



FACULTAD DE CIENCIAS

Dpto. de Química Física Aplicada

Transductores de oro nanoestructurado para su empleo en el desarrollo de biosensores enzimáticos

Tesis doctoral

Miriam Gamero Montejo

2013

Directores

Concepción Alonso Fuente

Profesor Titular

Dpto. Química Física Aplicada (UAM)

M^a Encarnación Lorenzo Abad

Profesor Catedrático

Dpto. Química Analítica Aplicada y Análisis Instrumental (UAM)

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

¡¡Por fin!! Ha llegado el momento de escribir las últimas líneas de mi tesis, o mejor dicho nuestra tesis, ya que la realización de esta no habría sido posible sin todo el apoyo, ayuda, conocimiento, cariño y/o paciencia que he recibido por parte de todas las personas que han puesto su granito de arena para que este trabajo haya sido posible.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis Directoras de Tesis, la Dra. Concepción Alonso Fuente y la Dra. María Encarnación Lorenzo, por sus enseñanzas y orientaciones y en definitiva por haber hecho posible que este trabajo saliera adelante. Agradecer también a la Universidad Autónoma de Madrid por concederme el contrato de Profesor Ayudante con el que me ha sido posible realizar este trabajo.

A la Dra. María Encarnación Lorenzo le agradezco la confianza que depositó en mí al aceptarme en su grupo y al darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación con una beca FPI en el departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental.

A la Dra. Concepción Alonso Fuente, en primer lugar le agradezco que me diera la oportunidad de incorporarme al departamento de Química Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, al que también tengo que agradecer su buena acogida, y después tengo que agradecerle toda su confianza, apoyo y dedicación durante todos estos años.

Asimismo, agradezco al Prof. Phillip Bartlett, por darme la posibilidad de realizar dos estancias de 6 y 3 meses en su grupo de investigación en la Universidad de Southampton, donde pude realizar parte del trabajo esencial para esta Tesis. A su vez quiero expresar mi gratitud a los compañeros y amigos que conocí allí y que me ayudaron a adaptarme tanto fuera como dentro del laboratorio. Especialmente a Ana, que desde el primer día se encargó de que me sintiera como en casa y a Magda, Thomas, Maciek, David, Hartini, Sumeet y el resto de compañeros que hicieron mi estancia allí mucho más fácil. También agradezco a mi familia española en

Southampton: Ana, Bego, Susana, Bea, Patxi, María y Norberto por haberme acogido tan bien.

Por supuesto gracias también a mis compañeros y amigos de la UAM. A todos los miembros del grupo de investigación, a mis compañeros de Analítica, los que siguen aquí y a los que seguimos viendo de vez en cuando. Especialmente gracias a Tania y a Mónica por todo su apoyo, que ha sido fundamental durante todos estos años dentro y fuera del trabajo. ¡Muchas gracias!

A todos mis compañeros de *Quiji*, especialmente a Eva, que me ha acompañado en las últimas etapas de este largo camino y siempre ha estado dispuesta a escuchar y aconsejarme. A Laura, gracias por ayudarme en todo lo que has podido y por tus ánimos cuando los he necesitado.

A Leo y a Bea que me hicieron compañía durante una temporadita en el labo. Gracias Leo por esa alegría que desprendes y por el hilo musical...¡Mucho ánimo!, que algún día tú estarás escribiendo los agradecimientos de tu tesis.

Gracias también a todos mis amigos de fuera del laboratorio. Por aguantarme en mi lucha por acabar esta tesis. Y al voley, por haberme proporcionado tantos buenos amigos que me han apoyado y servido de vía de escape en tantas ocasiones.

Y sobre todo, gracias a mi familia por ser vuestro mucho del tiempo que he utilizado para terminar esta Tesis. En primer lugar gracias a mis padres, por haber estado en cada momento de mi vida. Por todo su cariño, por haber confiado siempre en mí y por haberme inculcado las ganas de saber. Y a mi hermana por sus “batallitas” que siempre consiguen que desconecte de las preocupaciones. Y por supuesto a Javi, gracias por tu infinita paciencia, por haberme apoyado siempre y no haber permitido que me rindiera nunca. Y gracias también por haberme permitido anteponer tantas veces este trabajo a nuestra vida personal.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	NANOMATERIALES	6
1.1.1	Definición, obtención y clasificación de los nanomateriales.....	6
1.1.2	Propiedades de los nanomateriales.....	7
1.2	BIOSENSORES	9
1.2.1	Biosensores basados en nanomateriales.....	13
1.2.2	Biosensores de Lactato Oxidasa.....	19
1.2.2.1	Métodos de Inmovilización de enzimas.....	23
2	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	31
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	35
3.1	Teoría enzimática	35
3.1.1	Cinética enzimática	35
3.1.2	Modelo cinético para un biosensor electroquímico con una monocapa de enzima inmovilizada utilizando un mediador soluble.....	40
3.2	Técnicas no estacionarias para sistemas enzimáticos.	46
3.2.1	Voltametría cíclica para un proceso reversible.....	46
3.2.2	Voltametría cíclica para un proceso catalítico.....	51
3.3	Técnicas electroquímicas periódicas.....	54
3.3.1	Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS).....	54
3.4	Técnicas de caracterización superficial	67
3.4.1	Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	67
3.4.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	72
3.4.3	Difracción de Rayos-X (DRX)	75

3.4.4	Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS).....	79
4	MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPOS UTILIZADOS	85
4.1	Reactivos y disoluciones.....	85
4.2	Materiales.....	87
4.3	Metodología	89
4.3.1	Caracterización superficial mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	89
4.3.2	Procesos de inmovilización de la enzima sobre los distintos soportes	90
4.3.3	Análisis por espectroscopia fotoelectrónica de Rayos-X (XPS).....	91
4.3.4	Medidas electroquímicas	91
4.4	Equipos	92
4.4.1	Microscopio de fuerza atómica (AFM).....	92
4.4.2	Microscopio electrónico de barrido (SEM)	92
4.4.3	Difractómetro de Rayos-X (DRX).....	93
4.4.4	Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS).....	93
4.4.5	Potenciostato – Galvanostato.....	94
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
5.1	TRANSDUCTOR DE ORO POLICRISTALINO	97
5.1.1	Cálculo del área real del electrodo de oro.....	98
5.1.2	Caracterización superficial	99
5.1.2.1	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	100
5.1.2.2	Difracción de Rayos-X (DRX).....	101
5.1.3	Estudio de la adsorción de DTSP sobre oro	103
5.1.3.1	Por espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	103

5.1.4	Caracterización electroquímica del biosensor por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	107
5.1.4.1	Variación del recubrimiento de DTSP con el tiempo de adsorción	107
5.1.4.2	Construcción del biosensor	112
5.1.4.3	Transformadas de Kramers-Kronig (K-K).....	120
5.1.5	Respuesta del biosensor	122
5.1.5.1	Cálculo de constantes cinéticas del biosensor.....	127
5.1.5.2	Determinación de las propiedades analíticas del biosensor	131
5.2	TRANSDUCTOR DE ORO RUGOSO	133
5.2.1	Fabricación de los transductores de oro rugoso (Au_R)	135
5.2.2	Caracterización superficial	138
5.2.2.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	138
5.2.2.2	Microscopia de fuerza atómica (AFM)	140
5.2.2.3	Difracción de Rayos-X (DRX).....	143
5.2.3	Caracterización electroquímica del biosensor por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	145
5.2.3.1	Variación del recubrimiento de DTSP con el tiempo de adsorción	145
5.2.3.2	Construcción del biosensor	147
5.2.4	Respuesta del biosensor	156
5.2.4.1	Respuesta del biosensor en función del tipo de inmovilización.	157
5.2.4.2	Determinación de las propiedades analíticas del biosensor	163
5.3	TRANSDUCTOR DE ORO MACROPOROSO TRIDIMENSIONAL ORDENADO (3DOM).....	165

5.3.1	Fabricación de los soportes de oro 3DOM.....	174
5.3.2	Caracterización superficial	183
5.3.2.1	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	183
5.3.2.2	Microscopía de fuerza atómica (AFM)	189
5.3.2.3	Difracción de Rayos X (DRX)	191
5.3.3	Caracterización electroquímica del biosensor por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	194
5.3.3.1	Variación del recubrimiento de DTSP con el tiempo de adsorción	194
5.3.3.2	Construcción del biosensor	198
5.3.3.3	Estudio de la respuesta de EIS en función del número de capas del Au _{3DOM} .	206
5.3.4	Respuesta del biosensor	210
5.3.4.1	Respuesta del biosensor en función del número de capas de Au _{3DOM} .	210
5.3.4.2	Respuesta del biosensor en función del tipo de inmovilización.	213
5.3.4.3	Determinación de las propiedades analíticas del biosensor	218
6	RESUMEN / ABSTRACT.....	223
7	CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	241
8	BIBLIOGRAFÍA.....	247
9	ANEXO	256
9.1	Índice de Figuras.....	256
10	PUBLICACIONES Y CONTRIBUCIONES A CONGRESOS	264

1 INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

La ciencia y tecnología de nuevos materiales, tiene como uno de sus objetivos, diseñar y preparar componentes nuevos que, una vez procesados, presenten propiedades que los hagan aptos para aplicaciones de interés. Es, por tanto, una disciplina compleja que implica conocimientos básicos y aplicados de muy diversa índole, y siempre en conexión con los respectivos sectores productivos de la sociedad, que son los que marcan nuevos retos y necesidades a los que la investigación debe responder.

