4) a (A.2.6) quedan:

$$\Delta a = \frac{-\lambda \gamma^{-1} V}{1 + (\eta s)^{-1} + (\gamma a)^{-1}} \quad (\text{A.2.22})$$

$$\Delta s = \frac{\gamma \Delta a D_s}{\eta \theta \zeta D_a} \quad (\text{A.2.23})$$

Estas ecuaciones se usan en la simulación en cada punto excepto en el último y el primero (superficie del electrodo y seno de la solución).

$$e_2 = \frac{1}{1 + (\eta s)^{-1} + (\gamma a)^{-1}} \quad (\text{A.2.24})$$

Las concentraciones de enzima así determinadas no juegan ningún rol en la simulación de la cinética (supusimos estado estacionario para E) y solo se calculan con el objeto de mostrar los perfiles de concentración para la misma.

### A.2.2 Resolución de ecuaciones diferenciales acopladas por método de relajación

El principio detrás del método de relajación consiste en *arriesgar* una primera solución al problema de hallar los perfiles de concentración, luego esta primera solución se ajustará o dejará relajar hasta la solución correcta. Tomemos el caso trivial de una única ecuación  $\mathbf{W}$  en términos de una variable  $\mathbf{y}$ :

$$\mathbf{W}(\mathbf{y}) = f(\mathbf{y}) = 0 \quad (\text{A.2.25})$$

Comenzamos arriesgando un valor para  $\mathbf{y}$ , que luego será ajustado iterativamente por pequeños valores  $\Delta\mathbf{y}$ . Para la solución correcta:

$$\mathbf{W}(\mathbf{y} + \Delta\mathbf{y}) = 0 \quad (\text{A.2.26})$$

Alternativamente podemos escribir (A.2.26) como:

$$\mathbf{W}(\mathbf{y} + \Delta\mathbf{y}) = \mathbf{W}(\mathbf{y}) + \mathbf{V}\Delta\mathbf{y} = 0 \quad (\text{A.2.27})$$

donde

$$\mathbf{V} = \frac{\partial \mathbf{W}(\mathbf{y})}{\partial \mathbf{y}} \quad (\text{A.2.28})$$

Reordenando (A.2.28) obtenemos  $\Delta\mathbf{y}$  en términos de la estimación previa de  $\mathbf{y}$ :

$$\Delta\mathbf{y} = -\frac{\mathbf{W}(\mathbf{y})}{\mathbf{V}} \quad (\text{A.2.29})$$

Si tratamos con un número mayor a 1 de ecuaciones y variables,  $\mathbf{V}$  es una matriz que contiene los diferenciales de todas las ecuaciones  $\mathbf{W}$  con respecto a cada variable  $\mathbf{y}$ . La solución de este problema requiere la inversión de la matriz [170].

#### A.2.2.1 Implementación del método de relajación

##### A.2.2.1.1 Representación de los perfiles de concentración

Haremos uso en lo sucesivo de la notación introducida en la sección 1.9.2.3 al presentar el modelo de Bartlett-Pratt [49].

En nuestro sistema se requieren cuatro variables para describir los perfiles de concentración:

$$\mathbf{y}_1 = a \quad (\text{A.2.30})$$

$$\mathbf{y}_2 = s \quad (\text{A.2.31})$$

$$\mathbf{y}_3 = \frac{da}{d\chi} \quad (\text{A.2.32})$$

$$\mathbf{y}_4 = \frac{ds}{d\chi} \quad (\text{A.2.33})$$

Nótese que estamos escribiendo todas las ecuaciones como ecuaciones diferenciales de primer orden. Entonces  $\frac{d^2 a}{d\chi^2}$  queda representada por  $\frac{dy_3}{d\chi}$ .

### A.2.2.1.2 Malla adaptativa

El método de relajación usa una grilla de  $N$  puntos para representar la distancia  $0 \leq \chi \leq 1$ . Cada variable  $\mathbf{y}_r$  en (A.2.30) a (A.2.33) queda representada por un arreglo de valores donde  $0 \leq n \leq N$ . Se introducen tres nuevas variables  $\mathbf{y}_{r,n}$ :

$$\mathbf{y}_5 = \mathbf{Q} \quad (\text{A.2.34})$$

$$\mathbf{y}_6 = \frac{d\mathbf{Q}}{dq} \quad (\text{A.2.35})$$

$$\mathbf{y}_7 = \chi \quad (\text{A.2.36})$$

donde  $\mathbf{q}$  es igual al número de punto de la grilla  $n$ , es decir, varía de 1 a  $N$ . La variable  $\mathbf{Q}$  es proporcional a  $\mathbf{q}$ , pero no tiene un intervalo de valores definidos. La relación entre  $\mathbf{Q}$  y la distancia al electrodo  $\chi$  en un punto dado viene determinada por la función densidad de malla.  $\Phi = \frac{d\mathbf{Q}}{d\chi}$ . Un valor alto de  $\Phi$  indica que se requiere una alta densidad de malla

en esa zona de la película, *i.e.* una gran cantidad de puntos en la distancia  $\Delta\chi$ .

Pratt utiliza la siguiente función  $\Phi$ :

$$\Phi = P_1 + P_2 \left| \frac{da}{d\chi} \right| + P_3 \left| \frac{ds}{d\chi} \right| + P_4 \left| \frac{d\left(\frac{da}{d\chi}\right)}{dq} \right| + P_5 \left| \frac{d\left(\frac{ds}{d\chi}\right)}{dq} \right| \quad (\text{A.2.37})$$

que en términos de variables  $\mathbf{y}$ , queda:

$$\Phi = P_1 + P_2 |\mathbf{y}_3| + P_3 |\mathbf{y}_4| + P_4 \left| \frac{dy_3}{dq} \right| + P_5 \left| \frac{dy_4}{dq} \right| \quad (\text{A.2.38})$$

Las variables  $P_1$  a  $P_5$  son parámetros de ponderación de datos. A mayor valor, más peso tendrá ese término en la densidad de la malla. No es necesario normalizar estos valores.

### A.2.2.1.3 Ecuaciones diferenciales

Para hallar  $G$  variables se necesitan  $G$  ecuaciones diferenciales [170]. Dos están dadas por la relación entre  $\mathbf{y}_1$  e  $\mathbf{y}_3$  y entre  $\mathbf{y}_2$  e  $\mathbf{y}_4$

$$\frac{da}{dq} = \frac{da}{d\chi} \frac{d\chi}{dq} \therefore \frac{dy_1}{dq} = \mathbf{y}_3 \frac{dy_7}{dq} \quad (\text{A.2.39})$$

$$\frac{dy_2}{dq} = y_4 \frac{dy_7}{dq} \quad (\text{A.2.40})$$

Dos más están dadas por las ecuaciones (5.5) y (1.79).

$$\frac{dy_3}{dq} = \frac{dy_7}{dq} \frac{\kappa^2 y_1 y_2}{\gamma y_1 (1 + \mu y_2) + y_2} \quad (\text{A.2.41})$$

$$\frac{dy_4}{dq} = \frac{dy_7}{dq} \frac{\kappa^2 y_1 y_2}{\gamma y_1 (1 + \mu y_2) + y_2} \frac{\gamma}{\eta} \quad (\text{A.2.42})$$

A partir de (A.2.34)

$$\frac{dy_5}{dq} = y_6 \quad (\text{A.2.43})$$

Como hay una relación lineal entre  $\mathbf{q}$  y  $\mathbf{Q}$ . Tenemos

$$\frac{dy_6}{dq} = 0 \quad (\text{A.2.44})$$

La ecuación final la da la función densidad de malla  $\Phi$ :

$$\frac{dy_7}{dq} = \frac{y_6}{\Phi} \quad (\text{A.2.45})$$

#### A.2.2.1.4 Representación en diferencias finitas

Las 7 ecuaciones se escriben en diferencias finitas como  $\mathbf{W}_{g,n}$ , acoplando los puntos  $n$  y  $n-1$ , según:

$$\frac{dy_{r,n-1/2}}{dq} \approx y_{r,n} - y_{r,n-1} = y_r^m \quad (\text{A.2.46})$$

$$y_{r,n-1/2} \approx \frac{y_{r,n} + y_{r,n-1}}{2} = 1/2 y_r^p \quad (\text{A.2.47})$$

Las abreviaciones  $y_r^m$  e  $y_r^p$  se usan para simplificar la notación. Usando entonces esta notación, las ecuaciones diferenciales quedan:

$$\mathbf{W}_{1,n} = y_1^m - (y_7^m y_3^p)/2 \quad (\text{A.2.48})$$

$$\mathbf{W}_{2,n} = y_2^m - (y_7^m y_4^p)/2 \quad (\text{A.2.49})$$

$$\mathbf{W}_{3,n} = y_3^m - \frac{\kappa^2 y_7^m y_1^p y_2^p}{2(\gamma y_1^p (1 + \mu y_2^p) + y_2^p)} \quad (\text{A.2.50})$$

$$\mathbf{W}_{4,n} = y_4^m - \frac{\gamma \kappa^2 y_7^m y_1^p y_2^p}{2\eta(\gamma y_1^p (1 + \mu y_2^p) + y_2^p)} \quad (\text{A.2.51})$$

$$\mathbf{W}_{5,n} = \mathbf{y}_5^m - \mathbf{y}_6^p h/2 \quad (\text{A.2.52})$$

$$\mathbf{W}_{6,n} = \mathbf{y}_6^m \quad (\text{A.2.53})$$

$$\mathbf{W}_{7,n} = \mathbf{y}_7^m - \frac{\mathbf{y}_6^p h}{2(P_1 + \frac{1}{2}P_2|\mathbf{y}_3^p| + \frac{1}{2}P_3|\mathbf{y}_4^p| + P_4|\mathbf{y}_3^m| + P_5|\mathbf{y}_4^m|)} \quad (\text{A.2.54})$$

donde cada  $\mathbf{W}_{g,n}$  debe ser igual a 0 para la solución correcta. La variable  $h$  es igual a  $1/(N-1)$ , *i.e.* es el espaciado promedio  $\Delta\chi$ .

#### A.2.2.1.5 Solución de las ecuaciones

Teniendo en cuenta todos los valores de  $\mathbf{W}_{g,n}$ ,  $\mathbf{y}_{r,n}$ , e  $\mathbf{y}_{r,n-1}$  las ecuaciones (A.2.26) y (A.2.28) quedan [170]:

$$\mathbf{W}_{g,n}(\mathbf{y}_{r,n} + \Delta\mathbf{y}_{r,n}, \mathbf{y}_{r,n-1} + \Delta\mathbf{y}_{r,n-1}) \approx \mathbf{W}_{g,n}(\mathbf{y}_{r,n}, \mathbf{y}_{r,n-1}) + \sum_{r=1}^G (\mathbf{V}_{g,r} \Delta\mathbf{y}_{r,n-1} + \mathbf{V}_{g,r+G} \Delta\mathbf{y}_{r,n})$$

(A.2.55) donde

$$\mathbf{V}_{g,r} = \frac{\partial \mathbf{W}_{g,n}}{\partial \mathbf{y}_{r,n-1}} \quad (\text{A.2.56})$$

$$\mathbf{V}_{g,r+G} = \frac{\partial \mathbf{W}_{g,n}}{\partial \mathbf{y}_{r,n}} \quad (\text{A.2.57})$$

y para  $1 \leq r \leq G$ ,  $1 \leq g \leq G$ ,  $1 \leq n \leq N$ .

Para evaluar cada uno de los  $\Delta\mathbf{y}_{r,n}$  y  $\Delta\mathbf{y}_{r,n-1}$  se requiere invertir la matriz  $\mathbf{V}$ . Esto se realiza usando las rutinas de Press y *col*. [170] y no se discutirá acá.

A partir de (A.2.56) y (A.2.57) vemos que se requiere evaluar cada uno de esos diferenciales respecto a cada variable  $\mathbf{y}_{r,n}$  e  $\mathbf{y}_{r,n-1}$ , es decir 98 diferenciales. Unos pocos se muestran como ejemplos. Para la ecuación  $\mathbf{W}_1$ :

$$\mathbf{V}_{1,r} = \frac{d\mathbf{W}_{1,n}}{d\mathbf{y}_{r,n-1}} \quad ; \quad 1 \leq r \leq 7 \quad (\text{A.2.58})$$

Para  $r = 1$  diferenciamos (A.2.48) respecto a  $\mathbf{y}_1$  en el punto  $n-1$

$$\mathbf{W}_{1,n} = \mathbf{y}_1^m - (\mathbf{y}_7^m \mathbf{y}_3^p)/2 \quad (\text{A.2.59})$$

$$\mathbf{V}_{1,1} = \frac{d(\mathbf{y}_{1,n} - \mathbf{y}_{1,n-1} - (\mathbf{y}_7^m \mathbf{y}_3^p)/2)}{d\mathbf{y}_{1,n-1}} \quad (\text{A.2.60})$$

$$\therefore \mathbf{V}_{1,1} = -1 \quad (\text{A.2.61})$$

Para  $r = 2$

$$\mathbf{V}_{1,2} = \frac{d(\mathbf{y}_1^m - (\mathbf{y}_7^m \mathbf{y}_3^p)/2)}{d\mathbf{y}_{2,n-1}} \quad (\text{A.2.62})$$

$$\therefore \mathbf{V}_{2,1} = 0 \quad (\text{A.2.63})$$

Para  $r = 3$

$$\mathbf{V}_{1,3} = \frac{d(\mathbf{y}_1^m - (\mathbf{y}_7^m (\mathbf{y}_{3,n} + \mathbf{y}_{3,n-1}))/2)}{d\mathbf{y}_{3,n-1}} \quad (\text{A.2.64})$$

$$\therefore \mathbf{V}_{1,3} = -\mathbf{y}_7^m / 2 \quad (\text{A.2.65})$$

Los restantes  $\mathbf{V}_{l,r}$  se evalúan de forma similar.  $\mathbf{V}_{l,r+1}$  a  $\mathbf{V}_{l,r+7}$  son diferenciales respecto a  $\mathbf{y}_1$  en el punto  $n$ :

$$\mathbf{V}_{g,r+G} = \frac{\partial \mathbf{W}_{g,j}}{\partial \mathbf{y}_{r,j}} \quad ; \quad 8 \leq r + G \leq 14 \quad (\text{A.2.66})$$

Por ejemplo,  $\mathbf{V}_{1,14}$  es  $\mathbf{W}_{1,n}$  diferenciado respecto a  $\mathbf{y}_{7,n}$

$$\mathbf{V}_{1,14} = \frac{d(\mathbf{y}_1^m - ((\mathbf{y}_{7,n} + \mathbf{y}_{7,n-1}) \mathbf{y}_3^p)/2)}{d\mathbf{y}_{7,n}} \quad (\text{A.2.67})$$

$$\therefore \mathbf{V}_{1,14} = -\mathbf{y}_3^p / 2 \quad (\text{A.2.68})$$

Muchos de los 98 diferenciales valen 0, o una expresión sencilla y la tarea no es tan difícil como parecía. algunos son ligeramente más complicados, por ejemplo  $\mathbf{V}_{3,1}$  es

$$\mathbf{V}_{3,1} = \frac{d\left(\mathbf{y}_3^m - \frac{\zeta \kappa^2 \mathbf{y}_7^m \mathbf{y}_1^p \mathbf{y}_2^p}{2(\gamma \mathbf{y}_1^p (1 + \mu \mathbf{y}_2^p) + \mathbf{y}_2^p)}\right)}{d\mathbf{y}_{1,n}} \quad (\text{A.2.69})$$

$$\mathbf{V}_{3,1} = -\frac{\zeta \kappa^2 \mathbf{y}_7^m (\mathbf{y}_2^p)^2}{2(\gamma \mathbf{y}_1^p (1 + \mu \mathbf{y}_2^p) + \mathbf{y}_2^p)^2} \quad (\text{A.2.70})$$

Cabe resaltar en este punto que el algoritmo que mostramos acá incluye la corrección del modelo y de las ecuaciones diferenciales que proponemos más adelante en el capítulo 5 (sección 5.2), dado que son las ecuaciones diferenciales que efectivamente se utilizaron en este trabajo de tesis.

#### A.2.2.1.6 Condiciones de contorno

En las fronteras la técnica es similar. Como no hay punto  $n = 0$ , no se requiere una ecuación para  $\mathbf{y}_{r,n-1}$ , en la frontera interior ( $n = 1$ ), lo mismo para  $\mathbf{W}_{g,n}$  que solo se diferencia respecto a  $\mathbf{y}_{r,N}$ .

Entonces para  $\chi = 0$  ,  $n = 1$ :

$$\mathbf{V}_{g,r+G} = \frac{\partial \mathbf{W}_{g,1}}{\partial \mathbf{y}_{r,1}} \quad (\text{A.2.71})$$

y en la frontera exterior,  $\chi = 1$  ,  $n = N$ :

$$\mathbf{V}_{g,r+G} = \frac{\partial \mathbf{W}_{g,N+1}}{\partial \mathbf{y}_{r,N}} \quad (\text{A.2.72})$$

donde  $1 \leq r \leq G$ .

Tenemos 4 condiciones de contorno para  $\mathbf{y}_1$  a  $\mathbf{y}_4$ . En la frontera interior  $\chi = 0$ ,  $n = 1$

$$a = a_\varepsilon ; \quad \mathbf{W}_{7,1} = \mathbf{y}_{1,1} - a_\varepsilon ; \quad \mathbf{V}_{7,8} = 1 \quad (\text{A.2.73})$$

$$\frac{ds}{d\chi} = 0 ; \quad \mathbf{W}_{6,1} = \mathbf{y}_{4,1} ; \quad \mathbf{V}_{6,11} = 1 \quad (\text{A.2.74})$$

En la frontera exterior  $\chi = 1$  ,  $n = N$ :

$$\frac{da}{d\chi} = 0 ; \quad \mathbf{W}_{1,N+1} = \mathbf{y}_{3,N} ; \quad \mathbf{V}_{1,10} = 1 \quad (\text{A.2.75})$$

La concentración de sustrato tiene la misma concentración que en la solución adyacente:

$$s = 1 ; \quad \mathbf{W}_{2,N+1} = \mathbf{y}_{2,N-1} ; \quad \mathbf{V}_{2,9} = 1 \quad (\text{A.2.76})$$

Las tres condiciones restantes vienen de la malla. En la frontera interior:

$$\mathbf{Q} = 0 ; \quad \mathbf{W}_{5,1} = \mathbf{y}_{5,1} ; \quad \mathbf{V}_{5,12} = 1 \quad (\text{A.2.77})$$

$$\chi = 0 ; \quad \mathbf{W}_{4,1} = \mathbf{y}_{7,1} ; \quad \mathbf{V}_{4,14} = 1 \quad (\text{A.2.78})$$

Y en la exterior:

$$\chi = 1 ; \quad \mathbf{W}_{3,N+1} = \mathbf{y}_{7,N-1} ; \quad \mathbf{V}_{3,14} = 1 \quad (\text{A.2.79})$$

Todos los demás  $\mathbf{V}_{g,r}$  valen 0. Nótese que el orden de los índices  $g$  en las ecuaciones  $\mathbf{W}_{g,n}$  es arbitrario. Sin embargo, el ordenamiento de los valores de  $\mathbf{V}$  en la matriz es de importancia vital [44, 170].

### A.2.2.1.7 Flujos

Los valores de los flujos adimensionales son:

$$J_A = -\left. \frac{da}{d\chi} \right|_{\chi=0} = -\mathbf{y}_{3,1} \quad (\text{A.2.80})$$

$$J_S = -\left. \frac{\eta ds}{\gamma d\chi} \right|_{\chi=1} = \frac{\eta}{\gamma} \mathbf{y}_{4,N+1} \quad (\text{A.2.81}).$$



## Capítulo 3.

# Determinación de constantes cinéticas para el sistema homogéneo $\beta$ -D-glucosa/GOx/[Os(bpy)<sub>2</sub>ClpyCOOH]<sup>+</sup>

### 3.1 Introducción

Para el diseño de biosensores amperométricos, es necesario elegir un mediador redox artificial apropiado para un dado sistema enzima-sustrato. Generalmente la decisión se toma en función de experimentos realizados previamente sobre el sistema homogéneo, donde la enzima, su sustrato y el mediador pueden difundir libremente, y el mediador reacciona sobre un electrodo inerte [24, 171]. La razón para trabajar en medio homogéneo es que aplicar modelos al caso estacionario del mismo es más sencillo que para sistemas inmovilizados: las concentraciones y la difusión están mejor definidas y no hay problemas de partición de especies, como vimos en el capítulo 1.

En este punto vale la pena mencionar que en la literatura [10, 94, 155-157, 172] se encuentran muchos ejemplos donde para sistemas de oxidasas no se trabaja con los datos específicos para el mediador artificial elegido, sino que se toman de reportes previos los datos de constantes cinéticas para el mediador natural, O<sub>2</sub>.

En este capítulo describiremos en detalle la extracción de datos cinéticos para el sistema D-glucosa/Glucosa Oxidasa, mediado artificialmente por el complejo de Os, [Os(bpy)<sub>2</sub>ClPyCOOH]<sup>+</sup>, así como los inconvenientes encontrados durante el análisis de los datos.

#### 3.1.1 Modelo propuesto

Describimos en el capítulo 1 (sección 1.9.1.1), el modelo teórico de Albery *y col.* [54]. Este modelo es uno de los que más comúnmente se utiliza para analizar datos del sistema homogéneo y extraer constantes cinéticas a partir de los mismos.

Señalamos que cuando se escriben las ecuaciones diferenciales acopladas de difusión-reacción que describen el estado estacionario, no es posible encontrar una única solución analítica cerrada. Mostramos en la tabla 1.2 las fórmulas analíticas aproximadas derivadas por Albery *y col.*, válidas para ciertos casos límites.

Para el caso donde la forma reducida del mediador redox se encuentra presente en el seno de la solución, y se genera en su forma activa (oxidada) sobre la superficie del electrodo, se obtienen cinco casos límite, dos de los cuales son de particular relevancia para nuestro trabajo. Estos son, según la notación original, los casos I y VI, que describen la respuesta amperométrica limitada por las reacciones enzima-mediador y enzima-sustrato respectivamente. Por ajuste de los datos experimentales a las fórmulas analíticas respectivas pueden averiguarse las constantes cinéticas que caracterizan a un dado sistema sustrato-enzima-mediador.

Vimos que para esos dos casos en particular no hay dependencia funcional con la velocidad de rotación, es decir, utilizar convección forzada no cambia el resultado, por lo que da lo mismo trabajar con un electrodo de disco rotante, o un electrodo inmóvil. Señalamos que en estos casos, el voltagrama cíclico resultante será estacionario, e independiente de la velocidad de barrido.

Recordemos las fórmulas:

$$\text{Caso I} \quad i = nFA[A_{\Sigma}](D_M k[E])^{1/2} \quad (1.48)$$

$$\text{Caso VI} \quad i = nFA(2D_M k_E [E][A_{\Sigma}])^{1/2} \quad (1.53)$$

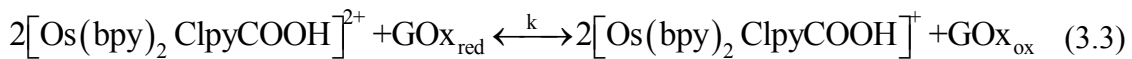
Si escribimos la ecuación (1.53), desarrollando  $k_E$  según (1.5) obtenemos:

$$i_{VI} = nFA \left( \frac{2D_M k_{cat} [E][A_{\Sigma}][S]_{\infty}}{[S]_{\infty} + K_{MS}} \right)^{1/2} \quad (3.1)$$

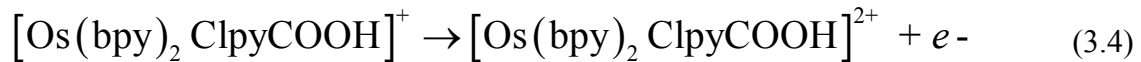
Recordemos que para derivar las fórmulas (1.48) y (1.53), se asume caída en la concentración de sustrato despreciable. Es decir, las ecuaciones diferenciales se resolvieron bajo la suposición que  $[S] = [S]_{\infty}$ , a cualquier distancia del electrodo. Esta aproximación podría no ser válida a baja concentración de sustrato o a alta concentración de enzima. Simulaciones y experimentos previos [24, 42] han demostrado que este factor no debería ser ignorado. El agotamiento del sustrato ha llevado a malos ajustes de los datos experimentales a los modelos, y en los primeros trabajos en el área a significativas sobreestimaciones de  $K_{MS}$ , dado que este parámetro se extrae de la primera parte de las curvas de calibración, a baja concentración de sustrato.

Las reacciones y constantes cinéticas que caracterizan al sistema se esquematizan entonces:





Estas dos primeras reacciones en todo el volumen de la solución y sobre la superficie del electrodo



### 3.1.2 Inactivación enzimática

Otro factor a tener en cuenta para caracterizar el sistema y obtener constantes cinéticas es la inactivación enzimática.

En toda la bibliografía consultada no hemos encontrado ejemplos donde este factor se haya tenido en cuenta a la hora de modelar la respuesta amperométrica de electrodos enzimáticos, ni para la extracción de constantes cinéticas a partir de datos electroquímicos. Cabe destacar acá los trabajos de Savéant *y col.* [173, 174] que han analizado el tema para GOx y para peroxidasa de rábano, aunque desde una perspectiva de la descripción del fenómeno y no desde la problemática que este acarrea para extraer constantes cinéticas a partir de los datos experimentales.

### 3.2 Resultados experimentales

Se realizaron experimentos de voltametría cíclica sobre un electrodo de Carbono vítreo. Este material no posee picos característicos dentro del intervalo de potenciales analizado, y es inerte frente a la adsorción física de nuestros reactivos.

Salvo que se especifique lo contrario, todas las mediciones electroquímicas fueron llevadas a cabo en buffer fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH= 7.2, 0.1M + 0.1M NaCl), no repetiremos esta condición en los epígrafes de los gráficos.

La figura 3.1 muestra una serie de voltagramas cíclicos para soluciones de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$ .

La figura 3.2 muestra la corriente de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, para una solución de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$  en ausencia y presencia de D-glucosa (y en ausencia de enzima).

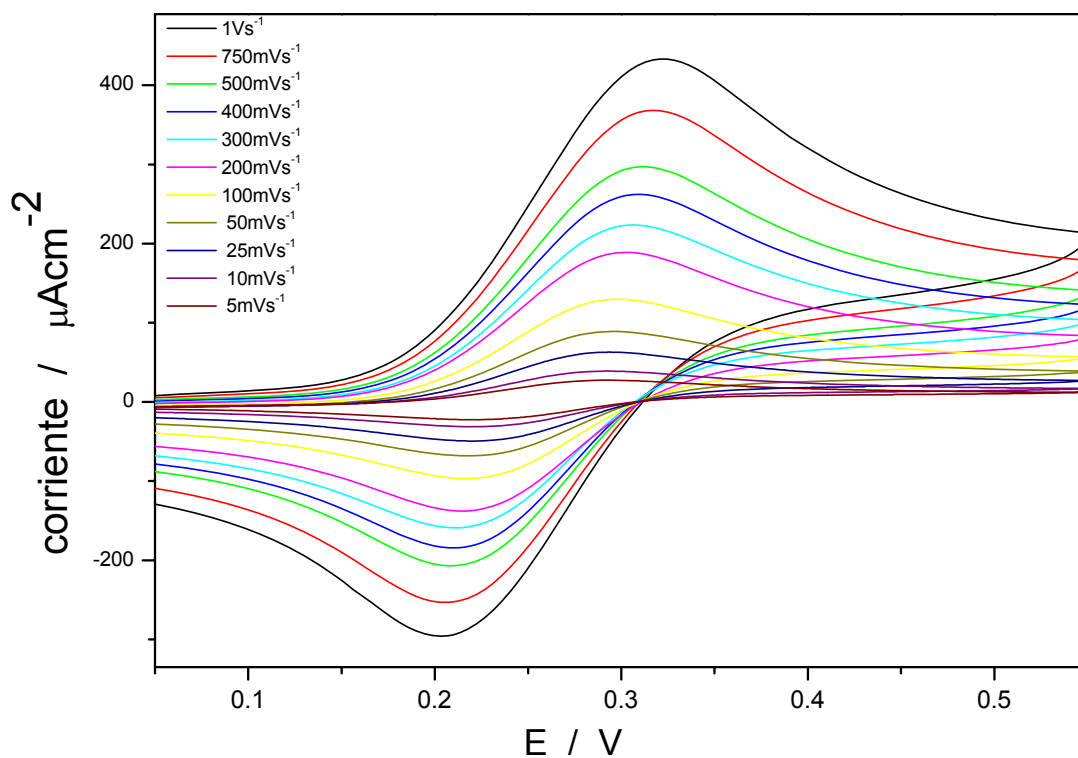


Figura 3.1: Voltagramas cíclicos a distintas velocidades de barrido para una solución de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$  1.0mM. Las velocidades se muestran en la figura.

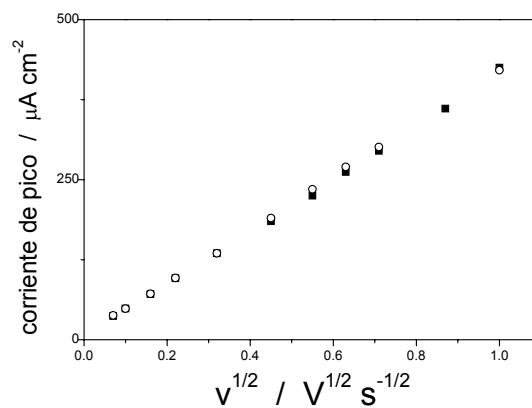
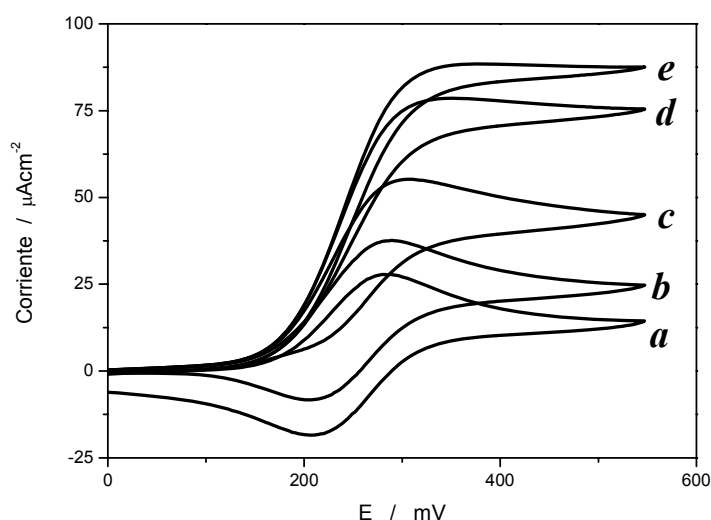


Figura 3.2: Gráfico de corriente de pico anódico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para voltagramas de una solución de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$  1.0mM, en ausencia (cuadrados negros sólidos) y en presencia de 100mM D-glucosa (círculos abiertos), siempre en ausencia de enzima.

Para realizar mediciones de respuesta catalítica, se preparó una solución de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$  en buffer de la concentración deseada, se burbujeó Ar para eliminar el  $\text{O}_2$  (mediador natural de la enzima) disuelto en la solución durante 20

minutos, se agregó una alícuota de enzima a partir de una solución concentrada de la misma y se burbujeó Ar 2 minutos más. A continuación se realizan las mediciones de voltametría cíclica por agregados sucesivos de alícuotas de D-glucosa, siempre sobre la misma solución de trabajo.

La figura 3.3 muestra una secuencia de voltagramas cíclicos a  $v = 5\text{mVs}^{-1}$  para una solución 1.0mM de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$  y 1.6 $\mu\text{M}$  de GOx, en ausencia (a) y a distintas concentraciones (b-e) de sustrato enzimático D-glucosa.



**Figura 3.3:** Voltagramas cíclicos para  $[\text{Os}_{\Sigma}] = 1.02\text{mM}$  y  $[E] = 1.6\mu\text{M}$ .  $[S]_{\infty}$  (mM): a) 0.0; b) 1.6; c) 3.2; d) 9.9; e) 22.7.

La curva *a* de la figura 3.3 muestra un voltagrama cíclico reversible, donde la corriente de pico está limitada por difusión y está descrita por la ecuación de Randles Sevcic (A.2.19) [12], donde  $E' = 242.9\text{mV}$  y  $D_{\text{Os}} = 2.7 \times 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ . Este valor se obtiene del ajuste de una recta a los datos de la figura 3.2., como se vio en el capítulo 2. En presencia de glucosa (curvas *b* a *e*), la forma de los voltagramas evoluciona hacia una onda catalítica, si bien se observa histéresis en todos los casos entre el barrido anódico y el catódico. Notemos también que el voltagrama *b* y *c* (este en menor medida) presentan un pico de corriente máxima.

### 3.2.1 Obtención de $K_{\text{MS}}$ y $k_{\text{cat}}$

Una primera aproximación para obtener las constantes cinéticas  $K_{\text{MS}}$  y  $k_{\text{cat}}$  es realizar experimentos dentro del caso VI.

Las condiciones para estar dentro de este caso límite son [24, 54]:

$$[A_{\Sigma}] > \frac{k_E}{k} \quad (3.5)$$

$$\frac{[A_{\Sigma}]}{[E]} > \frac{D_E}{D_M} \quad (3.6)$$

La condición de la inecuación (3.6) se cumple fácilmente, dado que el coeficiente de difusión del mediador es casi un orden de magnitud mayor que el de la enzima ( $D_E = 4.94 \times 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  [3]); y la enzima siempre se encuentra presente en concentraciones catalíticas, muy inferiores al mediador.

En cuanto a la condición (3.5), el valor máximo para  $k_E$  es  $k_{\text{cat}}$ , cuando la cinética de Michaelis-Menten está saturada.

Intervalos de valores reportados en la literatura para las constantes cinéticas de D-glucosa/GOx/mediador natural o artificial (ver tabla 3.6) son:

$$k_{\text{cat}} = 200-1000 \text{ s}^{-1}$$

$$K_{\text{MS}} = 1-100 \text{ mM}$$

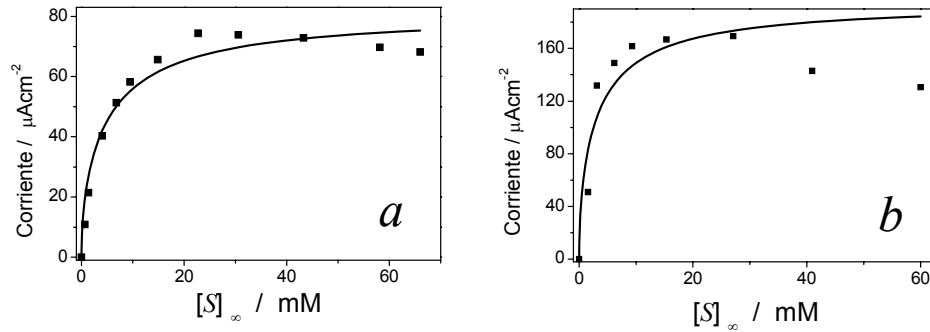
$$k \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Idealmente deberíamos trabajar con concentraciones de mediador del orden de 10.0mM para satisfacer las condiciones de caso VI. Sin embargo, la solubilidad de la sal  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]\text{PF}_6$  es apenas superior a 3.0mM. Debido a esto realizamos experimentos a concentraciones de 1mM y 3.16mM (límite de solubilidad). Para asegurar condición de caso VI evitaremos concentraciones de sustrato muy elevadas. Concentraciones de enzima en el orden de  $\mu\text{M}$  satisfarán también las condiciones de caso VI.

Los voltagramas cíclicos mostrados en la figura 3.3 corresponden a condiciones experimentales de caso VI. Nótese que contrariamente a lo predicho por el modelo de Albery [54], estos voltagramas no son estacionarios. Voltagramas similares se obtuvieron al trabajar dentro de las condiciones de caso VI a baja concentración de sustrato (aproximadamente hasta 4.0mM de glucosa). Al construir las curvas de calibración de respuesta amperométrica en función de la concentración de sustrato, para los puntos de mayor concentración de sustrato se lee el valor de corriente a cualquier potencial  $E > E^0$ , dado que la corriente es constante (se alcanza un *plateau*). Esto no es así para los voltagramas que presentan un pico de corriente máxima. En estos casos, se eligió leer la corriente siempre al mismo valor de  $E$ , en nuestro caso 500mV.

La figura 3.4 muestra resultados de corriente catalítica en función de la concentración de glucosa, para concentraciones que producirían una respuesta dentro del Caso VI. Los

datos de corriente graficados en la figura 3.4 provienen de experimentos de voltametría cíclica.



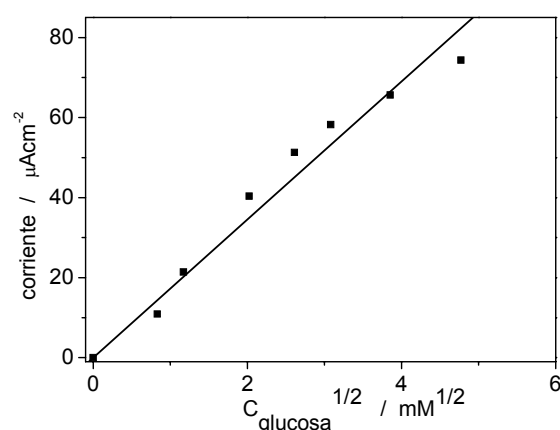
**Figura 3.4:** Gráficos de corriente catalítica en función de la concentración de sustrato, para condiciones experimentales de Caso VI según [24, 54]. a)  $[Os_2] = 1.02\text{mM}$ ,  $[E] = 1.6\mu\text{M}$ . b)  $[Os_2] = 3.16\text{mM}$ ,  $[E] = 1.5\mu\text{M}$ . Las líneas continuas muestran los mejor ajustes de la ecuación (3.1) a los datos experimentales. Todos los experimentos se realizaron sobre la misma solución, haciendo agregados sucesivos de D-glucosa.

Nótese que para ambas concentraciones de mediador, los datos pasan por un máximo a concentraciones de glucosa intermedias y luego se observa caída de la corriente a altas concentraciones de glucosa. La caída en corriente es más pronunciada para la concentración de mediador más alta.

Los valores de  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$  se obtienen normalmente de un ajuste no lineal a la ecuación (1.53). Vemos en la figura 3.4 que el ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales no es bueno. El modelo predice que la respuesta catalítica debería alcanzar un *plateau* a saturación de glucosa que nosotros no estamos observando. El cociente entre  $k_{cat}$  y  $K_{MS}$  también puede obtenerse por un ajuste lineal a los datos de corriente catalítica de la primera parte de la curva de calibración en función de la raíz cuadrada de la concentración de glucosa, como se muestra en la figura 3.5, para los mismos datos de la figura 3.4.a (elegimos trabajar con los datos del panel a y no del b dado que se apartan menos del modelo). Si simplificamos la ecuación (3.1), obtenemos:

$$i = nFA \left( 2D_M \frac{k_{cat}}{K_{MS}} [E][A_2][S]_\infty \right)^{1/2} \quad (3.7)$$

que resulta válida cuando  $[S]_\infty \gg K_{MS}$ .



**Figura 3.5:** Gráfico de corriente catalítica en función de la raíz cuadrada de la concentración de sustrato. Otra presentación de los mismos datos experimentales de la figura 3.4.a. La línea recta es el mejor ajuste a un comportamiento lineal.

Los datos obtenidos por estos ajustes se muestran en la tabla 3.1.

$k_{cat}$	$(60 \pm 20) s^{-1}$	ec. (3.1)
$K_{MS}$	$(13 \pm 5) mM$	ec. (3.1)
$k_{cat} / K_{MS}$	$(5 \pm 3) \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$	ec. (3.1)
$k_{cat} / K_{MS}$	$(3.9 \pm 0.1) \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$	ec. (3.7)

**Tabla 3.1:** Valores de constantes cinéticas obtenidos por ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones (3.1) y (3.7).

### 3.2.2 Modificaciones al diseño experimental

Parece claro al observar la figura 3.4 que el ajuste del modelo a los datos es pobre y consecuentemente las constantes cinéticas extraídas tendrán considerable error. Analizamos las condiciones experimentales detalladamente, suponiendo un error en el diseño experimental y ensayamos diversas variantes que enumeramos a continuación.

En primer término, consideramos el pH de la solución de trabajo.

Existe una importante diferencia entre la reoxidación aeróbica de GOx reducida y la oxidación por mediadores artificiales [175]. Los dos protones producidos durante la oxidación de glucosa son tomados por GOx(FAD) para dar GOx(FADH<sub>2</sub>). En el caso de la oxidación aeróbica, el oxígeno molecular toma estos dos protones para dar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se muestra en las siguientes reacciones:

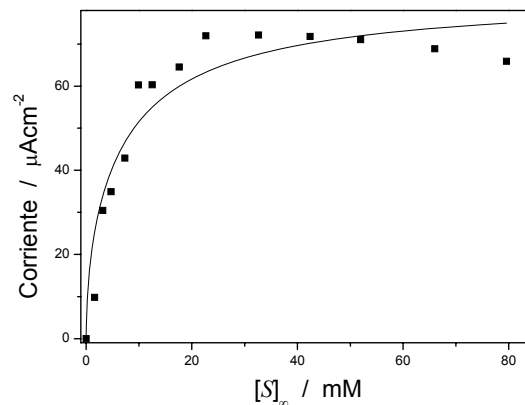






En las reoxidaciones anaeróbicas por medio de mediadores artificiales, como ser nuestro complejo de Os, el mediador redox no toma estos protones, y consecuentemente permanecen en solución como un subproducto de la reacción, pudiendo provocar eventualmente una baja en el pH si se trabaja en un buffer de baja capacidad reguladora. Recordemos que el pH de la solución es importante, dado que los valores de las constantes cinéticas dependen fuertemente de él como se ha mostrado en la literatura [176].

Descartamos la hipótesis de cambios de pH en nuestro sistema al repetir el experimento en una solución del mismo buffer cinco veces más concentrado y obtener exactamente los mismos resultados que con buffer 0.1M, como se muestra en la figura 3.6.



**Figura 3.6:** Gráfico de corriente catalítica en función de la concentración de sustrato, para condiciones experimentales de Caso VI según [24, 54].  $[\text{O}_{S_2}] = 1.02\text{mM}$ ,  $[\text{E}] = 1.6\mu\text{M}$ . Experimentos en buffer fosfato 0.5M, pH = 7.2. La línea continua muestra el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (3.1). Todos los experimentos se realizaron sobre la misma solución, haciendo agregados sucesivos de D-glucosa.

En segundo lugar, supusimos que la superficie del electrodo podría contaminarse durante el curso del experimento, por ejemplo por adsorción de diversas moléculas. Luego de registrar un voltograma cíclico a saturación de glucosa, se retiró el electrodo de la solución, se pulió con alúmina como se describe en el capítulo 2, y se volvió a introducir en la celda para registrar un nuevo voltograma. La corriente catalítica decayó respecto a la original. Descartamos entonces esta segunda hipótesis como responsable de las caídas de corriente.

En tercer lugar, se cambió la secuencia de pasos experimentales. La solución original de buffer, complejo de Os y enzima se dividió en dos alícuotas. A la primer alícuota se le

agregó D-glucosa hasta una concentración de 100mM y se registró un voltagrama. A continuación, se mezcló esta primer alícuota con la segunda, de manera tal de mantener las concentraciones de buffer, mediador y enzima constantes, diluyendo la concentración de D-glucosa a la mitad. Se registró un voltagrama sobre el electrodo nuevo, que mostró un marcado aumento de la corriente catalítica para la solución de glucosa más diluida. La figura 3.7 muestra estos dos voltagramas sucesivos a distinta concentración de glucosa.

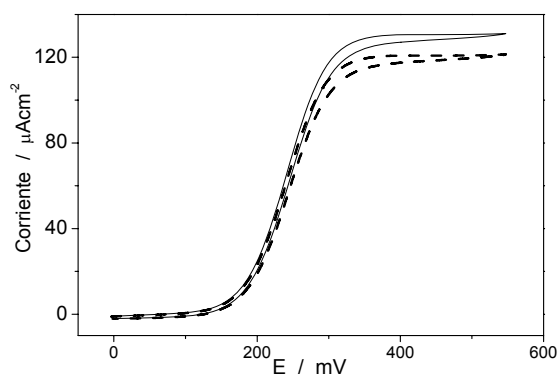


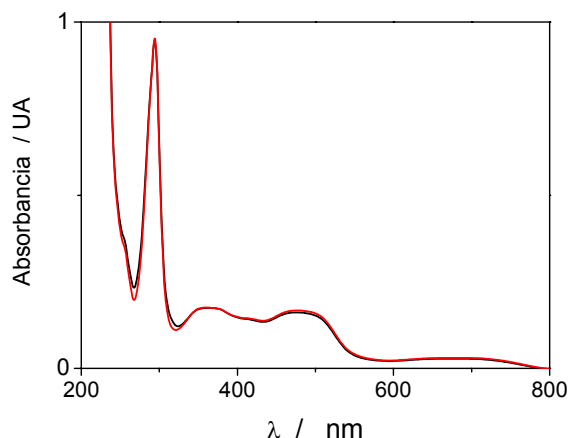
Figura 3.7: Voltagramas cíclicos para  $[Os_{\Sigma}] = 1.02\text{mM}$  y  $[E] = 1.6\mu\text{M}$ . La línea de trazo discontinuo corresponde al primer voltagrama en el tiempo  $[S]_{\infty} = 100\text{mM}$ . La línea de trazo continuo es el segundo voltagrama en el tiempo y corresponde a  $[S]_{\infty} = 50\text{mM}$  (dilución con más buffer, complejo y enzima). Ver descripción del experimento en el texto.

A partir de este experimento podemos concluir, que cualquiera sea el efecto que está produciendo la caída en la corriente, es más evidente a mayor concentración de glucosa.

En cuarto lugar, la estabilidad del complejo de Os se monitoreó por espectroscopía UV-Visible. Se extrajeron sucesivamente alícuotas de la solución sobre la cual se realizaba un experimento de catálisis (con agregados sucesivos de D-glucosa). La figura 3.8 muestra el primer y el último de estos espectros. Las únicas especies que tienen transiciones electrónicas en el UV-Vis son el complejo de Os y GOx. El espectro observado es idéntico al espectro que presenta el complejo de Os puro en solución acuosa, esto se debe, a que GOx está muy diluida y no aporta considerablemente al espectro total. Como se muestra en la figura 3.8, no se observan cambios ni en la posición ni en la altura de los picos de adsorción del complejo de Os. Descartamos entonces la descomposición del complejo de Os durante el transcurso del experimento.

En quinto lugar, se descartó un cambio en el coeficiente de difusión del mediador redox en soluciones más viscosas (mayor concentración de sustrato). La figura 3.2.b muestra que los gráficos de corriente de pico anódico en función de la raíz cuadrada de la

velocidad de barrido para  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$  en ausencia y a 100mM de glucosa son casi superponibles (en ausencia de enzima en solución).



**Figura 3.8:** Espectro UV-Vis de la solución sobre la cual se realizó un experimento de catálisis enzimática, mostrando que la concentración de  $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}(\text{PyCOOH})]^+$  se mantiene sin cambios durante el experimento. La línea negra corresponde a solución que contiene buffer, GOx y complejo. La línea roja corresponde a una alícuota de solución sobre la que se hicieron agregados sucesivos de D-glucosa hasta llegar a saturación. Ensayo realizado aproximadamente 40 minutos después del primero. Notar que los dos espectros son casi indistinguibles.

En sexto lugar, ensayamos si la cinética se veía afectada por el aumento de la viscosidad. Anicet *y col.* [177] reportaron variación en los parámetros cinéticos del sistema glucosa/GOx/ferroceno metanol al aumentar la viscosidad con sucrosa. Por ejemplo,  $k$  decrece de  $1.2 \times 10^7$  hasta  $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  en 0.16 M de sucrosa. En las mismas soluciones,  $k_{\text{cat}}$  varía desde 700 hasta  $400 \text{ s}^{-1}$ ; y  $K_{\text{MS}}$  de 64 a 42 mM.

El experimento de calibración se repitió siguiendo el protocolo habitual hasta llegar a saturación de sustrato, donde se observa la caída en corriente con sucesivos agregados. En este punto, en lugar de seguir con agregados de D-glucosa, se agregó una pequeña alícuota de L-glucosa. L-glucosa es el isómero óptico de D-glucosa, como tal tiene exactamente las mismas propiedades físico-químicas que esta, pero su oxidación no es catalizada por GOx [3]. Por estas razones, consideramos que era el azúcar ideal para confirmar si los cambios podían explicarse por fenómenos físicos. La figura 3.9 muestra dos voltagramas, antes y después de un agregado de L-glucosa. Ambos voltagramas son a igual concentración de D-glucosa, a un valor (92mM) donde habitualmente se observa caída de la corriente por agregados sucesivos de D-glucosa. Se observa, una vez más, una caída de la corriente catalítica.

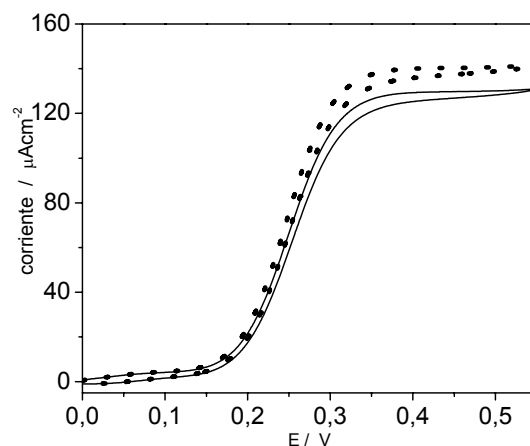
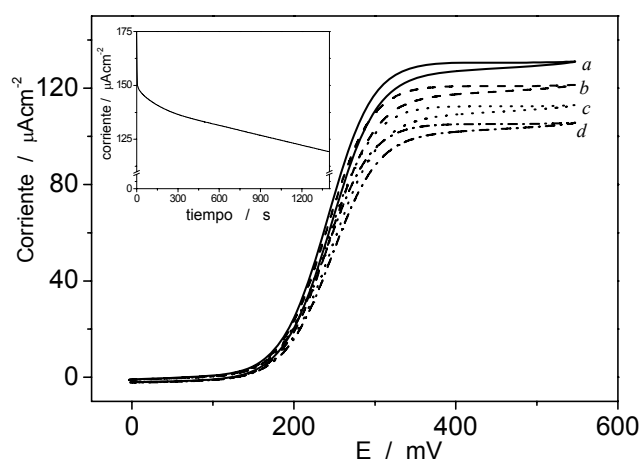


Figura 3.9: Voltagramas cíclicos para  $[O_{2\Sigma}] = 1.02\text{mM}$ ,  $[E] = 1.6\mu\text{M}$  y  $[S]_0 = 92\text{mM}$ . La línea de trazo discontinuo es el primer experimento en el tiempo. La línea de trazo continuo es el segundo experimento, tras el agregado de  $[L\text{-glucosa}] = 30\text{mM}$ .

En este punto, parecería ser que el agregado de L-glucosa, habría provocado la caída de corriente que se observa. Dijimos que L-glucosa no reacciona con GOx, por lo cual aparentemente, la caída de corriente se debería a los cambios físicos que el azúcar provoca en el medio de reacción. Volveremos sobre estos efectos en breve.

En séptimo lugar, analizamos el efecto del catión  $\text{Na}^+$ . Existe un trabajo que reporta efectos inhibitorios de los cationes  $\text{Na}^+$  sobre GOx [178]. Estos efectos fueron sin embargo reportados en escala temporal de horas. En el mismo trabajo sugieren trabajar preferentemente con  $\text{K}^+$ . En nuestro caso, una curva de calibración realizada en las mismas condiciones que la figura 3.4, pero cambiando el buffer por  $0.1\text{M KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4 + 0.1\text{M KNO}_3$  (pH =7.2) no mostró diferencia alguna con aquella figura, con lo cual descartamos también esta hipótesis.

Finalmente investigamos la inactivación enzimática en el tiempo, como posible causa de la caída de la corriente observada. La figura 3.10 muestra experimentos sucesivos de voltametría cíclica, tomados a intervalos de varios minutos, sin agregados extra de ningún reactivo, a alta concentración de glucosa (se burbujeó Ar permanentemente por sobre la solución para impedir la entrada de  $\text{O}_2$ ). Se observa caída de la corriente del *plateau* entre estos sucesivos voltagramas. Sorprendentemente, la velocidad de decaimiento es bastante rápida. El inserto en la figura 3.10 muestra un experimento de cronoamperometría durante 25 minutos a un potencial de  $0.50\text{ V}$ , que también muestra la caída de corriente en el tiempo.



**Figura 3.10:** Voltagramas cíclicos para  $[O_{S\Sigma}] = 1.05\text{mM}$ ,  $[E] = 2.4\mu\text{M}$ ,  $[S]_{\infty} = 46\text{mM}$  a.) primer CV a tiempo 0; b.) CV después de 5 minutos; c.) CV después de 10 minutos; d.) CV después de 25 minutos. El inserto muestra un experimento de Cronoamperometría a 0.50 V. ( $[O_{S\Sigma}] = 1.22\text{mM}$ ,  $[E] = 2.6\mu\text{M}$ ,  $[S]_{\infty} = 117\text{mM}$ , mostrando la caída de la corriente en el tiempo sin agregado de ningún otro reactivo).

En este punto es oportuno descartar un consumo excesivo de sustrato durante los pocos minutos que dura el experimento. Por ejemplo, si partimos de una concentración de D-glucosa inicial de 50mM, y calculamos la cantidad de sustrato consumido suponiendo una corriente catalítica constante de 15.5µA durante un experimento de cronoamperometría, sobre un electrodo de área 0.196cm<sup>2</sup>, en una celda de volumen = 8ml, la concentración de D-glucosa al cabo de 15 minutos habría caído solamente hasta 49.99 mM. Además una caída de corriente debido a consumo de sustrato se revertiría por agregado de más sustrato.