Dentro de la tecnología de nuevos materiales, la nanotecnología ha sido una de las disciplinas con mayor desarrollo e impacto científico en los últimos años. Se entiende por nanotecnología, el conjunto de procesos y procedimientos, que permiten la fabricación a escala nanométrica, de estructuras funcionales que muestran propiedades macroscópicas mejoradas. Dentro de los materiales nanoestructurados, existe un creciente interés hacia las estructuras periódicas de nanopartículas, debido a sus potenciales aplicaciones en diversas áreas, como el almacenamiento de información, dispositivos optoelectrónicos, la fabricación de sensores y biosensores o el desarrollo de catalizadores más eficientes.

Una clase de estos materiales, son los sólidos macroporosos tridimensionalmente ordenados (3DOM). Debido a su diversidad de aplicaciones, estos materiales se han desarrollado paralelamente en diferentes comunidades de investigadores, incluyendo químicos, físicos e ingenieros. La síntesis de estos sólidos requiere en primer lugar la formación de una suspensión coloidal de partículas esféricas, generalmente de sílice o de látex y de tamaño micrométrico. Estos son conocidos como cristales coloidales, ya que se ordenan formando una red compacta. Un caso particular de los cristales coloidales son los ópalos artificiales. Cuando una suspensión de esferas se deja depositar sobre un substrato y se evapora el medio en que se encuentran, lo que resulta es una estructura

ordenada cúbica centrada en las caras (fcc) de sílice, de forma parecida a lo que ocurre en un ópalo natural. Los ópalos naturales son piedras preciosas opalescentes, formadas por pequeñas esferas de sílice hidratada ($SiO_2 \cdot nH_2O$) dispuestos en planos paralelos, que actúan como redes de difracción.

Dichas estructuras se pueden utilizar como moldes para la fabricación de ópalos inversos. Para ello se llenan los espacios intersticiales existentes entre las esferas con un fluido capaz de solidificarse, eliminando después la matriz de sílice para obtener la réplica inversa. El tamaño de poro de estos nuevos materiales puede ser seleccionado entre un rango de valores comprendido entre décimas de micra y una micra. La densidad de los poros que puede obtenerse mediante este procedimiento es elevada respecto a otras técnicas tradicionales, y pueden lograrse dominios ordenados bidimensionales desde décimas hasta decenas o cientos de micras.

Un tamaño de poro de unos pocos cientos de nanómetros, junto con un orden en la estructura porosa, dotan a los materiales 3DOM de propiedades ópticas interesantes, tales como la inhibición de una emisión espontánea o localización fotónica, pudiendo ser utilizados como guías de onda, diodos-láser y sensores. Con superficies altamente accesibles y grandes tamaños de poro estos materiales pueden ser útiles para cromatografía, catálisis y como materiales bioactivos. Diferentes tamaños de poro pueden permitir la estabilización, la separación o la descarga de pequeñas y grandes moléculas. La combinación de estas propiedades dentro de una estructura dada puede conducir a nuevos materiales multifuncionales.

Una vía alternativa para obtener superficies nanoestructuradas consiste en rugosar la superficie electródica mediante un cambio de fase^[1]. Estas estructuras fueron desarrolladas en los años 80 por Arvía y col.^[2]. Mediante un pulso de potencial periódico, impuesto a una cierta frecuencia, se obtienen electrodos metálicos con un alto factor de rugosidad. La conformación de estas estructuras

depende de cómo se lleve a cabo el proceso de acumulación de carga, así como la electroreducción del óxido generado. Para sobrepotenciales elevados se genera una estructura columnar cuya área electroquímica puede llegar a ser 100 veces la inicial.

Por tanto, la finalidad del presente trabajo ha sido la fabricación y caracterización tanto morfológica, estructural como electroquímica de soportes nanoestructurados consistentes en sólidos macroporosos tridimensionalmente ordenados o bien soportes de oro rugoso, ambos con una alta relación área-volumen, que pueden ser utilizados como transductores nanoestructurados para su empleo en el diseño de biosensores enzimáticos.

1.1 NANOMATERIALES

1.1.1 Definición, obtención y clasificación de los nanomateriales

Se consideran nanomateriales aquellos en los que al menos una de sus dimensiones se encuentra en el rango de la nanoescala, es decir, entre 1 y 100 nanómetros.

Los transductores con superficies nanoestructuradas se pueden obtener a partir de la modificación de superficies con materiales nanoestructurados o la nanoestructuración de la superficie del transductor en sí.

La preparación de estos materiales puede plantearse siguiendo dos tipos de procedimientos: métodos descendentes (**“top-down”**) basados en la reducción del tamaño de materiales másicos hasta límites nanométricos, y métodos ascendentes (**“bottom-up”**) consistentes en el autoensamblaje del material de partida para formar estructuras más complejas.

La síntesis de nanopartículas a partir de una dispersión coloidal sería un ejemplo de fabricación por el método “bottom-up”, mientras que la litografía convencional se basaría en un procedimiento “top-down”.

Por lo general, las síntesis de materiales mediante técnicas “bottom-up” son más eficaces para obtener nanoestructuras con menos defectos, con una composición química más homogénea y un orden más riguroso a todas las escalas. Esto se debe a que las técnicas ascendentes se fundamentan en la reducción de la energía libre de Gibbs, situando las nanoestructuras y nanomateriales producidos en un estado más cercano al equilibrio termodinámico. Por el contrario, en las técnicas descendentes (“top-down”) es más probable que se introduzca una tensión interna, que puede dar lugar a defectos superficiales e impurezas^[3].

Los nanomateriales se pueden clasificar en base a sus dimensiones o la de alguno de sus componentes^[4, 5], estableciéndose así cuatro categorías en función del número de dimensiones de la nanoestructura que superan el rango de la nanoescala: 0D (puntos cuánticos, nanopartículas), 1D (nanohilos o nanotubos de carbono), 2D (películas delgadas o láminas de grafeno) y 3D (sólidos macroporosos ordenados).

1.1.2 Propiedades de los nanomateriales

Los materiales en la escala nanométrica presentan propiedades físicas claramente diferentes a las que posee su correspondiente material micro o macrométrico^[6-8].

Las propiedades que puede presentar la materia a escala nanométrica como consecuencia de su pequeño tamaño, se deben a dos razones principales. La primera es su elevada área superficial, que hace que el material sea más reactivo debido a que poseen una mayor cantidad de átomos accesibles en la superficie. La segunda razón por la que estos materiales poseen propiedades únicas, son los efectos cuánticos, que afectan a las propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas de los nanomateriales.

Como consecuencia de estas propiedades, las características principales de los nanomateriales^[9], son:

Efectos de tamaño: El efecto de tamaño de las partículas tiene un impacto importante en las propiedades estructurales, termodinámicas, electrónicas, espectroscópicas, electromagnéticas y químicas de los nanomateriales. Por lo tanto se pueden conseguir nanomateriales con distintas propiedades modificando tan solo su tamaño a escala nanométrica.

Química superficial: Los nanomateriales poseen una gran área superficial específica y una elevada energía libre superficial. Debido a estas propiedades, se

ha comprobado que sobre estos materiales se pueden adsorber y unir covalentemente diversas biomoléculas proporcionando una alta estabilidad química^[10, 11]. El potencial superficial de los nanomateriales juega un papel importante en el rendimiento y las características de todos los dispositivos relacionados con la química de superficies, tales como en los biosensores basados en puntos cuánticos^[12, 13].

En las estructuras nanométricas aumenta la energía superficial de los átomos localizados en la superficie debido a la reducción en el número de coordinación de los mismos. De este modo la difusión atómica se produce a una temperatura relativamente baja; por ejemplo, en el caso de las nanopartículas de oro, la temperatura de fusión de aquellas partículas con un diámetro menor que 5 nm es de ~ 300 °C, mientras que el punto de fusión del oro másico es 1.063 °C^[14]. Estudios fundamentales del potencial superficial han sido de vital importancia para entender el comportamiento de estos materiales, así como sus aplicaciones en sensores químicos y biosensores.

Biocompatibilidad: La elevada biocompatibilidad de los nanomateriales es otro factor determinante para su aplicación en el desarrollo de dispositivos biosensores. Con el desarrollo de nanomateriales y nanoestructuras, se han abierto nuevas vías para la estabilización de las enzimas inmovilizadas. Estos materiales pueden ofrecer tamaños de poros adaptados a las dimensiones de la molécula de proteína y múltiples sitios para la interacción de la enzima con la superficie^[15].

Propiedades catalíticas: En general los nanomateriales proporcionan unas excelentes propiedades electrocatalíticas. Concretamente, las nanopartículas de metales nobles^[10, 14, 16, 17] se han utilizado como catalizadores en innumerables dispositivos biosensores, debido a su buena estabilidad y a que la introducción de nanopartículas con propiedades catalíticas en sensores electroquímicos y

biosensores puede disminuir los sobrepotenciales de muchas reacciones electroquímicas analíticamente importantes.

Conductividad eléctrica: Esta propiedad es fuertemente dependiente de la estructura nanocristalina del material^[18]. Los nanomateriales presentan propiedades de transporte de electrones mejoradas respecto a su macromaterial equivalente. Estas propiedades de transporte electrónico de los nanomateriales son muy interesantes desde el punto de vista de aplicaciones eléctricas.

1.2 BIOSENSORES

La IUPAC define un **biosensor** como: *“A device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals”*.

Por tanto, un biosensor es un dispositivo de análisis que combina dos componentes básicos: un **elemento biológico** (enzima, ácido nucleico, anticuerpo, etc.) y un **transductor** físico. Este sistema permite la determinación selectiva de un analito gracias a la especificidad del componente biológico. El dispositivo permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, transduciéndola en una señal cuantificable, proporcional a la concentración de analito en la muestra.

El primer biosensor (conocido inicialmente como electrodo enzimático) fue propuesto en 1962 por Clark y Lyons^[19] y fue desarrollado posteriormente en 1967, para la detección de la glucosa, por Updicke y Hicks^[20]. Este biosensor consistió en el acoplamiento de la enzima glucosa oxidasa a un electrodo amperométrico de oxígeno, el cual permitía la detección de glucosa en sangre, relacionando directamente la concentración de glucosa con la disminución de la concentración de oxígeno. La culminación de este trabajo llegó en 1975 cuando la

empresa Yellow Springs Industries (Ohio, EEUU) lo convirtió en una realidad comercial, poniendo a la venta el primer analizador de glucosa en sangre. Desde entonces, el desarrollo de biosensores, ha mostrado una progresión científica y comercial constante debido a sus numerosas aplicaciones, como el análisis clínico, de alimentos, bebidas, análisis medioambientales, seguridad... Actualmente existen multitud de biosensores, en los cuales se combinan una amplia diversidad de componentes biológicos (enzimas, ácidos nucleicos, receptores celulares, anticuerpos y células intactas) con diferentes tipos de transductores (electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos).

El desarrollo de estos dispositivos se ha visto impulsado por las ventajas que proporcionan. Entre sus características principales, destacan la elevada **selectividad** que proporciona el elemento de reconocimiento y la **sensibilidad** que aporta un transductor adecuado. Por tanto, la elevada especificidad y capacidad de reconocimiento de los sistemas biológicos los convierte en uno de los receptores más eficientes. Estos elementos de reconocimiento biológicos se pueden combinar con distintos sistemas de transducción, en función de la naturaleza de la interacción entre el analito y el sistema biológico.

Desde el desarrollo del primer biosensor hace unos 50 años, la tecnología de biosensores ha experimentado un crecimiento considerable en términos de aplicabilidad y la complejidad de los dispositivos^[21]. Se han desarrollado una gran cantidad de biosensores con detección electroquímica, cuya construcción ha implicado la inmovilización de gran variedad de sistemas biológicos (enzimas, ADN, anticuerpos, etc.), sobre distintos tipos de transductores electroquímicos. El gran interés que han suscitado este tipo de biosensores, como instrumentos analíticos de medida, se debe a la sencillez de su construcción, la gran selectividad que se confiere al proceso de medida, la especificidad de las interacciones biológicas y la gran sensibilidad de las técnicas electroquímicas.

Además de ser específicos y selectivos, los biosensores deben ser exactos, reproducibles y robustos, propiedades que vienen dadas por los elementos que conforman el biosensor y el diseño del proceso de unión entre el sistema biológico y el transductor. La utilización de electrodos convencionales de oro, platino o carbono como transductores en sensores o biosensores, es habitual en trabajos de investigación, pero cada vez es más necesario desarrollar nuevos transductores para mejorar la respuesta de estos dispositivos. Por este motivo, en la última década, la investigación hacia el desarrollo de biosensores está encaminada hacia el diseño de nuevos soportes, que permitan fases sensoras mejoradas respecto a las que se han venido utilizando tradicionalmente. Esta necesidad junto con el gran avance de los nanomateriales hacen que la nanociencia y la nanotecnología estén desempeñando un papel cada vez más importante en el desarrollo de estos dispositivos de análisis, apreciándose una creciente integración de nanomateriales en el desarrollo de plataformas sensoras o biosensoras, lo que supone una mejora en la sensibilidad y el rendimiento de estos dispositivos.

La función de un transductor electroquímico, en el cual se encuentra inmovilizado o retenido el material biológico, se basa en convertir la interacción analito-biomolécula en una respuesta eléctrica, que tras ser procesada estará relacionada con la concentración de analito. Dicho transductor, por tanto, determina la eficacia en el procesado de la señal del biosensor.

Las propiedades que presentan los materiales de escala nanométrica les convierte en unos buenos candidatos para ser empleados en el desarrollo de nuevos transductores electroquímicos. Por ello, en los últimos años, la nanotecnología está jugando un papel cada vez más importante en el desarrollo de biosensores, siendo la preparación y el empleo de superficies electródicas nanoestructuradas una línea de investigación de gran interés y actividad en electroanálisis.

Investigaciones recientes demuestran, que el uso de electrodos nanoestructurados como transductores, puede mejorar el rendimiento tanto de sensores como de biosensores electroquímicos gracias al aumento en la proporción señal/ruido con respecto a los macroelectrodos^[22]. Estos nanomateriales están mejorando considerablemente la sensibilidad y el límite de detección de los biosensores electroquímicos^[23-27].

Además de estas mejoras, el desarrollo de electrodos nanoestructurados, puede ser útil para algunas aplicaciones, tales como medidas in vivo, o ante la necesidad de realizar análisis en microvolúmenes de muestra, donde puede ser necesario el uso de electrodos miniaturizados. El problema de miniaturizar los electrodos es que la disminución de su área activa, conducirá a una reducción en la respuesta analítica. Por lo tanto, para lograr una tasa de conversión electroquímica suficientemente alta, se debe aumentar la superficie del electrodo artificialmente mediante el uso de nanoestructuras^[28-30].

Sin embargo, estas nanoestructuras no sólo nos proporcionan la posibilidad de miniaturizar dispositivos, sino también de almacenar gran cantidad de la biomolécula, siendo útiles por tanto para otras aplicaciones en las que se necesita convertir una gran cantidad de substrato en un corto periodo de tiempo. Para ello se pueden emplear macroelectrodos, pero si estos se nanoestructuran o se modifican con nanomateriales, pueden ofrecer un área activa mucho mayor, proporcionando un rendimiento mayor^[31].

Por otra parte, la topografía de estas estructuras puede disminuir las tensiones en la estructura terciaria de las proteínas durante el proceso de inmovilización, preservando su actividad catalítica, contrariamente a lo que sucede cuando la inmovilización se lleva a cabo sobre superficies planas.