Notemos que estos resultados pueden también explicar la caída de corriente tras el agregado de L-glucosa (figura 3.9). La caída en corriente observada en el tiempo (figura 3.10), es de la misma magnitud que la observada en aquel caso. Al observar una caída de corriente en el tiempo, suponemos que el mismo efecto estuvo también presente en los experimentos descriptos a lo largo de toda esta sección. Es decir, si el agregado de L-glucosa produjo algún cambio físico que afectó la actividad enzimática, este es indistinguible del efecto producido por el transcurso del tiempo.

### 3.2.3 Inactivación enzimática

Nuestros experimentos y cálculos muestran:

- que el pH de la solución permanece constante merced al buffer utilizado;
- que la concentración del complejo de Os permanece inalterada;

- que no existen cambios físicos provocados por el aumento de la concentración de azúcar;
- que el electrodo no se contamina durante los experimentos;
- que cambiar el catión  $\text{Na}^+$  por el catión  $\text{K}^+$  no produce ningún efecto sobre la catálisis;
- que no hay un consumo apreciable de glucosa durante las mediciones.

Entonces debemos llegar a la conclusión de que en el presente trabajo, la enzima está sufriendo un proceso de inactivación. Esta inactivación es relativamente rápida, observable en una escala temporal inferior a una hora.

A partir del experimento mostrado en la figura 3.7, podemos decir también que esta inactivación es más rápida a mayor concentración de D-glucosa.

La hipótesis de inactivación de GOx, sustenta las observaciones de todos los experimentos llevados a cabo en la sección anterior.

En el apéndice A.3.1 se muestra evidencia de inactivación para un sistema análogo al acá descrito. Se trabajó con igual buffer, enzima y sustrato, pero cambiando el mediador artificial por ferroceno metanol. En ese caso, también se observa el mismo perfil de caída en la corriente catalítica con un aumento en la concentración de sustrato.

Existen muchos trabajos en la literatura que reportan inactivación de glucosa oxidasa o caída en la respuesta de biosensores construidos a partir de GOx en escalas temporales que van desde pocas horas hasta días [5, 6, 9, 172, 173, 179-181].

En un trabajo reciente de Miron *y col.* [181] sugieren que las diferencias estructurales entre enzimas de distinto origen serían la causa por la cual la inactivación enzimática es observada o no por distintos autores en los cientos de trabajos que existen en la bibliografía de biosensores que utilizan GOx.

En el apéndice A.3.2 mostramos una curva de calibración realizada en las mismas condiciones que la curva de la figura 3.4, pero con una enzima de distinto origen.

La caída de la corriente catalítica en el tiempo sustenta la idea de la autoinactivación enzimática, dado que se observa incluso, cuando la catálisis se interrumpe por un tiempo (si no se aplica potencial sobre el electrodo, no hay mediador que pueda regenerar a la enzima). Más aún, si durante el transcurso del experimento, se retira el electrodo, se lo pule, y se lo vuelve a introducir en la misma solución, se observa caída en la corriente.

La inhibición por nosotros observada, parece estar relacionada con la enzima en estado reducido, más que con la cantidad de ciclos catalíticos que ha cumplido la enzima. Al comienzo de los experimentos descritos a lo largo del presente capítulo, GOx se agrega a la solución en su forma oxidada, y el complejo de Os en forma reducida. Luego,

conforme se hacen agregados de D-glucosa, la enzima se reduce al oxidar a su sustrato, y permanece en este estado, a menos que se acerque a la superficie del electrodo donde pueda encontrar dos moléculas de mediador que podrán reoxidarla. De esta forma, solamente las moléculas de enzima en la vecindad del electrodo pueden ser regeneradas y volver a participar de un nuevo ciclo catalítico. Las moléculas de enzima restantes, permanecen en solución reducidas luego de la reacción con  $\beta$ -D-glucosa durante todo el transcurso del experimento.

La inhibición por sustrato de la enzima libre proveniente de *Aspergillus niger*, ha sido modelada cuantitativamente por Miron *y col.* [181]. De acuerdo con este modelo, la velocidad de reacción enzimática en un sistema homogéneo, con presencia de inhibición, estará dada por:

$$v = \frac{v_{\max} [S]_{\infty}}{K_{MS} + [S]_{\infty} + K_{is} [S]_{\infty}^2} \quad (3.8)$$

donde  $K_{is}$  es la constante de inhibición por sustrato.

Este modelo corresponde a un estado estacionario, donde la velocidad de reacción enzimática es función únicamente de la concentración de sustrato, y no del tiempo. Un modelo estacionario no parecería ser el más adecuado para la interpretación de nuestros datos experimentales. Como se demostró en la figura 3.10, en una escala temporal relativamente corta, es posible observar decaimiento en la corriente a concentración de sustrato constante.

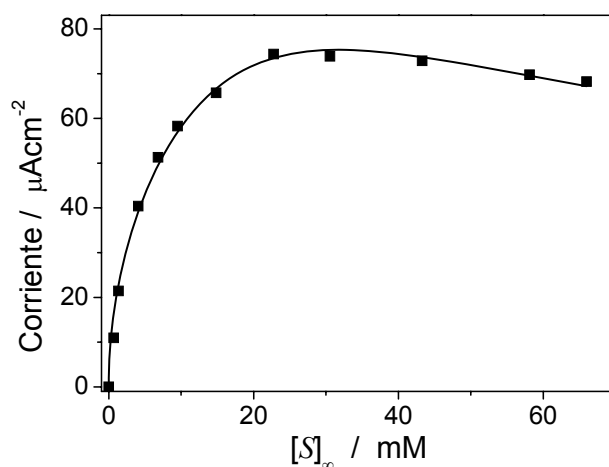
Vamos sin embargo a ensayar incorporar esta idea de inhibición estacionaria dependiente del sustrato a la respuesta amperométrica de nuestro sistema. Adaptando la ecuación (3.1) según (3.8), obtenemos:

$$i = nFA \left( \frac{2D_M [A_{\Sigma}] [E] k_{\text{cat}} [S]_{\infty}}{K_{MS} + [S]_{\infty} + K_{is} [S]_{\infty}^2} \right)^{1/2} \quad (3.9)$$

Ajustamos los mismos datos experimentales de la figura 3.4 a la ecuación (3.9), obteniendo una mejor calidad de ajuste, como se muestra en la figura 3.12.

Sin embargo, al realizar el ajuste no lineal de cuadrados mínimos a tres parámetros ( $k_{\text{cat}}$ ,  $K_{MS}$ ,  $K_{is}$ ), la estadística señala que estos tres parámetros están relacionados (son dependientes entre sí). Si se fija uno de estos tres parámetros (dentro de un cierto intervalo), dejando variar libremente los otros dos, puede obtenerse de todas formas, un buen ajuste no lineal, que arroja parámetros estadísticos de error de ajuste (funciones

$Chi^2$  y  $R^2$ ) muy similares en todos los casos. Vemos entonces que se obtiene un intervalo de valores muy amplio.



**Figura 3.11:** Gráfico de corriente catalítica en función de la concentración de sustrato, para condiciones experimentales de Caso VI según [24, 54].  $[O_{s_2}] = 1.02\text{mM}$ ,  $[E] = 1.6\mu\text{M}$ . La línea continua muestra el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (3.9). Todos los experimentos se realizaron sobre la misma solución, haciendo agregados sucesivos de D-glucosa. Mismos datos experimentales que en la figura 3.4.a.

La tabla 3.2 muestra tres combinaciones de parámetros  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_{\text{MS}}$ ,  $K_{\text{is}}$  que pueden obtenerse arrojando en todos los casos curvas simuladas muy similares a la que se muestra en la figura 3.11.

Un análisis estrictamente algebraico de la ecuación (3.9) permite ver que esta no se puede reparametrizar de forma tal de reducir el número de parámetros a ajustar, redefiniendo alguno de los parámetros originales como una función lineal de los restantes.

	$K_{\text{MS}} / \text{mM}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{is}} / \text{mM}^{-1}$
ajuste 1	173	838	0.170
ajuste 2	100	502	0.098
ajuste 3	25	156	0.018

**Tabla 3.2:** Distintos parámetros cinéticos que se obtiene al ajustar la ecuación (3.9) a los datos de la figura 3.11 aplicando distintas restricciones a los parámetros.

Sin embargo, el análisis de una decena de ajustes no lineales, aplicando restricciones para forzar distintos resultados, mostró que tanto  $k_{\text{cat}}$ , como  $K_{\text{is}}$  pueden escribirse



aproximadamente ( $\pm 15\%$ ) como funciones de  $K_{MS}$ , obteniéndose:  $k_{cat} = 5K_{MS}$  ( $k_{cat}$  en  $s^{-1}$ ,  $K_{MS}$  en mM) y  $K_{is} = K_{MS}/1150$  ( $K_{is}$  en  $mM^{-1}$ ).

Podemos concluir que el modelo propuesto por la ecuación (3.9) no parece acertado para extraer parámetros cinéticos. Solamente nos está permitiendo estimar intervalos muy amplios donde pueden encontrarse los parámetros de interés. Esta falla se suma al hecho de que estamos aplicando un modelo de estado estacionario a datos no estacionarios. Sin embargo, el modelo resulta útil a la hora de sustentar la idea de que existe un proceso de inactivación enzimático, y que el grado de inactivación sería mayor cuánto mayor es la concentración de sustrato.

### 3.3 Un nuevo diseño experimental

Vista toda la evidencia que señala la presencia de un proceso de inactivación dependiente del tiempo, decidimos tratar de independizarnos de esta variable.

El nuevo diseño experimental implica medir cada punto de corriente vs. concentración de glucosa sobre una nueva alícuota de solución de buffer/mediador/enzima, que es descartada luego de realizar la medición de voltametría cíclica.

De esta manera, todas las concentraciones de glucosa están mediciones a igual tiempo respecto al momento en que la enzima entra en contacto con el mediador redox y el sustrato, reduciendo al mínimo el lapso temporal en el que puede inactivarse.

La figura 3.12 muestra datos experimentales de corriente catalítica en función de la concentración de sustrato y el mejores ajuste de los mismos a la ecuación (3.1) para dos concentraciones de mediador distintas.

Vemos en la figura 3.12 que los ajustes no lineales siguen mejor los datos experimentales que en el caso de la figura 3.4. Los datos experimentales no pasan ahora por un máximo de corriente para después caer, sino que alcanzan un valor constante para las concentraciones de glucosa más altas, como predice el modelo.

Obsérvese también para el caso 3.12.a, que la corriente catalítica máxima alcanzada es aproximadamente  $120 \mu Acm^{-2}$ , para las mismas concentraciones de mediador y de enzima que con el anterior diseño experimental se alcanzaba tan solo  $70 \mu Acm^{-2}$ . Este dato estaría sugiriendo que en los aproximadamente 50 minutos que transcurrían desde el primer hasta el último agregado de glucosa sobre la misma solución en el experimento de la figura 3.4.a se estaba inactivando aproximadamente el 40% de la enzima.

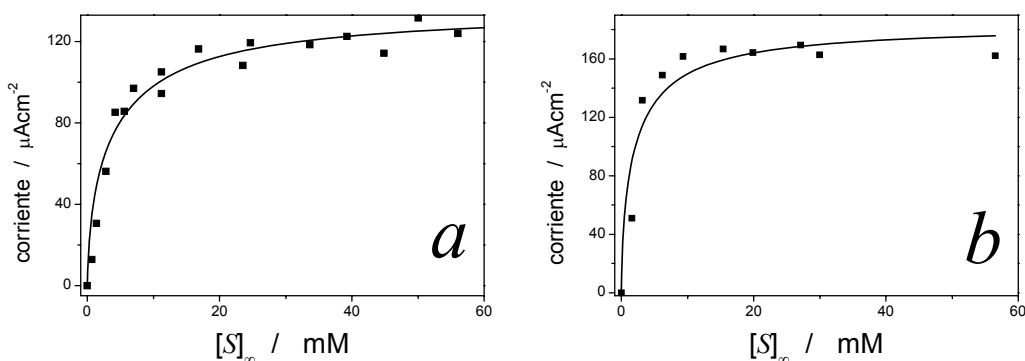


Figura 3.12: Gráfico de corriente catalítica en función de la concentración de sustrato, para condiciones experimentales de Caso VI según [24, 54]. La línea continua muestra el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación. Cada punto experimental corresponde a una nueva mezcla de solución de buffer/mediador/GOx/D-glucosa la cual se descartó después de tomar la voltametría cíclica. *a*)  $[O_{2\Sigma}] = 1.02\text{mM}$ ,  $[E] = 1.6\mu\text{M}$ .; *b*)  $[O_{2\Sigma}] = 3.16\text{mM}$ ,  $[E] = 1.5\mu\text{M}$  <sup>3</sup>.

Vemos mayor dispersión de los datos experimentales. Suponemos que esto se debe a ligeras variaciones en concentración al preparar soluciones nuevas para cada punto, así como tal vez pequeñas diferencias de tiempo en la medición de los datos experimentales. Los valores de  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{MS}}$  obtenidos por ajuste de los datos experimentales de la figura 3.12 se muestran en la tabla 3.3:

	3.12.a	3.12.b	fórmula
$K_{\text{MS}} / \text{mM}$	$9.3 \pm 2.5$	ND	(3.1)
$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$230 \pm 20$	$300 \pm 20$	(3.1)
$k_{\text{cat}}/K_{\text{MS}} / \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$2.5 \pm 0.9$	ND	(3.1)
$k_{\text{cat}}/K_{\text{MS}} / \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$2 \pm 1$	ND	(3.7)

Tabla 3.3: Constantes cinéticas extraídas de ajuste de las fórmulas correspondientes a los datos experimentales de la figura 3.12. ND = no determinado

### 3.3.1 Obtención de $k$

Una vez encontrado un diseño experimental que nos permite sobreponernos al problema de la inactivación enzimática, realizamos experimentos dentro de las fronteras del caso I [54], para obtener la constante de reoxidación bimolecular mediador-enzima.

Las condiciones para estar dentro de este caso límite son [24, 54]:

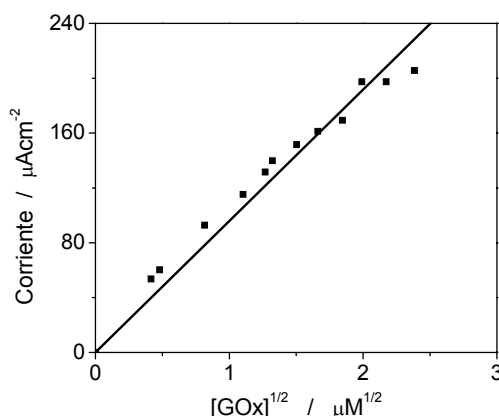
<sup>3</sup> Para la mayor concentración de mediador redox se realizaron menos experiencias, porque el objetivo era corroborar si aumentaba  $k_{\text{cat}}$  al alejarnos más de la frontera del caso límite. Esta constante se obtiene del valor del *plateau*. La baja cantidad de puntos experimentales a bajas concentraciones de sustrato acarrea mayor error para el cálculo de  $K_{\text{MS}}$  del presente gráfico y por ello no se reporta este valor.

$$[A_{\Sigma}] < \frac{k_E}{k} \quad (3.10)$$

Haciendo las mismas consideraciones que para el caso VI, y conociendo los valores aproximados para este sistema de  $k_{cat}$  y  $K_{MS}$  (tabla 3.3), elegimos  $[O_{S_{\Sigma}}]=1\text{mM}$  y una concentración de D-glucosa de 50mM (cuatro veces mayor que el valor hallado de  $K_{MS}$ , que asegura saturación, sin llegar a una concentración que por excesiva provoque problemas por inactivación enzimática).

La figura 3.13 muestra datos experimentales de corriente en función de la raíz cuadrada de concentración de enzima y el mejor ajuste de los mismos a una recta que pasa por el origen.

La pendiente de la curva indica un valor de  $k = 4.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Esta constante debe ser dividida por 2 [24], dado que dos moles de complejo de Os reoxidan un mol de GOx, a diferencia de la reoxidación aeróbica, donde reacciona un mol de  $O_2$  por mol de enzima. Recordemos que el modelo de Albery original no tiene en cuenta la estequiometría de la reacción enzima-mediador. El resultado se muestra en la tabla 3.4.



**Figura 3.13:** Gráfico de corriente catalítica en función de la raíz cuadrada de concentración de enzima a saturación (50mM) de D-glucosa.  $[O_{S_{\Sigma}}]=1.02\text{mM}$ . La línea corresponde al mejor ajuste a la ecuación (1.48).

$k / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$2.1 \pm 0.2$
----------------------------------	---------------

**Tabla 3.4:** Constante cinética bimolecular extraída del ajuste de la figura 3.13.

### 3.4 Comparación de datos experimentales con voltagramas simulados

En esta sección comparamos los voltagramas cíclicos experimentales con sus análogos simulados numéricamente. Las simulaciones resuelven las ecuaciones diferenciales sin

simplificar que describen el comportamiento del sistema homogéneo. El modelo utilizado difiere en dos aspectos respecto a los procesos considerados por Alberly y *col.*. En primer lugar, se tiene en cuenta la difusión del sustrato, y la concentración del mismo se expresa explícitamente como función del tiempo y de la distancia al electrodo. De esta forma, se considera como una posibilidad el desarrollo de perfiles de concentración para el mismo. En segundo lugar, se desestima la difusión de la enzima, debido a su coeficiente de difusión aproximadamente un orden de magnitud menor al del mediador soluble y el sustrato. En consecuencia,  $[E] = [E_{red}] + [E_{ox}] = \text{constante}$ , a cualquier distancia del electrodo. Esto implica que no se observarán gradientes de concentración para la enzima total  $[E]$ , aunque sí serán función de la distancia al electrodo las concentraciones individuales de  $[E_{red}]$  y  $[E_{ox}]$ .

La figura 3.14 esquematiza los procesos considerados en el modelo.

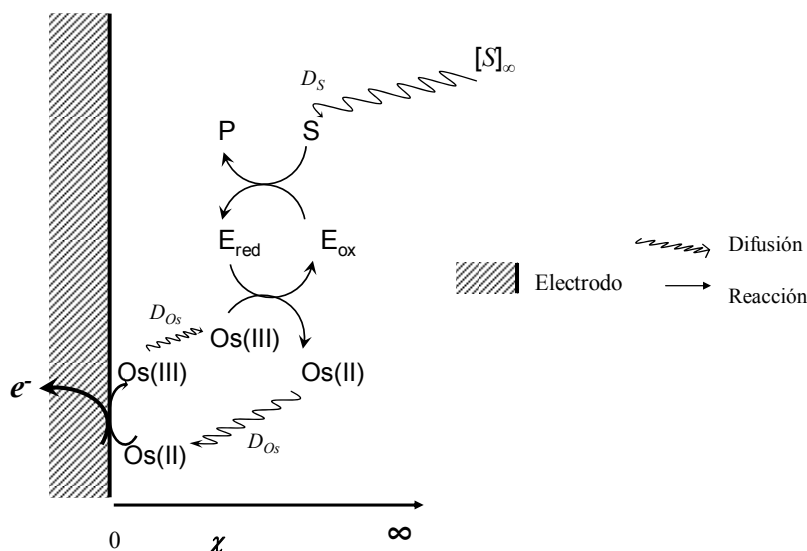


Figura 3.14: Representación esquemática de los procesos considerados en el modelo usado para escribir y resolver las ecuaciones diferenciales que describen el sistema durante una voltametría cíclica. Os(II) y Os(III) son las formas reducida y oxidada del mediador respectivamente,  $D_{Os}$  es el coeficiente de difusión que describe la difusión de Os(II) y de Os(III). Os(II) se convierte a Os(III) únicamente en la superficie del electrodo.  $E_{ox}$  y  $E_{red}$  son las formas oxidada y reducida de la enzima respectivamente. S y P son el sustrato y el producto.  $D_S$  es el coeficiente de difusión que describe la difusión del sustrato. Las reacciones enzimáticas pueden ocurrir en todo el volumen de la solución.

Se compararon voltagramas experimentales con curvas simuladas ajustando iterativamente los parámetros  $K_{MS}$ ,  $k_{cat}$  y  $k$ . A diferencia del capítulo 5 donde el ajuste se realizó incorporando la resolución numérica a una rutina computacional de ajuste, en este capítulo los ajustes se realizaron manualmente. Como valores iniciales (*semillas*) se utilizaron los valores dados en las tablas 3.3 y 3.4. Se utilizaron valores de bibliografía para el coeficiente de difusión de D-glucosa [182] y para la proporción de anómeros  $\alpha$  y

$\beta$  en una solución equilibrada en los anómeros [3]. Se utilizaron datos experimentales para el coeficiente de difusión del mediador redox, las concentraciones de todos los reactivos y el potencial  $E^\circ$  del mediador

Dado que hay tres parámetros de ajuste, muchas veces se consiguen más de un voltograma simulado con parámetros distintos que ajusta bien a los datos experimentales. Por esta razón se redujeron los valores posibles para los tres parámetros de ajuste, primero eligiendo los valores centrados en las estimaciones analíticas (tablas 3.3. y 3.4) y en segundo lugar, escogiendo los de mínimo error de ajuste.

En total se analizaron más de cien voltogramas experimentales para un amplio intervalo de concentraciones de enzima, sustrato y mediador y se compararon con las simulaciones numéricas.

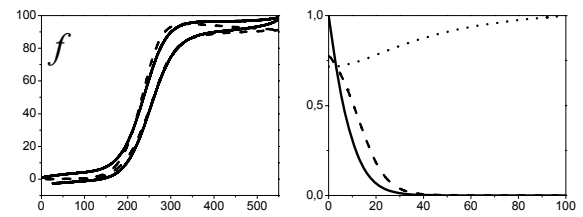
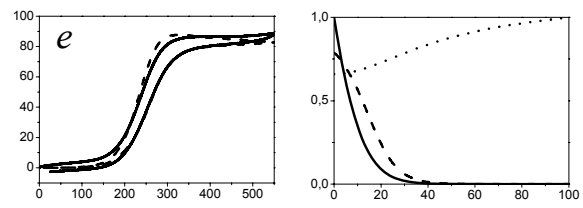
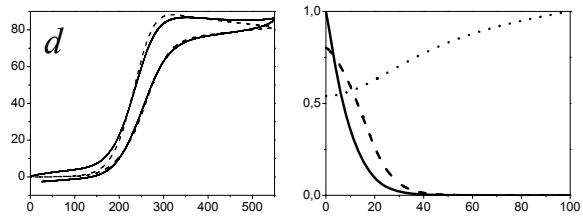
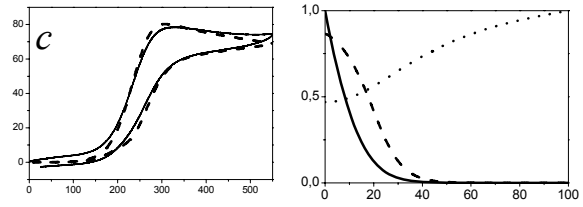
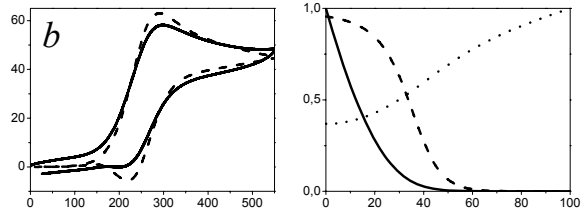
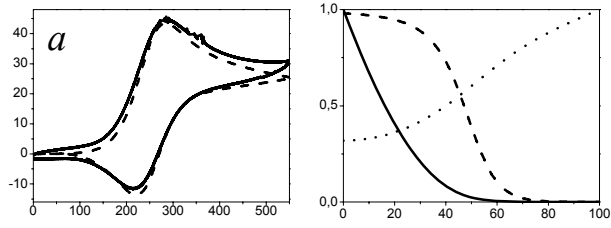
Las figuras 3.15.a-k y 3.16.a-k muestran superposiciones de voltogramas experimentales y simulados en los paneles de la izquierda. En los paneles de la derecha se muestran los perfiles de concentración para mediador, enzima reducida y sustrato en las cercanías del electrodo al final del barrido anódico. La figura 3.15 corresponde a voltogramas tomados a concentración de mediador y enzima constante, y concentración de sustrato creciente de los paneles a al k. La figura 3.16 muestra voltogramas a concentración de mediador y sustrato constantes, y concentración de enzima creciente de los paneles a al k.

Los voltogramas simulados que se muestran en los paneles 3.15 a-k y 3.16 a-k fueron calculados en todos los casos con los valores de constantes cinéticas que se muestran en la tabla 3.5, o con variaciones alrededor de estos parámetros nunca más allá del 10%.

La tabla 3.5 también recopila los valores hallados para las mencionadas constantes por ajuste a las fórmulas analíticas correspondientes. Estos se muestran junto con los valores usados en los cálculos de simulación para comparar los mismos.

	simulación	fórmula analítica
$K_{MS}$ (mM)	$11 \pm 1$	$9.3 \pm 2.5$
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$254 \pm 20$	$265 \pm 55$
$k \times 10^5$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$2.2 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.2$
$k_{cat}/K_{MS}$ ( $\times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ )	$2.3 \pm 0.4$	$2 \pm 1$

Tabla 3.5: Valores de constantes cinéticas utilizados en las simulaciones de voltogramas cíclicos y los mismos valores hallados por ajuste de las fórmulas analíticas a los datos experimentales.



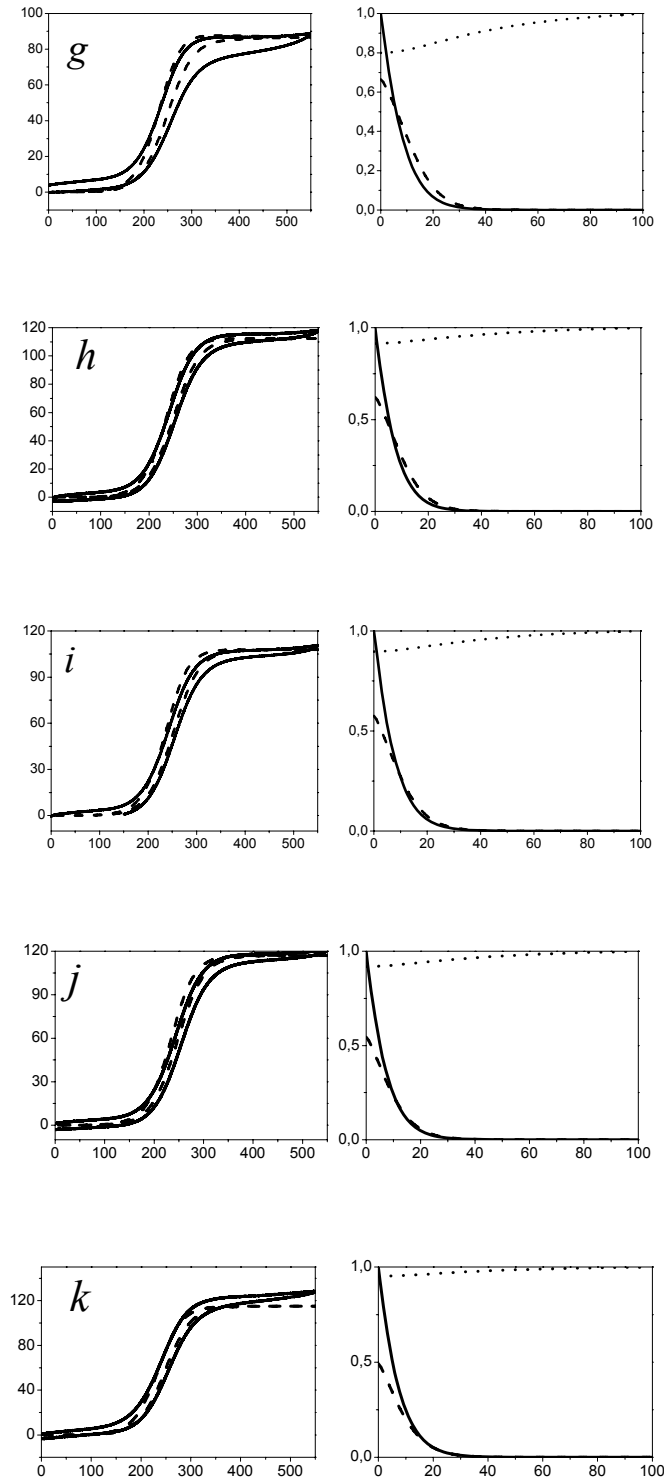
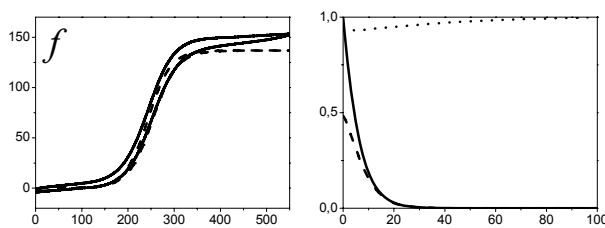
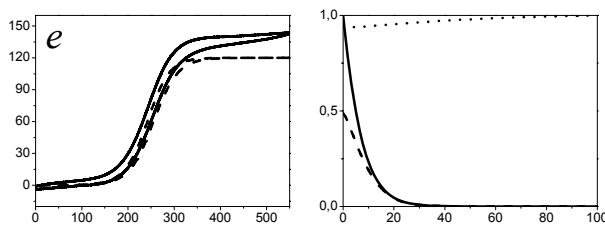
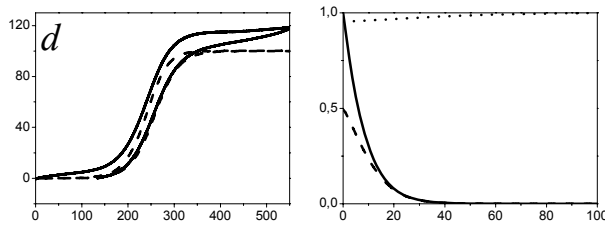
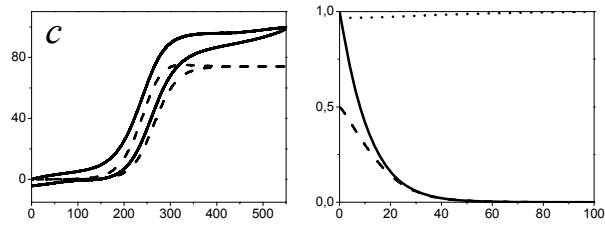
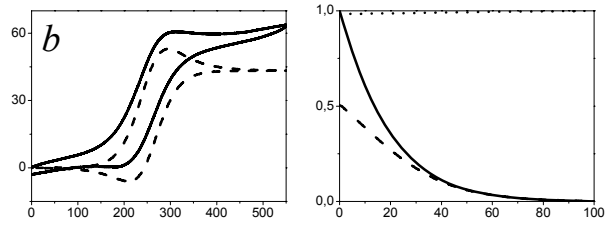
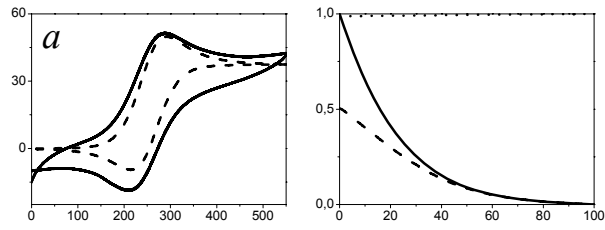
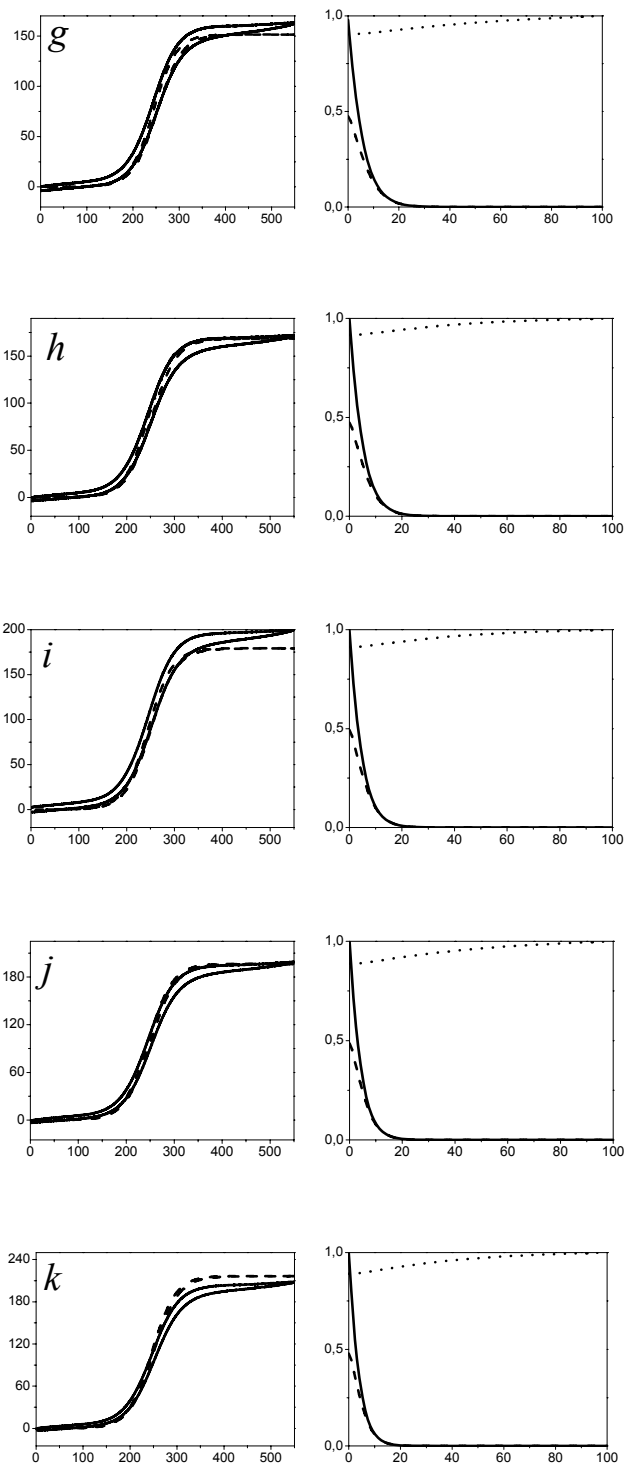


Figura 3.15 *a-k*: Gráficos columna izquierda: Comparación de voltagramas cíclicos simulados (línea de trazo continuo) y experimentales (línea de trazo discontinuo) para las mismas condiciones experimentales que la figura 3.12.a ( $[Os_{\Sigma}] = 1.0\text{mM}$ ;  $[E] = 1.6\mu\text{M}$ ). En todos los casos, corriente en  $\mu\text{Acm}^{-2}$  y potencial en mV. Velocidad de barrido  $5\text{mVs}^{-1}$ .

Gráficos columna derecha: perfiles de concentración adimensionales simulados al final del barrido anódico para  $Os(III)$  ( $[Os(III)]/[Os_{\Sigma}]$ , línea continua); D-glucosa ( $[S]/[S]_{\infty}$ , línea punteada); y enzima oxidada ( $[E_{ox}]/[E]$ , línea a rayas) en las cercanías del electrodo. Concentraciones de D-glucosa (mM): *a*) 0.7; *b*) 1.4; *c*) 2.8; *d*) 4.2 *e*) 5.6; *f*) 7.0; *g*) 11.2; *h*) 16.8; *i*) 23.5; *j*) 33.6; *k*) 56.1







**Figura 3.16 a-k:** Gráficos columna izquierda: Comparación de voltagramas cíclicos simulados (línea de trazo continuo) y experimentales (línea de trazo discontinuo) para las mismas condiciones experimentales que la figura 3.13 ( $[Os_{\Sigma}] = 1.0\text{mM}$ ;  $[S]_{\infty} = 50\text{mM}$ ). En todos los casos, corriente en  $\mu\text{Acm}^{-2}$  y potencial en mV. Velocidad de barrido  $5\text{mVs}^{-1}$ .

Gráficos columna derecha: perfiles de concentración adimensionales simulados al final del barrido anódico para  $Os(III)$  ( $[Os(III)]/[Os_{\Sigma}]$ , línea continua); D-glucosa ( $[S]/[S]_{\infty}$ , línea punteada); y enzima oxidada ( $[E_{ox}]/[E]$ , línea a rayas) en las cercanías del electrodo. Concentraciones de GOx ( $\mu\text{M}$ ): a) 0.17; b) 0.23; c) 0.67; d) 1.22 e) 1.75; f) 2.26; g) 2.76; h) 3.40; i) 3.96; j) 4.72; k) 5.68

La capacidad de simular los perfiles de concentración en la cercanía del electrodo es una herramienta única que nos brinda la teoría. Hasta el momento ninguna técnica experimental muestra estos perfiles. De las dos aproximaciones teóricas usadas para analizar nuestros datos solo la segunda (simulación) nos permite ver los perfiles para las tres especies, dado que el modelo de Albery no contempla el desarrollo de perfiles para el sustrato.

Analicemos primeramente los voltagramas de la figura 3.15. Resulta evidente que la forma de los voltagramas cíclicos cambia significativamente con las concentración de sustrato. A baja concentración de sustrato, en el voltagrama aún se observan picos y una pronunciada histéresis entre los barridos anódicos y catódicos. A altas concentraciones de sustrato, se observa una clara curva catalítica, sin picos y con mínima histéresis.

Observamos buen ajuste entre las curvas experimentales y las simuladas, para todo el intervalo de potenciales. Téngase en cuenta que las simulaciones son válidas en todos los casos cinéticos límites, e incluso en las zonas del diagrama cercanas a las fronteras entre casos límites donde las ecuaciones analíticas aproximadas presentan más error.

Existen reportes en la literatura [24, 28, 42, 91] de agotamiento de sustrato a bajas concentraciones del mismo en la cercanía del electrodo en experimentos de voltametría cíclica.

Una clara evidencia de esto son los voltagramas con forma de pico, en contraposición a una verdadera onda catalítica.

Al comienzo del barrido anódico, el sustrato se encuentra en la superficie del electrodo a la misma concentración que en el seno de la solución  $[S]_{\infty}$ . A su vez todo el mediador redox se encuentra en la forma reducida. Conforme el potencial se vuelve más positivo, la concentración de Os(III) en las cercanías de la superficie del electrodo crece (y alcanza la concentración de Nernst en la superficie del electrodo). La velocidad de reacción entre la enzima reducida y el mediador es relativamente alta, consumiendo la concentración de glucosa en las cercanías del electrodo, resultando en una corriente más alta que la corriente límite difusional, pero todavía con forma de pico. Más allá de este pico, la concentración de mediador permanece aproximadamente constante en las cercanías del electrodo, mientras que la concentración de glucosa continúa cayendo; y durante el barrido catódico resulta considerablemente inferior a los valores de concentración observados a igual potencial durante el barrido anódico. Esta es la causa de la histéresis observada entre ambos barridos, hasta alcanzar el potencial de equilibrio de la cupla Os(III)/Os(II). Más allá de este potencial, no se observa pico catódico, o si se

observa, resulta de magnitud menor a la del correspondiente pico anódico. Esto se debe a que la especie Os(III) se consume rápidamente por reacción con la enzima reducida.

Los perfiles de concentración simulados muestran un importante agotamiento en la concentración de sustrato hasta  $[S]_{\infty} = 11.2\text{mM}$ , *i.e.* hasta aproximadamente el valor de  $K_{MS}$  hallado. En todos los casos, mayor agotamiento en el perfil simulado, se corresponde con mayor histéresis en el voltograma experimental. Nótese también que casi no se observa agotamiento en las mayores concentraciones de sustrato.

Los perfiles simulados también muestran que la enzima se encuentra en su estado oxidado solo en una región muy pequeña en las cercanías del electrodo, permaneciendo reducida fuera de la delgada capa de reacción. Cuanto mayor es la concentración de sustrato, esta región se vuelve cada vez más angosta.

Conforme aumentamos la concentración de sustrato más allá de  $K_{MS}$ , la reacción enzima-sustrato aumenta su velocidad relativa respecto a la reacción enzima-mediador y nos acercamos a la frontera con el caso límite I.

Comentemos ahora los paneles de la figura 3.16. En esta serie de paneles el ajuste entre las simulaciones y los experimentos continúa siendo aceptable, aunque no resulta tan preciso como en 3.15. Una posible causa experimental para explicar este resultado, podría ser el desgaste del electrodo en el momento en que se realizaron estos experimentos (electrodo más viejo, con más fisuras y consecuente peor línea de base), los voltogramas mostrados solamente fueron normalizados a corriente por  $\text{cm}^2$  de área de reacción, pero no se restó la línea de base. El agotamiento de sustrato es bajo, aunque relativamente mayor a las concentraciones de enzima más altas.

Por otro lado, cuanto más baja es la concentración de enzima, más lejos puede difundir el mediador, y consecuentemente, también mayor es la región alejándonos del electrodo donde se encuentra la enzima en su estado oxidado (recordemos que estamos trabajando siempre a saturación de sustrato).

### 3.5 Discusión

La tabla 3.5 mostrada más arriba, compara los resultados obtenidos para las distintas constantes cinéticas para el sistema  $\beta\text{-D-glucosa}/\text{GOx}/[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{ClPyCOOH}]^+$ .

Las constantes cinéticas obtenidas por ajuste de los voltogramas simulados a los experimentos son muy cercanas a las halladas por ajuste a las fórmulas analíticas aproximadas.

Resulta interesante comparar los valores obtenidos en este trabajo con otros obtenidos en sistemas similares reportados en la bibliografía.

### 3.5.1 Acerca de las constantes cinéticas para el sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx

La mayor parte de los trabajos realizados con GOx con el objetivo de elucidar su mecanismo de reacción ha sido llevada a cabo con  $O_2$  como el aceptor de electrones y a  $pH = 5.5-5.6$  [3]. Sin embargo, para el estudio de biosensores, resultan más relevantes los datos cinéticos a  $pH$  cercano a 7.

Existe una dispersión muy grande de datos cinéticos en la literatura. Llamativamente, esta dispersión se encuentra tanto para la regeneración de la enzima por mediadores artificiales, como por  $O_2$ .

Las constantes cinéticas de  $\beta$ -D-glucosa/GOx/ $O_2$  muestran una fuerte dependencia con el  $pH$  [176, 183]. El esquema cinético propuesto en (1.40) a (1.42) es generalmente aceptado, si bien se trata en realidad de un esquema simplificado de un mecanismo más complejo de varios pasos. Los trabajos clásicos en el área reportan datos cinéticos obtenidos por mediciones de *stop-flow* y mediciones de estado estacionario para la reacción global. En ambos casos, mediciones espectrofotométricas, no electroquímicas. Bright y col. [176, 183] publicaron los primeros trabajos donde se estudia la cinética en función del  $pH$ . A  $pH = 7$ , reportan<sup>4</sup>  $k_{cat} \approx 900 \text{ s}^{-1}$  y  $k_{red} \approx 1.32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . De  $k_{red}$  puede extraerse  $K_{MS}$  ( $k_{red} = k_{cat} / K_{MS}$ ), obteniéndose un valor de  $K_{MS} = 68 \text{ mM}$ . Los gráficos del trabajo original se reproducen en la figura 3.17.

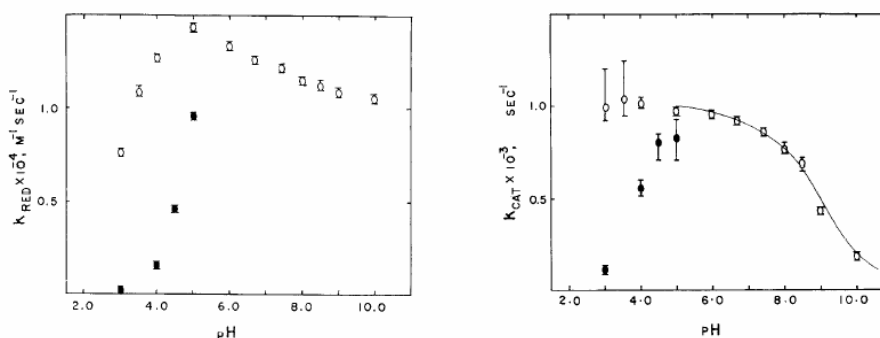


Figura 3.17: Variación de constantes cinéticas para  $\beta$ -D-glucosa/GOx/ $O_2$  en función del  $pH$ . Extraído de referencia [183]. Temperatura  $25^\circ\text{C}$ , puntos negros sólidos,  $0.1 \text{ M Cl}^-$ , demás datos sin  $\text{Cl}^-$ .

Numerosas publicaciones, hacen referencia a supuestos valores “*generalmente aceptados*”, o “*comúnmente aceptados en la bibliografía*” sin citar fuentes

<sup>4</sup> Los valores son aproximados dado que están extraídos de gráficos, este trabajo no publica tablas.

bibliográficas, o bien citando fuentes incorrectas donde no aparecen los datos que se están referenciando. La principal diferencia con los valores anteriormente citados, es respecto al valor de  $K_{MS}$ . Muchos autores citan como valores comúnmente aceptados a pH = 7,  $K_{MS}$  del orden de 20 o 30mM. Este es sin embargo, el valor reportado para la enzima a pH = 5.6 (Swodoba y Massey, 33mM [184]; luego citado por [3, 185]; varios otros reportes entre 22 y 37mM, [186], siempre a pH  $\approx$  5.5)

La tabla 3.6 compila datos de constantes cinéticas para  $\beta$ -D-glucosa/GOx y distintos mediadores redox en sistema homogéneo.

Mediador	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$	$K_{MS} / \text{mM}$	$k / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{cat}/K_{MS} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
O <sub>2</sub> [176, 183]	900	68	$1.6 \times 10^6$	$1.32 \times 10^4$
O <sub>2</sub> [3] (pH no especificado)	NR	del orden $20^{-5}$	NR	NR
O <sub>2</sub> [184] (pH = 5.6)	NR	33	NR	NR
ferrocenometanol [25]	780	65	$6.0 \times 10^6$	$1.20 \times 10^4$
ferrocenometanol [177]	400	42	$2.0 \times 10^6$	$0.95 \times 10^4$
ferrocenometanol [28]	408	36	NR	$1.13 \times 10^4$
ferrocenomonocarboxílico [25]	NR	NR	$1.5 \times 10^5$	NR
ferrocenomonocarboxílico [24]	497	29	$2.2 \times 10^5$	$1.70 \times 10^4$
ferrocenomonocarboxílico [27]	NR	NR	$6.0 \times 10^4$	NR
ferrocenomonocarboxílico [26]	NR	NR	$2.0 \times 10^5$	NR
ferrocenodimetanol [28]	340	30	NR	$1.13 \times 10^4$
(ferrocenometil)dimetilamonio [25]	NR	NR	$1.0 \times 10^7$	NR
(ferrocenometil)trimetilamonio [28]	233	27	NR	$8.6 \times 10^3$
ferrocenomonosulfonato [27]	95	88	$9.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^3$

Tabla 3.6: Constantes cinéticas para GOx de *Aspergillus niger* con distintos mediadores en sistema homogéneo y fuentes bibliográficas. pH = 7, salvo indicación contraria. NR = no reportado

Con los datos de la tabla 3.6. podemos comparar:

- Variación de  $K_{MS}$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_{MS}$  para distintos mediadores redox;
- Variación de  $k$  para distintos mediadores redox;
- Variación de  $K_{MS}$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_{MS}$  y  $k$  para un mismo mediador redox, para mediciones y tratamiento de datos realizados por distintos autores;
- Variación de  $K_{MS}$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_{MS}$  para distintos mediadores redox, para mediciones y tratamiento de datos realizados por un mismo grupo.

<sup>5</sup> Esa frase aparece en el citado trabajo.

La primera pregunta que surge es si los valores de  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$  deberían depender del mediador redox utilizado. En la primera parte del mecanismo de tipo ping-pong (reacción (1.40)), éste no interviene en la reacción entre la enzima y la glucosa. Según los pasos de reacción del mecanismo comúnmente aceptado [3, 176, 183, 184, 187-190] cambiar  $O_2$  por un mediador redox artificial no debería modificar ni  $K_{MS}$  ni  $k_{cat}$ .

En esta idea se apoyan los autores que deciden no investigar los parámetros cinéticos  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$  particulares para un nuevo mediador redox.

Por otro lado, varios grupos trabajando con mediadores redox artificiales buscaron comparar sus valores cinéticos con los valores para  $O_2$  [24, 25, 27, 43], calificando de mejores o peores resultados a aquellos valores que se acercan más a los de  $O_2$  (comparando muchas veces contra los valores a  $pH \approx 5.5$ , pese a trabajar a  $pH \approx 7$ ).

Si analizamos los valores de la tabla 3.6, observamos una gran dispersión en los valores de  $K_{MS}$  que varían entre 20 y 88 mM; así como en los valores de  $k_{cat}$ , entre 95 y 900  $s^{-1}$ .

En la tabla 3.6 también puede verse cómo distintos grupos han reportado valores distintos para el mismo mediador redox, ver en particular el caso del ferrocenometanol. Los datos de las referencias [25, 177] fueron publicados ambos por el grupo de J.M. Savéant, y comparan la cinética analizada siempre por métodos electroquímicos, pero en soluciones de alta o baja viscosidad. Llamativamente, los datos de Yokoyama *y col.* [28] medidos en soluciones de baja viscosidad se asemejan mucho más a los datos de Savéant *y col.* en soluciones viscosas.

Nótese que los datos que sí son llamativamente similares son los del cociente entre  $k_{cat}$  y  $K_{MS}$ . Estos valores son además muy similares al mismo cociente para otros mediadores redox.

Los datos de Yokoyama *y col.* son muy interesantes dado que permiten comparar constantes cinéticas para tres mediadores redox distintos obtenidas a partir del mismo dispositivo experimental, mediante el mismo tratamiento de datos y para enzima proveniente del mismo lote (*batch*). Estos datos muestran que los valores de  $K_{MS}$  no son muy distintos, incluso podrían considerarse iguales, dentro del error experimental reportado, del orden del 35%. Sin embargo los datos de  $k_{cat}$  sí son distintos (además en este caso el error experimental reportado es mucho menor, del orden del 5%).  $k_{cat}$  resulta máxima para ferrocenometanol; un 12.5% inferior para ferrocenodimetanol y casi un 60% inferior para (ferrocenometil)trimetilamonio.

Los valores de  $k$  para distintos mediadores varían significativamente, incluso tres órdenes de magnitud. Esta variación es probablemente la más fácil de explicar. Resulta

esperable que moléculas distintas, de distinto tamaño y carga, tengan distinta tendencia a reoxidar a GOx. Existir amplio acuerdo en este último punto entre distintos autores. Incluso existen muchos más trabajos que estudian únicamente la cinética de la reoxidación de GOx (particularmente cuando se reportan nuevos mediadores).

Para un mismo mediador redox (ferrocenomonocarboxílico) la dispersión de datos de  $k$  no resulta tan marcada, tres grupos obtienen datos relativamente concordantes, mientras que un cuarto grupo obtiene un valor algo menor.

Recordemos que las ecuaciones diferenciales que describen el sistema acoplado de cinética enzimática de tipo ping-pong acoplado a un modelo donde todas las especies son libres de difundir en solución son altamente no lineales. Al no tener solución analítica, se puede proceder a resolver algunos casos límites (Bourdillon *y col.*, Bartlett *y col.*, Battaglini *y col.*) o a resolverlas por métodos numéricos (Yokoyama *y col.*).

De los trabajos citados en la tabla 3.6, solamente Yokoyama *y col.* tienen en cuenta el agotamiento de la concentración de sustrato en las cercanías del electrodo.

En cuanto a las ecuaciones aproximadas del modelo de Albery *y col.* utilizado tanto en este trabajo como en [24, 27] son válidas únicamente dentro de determinados límites impuestos por concentraciones, constantes cinéticas y coeficientes de difusión.

No analizaremos aquí en particular el modelo utilizado en [25, 43, 177], sin embargo, las fórmulas aproximadas allí utilizadas son muy similares a las de Albery *y col.* (ver introducción y nuestro trabajo próximo a publicarse [191]).

### 3.5.2 ¿Contra qué valores comparamos?

No cabe duda que existe una gran cantidad de datos cinéticos distintos reportados. La pregunta es si esta dispersión se debe a errores sistemáticos de medición, a modelos que desestiman procesos importantes o, a que efectivamente las constantes cinéticas  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$  se modifican al cambiar el mediador redox.

De la figura 3.17 se desprende que los valores de  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$  para  $O_2$  son ambos mayores a los nuestros (68mM vs. 11mM y  $900s^{-1}$  vs.  $254s^{-1}$ ). Al comparar con otros mediadores artificiales, observamos que nuestras constantes caen ambas dentro de los intervalos de valores previamente reportados. El cociente  $k_{cat}/K_{MS}$  es ligeramente mayor para nuestro análisis que para otros autores. Por otro lado,  $k$  también está dentro del rango de valores reportado para otros mediadores (aunque acá es más esperable hallar variaciones).

Como vimos en 3.2.1, se debería trabajar idealmente a concentraciones de mediador redox más altas que las utilizadas por nosotros o por otros grupos, para asegurarse

realmente estar dentro del caso límite VI, y no demasiado cerca de la frontera con el caso I. Lamentablemente, esto no resulta posible, dado que tanto nuestro complejo de Os, como ferroceno o sus derivados, son poco solubles en soluciones acuosas. Conforme aumentamos la concentración de sustrato, a concentración de mediador fija, nos acercamos cada vez más a la frontera con el caso límite I, es decir cinética limitada por la reacción enzima-mediador. Si la velocidad de este proceso se vuelve comparable a la de la reacción enzima-sustrato, la fórmula del caso aproximado pierde exactitud, y es de esperar que se obtengan corrientes más bajas que lo esperado, si el proceso estuviera solamente controlado por la cinética enzima-sustrato. De hecho, en los experimentos realizados a distintas concentraciones de mediador, se obtuvo un valor de  $k_{cat}$  ligeramente mayor para los ensayos más concentrados en mediador (300 vs. 233  $s^{-1}$ , ver tabla 3.3).