1.2.1 Biosensores basados en nanomateriales

Las propiedades de los nanomateriales descritas anteriormente los convierten en unos elementos muy atractivos para su posible utilización en plataformas biosensoras. A continuación se recoge una recopilación bibliográfica de los diferentes tipos de nanomateriales más representativos utilizados para el desarrollo de biosensores:

Nanomateriales 0D

Uno de los materiales cero dimensionales más utilizado en el desarrollo de biosensores son las nanopartículas. Concretamente las **nanopartículas** metálicas son materiales muy interesantes con propiedades electrónicas únicas y propiedades electrocatalíticas que dependen de su tamaño y morfología^[32, 33]. Estas propiedades las convierten en un material muy atractivo para su empleo en el diseño de biosensores. Se han empleado nanopartículas de distintos metales: platino^[34], plata^[35], paladio^[36], cobre^[37, 38], cobalto etc. Sin embargo, las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido las más utilizadas, ya que proporcionan ciertas ventajas frente a otros metales. En primer lugar, debido a su biocompatibilidad, aportan una inmovilización estable de biomoléculas permitiéndolas conservar su bioactividad. Esto se pone de manifiesto en trabajos como el de Chai y col.^[39] en el que preparan un inmunosensor para la detección de la gonadotropina coriónica humana (HCG) a partir de un electrodo de carbón vítreo modificado con AuNPs. En este trabajo se comprueba como la estabilidad y sensibilidad del dispositivo mejora debido a la elevada área superficial que proporcionan las nanopartículas para la acumulación de anti-HCG. Shulga y col.^[40] construyeron un biosensor enzimático de acetilcolinesterasa electrodeponiendo AuNPs sobre un electrodo de oro, que se empleó para detectar concentraciones nM del pesticida carbofurano.

Por otro lado, se ha reportado que las AuNPs incluidas en biosensores enzimáticos, pueden facilitar la transferencia directa de electrones entre las proteínas redox y el electrodo, permitiendo así que la detección electroquímica se lleve a cabo sin necesidad de mediadores^[14]. Esta capacidad para funcionar como portador de electrones entre el grupo prostético de la enzima y la superficie del electrodo, se debe a su elevada área superficial por unidad de volumen, su alta energía superficial así como la capacidad para disminuir la distancia metal-proteína^[14, 41].

Por tanto, la modificación del material de electrodo con nanopartículas metálicas, proporciona un área superficial elevada que va a permitir una mayor carga de material biológico, a la vez que facilitar el flujo de electrones entre el electrodo y la biomolécula, obteniéndose mejores límites de detección que en los biosensores sin modificar^[42].

Sin embargo, entre las limitaciones de estos materiales para su empleo en biosensores destacan la falta de reproducibilidad de las medidas debido a la variación de la densidad de nanopartículas o de biomoléculas incorporadas al dispositivo. Por ello los investigadores están trabajando en la automatización de la modificación de la superficie y se considera que es mejor utilizar un solo tipo de nanoestructura o dos a lo sumo, ya que una menor modificación superficial proporciona una mejor evaluación analítica^[42].

Nanomateriales 1D

Entre los nanomateriales unidimensionales destacan los **nanotubos de carbono** (CNT) y los **nanohilos**.

En el caso de los nanohilos, se ha observado que parámetros como su longitud y diámetro, el estado de su superficie, su estructura cristalina, composición química, orientación cristalográfica, etc, influyen en el mecanismo de transporte de electrones^[11, 18]. Debido a su alta relación área-volumen y a las

novedosas propiedades de transporte de electrones de estas nanoestructuras, con una conductividad electrónica fuertemente influenciada por perturbaciones menores de la superficie (tales como las asociadas con la unión de macromoléculas), pueden ofrecer una detección bioelectrónica rápida y sensible.

Por otro lado, los nanotubos de carbono, descubiertos por lijima en 1991^[43], actualmente son los nanomateriales 1D más atractivos y han generado un gran interés debido a sus singulares propiedades dependientes de su estructura electrónica y mecánica^[16, 44, 45]. Cabe destacar la habilidad de estos materiales para lograr transferencia de carga directa en el desarrollo de biosensores electroquímicos. Como ejemplo se puede mencionar el biosensor enzimático desarrollado recientemente por Das y col.^[46] basado en la alcohol oxidasa, empleando nanotubos de carbono como elemento de transducción. De manera similar, la peroxidasa (HRP) adsorbida sobre un microelectrodo de polvo de nanotubos de carbono^[47], también presenta transferencia de carga directa. Estos son sólo algunos ejemplos en los que se muestra como los nanotubos de carbono mejoran el rendimiento de los biosensores electroquímicos, en parte debido a que posibilitan una carga enzimática alta y por otra parte debido a la mejor capacidad de comunicación eléctrica de los nanotubos^[9].

Nanomateriales 2D

Entre los materiales bidimensionales, aquellos en los que sólo una de sus dimensiones se encuentra en el rango de la nanoescala, destacan las láminas de grafeno. El grafeno, fue descubierto en el año 2004 por Geim y Novoselov^[48] y se ha convertido rápidamente en objetivo de investigación en el campo de la ciencia de los materiales. Está compuesto por una lámina de átomos de carbono unidos mediante enlaces sp^2 , con un espesor monoatómico y estructura hexagonal. Gracias a sus excepcionales propiedades cristalinas y eléctricas, y a pesar de su corta historia, este nuevo material ha revelado una multitud de nuevas

aplicaciones. En el campo de los biosensores, el grafeno también se ha convertido en un material muy valorado, desarrollándose dispositivos basados en este material^[49]. Destacan trabajos como el de Shan y col.^[50] en el que se desarrolla un biosensor enzimático con transferencia de carga directa sobre un transductor basado en grafeno y empleando como enzima modelo la glucosa oxidasa o trabajos más recientes como el de Casero y col.^[51] en el que emplea grafeno oxidado y grafeno reducido electroquímicamente para desarrollar un biosensor de lactato. En ambos casos, la respuesta catalítica obtenida mejora considerablemente respecto al biosensor construido en ausencia de grafeno, siendo la mejora ligeramente mayor en el dispositivo que emplea el grafeno oxidado.

Este material también se ha utilizado con otro tipo de material biológico, como en el inmuno-biosensor descrito por Jung y col.^[52] basado en óxido de grafeno para detección de patógenos, o el genosensor desarrollado por Bo y col.^[53] basado en grafeno y nanohilos de polianilina que presenta una sensibilidad y selectividad mejorada para la detección de secuencias de ADN complementarias.

Nanomateriales 3D

Según la definición de nanomaterial, los materiales llamados 3D no se deberían incluir en la categoría de nanoestructuras, ya que todas sus dimensiones serán mayores de 100 nm. Sin embargo, se consideran materiales nanoestructurados 3D a aquellos en los que se utilizan nanoestructuras (0D, 1D o 2D) como bloques de construcción, replicándose en las 3 direcciones del espacio de forma ordenada.

Dentro de estos materiales, en el campo de los biosensores se han utilizado los sólidos macroporosos tridimensionales (3DOM) con el fin de obtener mejores respuestas analíticas. Entre sus características principales destacan su elevada área superficial, la buena biocompatibilidad que ofrecen gracias a una morfología que

proporciona un microambiente favorable para el alojamiento de las biomoléculas y su capacidad para aumentar la conductividad y facilitar el intercambio de electrones.

Varios autores han considerado que estas estructuras podrían ser buenas candidatas para el desarrollo de biosensores. Xia y col.^[26] utilizaron un electrodo de oro 3DOM modificado así como una estructura tridimensional construida a partir de citocromo c para estudiar la transferencia electrónica directa de hemoglobina^[54]. Szamocki y col. fabricaron estas estructuras macroporosas sobre ultramicroelectrodos^[55], modificando los electrodos posteriormente con un modelo bioelectrocatalítico que contenía un mediador redox, un cofactor y la enzima glucosa deshidrogenasa, amplificando la señal electroquímica dos órdenes de magnitud respecto a la obtenida con un electrodo plano. Qiu y col.^[56] prepararon una estructura 3DOM basada en *Prussian Blue* (PB) y la modificaron con glucosa oxidasa obteniendo un biosensor para la determinación de glucosa con una buena sensibilidad, un amplio intervalo lineal, una reproducibilidad aceptable y una buena estabilidad operacional y de almacenamiento.

Posteriormente Chen y col.^[57] desarrollaron un inmunosensor impedimétrico para la detección de la proteína C-reactiva (CRP) sobre un electrodo de oro 3DOM. La concentración de CRP se evaluó a través del aumento de los valores de impedancia tras la unión específica antígeno-anticuerpo. El aumento en la resistencia a la transferencia de carga fue proporcional al logarítmico de la concentración de CRP en el intervalo de 0,1 a 20 ng ml⁻¹.

Ben-Ali y col.^[31] modificaron por primera vez la superficie interior de un electrodo macroporoso de oro con una monocapa de un mediador redox (nitrofluorenona), demostrando que toda la superficie del electrodo está accesible, ya que el número de moléculas adsorbidas aumenta con el número de capas de poros. La elevada área superficial de estos electrodos combinada con la elevada constante de velocidad del mediador redox, les llevó a desarrollar un sistema modelo basado en la oxidación electrocatalítica de NADH. Posteriormente, la eficiencia

electrocatalítica de estos dispositivos les llevó a desarrollar un biosensor basado en glucosa deshidrogenasa utilizando estos soportes de oro 3DOM^[29], inmovilizando la superficie interna de la estructura macroporosa de oro con monocapas sucesivas de mediador redox, cationes calcio, NAD⁺ y glucosa deshidrogenasa. En este trabajo demostraron como la sensibilidad del dispositivo mejora sustancialmente con el número de capas de esferas del electrodo, pasando desde 0.14 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$ para un electrodo de 1/2 capa a 0.74 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$ para uno de 5/2 capas de esferas.

Otros nanomateriales 3D aplicados recientemente en la fabricación de biosensores son los electrodos de oro rugoso o también conocido como oro nanoporoso. Entre las propiedades de estos materiales destacan su elevada conductividad, gran área específica, alta estabilidad y biocompatibilidad. Para preparar estos sustratos se han desarrollado distintas metodologías, entre las que destaca la utilizada por Jia y col.^[58] que emplearon este tipo de sustratos para la oxidación de metanol, exhibiendo estos electrodos una elevada actividad electrocatalítica en comparación con el electrodo sin nanoestructurar. Estos electrodos han sido empleados posteriormente en el desarrollo de biosensores de ADN mejorando notablemente la sensibilidad del dispositivo^[59, 60].

En la bibliografía se han descrito recientemente varios métodos para la preparación de electrodos de oro rugoso, pero destaca mencionar el desarrollado por Arvía y col. en 1988^[2], consistente en la aplicación de una perturbación de potencial de onda cuadrada repetitiva (RSWPP) en medio ácido y posterior electroreducción de la capa de óxido de oro acumulada, obteniéndose de forma rápida y sencilla electrodos de oro con una rugosidad elevada. Este método se ha aplicado recientemente, y por primera vez, en el campo de los biosensores por Gamero y col.^[28] en la fabricación de un biosensor enzimático de lactato. Posteriormente la aplicación de estos electrodos se ha extendido al desarrollo de biosensores con material genómico como elemento de reconocimiento biológico^[25, 61].

En todos los casos mencionados, con estos sistemas, la eficiencia en la detección fue significativamente mayor que la de las respectivas películas no porosas.

1.2.2 Biosensores de Lactato Oxidasa

Con el fin de valorar las ventajas que proporciona el empleo de soportes de oro nanoestructurado como transductores en el desarrollo de biosensores, se eligió la lactato oxidasa como enzima para la construcción de un biosensor de lactato.

La determinación de ácido láctico o lactato ha sido de gran interés durante los últimos años, debido a su importancia en análisis clínico y de alimentos. Este analito es importante para el diagnóstico de algunas enfermedades, en la industria alimentaria ^[62], bebidas y fermentación ^[63] y en medicina clínica ^[64-66].

Los niveles de lactato en la sangre o los tejidos se correlacionan con la presencia de varias enfermedades tales como la hipoxia tisular, los choques cardiogénico o endotóxico, insuficiencia respiratoria y trastornos sistémicos derivados de las enfermedades neoplásicas, el hígado y fallos renales o diabetes mellitus. Por lo tanto, el desarrollo de métodos sensibles y fiables para la determinación de lactato, es de gran interés en el diagnóstico clínico ^[67, 68]. También es útil en otros campos de la medicina como la medicina deportiva, en particular para la estimación de las condiciones físicas de los deportistas.

En la industria alimentaria, el nivel de lactato es un indicador de procesos de fermentación y está relacionado con la frescura, estabilidad y calidad del almacenamiento de varios productos como salsas de tomate^[69], fruta, zumos, vino y leche^[70, 71]. En particular, en el caso de los productos lácteos es el responsable de su sabor amargo, siendo el producto principal de la fermentación de la leche por bacterias del ácido láctico.

Por otro lado, en cuanto a su influencia sobre el medio ambiente, el lactato puede causar una seria contaminación del agua, bajando su pH y generando una inmensa demanda química de oxígeno^[72].

Por tanto, debido al gran interés en la detección y/o monitorización del lactato, se han propuesto varios procedimientos para medir los niveles de ácido láctico, en muestras muy diferentes, basados en métodos colorimétricos, cromatografía de gases, espectroscopia de masas, cromatografía de intercambio iónico, espectroscopia de IR cercanos, HPLC, electroforesis capilar, isotacoforesis, FIA, colorimetría enzimática, etc. Los fundamentos, ventajas y desventajas de algunas de estas metodologías han sido resumidos y comparados en una revisión reciente^[73].

El principal inconveniente de muchos de estos métodos analíticos convencionales es que son lentos, debido a que requieren un pretratamiento laborioso de la muestra.

Por tanto, el desarrollo de métodos alternativos simples, directos y que permitan medidas en tiempo real para la detección de ácido láctico, es aún de gran interés.

Una alternativa a los métodos convencionales para la determinación de lactato es el uso de los biosensores. Las ventajas de estos dispositivos frente a los métodos tradicionales es que permiten llevar a cabo medidas de un modo simple y reproducible que reduce los tiempos de análisis. La elevada especificidad de los sistemas biológicos, junto con la transducción electroquímica, permiten la medida directamente en la muestra, independientemente de su complejidad, facilitando la información requerida de una forma rápida y sin necesidad de análisis muy complejos.

Existen varios biosensores electroquímicos para la determinación de lactato. Las principales diferencias entre unos y otros residen en el material del

electrodo, el elemento de reconocimiento biológico empleado, los métodos de inmovilización, los mediadores y cofactores empleados, así como sus campos de aplicación^[74].

Entre los **materiales de electrodo** más utilizados en este tipo de biosensores destacan los electrodos metálicos, principalmente de platino, oro y en menor medida óxidos metálicos y los electrodos basados en carbono, como los de pasta de carbono, carbón vitreo o grafito.

Sin embargo, los materiales nanoestructurados todavía no han sido muy utilizados en el desarrollo de estos biosensores. En los últimos años han aparecido algunas publicaciones de biosensores basados en nanomateriales como grafeno^[51], nanotubos de carbono^[75] o el trabajo de Yang^[76] en el que consiguen una transferencia de carga directa entre la enzima (LOx) y el electrodo en presencia de nanotubos de óxido de titanio (TNTs) permitiendo de este modo que el biosensor opere a un bajo potencial de trabajo y evitando la influencia de la presencia de O₂ en la respuesta amperométrica.

En cuanto al **elemento de reconocimiento biológico** en los biosensores de lactato, se han empleado elementos de distinta naturaleza, como células^[77], bacterias^[78] y principalmente enzimas. Las enzimas más empleadas para el desarrollo de biosensores electroquímicos de lactato han sido la lactato oxidasa (LOx)^[79-81], lactato deshidrogenasa (LDH)^[82, 83], y en menor medida el citocromo b₂ (Cyt b₂)^[84].

Los biosensores basados en la LOx permiten la determinación del peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática^[85]. Pero la determinación electroquímica de peróxido de hidrógeno implica un alto potencial positivo y puede verse afectada por la presencia de interferentes como el ácido cítrico, ácido tartárico, glucosa, ácido úrico, etc., comúnmente presentes en muestras reales^[74]. Por otro lado, la sensibilidad del biosensor depende de la concentración de

oxígeno molecular^[86, 87]. Una estrategia utilizada para evitar estos problemas es reemplazar el aceptor natural de electrones (O_2) por un mediador artificial, es decir una especie electroactiva que actúa como lanzadera de electrones, provocando un acoplamiento redox entre el electrodo y el centro redox de la enzima. Además, en la mayoría de las enzimas la velocidad de transferencia de carga hacia la superficie del electrodo es muy lenta, pudiéndose aumentar con la incorporación de mediadores^[88].

Con el fin de encontrar el mediador más adecuado para cada sistema, de acuerdo con Fultz y Durst^[89], es importante considerar el potencial formal de los componentes implicados; el potencial formal del mediador debe ser cercano al del componente biológico en estudio.

En el caso de los biosensores amperométricos fabricados con la enzima lactato oxidasa, el potencial de oxidación del mediador elegido debe ser mayor que el potencial de reducción del centro redox de la enzima. En principio, el mejor mediador sería el que presente el mayor potencial redox, ya que proporcionaría la mayor transferencia electrónica de la enzima al mediador. Sin embargo, el potencial redox no tiene que ser demasiado alto, ya que en muestras reales se podrían causar interferencias por la transferencia electrónica de otros compuestos presente en ellas^[90].

Entre los mediadores más habituales destacan las quinonas^[91], complejos de osmio^[92], colorantes^[27] como la tionina, azure A, azure C o verde de metilo, así como derivados del ferroceno^[79, 93] como es el caso del hidroximetilferroceno (HMF) empleado en este trabajo. El HMF actúa como mediador redox, transformándose en cada ciclo catalítico de HMF(II) a HMF(III) y por tanto será el potencial redox de este sistema el que marque el potencial de respuesta del biosensor, siendo la magnitud de la corriente catalítica la señal analítica utilizada en la determinación de la concentración de lactato.