El valor de  $K_{MS}$  también dependerá del valor de corriente máxima alcanzada, con lo cual si no alcanzamos el máximo verdadero, también  $K_{MS}$  será más baja de lo esperado.

Los efectos de inactivación enzimática también apuntan en la misma dirección, si la enzima se inactiva, se alcanzará una corriente de *plateau* menor, *i.e.* menor  $k_{cat}$  y menor  $K_{MS}$ .

El hecho de que nuestro mediador soluble sea una especie cargada positivamente, podría producir asociación entre el mismo y una molécula de GOx (negativamente cargada al pH de trabajo) y esto podría tener relevancia, tanto en la obtención de constantes cinéticas más bajas que para otros mediadores, como en la inactivación enzimática. Yokoyama *y col.* [28] utilizan la hipótesis de la carga positiva sobre (ferrocenometil)trimetilamonio, para explicar resultados más bajos con el mismo que con ferroceno metanol y ferrocenodimetanol en exactamente las mismas condiciones de trabajo. Argumentan que podría existir cierto grado de asociación entre el mediador cargado positivamente y la enzima de carga opuesta.

¿Tienen entonces sentido las constantes acá reportadas? Sin duda, explican bien los datos experimentales mostrados. Creemos haber demostrado que no hay acuerdo acerca de cuáles serían los valores o intervalos de valores *correctos* o *esperables* en el caso de mediadores artificiales. Creemos que la combinación de simulaciones numéricas con fórmulas analíticas aproximadas parece ser un enfoque adecuado que promete la extracción de buenos resultados. Ambos métodos se complementan bien como se discutió en el capítulo 1.



El sistema homogéneo resulta más sencillo de modelar que cualquier sistema de enzimas inmovilizadas (multicapas, monocapas, etc.). Sin embargo sigue tratándose de un sistema complejo, donde evidentemente hay muchos factores en juego que han llevado a tantos autores a obtener la dispersión de datos mostrada.

### **3.6 Consideraciones finales acerca de la inactivación enzimática**

Resultó muy llamativo para nosotros encontrarnos en el presente capítulo con indicios de inactivación enzimática. Existen numerosos trabajos en la literatura con el sistema  $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os [10, 94, 155-157], análogo inmovilizado del sistema homogéneo en estudio. En ninguno de ellos se reportan problemas de inactivación. Evidentemente, en las escalas temporales consideradas (menores a las dos horas), la inactivación enzimática en exceso de glucosa solo es perceptible para el sistema homogéneo.

Bourdillon *y col.* [43] también encuentran que la enzima es mucho más estable en películas de enzimas inmovilizadas por reacción antígeno-anticuerpo que en solución (por un factor aproximado de 20). Los autores atribuyen este hecho a que la enzima inmovilizada se encuentra en un entorno donde la concentración enzimática es muy alta (190mg/ml), es decir cada molécula de enzima se encuentra rodeada de otras enzimas, en comparación al sistema homogéneo donde la distancia entre dos enzimas es mucho mayor.

## Apéndices al Capítulo 3

### A.3.1 Decaimiento de la actividad enzimática en el sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx/ferrocenometanol

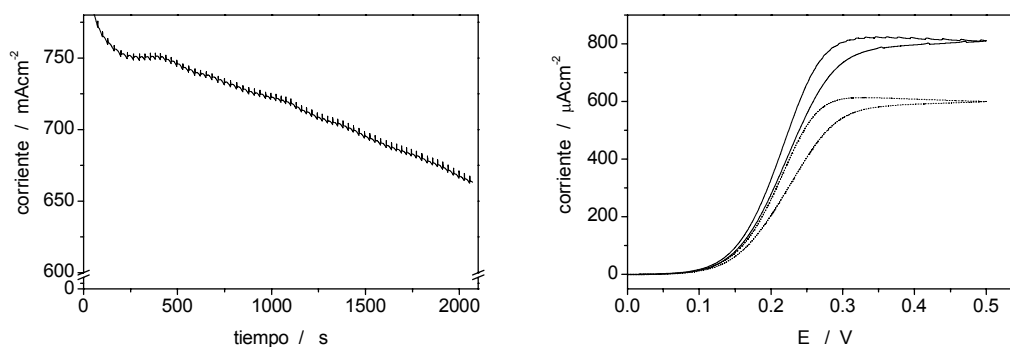


Figura A.3.1: a) Cronoamperometría durante 40 minutos.  $[\text{ferrocenometanol}]_{\Sigma} = 4.7\text{mM}$ ,  $[\text{E}] = 1.5\mu\text{M}$ ,  $[\text{S}]_{\infty} = 73\text{mM}$  b) Mismas condiciones que a), dos voltametrías cíclicas sucesivas separadas por un lapso de tiempo de 1 hora.

### A.3.2 Curva de calibración para el sistema

#### $\beta$ -D-glucosa/GOx// $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{CIPyCOOH}]^+$ y enzima de otro origen

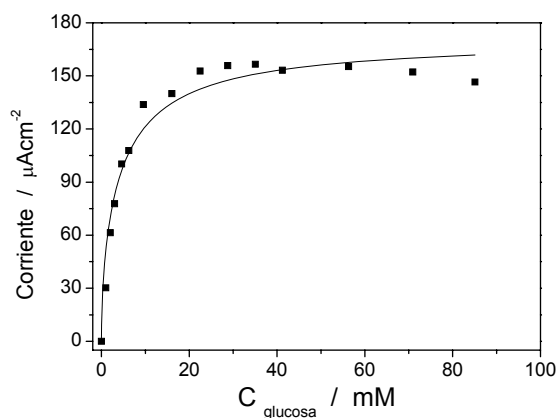


Figura A.3.2: Curva de calibración para condiciones experimentales de Caso VI con una enzima de distinto origen (Medisense<sup>®</sup>, UK) al resto de los experimentos de toda esta tesis.  $[\text{Os}_{\Sigma}] = 1.02\text{mM}$ ,  $[\text{E}] = 1.8\mu\text{M}$ . La línea muestra el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (3.1)

## Capítulo 4.

### Dependencia del “cableado molecular” con la estructura

#### 4.1 Introducción

Para biosensores amperométricos donde la enzima y el mediador redox se encuentran conjuntamente inmovilizados en una película sobre la superficie del electrodo, la estructura de esta película juega un rol fundamental en la electrocatálisis enzimática.

Lo que determinará en primera instancia la estructura de la película será el modo de inmovilización elegido [10, 43, 119, 122, 124, 135, 141, 192-196]. Esto generará estructuras de mayor o menor orden, flexibilidad y *mezclado* de los componentes que formen la película de reconocimiento.

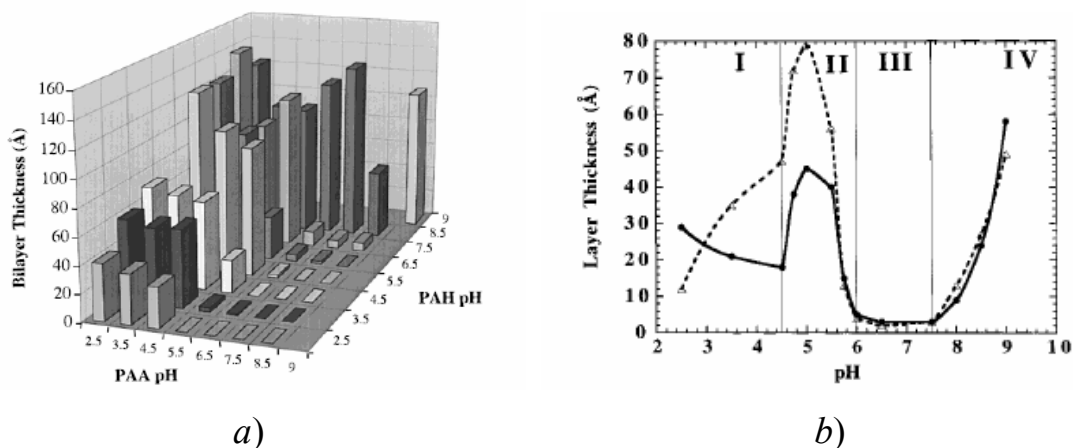
Al trabajar con un único método de inmovilización, en nuestro caso autoensamblado electrostático capa-por-capas, también es posible controlar y cambiar la estructura de la película y conservar los mismos ladrillos de construcción. Para el sistema PAH-Os/GOx existen varios estudios que reportan variaciones estructurales y en la electrocatálisis. Por ejemplo, una forma sencilla de modificar la estructura, es la adsorción de GOx sobre PAH-Os o sobre un alcanotiol corto y cargado (2, 2'-diaminoetildisulfuro) [10]. En el primer caso, se ven agregados bidimensionales de enzima, mientras que en el segundo se observan moléculas individuales de GOx formando aproximadamente una monocapa (experimentos de AFM y QCM). Por otro lado, diferentes estructuras en monocapa de GOx adsorbida sobre PAH-Os, PAH y cisteamina y cableada siempre por PAH-Os mostraron que la constante de reoxidación bimolecular de GOx por Os se mantiene casi sin variaciones, pero que la proporción de enzimas cableadas depende fuertemente de la relación de concentraciones de Os a GOx en las multicapas [156].

Vimos en el capítulo 1 que el proceso de autoensamblado electrostático capa-por-capas era posible merced a que se producía sobrecompensación de carga, llevando a que se revierta la carga superficial después de cada paso de adsorción [197].

Shiratori y Rubner [146, 147, 198] han reportado un detallado estudio del rol que juega el pH de las soluciones a partir de las cuales se adsorben polielectrolitos débiles en el proceso de autoensamblado electrostático capa-por-capas. Estos autores encontraron

diferencias enormes en el modo en que se adsorbían los polímeros PAH y PAA (polialilacrílico) al variar el pH, incluyendo cambios en el espesor de cada capa adsorbida, que puede variar entre 80 y 4Å.

Las figuras 4.1 *a)* y *b)* son un resumen de los resultados de Shiratori y Rubner.



**Figura 4.1:** *a)* Matriz que muestra el incremento promedio en espesor por cada bicapa de PAH/PAA como función del pH de la solución de autoensamblado (se varía el pH de ambas soluciones). *b)* Incremento de espesor promedio para una capa de PAA (línea sólida) y PAH (línea punteada) como función del pH de la solución de autoensamblado, (ambas soluciones se encontraban a igual pH). Figuras extraídas de [146]

La figura 4.1.a muestra el espesor promedio de una bicapa (PAH/PAA) en función del pH de adsorción (el pH de las soluciones de ambos polielectrolitos). En una primera inspección se observan los dramáticos cambios de espesor que pueden conseguirse con solo variar el pH de las soluciones (sin agregado extra de sales).

La figura 4.1.b representa el incremento en espesor para cada paso individual de adsorción (capa, no bicapa) en función del pH. En particular estos datos corresponden a la diagonal de la matriz de la figura 4.1.a, es decir, autoensamblar PAA y PAH a igual pH.

Shiratori y Rubner llegan a la conclusión de que el pH controla tanto la densidad de carga lineal del polímero que se está adsorbiendo, como la densidad de carga sobre la capa previamente adsorbida. Esto ocurre porque el grado de ionización de PAA y de PAH, dependen del pH.

Se encontró además que el estado conformacional de la capa previamente adsorbida también influye fuertemente en el espesor y la conformación de la capa que se está pegando.

Finalmente, estos autores hablan de un  $pK_a$  efectivo variable en las multicapas con respecto a la misma especie libre en solución para los grupos ácidos de los

polielectrolitos débiles (en aproximadamente una unidad). Esto se explica por una desprotonación/protonación parcial antes del pH previsto para tratar de neutralizar la carga que se encuentra sobre la superficie.

Un análisis más detallado de la figura 4.1, ejemplifica las conclusiones anteriores. Por ejemplo, en la figura 4.1.b, en la región señalada con III, ambos polielectrolitos se encuentran como especies totalmente cargadas y en consecuencia ambos se adsorben planos, en cadenas bien estiradas sin ovillarse. Este comportamiento es análogo al observado cuando se adsorben dos polielectrolitos completamente cargados (fuertes) [199], como ser el caso de las especies de tipo vinílico.

En la región marcada como I, un aumento de la carga de la capa adsorbida de PAA (al subir el pH) provoca aumento en espesor de la capa PAH (se necesita más carga positiva para neutralizar la carga negativa creciente sobre la PAA ya adsorbida). Por el contrario, en la misma región, el espesor de las capas de PAA disminuye debido a un aumento de su densidad de carga lineal, lo que provoca una disminución en la proporción de segmentos ovillados y colas.

En la región II, cuando el pH se baja más allá de 6, el espesor de ambas capas aumenta abruptamente en un intervalo aproximado de 0.5 unidades de pH. En este intervalo, las cadenas de PAH están completamente ionizadas, mientras que las de PAA están casi completamente ionizadas. El marcado aumento de espesor se estaría produciendo cuando un polielectrolito completamente cargado, se adsorbe sobre otro casi completamente cargado. De forma similar, en la región IV, se observa una transición similar a la observada en la región II. Acá las cadenas de PAA están siempre adsorbidas como especies totalmente ionizadas, mientras que las cadenas de PAH comienzan a desprotonarse.

Vemos entonces que las transiciones hacia espesores grandes ocurren cuando una de las especies comienza a perder carga. Y esto ocurre independientemente de que pierda carga la especie aniónica o la catiónica.

Las transiciones entre las cuatro regiones pueden explicarse desde un modelo termodinámico [200, 201]. Para un valor de densidad de carga superficial crítico, el costo entrópico por estirar una cadena polimérica para llevarla a una conformación plana (capa delgada) es inferior a la ganancia en entalpía por la energía de adsorción. Sin embargo, cuando la densidad de carga disminuye más allá de este punto, la ganancia en entalpía ya no es suficiente para superar la pérdida de entropía, y ocurre la abrupta transición hacia capas gruesas.

Los estudios de Rubner *y col.* [146, 147, 198, 200-202], se limitan a cadenas poliméricas lineales (no ramificadas).

A lo largo de los capítulos 4 y 5 de esta tesis, los ladrillos de construcción de las estructuras autoensambladas son el polímero PAH-Os y la enzima Glucosa Oxidasa.

PAH-Os no difiere estructuralmente en forma significativa de PAH. El complejo de Os posee una carga positiva (en estado reducido) y el grado de sustitución de PAH por complejos de Os es ligeramente inferior a 1 cada 10 unidades de monómero. Entonces si queremos tener una idea aproximada de cómo se modifica la carga de PAH-Os en función del pH, podemos tomar como aproximación la figura 4.2 para PAH. Ahí se muestra la variación en el grado de ionización de los grupos amino en función del pH de la solución de PAH.

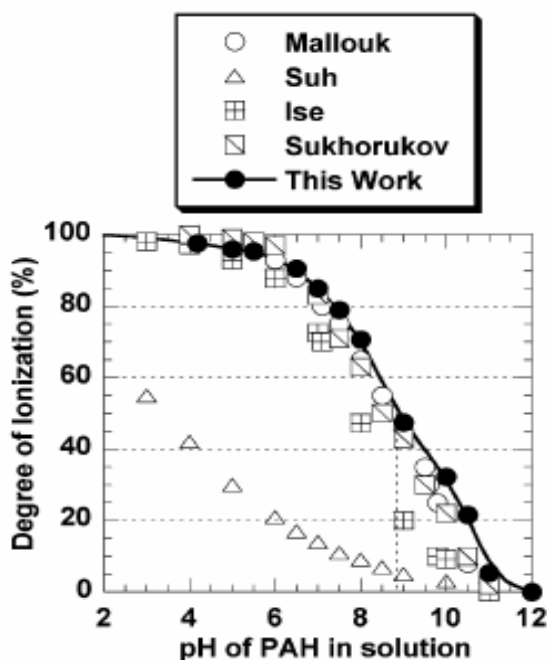


Figura 4.2: Grado de ionización estimado para PAH en función del pH. La línea vertical a  $\text{pH} \approx 8.8$  indica el pH al cual el 50 % de las unidades de PAH están cargadas. Figura extraída de referencia [198], datos de los autores y de las referencias ahí citadas. Los datos mostrados como *this work*, fueron calculados a partir de bandas de adsorción de IR en películas adsorbidas en monocapa de PAH. Los otros datos que se usan para comparar fueron calculados a partir de técnicas convencionales para polímeros en solución.

Podemos observar que entre pH aproximadamente 6 y 11 se produce un cambio en el grado de ionización de PAH desde totalmente ionizada hasta casi neutra.

Dijimos en el capítulo 1 que GOx es una enzima globular de dimensiones 7.0nm x 5.5nm x 8.0nm [3]. Cuando se encuentra en solución, el pH de la misma, afectará su actividad catalítica, su estabilidad y su carga. Sin embargo, dentro de los intervalos de

pH de trabajo, no se verá afectada su geometría o su conformación en forma apreciable. Dicho de otra forma, los grandes cambios conformacionales que se observan para un polímero lineal, como PAH, que cambia su conformación de cadenas lineales a ovillos en unas pocas unidades de pH no se observan para GOx.

La figura 4.3 muestra la carga total de una molécula de enzima en función del pH de la solución en que se encuentra disuelta [203]. Podemos ver que a partir de pH=4.05, su punto isoeléctrico, la enzima está cargada negativamente (se trata de una enzima ácida), cuya carga aumentará casi monótonamente con el pH.

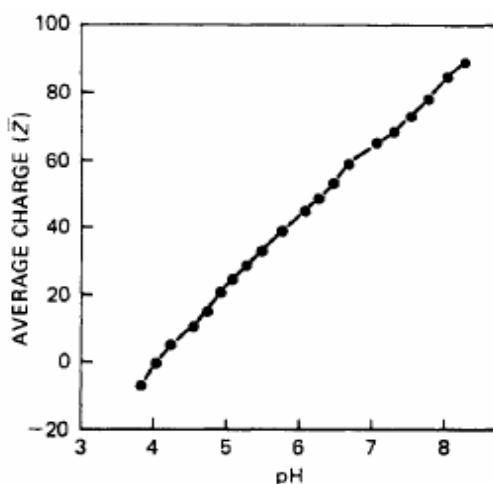


Figura 4.3: Carga promedio de la glucosa oxidasa, como función del pH, asumiendo un punto isoeléctrico de 4.05. Figura extraída de referencia [203].

## 4.2 Desarrollo Experimental

Hemos resumido en el capítulo 1 y en la introducción de este capítulo los reportes que se encuentran en la bibliografía acerca de las muchas variables que pueden moverse para cambiar la estructura de un autoensamblado manteniendo los mismos ladrillos de construcción (las mismas macromoléculas).

Para estudiar el efecto particular del pH de la solución de polielectrolito sobre la estructura y función del autoensamblado, se decidió mantener todas las demás variables constantes, a saber:

- pH y fuerza iónica de las soluciones de GOx
- número de bicapas autoensambladas
- concentración y fuerza iónica constante de las soluciones de PAH-Os

Se estudiaron en todos los casos electrodos autoensamblados capa-por-capas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>3</sub> (salvo una excepción claramente señalada). Se eligió este número de bicapas para tener un número de capas suficiente como para independizarnos del

efecto del electrodo de Au por un lado, pero manteniendo películas lo suficientemente delgadas como para poder independizarnos de los efectos difusionales dentro de las mismas.

Se utilizaron las siguientes técnicas experimentales:

- elipsometría, para estudiar el espesor de las películas;
- microbalanza de cristal de cuarzo, para estudiar la cantidad total de enzima adsorbida;
- microscopía y espectroscopía de fuerza atómica, para estudiar la morfología de las películas y sus propiedades elásticas y mecánicas;
- voltametría cíclica, para estudiar la respuesta de la cupla redox en las distintas estructuras;
- voltametría cíclica, para estudiar la electrocatálisis.

Para las dos primeras técnicas, se estudió el crecimiento de las películas, paso a paso, dado que se realizaron mediciones individuales para cada paso de adsorción.

En el presente capítulo, siempre que se mencione el término pH será en relación al pH de la solución de PAH-Os a partir de la cual se forma el autoensamblado. Muchas veces por simplicidad nos referiremos simplemente al pH, cuando en realidad la frase precisa sería “pH de la solución de PAH-Os usada durante el autoensamblado”; (ej: película formada a pH alto, pegado de GOx a alto pH, etc.). Todas las mediciones realizadas en solución se llevaron a cabo a pH constante (AFM, espectroscopía de fuerza y elipsometría bajo agua; QCM y electroquímica en buffer TRIS pH = 7.2). La enzima siempre se disolvió en agua y el MPS siempre en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10mM.

#### **4.2.1 Elipsometría**

La figura 4.4 muestra el incremento del espesor elipsométrico para cada paso de adsorción para películas autoensambladas capa-por-capas, a partir de soluciones de PAH-Os de pH variable. Cada curva corresponde a un pH fijo de solución de PAH-Os, que se indica a la derecha de la misma.

La elipsometría muestra un crecimiento regular del espesor de la película con el número de capas autoensambladas, para todas las soluciones de trabajo.

Se observa que para las multicapas autoensambladas a partir de las soluciones de menor pH (hasta pH=7.50 inclusive), la contribución mayoritaria al incremento del espesor proviene de la adsorción de la enzima. El incremento del espesor producto de la adsorción del polímero es casi despreciable. La figura 4.4.b muestra a mayor escala este



fenómeno para la película más delgada. Por el contrario, para las dos películas formadas a mayor pH de PAH-Os, tanto el polímero como la enzima contribuyen al crecimiento en espesor de las películas.

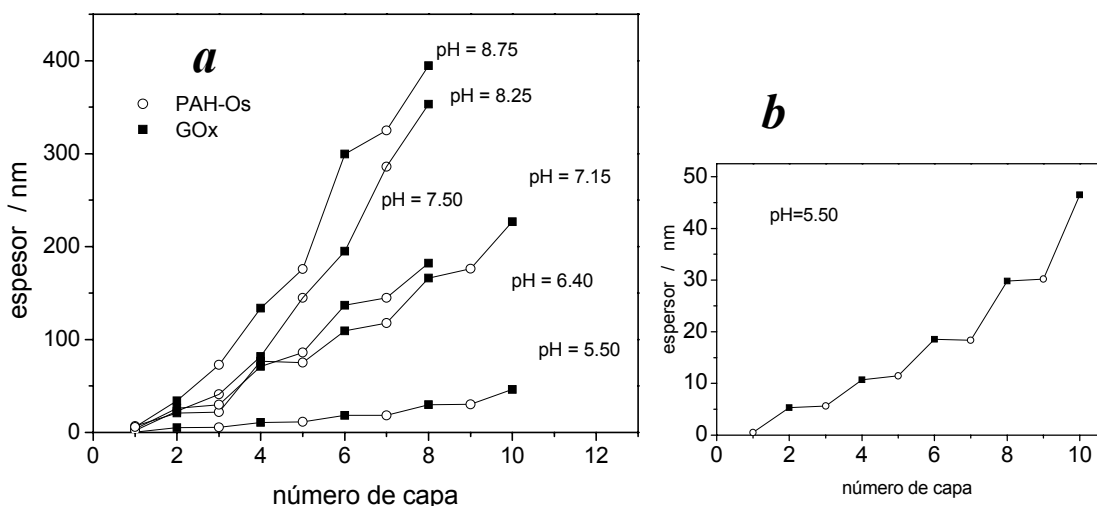
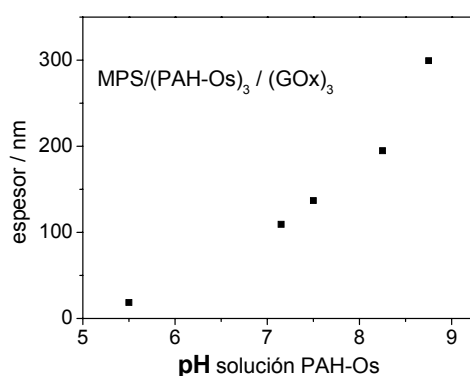


Figura 4.4: a) Espesor elipsométrico en función del número de capa autoensamblada para MPS/(PAH-Os)<sub>n</sub>/(GOx)<sub>m</sub> para soluciones de PAH-Os de distinto pH (el pH de cada solución se muestra al costado de cada curva experimental). b) Ampliación de escala para los datos a pH=5.50

Sabemos que a partir de pH 7, la poli(alilamina) tiene menor carga positiva, producto de la desprotonación al aumentar el pH [198, 204], o dicho de otro modo, tiene menor densidad de carga positiva o menor cantidad de carga por unidad de longitud. Esto provoca que se forme una capa gruesa, con una alta proporción de ovillos (ver luego los resultados de AFM), dado que se necesitan adsorber más segmentos poliméricos para compensar y revertir la carga superficial negativa de la enzima. Esto también provocará que la superficie resultante sea más rugosa, con más colas poliméricas expuestas hacia la solución, ofreciendo más sitios para el paso posterior de adsorción de enzima.

La figura 4.5 muestra el espesor total para un número de pasos de adsorción fijos (3 bicapas) en función del pH de la solución de PAH-Os. Se observa que a menor pH de la solución de polication, más delgada resulta la película formada para igual número de pasos de adsorción.



**Figura 4.5:** Espesor elipsométrico en función del pH de la solución de adsorción de PAH-Os. Todas las películas tienen igual número de bicapas: MPS/(PAH-Os)<sub>3</sub>/(GOx)<sub>3</sub>.

#### 4.2.2 Microbalanza de cristal de cuarzo

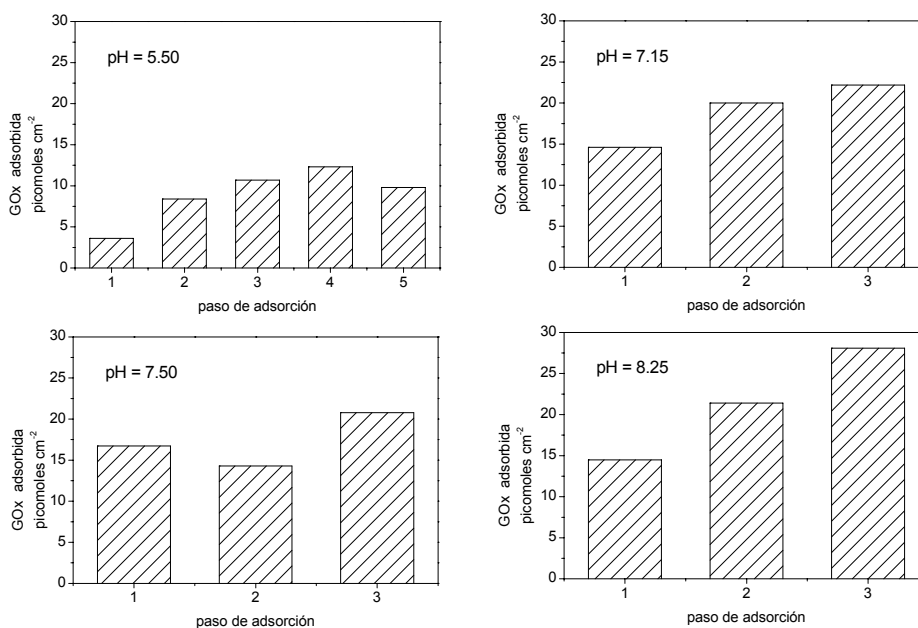
La adsorción en el tiempo de GOx fue seguida por microbalanza de cristal de cuarzo. Para adsorción de GOx sobre PAH-Os adsorbida en el paso previo a distintos pH, las curvas de adsorción en función del tiempo siguen siempre el mismo perfil. En todos los casos, esta forma coincide con reportes previos de adsorción de GOx sobre PAH-Os a bajo pH [10]. En el circuito eléctrico equivalente de Butterworth-Van Dyke, que representa al resonador de cuarzo cargado con la película de enzima y polielectrolito, la variación del parámetro resistivo  $\Delta R$ , resultó en todos los casos mucho más baja que la componente de la impedancia inductiva del cuarzo,  $\Delta X_L$ . Dado lo cual, las películas crecidas entre pH 5.50 y 8.75 se comportan acústicamente como películas delgadas en el régimen gravimétrico y el incremento de masa pudo calcularse a partir de la ecuación de Sauerbrey [165].

Los transitorios de QCM también muestran que no existe desorción de la enzima, ni durante los lavados, ni durante la adsorción posterior del polímero por interacción con el mismo, en concordancia también con datos previamente reportados a bajo pH [165].

En la figura 4.6 se muestran cuatro gráficos de barras representativos de cantidad de GOx adsorbida en cada paso de adsorción. El pH señalado en cada panel se corresponde con el pH de la solución de PAH-Os usada en los pasos de adsorción de polímero.

Como ya se había reportado anteriormente a bajo pH [10, 155], la cantidad de enzima adsorbida crece durante los tres primeros pasos de autoensamblado, para luego estabilizarse y mantenerse. Para pH=5.50 se muestran esta tendencia durante los cinco primeros pasos; mientras que para los otros casos, se muestran solo los tres primeros.

Mirando el mismo paso de adsorción, a distinto pH de adsorción de PAH-Os, vemos que la cantidad de enzima adsorbida crece con el pH. Si comparamos, por ejemplo la capa 3, a pH 5.50 y 8.25, vemos que la cantidad de enzima adsorbida crece casi al triple. A pHs intermedios se alcanzan adsorciones intermedias, donde no se observan apreciables diferencias en el escaso intervalo donde se varió el pH.



**Figura 4.6:** Gráficos de la masa de enzima adsorbida en estado estacionario después de adsorber PAH-Os a partir de soluciones de distinto pH (el pH de PAH-Os se muestra en cada panel).

Estas diferencias en masa, no parecen ser suficientes como para explicar el mucho mayor crecimiento en espesor que se observa por elipsometría. Por ejemplo, analicemos el caso para tres bicapas (MPS/PAH-Os/GOx)<sub>3</sub>. Mientras la masa de enzima medida por QCM se multiplica por tres, el espesor elipsométrico aumenta 10 veces (mirando el mismo ejemplo, pH 5.50 vs. 8.25). Sin embargo, al observar el perfil del crecimiento del espesor capa-por-capa, estos aumentos son coherentes. Vemos que en la curva de pH 8.25 aportan al espesor tanto los agregados de enzima como de polímero, como comentábamos más arriba; mientras que a pH 5.50, sólo lo hace la enzima.

#### 4.2.3. Microscopía de fuerza atómica

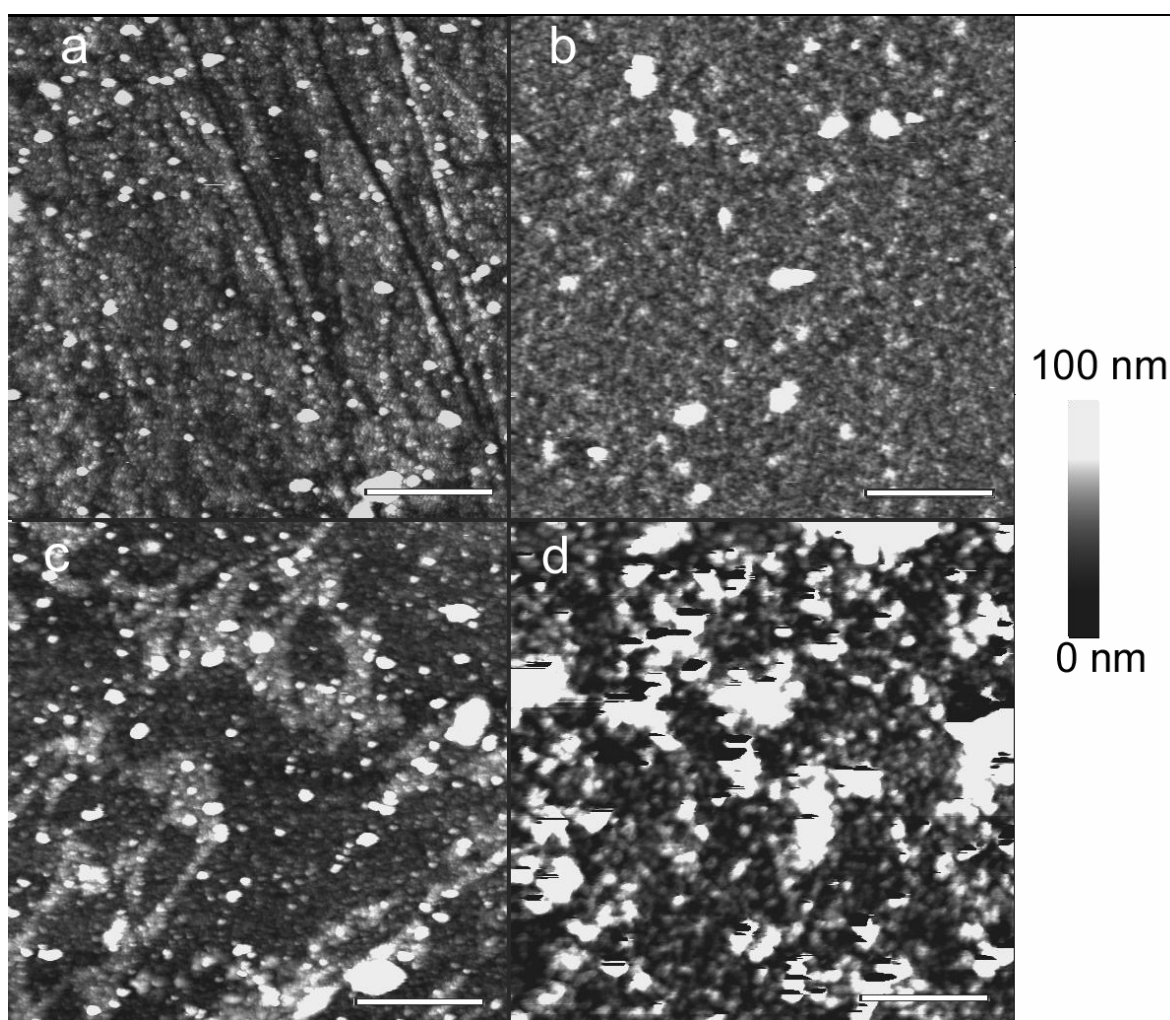
La superficie de las películas autoensambladas fue estudiada por microscopía de fuerza atómica (AFM).

Como se comentó en el capítulo 2, se eligió trabajar con AFM en modo de contacto intermitente para minimizar los daños a la película que podría provocar la punta del cantilever por arrastre o fricción en el caso de trabajar en modo contacto.

Se analizaron las siguientes muestras:

- |  |                            |
|--|----------------------------|
| a) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> PAH-Os | solución PAH-Os, pH = 5.50 |
| b) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> PAH-Os | solución PAH-Os, pH = 8.25 |
| c) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub>        | solución PAH-Os, pH = 5.50 |
| d) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub>        | solución PAH-Os, pH = 8.25 |

La figura 4.7 muestra las imágenes de AFM de estas muestras para un área de barrido de 10µm x 10µm en cada caso.



**Figura 4.7:** Imágenes de AFM en modo contacto intermitente. Imágenes bajo agua, todas las imágenes corresponden a áreas de barrido de 10µm x 10µm. La barra de escala en cada panel corresponde a 2 µm.

- |  |                            |
|--|----------------------------|
| a) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> PAH-Os | solución PAH-Os, pH = 5.50 |
| b) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> PAH-Os | solución PAH-Os, pH = 8.25 |
| c) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub>        | solución PAH-Os, pH = 5.50 |
| d) MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub>        | solución PAH-Os, pH = 8.25 |

La elección de estas muestras pretende, en primer lugar, seleccionar dos pHs distintos donde ya hemos visto por elipsometría y QCM que se forman películas de características bien distinguibles. En segundo lugar, deseábamos analizar las diferencias al terminar la película autoensamblando en el último paso GOx o polímero.

Las películas autoensambladas a partir de soluciones de PAH-Os de mayor pH muestran una mayor rugosidad que aquellas formadas a bajo pH; lo cual es consistente con los datos de elipsometría y QCM.

La morfología de las películas se asemeja a la reportada por Caruso *y col.* [205] para inmunoglobulina-poli(alilamina) y poli(vinilsulfonato) y por Oliveira *y col.* [206] para poli(o-metoxianilina) y poli(vinilsulfonato).

La rugosidad puede evaluarse cuantitativamente mediante el cálculo de Rms (ecuación (2.7)). Estos valores se muestran en la tabla 4.1.

película	Rms
MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> PAH-Os (PAH-Os, pH = 5.50)	6
MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> PAH-Os (PAH-Os, pH = 8.25)	21
MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> (PAH-Os, pH = 5.50)	22
MPS/(PAH-Os) <sub>3</sub> (GOx) <sub>3</sub> (PAH-Os, pH = 8.25)	41

**Tabla 4.1:** Valores de Rms sobre áreas analizadas de 10µm x 10µm para distintas estrategias de autoensamblado.

Es esperable que la adsorción de polímeros ovillados (baja densidad de carga) dé como resultado películas más rugosas, donde el área superficial será mayor, con mayor posibilidad de sitios de unión PAH-Os/GOx. La mayor corrugación resultará en mayor carga redox de Os y mayor adsorción de enzima.

Las imágenes y los valores de Rms muestran por otro lado, que las películas terminadas en GOx son más rugosas que las terminadas en polímero, a ambos pHs de trabajo. De las imágenes mostradas también se desprende que GOx tiende a formar agregados de varias enzimas (ver los puntos de mayor relieve en las figuras 4.7 c y d).

#### 4.2.4 Espectroscopía de fuerza atómica

Para analizar las propiedades elásticas y mecánicas se decidió estudiar las películas por espectroscopía de fuerza atómica. Al igual que en el caso de AFM se trabajó a dos pHs

de autoensamblado donde el polímero mostrara claras diferencias en el modo de pegarse. Se trabajó en este caso también a pH 5.50 y 8.25.

Las curvas de deflexión en función de la altura fueron tomadas en modo contacto, es decir, en este caso el cantilever no vibraba mientras se acercaba a la muestra.

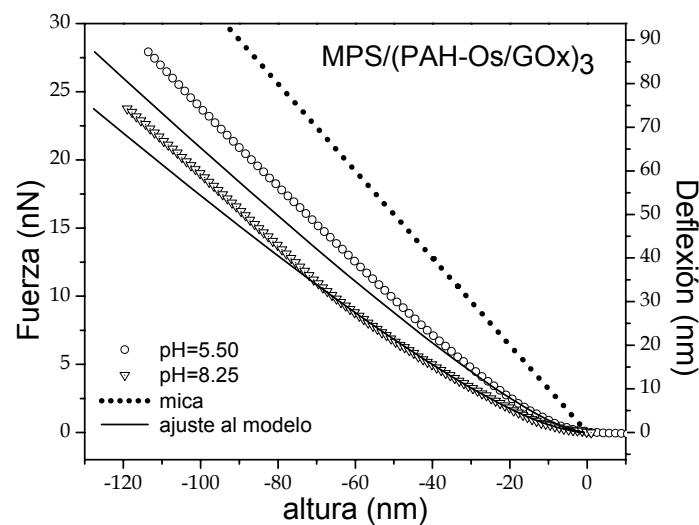
Uno de los modelos más usados y más sencillos para estudiar propiedades elásticas mediante espectroscopía de fuerza atómica es el modelo de Sneddon [207, 208], que es una extensión de los estudios de Hertz [209]. El modelo se corresponde con una indentación ( $\delta$ ) elástica producida por una punta rígida (en nuestro caso particular de geometría cónica) en una muestra blanda semi-infinita. Cabe aclarar que si la muestra es muy delgada, la deflexión del cantilever se ve influenciada por el sustrato, lo que restringe la validez del modelo.

El modelo nos permite relacionar la distancia punta-muestra ( $z$ ), con la deflexión del sensor de fuerza ( $d$ ) según la ecuación (4.1) (ver apéndice A.4.1).

$$z - z_0 = d - d_0 + \sqrt{\frac{k_c (d - d_0) \pi (1 - \nu^2)}{2E_y \tan(\alpha)}} \quad (4.1)$$

De un ajuste no lineal de la curva experimental de fuerza en función de altura al modelo de Sneddon pueden obtenerse los parámetros  $z_0$ , conocido como punto de contacto, y  $E_y$ , módulo de Young, que es una medida de la elasticidad de la muestra.

La figura 4.8 muestra las curvas de fuerza en función de la altura para dos películas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>3</sub> autoensambladas a distinto pH.



**Figura 4.8:** Curvas de fuerza en función de altura para dos películas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>3</sub> autoensambladas a distinto pH. Se observa también el intento de ajuste al modelo de Sneddon y la curva para una muestra rígida (mica).

Como vimos en el capítulo 2, por altura se entiende el movimiento del scanner piezoeléctrico que mueve la muestra verticalmente en dirección a la punta. Una de las principales fuentes de error cuando se quiere ajustar una curva experimental al modelo de Sneddon es la elección de  $z = 0$ , es decir, el momento en el cual se considera que la punta ha hecho contacto con la muestra. Como se ve en la figura, no es fácil establecer en qué momento la deflexión del cantilever deja de ser nula y comienza a indentar la muestra. En el presente trabajo, se realizó primero un ajuste al modelo de Sneddon, se obtuvo  $z_0$  a partir del ajuste, y luego se restó este valor de  $z_0$  a los datos que se presentan [208].

En el eje vertical se grafica tanto fuerza como deflexión del cantilever. Estas dos magnitudes son directamente proporcionales, siendo  $k_c$ , la constante de fuerza del cantilever informada por el fabricante, la constante de proporcionalidad.

Se asume que cuando la deflexión en función de la altura alcanza una dependencia lineal de pendiente unitaria, la punta ha indentado o atravesado la totalidad de la muestra blanda y ha entrado en contacto con el sustrato rígido sobre el cual se apoya la muestra blanda. Al no poder indentar este sustrato, la respuesta es igual a la de una superficie rígida.

Podemos observar en la figura 4.8 que las curvas de deflexión en función de la distancia (particularmente la de pH=5.50) se vuelven paralelas a la curva de la mica (sustrato rígido) muy rápidamente. El ajuste de los datos experimentales al modelo es muy pobre, por lo cual se decidió repetir el experimento para muestras de mayor espesor.

Se prepararon dos nuevas muestras de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>9</sub> autoensambladas a pH 5.50 y 8.25 respectivamente.

La figura 4.9 muestra las curvas de fuerza en función de la altura para multicapas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>9</sub>.

Se observa que en este caso donde la película blanda es mucho más gruesa que en el caso de las 3 bicapas, la zona de la respuesta no lineal (*forma de panza*, en la jerga) es mucho más amplia. El ajuste al modelo es excelente en el caso de la película autoensamblada a pH=8.25, donde todo el intervalo de puntos experimentales puede ser ajustado. En el caso de la película autoensamblada a pH=5.50, la mayor parte de la curva también puede ajustarse al modelo, a excepción del último tramo de la misma. El no ajuste en esta última parte de la curva probablemente se deba a que la punta ya entró en contacto con el sustrato rígido indeformable. Recordemos que la muestra

autoensamblada a pH=5.50 es considerablemente más delgada que la muestra de pH=8.25.

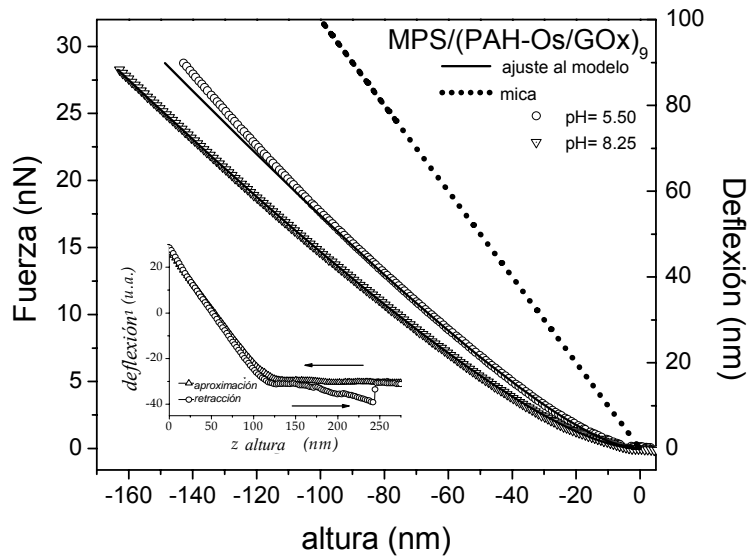


Figura 4.9: Curvas de fuerza en función de altura para dos películas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>9</sub> autoensambladas a distinto pH. Se observa también el ajuste al modelo de Sneddon y la curva para una muestra rígida (mica). En el inserto se observan las curvas de deflexión en función de altura para el acercamiento y la retracción de la punta.

En el inserto de la figura 4.9, se muestra un intervalo más amplio de datos. Se puede ver la primera parte de la curva de aproximación, donde la punta aún no ha entrado en contacto con la muestra, luego se observa la indentación, penetración de la punta en la muestra y la reversión del proceso. Al retrotraerse el scanner para alejar la punta de la muestra, la curva coincide casi exactamente con la curva de aproximación. Sin embargo, al llegar al punto de contacto, la punta no se despega automáticamente. La punta sigue adherida a la muestra, provocando que el cantilever se defleccione en la dirección opuesta. La punta permanece adherida a la muestra aún cuando el piezoeléctrico se ha retrotraído una distancia considerable, hasta que finalmente se despega abruptamente, se produce un salto en la deflexión, y la curva de retracción vuelve a superponerse con la de aproximación en el valor de deflexión constante inicial.

Tanto la figura 4.8 como la 4.9, corresponden a indentaciones sobre un único punto (x,y) de la muestra. Cada curva mostrada corresponde al promedio de 10 curvas individuales en el mismo punto. Para analizar si las propiedades mecánicas eran similares en diversos puntos (x,y) se tomaron curvas en aproximadamente 10 posiciones distintas. La forma de las curvas de deflexión vs. altura fue la misma dentro del error experimental en todos los

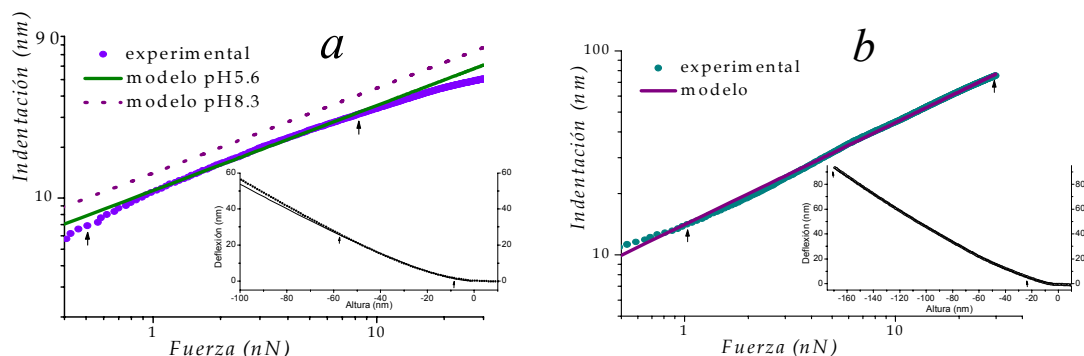


puntos. Sin embargo el ajuste al modelo de Sneddon arrojó valores distintos para el parámetro  $z_0$  (punto de contacto). Atribuimos estas diferencias a las diferentes alturas en diferentes puntos producto de la rugosidad superficial.

Nuestro interés principal en la espectroscopía de fuerza, reside en analizar las propiedades mecánicas y elasticidad de las películas y no era averiguar el espesor de la superficie (que ya se conoce por elipsometría). Suponemos que estas son propiedades que dependen de todo el espesor, no solamente de la capa superficial. Esto se ve avalado por la forma de la curva de indentación y por valores similares en el parámetro  $E_y$  en distintos puntos.

En la figura 4.9 se observa una mayor indentación (mayor diferencia entre la deflexión del cantilever y el avance del piezoeléctrico) para la muestra autoensamblada a pH=8.25. Esto se corresponde con un valor menor de módulo de Young (muestra más *blanda*).

La figura 4.10 es otra forma de presentar los datos. Se compara la indentación en función de la fuerza para las dos muestras autoensambladas a distinto pH.

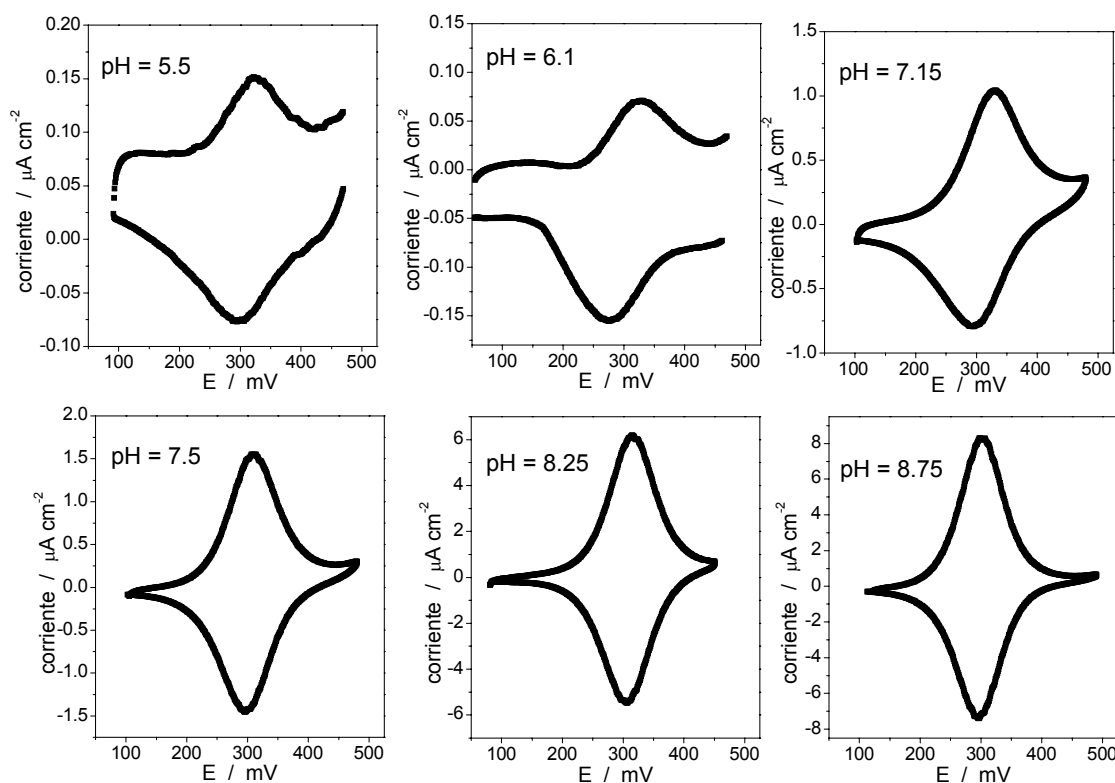


**Figura 4.10:** Gráficos de indentación en función de la fuerza y el ajuste al modelo de Sneddon con distinto  $E_y$  en cada caso. pH de autoensamblado *a*) 5.50; *b*) 8.25 El gráfico *a* compara los ajustes de *a* y *b*. En los insertos se observan los gráficos de deflexión en función de la altura, las flechas señalan el intervalo de datos usado para el ajuste del gráfico principal.

Observamos que existe un factor 2 de diferencia en el módulo de Young entre las muestras (la muestra a pH=5.50 es más *dura*). Esto es equivalente a decir que la muestra de pH=8.25 se deforma más por la presión del indentador.

#### 4.2.5 Voltametría cíclica en ausencia de sustrato enzimático

En la figura 4.11 se muestra la respuesta de los centros de Os en las multicapas en ausencia del sustrato de la enzima,  $\beta$ -D-glucosa. Se observa en todos los casos ondas reversibles de oxidación para los grupos redox confinados a una superficie.



**Figura 4.11:** Voltagramas cíclicos a  $5\text{mVs}^{-1}$  de películas de  $\text{MPS}/(\text{PAH-Os})_3(\text{GOx})_3$  preparadas a partir de soluciones de PAH-Os de distinto pH. El pH de la solución se muestra en cada voltagrama. Notar las distintas escalas en el eje y para los distintos gráficos. Los voltagramas a pH 5.5 y 6.1 han sido procesados de forma tal de restar la línea de base.

La corriente de pico anódico en función de la velocidad de barrido se muestra en la figura 4.12. En todos los casos, la respuesta es lineal y arroja una buena correlación (superior a 0.98). Esto indicaría que todos los centros redox de Os están accesibles para la oxidación-reducción electroquímica en la escala temporal del experimento para las velocidades de barrido consideradas.

La figura 4.13 muestra la corriente de pico anódico en función del espesor de la película. La corriente de pico crece con el espesor, pero este crecimiento no es lineal. Este dato es consistente con la información obtenida por la microbalanza de cristal de cuarzo y con la carga redox total adsorbida, lo cual se vuelve más evidente para espesores superiores a los 137nm.

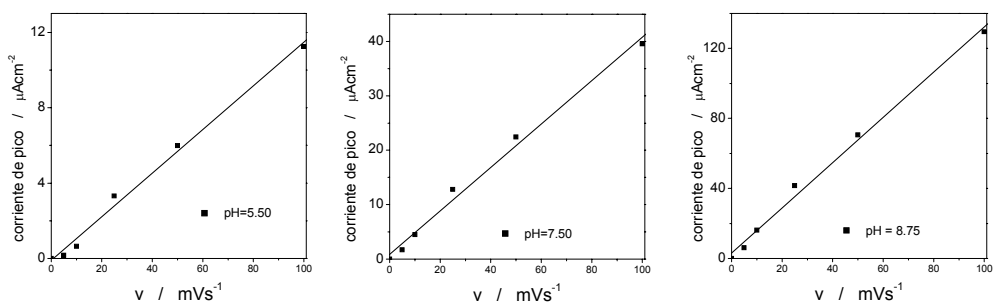


Figura 4.12: Corriente de pico anódico vs. velocidad de barrido para películas de  $\text{MPS}/(\text{PAH-Os})_3(\text{GOx})_3$  preparadas a partir de soluciones de PAH-Os de distinto pH (el pH se muestra en el gráfico). Se muestran tres casos representativos.