1.2.2.1 *Métodos de Inmovilización de enzimas*

La definición de enzimas inmovilizadas se estableció en 1971, en la primera conferencia de ingeniería enzimática. Según dicha definición, enzimas inmovilizadas son enzimas físicamente confinadas o localizadas en una región del espacio, reteniendo su actividad catalítica y pudiendo ser usadas continua y repetidamente^[94]. Posteriormente se amplió el concepto, considerando que la inmovilización de enzimas es un proceso mediante el cual se restringen los grados de libertad de movimiento de enzimas mediante su unión a un soporte, dando lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica^[95].

Como ya se ha mencionado, las enzimas poseen una elevada especificidad. Sin embargo se desnaturalizan fácilmente, con su consiguiente pérdida de actividad. Por tanto, la inmovilización de la enzima sobre el transductor es un factor clave en el desarrollo de un biosensor eficaz. Su objetivo fundamental es permitir un íntimo contacto entre la enzima y el transductor, manteniendo inalterable en lo posible su actividad. El rendimiento de un biosensor enzimático en términos de tiempo de vida, intervalo lineal de respuesta, sensibilidad, selectividad, tiempo de respuesta y la susceptibilidad a interferentes, depende fuertemente del método utilizado para inmovilizar la enzima^[74, 95].

En general, los métodos de inmovilización se clasifican en dos grandes grupos: retención física (atrapamiento físico y microencapsulación) y unión química (entrecruzamiento, adsorción y enlace covalente)^[95].

❖ RETENCIÓN FÍSICA

- **Atrapamiento físico por membrana:** Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades de una matriz constituida generalmente por polímeros entrecruzados. El atrapamiento también puede llevarse a cabo con geles o fibras.

Este método, además de sencillo, tiene la ventaja de que la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura.

- **Microencapsulación:** Esta técnica consiste en rodear las enzimas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de las propias enzimas. Estas microcápsulas, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro, permiten la retención de material biológico muy diverso (enzimas, células o biomoléculas)^[95, 96].

❖ UNIÓN QUÍMICA

- **Entrecruzamiento (cross-linking):** Este método se basa en el uso de reactivos bifuncionales, que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Estos reactivos bifuncionales o agentes entrecruzantes (dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio...) permiten que la enzima pueda establecer enlaces intermoleculares covalentes con otras enzimas y de este modo el dispositivo es capaz de resistir condiciones extremas de pH y temperatura sin pérdida de actividad por difusión al medio^[97].

Sin embargo, es difícil controlar la reacción y requiere una modificación de la estructura de la proteína que puede afectar a su actividad y estabilidad.

- **Adsorción:** Es el método más sencillo, puesto que la enzima se retiene sobre un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno.

La mayor desventaja de este método es que los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico y la unión al soporte es débil. Esta baja fortaleza del enlace, genera como resultado la pérdida de enzima por cambios de pH, fuerza iónica o simple difusión hacia el medio. Además, después de la adsorción sobre superficies metálicas las enzimas suelen desnaturalizarse, perdiendo por tanto su capacidad catalítica.

- **Enlace covalente:** La metodología de la unión covalente requiere superficies funcionalizadas a las que se unirá la enzima mediante enlace covalente. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son, principalmente, la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente.

Entre las *ventajas* de este método destacan:

- Mayor resistencia a la desactivación por cambios en las condiciones del medio (cambios en la temperatura, pH, disolventes orgánicos, etc.)
- Permite orientar la proteína en la superficie, generando un posible acercamiento del centro activo de la enzima a la superficie electródica, facilitando una posible transferencia electrónica directa enzima-electrodo.
- Mejora la reproducibilidad en el recubrimiento de enzima respecto a la inmovilización por adsorción directa.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de *inconvenientes*:

- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura terciaria de la enzima, pudiendo esta alteración afectar al centro activo, lo que llevaría a la pérdida de actividad de la misma. Por lo tanto, hay que tener cuidado con la elección del procedimiento de inmovilización química con el fin de evitar la desnaturalización y consiguiente inactivación de la proteína.

Hay una amplia variedad de procedimientos para la inmovilización covalente de proteínas sobre superficies según la funcionalización de la misma^[95]. Esto se debe a que no existe un método ideal para su inmovilización, por lo que es necesario seleccionar el método en función de las características específicas que precisemos.

Concretamente, para la inmovilización de la LOx sobre un transductor amperométrico, se han seguido estrategias muy diversas: (i) entrecruzamiento con glutaraldehído^[86, 98, 99], (ii) atrapamiento en membranas poliméricas como Nafion^[100], polivinilferroceno^[101], alcohol polivinílico^[102], o poli-l-lisina/poli-4-stirenesulfonato^[103] (iii) confinamiento en una matriz sol-gel^[92], (iv) inmovilización covalente^{[104] [105]}, (v) inclusión en compuestos de grafito o pasta de carbono^[93, 106-109], etc.

La gran variedad de métodos de inmovilización utilizados se debe a que, en la literatura se define la LOx como una enzima inestable^[110], y la inestabilidad es un problema cuando hablamos de su empleo en biosensores. El desarrollo de nuevos métodos de inmovilización de la enzima o de superficies capaces de mantener la estructura enzimática intacta y con ello, la actividad de la enzima, es un factor clave en el progreso de los biosensores de lactato y está aún desarrollándose^[111]. Por tanto, a pesar de que en la bibliografía se pueden encontrar gran cantidad de biosensores de lactato, todavía hay un gran interés en la mejora de la sensibilidad y la estabilidad de estos dispositivos.

De entre todos ellos se va a comentar en detalle el que se ha utilizado en el presente trabajo:

- *Formación de enlace amida*: generalmente para formar el enlace entre aminas y ácidos carboxílicos, lo primero que hay que conseguir es convertir el ácido carboxílico en un reactivo intermedio susceptible de ser atacado por el grupo amino. Para ello se emplea una carbodiimida, la N-etil-N-dimetilaminopropilcarbodiimida (EDC), en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) como activador de los grupos carboxílicos^[112]. En nuestro caso se ha utilizado una variación más simple de esta metodología basada en el empleo del ditiobis (N-succinimidil propionato (DTSP), un reactivo comercial con el grupo carboxilo ya activado que permite ahorrar ese paso en la construcción del biosensor. Este reactivo bifuncional, se adsorbe sobre la superficie del oro a través del grupo disulfuro,

dejando los grupos succinimida terminales expuestos a la disolución para su posterior enlace covalente con las lisinas de la enzima.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, los soportes nanoestructurados favorecen la inmovilización de la enzima, ya que suministran más puntos de interacción entre la enzima y la superficie, además de proporcionar una morfología más adecuada a la forma de la enzima, dificultando su posible desnaturalización. Esta propiedad de los nanomateriales unida a todas las ventajas mencionadas a lo largo del presente capítulo, como la elevada área superficial que permite una mayor acumulación de material biológico, así como su elevada conductividad eléctrica entre otras, nos ha llevado a fabricar dos tipos de transductores de oro nanoestructurado (oro rugoso y oro macroporoso tridimensionalmente ordenado) para su aplicación como soportes en biosensores electroquímicos enzimáticos, tomando como modelo un biosensor basado en LOx. Para la inmovilización de la LOx a estos soportes se han elegido dos metodologías diferentes: adsorción directa y un método de unión covalente por formación de enlace amida.

Con el fin de estudiar el efecto que tienen estas estructuras sobre las propiedades analíticas de un biosensor, en primer lugar se construyó el biosensor con un transductor de oro sin nanoestructurar para utilizarlo posteriormente como referencia y poder analizar los efectos que tiene la nanoestructuración sobre las propiedades analíticas de estos dispositivos.

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo general de la tesis consiste en el desarrollo de transductores de oro nanoestructurados que servirán para la fabricación de biosensores enzimáticos de lactato con características operacionales mejoradas respecto a sus equivalentes sin nanoestructurar.