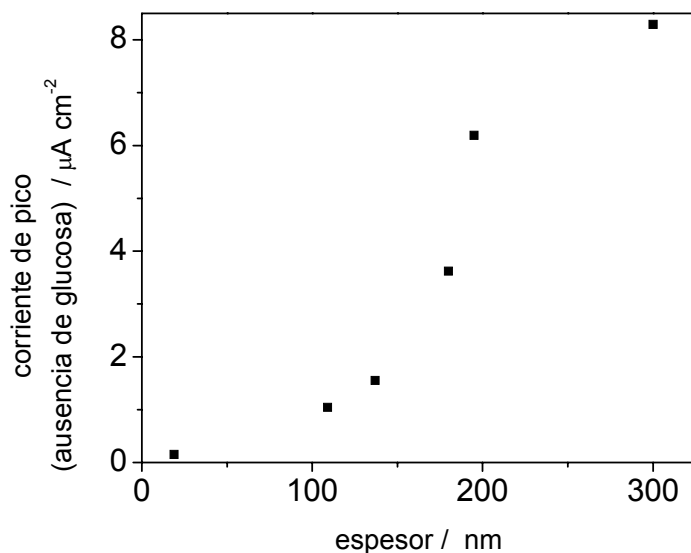


Figura 4.13: Corriente de pico en ausencia de sustrato para voltogramas cíclicos realizados  $5\text{mVs}^{-1}$  en función del espesor.

Dado que todos los sitios redox están accesibles para la oxidación-reducción, el cubrimiento superficial de Os puede obtenerse a partir de la carga total que circula durante el barrido anódico o durante el catódico a baja velocidad de barrido. Los valores obtenidos por integración del pico anódico de los voltogramas a  $5\text{mVs}^{-1}$  se muestran en la tabla 4.3. Podemos ver que para películas adsorbidas a partir de soluciones de polímero de pH creciente (películas más gruesas) se observa una mayor carga redox. Volviendo a los voltogramas cíclicos de la figura 4.11, podemos apreciar que estos se vuelven más reversibles al aumentar el pH del autoensamblado, con valores de

separación de pico anódico y catódico decrecientes al aumentar el pH y ancho de pico a media altura (FWHH) cercano a 90mV en todos los casos. Los valores numéricos se compilan en la tabla 4.2.

pH	$\Delta E$ / mV	FWHH / mV
5.50	27.6	82.0
6.10	49.8	115.0
7.15	35.5	94.0
7.50	11.7	84.3
8.25	7.5	90.6
8.75	0.7	83.7

Tabla 4.2: Parámetros característicos para voltagramas cíclicos en ausencia de sustrato a  $5\text{mVs}^{-1}$ , para películas autoensambladas a partir de soluciones de PAH-Os de distinto pH.

Estos resultados son esperables para un esqueleto polimérico flexible que permite tanto movimientos segmentarios para las cadenas como para los centros redox.

### 4.3 Estructura de las películas

En la figura 4.14 se muestra esquemáticamente la imagen que nos hemos formado hasta el momento de la morfología de las películas, producto del análisis a través de varias las distintas técnicas anteriormente descrito.

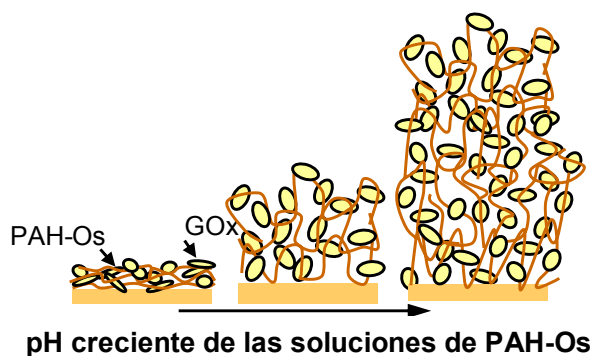


Figura 4.14: Representación esquemática de las multicapas de  $(\text{PAH-Os})_3(\text{GOx})_3$  adsorbidas a partir de soluciones de PAH-Os de diferente pH (poelectrolito con diferente densidad de carga).

No se muestran *capas* distinguibles de polímero redox y enzima. Si bien está probado que las películas crecen en espesor, en carga redox y en contenido de enzima con los pasos de adsorción [10, 155, 156]. Vimos en la introducción a este capítulo que también está demostrado que existe una importante interpenetración entre las macromoléculas

[145, 153] de distinta carga y que el esquema más adecuado es el que se muestra en la figura.

Los experimentos analizados hasta ahora muestran que para polielectrolitos débiles como PAH-Os puede conseguirse control sobre la organización molecular y la estructura de las multicapas por un simple ajuste de pH de la solución de PAH-Os que se usa para formar las multicapas. Esto controla tanto la densidad de carga lineal del polímero que se va a adsorber (y de esta forma también su morfología), así como la de la capa de GOx adsorbida en el paso previo.

En el proceso de adsorción capa-por-capa, los complejos insolubles de PAH-Os/GOx se forman sobre la superficie, como el nombre lo indica, capa-por-capa, en cada paso de autoensamblado. A bajo pH, el modelo de capas delgadas sobre la superficie es consistente con los datos de elipsometría, QCM, carga redox y AFM (imagen y espectroscopía). A pH más alto, la densidad de carga sobre PAH-Os es mucho más baja, y se necesitan *más hebras* de polímero para igualar primero y sobrecompensar luego la carga dejada por el paso previo de deposición de GOx. Podríamos decir que la relación estequiométrica PAH-Os/GOx es ahora distinta. El polímero adopta arreglos conformacionales ovillados, dejando además colas hacia la solución que se extienden hacia fuera dando lugar a películas mucho más gruesas y rugosas.

Se observaron dos regímenes distintos de crecimiento por elipsometría, confirmados por las demás técnicas. A pH 7.50 y menores, solamente GOx contribuye de manera apreciable al crecimiento de la película. A pH mayor que 7.50, tanto el polímero como la enzima contribuyen al crecimiento de las películas.

#### **4.4 Electrocatálisis enzimática**

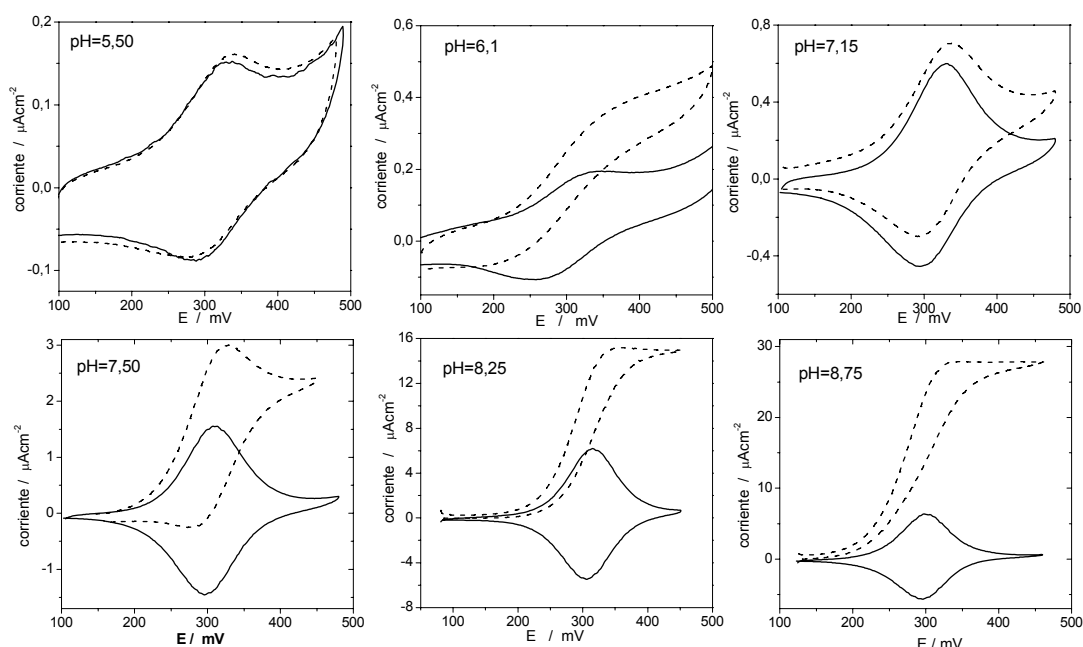
Hemos establecido que podemos controlar el espesor de las películas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>3</sub>, la concentración de centros redox, la concentración de enzima, y la estructura de las películas ajustando la densidad de carga del polímero PAH-Os. Examinemos ahora la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa catalizada por GOx y mediada por el cable molecular. Todas las medidas de electrocatálisis enzimática se llevaron a cabo en buffer TRIS 0.1M, pH = 7.2 con agregado de 0.1M de NaCl.

La figura 4.15 muestra voltametrías cíclicas a baja velocidad de barrido ( $5\text{mVs}^{-1}$ ) a saturación (50 mM) y en ausencia de sustrato  $\beta$ -D-glucosa para películas adsorbidas a partir de soluciones de PAH-Os de distinto pH.

En todos los casos se observa corriente catalítica durante el barrido anódico y una disminución de la corriente (respecto a la voltametría en ausencia de sustrato) durante el barrido catódico debido al consumo de Os(III) por la reacción enzimática.

Para películas crecidas a partir de soluciones de pH 7.50 o menor, se observa un pico de corriente además de la corriente catalítica. En los dos experimentos a mayor pH, se observan claras ondas catalíticas, aunque con histéresis.

Las curvas con forma de pico indican que debido a las bajas corrientes catalíticas, la contribución de la corriente no estacionaria  $i_{dif}$  aun es significativa. En los otros casos, la corriente aumenta casi un orden de magnitud respecto a la ausencia de sustrato y se observa entonces la curva catalítica pura ( $i_{cat} \gg i_{dif}$ ).

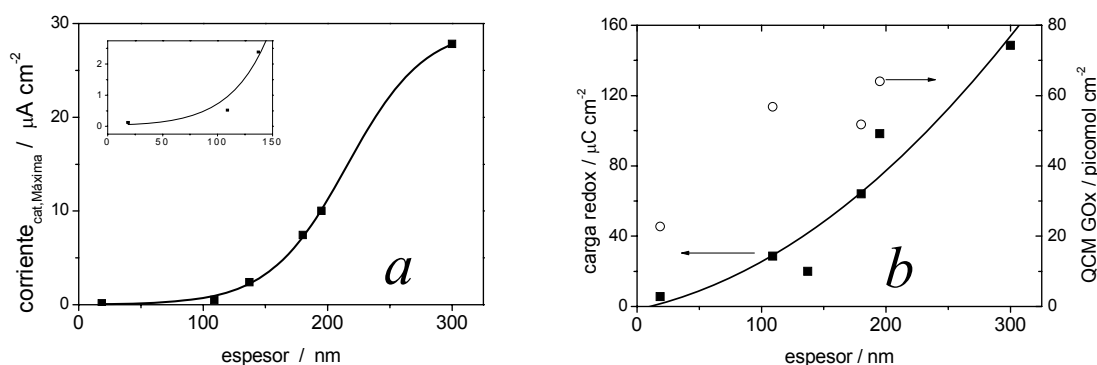


**Figura 4.15:** Voltametría cíclica en ausencia (línea continua) y a saturación de sustrato, 50 mM (línea cortada) para películas de MPS/(PAH-Os)<sub>3</sub>(GOx)<sub>3</sub> autoensambladas a distinto pH según se lee en el texto de cada figura. Velocidad de barrido = 5mVs<sup>-1</sup>. Notar la diferencia de escalas en el eje y para las distintas figuras.

La figura 4.16.a muestra la corriente catalítica a saturación de sustrato en función del espesor de la película. Para facilitar la comparación, se muestra en la figura 4.16.b la carga redox y la masa de GOx también en función del espesor (siempre para películas de 3 bicapas). Del análisis de la figura 4.16 se desprende que la corriente catalítica crece como función del espesor siguiendo una tendencia similar a la de la carga redox.

Para cada película mostrada en la figura 4.15 se midió la curva de respuesta catalítica en función de la concentración de glucosa. Se realizaron agregados sucesivos de D-glucosa

a la solución de medida y se registró la voltametría cíclica. En los casos donde se observó un pico de corriente durante el barrido anódico, la corriente catalítica se obtuvo restando a cada voltograma el voltograma respectivo en ausencia de sustrato.



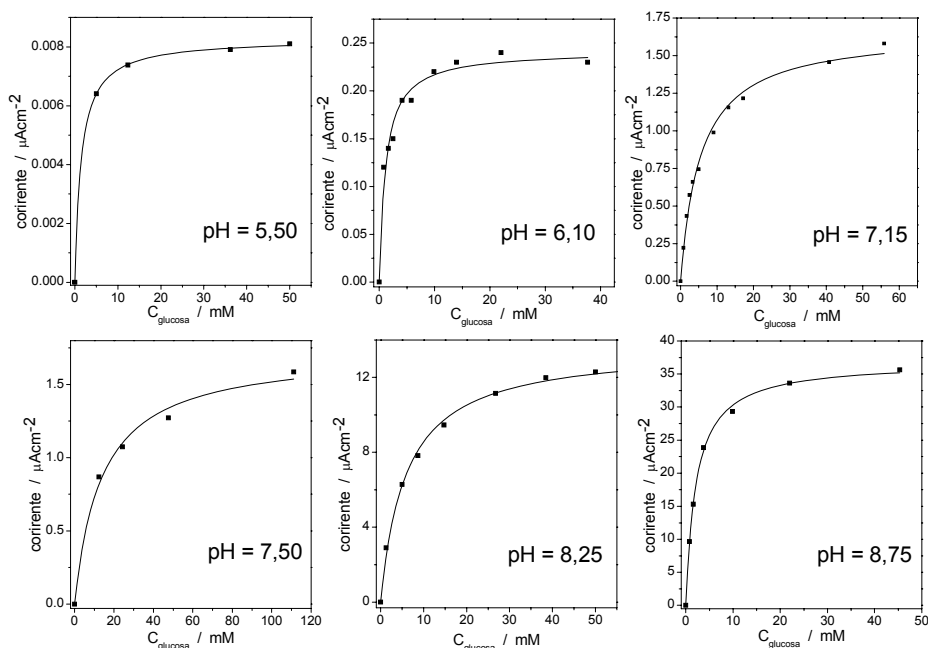
**Figura 4.16:** a) Corriente catalítica máxima en función del espesor. En el inserto se muestra a mayor escala los puntos de menor espesor. b) Carga redox (cuadrados sólidos) y masa de GOx por QCM (círculos huecos) en función del espesor elipsométrico. En ambos casos, la línea trazada es solo una ayuda para guiar al ojo a encontrar la tendencia, no representa ajuste a modelo alguno.

En función de los resultados del capítulo 3, al terminar de medir cada curva de calibración se mantuvo el electrodo en solución de glucosa durante dos horas. Se tomaron voltagramas cíclicos a intervalos regulares de 20 minutos, observándose en todos los casos la misma respuesta que en los voltagramas previos. Para ningún electrodo se observó caída de la corriente en el tiempo, *i.e.* no tenemos evidencia para ninguno de los electrodos preparados de inactivación enzimática en el sistema inmovilizado.

La figura 4.17 muestra la dependencia de la corriente catalítica con la concentración de D-glucosa para películas autoensambladas a partir de soluciones de PAH-Os de distinto pH. En base al esquema catalítico propuesto en el capítulo 1 (figura 1.4), y considerando que las películas analizadas en este capítulo son delgadas, y no se generan perfiles difusionales de concentración apreciables dentro de las mismas, podemos aplicar la aproximación de capa delgada del modelo de Bartlett-Pratt [49, 135] (ecuación (5.15)) para relacionar la corriente catalítica con la concentración de sustrato. Esta fórmula ya ha sido validada y utilizada en numerosos estudios previos [10, 94, 135, 155-157, 159].

$$i_{cat} = \frac{2Fk_{cat}\Gamma_{we}}{1 + \frac{k_{cat}}{k[O_{S_z}]} + \frac{K_{MS}}{[S]_{\infty}}} \quad (5.15)$$

En el apéndice A.4.2 se presenta evidencia que avala la utilización del modelo de capa delgada. A su vez en el apéndice A.4.3 se muestra un estudio de la permeabilidad de moléculas no cargadas a través de las multicapas.



**Figura 4.17:** Dependencia de la corriente catalítica con la concentración de D-glucosa a  $E=450\text{mV}$ . Cada gráfico corresponde a películas de  $\text{MPS}/(\text{PAH-Os}/\text{GOx})_3$  autoensambladas a partir de soluciones de PAH-Os de distinto pH (indicado en el gráfico). Los puntos corresponden a los datos experimentales. Las líneas de trazo continuo representan el mejor ajuste a la ecuación (5.15).

La concentración de Os(III) tiene una dependencia Nernstiana con el potencial del electrodo, de manera tal que cuando este aumenta, todo el Os(II) en la película se convierte en Os(III). Si  $E \gg E^0$ , entonces la corriente catalítica solo depende de la concentración de la figura 4.17 se muestran los datos experimentales y el mejor ajuste al modelo de capa delgada. Este ajuste arroja estimaciones para la concentración superficial de enzima cableada ( $\Gamma_{we}$ ) y la constante de *pseudo* primer orden para la reoxidación de  $\text{GOx}(\text{FADH}_2)$ ,  $k[\text{Os}_\Sigma]$ .

Notemos que para realizar el ajuste al modelo de capa delgada es necesario fijar los valores de  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{MS}}$ . Naturalmente, el valor de los parámetros de ajuste dependerá de estos valores. Sin embargo, la calidad del ajuste no lineal resulta independiente de los valores usados. Si suponemos que  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{MS}}$  no varían de película en película, y



solamente queremos comparar la respuesta catalítica entre las distintas estructuras no importará qué valores precisos usemos para  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{MS}}$ , solo importa usar en todos los ajustes el mismo par de valores. Debido a los inconvenientes comentados en el capítulo 3 para determinar con precisión  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{MS}}$  en solución para mediador y enzima, y con el objeto de facilitar la comparación de nuestros resultados con reportes previos para PAH-Os/GOx, elegimos probar los ajustes con los valores usados en los trabajos previos:  $700\text{s}^{-1}$  y  $25\text{mM}$ .

La tabla 4.3 compila los valores relevantes para el análisis de la electrocatálisis, incluyendo los valores obtenidos por ajuste al modelo de capa delgada.

espesor nm	$Q^{(a)}$ $\mu\text{C cm}^{-2}$	$k[\text{Os}_{\Sigma}]^{(b)}$ $\text{s}^{-1}$	$k$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Gamma_{\text{QCM}}$ $\text{pmol cm}^{-2}$	$\Gamma_{\text{we}}^{(b)}$ $\text{pmol cm}^{-2}$	$[\text{Os}_{\Sigma}]/[E_{\text{QCM}}]^{(c)}$
19	5.7 (32)	44	1375	23	0.001	2.6
ND	7.4 (ND)	34	ND	ND	0.039	ND
109	29 (27)	198	7333	57	0.056	5.2
137	20 (15)	250	16667	52	0.042	4.0
180	64(37)	217	5864	ND	0.40	N/A
195	98 (52)	200	3846	64	0.43	15.8
300	149 (51)	66	1294	ND	3.15	ND

**Tabla 4.3:** Espesor, carga redox, masa de GOx y datos cinéticos para películas de MPS/(PAH-Os)<sub>3</sub>(GOx)<sub>3</sub>  
(a) la segunda columna entre paréntesis corresponde a la concentración en volumen de complejo de Os (a partir de la carga y el espesor). ND = no determinado  
(b) a partir de ajuste a la ecuación (5.15)  
(c) Proporción de concentración en volumen de Os, a concentración en volumen de enzima total (enzima por QCM)

## 4.5 Discusión

Analicemos los parámetros obtenidos por análisis de los datos de corriente catalítica según el modelo de capa delgada.

### 4.5.1 Enzima cableada

Notamos en primer lugar, que la concentración de enzima cableada resulta para todas las películas analizadas muy inferior a la concentración total de enzima determinada por QCM ( $\Gamma_{\text{we}} \ll \Gamma_{\text{QCM}}$ ). Este hecho coincide con todos los reportes previos acerca de electrodos donde la enzima y el mediador se encuentran coinmovilizados, como comentamos en la sección 1.10.3

Si bien en ningún caso  $\Gamma_{we} \approx \Gamma_{QCM}$ , podemos ver que en las películas autoensambladas a partir de soluciones de mayor pH la proporción de enzima cableada crece apreciablemente. Podemos encontrar dos razones que explican este comportamiento.

En primer lugar, las estructuras autoensambladas a mayor pH son más flexibles, permitiendo un movimiento relativo mayor de los segmentos poliméricos en general y de los centros de Os en particular, alrededor de sus centros de anclaje. Vimos por espectroscopía de fuerza atómica que las estructuras autoensambladas a mayor pH eran mecánicamente más blandas.

Por otro lado, la carga redox y la cantidad total de enzima autoensamblada no crecen en igual magnitud con el espesor (ver figura 4.16). El crecimiento de la carga redox es mucho mayor que el de enzima, lo que provoca, que varíen las concentraciones relativas de estas especies ( $[Os_{\Sigma}]/[E_{QCM}]$ ). La mayor concentración relativa de sitios Os para películas formadas a mayor pH implica también que es mayor la probabilidad de que alguno de estos sitios pueda cablear efectivamente a la enzima. En este sentido, Wolosiuk *y col.* [156] llegaron a conclusiones similares respecto a la mayor proporción de enzima cableada a mayor concentración de centros de Os para una monocapa de GOx y distintas concentraciones relativas de PAH-Os.

#### 4.5.2 Constante de reoxidación $k$

La figura 4.18 muestra la variación de  $k$  con el espesor. Nótese que  $k$  pasa claramente por un valor máximo para espesores intermedios.

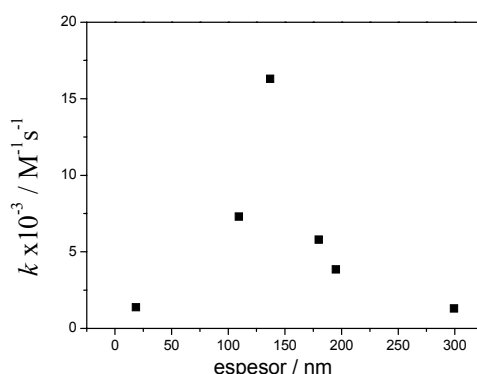


Figura 4.18:  $k$ , constante de reoxidación bimolecular de GOx(FADH<sub>2</sub>) como función del espesor de la película.

Wolosiuk *y col.* [155] estudiaron películas de espesor creciente, autoensamblando distinto número de bicapas de enzima y mediador redox, manteniendo la densidad de

carga de los polielectrolitos siempre constante (PAH-Os a  $\text{pH} \approx 6$ , totalmente cargada). Estos autores encontraron que en esas condiciones,  $k$  resultaba aproximadamente independiente del espesor ( $k \approx 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

En el presente trabajo de tesis, la variación de espesor en las distintas películas se logra a través de una estrategia totalmente distinta. El número de pasos de autoensamblado es constante para todas las estructuras analizadas y se varía el  $\text{pH}$  de la solución de adsorción. Discutimos que no solo se consiguen cambios importantes de espesor, sino también de estructura.

Cabe destacar que tanto  $k$  como  $\Gamma_{\text{we}}$  se obtuvieron a partir del ajuste de los datos experimentales a un modelo que asume que la película es homogénea, *i.e.* se asume que dentro de la película las concentraciones de enzima y de mediador redox están homogéneamente distribuidas. Por lo cual los valores hallados para  $k$  representan un valor promedio para toda la película, que no discriminan inhomogeneidades en la construcción de las multicapas.

Encontramos dos explicaciones posibles para este valor máximo de  $k$  alrededor de  $\text{pH}$  7.50:

a) Distribución inhomogénea de la enzima en las multicapas. Las figuras 4.4 y 4.6 muestran cómo aumenta la cantidad de enzima en las multicapas. Las imágenes de AFM (figura 4.7) muestran señales que indicarían la presencia de grandes agregados de enzima.

b) Cambio de la estructura de las películas con el aumento del espesor. Ya discutimos como todas las técnicas experimentales utilizadas apuntan en este sentido.

Ambos factores explicarían cambios en la cinética de reoxidación enzima-mediador al variar el  $\text{pH}$  de las soluciones de autoensamblado.

Una condición indispensable para que exista comunicación eléctrica entre la enzima y los centros de Os es que exista contacto físico entre ambas especies. Los agregados de enzima volverían *invisibles* al mediador a las moléculas de GOx que quedan atrapadas en los mismos.

En cuanto al cambio de estructura, es de destacar el hecho de que los máximos valores de  $k$  se observan justamente antes de que cambie el patrón de adsorción de polímero y enzima. Recordemos el detalle de la figura 4.4. Vimos por elipsometría, que en todos los casos de películas autoensambladas a  $\text{pH}$  menor o igual a 7.50, el crecimiento en espesor se debía fundamentalmente a los pasos de adsorción de enzima.

Podemos decir que es esperable que exista una suerte de compromiso donde se optimice el contacto Os/GOx. Podemos imaginar una situación extrema, a bajo pH de autoensamblado de PAH-Os donde debido a la alta densidad de carga lineal del polímero, se forma una estructura con muchos sitios de unión, rígida, donde polímero y enzima quedan inmobilizados, sin mucha capacidad de movimiento respecto a la posición en la que se adsorbieron. En el otro extremo, estarían las películas autoensambladas a alto pH de PAH-Os, donde la movilidad de los segmentos poliméricos sería mucho mayor.

Es de esperar que una estructura rígida dificulte el contacto en posición óptima de Os y GOx (bajo pH). Sin embargo, también es plausible, que para las películas donde existe más movilidad, ya se haya sobrepasado un valor óptimo de flexibilidad en las estructuras. Podríamos pensar que en las películas autoensambladas a mayor pH, los componentes tienen ya demasiada movilidad, y debido a esto también se dificulta el contacto. Otra opción es que la disminución en  $k$  a alto pH se explique porque la aparición de los agregados de enzima sobrepase el efecto benéfico de la mayor movilidad en las estructuras menos rígidas.

En general podemos concluir que las estructuras de pHs más bajos producirían distribuciones de concentración de especies más uniformes, es decir un mejor mezclado de los componentes. Mientras que las condiciones de contacto óptimas se alcanzarían cuando el polímero empieza a perder su carga positiva.

## Apéndices al Capítulo 4

### A.4.1 Análisis de curvas de fuerza vs. distancia en espectroscopía de fuerza atómica

Los valores de deflexión pueden convertirse fácilmente en valores de fuerza aplicando la ley de Hooke.

$$F = k_c(d - d_0) \quad (\text{A.4.1})$$

donde  $F$  es la fuerza,  $k_c$  es la constante del cantilever (informada por el fabricante),  $d$  la deflexión del cantilever, y  $d_0$  la deflexión en ausencia de interacción con la muestra (lejos de la muestra).

La indentación  $\delta$  se define como la diferencia entre la altura base de la muestra  $z$  y la deflexión del cantilever  $d$ :

$$\delta = z - d \quad (\text{A.4.2})$$

Como hay que considerar los *offsets*, reescribimos (A.4.2) según:

$$\delta = (z - z_0) - (d - d_0) \quad (\text{A.4.3})$$

donde  $z_0$  se denomina punto de contacto.

En este punto debe elegirse un modelo para cuantificar las propiedades elásticas de la muestra. Uno de los modelos más usados y sencillos para estudiar propiedades elásticas mediante espectroscopía de fuerza atómica es el modelo de Sneddon [207, 208], que es una extensión de los estudios de Hertz [209]. El modelo se corresponde con una indentación ( $\delta$ ) elástica producida por una punta rígida (en nuestro caso particular de geometría cónica) en una muestra blanda semi-infinita. Si la muestra es muy delgada, la deflexión del cantilever se ve influenciada por el sustrato, lo que restringe la validez del modelo.

$$F_{cono} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot \delta^2 \tan \alpha \quad (\text{A.4.4})$$

$F_{cono}$  es la fuerza necesaria para indentar (penetrar) una muestra elástica;  $\alpha$  el ángulo de apertura de la punta; y  $\nu$  el coeficiente de Poisson, que es igual a la magnitud de la contracción de un material elástico en una dirección, dividido el estiramiento en la dirección perpendicular (multiplicado por -1). Todas estas magnitudes son conocidas.

Si combinamos (A.4.1), (A.4.3) y (A.4.4) obtenemos:

$$k(d-d_0) = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \cdot (z-z_0 - (d-d_0))^2 \tan \alpha \quad (\text{A.4.5})$$

que se puede reordenar para dar:

$$z-z_0 = d-d_0 + \sqrt{\frac{k(d-d_0)\pi(1-\nu^2)}{2E \tan(\alpha)}} \quad (\text{A.4.6})$$

que es la expresión utilizada en la sección 4.2.4.

#### A.4.2 Permeabilidad de películas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>3</sub>

Las propiedades de permeabilidad de estructuras de multicapas autoensambladas electrostáticamente capa-por-capas han sido estudiadas por varios autores [210-214]. Por ejemplo, Liu y Bruening [214] reportaron un coeficiente de difusión para glucosa en multicapas de PAH-PSS autoensambladas de  $9.87 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . En su trabajo utilizaron soluciones de autoensamblado de PAH de muy bajo pH (pH ~ 2.1). Como vimos en la introducción a este capítulo, a ese pH extremo, PAH está totalmente cargada y el PSS, al ser un polielectrolito fuerte también lo está. Se forman entonces multicapas muy compactas.

En nuestro caso, por el contrario, a partir de pH~7.5 PAH comienza a disminuir su carga, y hemos visto que se forman estructuras con ovillos y colas, de estructura mucho más abierta.

Para estudiar la permeabilidad se realizaron experimentos de voltametría cíclica para una especie electroactiva presente en solución. Se trabajó con ferroceno metanol, una molécula pequeña (tamaño similar a la glucosa) y que al igual que la glucosa, no posee carga eléctrica. Se realizaron voltametrías cíclicas a distintas velocidades de barrido primero sobre un electrodo de Au *desnudo*, y luego sobre un electrodo de Au modificado con una multicapa de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>3</sub>. En este último caso, las moléculas de ferroceno metanol debían difundir a través de la multicapa antes de reaccionar sobre el electrodo. La figura A.4.1.a muestra los resultados experimentales.

La figura A.4.1.b muestra el aspecto de los voltagramas cíclicos en las dos condiciones experimentales analizadas a velocidad de barrido de  $5 \text{ mVs}^{-1}$ . Obsérvese que la magnitud de la señal de la especie en solución es dos órdenes de magnitud más alta que la señal del Os inmovilizado y que solo apreciamos la primera.

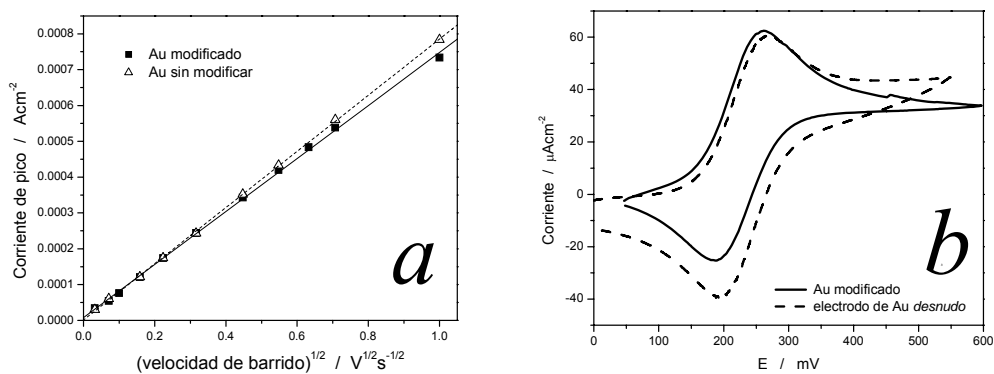


Figura A.4.1: a) Gráfico de corriente de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para experimentos de voltametría cíclica para 1mM ferroceno metanol sobre un electrodo de Au *desnudo* (triángulos sin relleno) y sobre un electrodo de Au modificado con MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>3</sub> (cuadrados sólidos). Solución de PAH-Os de pH = 8.25

b) Comparación de voltagramas de 1mM ferroceno metanol en solución sobre electrodo de Au modificado (línea de trazo continuo) y sin modificar (línea de trazo cortado)

De la pendiente de las rectas de la figura A.4.1.a, obtuvimos  $D_{fc} = 6.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  sobre el electrodo desnudo y  $D_{fc} = 5.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  sobre el electrodo modificado. Podemos concluir entonces que las multicapas en estudio no presentan una barrera para la difusión de especies pequeñas no cargadas solubles en agua.

En cuanto a las películas autoensambladas a partir de soluciones de PAH-Os de menor pH, esperamos una permeabilidad más baja que en el caso analizado. Sin embargo esto se compensaría parcialmente al menos por el hecho de que son películas considerablemente más delgadas.

De estas experiencias podemos inferir que el coeficiente de difusión de la glucosa a través de las multicapas no puede diferir demasiado del valor del mismo reportado para mediciones en solución [182].

El objetivo de este estudio es justificar el uso del valor de  $D_S$  reportado en solución para los cálculos de la sección A.4.3 y del capítulo 5. Sabemos que  $D_S$  a través de las multicapas será ligeramente inferior al valor que usaremos, pero con el presente estudio creemos haber mostrado evidencia de que estará en el mismo orden de magnitud, y eso será suficiente para los cálculos que siguen (esta discusión continuará en el capítulo 5).

### A.4.3 Perfiles de concentración para validar el modelo de capa delgada

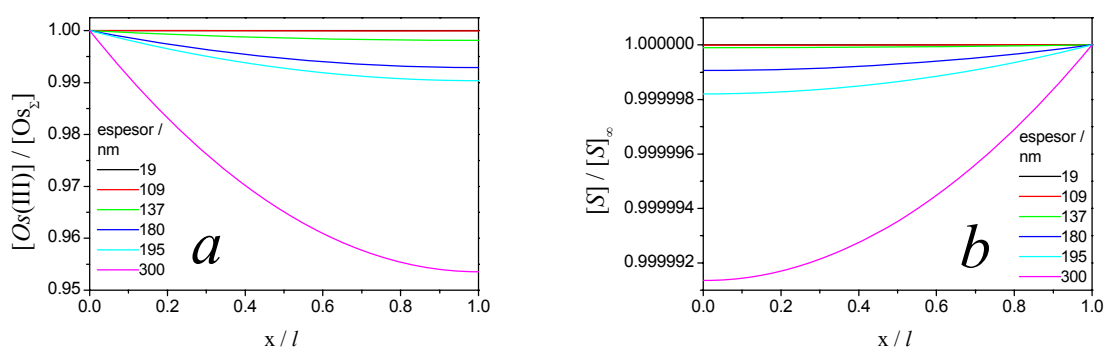
El modelo de capa delgada [49] es aplicable para películas delgadas donde ni el sustrato enzimático, ni el mediador redox desarrollan perfiles de concentración apreciables en el interior de las películas. Esto es equivalente a decir que la difusión del sustrato

enzimático a través de la película es lo suficientemente rápida como para reponer el sustrato consumido por la reacción enzimática; y además, que la concentración de mediador redox impuesta por el equilibrio nernstiano en la superficie del electrodo se conserva también a lo largo de todo el espesor de la película. En este caso, la difusión de electrones por *electron-hopping* recupera la concentración de Os(III) consumida por la regeneración de la enzima.

La figura A.4.2 muestra las concentraciones adimensionales de mediador redox y sustrato enzimático en función de la distancia al electrodo para películas autoensambladas a distinto pH. Las simulaciones resuelven numéricamente las ecuaciones diferenciales utilizando el método de relajación con malla adaptativa según se describe en el capítulo 2. Las variables adimensionales quedan definidas por (1.71) a (1.73).

Las ecuaciones diferenciales se resolvieron usando espesor y concentración de Os total de valores experimentales;  $[S]_{\infty} = 50\text{mM}$  (saturación);  $k$ ,  $\Gamma_E$ , obtenidas del ajuste al modelo de capa delgada (tabla 4.3);  $K_{MS} = 25\text{mM}$  y  $k_{\text{cat}} = 700\text{s}^{-1}$ ;  $D_S = 6.73 \times 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$  y  $D_e = 1.2 \times 10^{-9}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$  [94, 157].

Observamos que para ninguno de los espesores analizados se desarrollan perfiles de concentración apreciables.



**Figura A.4.2:** Perfiles de concentración simulados dentro de películas de MPS/(PAH-Os)<sub>3</sub>(Gox)<sub>3</sub>. Se muestra cómo varía el perfil para películas de distinto espesor. Los distintos perfiles corresponden a películas autoensambladas a partir de soluciones de PAH-Os de distinto pH. a) mediador redox; b) sustrato enzimático.



## Capítulo 5.

# Análisis del sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os según el modelo cinético-difusional de Bartlett-Pratt para biosensores totalmente integrados

### 5.1 Introducción

Hicimos en el capítulo 1 una breve introducción a los distintos modelos publicados en la literatura para el tratamiento de electrodos enzimáticos, describiendo en particular el modelo de Bartlett-Pratt para electrodos donde tanto la enzima como el mediador se hallan inmovilizados en una película sobre el electrodo [44, 49].

En el presente capítulo nos proponemos movernos a través de los casos cinéticos límite del diagrama de Bartlett-Pratt y probar la validez del modelo en general y de las ecuaciones aproximadas en particular. Elegimos para ello el sistema  $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os, sobre el cual ya realizamos algunos estudios en el capítulo 4 y sobre el que existen además varios reportes que lo caracterizan en la literatura [10, 94, 155-161].

La estrategia de construir sensores amperométricos por autoensamblado electrostático capa-por-capas es muy prometedora para moverse a través del diagrama de casos cinéticos. La variación del número de capas permite primeramente modificar el espesor de las películas de reconocimiento, en un intervalo tan amplio como se desee. No existe, en principio, límite al número total de capas que pueden autoensamblarse.

Como vimos en el capítulo 4, modificando el pH de las soluciones de polielectrolito podemos conseguir también cambios importantes. Podemos jugar dentro de un determinado intervalo con los valores de la constante de reoxidación enzima-mediador. Podemos en segundo lugar, acelerar el crecimiento de las multicapas, es decir, lograr mayores espesores a igual número de pasos de autoensamblado. Resta estudiar si al construir películas cada vez más gruesas, el grado de interpenetración de las distintas capas afecta de alguna manera la capacidad electrocatalítica de las películas.

## 5.2 Una pequeña corrección al modelo de Bartlett-Pratt

El análisis de nuestro sistema en particular desnuda una pequeña falla del modelo: no tiene en cuenta la estequiometría de la reacción enzima-mediador redox.

Las reacciones (1.62) y (1.63) deberían escribirse:



donde  $\zeta$  es un coeficiente estequiométrico y  $n$  el número de electrones que intercambia la especie B sobre el electrodo.  $n$  es igual a 1 para ferrocenos, complejos de osmio y rutenio, entre otras especies; e igual a 2 para quinonas y otras cuplas orgánicas.

La reacción entre el mediador y la enzima no ocurre en un solo paso sino que procede a través de una forma semiquinoidea de la enzima (ver la propuesta de mecanismo de Bourdillon *y col.* [25]). Puede demostrarse que la reacción de reoxidación puede estudiarse cinéticamente como una reacción de orden 1 en el mediador, teniendo en cuenta el coeficiente estequiométrico  $\zeta$  [25, 43, 44]. Entonces, con un mediador de un electrón ( $n=1$ ), el coeficiente estequiométrico será 2 ( $\zeta = 2$ ). Por otro lado, para mediadores de  $n = 2$ ,  $\zeta = 1$ .

En la mayoría de los trabajos que derivan ecuaciones cinéticas en la literatura los autores plantean mecanismos muy genéricos como los vistos en (1.61) a (1.63) y no incluyen coeficientes estequiométricos. Sin embargo, cuando se comparan fórmulas analíticas con resultados experimentales con el objetivo de evaluar parámetros cinéticos, concentraciones o coeficientes de difusión, los coeficientes estequiométricos son determinantes para obtener valores acertados. La inclusión del coeficiente estequiométrico, no produce variaciones en la dependencia funcional de la respuesta amperométrica con los distintos parámetros. Esto es así porque no estamos cambiando el orden de reacción.

Las ecuaciones diferenciales se modifican según:

$$\frac{\partial[A]}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2[A]}{\partial x^2} - \zeta k[E_{\text{red}}][A] \quad (5.3)$$

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} - \frac{k_{\text{cat}}[E_{\text{ox}}][S]}{K_M + [S]} \quad (1.65)$$

$$\frac{\partial[E_{\text{ox}}]}{\partial t} = k[E_{\text{red}}][A] - \frac{k_{\text{cat}}[E_{\text{ox}}][S]}{K_M + [S]} \quad (1.66)$$

Las ecuación (1.64) se modifican según (5.3), mientras que (1.65) y (1.66) quedan inalteradas.

En el estado estacionario, (1.69) se modifica por (5.4), mientras que (1.70) no cambia.

$$D_{e^-} \frac{d^2[A]}{dx^2} = \frac{\zeta k k_{cat} [A][S][E]}{k[A](K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (5.4)$$

$$D_S \frac{d^2[S]}{dx^2} = \frac{k k_{cat} [A][S][E]}{k[A](K_{MS} + [S]) + k_{cat} [S]} \quad (1.70)$$

Vemos que las ecuaciones diferenciales a resolver solo se modifican ligeramente.

Se eligió no modificar las definiciones de variables adimensionales dadas de (1.71) a (1.77). Por el contrario se trabajó sobre la expresión de las ecuaciones diferenciales en variables adimensionales. (1.78) se modifica según (5.5), mientras que (1.79) no varía.

$$\frac{d^2 a}{d\chi^2} = \frac{\zeta \kappa^2 a s}{\gamma a(1 + \mu s) + s} \quad (5.5)$$

$$\frac{d^2 s}{d\chi^2} = \frac{\gamma \eta^{-1} \kappa^2 a s}{\gamma a(1 + \mu s) + s} \quad (1.79)$$

También se modifican las expresiones de los flujos de sustrato y mediador (1.85) para incorporar el coeficiente estequiométrico.

A partir de (5.4) y (1.28), obtenemos:

$$D_S \frac{d^2[S]}{dx^2} = \frac{1}{\zeta} D_{e^-} \frac{d^2[A]}{dx^2} \quad (5.6)$$

Integrando y con las mismas condiciones de contorno de la tabla 1.3, llegamos a la nueva expresión que iguala los flujos de ambas especies, que reemplaza a (1.85):

$$J_{obs} = \zeta J_S \quad (5.7)$$

Nótese que los únicos cambios algebraicos que hemos introducido respecto al análisis de Bartlett y Pratt (ecuaciones (1.61) a (1.94)) fueron el coeficiente estequiométrico en una de las ecuaciones diferenciales a resolver, (5.5) lo que acarrea que el coeficiente se incorpore en la relación entre los flujos, (5.7).

Bartlett y Pratt [44, 49] llegan a las fórmulas analíticas aproximadas dadas en la tabla 1.4 por simplificación de las ecuaciones (1.78) y (1.79). Volvimos a resolver las ecuaciones diferenciales en variables adimensionales, siguiendo exactamente los mismos lineamientos, procedimientos y aproximaciones usados en el trabajo original, pero teniendo en cuenta  $\zeta$ .

Las nuevas fórmulas, que son las que utilizaremos para el análisis de los datos experimentales en la presente tesis, pueden verse en la tabla 5.1.

Caso	Proceso limitante	Fórmula aproximada
I	reacción enzima-mediador película delgada	$i = \zeta nFA a_e [A_\Sigma] k [E] l$ (5.8)
II	reacción enzima-mediador película gruesa	$i = nFA [A_\Sigma] a_e \sqrt{\zeta D_e k [E]}$ (5.9)
III	agotamiento de sustrato y de mediador	$i = \zeta nFA \frac{D_e [A_\Sigma] a_e + D_s K_s [S]_\infty}{l}$ (5.10)
IV	reacción enzima-sustrato película gruesa	$i = \zeta nFA K_s [S]_\infty \sqrt{\frac{k_{cat} [E] D_s}{K_{MS} + 1/2 K_s [S]_\infty}}$ (5.11)
V	reacción enzima-sustrato película delgada	$i = \zeta nFA \frac{l [E] k_{cat} K_s [S]_\infty}{K_{MS} + K_s [S]_\infty}$ (5.12)
VI	caso de transición	$i = nFA \sqrt{2 \zeta a_e [A_\Sigma] k [E] D_s K_s [S]_\infty}$ (5.13)
VII	caso de transición	$i = nFA \sqrt{\frac{2 \zeta a_e D_e [A_\Sigma] k_{cat} [E] K_s [S]_\infty}{K_{MS} + K_s [S]_\infty}}$ (5.14)

Tabla 5.1: Fórmulas analíticas aproximadas para los distintos casos límite del modelo de Bartlett-Pratt, corregidas para incluir el coeficiente estequiométrico de la reacción enzima-mediador,  $\zeta$ .

### 5.3 Casos cinéticos

Analicemos en forma un poco más detallada los casos cinéticos propuestos (tabla 5.1).

Los casos I y II se obtienen haciendo la suposición de que la reacción limitante es la reacción entre la enzima y el mediador redox. Análogamente, los casos IV y V se obtienen haciendo la suposición contraria, que la reacción limitante es la reacción enzima-sustrato.

Vemos que en ambas cinéticas límite se obtienen dos casos. Los casos I y V corresponden a los casos de película delgada, donde ni el mediador redox ni el sustrato desarrollan perfiles difusionales apreciables en el interior de la película. Para el sustrato la concentración en el seno de la solución multiplicada por el coeficiente de partición se mantiene prácticamente uniforme, mientras que para el mediador, podemos presuponer que la relación de Nernst sobre el electrodo también se cumple en todo el volumen.

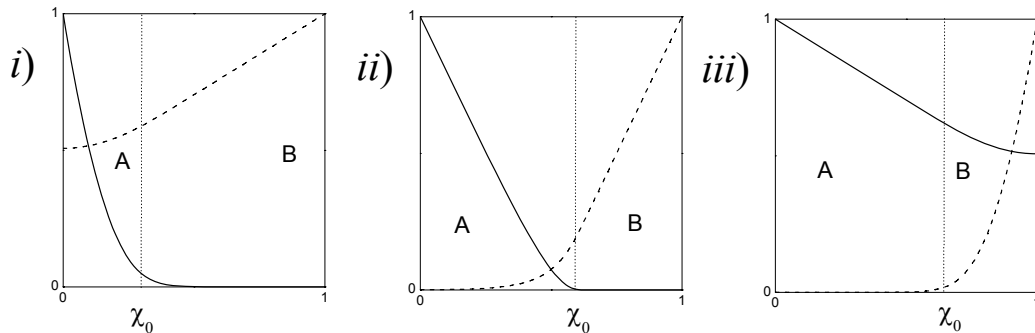
Los casos II y IV corresponden a películas de espesores lo suficientemente grandes como para que se desarrollen perfiles de concentración para sustrato (caso IV) o mediador (caso II).

Volviendo al caso particular de una película delgada, puede hallarse una fórmula que da la respuesta amperométrica en todo el intervalo de concentraciones de sustrato. Esta es la única situación donde una única fórmula puede describir una curva de calibración completa (todo el rango de concentraciones de sustrato).

$$i = \frac{\zeta n F A k_{cat} [E] / l}{1 + \frac{k_{cat}}{k[A_{\Sigma}]} + \frac{K_{MS}}{[S]_{\infty}}} \quad (5.15)$$

Nótese que las fórmulas aproximadas para los casos I y V (ecuaciones (5.8) y (5.12)) pueden reobtenerse a partir de la ecuación (5.15). Esta fórmula ya la hemos usado en la sección 4.4.

El caso III, es llamado *caso de titulación*, y describe el caso donde la cinética está limitada en una zona de la película por la reacción enzima-mediador, mientras que en el resto de la película lo está por la reacción enzima-sustrato. Este caso ocurre cuando las concentraciones tanto de mediador como de sustrato se agotan dentro de la película, como se muestra en la figura 5.1.ii.



**Figura 5.1:** Representación de los perfiles de concentración que ocurren en los casos donde todo el mediador y/o todo el sustrato se consumen dentro de la película. La cinética está limitada por la reacción enzima-sustrato en la región A y por enzima-mediador en la región B. Los perfiles de concentración se calcularon con los siguientes adimensionales: *i)*  $\kappa=20$ ,  $\eta=100$ ,  $\gamma=10$ . Caso VII; *ii)*  $\kappa=100$ ,  $\eta=100$ ,  $\gamma=100$ . Caso III; y *iii)*  $\kappa=2$ ,  $\eta=0.01$ ,  $\gamma=0.1$ . Caso VI. En los tres casos  $\mu \ll 1$ . Línea de trazo continuo, perfil del mediador y línea de trazo cortado, perfil del sustrato. Figura dibujada acorde a referencia [49].

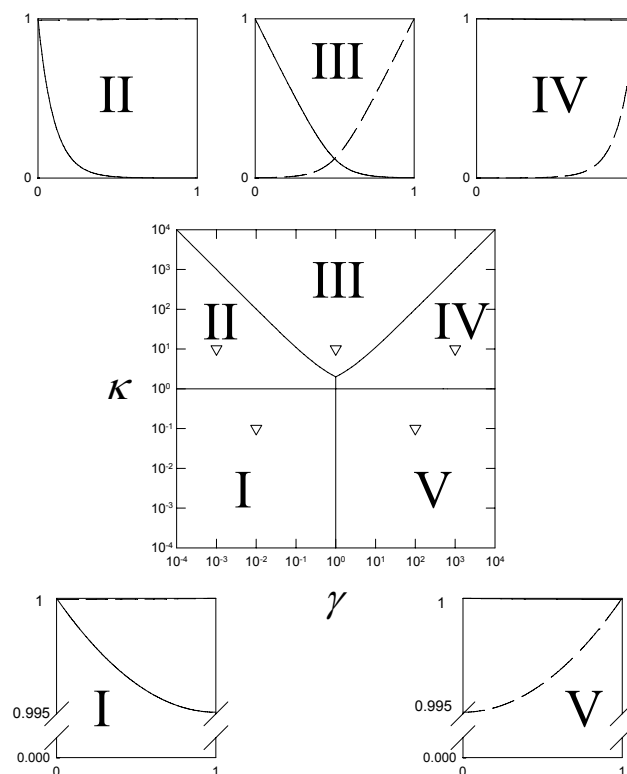
Existen además otros dos casos de transición. En el caso VII, todo el mediador se consume en una capa cerca del electrodo. La concentración del sustrato decrece pero nunca se agota (figura 5.1.i). El caso complementario es el caso VI, donde el sustrato se

consume en una capa en la parte más externa de la película. La concentración de mediador decrece, pero tampoco se agota (figura 5.1.iii). En ambos casos, según la zona de la película la reacción estará limitada por un proceso distinto.

A partir de las aproximaciones usadas para establecer los distintos casos límite y de las fórmulas aproximadas dadas en la tabla 5.1 pueden hallarse expresiones para las fronteras entre los distintos casos límite [49]. Estas expresiones deben usarse con mucho cuidado, dado que justamente, en las fronteras entre los distintos casos, es donde las fórmulas de la tabla 5.1 pierden precisión rápidamente.

### 5.3.1 Diagrama de casos cinéticos

A continuación se muestran algunos ejemplos de los diagramas de casos cinéticos que se obtienen según el modelo de Bartlett-Pratt. Estos diagramas muestran la interrelación entre los distintos casos límite. Para describir completamente al sistema se necesitarían cuatro variables, por esta razón, solo mostramos algunos diagramas sencillos.



**Figura 5.2:** Diagrama de casos bidimensional graficado para  $\eta = 1$  y  $\mu < 1$  mostrando los cinco casos que bajo estas condiciones se predicen analíticamente. Alrededor del diagrama se grafican los perfiles de concentración, en los puntos marcados como ( $\nabla$ ) en el diagrama de casos. Caso I,  $\kappa=0.1$  y  $\gamma=0.01$ ; Caso II,  $\kappa=10$  y  $\gamma=0.001$ ; Caso III,  $\kappa=10$  y  $\gamma=1$ ; Caso IV,  $\kappa=10$  y  $\gamma=1000$ ; Caso V,  $\kappa=0.1$  y  $\gamma=100$ . —, concentración adimensional de mediador,  $a$ . ---, concentración adimensional de sustrato,  $s$ . La escala horizontal va desde el electrodo  $\chi = 0$ , hasta la interfaz con la solución  $\chi = 1$ . La escala vertical es la concentración adimensional. Figura extraída de referencia [49].

La publicación original de Bartlett y Pratt [49], discutía muy detalladamente las fórmulas analíticas halladas y el significado físico-químico de las mismas. A su vez, los resultados fueron comparados con simulaciones numéricas. Sin embargo, no hay reporte de datos experimentales en ese trabajo.

Sí se encuentran varias publicaciones que hacen uso de la ecuación (5.15) encontrando muy buena concordancia con los datos experimentales [10, 135, 155-157].

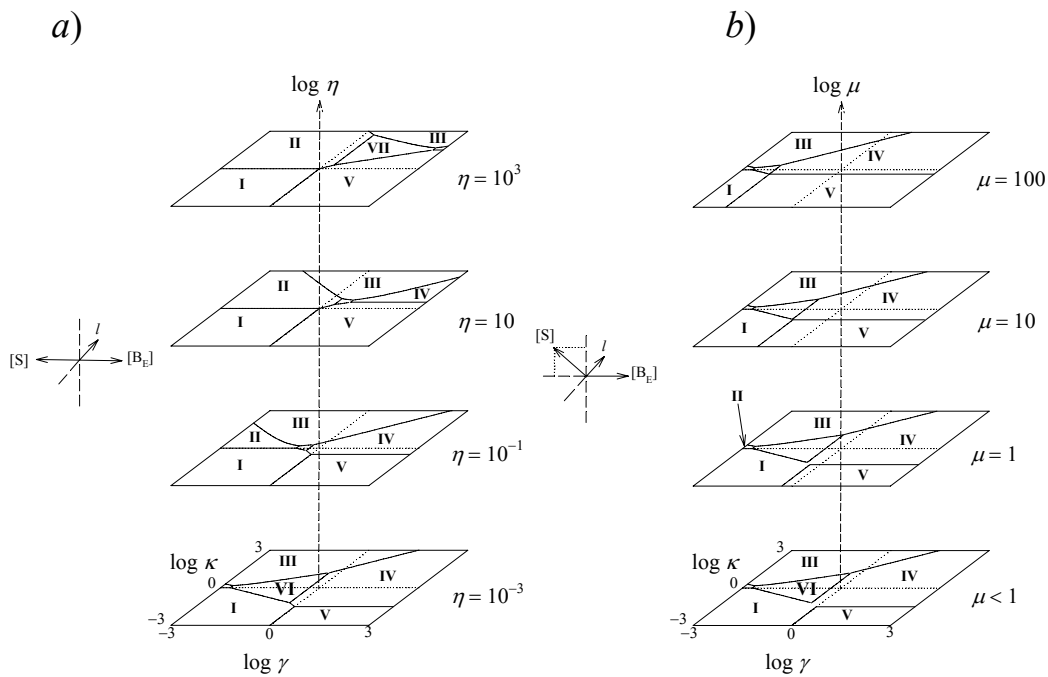


Figura 5.3: Diagramas de casos tridimensionales, mostrando los siete casos cinéticos. a)  $\mu < 1$ . b)  $\eta = 10^{-3}$ . En ambos casos, los ejes coordenados a la izquierda muestran la dirección de incremento de la concentración de sustrato, mediador y espesor. Figuras extraídas de referencia [49].

#### 5.4 El modelo de casos cinéticos y el sistema $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os

De las siete variables adimensionales que se definen en el modelo de Bartlett-Pratt, cuatro de ellas son las que determinan en qué caso cinético se encontrará un sistema determinado, estas son  $\kappa$ ,  $\eta$ ,  $\gamma$  y  $\mu$  (ecuaciones (1.74) a (1.77)) (recordemos que las otras tres describen los perfiles de concentración y la distancia al electrodo).

En base a los mencionados estudios previos sobre el sistema podemos estimar los valores aproximados de los parámetros cinéticos, difusionales, las concentraciones alcanzables en el interior de las películas e intervalos de espesores. En base a esos valores, queremos calcular aproximadamente a través de qué casos cinéticos será posible moverse con este sistema sustrato-enzima-mediador. Repasemos estos valores:

Parámetro	Valores aproximados esperables	Referencia/Comentario
$D_{e-}$	$1.2 \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	[94, 157]
$D_S$	$6.72 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	[182], <sup>(1)</sup>
$K_S$	1	(2)
$l$	>20nm	
$[E]$	<0.5mM	(3)
$[O_{S\Sigma}]$	<0.06M	(4)
$[S]_{\infty}$	0.1mM-1M	(5)
$k$	2000	(6)
$k_{\text{cat}}$	700	(7)
$K_{MS}$	25	(7)

Tabla 5.2: Valores o intervalos de valores aproximados posibles para el cálculo de los adimensionales para el sistema  $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os.

<sup>(1)</sup> Valor reportado para la glucosa en agua. Ver apéndice A.4.2 que presenta evidencia y una discusión acerca de por qué creemos que el valor de  $D_S$  en las películas no difiere apreciablemente de este valor. Además, para decidir el caso cinético, importa la relación entre los dos coeficientes de difusión  $D_S$  y  $D_{e-}$ . Si bien  $D_S$  será un poco menor al valor reportado en agua, es seguro que  $D_S \gg D_{e-}$  por órdenes de magnitud (difusión de una molécula libre vs. *electron hopping*)

<sup>(2)</sup> Ver también apéndice A.4.2 donde se discute la permeabilidad de las películas. Se impone un razonamiento análogo al anterior, existe la posibilidad de que  $K_S$  sea ligeramente menor que 1, pero tomar este valor como referencia no afectará la asignación de casos cinéticos.

<sup>(3)</sup> Este es el valor aproximado que se obtiene en general en los trabajos previos ya reportados [10, 94, 155-159] donde GOx se autoensambla electrostáticamente con PAH-Os. Es importante recordar que acá solamente estamos calculando la concentración de *enzima cableada*. Para lograr una concentración aún menor debería diluirse GOx con apo-GOx o intercalar capas de GOx con capas de apo-GOx.

<sup>(4)</sup> Valor promedio obtenido en trabajos previos [10, 94, 155-159] donde se autoensambló PAH-Os con GOx. Para obtener valores menores, se podría mezclar PAH-Os con PAH o intercalar capas de ambos polímeros.

<sup>(5)</sup> Si bien podría trabajarse a concentraciones tanto menores como mayores de glucosa, ese intervalo de valores es consistente con el valor de  $K_{MS}$ . Por ejemplo una



concentración 1M asegura con creces condición de enzima saturada en su sustrato, aumentar esta concentración aún más no cambiaría en nada esta situación.

<sup>(6)</sup> También este es un valor promedio de los anteriormente reportados para este sistema [10, 94, 155-159]. Respecto a este valor, podrían llegar a observarse variaciones importantes conforme aumentamos el espesor de las películas más allá de los límites antes alcanzados. Sin embargo sí hay un valor que podemos tomar como cota superior, que es el valor de la constante de segundo orden en solución,  $2.2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

<sup>(7)</sup> Discutimos ampliamente en el capítulo 3, los problemas para determinar estos valores. Una vez más, para estimar los casos cinéticos importa el orden de magnitud de estas constantes. Además, al igual que en el capítulo 4, preferimos trabajar con esos valores para facilitar la comparación con reportes previos.

Vimos en el capítulo 4, que al modificar la estructura de las películas, se modifica el parámetro  $k$ . No nos detuvimos en ese momento a analizar cuantitativamente otros parámetros, como por ejemplo, los coeficientes de difusión. No resulta descabellado pensar que estos también podrían cambiar.

Detengámonos sin embargo en otro punto. Supongamos que queremos comparar datos provenientes de electrodos autoensamblados a partir de soluciones de polímero de igual pH. ¿Qué sucede con los parámetros de la tabla 5.2 al aumentar sistemáticamente el espesor de las películas? Vimos en la sección 1.10.2, que existe suficiente evidencia del crecimiento regular de las películas con el espesor <sup>6</sup>. Los cálculos muestran que, para los espesores analizados, las concentraciones en volumen de enzima y mediador se mantienen constantes, lo mismo ocurre con  $k$ .

En este marco, es plausible suponer, que las demás variables, que no conocemos con tanta certeza, como ser los coeficientes de difusión, también se mantienen constantes al incrementar el espesor (dado que la estructura, parece mantenerse).

Analicemos entonces, qué aspecto tendrá el diagrama de casos cinéticos construido a partir de una única solución de polímero (pH y fuerza iónica constante).

$\eta$  es el producto de parámetros que vimos se mantendrán constantes.

$\kappa$  es igual al producto del espesor por variables que se mantienen constantes. Es decir,  $\kappa$  será una medida del espesor.

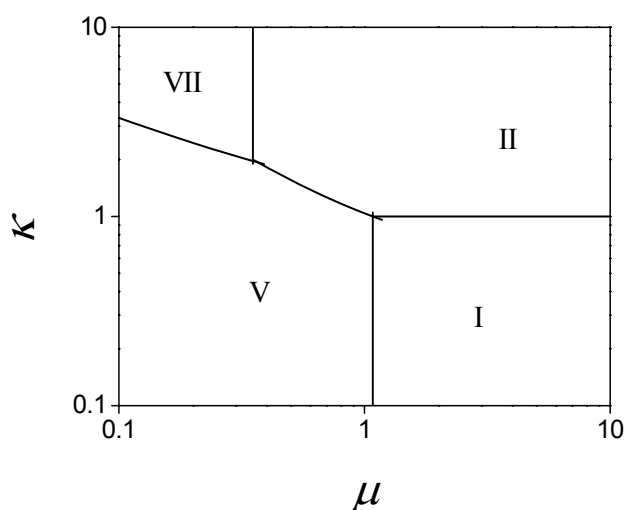
$\mu$  es igual al cociente entre  $[S]_{\infty}$  y una constante. Es decir, será una medida de  $[S]_{\infty}$ .

---

<sup>6</sup> Esta regularidad se logra luego de superar los espesores más bajos, donde la película tiene un fuerte registro del electrodo que modifica ligeramente estas propiedades.

$\gamma$  depende de parámetros constantes y de  $[S]_{\infty}$ . Si pensamos que el crecimiento de las películas será homogéneo,  $\gamma$  no aportará más información que nos brinda  $\mu$ .

Podemos construir un diagrama reducido de casos cinéticos bidimensional, sin incluir las variables  $\gamma$  (que no aporta más información) ni  $\eta$  (constante). Este se muestra en la figura 5.4.



**Figura 5.4:** Diagrama de casos cinéticos reducido para el sistema  $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os para las condiciones alcanzables consideradas en la tabla 5.2. Nótese que ambos ejes están en escala logarítmica.

El diagrama de la figura 5.4 se construyó usando las fórmulas para las fronteras entre los casos cinéticos [49] y los datos de la tabla 5.2.

Pensemos ahora qué pasaría, si decidimos trabajar con iguales *ladrillos*, pero modificando el pH de la solución de PAH-Os. De seguro cambiará  $k$ , y probablemente también lo harán los coeficientes de difusión. Sin embargo, todos los valores cambiantes, se mantendrán dentro del mismo orden de magnitud que en el primer análisis. En ese caso, la forma del diagrama se conservaría exactamente igual, se moverían un poco las fronteras, pero de seguro que no aparecerían nuevos casos cinéticos. Nótese la escala logarítmica de los ejes de valores  $\mu$  y  $\kappa$ , para cambiar de caso cinético es necesario cambiar los adimensionales al menos un orden de magnitud.

Un análisis en iguales términos, se impone respecto a los constantes  $k_{\text{cat}}$  y  $K_{\text{MS}}$ , ¿qué pasaría si, por ejemplo,  $k_{\text{cat}}$  cambiase de  $700$  a  $250\text{s}^{-1}$ ? La forma del diagrama seguiría conservándose<sup>7</sup>.

<sup>7</sup> No cabe analizar el caso donde se autoensamblan polímero a partir de soluciones de distinto pH en distintos pasos de autoensamblado porque para aplicar el modelo de Bartlett-Pratt solo nos interesan las películas homogéneas.

No podemos soslayar la incertidumbre acerca de qué pasará respecto a nuestras suposiciones de regularidad en el crecimiento y propiedades de la película, cuando ensayemos espesores mucho mayores a los considerados en estudios previos. Resulta admisible, y hasta esperable, que al entrar en la mesoescala, algunas propiedades puedan verse modificadas. Volveremos sobre esto al analizar los resultados experimentales.

#### 5.4.1 Cinética limitada por la reacción enzima-mediador

Según el modelo [49], estaremos en esta situación cuando

$$k[Os_{(III)}] \ll k_E[S] \quad (5.16)$$

Es importante destacar que esta condición debe cumplirse en todo el volumen de la película, a cualquier distancia del electrodo. Las concentraciones expresadas en (5.16) ( $[Os_{(III)}]$  y  $[S]$ ) son concentraciones en función de la distancia al electrodo. Simulamos perfiles de concentración para una gran cantidad de electrodos suponiendo los valores de la tabla 5.2 y espesores variables. En todos los casos, el gradiente de concentración desarrollado por  $[Os_{(III)}]$  en la cercanía del electrodo es mucho más pronunciado que el gradiente de  $[S]$  al entrar en la película. Esto se explica por las velocidades moderadas de reacción enzimática y el mencionado desfasaje de tres órdenes de magnitud en los coeficientes de difusión de mediador y enzima. Para películas de 5  $\mu\text{m}$  de espesor o menos (los espesores por nosotros alcanzados fueron siempre menores), nunca observamos que  $[S]$  disminuyera por debajo del 90% de la concentración en el seno de la solución ( $s > 0.9$ ). Considerando también que  $[Os_{(III)}] \leq [Os_{(III)}]_0$ , podemos aproximar (5.16) por  $k[Os_{(III)}]_0 \ll k_E[S]_\infty$ .

Con los valores de la tabla 5.2 podemos decir que los primeros puntos de una curva de calibración tendrán cinética limitada por la reacción enzima-sustrato, mientras que los últimos corresponderán a enzima-mediador.

Nuevamente según el modelo, si la película es gruesa ( $\kappa > 1/\sqrt{\zeta}$ ), los datos experimental podrán ajustarse a la fórmula aproximada de caso II; mientras que si es delgada ( $\kappa < 1/\sqrt{\zeta}$ ), a la de caso I. Una vez más, para los valores de la tabla 5.2, una película podrá considerarse *gruesa*, aproximadamente a partir de  $l > 350\text{nm}$ .

#### 5.4.2 Cinética limitada por la reacción enzima-sustrato

Según el modelo [49], estos estaremos en esta situación cuando

$$k [Os_{(III)}] \gg k_E [S] \quad (5.17)$$

Acá también la condición debe cumplirse a cualquier distancia del electrodo.

Si se cumple (5.17) estaremos en el caso V si la película es delgada ( $\kappa < \frac{(1 + \mu)\eta^{1/2}}{(1 + \mu\eta)^{1/2}}$ ),

o en el caso IV, si es gruesa ( $\kappa > \frac{(1 + \mu)\eta^{1/2}}{(1 + \mu\eta)^{1/2}}$ ). Nótese que la clasificación de película

*delgada* o *gruesa*, depende de qué proceso estemos considerando. Sin embargo no resulta ahora tan sencillo estimar si (5.17) se cumple a cualquier distancia del electrodo, dado que el mediador se consume mucho más rápidamente que el sustrato.

La diferencia de tres órdenes de magnitud en los coeficientes de difusión. produce que en las películas gruesas expuestas a soluciones de baja concentración de sustrato, la cinética se encuentre limitada por la reacción enzima-sustrato en la cercanía del electrodo donde la concentración de mediador es alta, y se invierta a enzima-mediador conforme nos alejamos del electrodo, debido al agotamiento en la concentración de mediador. Este comportamiento de transición vimos que corresponde al caso límite VII. Las dos zonas de cinéticas limitadas por distintos procesos se esquematizan en la figura 5.1.i. No es posible entonces con este sistema alcanzar condiciones tales donde se agote el sustrato dentro de la película, como requiere el caso límite IV.

### 5.4.3 Inaccessibilidad de los casos III, IV y VI

Como muestra la figura 5.4, no es posible alcanzar experimentalmente los casos III, IV y VI para el sistema  $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os (sin importar cuántas capas crezcamos o cuánto forcemos el pH de las soluciones de autoensamblado).

Esto se debe principalmente a la difusión mucho más rápida de la glucosa respecto al mediador, y en una segunda instancia al relativamente alto valor de  $k$ . En términos adimensionales  $\eta \gg 1$ .

Ya vimos que  $\eta = 1$  indica que los consumos de mediador y sustrato están igualados. Para  $\eta \gg 1$ , la reducción del mediador es mucho más importante que el consumo de sustrato. Es decir, que si en nuestro sistema  $\eta \approx 400$ , nunca alcanzaremos esos casos porque estamos muy lejos de sus fronteras [49]:

El caso IV requiere  $\eta < 1$ .

El caso III requiere  $\kappa \gg 1$  y  $\kappa/\eta^{1/2} \gg 1$ .

Como mostramos anteriormente, una película de 40 bicapas, crecida con un polímero de baja densidad de carga lineal, tiene  $\kappa = 8.4$  (es decir,  $\kappa/\eta^{1/2} = 0.27$ ). Tendríamos que autoensamblar un electrodo de muchas más bicapas para llegar a caso III. El principal problema en este caso, sería comprobar si la enzima permanece catalíticamente activa inmovilizada en el autoensamblado durante los varios días que llevaría preparar el electrodo considerado (más de 100 bicapas). Además habría que ver cómo influyen en un electrodo tan grueso las propiedades de mesoescala.

En 5.4.2 ya vimos por qué no es alcanzable el caso IV.

La figura 5.3.a, extraída del trabajo original de Bartlett y Pratt muestra cómo varía la forma del diagrama de casos cinéticos al variar  $\eta$ . Se observa que al variar  $\eta$  entre 10 y  $10^3$ , el caso IV desaparece.

## 5.5 Resultados experimentales

Para probar el modelo de casos cinéticos de Bartlett-Pratt se prepararon electrodos modificados por autoensamblado electrostático de multicapas de  $\text{MPS}/(\text{PAH-Os}/\text{GO}_x)_m$  de espesor variable, es decir a través de número de pasos de adsorción ( $m$ ) crecientes.

En función de los resultados mostrados en el capítulo 4 de la presente tesis, había que decidir a qué pH y fuerza iónica de la solución de polímero se iba a trabajar. Para acelerar el crecimiento de las multicapas se eligió trabajar a alto pH de solución (pH = 9.2) y baja fuerza iónica, donde la densidad de carga lineal del polímero es más baja. En estas condiciones, en cada paso se adsorbe una gran cantidad de polímero (en conformaciones de ovillo) y enzima. Estas condiciones de adsorción producen películas que crecen muy rápidamente con el número de pasos de adsorción, posibilitando la formación de películas donde se desarrollarán perfiles de concentración dentro de las mismas.

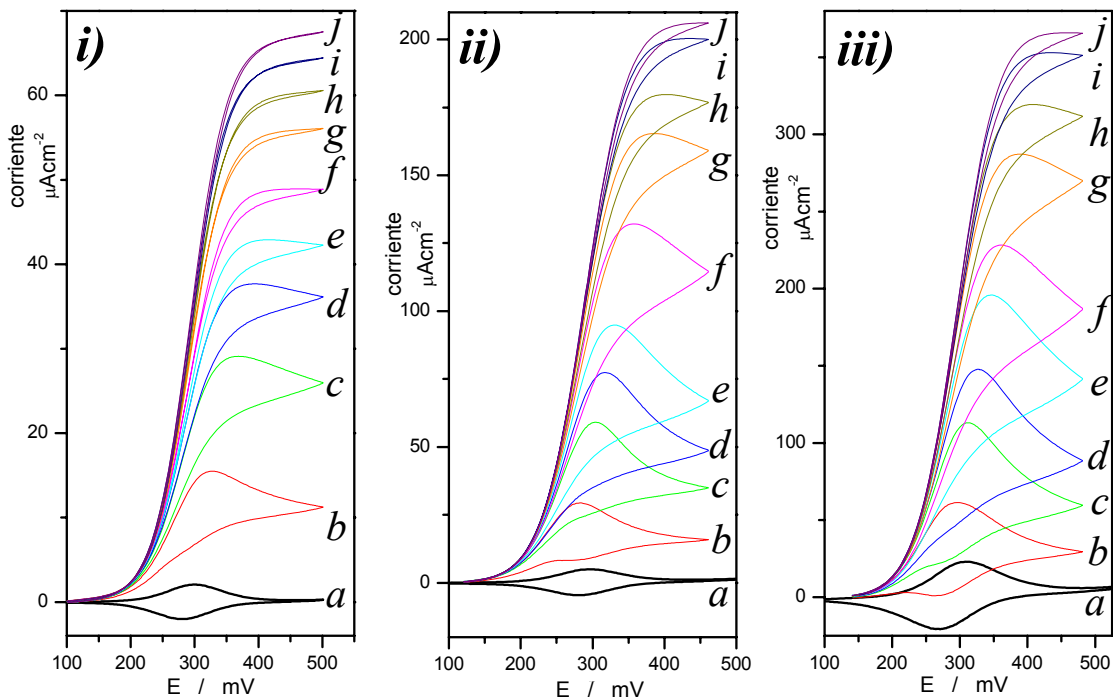
Se estudió la respuesta amperométrica en función de:

- a) el espesor de las películas autoensambladas;
- b) la concentración de glucosa;
- c) el potencial redox, que a su vez controla la concentración de Os(III).

A partir de ahora, y en la descripción de experimentos a lo largo del presente capítulo, cuando usemos los términos *diferentes electrodos*, nos estaremos refiriendo siempre a electrodos de distinto espesor.

Para cada uno de los electrodos preparados se analizó la respuesta en función de la concentración de glucosa mediante experimentos de voltametría cíclica a baja velocidad de barrido ( $5\text{mVs}^{-1}$ ), realizando agregados sucesivos de glucosa a la solución. En todos los casos se analizó la respuesta amperométrica en buffer TRIS  $0.1\text{M} + 0.12\text{M KNO}_3$ ,  $\text{pH} = 7.2$ . Entonces, para cada electrodo, tenemos datos correspondientes a aproximadamente 15 experimentos de voltametría cíclica. En la figura 5.5 se muestran tres ejemplos de tales resultados: una película relativamente delgada (espesor =  $87\text{nm}$ ), una de espesor intermedio ( $242\text{nm}$ ), y una película bien gruesa ( $1.15\mu\text{m}$ ).

A la luz de los resultados mostrados en el capítulo 3 de esta tesis, verificamos que no se observaran procesos de inactivación enzimática para la enzima inmovilizada y el diseño experimental propuesto. En este sentido, ensayos sucesivos sobre el mismo electrodo a lo largo de dos horas, a intervalos regulares de 15 minutos, y concentración de glucosa constante mostraron voltagramas perfectamente reproducibles y superponibles. El ensayo se repitió a distintas concentraciones de glucosa verificándose en todos los casos el mismo comportamiento.



**Figura 5.5:** Ejemplo de voltametrías cíclicas sobre tres electrodos de distinto espesor de película. En todos los casos, velocidad de barrido  $5\text{mVs}^{-1}$ , buffer TRIS  $\text{pH}=7.2$ . Nótese las diferentes escalas en el eje y.

- i):**  $87\text{nm}$ ,  $[S]_{\infty}$  en mM a) 0.0; b) 0.8; c) 1.7; d) 2.5; e) 4.2; f) 5.8; g) 9.9; h) 14.0; i) 22.0; j) 37.7  
**ii):**  $242\text{nm}$ ,  $[S]_{\infty}$  en mM a) 0.0; b) 1.0; c) 2.0; d) 3.0; e) 4.0; f) 8.0; g) 12.8; h) 17.7; i) 27.2; j) 36.6  
**iii):**  $1.15\mu\text{m}$ ,  $[S]_{\infty}$  en mM a) 0.0; b) 1.0; c) 2.0; d) 3.0; e) 5.0; f) 7.0; g) 11.9; h) 16.7; i) 26.3; j) 35.7

Los voltagramas de la figura 5.5 brindan mucha información que trataremos de ir desglosando a lo largo de este capítulo. Para los tres electrodos mostrados, se tienen también voltagramas a mayor concentración de sustrato. Estos voltagramas poseen la misma forma que el voltagrama de mayor concentración mostrado en cada caso, y el incremento en corriente respecto al mismo es muy pequeño, lentamente se alcanza un *plateau* de corriente máxima. No mostramos estos datos para no sobrecargar visualmente la figura, dado que consideramos que no aportan más información.

### 5.5.1 Análisis de los voltagramas cíclicos

Primeramente, observamos que electrodos de distinto espesor tienen respuestas amperométricas distintas a igual concentración de sustrato, lo cual ya había sido reportado [155].

En segundo lugar, resulta evidente que casi todos los voltagramas cíclicos presentan histéresis, el barrido en sentido catódico no es superponible al barrido en sentido anódico. Este fenómeno resulta mucho más marcado a mayor espesor de la película. Por ejemplo, en *i*) en los voltagramas a mayor concentración de glucosa casi no se aprecia histéresis (nada en *j* e *i*, y muy poco en *h* y *g*). En *ii*) es ligeramente inferior que en *iii*), pero muy superior que en *i*).

En el otro extremo de concentraciones de glucosa, observamos que la forma de los voltagramas no responde a curvas catalíticas bien definidas, sino que en los tres electrodos se observa que los primeros voltagramas presentan un pico de corriente máxima durante el barrido anódico. Comparando los voltagramas de los tres electrodos, observamos que la forma de pico es menos marcada y desaparece a concentraciones más bajas de glucosa en el electrodo *i*) que en *ii*) y en *iii*).

Además a bajas concentraciones en los voltagramas de los electrodos *ii*) y *iii*) se observan también un pico durante el barrido catódico. Estos picos son mucho más marcados en el electrodo más grueso, *iii*).

Los voltagramas con forma de pico que hemos descrito no representan procesos en estado estacionario. Las voltametrías que en presencia de sustrato no dan curvas verdaderamente catalíticas, podrían explicarse por tres procesos distintos:

a) Cambio de pH dentro de la película, debido a los protones producidos por la regeneración no aeróbica de la enzima, como se discutió en el capítulo 3. Recordemos que las constantes cinéticas son fuertemente dependientes del pH.

b) Mucha mayor actividad redox de los centros Os que no cablean enzima (corriente *pseudo* capacitiva) que actividad redox relacionada con cableado enzimático. Es decir, la corriente experimentalmente observable sería la suma de dos procesos paralelos:

$$i = i_{cat} + i_{dif} \quad (5.18)$$

donde  $i_{cat}$  representa corriente derivada de cableado enzimático e  $i_{dif}$ , corriente derivada de procesos *pseudo* capacitivos.

c) Agotamiento de sustrato dentro de la película. Aquí podemos separar dos casos marcadamente diferentes:

c.1) Agotamiento de sustrato dentro de la película enzimática, mientras que el sustrato en la solución adyacente a la misma permanece a igual concentración que en el seno de la solución.

c.2) El sustrato se agota en la solución adyacente a la película. La difusión en la solución, no es lo suficientemente rápida para reponer el sustrato que consume la película. El agotamiento fuera de la película, acarrea consecuentemente agotamiento dentro de la película.

Analicemos la viabilidad de cada uno de estos procesos.

### 5.5.1.a Cambios internos de pH

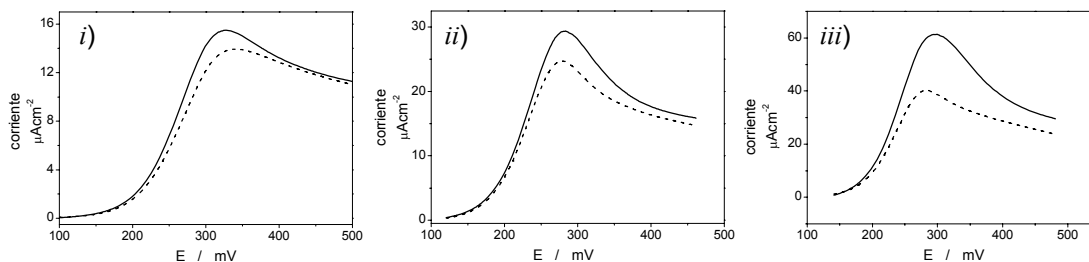
El punto a) es fácil de descartar. Si esta fuera la causa de la caída en corriente, esta caída debería ser mayor a alta concentración de sustrato que a baja, debido a la mayor actividad enzimática. Por el contrario, son justamente esas voltametrías las que presentan aspectos catalíticos puros, sin picos.

### 5.5.1.b Presencia de corrientes *pseudo* capacitivas

Si la forma de pico de los voltagramas se debiese a la presencia de corrientes *pseudo* capacitivas, de la ecuación (5.18) vemos que podría recuperarse una curva catalítica de aspecto sigmoideo restando punto a punto al voltagrama en presencia de sustrato, los datos del voltagrama en ausencia de sustrato. La figura 5.6 muestra la resta de los dos voltagramas para la concentración de glucosa más baja para cada una de las películas analizadas. Allí vemos que el voltagrama resta no corresponde a una curva catalítica pura, en ninguno de los tres casos.

Por lo tanto, descartamos la presencia de corrientes *pseudo* capacitivas como responsables de la forma de los voltagramas a baja concentración de sustrato.





**Figura 5.6:** Voltagramas cíclicos originales a baja concentración de sustrato (línea de trazo continuo), y voltagramas obtenidos después de restar punto a punto al CV original el CV en ausencia de sustrato (línea de trazo cortado). Se muestran solamente los barridos en sentido anódico. Mismas mediciones experimentales que en la figura 5.5. *i)* espesor = 87nm,  $[S]_{\infty} = 0.8\text{mM}$ ; *ii)* espesor = 242nm,  $[S]_{\infty} = 1.0\text{mM}$ ; *iii)* espesor = 1.15 $\mu\text{m}$ ,  $[S]_{\infty} = 1.0\text{mM}$

### 5.5.1.3 Agotamiento de sustrato dentro de la película

Notemos una vez más la diferencia entre los procesos sugeridos en c.1) y c.2). En ambos casos se desarrollarían perfiles de concentración para el sustrato en el interior de la película. Sin embargo, en c.2) estos serían consecuencia de un factor externo, la difusión en la solución adyacente a la película no es lo suficientemente rápida para reponer el sustrato que la película consume

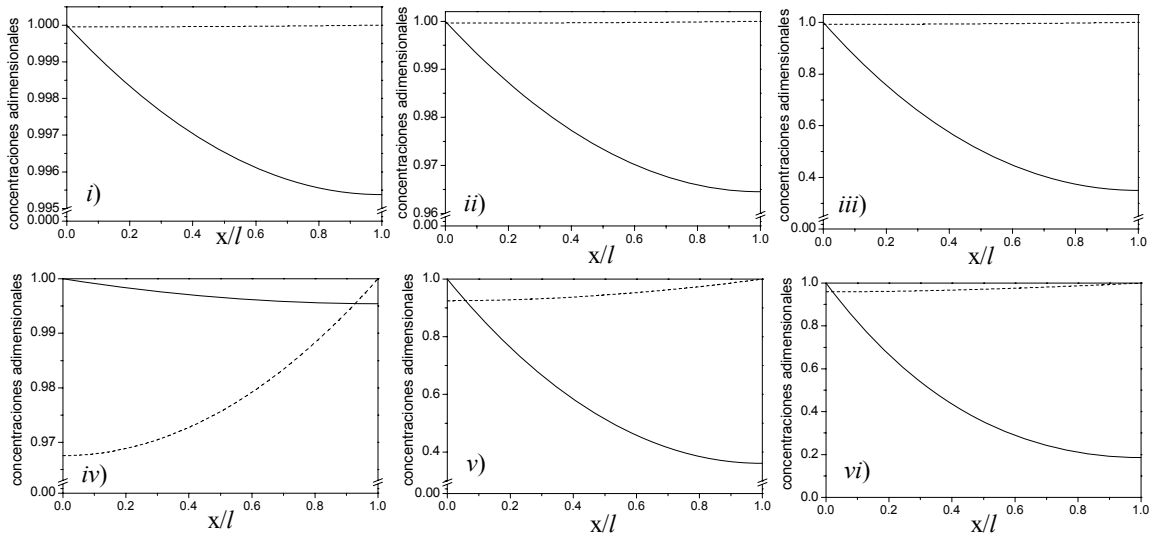
En cuanto al punto c.1), podemos discutir el mismo en función de los resultados de perfiles de concentración simulados. Como vimos en el capítulo 2, tenemos la capacidad de resolver numéricamente las ecuaciones diferenciales que describen el sistema acoplado de difusión-reacción en el estado estacionario y obtener los perfiles de concentración dentro de la película.

La figura 5.7 muestra estos perfiles haciendo uso preliminar de los parámetros dados en la tabla 5.2. Estos perfiles son tan solo una aproximación al sistema, pero bastarán para tener una idea cualitativa de qué sucede en el interior de las películas y considerar plausible o no la hipótesis dada en c.1).

Los perfiles calculados se corresponden con las concentraciones de glucosa más bajas usadas. Obsérvese que en ninguno de los casos se observa agotamiento del sustrato apreciable dentro de la película (mientras que sí se observa agotamiento del mediador).

En los tres primeros paneles (*i* a *iii*) se muestran los perfiles simulados haciendo uso de  $D_S = 6.72 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  para el coeficiente de difusión de la glucosa dentro de la película. Hemos discutidos más arriba y en el capítulo 4, por qué creemos que este valor es una buena aproximación al verdadero valor del coeficiente de difusión a través de la película.

Sin embargo, y para no dejar dudas acerca de por qué creemos que el problema no es la difusión de sustrato dentro de la película, también recalculamos las simulaciones para valores más bajos de coeficiente de difusión.



**Figura 5.7:** Perfiles de concentración simulados para tres películas de espesores como los de la figura 5.5; *i*) y *iv*) 87nm; *ii*) 242nm; *iii*), *v*) y *vi*) 1.15µm. En los seis casos, línea continua (—) perfil del mediador ( $[Os_{(III)}]/[Os_{\Sigma}]$ ) y línea punteada (---) perfil de D-glucosa ( $[S]/K_S[S]_{\infty}$ ). Tanto las concentraciones como el espesor de la película se grafican normalizados (adimensionalizados). Parámetros adimensionales usados: *i*)  $\kappa = 0.225$ ,  $\gamma = 4.3$ ,  $\eta = 400$ ,  $\mu = 0.04$ ; *ii*)  $\kappa = 0.625$ ,  $\gamma = 4.3$ ,  $\eta = 400$ ,  $\mu = 0.04$ ; *iii*)  $\kappa = 2.970$ ,  $\gamma = 4.3$ ,  $\eta = 400$ ,  $\mu = 0.04$ ; *iv*)  $\kappa = 0.225$ ,  $\gamma = 4.3$ ,  $\eta = 0.6$ ,  $\mu = 0.04$ ; *v*)  $\kappa = 2.970$ ,  $\gamma = 4.3$ ,  $\eta = 40$ ,  $\mu = 0.04$ ; *vi*)  $\kappa = 2.970$ ,  $\gamma = 1.4$ ,  $\eta = 40$ ,  $\mu = 0.12$ . Nótese las diferentes escalas en el eje y.

Calculamos los perfiles de concentración usando un coeficiente de difusión un orden de magnitud menor:  $D_S = 6.72 \times 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ . Para las películas de espesor delgado e intermedio (89 y 242 nm) no se observaron diferencias apreciables en los perfiles de concentración a la concentración de glucosa más baja usada respecto a los perfiles mostrados en *i*) y *ii*) (no se muestran estos datos). Para la película más gruesa (1.15µm) se observó un ligero agotamiento de sustrato en el estado estacionario a la concentración de glucosa más baja, como puede observarse en el panel *v*) de la figura 5.7. La concentración de glucosa cae en la superficie del electrodo un 4% respecto al valor en solución, que no explicaría, en principio, la mucho mayor caída de corriente observada. Además, conforme aumentamos la concentración de sustrato, este agotamiento se recupera mucho más rápidamente que la corriente. Obsérvese el panel *vi*) de la figura 5.7, donde para el mismo electrodo se simulan los perfiles de concentración para  $[S]_{\infty} = 3.0 \text{mM}$ . La caída de concentración de glucosa sobre el electrodo es tan solo del 2%,

mientras que si se observa el voltagrama correspondiente, la caída en corriente más allá del pico es mucho mayor.

Finalmente el panel *iv)* de la figura 5.7 muestra que para la película más delgada, puede forzarse aún a valores mucho más bajos el coeficiente de difusión de la glucosa sin observarse agotamiento apreciable en la concentración de sustrato. En este caso, se simuló los perfiles para  $D_S = 1.0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  observándose una caída en la concentración de sustrato de tan solo 3.2% respecto al valor en solución.

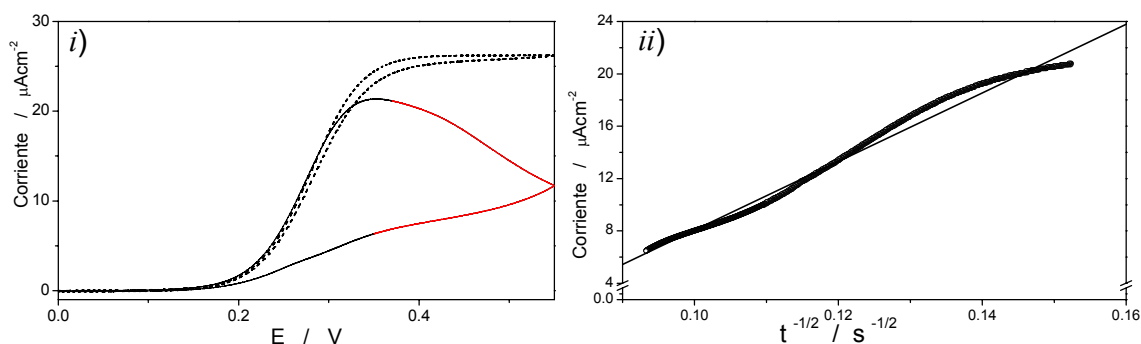
Dados los resultados de las simulaciones mostradas, descartamos que la forma de los voltogramas cíclicos se deba al desarrollo de perfiles de concentración en las películas independientes de la concentración en la solución adyacente.

### 5.5.1.c.2 Agotamiento de sustrato en la solución adyacente a la película

Analicemos más detenidamente el agotamiento del sustrato en la solución adyacente al electrodo como hipótesis.

Si se estuviesen desarrollando perfiles de concentración debido al agotamiento de sustrato en la solución adyacente al electrodo, podría intentar mejorarse la llegada de sustrato a la película mediante el uso de convección forzada, empleando un electrodo rotatorio.

Los resultados de un experimento de voltametría cíclica a baja concentración de sustrato usando un electrodo rotatorio se muestran en la figura 5.8.i.



**Figura 5.8:** *i)* Voltagramas cíclicos tomados a  $5\text{mVs}^{-1}$  a baja concentración de sustrato (1.4mM) para un electrodo de 75nm de espesor. Línea continua (—) sin rotar el electrodo; línea punteada (···) rotando el electrodo a 5.3Hz. *ii)* Gráfico de Cottrell: corriente en función de la inversa de la raíz cuadrada del tiempo, y mejor ajuste de los datos experimentales a una recta. Se graficó la porción de datos que se muestra en el gráfico de la izquierda en rojo. Estos son los datos que creemos afectados por la difusión de la glucosa en la solución adyacente a la película.

Un análisis preliminar de la figura 5.8.i indica que se estaría produciendo un agotamiento de sustrato en la solución adyacente a la película, dado que el uso de convección forzada cambia radicalmente la forma del voltagrama: el pico anódico desaparece, se alcanza una corriente mayor a la del pico en el caso del primer voltagrama y casi no hay histéresis entre barridos en sentido anódico y catódico.

Veamos cómo el siguiente análisis propuesto por Bard [12] sustenta nuestra hipótesis. Bard introduce el concepto de *corriente límite* o *corriente característica* para analizar y diagnosticar pasos limitantes en sistemas complejos controlados por muchas variables (por ejemplos, procesos que ocurren sobre electrodos modificados). La corriente límite, es un concepto, no es una corriente experimentalmente medible bajo alguna circunstancia experimental en particular. Se trata de la corriente que podría medirse si un proceso dinámico individual controlara la velocidad global enteramente por sí mismo. Se pueden encontrar expresiones analíticas para estas corrientes, suponiendo, que todos los demás pasos son infinitamente rápidos, en comparación al proceso de interés.

Entonces en nuestro caso, la corriente límite difusional, sería la corriente alcanzable si la partición de sustrato entre la película y la superficie, los procesos difusionales en el interior de la película, las reacciones enzimáticas, y la reacción heterogénea sobre el electrodo, fueran todas mucho más rápidas que la llegada de glucosa a la película. En este caso, toda la glucosa que llegase a la misma, generaría una corriente eléctrica. Bajo control difusional, esta corriente sería la dada por la ecuación de Cottrell:

$$i = \frac{nFD_R^{1/2}C_R^\infty}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (5.19)$$

ecuación escrita para una especie que se oxida sobre el electrodo, donde  $C_R^\infty$  es la concentración de dicha especie en el seno de la solución y  $D_R$  su coeficiente de difusión. La ecuación (5.19) predice que la corriente decae linealmente con la inversa de la raíz cuadrada del tiempo,  $t$ , a partir del cual se perturba el sistema mediante la aplicación de un potencial adecuado.

Para calcular la corriente límite, tenemos el tiempo inicial como incerteza. Es decir en qué momento preciso la película empieza a demandar mayor concentración de glucosa. A la ecuación (5.19) se llega por integración de la segunda ley de Fick para un proceso bien definido en el tiempo. En nuestro caso, nuestros valores de corriente en función del tiempo no provienen de experimentos de salto de potencial o cronoamperometría, sino de voltagramas cíclicos. La demanda de glucosa por parte de la película crece

gradualmente, conforme aumenta la concentración de sitios de Os(III) al incrementar el potencial. Por lo tanto es difícil asignar un tiempo 0 a nuestros datos. Decidimos calcular la corriente límite considerando como tiempo 0 el momento en que empieza a aumentar apreciablemente la corriente en el voltagrama, aproximadamente 170mV.

Esta corriente límite se muestra en la figura 5.9 comparada a la corriente experimental.

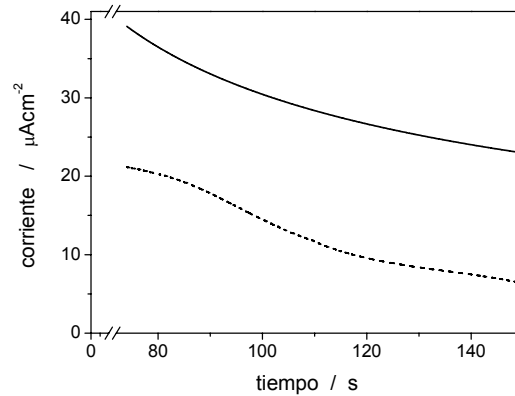


Figura 5.9: Comparación entre la corriente experimental (línea de trazo cortado) y la corriente límite teórica calculada (línea de trazo continuo).

Vemos que la corriente límite es aproximadamente el doble de la corriente por nosotros medida. Esto indica, que el control global de todos los procesos que afectan la generación de señal eléctrica sobre el electrodo, está cerca del límite impuesto por la difusión. No podemos menospreciar este proceso limitante.

En función de la corriente límite, podríamos estimar cuál es la concentración de glucosa en la interfase película-solución:

$$\frac{[S]_{sup}}{[S]_{\infty}} = \left( 1 - \frac{i_{exp}}{i_{lim}} \right) \quad (5.20)$$

donde  $[S]_{sup}$  representa la concentración de glucosa en el límite externo de la película y,  $i_{exp}$  e  $i_{lim}$  la corriente medida experimentalmente y la corriente límite calculada. La concentración de glucosa en el exterior de la película, ronda entre el 40 y el 70% del valor en el seno de la solución, para las concentraciones más bajas de sustrato. Mostrando que efectivamente se estaría generando un perfil de concentración de sustrato, que en el tiempo de la voltametría cíclica no alcanza un estado estacionario y que explicaría muy bien la forma de los voltagramas experimentales.

Finalmente, como la ecuación de Cottrell [12] predice cómo varía la corriente sobre un electrodo plano infinito cuando la llegada de especie electroactiva al electrodo está

únicamente controlada por difusión física (en ausencia de convección), analizamos cómo es la dependencia de nuestros datos con la inversa de la raíz cuadrada del tiempo.

Si en nuestros voltagramas, la caída en corriente (en ausencia de convección) se debiese a un proceso difusional, esperaríamos que la corriente decayese con la inversa de la raíz cuadrada del tiempo. La figura 5.8.ii muestra este gráfico para la porción de nuestros datos que creemos se ve afectada por difusión y el ajuste lineal de los mismos. Se observa también el buen ajuste de los datos a una recta.

Una vez más surge el problema de la asignación de tiempo 0 a los datos. Elegimos la misma convención que antes (tiempo 0, donde comienza el incremento apreciable de corriente). Cabe destacar que tomando otros tiempos, por ejemplo el tiempo 0 del voltagrama o el tiempo del potencial a media altura, en todos los casos se obtiene un muy buen ajuste lineal en el gráfico de corriente en función de la inversa de la raíz cuadrada del tiempo (por supuesto cambia la pendiente). Téngase en cuenta además, que por lo general se considera que más allá de los 10 segundos, empiezan a observarse efectos de convección natural, que producen que la ecuación de Cottrell no sea una descripción exacta del sistema. Hechas estas salvedades, de la pendiente del gráfico mostrado en 5.8.ii podemos estimar un coeficiente de difusión. En nuestro caso obtuvimos  $D_R = 7.5 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  (utilizando otros valores de pendiente obtenidas modificando el tiempo 0, se obtienen en todos los casos coeficientes de difusión que están siempre en este orden de magnitud). Este valor es muy cercano al valor reportado para la glucosa en solución y creemos que es otro muy buen indicio de que la forma de nuestros voltagramas se debe a procesos difusionales en el exterior de la película.

### 5.5.2 Balance de ventajas y desventajas en el uso del electrodo rotatorio

La figura 5.10 muestra un experimento de cronoamperometría con electrodo rotatorio durante el cual se hicieron agregados sucesivos de glucosa para estudiar la respuesta amperométrica en todo el intervalo de concentraciones en condiciones de convección forzada. En línea de trazo negro se muestra la fracción del experimento llevada a cabo mientras se rotaba el electrodo, y en trazo rojo se muestra un pequeño lapso (alrededor de tiempo = 130 s) y el final del experimento durante los cuales se interrumpió la rotación. Cada salto (escalón) corresponde a nuevos agregados de glucosa para aumentar su concentración <sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> Los picos agudos corresponden a la breve inestabilidad del sistema, luego de un nuevo agregado y mientras se burbujea Ar por unos pocos segundos para homogeneizar la solución.

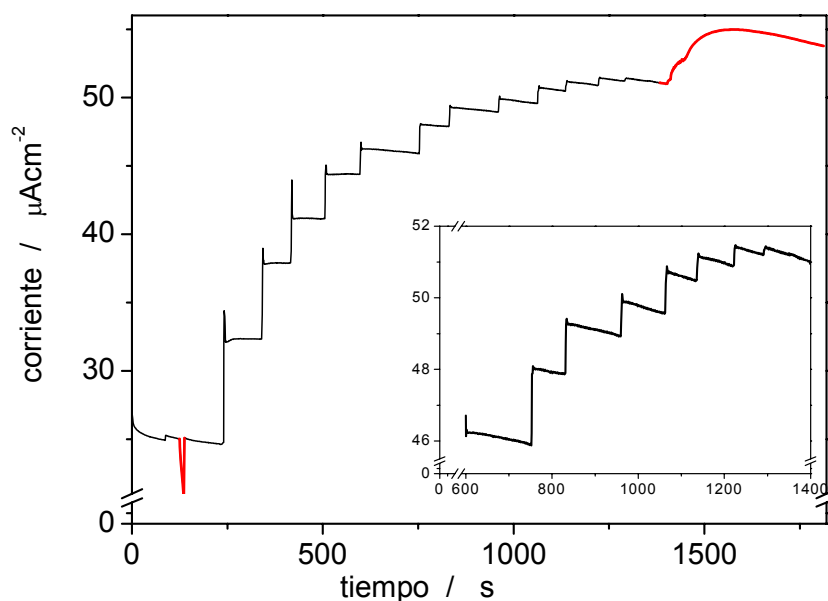


Figura 5.10: Cronoamperometría a 450mV sobre un electrodo de 75nm de espesor sobre el que se realizaron agregados sucesivos de glucosa sin detener el experimento.  $[S]_{\infty} = 1.4\text{mM}$  a tiempo 0 s y  $[S]_{\infty} = 96.8\text{mM}$  a tiempo 1400 s, pasando por concentraciones intermedias. La línea negra muestra la fracción del experimento durante la cual se rotó electrodo a 5.3Hz. La línea roja muestra la fracción del experimento con electrodo estático. En el inserto se muestran a mayor escala los agregados de glucosa para los cuales se observa caída de la corriente.

A partir del segundo agregado hasta aproximadamente 600 s se observa que la respuesta en corriente es constante después de cada nuevo agregado de glucosa. Se observa además que interrumpir la rotación produce una brusca caída de la corriente (pico en rojo mencionado anteriormente), la cual se recupera al reestablecer la rotación. En concentración de glucosa ( $[S]_{\infty}$ ), estos puntos van desde 1.4 mM hasta 13.7 mM.

A partir de aproximadamente 600 s y hasta 1400 s se observan que después de nuevos agregados de glucosa la corriente salta a un valor más alto pero no se estabiliza en el mismo (como sí lo hacía antes de 600 s) sino que cae lenta y constantemente. Estos agregados sucesivos de glucosa llevan la concentración ( $[S]_{\infty}$ ) desde 18.8 mM hasta 96.8 mM. El inserto de la figura 5.10 muestra a mayor escala estos datos.

A tiempo 1400 s se interrumpió definitivamente la rotación y se siguió registrando la corriente durante algunos minutos más. Sorpresivamente la corriente aumentó aproximadamente 8%, llegó a un máximo y después comenzó a caer lentamente. Experimentos similares sobre otros electrodos (lapsos de rotación y estáticos intercalados) produjeron resultados similares. Después de un período de rotación del electrodo, al interrumpir la rotación, la corriente aumenta pronunciadamente, luego cae,

y después de varios minutos vuelve a subir, no estableciéndose nunca una corriente constante durante los más de 30 minutos en que se registró la corriente, manteniendo el electrodo estático y sin hacer nuevos agregados de glucosa. La corriente se mantuvo sin embargo siempre por sobre el valor obtenido rotando el electrodo.

Carecemos de mayor evidencia para explicar estas caídas en corriente. Podrían explicarse producto de la entrada de alguna especie a la película (en la solución hay sustrato, el producto perdido, el buffer y el electrolito soporte); o bien por pérdida acelerada por la convección de algún producto de la reacción. No descartamos tampoco la aparición de algún proceso de inactivación enzimática en estas condiciones como los discutidos en el capítulo 3. Podríamos en este punto diseñar experimentos que nos permitan tratar de entender qué ocurre al rotar y detener secuencialmente el electrodo durante experimentos de respuesta amperométrica. Sin embargo esto nos alejaría de nuestro objetivo principal que es tratar de movernos a través de los casos límite del modelo de Bartlett-Pratt.

### **5.5.3 Decisión acerca del diseño experimental definitivo y los datos a elegir para el análisis cinético posterior**

#### **5.5.3.1 Respuesta amperométrica**

A esta altura, creemos que el sistema es lo suficientemente complejo como para que el diseño experimental ideal exista.

Los experimentos sobre electrodos estáticos sufren la falencia de que a bajas concentraciones de glucosa se agota la concentración de sustrato en la solución cercana al electrodo, produciendo caídas en la corriente amperométrica.

Producir convección forzada mediante el empleo de un electrodo de disco rotante soluciona el problema del agotamiento de sustrato a bajas concentraciones del mismo, pero acarrea caídas de la corriente a altas concentraciones.

Una alternativa podría ser un diseño experimental mixto: producir convección forzada a bajas concentraciones de sustrato y usar un electrodo estático a medianas y altas concentraciones. No creemos que esta sea la óptima aproximación al problema. Recordemos, los resultados erráticos al detener la rotación comentados más arriba. Pensamos que es mejor mantener siempre las mismas condiciones experimentales, conociendo las falencias del método elegido, pero prefiriendo errores sistemáticos conocidos y, creemos, controlados.



Elegimos trabajar con experimentos de voltametría cíclica a baja velocidad de barrido manteniendo el electrodo estático.

Sabemos entonces que la respuesta amperométrica en función de la concentración de sustrato tendrá un cierto error experimental por defecto a bajas concentraciones de sustrato, y que probablemente este error será mayor cuando se incremente el espesor de la película debido al aumento de la actividad enzimática total.

Recordamos que el modelo de Bartlett-Pratt está formulado para una respuesta estacionaria. Es necesario elegir un valor de corriente, a partir de todos los aportados por un voltagrama cíclico (de aspecto no estrictamente de onda catalítica) para construir una curva de calibración de señal amperométrica en función de la concentración de sustrato. A partir de la comparación de los dos voltagramas presentados en la figura 5.8.i creemos que el menor error se obtendrá eligiendo el valor del pico de corriente máxima, que es el valor que más se aproxima al del voltagrama estacionario cuando se produce convección forzada.

Insistimos que sabemos que estamos trabajando con una incerteza sistemática, pero que creemos que la toma de datos sugerida es la mejor opción dada la evidencia presentada.

La figura 5.11 muestra algunas curvas de calibración representativas para electrodos de distinto espesor.

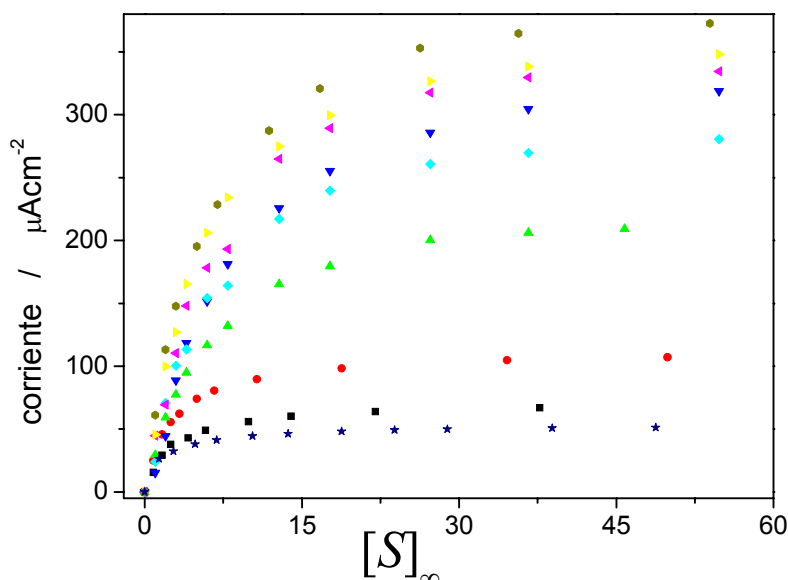


Figura 5.11: Algunas curvas representativas de respuesta amperométrica en función de la concentración de sustrato en el seno de la solución. Los puntos en distinto color y símbolo corresponden a películas de distinto espesor: azul oscuro: 75nm; negro: 87nm; rojo: 194nm; verde: 242nm; celeste: 302nm; azul: 351nm; rosa: 410nm; naranja: 613nm; marrón: 1.15μm

### 5.5.3.2 Espesores

Para comparar nuestros datos experimentales con el modelo es necesario en algunos casos comparar la respuesta en corriente en función del espesor de la película a demás variables constantes.