De acuerdo con el objetivo a desarrollar, se ha elaborado el siguiente plan de trabajo:

- Elaboración de los diferentes sustratos de oro nanoestructurado como son el oro rugoso (Au_R) y el oro macroporoso tridimensionalmente ordenado (Au_{3DOM}) para su utilización como plataformas biosensoras.
- Análisis de la morfología de los distintos soportes desarrollados, mediante técnicas de caracterización superficial tales como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerzas atómicas (AFM) y difracción de R-X (DRX).
- Posteriormente, estos soportes se emplearán como transductores en la preparación de biosensores enzimáticos de lactato oxidasa (LOx). La inmovilización de la enzima sobre los distintos transductores se llevará a cabo mediante dos metodologías diferentes: adsorción directa o mediante enlace covalente a través de un tiol el ditiobis (N-succinimidil propionato) o DTSP.
- El grado de recubrimiento que genera este tiol sobre los distintos soportes de oro nanoestructurado se estudiará mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y el tipo de enlace formado será analizado mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).
- Se estudiará cada uno de los pasos seguidos en la fabricación del biosensor mediante impedancia electroquímica (EIS) y se cuantificará la actividad catalítica del biosensor obtenido en cada caso mediante voltametría cíclica.

- Por último, se determinarán las propiedades analíticas de cada uno de los biosensores desarrollados sobre los transductores nanoestructurados de oro rugoso y de oro macroporoso teniendo como referencia el biosensor construido sobre un soporte de oro policristalino.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

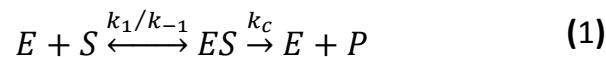
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Teoría enzimática

La finalidad del presente capítulo es exponer los fundamentos básicos y el modelo cinético que mejor describa los procesos que tienen lugar en nuestro sistema sensor en estudio, así como la herramienta matemática necesaria a través de la cual obtendremos la información que justifique las características de su respuesta. Además se detallan los fundamentos teóricos de las técnicas de caracterización empleadas.

3.1.1 Cinética enzimática

La descripción más simple de la cinética enzimática está basada en el trabajo de Michaelis-Menten^[113]. Este modelo supone que el sustrato forma un complejo con la enzima [ES] en una etapa reversible y que existe un equilibrio entre el sustrato (S), el enzima (E), y el complejo [ES] según el siguiente esquema:



Posteriormente tiene lugar la ruptura irreversible del complejo [ES] que conduce al producto (P). k_1 y k_{-1} son las constantes de formación y ruptura del complejo enzima-sustrato y la constante k_c (constante catalítica) hace referencia al número máximo de reacciones enzimáticas catalizadas por segundo.

La segunda suposición del modelo es que la concentración del complejo enzima-sustrato [ES] es constante, por tanto el proceso está en estado estacionario. Claramente esto no es cierto inmediatamente después de mezclar la enzima con el sustrato, cuando la concentración del intermediato enzima-sustrato

todavía está creciendo (fase pre-estacionaria). Solamente se cumplirá el estado estacionario cuando la [S] no disminuya durante el transcurso de la reacción.

A partir de este esquema las velocidades de formación y desaparición del complejo E-S se pueden escribir como:

$$v_f = k_1[E][S] \quad (2)$$

$$v_d = k_{-1}[ES] - k_c[ES] \quad (3)$$

la ecuación de velocidad para el intermedio E-S queda definida como:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_c[ES] \quad (4)$$

Suponiendo que la concentración de sustrato [S] es mucho mayor que la concentración de enzima [E], la concentración de sustrato sin complejar se puede suponer igual a la inicial. Considerando que en todo momento, la concentración total de enzima (E_0) es la suma de la concentración de enzima libre y de la que forma parte del complejo ($[E_0] = [E] + [ES]$), la ecuación (4) se transforma en:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E_0][S] - (k_1[S] + k_{-1} + k_c)[ES] \quad (5)$$

En el estado estacionario $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ (estrictamente se hace la suposición de que $\frac{d[ES]}{dt}$ es pequeña comparada con $k_1[E_0][S]$). Por tanto, la concentración del complejo es:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

siendo K_M la constante de Michaelis-Menten, que matemáticamente se define como:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_c}{k_1} \quad (7)$$

La velocidad de reacción viene dada por la desaparición del sustrato o la aparición del producto con el tiempo de reacción:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_c[ES] \quad (8)$$

que puede ser escrita en forma de ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{k_c[E_0][S]}{K_M + [S]} = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

donde $k_c[E_0]$ es la velocidad máxima, velocidad a la cual la enzima está saturada, no afectando a la velocidad de reacción los cambios en la concentración de sustrato $[S]$. K_M se define como la concentración para la cual la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la v_{max} .

Por tanto, v_{max} nos da una idea de la capacidad de la enzima para convertir el sustrato en producto, mientras que K_M nos indica la afinidad de la enzima por el sustrato, siendo el valor de K_M inversamente proporcional a la afinidad enzima-sustrato.

Análisis de los datos cinéticos

En la **Figura 1** se puede ver el efecto de la concentración de sustrato sobre la cinética enzimática.

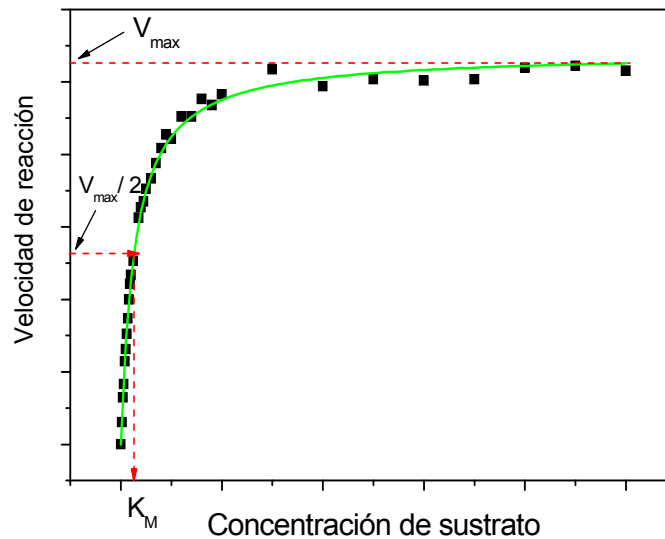


Figura 1: Relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato en la cinética Michaeliana.

A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción aumenta linealmente con la $[S]$. Esto es debido a que cuando $[S] \ll K_M$, la ecuación:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (10)$$

se aproxima a:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M} \quad (11)$$

Cuando la concentración de sustrato es igual a la K_M , $[S]=K_M$, la velocidad de reacción es justo la mitad del valor máximo:

$$v = \frac{v_{max}}{2} \quad (12)$$

Finalmente, a concentraciones de sustrato altas, la velocidad alcanza su valor máximo, aproximándose la velocidad a:

$$v = k_c[E_0] = v_{max} \quad (13)$$

Por tanto, la cinética de Michaelis-Menten describe una situación no lineal en la cual a valores bajos de $[S]$ la reacción es de primer orden, y la velocidad de

reacción es linealmente dependiente con la concentración de sustrato. Sin embargo, a concentraciones de $[S]$ elevadas la velocidad tiende a permanecer constante siguiendo una cinética de orden cero.

La ecuación de Michaelis puede ser reescrita de varias formas para conducir a representaciones lineales:

Si consideramos la inversa de la velocidad podemos obtener la **representación de Lineweaver-Burk**, representación bastante utilizada para calcular los parámetros cinéticos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (14)$$

Representando la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato, se obtiene una recta con pendiente K_M y ordenada en el origen v_{max} .

Sin embargo, este tratamiento de los resultados puede inducir a un gran error, ya que la región lineal queda definida por los puntos de menor concentración, que son los que llevan asociados un mayor error en la medida.

Para evitar el problema de esta representación, surgió la **representación de Eadi-Hofstee**, que expresa la ecuación de Michaelis en la forma:

$$v = -K_M \frac{v}{[S]} + v_{max} \quad (15)$$

Representando la velocidad frente a $v/[S]$, se obtiene el valor de K_M directamente de la pendiente y v_{max} de la ordenada en el origen.

Con esta representación todos los puntos tienen el mismo peso en la regresión lineal. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la velocidad de reacción es un valor medio medido experimentalmente, con su error experimental asociado que se representará en ambos ejes. Aún así, los valores obtenidos mejoran la representación de Lineweaver-Burk.

Con el fin de solucionar los problemas asociados a las dos representaciones anteriores, surgió la **representación de Hanes**:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max}} \quad (16)$$

En esta representación v_{max} se obtiene a partir de la pendiente y K_M de la ordenada en el origen.

De este modo se consigue una representación en la que todos los puntos tienen el mismo peso en la regresión lineal y la velocidad de reacción sólo está presente en uno de los ejes.

Aunque hoy en día el método más fácil, y estadísticamente más correcto para analizar los datos provenientes de una cinética enzimática basada en el modelo Michaelis-Menten, consiste en utilizar un programa de regresión no lineal para el ajuste directo de los datos experimentales a la ecuación (10)^[114], es conveniente analizar las representaciones lineales de la ecuación, ya que ponen de manifiesto de forma más clara para que concentraciones de sustrato deja de cumplirse la linealidad.