Las mediciones de espesor elipsométrico y de electrocatálisis enzimática se efectuaron sobre electrodos distintos. Necesitamos sin embargo conocer el espesor de las películas sobre las cuales hemos hecho mediciones de electrocatálisis.

Sobre todos los electrodos que se realizaron mediciones elipsométricas, se midió a continuación su carga redox (por cronoamperometría). A partir de estos datos tenemos curvas confiables de espesor elipsométrico en función de la carga redox.

Por otro lado, también podríamos relacionar el espesor elipsométrico al número de pasos de adsorción (de hecho el crecimiento regular de las multicapas, es la razón por la cual elegimos estos sistemas para probar un modelo de casos cinéticos). En ambos casos (espesor en función de la carga redox o del número de pasos de adsorción) la respuesta es lineal. Sin embargo, en el segundo caso se observa mucha más dispersión en los datos experimentales que en el primero.

Entonces preferimos correlacionar el espesor a la carga redox de las películas (medida siempre en ausencia de sustrato antes de las mediciones electrocatalíticas).

Un dato más que sustenta nuestra elección es la reproducibilidad obtenida con películas formadas por igual número de pasos de adsorción. La carga redox (cantidad de PAH-Os adsorbida) es reproducible dentro de un intervalo de aproximadamente el 15% de error. Sabemos que al trabajar con soluciones de menor pH la reproducibilidad es mayor, pero confiamos en compensar esta incerteza tomando como variable de crecimiento la carga redox.

En los casos donde en la fórmula aproximada aparece tanto el espesor de la película como la concentración en volumen de Os, dado que  $[Os_{\Sigma}]l = Os_{\Sigma}$  superficial, compararemos directamente la corriente con la carga superficial, sin mediar datos de espesor.

## 5.6 Análisis cinético de los resultados experimentales

Un primer y muy simplificado análisis posible de las curvas de calibración, es realizar una normalización genérica de las mismas.

Desde un análisis meramente fenomenológico, observamos que nuestras curvas de calibración ajustan bastante bien al siguiente comportamiento genérico:

$$i = \frac{i_{\max}}{1 + \frac{K_{MSapp}}{[S]_{\infty}}} \quad (5.21)$$

donde  $i_{\max}$  es la corriente máxima alcanzada para cada electrodo a saturación de sustrato; y  $K_{MSapp}$ , la constante de Michaelis-Menten aparente, definida como la concentración de sustrato a la cual se alcanza una corriente igual a la mitad de la corriente máxima. Podemos entonces normalizar los datos mostrados en la figura 5.11. La corriente se normaliza dividiendo por  $i_{\max}$ , mientras que la concentración de sustrato se divide por  $K_{MSapp}$ . En la figura 5.12.i se muestra la corriente normalizada en función de la concentración de sustrato, mientras que en 5.12.ii se normalizaron tanto la corriente como la concentración de sustrato.

Observemos que las curvas de calibración doblemente normalizadas, 5.12.ii, siguen perfiles sorprendentemente similares para los datos provenientes de electrodos de espesores muy diversos.

En cuanto a las curvas donde solamente normalizamos en corriente, 5.12.i, observamos que el patrón de las mismas también es muy similar, si bien es necesario destacar, que hay datos correspondientes a tres electrodos, que muestran un comportamiento ligeramente diferente, donde el crecimiento de la corriente normalizada parecería ser más rápido. Estos tres electrodos, son los más delgados de todos los mostrados.

Llevando el razonamiento un poco más allá, en términos de modelos de comportamiento de un sistema enzimático, el parámetro fenomenológico  $i_{\max}$ , tiene que ser una función de la concentración de enzima y de mediador superficiales (cantidad total de enzima y de mediador). Es decir, que al normalizar por la corriente máxima, estamos tratando de independizar nuestros datos de estas concentraciones, que sabemos son los parámetros que con seguridad cambian al construir electrodos de distinto espesor.

La normalización por  $K_{MSapp}$  se realizó para ver si se corregía la discrepancia en el crecimiento de la corriente para los electrodos más delgados. Los datos antes ligeramente divergentes se aproximaron bastante más a los restantes.

De este análisis fenomenológico preliminar, podemos concluir que las propiedades que caracterizan a las película, parecen mantenerse uniformes e invariantes conforme aumentamos el espesor de las mismas. Nos referimos a las constantes cinéticas, y a las

propiedades de partición, permeabilidad y difusión a través de las mismas, independientemente de la cantidad total de enzima y mediador redox. Esto es muy auspicioso, para probar la validez del modelo de Bartlett-Pratt sobre las mismas.

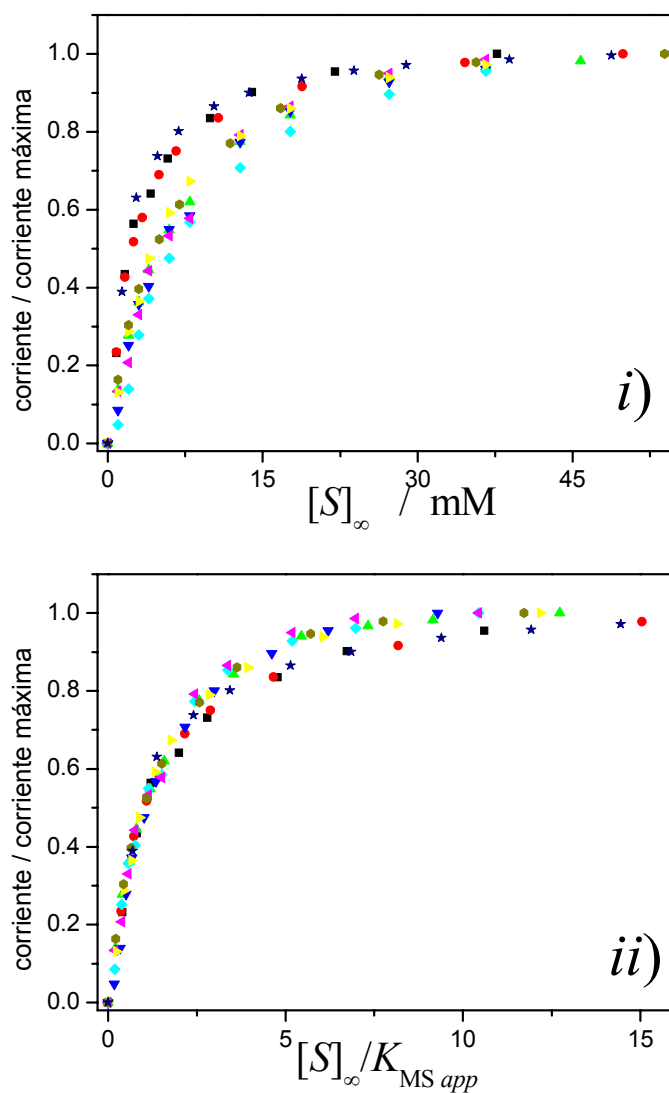


Figura 5.12: *i)* Corriente catalítica normalizada en función de la concentración de sustrato. *ii)* Corriente catalítica normalizada en función de la concentración de sustrato normalizada. Mismos datos experimentales que en la figura 5.11. Los puntos en distinto color y símbolo corresponden a películas de distinto espesor: azul oscuro: 75nm; negro: 87nm; rojo: 194nm; verde: 242nm; celeste: 302nm; azul: 351nm; rosa: 410nm; naranja: 613nm; marrón: 1.15µm

### 5.7 Ajuste de los datos experimentales al modelo de Bartlett-Pratt

Nuestro objetivo es analizar si los datos experimentales de corriente amperométrica para electrodos modificados mediante multicapas de MPS/(PAH-Os/GOx)<sub>m</sub> responden al comportamiento predicho por el modelo de Bartlett-Pratt.

El primer paso, es utilizar las fórmulas aproximadas y analizar si dentro de cada uno de los casos límite alcanzables, la respuesta amperométrica sigue la funcionalidad predicha por el modelo para cada variable. Idealmente, debemos mover estas individualmente, manteniendo constantes las restantes variables. Por ejemplo, si quisiéramos analizar el caso límite I,  $i = \zeta nFAa_e [A_\Sigma] k [E] l$ , ecuación (5.8), podríamos estudiar si mientras nos mantenemos dentro de las fronteras del caso, la corriente aumenta o no linealmente con el espesor.

Para hacer esto, es necesario presuponer, que los demás parámetros se mantienen aproximadamente constantes. Analizando el mismo ejemplo de caso I, sería necesario que la concentración de mediador total y de enzima y la constante de segundo orden  $k$ , o el producto de estos tres parámetros, se mantenga constantes.

El análisis fenomenológico hecho en 5.6 y la discusión dada en 5.4, nos está indicando que en una primera instancia podemos hacer esta suposición.

A su vez, comprobar el comportamiento predicho por el modelo, sería un indicio más de que estos otros parámetros se mantienen constantes.

Además del interés en analizar la aplicabilidad del modelo a nuestro sistema, sería muy valioso poder utilizar el mismo para extraer o confirmar valores de parámetros desconocidos (o para los cuales tenemos solamente estimaciones crudas).

Observando la tabla 5.1, vemos todas las variables que definen la corriente en los distintos casos. Los parámetros que conocemos con mayor certeza son la concentración en el seno de la solución del sustrato ( $[S]_\infty$ ), el espesor ( $l$ ) y la concentración en volumen de centros Os ( $[O_{S\Sigma}]$ ). Con una incerteza algo mayor, podemos estimar los dos coeficientes de difusión ( $D_e$  y  $D_s$ ), y la constante de partición  $K_S$  (ver comentarios posteriores a la tabla 5.2).

Los otros parámetros son las tres constantes cinéticas,  $K_{MS}$ ,  $k_{cat}$  y  $k$ , y la concentración en volumen de enzima cableada,  $[E]$ .

La concentración de enzima que aparece como parámetro en las simulaciones y en las fórmulas aproximadas del modelo de Bartlett-Pratt, es concentración de enzima *cableada*, no concentración de enzima total. No estamos usando subíndices especiales para referirnos a la enzima cableada con el objeto de modificar la notación del trabajo original lo menos posible. Sin embargo, en este capítulo, los parámetros  $[E]$  o  $\Gamma_E$  deben interpretarse siempre como referidos a la enzima *cableada*.

Creemos que nuestro mayor desconocimiento acerca del sistema es respecto a los parámetros  $k$  y  $[E]$ . Ya discutimos en los capítulos 1 y 4 cómo estos dos parámetros son los que más se modifican al cambiar la estructura de las películas.

Sería muy útil poder extraer valores para los parámetros  $k$  y  $[E]$  por ajuste a las fórmulas analíticas aproximadas y/o a las simulaciones.

Analicemos finalmente qué sucede con  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$ . Creemos que en comparación con  $k$  y  $[E]$  resulta mucho menos probable que los valores de  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$  cambien al modificar la estructura o el espesor de los autoensamblados. Dado que la glucosa es libre de difundir a través del autoensamblado, no vemos mayores razones para que los valores de constante se modifiquen de una estructura a otra. Si esta hipótesis fuese válida, entonces podríamos elegir un par de valores para las constantes, y realizar todos los ajustes al modelo ateniéndonos siempre al mismo par de valores. Si de un ajuste al modelo obtuviésemos un producto de parámetros que incluye alguno de estos dos valores, podemos asignar siempre el mismo valor a  $K_{MS}$  y/o  $k_{cat}$  para poder comparar los otros parámetros en distintos electrodos. Siguiendo los mismos lineamientos que en el capítulo 4, elegimos trabajar con  $K_{MS} = 25\text{mM}$  y  $k_{cat} = 700\text{s}^{-1}$ , para poder comparar nuestros resultados con trabajos previos.

## 5.7.1 Ajuste a las fórmulas analíticas aproximadas

### 5.7.1.1 Cinética limitada por la reacción enzima-mediador

La figura 5.13 muestra un gráfico de la respuesta amperométrica a saturación de glucosa en función de la concentración superficial de  $Os_{\Sigma}$  (donde  $Os_{\Sigma} = Os_{(III)} + Os_{(II)}$ ).

Vimos en 5.4.1 que trabajando a concentraciones de sustrato superiores a  $K_{MS}$  nos asegurábamos cinética limitada por la reacción enzima-mediador.

Observamos que en los primeros puntos la respuesta catalítica crece con la carga redox (espesor) para alcanzar un valor constante o *plateau* a partir de  $3nCc\text{m}^{-2}$  aproximadamente.

Vimos que los casos cinéticos que describen la cinética limitada por la reacción enzima-mediador son los casos I y II, para películas delgadas y gruesas respectivamente.

$$\text{Caso I} \quad i = \zeta nFAa_{\varepsilon} [A_{\Sigma}] k [E] l \quad (5.8)$$

$$\text{Caso II} \quad i = nFAa_{\varepsilon} [A_{\Sigma}] \sqrt{\zeta D_e k [E]} \quad (5.9)$$

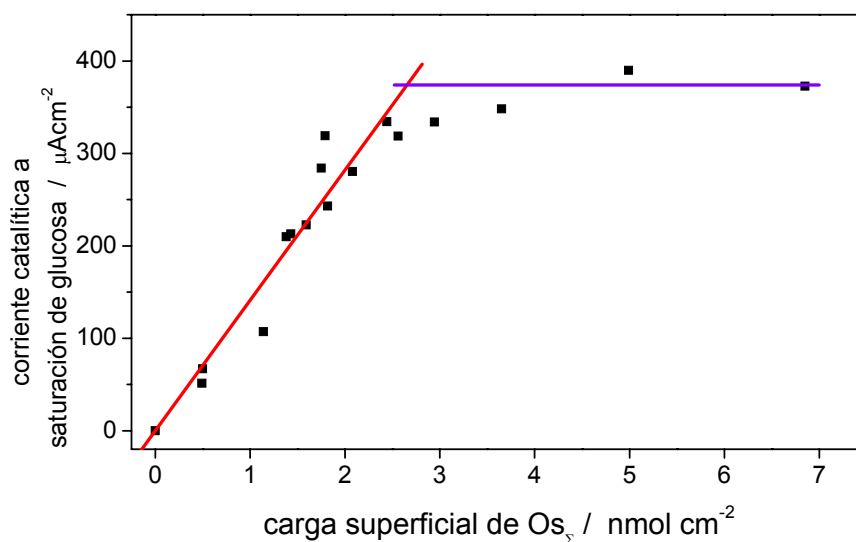


Figura 5.13: Corriente catalítica a saturación de glucosa en función de la carga superficial de  $Os_{\Sigma}$  para electrodos autoensamblados de distinto espesor. En rojo se observa el mejor ajuste de los datos experimentales a la fórmula de caso límite I. En azul se observa la corriente *plateau*, independiente del espesor de la película, aproximación de los datos experimentales a la fórmula de caso II

El mejor ajuste de los datos experimentales a una recta que pasa por el origen se muestra con la línea roja en la figura 5.13. De la pendiente puede extraerse el producto de  $k[E]$ .

Del *plateau* de la figura 5.13 (línea azul) puede extraerse el producto  $\sqrt{D_e k[E]}$ , usando como datos la concentración en volumen de centros de  $Os_{\Sigma}$ . También podemos estimar  $\sqrt{k[E]}$  si suponemos conocido el valor de  $D_e$  y comparar este valor con el hallado por la fórmula de caso I.

La tabla 5.3 resume los parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales a las fórmulas de los casos I y II.

ajuste a fórmula caso	parámetro
I	$k[E] = (0.8 \pm 0.1)s^{-1}$
II	$k[E] = (1.7 \pm 0.2)s^{-1}$
II	$D_e k[E] = (2.1 \times 10^{-9} \pm 0.2 \times 10^{-9})cm^2$

Tabla 5.3: Parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales a las fórmulas analíticas aproximadas de los casos I y II. Las incertezas corresponden únicamente al error de las regresiones lineales correspondientes.

El gráfico 5.13 muestra que para cinética limitada por reacción enzima-mediador y las variables estudiadas los datos experimentales siguen el comportamiento predicho por el modelo de Bartlett-Pratt. Este primer ajuste al modelo es una señal de que este sería en principio una buena descripción de los procesos que se producen dentro de la película enzimática. El buen ajuste es además un indicio de que las suposiciones que hemos realizado son válidas.

Creemos que la concordancia entre los parámetros hallados por ambas fórmulas aproximadas es muy buena.

### 5.7.1.2 Cinética limitada por la reacción enzima-sustrato

Vimos recientemente que para bajas concentraciones de sustrato en el seno de la solución pueden darse dos casos límites bien distintos.

El primer caso, se da cuando la baja concentración de sustrato produce que la cinética se encuentre limitada por la reacción enzima-sustrato en todo el volumen de la película enzimática. La película se comporta como una película *delgada*, donde ni sustrato ni mediador desarrollan perfiles difusionales apreciables. Este es el caso límite V.

En el segundo caso, observamos un comportamiento doble, los perfiles de concentración son marcadamente diferentes para el mediador y para el sustrato. En la parte más interna de la película, en las cercanías del electrodo, la cinética estará limitada por la reacción enzima-sustrato. Por el contrario, conforme nos alejamos del electrodo, la concentración de mediador se agota, y la cinética pasa a estar limitada por la reacción enzima-mediador. Este es el caso límite VII.

Este razonamiento se condice con el diagrama de la figura 5.2, donde se observa claramente que los electrodos más delgados (menor valor de  $\kappa$ ) caen dentro del caso cinético V, y los más gruesos en el VII.

Obsérvese también que una misma película puede considerarse delgada frente a un análisis a baja concentración de sustrato (clasificándose como perteneciente a caso V) y grueso, frente a un análisis a altas concentraciones (entrando en el caso II). Esto se debe al elevado valor del parámetro adimensional  $\eta$ . El diagrama resulta simétrico únicamente en el caso de  $\eta = 1$ , lo que se evidencia también al analizar los diagramas de casos genéricos que se muestran en las figuras 5.2 y 5.3.

Recordemos las fórmulas aproximadas de interés:

$$\text{Caso V} \quad i = \zeta nFA \frac{l[E]k_{cat}K_s[S]_{\infty}}{K_{MS} + K_s[S]_{\infty}} \quad (5.12)$$



$$\text{Caso VII} \quad i = nFA \sqrt{\frac{2\zeta a_{\varepsilon} D_{e^{-}} [A_{\Sigma}] k_{cat} [E] K_S [S]_{\infty}}{K_{MS} + K_S [S]_{\infty}}} \quad (5.14)$$

A bajas concentraciones de sustrato puede hacerse la aproximación  $[S]_{\infty} \ll K_{MS}$

$$\Rightarrow \frac{[S]_{\infty}}{[S]_{\infty} + K_{MS}} \approx \frac{[S]_{\infty}}{K_{MS}}$$

A partir de las fórmulas, esperaríamos los siguientes comportamientos para las curvas de calibración para cada electrodo individual (analizando toda la curva):

- a) respuesta lineal a baja concentración de sustrato, y luego constante a alta concentración (casos V y I o II);
- b) respuesta lineal con la raíz cuadrada de la concentración de sustrato, y luego constante a alta concentración (casos VII y II);

Naturalmente en todos los casos, habrá puntos experimentales que corresponderían a comportamientos intermedios.

Para decidir qué datos debemos ajustar a la fórmula de caso V y cuáles a VII podríamos usar la fórmula correspondiente a la frontera entre los dos casos[49],  $\kappa^2 = 2\gamma(1 + \mu)$

Esta fórmula es función de  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$ , acerca de cuyas incertezas ya hemos hablado bastante y de  $[E]$ , parámetro que estamos tratando de estimar. Preferimos no usar esta fórmula y estudiar la dependencia funcional de nuestros datos con  $[S]_{\infty}$ .

Para analizar la dependencia funcional de nuestros datos con  $[S]_{\infty}$ , resulta más conveniente realizar gráficos logaritmos. La pendiente de las distintas porciones del gráfico (pendiente 1,  $\frac{1}{2}$  o 0) indicará a qué modelo se ajusta mejor la cinética observada. Algunos gráficos representativos pueden observarse en la figura 5.14.

Sólo se muestran los primeros puntos, puesto que después la linealidad se pierde rápidamente. Para los electrodos más delgados, es menor el número de puntos que ajustan a una recta que para los electrodos más gruesos.

Se observaron dos tipos de comportamiento distintos. Para los electrodos cuyos datos se muestran en 5.14.i, (y para otros no mostrados acá) se obtuvieron pendientes de valores entre 0.73 y 0.90 aproximadamente. Por otro lado, para los dos electrodos más gruesos de los cuales tenemos datos en función de la concentración de sustrato, observamos que las pendientes fueron menores, y muy cercanas a 0.5, estos datos se muestran en la figura 5.14.ii, en estos casos, no se grafico el dato de concentración de corriente más baja, dado que este no ajustaba a la misma recta que el resto de los puntos.

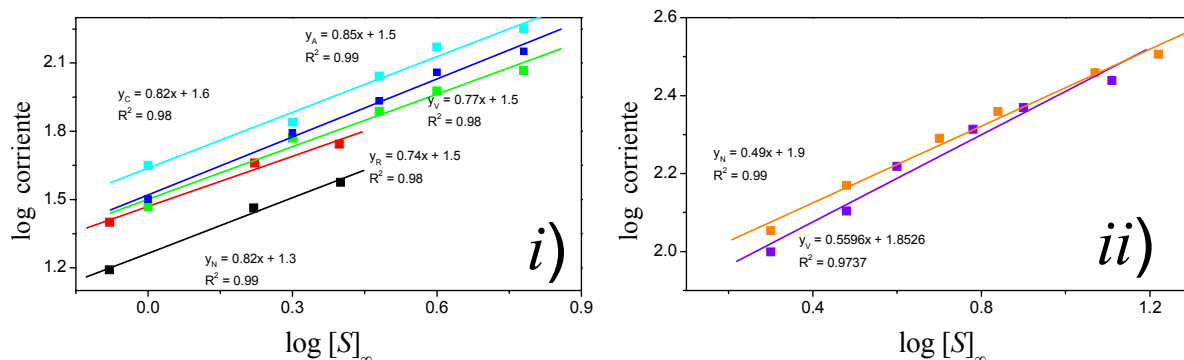


Figura 5.14: Gráficos de logaritmo de la respuesta amperométrica en función del logaritmo de la concentración de sustrato ( $[S]_{\infty}$ ) y ajuste lineal de los datos. Se muestra la recta del ajuste y el parámetro estadístico  $R^2$  de cada ajuste. Cada lote de datos (distinto color) corresponde a una película de distinto espesor. i) negro: 87nm; rojo: 194nm; verde: 242nm; azul: 307; celeste: 410nm; ii) violeta: 613nm; naranja: 1.15 $\mu$ m.

Volviendo al gráfico de la derecha (5.14.ii), creemos que la respuesta en función de la concentración de sustrato se aproxima más a una respuesta lineal que a una respuesta cuadrática. Una posible explicación para los valores inferiores a 1, es la incerteza en los datos experimentales que se discutió más arriba. También podría deberse a que la dependencia funcional exacta no es  $[S]_{\infty}$  o  $\sqrt{[S]_{\infty}}$ , sino con  $[S]_{\infty}/(K_{MS} + [S]_{\infty})$  (o la raíz de ese cociente). Suponiendo un valor de  $K_{MS}$  de 25mM, vemos que rápidamente crece la importancia del sumando  $[S]_{\infty}$  en el denominador frente a  $K_{MS}$  para dejar de volverse despreciable.

Recordemos además, que las fórmulas del modelo de Bartlett-Pratt, responden a simplificaciones de las ecuaciones diferenciales que describen completamente al sistema. Conforme nos acercamos a las fronteras entre casos cinéticos, las fórmulas pierden precisión en la descripción del comportamiento. Estrictamente estas fórmulas son válidas bien lejos de las fronteras.

En la figura 5.4, vemos que podría existir un comportamiento intermedio, una película podría caer en el caso V para concentraciones bajas de sustrato; en el VII para concentraciones intermedias, y luego en el II a saturación de sustrato. Se analizó si algún lote de datos mostraba esta dependencia mixta, pero los resultados no fueron concluyentes. Creemos que esto se debe a que a concentraciones de sustrato intermedias ya no tiene mucho sentido graficar corriente en función de  $[S]_{\infty}$  o de  $\sqrt{[S]_{\infty}}$  porque acá la dependencia ya no sería lineal (ver más arriba). Por otro lado, los ajustes de los datos

de todas las películas con el logaritmo  $[S]_{\infty}$  muestran una pérdida rápida de la linealidad al aumentar  $[S]_{\infty}$ . Esto se debe a los puntos intermedios, que están cerca de la fronteras con los casos I o II donde no hay dependencia con  $[S]_{\infty}$ , y no necesariamente a que esté apareciendo el caso VII. Estos dos casos no podrían discernirse por un análisis sencillo como el que estamos realizando ahora.

Podemos realizar otro análisis diagnóstico para reafirmar la hipótesis de que estaríamos frente a una cinética de caso V para los electrodos más delgados y de caso VII para los de mayor espesor. La ecuación (5.12) predice que a  $[S]_{\infty}$  constante, la respuesta amperométrica crecerá linealmente con el espesor de la película (caso V), mientras que la ecuación (5.14), predice que no habrá dependencia de la corriente con el espesor a  $[S]_{\infty}$  constante. Entonces podríamos tabular y graficar los datos de distintos electrodos a igual concentración de sustrato como función del espesor. La figura 5.15 muestra gráficos de corriente en función del espesor para ocho concentraciones distintas de sustrato.

En todos los casos se observa la dependencia lineal con el espesor predicha por el modelo para los espesores más bajos (caso V). Mientras que a mayores espesores vemos cómo la corriente alcanza un valor constante.

Creemos que estos gráficos son los que mejor determinan a qué cinética límite corresponden los datos de cada electrodo. Sin lugar a dudas, la corriente se incrementa con el espesor para los electrodos más delgados, lo que descarta totalmente la idea de que estos puedan clasificarse como caso VII.

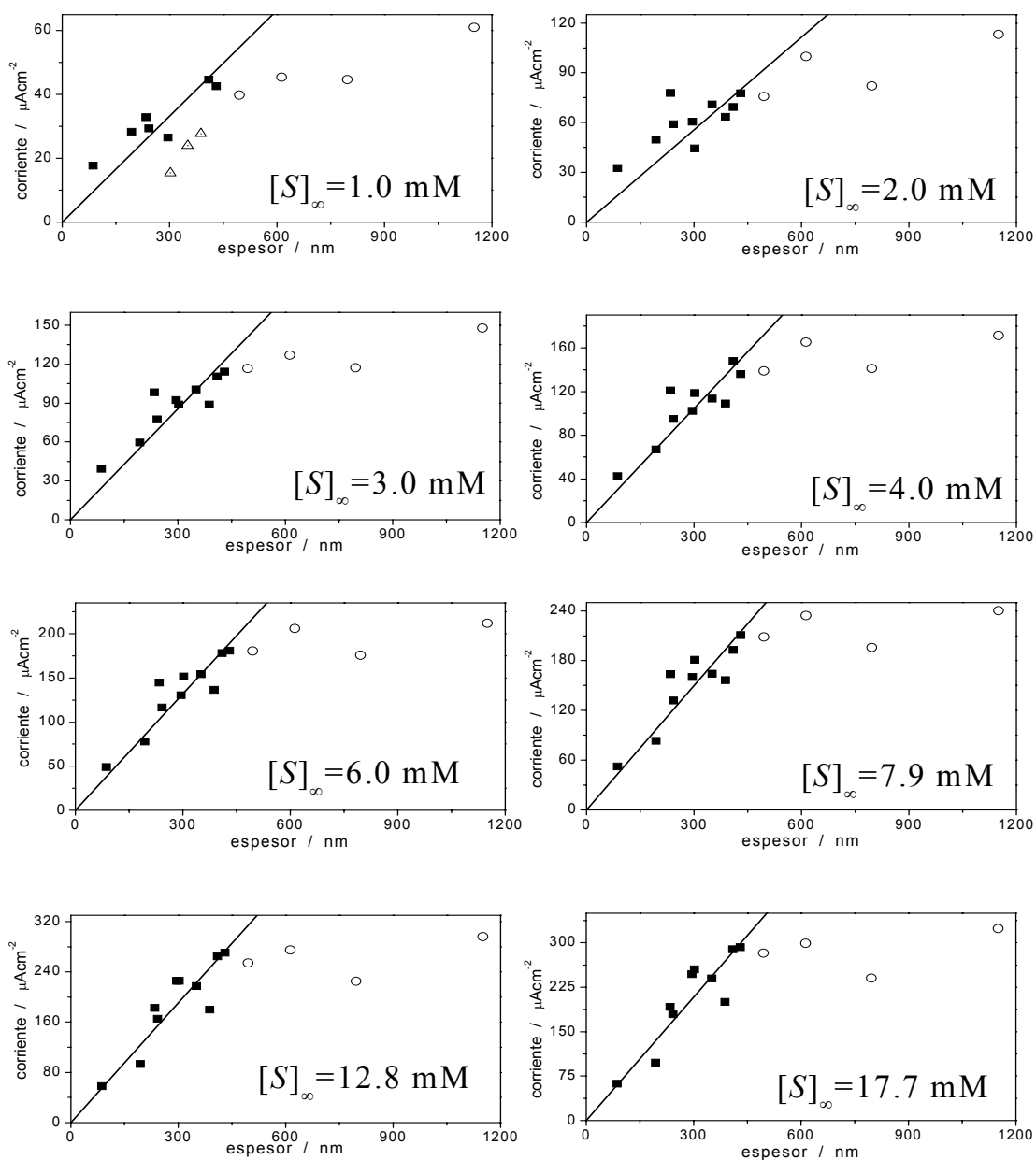
Los datos de mayor espesor, por su parte se clasifican muy bien como caso VII, no solo no se ajustan a la regresión lineal, sino que presentan valores muy similares entre ellos, es decir, no muestran dependencia con el espesor.

Nótese la similitud entre cada uno de los paneles de la figura 5.15 con la figura 5.13. Los datos de corriente tienen un crecimiento lineal con el espesor para las películas más delgadas, y llegado un espesor determinado, se vuelven constantes.

De cada una de las regresiones lineales de la figura 5.15 pueden extraerse entonces parámetros cinéticos.

Recordemos una vez más la fórmula aproximada de caso V:

$$i = \zeta nFA \frac{l[E]k_{cat}K_s [S]_{\infty}}{K_{MS} + K_s [S]_{\infty}} \quad (5.12)$$



**Figura 5.15:** Gráficos de respuesta amperométrica en función del espesor de la película autoensamblada a concentración de sustrato constante ( $[S]_{\infty}$ ) y mejor ajuste lineal de los datos experimentales. Cada gráfico corresponde a una concentración distinta de glucosa (el valor se muestra en el gráfico). En ningún caso se tuvieron en cuenta para la regresión lineal los puntos correspondientes a mayor espesor (puntos redondos y huecos). Los puntos triangulares vacíos en el gráfico correspondiente a  $[S]_{\infty} = 1\text{mM}$ , son datos que tampoco se incluyeron en la regresión lineal.

Entonces la pendiente de cada uno de los gráficos de la figura 5.15 será igual a

$$\zeta nF \frac{[E]k_{cat}[S]_{\infty}}{K_{MS} + [S]_{\infty}}$$

(los datos de corriente ya están graficados por unidad de área y

suponemos  $K_S = 1$ ). La tabla 5.4 recopila los resultados de la regresión lineal y la extracción de parámetros correspondiente.

$[S]_\infty$ / mM	$\frac{[E]k_{cat}}{K_{MS}}$ (A) /s <sup>-1</sup>	$[E]k_{cat}$ (B) / mM s <sup>-1</sup>	$[E]$ (C) / mM
1.0	5.0	130	0.19 ± 0.02
2.0	4.8	130	0.19 ± 0.01
3.0	5.0	140	0.199 ± 0.007
4.0	4.5	132	0.188 ± 0.006
6.0	3.9	120	0.171 ± 0.004
7.9	3.3	108	0.155 ± 0.006
12.8	2.7	101	0.144 ± 0.005
17.7	2.1	90	0.129 ± 0.005

**Tabla 5.4:** Parámetros cinéticos extraídos de las regresiones lineales de la figura 5.15. El ajuste corresponde a datos de respuesta amperométrica en función del espesor para electrodos distintos a concentración de sustrato constante (caso V). Los valores de la cuarta columna se calculan suponiendo  $K_{MS} = 25\text{mM}$  y  $k_{cat} = 700\text{s}^{-1}$ . Las incertezas de estos valores provienen únicamente del error de la regresión lineal.

- (A) A partir de la regresión lineal, y suponiendo  $[S]_\infty \ll K_{MS} \Rightarrow \frac{[S]_\infty}{[S]_\infty + K_{MS}} \approx \frac{[S]_\infty}{K_{MS}}$   
 (B) Sin despreciar  $K_{MS}$  frente a  $[S]_\infty$  y suponiendo  $K_{MS} = 25\text{mM}$   
 (C) Sin despreciar  $K_{MS}$  frente a  $[S]_\infty$  y suponiendo  $K_{MS} = 25\text{mM}$  y  $k_{cat} = 700\text{s}^{-1}$

La cuarta columna en la tabla 5.4 es un cálculo de la concentración de la enzima, suponiendo conocidos los valores de  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$ . La segunda columna es una estimación del producto de la concentración de la enzima por el cociente de las constantes cinéticas, sin hacer suposiciones de ningún otro parámetro. Conforme aumenta la concentración de sustrato, el término  $[S]_\infty$  empieza a cobrar importancia frente a  $K_{MS}$ , y esta estimación gana error. La tercer columna estima  $K_{MS}$  para salvar esta fuente de error.

Nótese la muy buena concordancia que existe en los valores de concentración de enzima calculados a partir del ajuste a la fórmula de caso V para ocho concentraciones de glucosa distintas.

Queremos ahora analizar los datos de cada electrodo separadamente en función de la concentración de glucosa,  $[S]_\infty$ .

Sabemos ahora, los datos de qué electrodos pueden ser ajustados a la fórmula de caso V y cuáles a la de caso VII. Regresamos entonces sobre el análisis hecho en la figura 5.14.

Graficamos la corriente en función de  $[S]_\infty$  (electrodos más delgados); y en función de la raíz cuadrada de  $[S]_\infty$  (electrodos más gruesos).

La figura 5.16.i muestra algunos gráficos representativos de corriente en función de  $[S]_{\infty}$  y 5.16.ii muestra gráficos de corriente en función de la raíz cuadrada de  $[S]_{\infty}$ . En ambos casos se muestran las regresiones lineales de las cuales extraeremos los parámetros cinéticos.

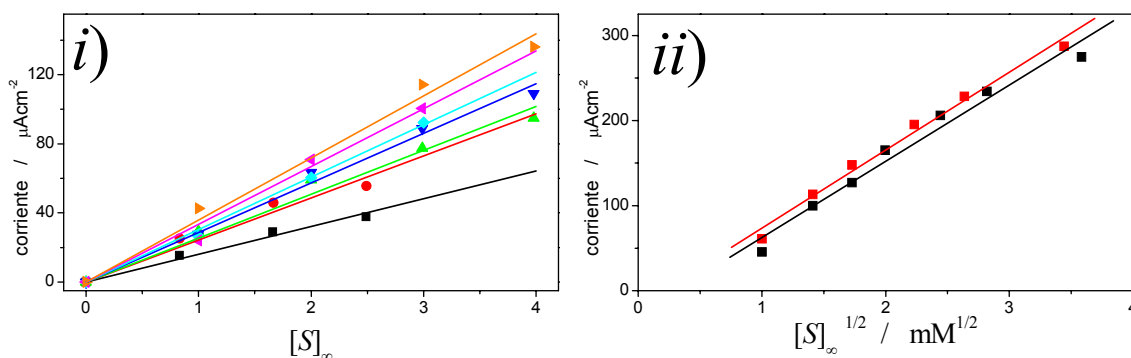


Figura 5.16: i) Respuesta amperométrica en función de la concentración de sustrato,  $[S]_{\infty}$  y ajuste lineal de los datos experimentales para electrodos de distinto espesor. Negro: 87nm; rojo: 194nm; verde: 242nm; azul: 270nm; celeste: 295nm; rosa: 351nm; naranja: 430nm.

ii) Respuesta amperométrica en función de la raíz cuadrada de la concentración de sustrato y ajuste lineal de los datos experimentales para dos electrodos de distinto espesor negro: 613nm; rojo: 1.15  $\mu\text{m}$ .

En 5.16.i, se observa primeramente cómo los datos responden linealmente con la concentración de glucosa. Podemos ver además que la regresión lineal para películas de espesor creciente, arroja valores de pendiente que aumentan con el espesor. Al calcular las regresiones lineales, forzamos en todos los casos el punto (0;0) como ordenada al origen.

Por otro lado, en 5.16.ii, observamos cómo los datos de corriente siguen una dependencia de raíz cuadrada con la concentración de sustrato. La pendiente fruto de la regresión lineal de los datos es marcadamente similar para ambos electrodos, mientras que los datos experimentales para electrodos de distintos espesores son casi superponibles.

En la figura 5.16.ii, las regresiones lineales mostradas corresponden al cálculo efectuado dejando variar libremente el valor de la ordenada al origen (sin forzar el punto (0;0)). Cuando se intentó el ajuste forzando ese dato, el ajuste era de menor calidad y los valores de pendiente obtenidas eran inferiores. Vemos que si bien estos datos ajustan a cinética de caso VII, la frontera con el caso V no está lejos (particularmente para los valores de  $[S]_{\infty}$  más bajos), y esto podría dar lugar a un ajuste menor al esperado para datos más lejanos a la frontera.

La tabla 5.5 recopila los parámetros cinéticos extraídos del ajuste lineal de los datos a las fórmulas de caso V y VII.

espesor / nm	caso ajustado	$\frac{\Gamma_E k_{cat}}{K_{MS}}$ / pmol cm <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup>	$\frac{[E]k_{cat}}{K_{MS}}$ / s <sup>-1</sup>	[E] / mM
87	V	83	9.59	0.34 ± 0.05
194	V	145	7.51	0.27 ± 0.03
234	V	168	7.17	0.27 ± 0.04
242	V	141	5.83	0.21 ± 0.04
270	V	149	5.52	0.20 ± 0.03
295	V	157	5.33	0.19 ± 0.03
302	V	146	4.84	0.17 ± 0.04
307	V	151	4.92	0.18 ± 0.04
351	V	173	4.93	0.18 ± 0.05
410	V	192	4.68	0.17 ± 0.04
430	V	186	4.32	0.15 ± 0.04
495	V	190	3.84	0.14 ± 0.04
613	VII	249	4.07	0.15 ± 0.06
796	VII	228	2.87	0.10 ± 0.06
1150	VII	439	3.82	0.14 ± 0.05

**Tabla 5.5:** Parámetros cinéticos extraídos de las regresiones lineales de la figura 5.16. Cada ajuste corresponde a datos de un mismo electrodo en función de la concentración de sustrato (caso cinético V, panel 5.16.i) o en función de la raíz cuadrada de la concentración de sustrato (caso cinético VII, panel 5.16.ii). Los valores de la cuarta columna se calculan suponiendo  $K_{MS} = 25\text{mM}$  y  $k_{cat} = 700\text{s}^{-1}$ . Las incertezas de estos valores provienen únicamente del error de la regresión lineal.

Los datos tabulados en la tabla 5.5 se muestran gráficamente en la figura 5.17.

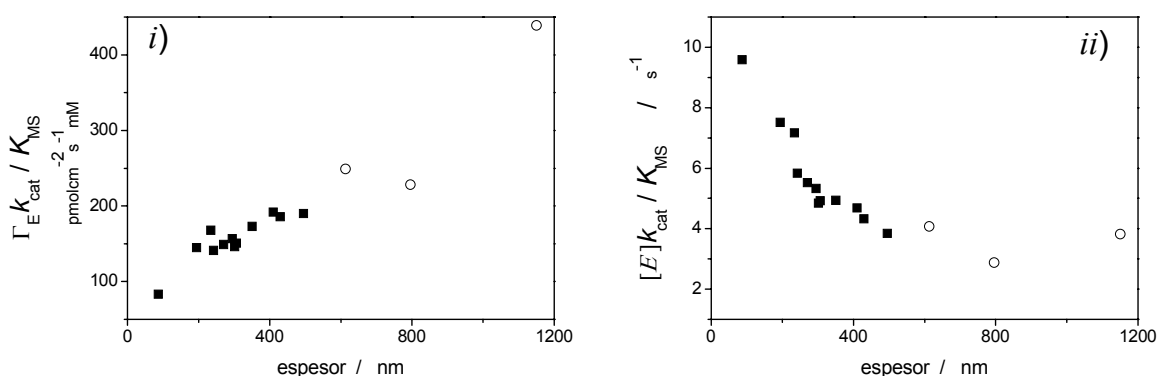
Un primer análisis de la figura 5.17 muestra que los valores hallados por ambas fórmulas aproximadas están claramente dentro del mismo orden de magnitud y en la misma tendencia.

También notamos que la concentración en volumen de enzima disminuye lentamente al aumentar el espesor; la concentración superficial de enzima ( $\Gamma_E$ ) aumenta con el espesor, pero este aumento es más lento que el incremento en espesor.

Los cálculos hechos con la fórmula de caso V arrojan concentraciones de enzima en volumen decrecientes con el espesor; mientras que los cálculos con fórmula de caso VII, arrojan concentraciones en volumen aproximadamente constantes.

Comparemos los datos de las tablas 5.4 y 5.5. Ambos resultados provienen de trabajar con los mismos datos experimentales pero de forma distinta. Notamos que la

concentración de enzima hallada por ambos métodos concuerda muy bien, en todos los casos valores muy cercanos a 0.2mM. A la luz de los resultados de la tabla 5.5, podrían presentarse objeciones sobre los datos mostrados en las tablas 5.3 y 5.4. Recordemos que para hallar los estos resultados, habíamos hecho la suposición de que la concentración de enzima (en volumen) era constante en las distintas películas. Sin embargo, vemos que si apartamos primeramente los valores de  $[E]$  calculados por fórmula de caso VII (que no fueron tenidos en cuenta en las regresiones lineales de la figura 5.15); y dejamos también de lado el dato de  $[E]$  para la película más delgada <sup>9</sup>, el resto de los valores de  $[E]$  si bien decrece con el espesor, lo hace muy lentamente. Creemos que no caímos en un error grave al consideramos constantes en los cálculos emanados de la figura 5.15.



**Figura 5.17:** Resultados de los ajustes a la ecuaciones de casos límite V (cuadrados rellenos) y VII (círculos vacíos), los resultados se corresponden con los de la tabla 5.5. *i)* concentración superficial de enzima multiplicada por el cociente de las constantes cinéticas. *ii)* concentración en volumen de enzima multiplicada por el cociente de las constantes cinéticas. En ambos casos en función del espesor.

Estamos hablando de valores de que no varían más allá del 25% (por exceso o defecto) de 0.2mM que puede considerarse el valor promedio.

Señalemos finalmente, que estos valores de concentración de enzima concuerdan muy bien con los valores esperados dados los conocimientos previos acerca del sistema.

Volvamos sobre los valores de las constantes  $k_{cat}$  y  $K_{MS}$ . Cualesquiera sean los valores verdaderos para nuestro sistema sustrato-enzima-mediador, creemos que las figuras 5.14 a 5.17 y las tablas 5.4 y 5.5 son una muy buena evidencia de que estos no se modifican con el espesor.

Podemos decir que el análisis presentado en esta sección muestra que nuestros datos experimentales para electrodos de espesor variable expuestos a baja concentración de

<sup>9</sup> Obsérvese que en la figura 5.15, este dato suele quedar casi siempre *por arriba* de la regresión lineal.



sustrato se ajustan muy bien al comportamiento predicho por las fórmulas aproximadas de casos límite V y VII del modelo de Bartlett-Pratt. Una vez más, esto nos lleva a la conclusión de que el modelo sería una buena descripción de los procesos que tienen lugar en el interior de las películas.

### **5.8 Ajuste de los datos a la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales**

En lo que va de este capítulo, hemos discutido y llegado a la conclusión de que nuestro sistema experimental, parece estar cumpliendo los requisitos para probar sobre él modelo de Bartlett-Pratt. Mostramos que nuestros datos ajustan bien al comportamiento predicho por las fórmulas aproximadas del modelo estudiadas. Esto es un indicio muy fuerte, de que este modelo describe adecuadamente los procesos físico-químicos que se están produciendo dentro de nuestra película enzimática.

Los sistemas de ecuaciones diferenciales que no poseen una solución analítica cerrada, pueden resolverse por integración numérica. Resolver las ecuaciones diferenciales en forma numérica es un artilugio matemático, análogo a la resolución analítica en forma aproximada. Entonces de la misma forma que nos servimos de las fórmulas aproximadas para extraer parámetros desconocidos, también podemos valernos de la resolución numérica para extraer estos parámetros.

Describimos en el capítulo 2, el algoritmo desarrollado por Bartlett y Pratt [49] basado en el método de relajación [170] especialmente aplicado a la resolución del problema de electrodos enzimáticos.

El sistema de ecuaciones diferenciales acopladas (ecuaciones (5.5) y (1.79)) describe el sistema en una situación particular de concentraciones  $[O_{s_2}]$ ,  $[E]$  y  $[S]_{\infty}$ , para un determinado espesor de película; es decir, el equivalente a un único punto experimental. Para encontrar parámetros desconocidos, es posible variar los valores de los mismos hasta encontrar valores que hagan corresponder la respuesta simulada con la respuesta experimental. Resulta más relevante sin embargo, encontrar parámetros que describan el comportamiento de toda una serie de puntos experimentales, medidos en condiciones análogas. Por ejemplo, toda una curva de respuesta amperométrica en función de la concentración de sustrato.

Para llevar a cabo esta tarea, será necesario resolver numéricamente el sistema de ecuaciones diferenciales tantas veces como puntos experimentales tenga una curva y tantas veces como juegos de parámetros de ajuste deseemos probar. Esto puede resultar una tarea sumamente engorrosa, pensemos que para ensayar 10 juegos de parámetros

sobre una curva de 10 puntos habrá que resolver el sistema de ecuaciones acopladas 100 veces. Para allanar el camino, decidimos introducir el algoritmo de resolución de ecuaciones diferenciales dentro de un método de ajuste, el método Simplex [170], que también se describió oportunamente en el capítulo 2.

El nuevo algoritmo combina el método de relajación para resolver las ecuaciones con el método Simplex para encontrar los parámetros que producen que las soluciones numéricas se acerquen a los resultados experimentales.

Primero se resuelven las ecuaciones diferenciales para un juego de parámetros, se calcula el error respecto a los datos experimentales ( $Chi^2$ ), se busca un nuevo juego de parámetros (de acuerdo con este error), se vuelven a resolver las ecuaciones diferenciales y se recalcula el error. Así sucesivamente, hasta hallar un juego de parámetros que minimice el error.

### **5.8.1 Validación del método**

La validación de la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales por el método de relajación ha sido reportada por Bartlett y Pratt [49]. Los autores validaron los resultados de las simulaciones numéricas contra la resolución de las ecuaciones diferenciales en forma aproximada dentro de los distintos casos límite (las ecuaciones dadas en la tabla 1.4).

Para este trabajo de tesis se modificó parcialmente el algoritmo original para incluir el coeficiente estequiométrico  $\zeta$  para la reacción enzima sustrato. El nuevo algoritmo se validó contra las ecuaciones modificadas, dadas en la tabla 5.1.

Para validar el ajuste por método Simplex, se decidió trabajar dentro de un caso límite donde existiese una fórmula aproximada contra la cual comparar los resultados. Para películas delgadas, vimos que la fórmula aproximada (5.15) predecía la respuesta amperométrica para todo el intervalo de concentraciones de sustrato. Comparamos entonces el ajuste obtenido por método Simplex combinado con resolución numérica con el arrojado por un ajuste no lineal de los datos a la fórmula (5.15).

La figura 5.18 muestra los resultados de ambos ajustes y la tabla 5.6 muestra los parámetros obtenidos para dos películas de distinto espesor.

Obsérvese que las curvas generadas por ambos métodos ajustan muy bien a los datos experimentales por un lado y entre sí por otro. Cabe destacar que para los puntos para los cuales se observan ligeras discrepancias entre los datos experimentales y los ajustes, ninguno de los dos métodos logra resolver estas diferencias, y ambos simulan el mismo

valor de corriente. De la tabla 5.6 podemos ver que los parámetros de ajuste obtenidos por los dos métodos concuerdan excelentemente.

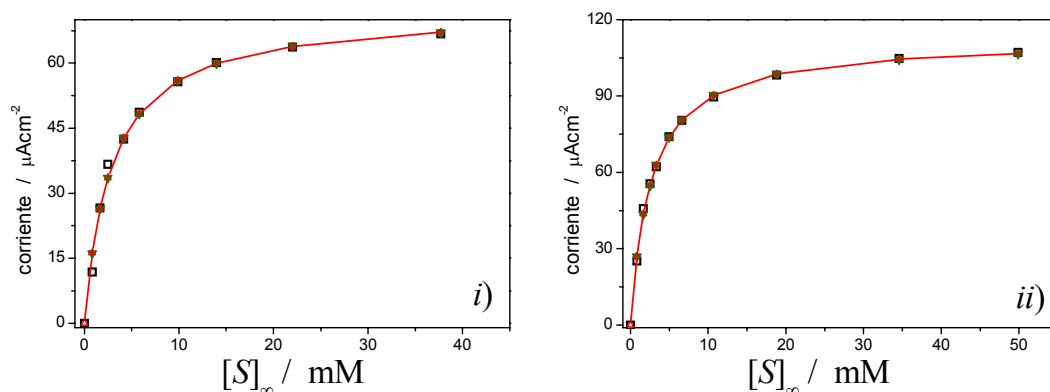


Figura 5.18: Datos experimentales (cuadrados negros), ajuste de los mismos a la fórmula aproximada de capa delgada (línea y triángulos huecos rojos) y resolución numérica del problema acoplada al algoritmo Simplex (triángulos llenos invertidos verdes). Datos para dos electrodos de distinto espesor *i*) 87 nm; *ii*) 194nm.

espesor nm	$[E] / \text{mM}$ capa delgada	$[E] / \text{mM}$ Simplex	$k / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ capa delgada	$k / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ Simplex	$[E]k / \text{s}^{-1}$ capa delgada	$[E]k / \text{s}^{-1}$ Simplex
87	0.537	0.534	1575	1613	0.85	0.86
194	0.411	0.404	1387	1506	0.57	0.61

Tabla 5.6: Comparación de los parámetros fruto del ajuste de los datos experimentales al modelo de capa delgada y a la resolución numérica del problema acoplada a un algoritmo Simplex.

### 5.8.2 Algunas consideraciones acerca del método Simplex

Antes de comenzar con los ajustes, señalemos algunas características del Simplex.

El algoritmo necesita valores iniciales o *semillas* para los parámetros a ser ajustados. Elegimos como *semillas*, los valores hallados en la sección previa por ajuste a las fórmulas analíticas.

Un potencial problema con el método Simplex, es que puede haber más de un lote de parámetros que minimizan la función  $Chi^2$  (ecuación (2.9)), es decir, la minimización podría encontrar mínimos locales. El algoritmo opera de manera tal de tratar de evitar los mínimos locales. Cuando llega a un aparente mínimo, vuelve a moverse lejos para analizar si es un mínimo local o no.

Sin embargo, el Simplex no siempre logra evadirse de los mínimos locales. Además la función a minimizar no contiene absolutamente ninguna información acerca del sistema

en estudio. Por lo cual, ocurre a veces que los parámetros que producen el mínimo absoluto de  $Chi^2$  carecen totalmente de sentido físico-químico, mientras que otros parámetros, para los cuales  $Chi^2$  es ligeramente mayor, sí lo tienen.

Se hace necesario entonces aplicar cotas a los valores de los parámetros buscados. Estas pueden provenir de tres fuentes:

- 1) Valores aproximados obtenidos por ajuste a las fórmulas analíticas aproximadas.
- 2) Conocimiento experimental del comportamiento del sistema. Por ejemplo  $k$  en un sistema inmovilizado nunca podría ser mayor que el valor hallado en solución para un dado sistema enzima-mediador. La concentración de enzima cableada tampoco podría ser mayor que la cantidad total de enzima adsorbida determinada por métodos de enzima total (por ejemplo QCM).
- 3) Comparación de parámetros obtenidos cuando distintas variables experimentales se modifican independientemente para un dado sistema. Por ejemplo no sería esperable que valores de  $k$  y  $[E]$  hallados para curvas de calibración de electrodos de distinto espesor fuesen absurdamente diferentes, por ejemplo modificándose más de un orden de magnitud.

Respecto a este último punto, vemos que si utilizamos los ajustes al modelo con suficiente criterio, no sólo estaremos simulando la respuesta amperométrica para algunas situaciones particulares, sino también prediciendo la evolución del sistema.

En términos matemáticos, el método de ajuste Simplex puede ajustar tantos parámetros como uno desee [170]. Sin embargo, es necesario tener mucho cuidado al hacer uso de esta cualidad del método. A mayor cantidad de parámetros a ajustar, suele ser también mucho mayor la cantidad de mínimos relativos donde podría anclarse el ajuste. Esto ocurre particularmente para lotes de datos relativamente pequeños como los nuestros (ninguna curva experimental tiene más de 15 datos).

Se encuentra en la práctica que para sistemas como el nuestro, es muy difícil encontrar resultados con sentido físico-químico cuando se intentan extraer tres o más parámetros simultáneamente por método Simplex. En estos casos suele ser mucho más conveniente comenzar fijando uno (o más) de los parámetros desconocidos (o acotándolo a un intervalo muy pequeño), hasta que resultados de un ajuste aproximado hayan sido hallados para los otros dos parámetros sobre los que se tiene más incerteza.

### 5.8.3 Resultados de los ajustes

En vista de las consideraciones anteriores decidimos probar las simulaciones con dos parámetros de ajuste:  $k$  y  $[E]$ .

Simulamos entonces la respuesta en corriente en función de la concentración de sustrato para cada electrodo. En todos los casos, alimentamos la simulación con los valores experimentales de espesor ( $l$ ) y  $[O_{S\Sigma}]$ . Asumimos como conocidos los valores de  $k_{cat}$ ,  $K_{MS}$ ,  $D_{e-}$ ,  $D_S$  y,  $K_S$  según la tabla 5.2.

Los resultados de estos primeros ajustes fueron pobres, si bien en términos estadísticos, se logró una excelente calidad de ajuste entre los datos simulados y los datos experimentales en todos los casos: el factor  $Chi^2$  fue pequeño y las curvas de calibración simuladas se superpusieron muy bien a las experimentales. Esto fue a costa de obtener parámetros  $k$  y  $[E]$  de poca relevancia físico-química.

En el caso de las películas más delgadas, obtuvimos valores de  $k$  y  $[E]$  muy satisfactorios. Sin embargo, encontramos valores de  $k$  que crecen siempre con el espesor de las películas y llegan a valores absurdamente altos para las más gruesas,  $k \approx 30000 M^{-1}s^{-1}$ . Al intentar acotar el valor máximo de  $k$  alcanzable, los valores de corriente simulados quedaban muy lejos de los valores experimentales.

Asumiendo los valores de espesor ( $l$ ) y  $[O_{S\Sigma}]$  hallados experimentalmente como invariantes, decidimos ver cómo afecta la calidad de la simulación cada una de las variables que se mantienen fijas.

Ya hemos mostrado que  $k_{cat}$  y  $K_{MS}$  no presentan grandes variaciones con el espesor. Cambiar los valores usados afectaría todas las simulaciones, a bajos y altos espesores, y vimos que estamos satisfechos con los resultados de bajo espesor. Variaciones sobre  $K_S$ <sup>10</sup> son equivalentes a variaciones de  $K_{MS}$ , por lo que también las descartamos.

En cuanto a los coeficientes de difusión,  $D_S$  y  $D_{e-}$ , estimaciones incorrectas afectarían mucho más las simulaciones en las películas más gruesas, donde los efectos difusionales son más importantes.

Ensayamos cambiar  $D_S$ , en un amplio intervalo de valores<sup>11</sup>. Sin embargo, los nuevos parámetros hallados con estos valores de  $D_S$  siguen sin satisfacer nuestras expectativas.

---

<sup>10</sup> En la práctica, disminuir  $K_S$  resultaría en concentraciones de sustrato dentro de la película inferiores a las concentraciones de la solución adyacente, lo que redundaría en valores inferiores de  $\mu$ . El mismo resultado se consigue aumentando  $K_{MS}$ .

<sup>11</sup> Corrimos ajustes de Simplex de tres parámetros de ajuste,  $k$ ,  $[E]$  y  $D_S$ , tomando como *semilla* el valor que veníamos utilizando,  $6.72 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ .  $D_S$  no se movió apreciablemente de esta semilla. También corrimos ajustes de Simplex de dos parámetros,  $k$  y  $[E]$ , dejando  $D_S$  fijo pero cambiando su valor entre las distintas corridas. Es necesario forzar  $D_S \approx 1 \times 10^{-8} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$  para lograr cambios importantes en  $k$  y  $[E]$ . No creemos que tan bajos valores de  $D_S$  tengan sentido, incluso ajustes con esos valores tampoco son satisfactorios.

Los argumentos que venimos sosteniendo en este capítulo, indican que es esperable que pequeños cambios en  $D_{e-}$  produzcan cambios significativos en los parámetros hallados por simulación, dado que los valores de los coeficientes de difusión de sustrato y mediador difieren en 3 órdenes de magnitud.

En las películas más gruesas la llegada del mediador redox a la parte más externa es un factor limitante de la respuesta amperométrica. Además, no hemos podido estimar el valor de  $D_{e-}$  a partir de las fórmulas analíticas aproximadas, ya que  $D_{e-}$  aparece como un factor multiplicativo para los casos II y VII acompañado de otros parámetros desconocidos: multiplicado por  $k[E]$  en el caso II y por  $[E]k_{cat}/K_{MS}$  en el caso VII. Si podemos asegurar que  $D_{e-}$  estará en el orden de magnitud de  $10^{-9}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ , a partir de los valores hallados de las pendientes en las figuras 5.13 y 5.16.ii.

Hemos utilizado hasta ahora un valor de  $D_{e-}$  que proviene de experimentos con PAH-Os/apoGOx/GOx [94, 157]. En nuestro caso,  $D_{e-}$  podría ser levemente diferente por tratarse de otros lotes de polímero o de diferentes estructuras de películas.

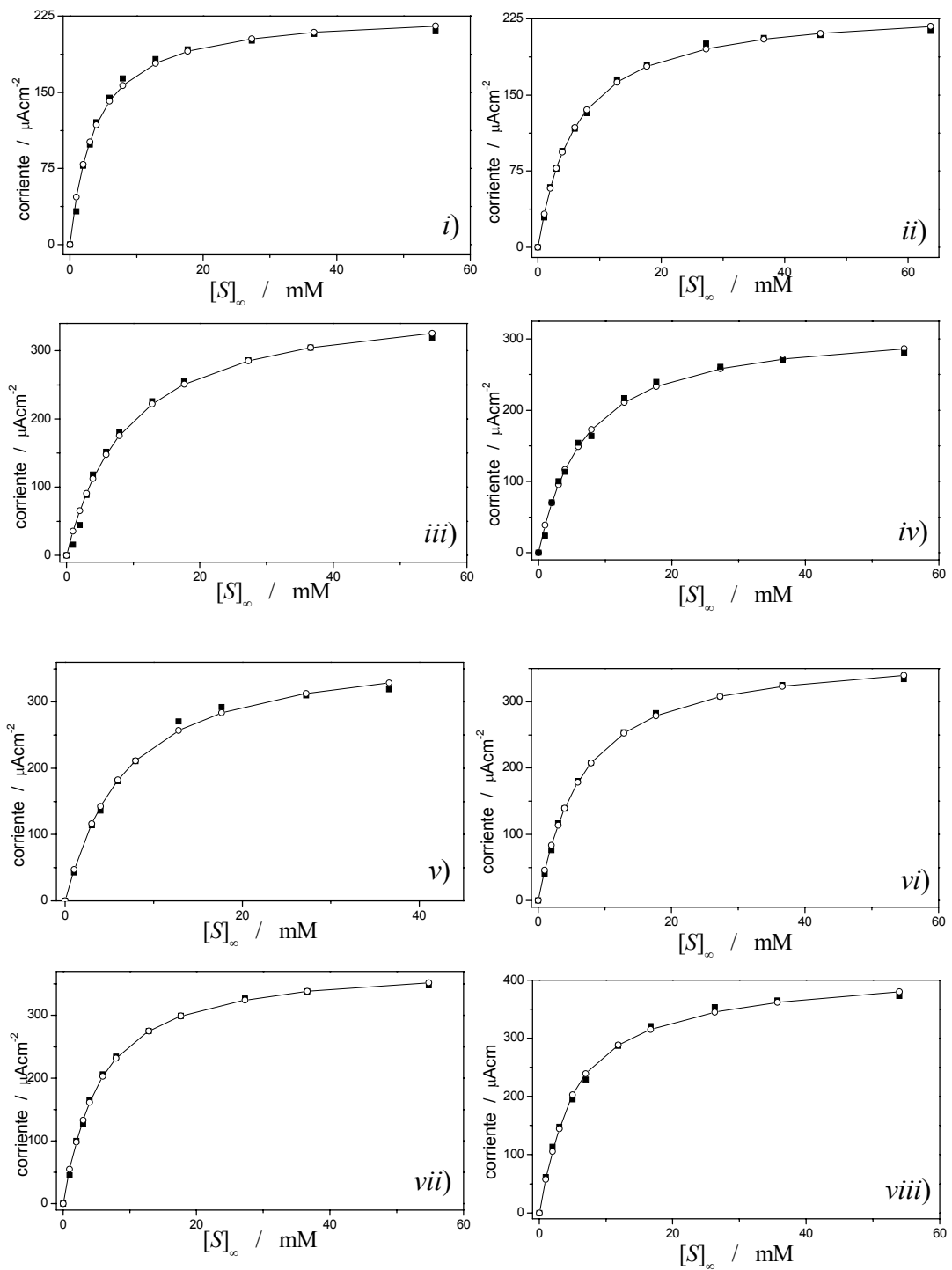
Luego, intentamos un ajuste de tres parámetros ( $[E]$ ,  $k$  y  $D_{e-}$ ) por método Simplex para conseguir una mejor estimación conjunta. Sin embargo, la complejidad de nuestro sistema, provocó la aparición de múltiples mínimos indiscernibles entre sí (para más detalles, ver apéndice A.5.1).

Como nos proponemos comparar el comportamiento de distintas películas entre sí y encontrar tendencias, hemos fijado uno de los tres parámetros,  $D_{e-}$ . Hemos mostrado que  $D_{e-}$  influye significativamente en las películas más gruesas; mientras cambios en  $k$  o  $[E]$  afectan a todas las películas. Otra observación importante fue que a partir de un determinado valor de  $D_{e-}$ , los valores de  $k$  dejan de cambiar tanto. Se usó un valor para el cual  $k$  no varía excesivamente para ningún espesor. Elegimos  $D_{e-} = 3.6 \times 10^{-9} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ , del orden del reportado anteriormente por Wolosiuk y Calvo.

La figura 5.19 muestra para ocho electrodos distintos la curva de calibración experimental superpuesta con la curva simulada.

Se puede apreciar la muy buena concordancia entre los datos experimentales de respuesta amperométrica y los simulados, para todo el intervalo de concentraciones de glucosa y para electrodos de espesores marcadamente distintos.

La tabla 5.7 tabula los parámetros  $k$  y  $[E]$  extraídos del ajuste por Simplex para todos los electrodos disponibles.



**Figura 5.19:** Curvas de respuesta amperométrica en función de la concentración de glucosa. Comparación de datos experimentales (cuadrados negros) con datos simulados numéricamente y ajustados por método Simplex (círculos vacíos unidos por la línea negra). Cada panel corresponde a una película de distinto espesor, en nm: *i)* 234; *ii)* 242; *iii)* 302; *iv)* 351; *v)* 430; *vi)* 495; *vii)* 613; *viii)* 1150.

espesor nm	$[E]$ mM	$k$ $M^{-1}s^{-1}$	$k[E]$ $s^{-1}$	$k[E]D_e$ $\times 10^{-9}cm^2$
87	0.534	1543	0.82	----
194	0.406	1443	0.59	----
234	0.465	2451	1.14	----
242	0.291	4449	1.29	----
302	0.255	8301	2.12	----
351	0.233	6099	1.42	----
370	0.190	9287	1.77	----
410	0.236	7190	1.70	----
430	0.230	6768	1.56	----
495	0.194	7237	1.40	----
613	0.191	6186	1.18	4.25
796	0.125	4975	0.62	2.23
1150	0.111	8850	0.98	3.53

**Tabla 5.7:** Parámetros obtenidos por ajuste con método Simplex de dos parámetros ( $[E]$  y  $k$ ) de los datos experimentales a la resolución numérica de las ecuaciones diferenciales. Se ajustaron datos correspondientes a curvas de respuesta amperométrica en función de  $[S]_{\infty}$  para electrodos de distinto espesor.

## 5.9 Comparación de valores hallados por fórmulas analíticas y simulaciones

Comparemos los valores de la tabla 5.7 con los hallados a través de las fórmulas analíticas aproximadas.

La figura 5.20 compara los distintos valores hallados por ambos métodos.

Analicemos cada uno de los parámetros a continuación.

### 5.9.1 $[E]$

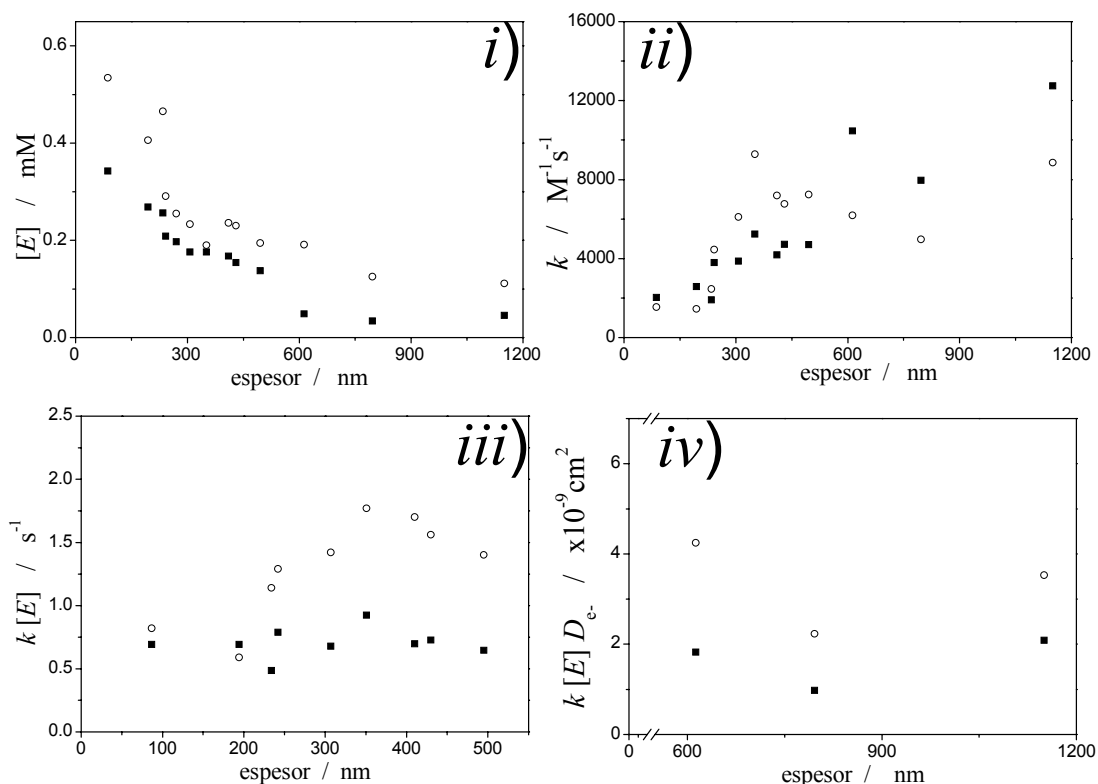
Observamos que para cualquiera de los dos métodos de ajuste, los valores de  $[E]$  decrecen con el espesor de las películas y más rápidamente para las películas más delgadas que para las más gruesas.

La tabla 5.4 mostraba estimaciones de  $[E]$  a partir de datos de respuesta amperométrica en función del espesor para glucosa constante y películas delgadas. Los datos de la tabla 5.5 también correspondían a estimaciones de  $[E]$ , esta vez para películas individuales y concentración de glucosa variable. Los datos hallados por simulaciones también concuerdan bien y siguen la misma tendencia que los datos de las tablas 5.4 y 5.5, como muestra la figura 5.20.i. Sin embargo, en todos los casos, los parámetros hallados por



simulación son siempre entre un 20 y un 45 % mayores que los hallados por las fórmulas aproximadas.

Al usar las fórmulas aproximadas de casos V y VII para extraer  $[E]$  fue necesario suponer conocido el cociente  $k_{\text{cat}}/K_{\text{MS}}$ . Sin embargo estos mismos valores también fueron necesarios para poder simular la respuesta amperométrica, con lo cual esta no sería en principio la causa de la diferencia. En el caso VII además fue necesario estimar  $D_{e^-}$ <sup>12</sup>, pero una vez más también se usó el mismo valor para este parámetro en las simulaciones.



**Figura 5.20:** Comparación de los resultados obtenidos al ajustar los datos experimentales a resolución numérica en combinación con método Simplex (círculos vacíos) y fórmulas analíticas aproximadas (cuadrados rellenos, se señala más abajo la fórmula de caso límite utilizada). Los resultados de las simulaciones son los mostrados en la Tabla 5.10. En todos los casos se grafican los parámetros en función del espesor de las películas.

*i)* Concentración en volumen de enzima,  $[E]$ . Caso V (películas más delgadas) y VII (películas más gruesas). *ii)* Constante de reoxidación enzima-mediador,  $k$ . Combinación de Casos I y II (películas más delgadas) y II y VII (películas más gruesas). *iii)* Producto  $k[E]$ . Caso V. *iv)* Producto  $k[E]D_{e^-}$ . Caso VII.

<sup>12</sup> En la figura 5.17 y en la tabla 5.5 habíamos preliminarmente estimado  $D_{e^-} = 1.2 \times 10^{-9} cm^2 s^{-1}$ , dado que todavía no se había dado la discusión acerca de este valor y no teníamos mayores elementos para justificar el uso de otro valor. Sin embargo, para esta comparación de valores se recalculó  $[E]$  a partir de la fórmula aproximada de caso VII haciendo uso del nuevo valor de  $D_{e^-} = 3.6 \times 10^{-9} cm^2 s^{-1}$ .

### 5.9.2 $k$

Por ambos métodos de cálculo, se observa un marcado crecimiento de  $k$ , que después de 300nm se estabiliza y fluctúa entre 6000 y 9000  $M^{-1}s^{-1}$ .

Ninguna fórmula aproximada nos permite obtener  $k$  independientemente de otros parámetros también desconocidos. Sin embargo, el producto  $k[E]$  puede obtenerse de la fórmula aproximada de caso I y este valor puede dividirse por el valor de  $[E]$  obtenido por aproximación a la fórmula de caso V para los datos obtenidos a menor concentración de glucosa. Análogamente, en las películas más gruesas  $k$  puede obtenerse por combinación de los parámetros obtenidos por fórmulas aproximadas de caso II y caso VII. Así se calcularon los valores mostrados en 5.21.ii para comparar con los valores hallados por simulación numérica.

En este caso la concordancia de los parámetros obtenidos por ambos métodos también es muy buena, aunque al igual que en 5.9.1 también se observa una discrepancia sistemática del orden del 25 al 45 %. En este caso además, los parámetros estimados por combinación de casos I y V son inferiores a los obtenidos por simulaciones mientras que los obtenidos por casos II y VII son mayores.

### 5.9.3 $k[E]$

Este producto parecería ser constante arrojando en la mayoría de los casos valores alrededor de  $1s^{-1}$ .

La tabla 5.3 mostraba estimaciones de  $k[E]$  calculadas a saturación de sustrato. Aquellos valores provenían de la pendiente de la regresión lineal a caso I. Evidentemente también es posible usar la fórmula aproximada para cada electrodo individual, los valores que se muestran en 5.20.iii se obtuvieron de esta forma.

En este caso, mientras el uso de las fórmulas aproximadas arroja valores sorprendentemente constantes, las simulaciones arrojan parámetros algo más dispersos. Aparentemente según las simulaciones, habría un salto de valores a espesores intermedios.

Cabe acá destacar que los valores hallados por simulación y fórmulas aproximadas correspondientes a las películas más delgadas son mucho más cercanos entre sí que en el caso de las películas más gruesas. Creemos que en este caso la divergencia puede explicarse por una pequeña sutileza algebraica mostrada en el apéndice A.5.2.

#### 5.9.4 $k[E]D_e$ .

Este producto parece arrojar un valor aproximadamente constante para los casos analizados.

Para los tres electrodos más gruesos, al hacer uso de la fórmula de caso II se obtiene  $k[E]D_e$ . Esto se muestra en la figura 5.20.iv, comparado con el resultado obtenido por simulación ( $D_e$  fijo). Una vez más, vemos que ambos grupos de valores siguen la misma tendencia y están en el mismo orden, aunque en este caso están separados entre un 60 y un 100%.

Una vez más, la divergencia puede explicarse por una sutileza algebraica relacionada con la simplificación de la función tangente hiperbólica (apéndice A.5.2). En este caso además, como se obtiene la raíz  $\sqrt{k[E]D_e}$ , al elevar al cuadrado se multiplica por dos el error introducido por la aproximación.

#### 5.10 Perfiles de concentración en el interior de las películas

La resolución de las ecuaciones diferenciales por el método de relajación resuelve las ecuaciones diferenciales acopladas hallando un valor de concentración adimensional para sustrato y mediador redox para cada posición dentro de cada uno de los pequeños intervalos ( $\Delta\chi$ ) en que se divide la película.

Es decir, además de permitirnos obtener valores de flujo de mediador que se traducen en respuesta amperométrica, nos permite estimar cómo son los perfiles de concentración tanto de mediador como de sustrato en el interior de la película.

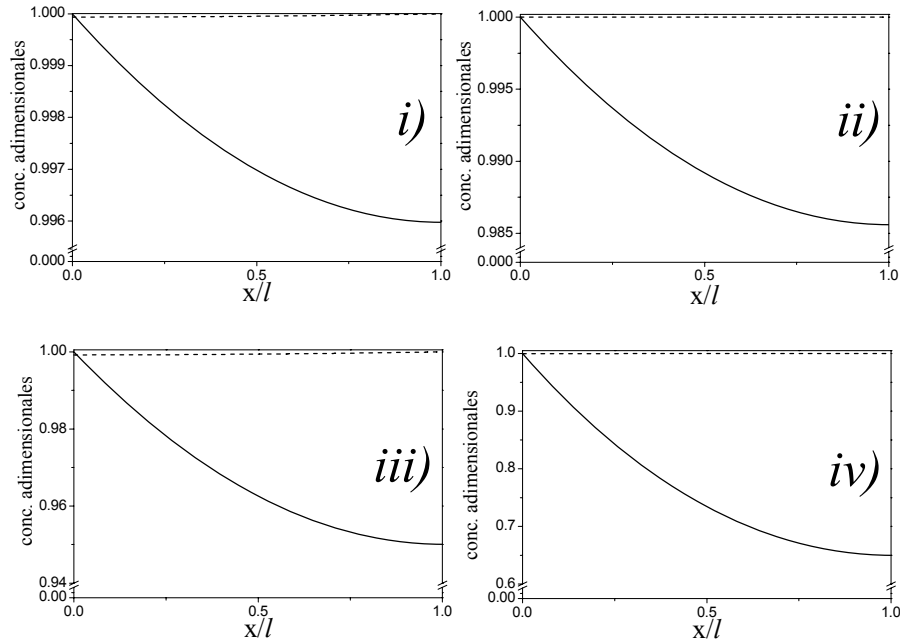
Esta es una gran herramienta que nos brinda la simulación numérica, dado que ninguna técnica experimental puede dar cuenta, hasta el momento, de estos perfiles.

Una vez hallados los valores óptimos de ajuste de los parámetros  $k$  y  $[E]$  para cada película individual, obtuvimos para estos valores los perfiles de concentración.

Las figuras 5.21 y 5.22 muestran algunos perfiles de concentración representativos.

Recordemos que el modelo detrás de las ecuaciones diferenciales resueltas numéricamente desestima la difusión de sustrato en la solución adyacente a la película. Consecuentemente los perfiles difusionales mostrados en las figuras 5.21 y 5.22 son perfiles que se obtienen al usando la condición de contorno  $s|_{\chi=1} = 1$ , o en forma dimensional  $[S]|_{x=l} = [S]_{\infty}$ . Por lo discutido en 5.5.1.3.1, sabemos que esta suposición

del modelo no se cumple estrictamente en nuestras películas. Con lo cual, los perfiles simulados mostrados deben ser analizados a la luz de este comentario.



**Figura 5.21:** Perfiles de concentración simulados por resolución numérica de las ecuaciones diferenciales alimentadas con los siguientes parámetros:  $D_S = 6.72 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ;  $D_e = 3.6 \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ;  $K_{MS} = 25 \text{mM}$ ;  $k_{\text{cat}} = 700 \text{s}^{-1}$  (en todos los paneles) y demás variables dadas abajo (todas variables fijas, no sujetas a ajuste por Simplex).

*i)* y *ii)*  $l = 87 \text{nm}$ ,  $[O_{S\Sigma}] = 0.0576 \text{M}$ ,  $[E] = 0.534 \text{mM}$ ;  $k = 1543 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

*iii)* y *iv)*  $l = 430 \text{nm}$ ,  $[O_{S\Sigma}] = 0.0597 \text{M}$ ,  $[E] = 0.230 \text{mM}$ ;  $k = 6768 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

*i)* y *iii)*  $[S]_{\infty} = 1 \text{mM}$ ;

*ii)* y *iv)*  $[S]_{\infty} = 50 \text{mM}$ .

Línea de trazo continuo: perfil del mediador ( $[O_{S(m)}]/[O_{S\Sigma}]$ ). Línea de trazo cortado: perfil del sustrato ( $[S]/[S]_{\infty}$ ). Nótese la diferencia de escalas en el eje y en cada panel. El eje y nunca llega a 0.

Los perfiles mostrados en 5.21 corresponden a dos películas de distinto espesor. En cada caso se muestra el perfil a muy baja concentración de sustrato ( $[S]_{\infty} = 1 \text{mM}$ ) y a alta concentración ( $[S]_{\infty} = 50 \text{mM}$ ), donde se esperan los dos extremos de comportamiento, cinética limitada por la reacción enzima-sustrato y enzima-mediador respectivamente.

Los paneles 5.21.i y 5.21.ii corresponden a la película más delgada medida (87nm). En ambos casos, la caída de concentración de sustrato dentro de la película es insignificante.

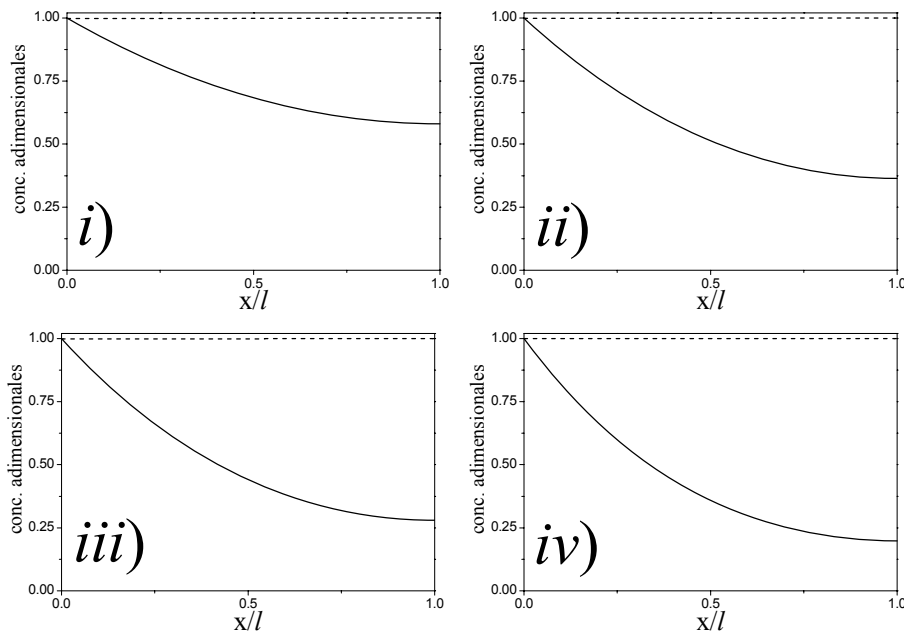
La caída en la concentración de mediador también es mínima, pero mucho mayor que la de glucosa en ambos casos. Además aumenta también entre la película expuesta a bajas y altas concentraciones de glucosa.

Los paneles 5.21.iii y 5.21.iv corresponden a una película de espesor intermedio (430nm). Una vez más, la caída de la concentración de sustrato es insignificante en

ambos casos. La caída en la concentración de mediador es considerablemente más alta al comparar la película expuesta a saturación de glucosa que a baja concentración. En 5.21.iv puede verse cómo la concentración de mediador disminuye hasta aproximadamente el 65% de la concentración alcanzada sobre el electrodo. Esto sería una muestra de que a altas concentraciones de sustrato la película se encuentra cerca de la frontera con el caso límite II, donde la concentración del mediador cae casi hasta cero en el interior de la película.

A baja concentración de sustrato la caída en la concentración de mediador es mucho más marcada que para la película más delgada. Sin embargo, aún no muestra estar cerca de la frontera con el caso límite VII, donde la concentración de mediador se agota.

La figura 5.22 muestra perfiles de concentración simulados para un único electrodo, el de máximo espesor medido ( $1.15\mu\text{m}$ ). Se observa cómo la concentración de mediador cae muy rápidamente en el interior de la película al aumentar la concentración de sustrato.



**Figura 5.22:** Perfiles de concentración simulados por resolución numérica de las ecuaciones diferenciales alimentadas con los siguientes parámetros:  $D_S = 6.72 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ;  $D_{e-} = 3.6 \times 10^{-9} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ;  $K_{MS} = 25 \text{mM}$ ;  $k_{\text{cat}} = 700 \text{s}^{-1}$ ;  $l = 1150 \text{nm}$ ,  $[O_{S\Sigma}] = 0.0597 \text{M}$ ,  $[E] = 0.111 \text{mM}$ ;  $k = 8850 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  (en todos los paneles) y concentraciones de sustrato variables de panel en panel (todas las variables fijas, no sujetas a ajuste por Simplex). **i)**  $[S]_{\infty} = 3 \text{mM}$ ; **ii)**  $[S]_{\infty} = 7 \text{mM}$ ; **iii)**  $[S]_{\infty} = 12 \text{mM}$ ; **iv)**  $[S]_{\infty} = 50 \text{mM}$ . Línea de trazo continuo: perfil del mediador ( $[O_{S(\text{III})}] / [O_{S\Sigma}]$ ). Línea de trazo cortado: perfil del sustrato ( $[S] / [S]_{\infty}$ ). Nótese que en todos los casos tenemos la misma escala en el eje y.

No se observa sin embargo en ningún caso que la concentración de mediador caiga casi a cero dentro de la película. Lo que evidencia que para este espesor de película y esta combinación de parámetros cinético-difusionales estamos dentro del caso límite VII, pero todavía estamos cerca de la frontera con el caso V.

En el panel 5.22.iv se observa cómo la concentración del mediador cayó más abajo del 20% respecto al valor en la superficie del electrodo. Este perfil de mediador, sumado a que el sustrato no desarrolla perfil de concentración nos lleva a confirmar que podemos encuadrar este perfil dentro del caso límite II. Sin embargo al igual que en los casos anteriores, es claro que todavía estamos cerca de una frontera, para este panel con el caso I, dado que la concentración no cae hasta cero.

Notemos que pese al grosor de las películas acá tampoco se observa caída en la concentración de glucosa apreciable.

Estas cercanías con las fronteras de otros casos, son en parte responsables de que los ajustes a las fórmulas analíticas aproximadas y a la resolución de las ecuaciones diferenciales en forma numérica no arrojen exactamente los mismos valores.

Calculamos finalmente cómo se vería un perfil de concentración en el centro del caso VII (lejos de las fronteras). Este se muestra en la figura 5.23, con las dos zonas de cinética límite claramente indicadas. Este perfil se corresponde con una hipotética película que tiene iguales propiedades que nuestras películas más gruesas pero un espesor tres veces mayor.

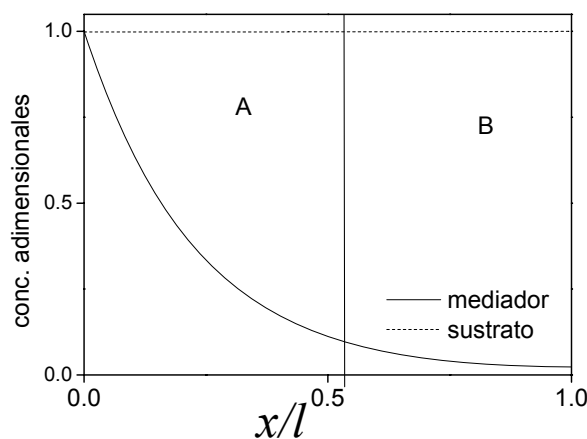


Figura 5.23: Perfil de concentraciones adimensionales simulados para una película gruesa.  $\kappa = 3.3$ ;  $\gamma = 0.5$ ;  $\eta = 400$ ;  $\mu = 0.35$ .

### 5.11 Discusión final

En la figura 5.20, observamos los valores individuales recuperados de  $k$  y  $[E]$ . Para los electrodos más delgados, la concentración de enzima aparentaba ser mayor (aproximadamente el doble) que para el resto. Más aún, se observa que el valor de  $[E]$  decrece para espesores crecientes; mientras  $k$  aumenta marcadamente, para alcanzar valores aproximadamente cuatro veces más altos en los electrodos más gruesos.

Notamos sin embargo, que el producto  $k[E]$  se mantiene aproximadamente constante para todo el intervalo de espesores analizados (si bien, algunos valores pueden ser ligeramente más altos para películas de espesores intermedios). De otro modo, no habríamos obtenido buen ajuste lineal en la figura 5.13.

Esta discrepancia no es menor. Los valores de  $k$  y  $[E]$  necesariamente están asociados.

Analicemos la dependencia de las fórmulas analíticas aproximadas de estos parámetros.

Cuando la cinética está limitada por la reacción enzima-mediador, estos parámetros aparecen siempre multiplicados entre sí, y elevados a la misma potencia (casos I y II).

Cuando la reacción limitante es la enzima-sustrato, la corriente no es función de  $k$ , y sí lo es de  $[E]$  (dependencia lineal con  $[E]$  en el caso V y con  $\sqrt{[E]}$  en el VII).

Vemos que es posible obtener  $[E]$  independientemente de otros parámetros de la pendiente inicial de la curva de calibración de cada electrodo individual<sup>13</sup>. Por el contrario,  $k$  siempre se obtiene asociada a  $[E]$ . Cuando el valor de  $k$  es determinante sobre la cinética, también lo es  $[E]$ . Esto ocurre tanto en las fórmulas analíticas aproximadas como en la resolución numérica de las ecuaciones. Si un dado valor de producto  $k[E]$  simula bien esta corriente, al mover  $k$  en un sentido, será preciso mover  $[E]$  en el otro para compensar el cambio (y al mover  $[E]$ , cambiará el ajuste a baja concentración de sustrato).

Consecuentemente, si por algún motivo, los datos experimentales a baja concentración de sustrato estuvieran viciados de un error sistemático, se verían afectados tanto  $k$  como  $[E]$ , pero no el producto de ambos parámetros.

En la sección 5.5.1.3.1 llegamos a la conclusión de que teníamos evidencia de agotamiento parcial de sustrato en la solución adyacente a la película, que el modelo no estaba teniendo en cuenta. Esto se evidencia solo a baja concentración de sustrato.

---

<sup>13</sup> Sosteniendo nuestra hipótesis de que  $K_{MS}$  y  $k_{cat}$  se mantienen constantes

La concentración de sustrato decae producto de la actividad enzimática total. Es de esperar (y la apariencia de los voltogramas cíclicos así lo sugiere) que el fenómeno se torne más grave para películas más gruesas (con mayor carga de enzima).

A la luz de esta discusión, surge la pregunta de si la menor concentración aparente de enzima en las películas más gruesas es real. Vemos que la fórmula de caso V predice igual dependencia funcional en la concentración de sustrato que en la concentración de enzima. Es decir, experimentalmente una corriente más baja que la esperada, podría explicarse tanto por una caída en la concentración de enzima como en la concentración de sustrato (o ambas).

Encontramos otras dos explicaciones que justifican la observada variación de  $k$  y  $[E]$  en la estructura de las películas.

La primera posibilidad, es que con aumentos tan significativos de espesor la estructura de la película efectivamente se modifique, y con ella los valores de  $k$  y  $[E]$ .

Una segunda posibilidad, es que la película no pueda aproximarse realmente por una estructura homogénea, sino que encontremos en ella grandes inhomogeneidades. Estas darían lugar a valores diversos de  $k$  y  $[E]$  en distintas regiones. En este caso, los valores recuperados por ajuste representarían un promedio de los diferentes valores hallados dentro de cada dominio. El modelo no tiene en cuenta estos posibles cambios, al suponer que las concentraciones totales en volumen de mediador y de enzima, las constantes cinéticas y los coeficientes de difusión se mantienen constantes a lo largo de toda la película.

La evidencia parcial que tenemos de que esto no está ocurriendo es el crecimiento lineal de la carga superficial de centros redox con el número de pasos de autoensamblado y el aumento del espesor en igual situación. Por otro lado, una limitación para detectar cambios estructurales para películas más gruesas fue que no pudimos realizar medir microbalanza de cristal de cuarzo más allá de la quinta etapa de adsorción, dado que la película dejaba de comportarse acústicamente delgada y no se pudo obtener la masa mediante la ecuación de Sauerbrey.

Los estudios anteriores de estas propiedades en función del número de pasos de adsorción solo se hicieron con películas mucho más delgadas y con un polímero de menor densidad de carga lineal [10, 155]. Consecuentemente no podemos descartar esta hipótesis.



## 5.12 Perspectivas futuras

Resultaría interesante continuar los experimentos con electrodo rotario y tratar de determinar la causa de las caídas en corriente a altas concentraciones que nos llevaron a nosotros a no decidimos por ese diseño experimental. Podría estudiarse en más detalle qué resultados se obtienen de un análisis cinético completo en este caso.

Una segunda opción sería trabajar con microelectrodos, que consumiesen menos glucosa y no produjesen gradientes de concentración en el exterior de las películas.

Sería bueno intentar realizar mediciones sobre electrodos de mayor espesor a los considerados. Esto sería con el objeto de entrar mejor dentro de los casos límite II y VII, y no quedar tan cerca de las fronteras. Un problema que surgiría acá estaría relacionado con las mediciones de espesor de las películas, ya que para espesores muy grandes, se perderá exactitud y el modelo óptico dejará de ser válido.

También sería muy útil intentar variar otros parámetros, por ejemplo, la concentración de enzima. Esto podría lograrse o bien alternando pasos de adsorción de apo-GOx con GOx, o bien diluyendo las soluciones de GOx con apo-GOx. Podría estudiarse también qué pasaría al trabajar con un lote de enzima totalmente distinto, es decir un lote con mucha mayor actividad enzimática (nosotros trabajamos con un lote de 200U/mg, y en el mercado existen proveedores que ofrecen 1000U/mg). Existe la posibilidad de que este cambio sea equivalente a aumentar la concentración enzimática manteniendo constante la cantidad de proteína total. Sugerimos estos cambios, dado que sería bueno poder aumentar la concentración de enzima, no solo disminuirla.

También sería interesante tratar de realizar experimentos a concentración de mediador variable. Al igual que en el caso de GOx, una alternativa sería diluir el polímero con PAH (polialilamina sin modificar con complejo de Os), o bien alternar capas de PAH con capas de PAH-Os. Una mejor alternativa aún, sería tratar de aumentar la concentración de centros redox. Sin cambiar los ladrillos de construcción, sería óptimo lograr sintetizar un polímero con mucha mayor sustitución de grupos Os/unidades monoméricas. De esta forma, podrían lograrse aumentos de la concentración de centros redox de hasta un orden de magnitud.

Una segunda alternativa para lograr este objetivo, sería jugar con las propiedades investigadas en el capítulo 4. Podría estudiarse si bajo alguna condición de pH y/o fuerza iónica es posible autoensamblar polímero en conformación ovillada y lograr que solo unas pocas enzimas se adsorban a continuación. De esta forma, al adsorber menos masa

y en consecuencia volumen de enzima, la película se volvería también más rica en centros redox (aunque en este caso se modificaría la estructura).

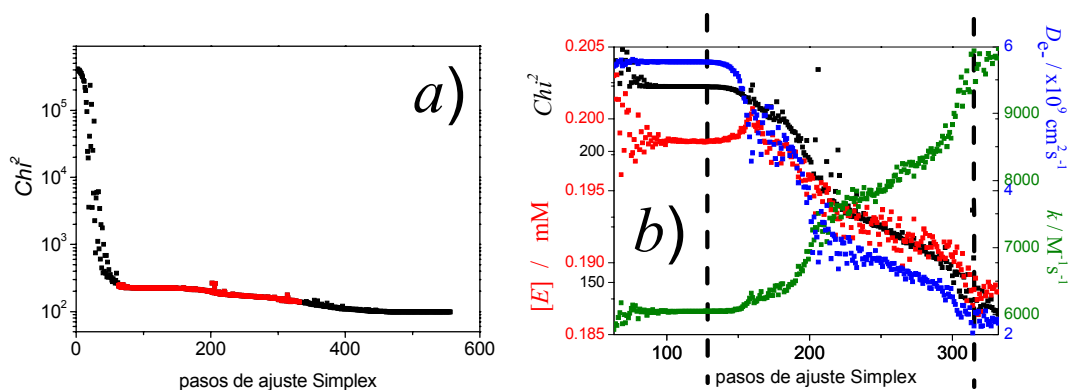
Una última y más drástica modificación sería cambiar completamente el polímero con centros redox por otro completamente distinto que posea un valor de  $D_{e- app}$  mucho mayor. Mano *y col.* [215] reportaron la síntesis de compuestos que al ser incluidos junto con enzimas en hidrogeles presentan valores de  $D_{e- app}$  anormalmente altos ( $5.8 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ). Si este coeficiente de difusión se mantuviese dentro de una estructura autoensamblada, este polímero permitiría alcanzar los casos límite que hemos descartado por inalcanzables con PAH-Os debido a su bajo coeficiente de difusión.

En este sentido, resultados preliminares con una muestra de polímero generosamente donada por el Dr. Nicolás Mano resultaron no concluyentes debido a la dificultad de autoensamblar en forma similar a PAH-Os/GOx, dada la altísima densidad de carga de dicho polímero. Esto se sumó a la absorbancia en la línea de 632nm del elipsómetro que impidió mediciones confiables de espesor.

## Apéndices al Capítulo 5

### A.5.1 Múltiples mínimos para un ajuste a tres parámetros

La figura A.5.1 muestra un ejemplo de cómo evoluciona un ajuste por el método Simplex.



**Figura A.5.1:** a) Disminución del parámetro de ajuste  $\chi^2$  para ajuste por método Simplex de tres parámetros ( $[E]$ ,  $k$  y  $D_e$ ) combinado con resolución numérica de las ecuaciones diferenciales para datos de una película de 495nm de espesor. Nótese la escala logarítmica en el eje y. Los puntos resaltados en rojo son los que se muestran ampliados en el panel b).

b)  $\chi^2$ , y parámetros de ajuste obtenidos en cada paso del mismo ajuste que en a). Se muestra el intervalo de parámetros ajustados que tienen sentido físico-químico y dentro de los cuales creemos que resulta muy difícil elegir una terna única de valores. Las líneas verticales señalan los valores discutidos en el texto.

Se observa cómo el método trata efectivamente de disminuir el parámetro  $\chi^2$ . En aproximadamente 40 pasos de ajuste,  $\chi^2$  se reduce muy significativamente. Sin embargo el algoritmo Simplex sigue tratando de reducir su valor. La fracción de datos mostrada en rojo se amplía en el panel de la derecha, A.5.1.b. Allí se muestra cómo para cambios relativamente pequeños de  $\chi^2$ , los parámetros ajustados se modifican considerablemente, particularmente  $D_e$  y  $k$ . Obsérvese que la calidad de ajuste es casi igual de buena para la combinación  $D_e = 2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  y  $k = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  que para  $D_e = 6 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  y  $k = 0.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (valores señalados en el gráfico con dos líneas verticales). En ambos casos (y todos los intermedios) la superposición de los datos experimentales y los simulados es indistinguible. Los valores de corriente simulados con los distintos juegos de parámetros difieren entre sí en menos del 1%. A nuestro criterio, estos cambios mínimos en  $\chi^2$  no tienen relevancia físico-química y todos los

parámetros hallados para valores muy similares de  $Chi^2$  son en principio igualmente admisibles.

### A.5.2 Una sutileza matemática en las fórmulas aproximadas

Para llegar a la fórmula analítica aproximada de los distintos casos límite se realizan dos tipos de aproximaciones.

Primeramente, se realiza siempre una aproximación de forma tal de linealizar alguna de las dos ecuaciones diferenciales (ecuaciones (5.5) y (1.79)).

Una vez que se resuelve el sistema, y se halla una solución para  $s(\chi)$  y para  $a(\chi)$ , pueden realizarse otro tipo de simplificaciones. Estas aproximaciones son de naturaleza muy distinta a las primeras (que eran indispensables). Se realizan únicamente para simplificar la funcionalidad de la función solución ya encontrada, para que la dependencia en los distintos parámetros sea sencilla (lineal o a lo sumo raíz cuadrada).

Analicemos el caso de cinética limitada por la reacción enzima-mediador (casos I y II).

En primer término, se considera que

$$k[A] < K_{MS}[S]/(K_{MS} + [S]) \quad (\text{A.5.1})$$

o en términos adimensionales

$$\gamma a < s/(1 + \mu s) \quad (\text{A.5.2})$$

Mediante el uso de (A.5.2), la ecuación diferenciales adimensionalizadas (5.5) se simplifica a:

$$\frac{d^2 a}{d\chi^2} = \zeta \kappa^2 a \quad (\text{A.5.3})$$

que es una ecuación diferencial lineal y haciendo uso de las condiciones de contorno dadas en la tabla 5.1 se llega a una solución analítica única para  $a(\chi)$ . Por evaluación del flujo adimensional en la superficie del electrodo, se llega a la siguiente expresión para el mismo:

$$J_{obs} = \kappa \zeta^{1/2} \tanh[\kappa \zeta^{1/2}] \quad (\text{A.5.4})$$

donde  $\tanh$  es la tangente hiperbólica.

Esta ecuación da lugar a dos casos límite, según el número dentro de la tangente sea mayor o menor que 1 (para nosotros esto es una vez más considerar la película delgada o gruesa para la difusión de mediador).

Bartlett y Pratt aproximan el valor de la tangente hiperbólica de (A.5.4) según:

$$\tanh\left[\kappa\zeta^{1/2}\right] \approx 1 \quad \text{si } \kappa\zeta^{1/2} > 1 \quad (\text{A.5.5})$$

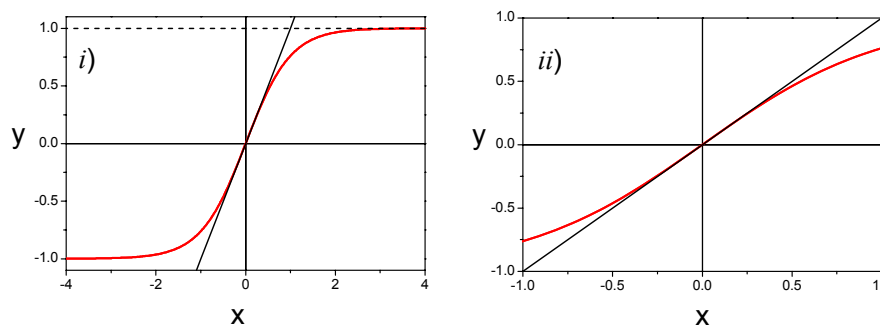
$$\tanh\left[\kappa\zeta^{1/2}\right] \approx \kappa\zeta^{1/2} \quad \text{si } \kappa\zeta^{1/2} < 1 \quad (\text{A.5.6})$$

donde (A.5.6) es la aproximación a orden 1 en serie de Taylor, y es la segunda aproximación introducida para llegar a la fórmula de caso I. Por su parte (A.5.5) es la segunda aproximación usada para llegar a la fórmula de caso II.

Estas dos aproximaciones no son imprescindibles para resolver el problema. Insistimos en que se realizan con el objeto de poder analizar con más facilidad y más directamente la dependencia funcional en cada uno de los parámetros (caso contrario, la dependencia sería de tangente hiperbólica con las concentraciones y constantes cinéticas).

Reemplazando los adimensionales por sus expresiones originales ((1.74) a (1.77)), se llega a partir de (A.5.5) y (A.5.6) a las fórmulas de los casos límite II y I respectivamente.

Observemos detenidamente el gráfico de la función tangente hiperbólica comparado con una función lineal de pendiente unitaria que se muestra en la figura A.5.2 y con la función  $y = 1$  (función constante).



**Figura A.5.2:** Representación gráfica de las funciones  $y = \tanh(x)$  (línea roja);  $y = x$  (línea negra continua); e  $y = 1$  (línea negra de trazo cortado); con el objeto de analizar en qué intervalo de valores la tangente hiperbólica es aproximable por la función lineal, y por una recta constante. En el panel *i*) se muestra un intervalo de valores más amplio que en *ii*).

Obsérvese que para valores de  $x$  a partir de aproximadamente 0.45, la tangente hiperbólica comienza a apartarse de la función lineal creciendo más lentamente.

Lo mismo ocurre para  $1 < x < 2.5$ . Si bien  $\tanh(x)$  se aproxima al valor 1, hasta  $x \approx 2.5$ , no lo hace estrictamente.

Si ahora tenemos las funciones

$$y = zx \tag{A.5.7}$$

$$y = \tanh(zx) \tag{A.5.8}$$

en el intervalo de valores tal que  $0.45 < zx < 1$ , donde  $z$  es una constante arbitraria. Si intentamos despejar  $z$  por ajuste a (A.5.7) el valor obtenido será menor que por ajuste a (A.5.8). Es decir, al extraer valores de un ajuste, si se usa la pendiente de la función, el valor obtenido será menor que si se usa la inversa de la  $\tanh(x)$ .

Creemos que las pequeñas divergencias observadas en los parámetros hallados por ajuste a fórmulas aproximadas y resolución numérica combinada con Simplex pueden, al menos en parte, explicarse por las aproximaciones usadas para liberarse de la  $\tanh$ .

## Capítulo 6.

### Conclusiones Generales

*Ahora llegó el momento de irse a dormir  
dejando caer el libro que nos ayudó a comprender  
que basta un poco de viento para guiarnos,  
pues somos navegantes aunque no naveguemos nunca.*  
Pippo Delbono, *El Silencio*

En la presente tesis hemos estudiado un sistema sustrato-enzima-mediador utilizable como biosensor amperométrico. Los resultados experimentales fueron comparados con modelos teóricos de difusión-reacción.

En el capítulo 3 caracterizamos el sistema homogéneo  $\beta$ -D-glucosa/GOx/[Os(bpy)<sub>2</sub>ClpyCOOH]<sup>+</sup>, análogo del sistema heterogéneo  $\beta$ -D-glucosa/GOx/PAH-Os. El tratamiento teórico del sistema homogéneo se simplifica debido a la disminución en el número de parámetros desconocidos. La concentración de enzima con capacidad de comunicarse con el electrodo es igual a la concentración analítica de la misma; no hay que considerar coeficiente de partición para el sustrato entre dos medios; mientras que el transporte de masa en solución se refiere a difusión física de especies, y en consecuencia, los parámetros difusionales son fáciles de determinar.

Comparamos primeramente nuestros datos experimentales con las fórmulas analíticas aproximadas derivadas del modelo de Albery *y col.* [54]. Existe evidencia suficiente en la literatura que ha validado el mismo. Consideramos en particular los dos casos límite que describen cinéticas limitadas por las reacciones enzima-sustrato y enzima-mediador respectivamente. En ambos casos, el modelo predice que la voltametría cíclica a baja velocidad de barrido será estacionaria. Nuestros experimentos a baja concentración de sustrato, mostraron voltagramas no estacionarios, con un pico de corriente máxima durante el barrido de potencial en sentido anódico y marcada histéresis entre este y el barrido en sentido catódico. Estos voltagramas son una clara evidencia de agotamiento de sustrato en las cercanías del electrodo, que el modelo no considera.

En una segunda aproximación al problema, comparamos nuestros voltogramas cíclicos experimentales con voltogramas simulados, ajustando iterativamente en los cálculos las constantes cinéticas hasta obtener los valores de las mismas que mejor describen el sistema. Al escribir las ecuaciones diferenciales que describen este problema, la concentración de sustrato se expresó como función del tiempo y de la distancia al electrodo (el modelo estacionario de Albery *y col.* supone concentración de sustrato constante en todo el volumen de la solución). La resolución numérica predice el desarrollo de perfiles difusionales en las cercanías de la superficie del electrodo a bajas concentraciones de glucosa y la forma de los voltogramas cíclicos simulados se condice con nuestros resultados experimentales.

En todas las condiciones experimentales usadas en el capítulo 3 se observó inactivación enzimática, evidenciada en una pequeña pero sistemática caída de la corriente amperométrica en mediciones de cronoamperometría y en voltogramas cíclicos sucesivos. Este decaimiento acarrió algunos problemas a la hora de construir curvas estacionarias de respuesta en corriente en función de los distintos parámetros y luego en la extracción de constantes cinéticas. Este fenómeno ha sido escasamente reportado en la literatura.

Cuando quisimos comparar las constantes cinéticas extraídas para el sistema homogéneo  $\beta$ -D-glucosa/GOx/[Os(bpy)<sub>2</sub>ClpyCOOH]<sup>+</sup>, con valores reportados para otros sistemas enzima-mediador en medio homogéneo encontramos un muy amplio intervalo de valores reportados, tanto para las constantes que caracterizan la cinética enzima-sustrato ( $k_{cat}$  y  $K_{MS}$ ), como la cinética enzima-mediador ( $k$ ), incluso valores marcadamente diferentes para un mismo mediador y enzima informados por distintos grupos. Creemos que los problemas señalados en relación a la extracción de constantes cinéticas a partir de datos experimentales explican, al menos en parte, esta gran dispersión de valores encontrada. No estamos en condiciones de arriesgar si la variedad de constantes reportadas refleja variaciones reales en la cinética enzimática o es producto del uso de distintos modelos y distintas condiciones experimentales.

En el capítulo 4 comenzamos el estudio del sistema inmovilizado. Realizamos una caracterización sistemática de la estructura de las películas autoensambladas al modificar la densidad de carga lineal del polímero PAH-Os. Como PAH-Os es un polielectrolito débil, su carga quedará determinada por el pH y la fuerza iónica de la solución donde se encuentra disuelto. Preparamos películas formadas por igual número de pasos de adsorción de polímero y enzima, y modificamos el pH de la solución de PAH-Os de



película en película. La microbalanza de cristal de cuarzo y la voltametría cíclica a baja velocidad de barrido en ausencia de sustrato mostraron que la masa de enzima y polímero adsorbidos se modifican con la densidad de carga del polímero, aumentando cuando esta carga baja. Este aumento de masa también se tradujo en un crecimiento del espesor elipsométrico medido. La rugosidad superficial fue estudiada por microscopía de fuerza atómica, mientras que las propiedades mecánicas fueron estimadas por espectroscopía de fuerza. Todas estas técnicas revelaron cambios muy importantes en la estructura de las películas adsorbidas en distintas condiciones. Después de estudiar la morfología de las películas se estudió su respuesta como biosensor amperométrico. Se concluyó que tanto la comunicación eléctrica entre la enzima y el mediador como la cantidad de enzima que efectivamente se comunica con el electrodo (*enzima cableada*) se ven afectada por la estructura de la película.

Las conclusiones emanadas del capítulo 4 nos brindaron una herramienta muy útil para empezar los estudios descriptos en el capítulo 5. Pudimos fabricar películas de espesores variables en forma rápida, alcanzando espesores donde se desarrollan perfiles de concentración apreciables en una cantidad de pasos de adsorción (tiempo) razonable.

En el capítulo 5 presentamos estudios para validar un modelo para electrodos amperométricos totalmente integrados, el modelo de Bartlett-Pratt [49]. En este sentido se construyeron películas de espesor variable, por adsorción de distinto número de capas de PAH-Os/GOx. Para cada película preparada se determinó la curva de respuesta en corriente en función de la concentración de sustrato. También fue necesario modificar ligeramente el modelo para tener en cuenta la estequiometría de la reacción enzima-mediador, que para nuestro sistema difiere respecto al caso general.

Se estimó mediante cálculos preliminares con los datos obtenidos anteriormente más datos de bibliografía, que pueden alcanzarse cuatro de los siete casos límite del modelo de Bartlett-Pratt.

Los datos experimentales fueron ajustados a las fórmulas analíticas aproximadas de los distintos casos límite. De estos ajustes pudieron estimarse valores para los parámetros que caracterizan a los biosensores amperométricos: la concentración de "*enzima cableada*" y la constante de reoxidación enzima-mediador.

En una segunda instancia, los mismos datos experimentales fueron ajustados a datos simulados por resolución de las ecuaciones diferenciales por el método de relajación combinado con un algoritmo de ajuste Simplex. Una vez más, pudimos calcular los parámetros que caracterizan al sistema, estimando además en este caso, el valor del

coeficiente de difusión de los electrones en el interior de la película por mecanismo de *electron-hopping*. Este valor se ajusta bien a resultados ya reportados.

Hacer uso en forma combinada de fórmulas analíticas aproximadas y simulaciones numéricas demostró ser una muy buena estrategia para encarar el problema. Las primeras permiten una comprensión cabal de la importancia relativa de cada uno de los parámetros en la respuesta del sensor, al mostrar directamente la relación entre variables. Las segundas no muestran la relación entre los distintos parámetros, pero son de ayuda invaluable en las fronteras entre distintos casos cinéticos, donde las fórmulas aproximadas pierden valor. También son valiosas para analizar un lote de datos en conjunto, que para ser estudiado en forma analítica debería ajustarse por partes a distintas fórmulas aproximadas. Los algoritmos matemáticos de ajuste suelen buscar mínimos de forma indiscriminada. Por esto deben ser cuidadosamente acotados de forma tal de arribar a soluciones con sentido físico-químico. Acotar las simulaciones alrededor de los parámetros calculados a partir de fórmulas aproximadas ha demostrado ser una buena estrategia.

Las fórmulas aproximadas dentro de cada caso límite, y las simulaciones en el caso general, permiten estimar la distribución de las distintas especies en el interior de la película (perfiles de concentración). Ninguna técnica experimental nos brinda, en este momento, esta valiosa información.

La comparación del modelo con nuestros datos experimentales nos permitió una validación parcial del mismo. Los resultados experimentales mostraron la dependencia funcional predicha por el modelo para las distintas variables: espesor de la película y concentración de sustrato en el seno de la solución.

La principal limitación para completar esta validación estuvo impuesta por el hecho de trabajar con un único sistema enzima-mediador: al no cambiar de sistema, muchos parámetros quedan fijos (constantes cinéticas y coeficientes de difusión), y no puede analizarse la dependencia de la respuesta amperométrica con los mismos. Otros parámetros sólo pueden moverse dentro de un intervalo relativamente acotado.

La otra limitación asociada a los electrodos de enzima y mediador coinmovilizados es la gran cantidad de parámetros de los cuales depende la respuesta del dispositivo, o desde otro punto de vista, un gran número de incógnitas. Recordemos una vez más que cuando se coinmovilizan la enzima y el mediador, nunca es posible lograr que todas las moléculas de enzima se comuniquen con el electrodo, la concentración de enzima cableada siempre será inferior a la concentración de enzima total. La concentración de

enzima cableada es siempre un parámetro desconocido que trataremos de estimar. Tanto en los ajustes a fórmulas analíticas aproximadas como a simulaciones numéricas, suele ser muy difícil separar estas variables, y los ajustes suelen quedar limitados a la estimación de un producto o cociente de varios de estos parámetros. En este trabajo de tesis tratamos de acotar estas incógnitas. En este sentido intentamos averiguar los valores de las constantes cinéticas asociadas a las reacciones enzima-sustrato a partir de análisis de datos del sistema homogéneo. Si hubiésemos tenido la capacidad de movernos a través de más casos cinéticos hubiera sido posible estimar mejor estas variables. Aspectos relacionados con este punto fueron analizados al final del capítulo 5. Las estructuras de enzimas y mediador redox autoensambladas electrostáticamente capa-por-capas permiten un control mucho más fino y preciso sobre el espesor y la composición del sistema, en comparación a otras técnicas también muy difundidas como la formación de hidrogeles. Sin embargo, debe tenerse cuidado al intentar extrapolar propiedades de películas delgadas para películas análogas de mayor espesor. Hemos presentado evidencia que señala que existirían cambios estructurales en las películas para aumentos radicales de espesor.

Creemos que este trabajo de tesis muestra un avance en la comprensión de los mecanismos y factores que gobiernan la respuesta de un biosensor enzimático amperométrico. Y como tal, resulta un aporte más para avanzar en el sentido de obtener modelos confiables que permitan predecir la respuesta de un sensor sin necesidad de calibración del dispositivo.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

“Structure and Thickness Dependence of "Molecular Wiring" in Nanostructured Enzyme Multilayers”, V. Flexer, E. Forzani, E. J. Calvo, S. J. Luduena, L. I. Pietrasanta, *Analytical Chemistry*, 78(2), 2006, 399-407

“Modelling Biosensor responses” Bartlett, P. N., Toh, C. S., Calvo, E. J., Flexer, V. en “Bioelectrochemistry, Fundamentals, Experimental Techniques and Applications” Ed. P.N. Bartlett, Wiley, Chichester, *en prensa*.

“Relaxation and Simplex mathematical algorithms applied to the study of steady state electrochemical responses of immobilized enzyme biosensors. Comparison with experiments” Flexer, V., Pratt, K. F. E., Garay, F., Bartlett, P. N., Calvo, E. J., *enviado para su publicación*.

# Referencias

1. Michaelis, L., Menten, M.L., *Biochem. Z.*, Die Kinetik der Invertinwirkung, 1913. **49**: p. 333-369.
2. Briggs, G.E., Haldane, J.B.S., *Biochem. J.*, A note on the kinetics of enzyme action, 1925. **19**(2): p. 338-339.
3. Wilson, R., Turner, A.P.F., *Biosens. Bioelectron.*, Glucose oxidase: an ideal enzyme, 1992. **7**(3): p. 165-185.
4. Degani, Y., Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.*, Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-amino-acid oxidase, 1988. **110**(8): p. 2615-2620.
5. Greenfield, P.F., Kittrell, J.R., Lawrence, R.L., *Analytical Biochemistry*, Inactivation of Immobilized Glucose Oxidase by Hydrogen-Peroxide, 1975. **65**(1-2): p. 109-124.
6. Kepple, K., *Biochemistry*, The Effect of Hydrogen Peroxide on Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*, 1966. **5**(1): p. 139-143.
7. Bartlett, P.N., Caruana, D.J., *The Analyst*, Electrochemical immobilisation of enzymes: Part V. Microelectrodes for the detection of glucose based on glucose oxidase immobilised in poly(phenol) film, 1992. **117**: p. 1287-1292.
8. Bartlett, P.N., Tebbutt, P., Whitaker, R.G., *Prog. React. Kinet.*, Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry, 1991. **16**: p. 55-155.
9. Bourdillon, C., Hervagault, C., Thomas, D., *Biotechnology and Bioengineering*, Increase in Operational Stability of Immobilized Glucose-Oxidase by the Use of an Artificial Cosubstrate, 1985. **27**(11): p. 1619-1622.
10. Calvo, E.J., Etchenique, R., Pietrasanta, L., Wolosiuk, A., Danilowicz, C., *Anal. Chem.*, Layer-By-Layer Self-Assembly of Glucose Oxidase and Os(Bpy)2CIPyCH2NH-poly(Allylamine) Bioelectrode, 2001. **73**(6): p. 1161-1168.
11. Ianniello, R.M., Lindsay, T.J., Yacynych, A.M., *Anal Chim Acta*, Direct electron transfer in immobilized flavoenzyme chemically modified graphite electrodes, 1982. **141**(1): p. 23-32.
12. Bard, A.J., Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd. ed. 2001, New York: John Wiley & Sons.
13. Southampton-Electrochemistry-Group, *Instrumental Methods in Electrochemistry*. 1990, Chichester: Horwood Publishing.
14. Mulchandani, A., Mulchandani, P., Kaneva, I., Chen, W., *Anal. Chem.*, Biosensor for Direct Determination of Organophosphate Nerve Agents Using Recombinant *Escherichia coli* with Surface-Expressed Organophosphorus Hydrolase. 1. Potentiometric Microbial Electrode, 1998. **70**(19): p. 4140-4145.
15. Karyakin, A.A., Vuki, M., Lukachova, L.V., Karyakina, E.E., Orlov, A.V., Karpachova, G.P., Wang, J., *Anal. Chem.*, Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. Application to Biosensors, 1999. **71**(13): p. 2534-2540.
16. Yao, T., Rechnitz, G.A., *Anal. Chem.*, Potentiometric biosensor for riboflavin based on the use of aporiboflavin-binding protein, 1987. **59**(17): p. 2115-2118.
17. Blackburn, G.F., Talley, D.B., Booth, P.M., Durfor, C.N., Martin, M.T., Napper, A.D., Rees, A.R., *Anal. Chem.*, Potentiometric biosensor employing catalytic antibodies as the molecular recognition element, 1990. **62**(20): p. 2211-2216.
18. Liao, C.-W., Chou, J.-C., Sun, T.-P., Hsiung, S.-K., Hsieh, J.-H., *Sensors and Actuators B: Chemical*, Preliminary investigations on a glucose biosensor based on the potentiometric principle, 2007. **123**(2): p. 720-726.
19. Fernandes, J.C.B., Kubota, L.T., Neto, G.d.O., *Anal. Chim. Acta*, Potentiometric biosensor for -ascorbic acid based on ascorbate oxidase of natural source immobilized on ethylene-vinylacetate membrane, 1999. **385**(1-3): p. 3-12.
20. Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Alegret, S., Fabregas, E., *Biosens. Bioelectron.*, Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode, 1999. **14**(1): p. 67-75.

21. Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Fabregas, E., Alegret, S., *Anal. Chim. Acta*, Potentiometric biosensor for lysine analysis based on a chemically immobilized lysine oxidase membrane, 1998. **371**(1): p. 49-56.
22. Sheppard, N.F., Mears, D.J., GuiseppiElie, A., *Biosens. Bioelectron.*, Model of an immobilized enzyme conductimetric urea biosensor, 1996. **11**(10): p. 967-979.
23. Bartlett, P.N., Birkin, P.R., *Anal. Chem.*, Enzyme switch responsive to glucose, 1993. **65**(8): p. 1118-1119.
24. Bartlett, P.N., Pratt, K.F.E., *J. Electroanal. Chem.*, A study of the kinetics of the reaction between ferrocene monocarboxylic acid and glucose oxidase using the rotating-disc electrode, 1995. **397**(1-2): p. 53-60.
25. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, New insights into the enzymic catalysis of the oxidation of glucose by native and recombinant glucose oxidase mediated by electrochemically generated one-electron redox cosubstrates., 1993. **115**(1): p. 2-10.
26. Cass, A.E.G., Davis, G., Francis, G.D., Hill, H.A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D., Turner, A.P.F., *Anal. Chem.*, Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose, 1984. **56**(4): p. 667-671.
27. Liaudet, E., Battaglini, F., Calvo, E.J., *J. Electroanal. Chem.*, Electrochemical study of sulphonated ferrocenes as redox mediators in enzyme electrodes, 1990. - **293**(- 1-2): p. - 68.
28. Yokoyama, K., Kayanuma, Y., *Anal. Chem.*, Cyclic Voltammetric Simulation for Electrochemically Mediated Enzyme Reaction and Determination of Enzyme Kinetic Constants, 1998. **70**(16): p. 3368-3376.
29. Heller, A., Degani, Y., *J. Electrochem. Soc.*, Direct electrical communication between redox enzymes and metal-electrodes, 1987. **134**(8B): p. C494-C495.
30. Gregg, B.A., Schmidt, H.L., Schuhmann, W., Ye, L., Heller, A., *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, Electrical wiring of redox enzymes, 1991. **201**: p. 188-PMSE.
31. Schuhmann, W., Ohara, T.J., Schmidt, H.L., Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.*, Electron-transfer between glucose-oxidase and electrodes via redox mediators bound with flexible chains to the enzyme surface, 1991. **113**(4): p. 1394-1397.
32. Bartlett, P.N., Whitaker, R.G., Green, M.J., Frew, J., *Chem. Commun.*, Covalent Binding of Electron Relays to Glucose-Oxidase, 1987(20): p. 1603-1604.
33. Bartlett, P.N., Bradford, V.Q., Whitaker, R.G., *Talanta*, Enzyme electrode studies of glucose oxidase modified with a redox mediator, 1991. **38**(1): p. 57-63.
34. Ryabova, E.S., Goral, V.N., Csoregi, E., Mattiasson, B., Ryabov, A.D., *Angew. Chem., Int. Edn.*, Coordinative approach to mediated electron transfer: Ruthenium complexed to native glucose oxidase, 1999. **38**(6): p. 804-807.
35. Badia, A., Carlini, R., Fernandez, A., Battaglini, F., Mikkelsen, S.R., English, A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, Intramolecular electron-transfer rates in ferrocene-derivatized glucose-oxidase, 1993. **115**(16): p. 7053-7060.
36. Bartlett, P.N., Booth, S., Caruana, D.J., Kilburn, J.D., Santamaria, C., *Anal. Chem.*, Modification of glucose oxidase by the covalent attachment of a tetrathiafulvalene derivative, 1997. **69**(4): p. 734-742.
37. Battaglini, F., Bartlett, P.N., Wang, J.H., *Anal. Chem.*, Covalent attachment of osmium complexes to glucose oxidase and the application of the resulting modified enzyme in an enzyme switch responsive to glucose, 2000. **72**(3): p. 502-509.
38. Ban, K., Ueki, T., Tamada, Y., Saito, T., Imabayashi, S., Watanabe, M., *Anal. Chem.*, Electrical communication between glucose oxidase and electrodes mediated by phenothiazine-labeled poly(ethylene oxide) bonded to lysine residues on the enzyme surface, 2003. **75**(4): p. 910-917.
39. Imabayashi, S., Ban, K., Ueki, T., Watanabe, M., *J. Phys. Chem. B*, Comparison of catalytic electrochemistry of glucose oxidase between covalently modified and freely diffusing phenothiazine-labeled poly(ethylene oxide) mediator systems, 2003. **107**(34): p. 8834-8839.
40. Taylor, R.F., *Protein Immobilization: fundamentals and applications*. 1991, New York: Marcel Dekker.
41. Williams, D.L., Doig, A.R., Korosi, A., *Anal. Chem.*, Electrochemical-enzymatic analysis of blood glucose and lactate, 1970. **42**(1): p. 118-121.
42. Bartlett, P.N., Pratt, K.F.E., *Biosens. Bioelectron.*, Modeling of Processes in Enzyme Electrodes, 1993. **8**(9-10): p. 451-462.
43. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *Acc. Chem. Res.*, From homogeneous electroenzymatic kinetics to antigen-antibody construction and characterization of spatially ordered catalytic enzyme assemblies on electrodes, 1996. **29**(11): p. 529-535.

44. Pratt, K.F.E., Modelling of amperometric enzyme electrodes, 1993, Tesis Doctoral en Química, University of Southampton
45. Dixon, M., Webb, E.C., *Enzymes*. 3rd. ed. 1979, London: Longman.
46. Bartlett, P.N., Wallace, E.N.K., *J. Electroanal. Chem.*, The oxidation of  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at poly(aniline)-coated electrodes: Part II. Kinetics of reaction at poly(aniline)-poly(styrenesulfonate) composites, 2000. **486**(1): p. 23-31.
47. Bartlett, P.N., Simon, E., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Poly(aniline)-poly(acrylate) composite films as modified electrodes for the oxidation of NADH, 2000. **11**: p. 2599-2606.
48. Lyons, M.E.G., Greer, J.C., Fitzgerald, C.A., Bannon, T., Barlett, P.N., *The Analyst*, Reaction/diffusion with Michaelis-Menten kinetics in electroactive polymer films. Part 1. The steady-state amperometric response, 1996. **6**: p. 715-731.
49. Bartlett, P.N., Pratt, K.F.E., *J. Electroanal. Chem.*, Theoretical treatment of diffusion and kinetics in amperometric immobilized enzyme electrodes Part I: Redox mediator entrapped within the film, 1995. **397**(1-2): p. 61-78.
50. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, Activation and diffusion in the kinetics of adsorption and molecular recognition on surfaces. Enzyme-amplified electrochemical approach to biorecognition dynamics illustrated by the binding of antibodies to immobilized antigens, 1999. **121**(11): p. 2401-2408.
51. Feldberg, S.W., Digital simulation: a general method for solving electrochemical-diffusion-kinetic problems. *Electroanalytical Chemistry*, ed. A.J. Bard. Vol. 3. 1969.
52. Britz, D., *Digital Simulation in Electrochemistry*. 2nd ed. 1988: Springer-Verlag.
53. Crank, J., Nicholson, P., *Proc. Cambridge Phil. Soc.*, A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat conduction type., 1947. **43**: p. 50-67.
54. Albery, W.J., Bartlett, P.N., Driscoll, B.J., Lennox, R.B., *J. Electroanal. Chem.*, Amperometric Enzyme Electrodes .5. The Homogeneous Mediated Mechanism, 1992. **323**(1-2): p. 77-102.
55. Bartlett, P.N., Tebbutt, P., Tyrrell, C.H., *Anal. Chem.*, Electrochemical immobilization of enzymes .3. Immobilization of glucose oxidase in thin-films of electrochemically polymerized phenols, 1992. **64**(2): p. 138-142.
56. Bacha, S., Bergel, A., Comtat, M., *Anal. Chem.*, Transient-response of multilayer electroenzymatic biosensors, 1995. **67**(10): p. 1669-1678.
57. Calvo, E.J., Danilowicz, C., Diaz, L., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, Enzyme Catalysis at Hydrogel-Modified Electrodes with Redox Polymer Mediator, 1993. **89**(2): p. 377-384.
58. Marchesiello, M., Genies, E., *J. Electroanal. Chem.*, A theoretical-model for an amperometric glucose sensor using polypyrrole as the immobilization matrix, 1993. **358**(1-2): p. 35-48.
59. Randriamahazaka, H., Nigretto, J.M., *Electroanalysis*, Digitally simulated predictions of the voltammetric current response relative to adsorbed enzyme-modified electrodes, 1993. **5**: p. 221.
60. Schulmeister, T., Pfeiffer, D., *Biosens. Bioelectron.*, Mathematical-modeling of amperometric enzyme electrodes with perforated membranes, 1993. **8**(2): p. 75-79.
61. Tatsuma, T., Watanabe, T., *Anal. Chem.*, Theoretical evaluation of mediation efficiency in enzyme-incorporated electrodes, 1993. **65**: p. 3129.
62. Bourdillon, C., Demaille, C., Gueris, J., Moiroux, J., Savéant, J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, A fully active monolayer enzyme electrode derivatized by antigen-antibody attachment, 1993. **115**(26): p. 12264-12269.
63. Lyons, M.E.G., Lyons, C.H., Fitzgerald, C., Bartlett, P.N., *J. Electroanal. Chem.*, Conducting-polymer-based electrochemical sensors - theoretical-analysis of the transient current response, 1994. **365**(1-2): p. 29-34.
64. Battaglini, F., Calvo, E.J., *J. Chem. Soc. -Faraday Transactions*, Enzyme catalysis at hydrogel-modified electrodes with soluble redox mediator, 1994. **90**(7): p. 987-995.
65. Martens, N., Hindle, A., Hall, E.A.H., *Biosens. Bioelectron.*, An assessment of mediators as oxidants for glucose-oxidase in the presence of oxygen, 1995. **10**(3-4): p. 393-403.
66. Rhodes, R.K., Shults, M.C., Updike, S.J., *Anal. Chem.*, Prediction of pocket-portable and implantable glucose enzyme electrode performance from combined species permeability and digital-simulation analysis, 1994. **66**: p. 1520.
67. Albery, W.J., Driscoll, B.J., Kalia, Y.N., *J. Electroanal. Chem.*, Amperometric enzyme electrodes. 8. Enzyme electrodes for choline plus betaine aldehyde and hypoxanthine plus xanthine. A kinetic model for a one-enzyme sequential substrate system, 1995. **399**(1-2): p. 13-20.
68. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, Catalysis and mass-transport in spatially ordered enzyme assemblies on electrodes, 1995. **117**(46): p. 11499-11506.

69. Gros, P., Bergel, A., *J. Electroanal. Chem.*, Improved model of a polypyrrole glucose-oxidase modified electrode, 1995. **386**(1-2): p. 65-73.
70. Kong, J.L., Liu, H.Y., Deng, J.Q., *Anal. Lett.*, Cyclic voltammetric response of tetrathiafulvalene glucose-oxidase modified electrode and results for digital-simulation, 1995. **28**(8): p. 1339-1357.
71. Chen, Y., Tan, T.C., *Aiche Journal*, Mathematical-model on the sensing behavior of a biooxidation biosensor, 1995. **41**: p. 1025.
72. Cambiaso, A., Delfino, L., Grattarola, M., Verreschi, G., Ashworth, D., Maines, A., Vadgama, P., *Sens. Actuators, B*, Modelling and simulation of a diffusion limited glucose biosensor, 1996. **33**: p. 203.
73. Gooding, J.J., Hall, E.A.H., *J. Electroanal. Chem.*, Practical and theoretical evaluation of an alternative geometry enzyme electrode, 1996. **417**: p. 25.
74. Jobst, G., Moser, I., Urban, G., *Biosens. Bioelectron.*, Numerical simulation of multi-layered enzymatic sensors, 1996. **11**: p. 111.
75. Desprez, V., Labbe, P., *J. Electroanal. Chem.*, A kinetic model for the electroenzymatic processes involved in polyphenol-oxidase-based amperometric catechol sensors, 1996. **415**: p. 191.
76. Calvo, E.J., Etchenique, R., Danilowicz, C., Diaz, L., *Anal. Chem.*, Electrical communication between electrodes and enzymes mediated by redox hydrogels, 1996. **68**(23): p. 4186-4193.
77. Krishnan, P., Atanasov, P., Wilkins, E., *Biosens. Bioelectron.*, Mathematical modeling of an amperometric enzyme electrode based on a porous matrix of Stober glass beads, 1996. **11**: p. 811.
78. Somasundrum, M., Tongta, A., Tanticharoen, M., Kirtikara, K., *J. Electroanal. Chem.*, A kinetic model for the reduction of enzyme-generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a metal-dispersed conducting polymer film, 1997. **440**(1-2): p. 259-264.
79. Zhu, K., Wu, H.H., *Chem. Res. Chinese U.*, Kinetic analysis of an enzyme-containing polymer modified electrode, 1997. **13**: p. 59.
80. Gooding, J.J., Hall, E.A.H., Hibbert, D.B., *Electroanal.*, From thick films to monolayer recognition layers in amperometric enzyme electrodes, 1998. **10**(16): p. 1130-1136.
81. Neykov, A., Georgiev, T., *Chem. Biochem. Eng. Q.*, Mathematical modelling of amperometric biosensor systems with non-linear enzyme kinetics, 1998. **12**: p. 73.
82. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Saveant, J.M., *J. Phys. Chem. B*, Analyzing product inhibition and pH gradients in immobilized enzyme films as illustrated experimentally by immunologically bound glucose oxidase electrode coatings, 1999. **103**(40): p. 8532-8537.
83. Gajovic, N., Warsinke, A., Huang, T., Schulmeister, T., Scheller, F.W., *Anal. Chem.*, Characterization and mathematical modeling of a bienzyme electrode for L-malate with cofactor recycling, 1999. **71**: p. 4657.
84. Anne, A., Demaille, C., Moiroux, J., *J. Am. Chem. Soc.*, Elastic bounded diffusion. Dynamics of ferrocene-labeled poly(ethylene glycol) chains terminally attached to the outermost monolayer of successively self-assembled monolayers of immunoglobulins, 1999. **121**: p. 10379-10388.
85. Anicet, N., Bourdillon, C., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *Langmuir*, Step-by-Step Avidin-Biotin Construction of Bienzyme Electrodes. Kinetic Analysis of the Coupling between the Catalytic Activities of Immobilized Monomolecular Layers of Glucose Oxidase and Hexokinase, 1999. **15**(19): p. 6527-6533.
86. CocheGuerente, L., Desprez, V., Diard, J.P., Labbe, P., *J. Electroanal. Chem.*, Amplification of amperometric biosensor responses by electrochemical substrate recycling Part I. Theoretical treatment of the catechol-polyphenol oxidase system, 1999. **470**: p. 53.
87. CocheGuerente, L., Desprez, V., Labbe, P., Therias, S., *J. Electroanal. Chem.*, Amplification of amperometric biosensor responses by electrochemical substrate recycling Part II. Experimental study of the catechol-polyphenol oxidase system immobilized in a laponite clay matrix, 1999. **470**: p. 61.
88. Gooding, J.J., Erokhin, P., Hibbert, D.B., *Biosens. Bioelectron.*, Parameters important in tuning the response of monolayer enzyme electrodes fabricated using self-assembled monolayers of alkanethiols, 2000. **15**(5-6): p. 229-239.
89. Galceran, J., Taylor, S.L., Bartlett, P.N., *J. Electroanal. Chem.*, Modelling the steady-state current at the inlaid disc microelectrode for homogeneous mediated enzyme catalysed reactions, 2001. **506**(2): p. 65-81.
90. Limoges, B., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *J. Electroanal. Chem.*, Kinetic control by the substrate and the cosubstrate in electrochemically monitored redox enzymatic immobilized systems. Catalytic responses in cyclic voltammetry., 2002. **521**(1-2): p. 1-7.



91. Limoges, B., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *J. Electroanal. Chem.*, Kinetic control by the substrate and the cosubstrate in electrochemically monitored redox enzymatic immobilized systems. Catalytic responses in cyclic voltammetry and steady state techniques, 2002. **521**(1-2): p. 8-15.
92. Limoges, B., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *J. Electroanal. Chem.*, Erratum to "Kinetic control by the substrate and the cosubstrate in electrochemically monitored redox enzymatic immobilized systems. Catalytic responses in cyclic voltammetry and steady state techniques" [*J. Electroanal. Chem.* 521 (2002) 8-15], 2002. **529**(1): p. 75.
93. Matsumoto, R., Kano, K., Ikeda, T., *J. Electroanal. Chem.*, Theory of steady-state catalytic current of mediated bioelectrocatalysis, 2002. **535**: p. 37-40.
94. Calvo, E.J., Danilowicz, C., Wolosiuk, A., *J Am Chem Soc*, Molecular "wiring" enzymes in organized nanostructures, 2002. **124**(11): p. 2452-2453.
95. Rosca, V., Popescu, I.C., *Electrochem. Commun.*, Kinetic analysis of horseradish peroxidase "wiring" in redox polyelectrolyte-peroxidase multilayer assemblies, 2002. **4**(11): p. 904-911.
96. Lyons, M.E.G., *Sensors*, Mediated electron transfer at redox active monolayers. Part 4: Kinetics of redox enzymes coupled with electron mediators, 2003. **3**: p. 19-42.
97. Calvente, J.J., Narvaez, A., Dominguez, E., Andreu, R., *J. Phys. Chem. B*, Kinetic analysis of wired enzyme electrodes. Application to horseradish peroxidase entrapped in a redox polymer matrix, 2003. **107**(27): p. 6629-6643.
98. Baronas, R., Kulys, J., Ivanauskas, F., *Biosens. Bioelectron.*, Modelling amperometric enzyme electrode with substrate cyclic conversion, 2004. **19**(8): p. 915-922.
99. Honeychurch, M.J., Bernhardt, P.V., *J. Phys. Chem. B*, A Numerical Approach to Modeling the Catalytic Voltammetry of Surface-Confined Redox Enzymes, 2004. **108**(40): p. 15900-15909.
100. Honeychurch, M.J., Bernhardt, P.V., *J. Phys. Chem. B*, On the Steady-State Assumption and Its Application to the Rotating Disk Voltammetry of Adsorbed Enzymes, 2005. **109**(12): p. 5766-5773.
101. Albery, W.J., Bartlett, P.N., Cass, A.E.G., Craston, D.H., Haggitt, B.G.D., *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, Electrochemical sensors: theory and experiment, 1986. **82**: p. 1033-1050.
102. Battaglini, F., Calvo, E.J., *Anal. Chim. Acta*, Digital-Simulation of Homogeneous Enzyme-Kinetics for Amperometric Redox-Enzyme Electrodes, 1992. **258**(1): p. 151-160.
103. Battaglini, F., Calvo, E.J., *J. Electroanal. Chem.*, Open Circuit relaxation behaviour of enzyme electrodes, 1990. **280**: p. 443-450.
104. Nicholson, R.S., Shain, I., *Anal. Chem.*, Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems., 1964. **36**(4): p. 706-723.
105. Green, M.J., Hill, H.A.O., *J.Chem. Soc.-Faraday Transactions I*, Amperometric Enzyme Electrodes, 1986. **82**: p. 1237-1243.
106. Rusling, J.F., Ito, K., *Anal. Chim. Acta*, Voltammetric Determination of Electron-Transfer Rate between an Enzyme and a Mediator, 1991. **252**(1-2): p. 23-27.
107. Frede, M., Steckhan, E., *Tetrahedron Letters*, Continuous Electrochemical Activation of Flavoenzymes Using Polyethyleneglycol-Bound Ferrocenes as Mediators - a Model for the Application of Oxidoreductases as Oxidation Catalysts in Organic-Synthesis, 1991. **32**(38): p. 5063-5066.
108. Gough, D.A., Leypoldt, J.K., *Anal. Chem.*, Membrane-covered, rotated disk electrode, 1979. **51**(3): p. 439-444.
109. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *J. Phys. Chem. B*, Analyzing Product Inhibition and pH Gradients in Immobilized Enzyme Films As Illustrated Experimentally by Immunologically Bound Glucose Oxidase Electrode Coatings, 1999. **103**(40): p. 8532-8537.
110. Limoges, B., Savéant, J.M., *J. Electroanal. Chem.*, Cyclic voltammetry of immobilized redox enzymes. Interference of steady-state and non-steady-state Michaelis-Menten kinetics of the enzyme-redox cosubstrate system, 2003. **549**: p. 61-70.
111. Bartlett, P.N., Whitaker, R.G., *J. Electroanal. Chem.*, Electrochemical immobilisation of enzymes : Part II. Glucose oxidase immobilised in poly-N-methylpyrrole, 1987. **224**(1-2): p. 37-48.
112. Bartlett, P.N., Whitaker, R.G., *J. Electroanal. Chem.*, Electrochemical immobilisation of enzymes : Part I. Theory, 1987. **224**(1-2): p. 27-35.
113. Gooding, J.J., Erokhin, P., Losic, D., Yang, W., Policarpio, V., Liu, J., Ho, F.M., Situmorang, M., Hibbert, D.B., Shapt, J.G., *Anal. Sci.*, Parameters important in fabricating enzyme electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols, 2001. **17**(1): p. 3-9.
114. Gooding, J.J., Hibbert, D.B., *TRAC*, The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes, 1999. **18**(8): p. 525-533.

115. Gooding, J.J., Pugliano, L., Hibbert, D.B., Erokhin, P., *Electrochem. Commun.*, Amperometric biosensor with enzyme amplification fabricated using self-assembled monolayers of alkanethiols: The influence of the spatial distribution of the enzymes, 2000. **2**(4): p. 217-221.
116. Gooding, J.J., Situmorang, M., Erokhin, P., Hibbert, D.B., *Anal. Commun.*, An assay for the determination of the amount of glucose oxidase immobilised in an enzyme electrode, 1999. **36**(6): p. 225-228.
117. Li, J.H., Yan, J.C., Deng, Q., Cheng, G.J., Dong, S.J., *Electrochim. Acta*, Viologen-thiol self-assembled monolayers for immobilized horseradish peroxidase at gold electrode surface, 1997. **42**(6): p. 961-967.
118. Jiang, L., McNeil, C.J., Cooper, J.M., *Chem. Commun.*, Direct electron-transfer reactions of glucose-oxidase immobilized at a self-assembled monolayer, 1995(12): p. 1293-1295.
119. Sun, S., Ho-Si, P.H., Harrison, D.J., *Langmuir*, Preparation of active Langmuir-Blodgett films of glucose oxidase, 1991. **7**(4): p. 727-737.
120. Barmin, A.V., Eremenko, A.V., Kurochkin, I.N., Sokolovsky, A.A., *Electroanal.*, Cyclic voltammetry of ferrocenecarboxylic acid monomolecular films and their reaction with glucose oxidase, 1994. **6**(2): p. 107-112.
121. Tsuji, H., Mitsubayashi, K., *Electroanal.*, An amperometric glucose sensor with modified Langmuir-Blodgett films, 1997. **9**(2): p. 161-164.
122. Rusling, J.F., *Acc. Chem. Res.*, Enzyme Bioelectrochemistry in Cast Biomembrane-Like Films, 1998. **31**(6): p. 363-369.
123. Schlereth, D.D., Kooyman, R.P.H., *J. Electroanal. Chem.*, Self-assembled monolayers with biospecific affinity for lactate dehydrogenase for the electroenzymatic oxidation of lactate, 1997. **431**(2): p. 285-295.
124. Anicet, N., Bourdillon, C., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *J. Phys. Chem. B*, Electron Transfer in Organized Assemblies of Biomolecules. Step-by-Step Avidin/Biotin Construction and Dynamic Characteristics of a Spatially Ordered Multilayer Enzyme Electrode, 1998. **102**(49): p. 9844-9849.
125. Creager, S.E., Olsen, K.G., *Anal. Chim. Acta*, Self-assembled monolayers and enzyme electrodes - progress, problems and prospects, 1995. **307**(2-3): p. 277-289.
126. Liu, C.C., Lahoda, E.J., Galasco, R.T., Wingard, L.B., *Biotechnology and Bioengineering*, Immobilization of lactase on carbon, 1975. **17**(11): p. 1695-1696.
127. Katz, E., Riklin, A., Willner, I., *J. Electroanal. Chem.*, Application of stilbene-(4,4'-diisothiocyanate)-2,2'-disulfonic acid as a bifunctional reagent for the organization of organic materials and proteins onto electrode surfaces, 1993. **354**(1-2): p. 129-144.
128. Willner, I., Riklin, A., Shoham, B., Rivenzon, D., Katz, E., *Advanced Materials*, Development of Novel Biosensor Enzyme Electrodes - Glucose-Oxidase Multilayer Arrays Immobilized onto Self-Assembled Monolayers Electrodes, 1993. **5**(12): p. 912-915.
129. Gregg, B.A., Heller, A., *Anal. Chem.*, Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications, 1990. **62**(3): p. 258-263.
130. Gregg, B.A., Heller, A., *J. Phys. Chem.*, Redox polymer films containing enzymes. 2. Glucose oxidase containing enzyme electrodes, 1991. **95**(15): p. 5976-5980.
131. Gregg, B.A., Heller, A., *J. Phys. Chem.*, Redox polymer-films containing enzymes .1. A redox-conducting epoxy cement - synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinone, 1991. **95**(15): p. 5970-5975.
132. Calvo, E.J., Danilowicz, C., Diaz, L., *J. Electroanal. Chem.*, A new polycationic hydrogel for 3-dimensional enzyme wired modified electrodes, 1994. **369**(1-2): p. 279-282.
133. Iwuoha, E.I., Smyth, M.R., Vos, J.G., *Electroanal.*, Amperometric glucose sensor containing nondiffusional osmium redox centers - analysis of organic-phase responses, 1994. **6**(11-12): p. 982-989.
134. Vilkanauskyte, A., Erichsen, T., Marcinkeviciene, L., Laurinavicius, V., Schuhmann, W., *Biosens. Bioelectron.*, Reagentless biosensors based on co-entrapment of a soluble redox polymer and an enzyme within an electrochemically deposited polymer film, 2002. **17**(11-12): p. 1025-1031.
135. Hodak, J., Etchenique, R., Calvo, E.J., Singhal, K., Bartlett, P.N., *Langmuir*, Layer-by-layer self-assembly of glucose oxidase with a poly(allylamine)ferrocene redox mediator, 1997. **13**(10): p. 2708-2716.
136. Hou, S.F., Fang, H.Q., Chen, H.Y., *Anal. Lett.*, An amperometric enzyme electrode for glucose using immobilized glucose oxidase in a ferrocene attached poly(4-vinylpyridine) multilayer film, 1997. **30**(9): p. 1631-1641.

137. Miscoria, S.A., Desbrieres, J., Barrera, G.D., Labbe, P., Rivas, G.A., *Anal. Chim. Acta*, Glucose biosensor based on the layer-by-layer self-assembling of glucose oxidase and chitosan derivatives on a thiolated gold surface, 2006. **578**(2): p. 137-144.
138. Ferreyra, N., Coche-Guerente, L., Labbe, P., *Anal. Chim. Acta*, Construction of layer-by-layer self-assemblies of glucose oxidase and cationic polyelectrolyte onto glassy carbon electrodes and electrochemical study of the redox-mediated enzymatic activity, 2004. **49**(3): p. 477-484.
139. Rodriguez, M.C., Rivas, G.A., *Electroanal.*, Assembly of glucose oxidase and different polyelectrolytes by means of electrostatic layer-by-layer adsorption on thiolated gold surface, 2004. **16**(20): p. 1717-1722.
140. Yan, X.D., Ji, H.F., Lvov, Y., *Chemical Physics Letters*, Modification of microcantilevers using layer-by-layer nanoassembly film for glucose measurement, 2004. **396**(1-3): p. 34-37.
141. Yoon, H.C., Kim, H.-S., *Anal. Chem.*, Multilayered Assembly of Dendrimers with Enzymes on Gold: Thickness-Controlled Biosensing Interface, 2000. **72**(5): p. 922-926.
142. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, Step-by-step immunological construction of a fully active multilayer enzyme electrode, 1994. **116**(22): p. 10328-10329.
143. Decher, G., Hong, J.D., Schmitt, J., *Thin Solid Films*, Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .3. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces, 1992. **210**(1-2): p. 831-835.
144. Decher, G., Hong, J.D., *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*, Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .2. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces, 1991. **95**(11): p. 1430-1434.
145. Decher, G., *Science*, Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites, 1997. **277**(5330): p. 1232-1237.
146. Shiratori, S.S., Rubner, M.F., *Macromolecules*, pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes, 2000. **33**(11): p. 4213-4219.
147. Yoo, D., Shiratori, S.S., Rubner, M.F., *Macromolecules*, Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes 1998. **31**(13): p. 4309 - 4318.
148. Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., Kunitake, T., *J. Am. Chem. Soc.*, Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption, 1995. **117**(22): p. 6117-6123.
149. Lvov, Y., Ariga, K., Kunitake, T., *Chemistry Letters*, Layer-by-Layer Assembly of Alternate Protein Polyion Ultrathin Films, 1994(12): p. 2323-2326.
150. Lvov, Y., Decher, G., Sukhorukov, G., *Macromolecules*, Assembly of Thin-Films by Means of Successive Deposition of Alternate Layers of DNA and Poly(Allylamine), 1993. **26**(20): p. 5396-5399.
151. Schmitt, J., Decher, G., Dressick, W.J., Brandow, S.L., Geer, R.E., Shashidhar, R., Calvert, J.M., *Advanced Materials*, Metal nanoparticle/polymer superlattice films: Fabrication and control of layer structure, 1997. **9**(1): p. 61-&.
152. Lvov, Y., Haas, H., Decher, G., Mohwald, H., Mikhailov, A., Mtchedlishvili, B., Morgunova, E., Vainshtein, B., *Langmuir*, Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus, 1994. **10**(11): p. 4232-4236.
153. Losche, M., Schmitt, J., Decher, G., Bouwman, W.G., Kjaer, K., *Macromolecules*, Detailed Structure of Molecularly Thin Polyelectrolyte Multilayer Films on Solid Substrates as Revealed by Neutron Reflectometry, 1998. **31**(25): p. 8893-8906.
154. Nuzzo, R.G., Allara, D.L., *J. Am. Chem. Soc.*, Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces, 1983. **105**(13): p. 4481-4483.
155. Calvo, E.J., Danilowicz, C.B., Wolosiuk, A., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Supramolecular multilayer structures of wired redox enzyme electrodes, 2005. **7**: p. 1-7.
156. Calvo, E.J., Wolosiuk, A., *ChemPhysChem*, Supramolecular architectures of electrostatic self-assembled glucose oxidase enzyme electrodes, 2004. **5**(2): p. 235-239.
157. Calvo, E.J., Wolosiuk, A., *ChemPhysChem*, Wiring Enzymes in Nanostructures Built with Electrostatically Self-Assembled Thin Films, 2005. **6**: p. 43-47.
158. Calvo, E.J., Danilowicz, C., Forzani, E., Wolosiuk, A., Otero, M., *Integrated Analytical Systems*, Chemically modified electrodes with integrated biomolecules and molecular wires, 2003. **39**: p. 327-376.

159. Calvo, E.J., Battaglini, F., Danilowicz, C.B., Wolosiuk, A., Otero, M., *Faraday Discussion*, Layer-by-layer electrostatic deposition of biomolecules on surfaces for molecular recognition, redox mediation and signal generation, 2000. **116**: p. 47-65.
160. Forzani, E.S., Otero, M., Pérez, M.A., López Teijelo, M., Calvo, E.J., *Langmuir*, The structure of layer-by-layer self-assembled glucose oxidase and Os(bpy)<sub>2</sub>CIPyCH<sub>2</sub>NH-poly(allylamine) multilayers: Ellipsometric and quartz crystal microbalance studies, 2002. **18**(10): p. 4020-4029.
161. Forzani, E.S., Perez, M.A., Teijelo, M.L., Calvo, E.J., *Langmuir*, Redox driven swelling of layer-by-layer enzyme-polyelectrolyte multilayers, 2002. **18**(25): p. 9867-9873.
162. Muller, R.H., *Adv. Electrochem. Electrochem. Engr.*, 1973. **9**: p. 167.
163. SPMguide, T., <http://www.di.com>.
164. Giessibl, F.J., *Rev. Mod. Phys.*, Advances in atomic force microscopy, 2003. **75**: p. 949-983.
165. Sauerbrey, G.Z., *Z. Phys.*, Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, 1959. **155**(2): p. 206-222.
166. Calvo, E.J., Danilowicz, C., Etchenique, R., *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, Measurement of viscoelastic changes at electrodes modified with redox hydrogels with a quartz crystal device, 1995. **91**(22): p. 4083-4091.
167. Danilowicz, C., Corton, E., Battaglini, F., *J. Electroanal. Chem.*, Osmium complexes bearing functional groups: building blocks for integrated chemical systems, 1998. **445**(1-2): p. 89-94.
168. Danilowicz, C., Corton, E., Battaglini, F., Calvo, E.J., *Electrochim. Acta*, An Os(byp)(2)CIPyCH(2)NHpoly(allylamine) hydrogel mediator for enzyme wiring at electrodes, 1998. **43**(23): p. 3525-3531.
169. Laemmli, U.K., *Nature*, Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, 1970. **227**: p. 680-685.
170. Press, W.H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., Flannery, B.P., *Numerical Recipes in Fortran in Fortran 77: The art of Scientific Computing*. 2nd ed. 1997, New York: Cambridge University Press.
171. Limoges, B., Moiroux, J., Saveant, J.-M., *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Kinetic control by the substrate and/or the cosubstrate in electrochemically monitored redox enzymatic homogeneous systems. Catalytic responses in cyclic voltammetry, 2002. **521**(1-2): p. 1-7.
172. Razumas, V., Kulys, J., Knichel, M., Wiemhofer, H.D., Gopel, W., *Electroanal.*, Monoalkylferrocene-Mediated Amperometric Enzyme Electrodes for Glucose Determination, 1993. **5**(5-6): p. 399-404.
173. Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.M., *J. of Physical Chemistry B*, Analyzing product inhibition and pH gradients in immobilized enzyme films as illustrated experimentally by immunologically bound glucose oxidase electrode coatings, 1999. **103**(40): p. 8532-8537.
174. Dequaire, M., Limoges, B., Moiroux, J., Savéant, J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase. Catalysis and inhibition, 2002. **124**(2): p. 240-253.
175. Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrak, J., Pericin, D., *Int. J. Biochem Cell Biol.*, Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors, 2005. **37**(4): p. 731-750.
176. Bright, H.J., Appleby, M., *J. Biol. Chem.*, The pH Dependence of the Individual Steps in the Glucose Oxidase Reaction, 1969. **244**(13): p. 3625-3634.
177. Anicet, N., Bourdillon, C., Demaille, C., Moiroux, J., Savéant, J.-M., *J. Electroanal. Chem.*, Catalysis of the electrochemical oxidation of glucose by glucose oxidase and a single electron cosubstrate: kinetics in viscous solutions, 1996. **410**(2): p. 199-202.
178. Ahmad, A., Akhtar, M.S., Bhakuni, V., *Biochemistry*, Monovalent Cation-Induced Conformational Change in Glucose Oxidase Leading to Stabilization of the Enzyme, 2001. **40**(7): p. 1945-1955.
179. Bourdillon, C., Thomas, V., Thomas, D., *Enzyme and Microbial Technology*, Electrochemical Study of D-Glucose Oxidase Auto-Inactivation, 1982. **4**(3): p. 175-180.
180. Kulys, J.J., Cenas, N.K., *Biochimica Et Biophysica Acta*, Oxidation of Glucose-Oxidase from Penicillium-Vitale by One-Electron and 2-Electron Acceptors, 1983. **744**(1): p. 57-63.
181. Miron, J., Gonzalez, M.P., Vazquez, J.A., Pastrana, L., Murado, M.A., *Enzyme and Microbial Technology*, A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions, 2004. **34**(5): p. 513-522.
182. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 82nd Ed.
183. Weibel, M.K., Bright, H.J., *J. Biol. Chem.*, The glucose oxidase mechanism. Interpretation of the pH dependence., 1971. **246**(9): p. 2734-2744.
184. Swodoba, B.E.P., Massey, V., *J. Biol. Chem.*, Purification and properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*, 1965. **240**(5): p. 2209-2215.

185. Raba, J., Mottola, H.A., *Critical Reviews in Anal. Chem.*, Glucose Oxidase as an Analytical Reagent, 1995. **25**(1): p. 1-42.
186. [www.brenda-enzymes.info](http://www.brenda-enzymes.info).
187. Gibson, Q.H., Swoboda, B.E., Massey, V., *J. Biol. Chem.*, Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase, 1964. **239**: p. 3927-3934.
188. Bright, H.J., Gibson, Q.H., *J. Biol. Chem.*, The oxidation of 1-deuterated Glucose by Glucose Oxidase, 1967. **242**(5): p. 994-1003.
189. Nakamura, S., Ogura, Y., *The Journal of Biochemistry*, Action Mechanism of Glucose Oxidase of *Aspergillus niger*, 1968. **63**(3): p. 308-316.
190. Duke, F.R., Weibel, M., Page, D.S., Bulgrin, V.G., Luthy, J., *J. Am. Chem. Soc.*, The Glucose Oxidase Mechanism. Enzyme Activation by Substrate, 1969. **91**(14): p. 3904-3909.
191. Bartlett, P.N., Toh, C.S., Calvo, E.J., Flexer, V., *Modelling Biosensor responses*, in *Bioelectrochemistry, Fundamental, Experimental Techniques and Applications*, P.N. Bartlett, Editor. en prensa, Wiley: Chichester.
192. Guioamar, A.J., Guthrie, J.T., Evans, S.D., *Langmuir*, Use of Mixed Self-Assembled Monolayers in a Study of the Effect of the Microenvironment on Immobilized Glucose Oxidase, 1999. **15**(4): p. 1198-1207.
193. Onda, M., Lvov, Y., Ariga, K., Kunitake, J., *J. Fermentation and Bioengineering*, 1996. **82**: p. 502.
194. Willner, I., Katz, E., Willner, B., *Electroanal.*, Electrical contact of redox enzyme layers associated with electrodes - routes to amperometric biosensors, 1997. **9**(13): p. 965-977.
195. Blonder, R., Katz, E., Cohen, Y., Itzhak, N., Riklin, A., Willner, I., *Anal. Chem.*, Application of Redox Enzymes for Probing the Antigen-Antibody Association at Monolayer Interfaces: Development of Amperometric Immunosensor Electrodes, 1996. **68**(18): p. 3151-3157.
196. Franchina, J.G.L., W. M.; Dermody, D. L.; Crooks, R. M.; Bergbreiter, D. E.; Sirkar, K.; Russell, R. J.; Pishko, M. V., *Anal. Chem.*, Electrostatic Immobilization of Glucose Oxidase in a Weak Acid, Polyelectrolyte Hyperbranched Ultrathin Film on Gold: Fabrication, Characterization, and Enzymatic Activity, 1999. **71**(15): p. 3133-3139.
197. Decher, G., *Multilayer Thin Films*, ed. G. Decher and J.B. Schlenoff. Vol. Chapter 1. 2003, Weinheim: Wiley-VCH.
198. Choi, J., Rubner, M.F., *Macromolecules*, Influence of the Degree of Ionization on Weak Polyelectrolyte Multilayer Assembly, 2005. **38**(1): p. 116-124.
199. Decher, G., Schmitt, J., *Prog. Colloid Polym. Sci.*, Fine-Tuning of the Film Thickness of Ultrathin Multilayer Films Composed of Consecutively Alternating Layers of Anionic and Cationic Polyelectrolytes, 1992. **89**: p. 160-164.
200. Park, S.Y., Barrett, C.J., Rubner, M.F., Mayes, A.M., *Macromolecules*, Anomalous Adsorption of Polyelectrolyte Layers 2001. **34**(10): p. 3384-3388.
201. Park, S.Y., Rubner, M.F., Mayes, A.M., *Langmuir*, Free Energy Model for Layer-by-Layer Processing of Polyelectrolyte Multilayer Films 2002. **18**(24): p. 9600-9604.
202. Mendelsohn, J.D., Barrett, C.J., Chan, V.V., Pal, A.J., Mayes, A.M., Rubner, M.F., *Langmuir*, Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers, 2000. **16**(11): p. 5017-5023.
203. Voet, J.G., Coe, J., Epstein, J., Matossian, V., Shipley, T., *Biochemistry*, Electrostatic control of enzyme-reactions-effect of ionic strength on the pKa of an essential acidic group on Glucose Oxidase, 1981. **20**(25): p. 7182-7185.
204. Petrov, A.I., Antipov, A.A., Sukhorukov, G.B., *Macromolecules*, Base-Acid Equilibria in Polyelectrolyte Systems: From Weak Polyelectrolytes to Interpolyelectrolyte Complexes and Multilayered Polyelectrolyte Shells, 2003. **36**(26): p. 10079-10086.
205. Caruso, F., Furlong, D.N., Ariga, K., Ichinose, I., Kunitake, T., *Langmuir*, Characterization of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Fourier Transform Infrared Reflection-Absorption, 1998. **14**(16): p. 4559-4565.
206. Lobo, R.F.M., Pereira-da-Silva, M.A., Raposo, M., Faria, R.M., Oliveira Jr, O.N., *Nanotechnology*, The morphology of layer-by-layer films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy, 2003. **14**: p. 101-108.
207. Sneddon, I.N., *Int. J. Eng. Sci.*, The relation between load and penetration in the axisymmetric boussines Q problem for a punch of arbitrary profile, 1965. **3**: p. 47-57.
208. Domke, J., Radmacher, M., *Langmuir*, Measuring the elastic properties of thin film polymer films with the atomic force microscope, 1998. **14**: p. 3320-3325.
209. Hertz, H., *J. Reine Angew. Mathematik*, 1882. **92**: p. 156-171.

210. Dai, J., Jensen, A.W., Mohanty, D.K., Erndt, J., Bruening, M.L., *Langmuir*, Controlling the Permeability of Multilayered Polyelectrolyte Films through Derivatization, Cross-Linking, and Hydrolysis 2001. **17**: p. 931-937.
211. Farhat, T.R., Schlenoff, J.B., *Langmuir*, Ion Transport and Equilibria in Polyelectrolyte Multilayers 2001. **17**: p. 1184-1192.
212. Harris, J.J., Stair, J.L., Bruening, M.L., *Chem. Mater*, Layered Polyelectrolyte Films as Selective, Ultrathin Barriers for Anion Transport 2000. **12**: p. 1941-1946.
213. Krasemann, L., Tieke, B., *Langmuir*, Selective Ion Transport across Self-Assembled Alternating Multilayers of Cationic and Anionic Polyelectrolytes 2000. **16**: p. 287-290.
214. Liu, X., Bruening, M.L., *Chem. Mater.*, Size-Selective Transport of Uncharged Solutes through Multilayer Polyelectrolyte Membranes 2004. **16**: p. 351-357.
215. Mao, F., Mano, N., Heller, A., *J. Am. Chem. Soc.*, Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "wiring" hydrogels, 2003. **125**: p. 4951-4957.