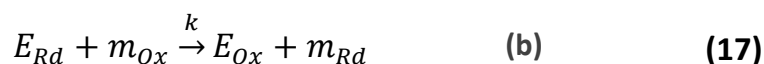
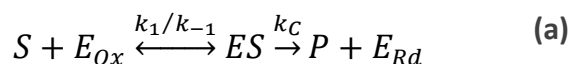
3.1.2 Modelo cinético para un biosensor electroquímico con una monocapa de enzima inmovilizada utilizando un mediador soluble

La modelización de la cinética de enzimas redox inmovilizadas sobre superficies electródicas ha sido tratada por un gran número de autores como Mell y Malloy^[115, 116], Shu y Wilson^[117], Leypoldt y Gough^[118, 119], Gough y Lucisano^[120], Tse y Gough^[121], Blaedel^[122], Kuly^[123], Bartlett y Whitaker^[124, 125], Marchesiello y Genies^[126], Bartlett y Pratt^[127], Karube y col.^[128], etc. En los últimos años, los progresos en este área han sido revisados por Bartlett y Cooper^[129] así como por Chaubey y col^[130, 131].

El modelo cinético simplificado que describe las diferentes etapas involucradas en el sistema químico en estudio y que mejor representa al tipo de electrodo enzimático que desarrollamos en este trabajo, se muestra esquemáticamente en la Figura 2. Siguiendo el tratamiento de Lyons^[132] la figura muestra una monocapa de enzima inmovilizada y los perfiles de concentración para el sustrato y el mediador enzimático.

En primer lugar, se supone que la enzima redox está localizada dentro de una capa delgada no conductora de espesor L , depositada sobre la superficie de un electrodo conductor. Esta capa puede ser un *film* autoensamblado de un tiol formado vía adsortiva desde la disolución. El enzima debe estar distribuido homogéneamente en la interfase entre el tiol y la disolución adyacente.

Considerando el siguiente esquema de reacción:



donde la forma oxidada del enzima E_{Ox} reacciona con el sustrato S para formar (vía complejo enzima/sustrato como intermediato) el producto P y la enzima reducida E_{Rd} . La forma oxidada del mediador m_{Ox} reacciona, dentro de la capa enzimática, con el enzima reducido para generar el enzima oxidado activo y producir la forma reducida del mediador m_{Rd} . m_{Ox} puede ser generado electroquímicamente en el electrodo vía la oxidación de m_{Rd} , cuya cinética se supone que es muy rápida. Por tanto las especies oxidadas y reducidas del mediador están relacionadas por la ecuación de Nernst. Si se supone que el valor de la concentración de mediador en el seno de la disolución es m_{Rd}^∞ (forma reducida), la concentración de la forma oxidada del mediador m_{Ox}^∞ fuera de la capa de difusión (espesor δ) es cero.

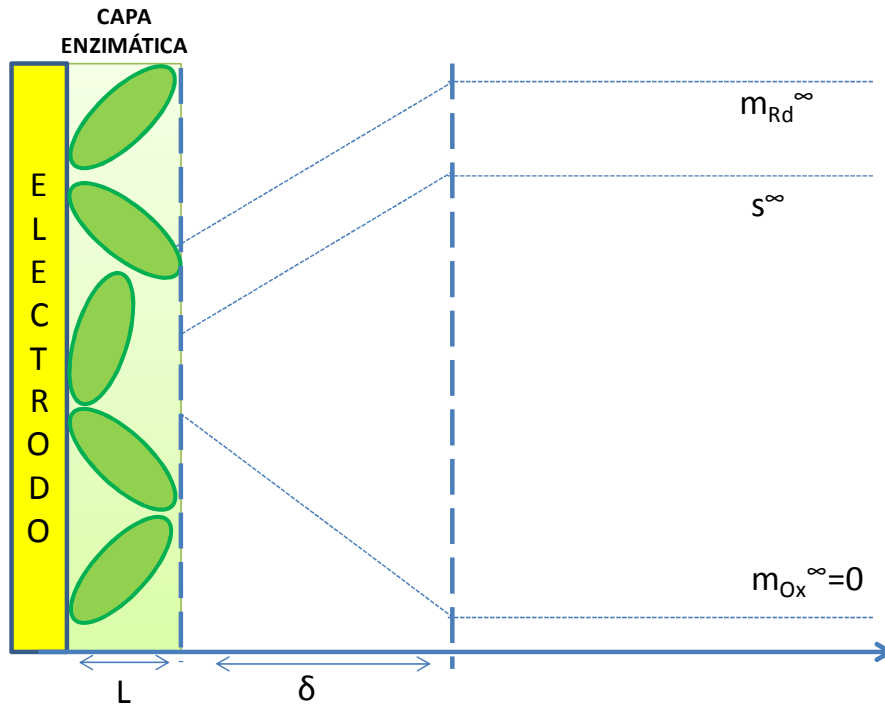


Figura 2: Representación esquemática de un biosensor enzimático con un mediador redox en disolución y perfiles de concentración de sus especies oxidadas y reducidas (m_{Rd} y m_{Ox}), así como de la concentración de sustrato (S).

La corriente que fluye en el electrodo está relacionada con el flujo de mediador redox soluble en la superficie del electrodo por:

$$\frac{I}{nFA} = J = D_{m_{Rd}} \left(\frac{dm_{Rd}}{dx} \right)_{x=0} \quad (18)$$

Donde n denota el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday, A el área real del electrodo, $D_{m_{Rd}}$ es el coeficiente de difusión del mediador reducido en la capa enzimática, el cual difiere del coeficiente de difusión en la disolución.

El flujo neto J está relacionado con el flujo de reacción enzima-sustrato J_s dentro de la capa enzimática, por $J = \alpha J_s$ donde $\frac{1}{2} \leq \alpha \leq 1$ según Bartlett y col.^[133]. El parámetro α refleja el hecho de que el flujo del sustrato reaccionando dentro del *film* no es exactamente igual al flujo del mediador oxidado detectado en el electrodo, puesto que algo de mediador puede difundir a través de la capa enzimática lejos del electrodo y perderse en la disolución adyacente. Debido a que

la capa de enzima inmovilizada es delgada se puede despreciar el gradiente difusivo del sustrato y del mediador en dicha capa y considerar solamente la cinética de Michaelis-Menten entre E_{Ox} y el sustrato S , así como la cinética bimolecular entre el mediador oxidado y la enzima reducida (E_{Rd}). En condiciones de estado estacionario ambos procesos están en equilibrio. Por tanto:

$$J_S = \frac{k_c E_{Ox} L \kappa_s S_L}{\kappa_s S_L + K_M} = k L E_{red} \kappa_m m_L \quad (19)$$

donde κ_s y κ_m son los coeficientes de partición para el sustrato y el mediador respectivamente y m_L y S_L representan, respectivamente, la concentración del mediador reducido (hasta ahora m_{Rd}) y del sustrato en el borde externo de la monocapa a $x=L$. Donde, L es el espesor de la capa inmovilizada y E_{Ox} , E_{Rd} son las concentraciones de la forma oxidada y reducida del enzima. Teniendo en cuenta que $E_0 = E_{Ox} + E_{Rd}$ representa la concentración total de enzima en la monocapa, la concentración de enzima oxidada viene dada por:

$$E_{Ox} = \frac{(\kappa_s S_L + K_M) k \kappa_m m_L E_0}{k_c \kappa_s S_L + (\kappa_s S_L + K_M) k \kappa_m m_L} \quad (20)$$

Sustituyendo E_{Ox} en la ecuación (19) se obtiene el flujo de sustrato dentro de la capa enzimática en función de la concentración total de enzima:

$$J_S = \frac{k_c L E_0}{\frac{k_c}{k \kappa_m m_L} + \left(1 + \frac{K_M}{\kappa_s S_L}\right)} = \frac{1}{\frac{1}{L E_0 k \kappa_m m_L} + \frac{1}{k_c L E_0} \left(1 + \frac{K_M}{\kappa_s S_L}\right)} \quad (21)$$

S_L y m_L se relacionan con las correspondientes cantidades en el seno de la disolución mediante la aproximación de la capa de difusión de Nernst (δ), según la cual:

$$J_S = D_S \left(\frac{S^\infty - S_L}{\delta} \right) = K_{DS} (S^\infty - S_L) \quad (22)$$

$$J_m = D_m \left(\frac{m^\infty - m_L}{\delta} \right) = K_{Dm}(m^\infty - m_L) \quad (23)$$

siendo D_s y D_m los coeficientes de difusión en disolución y $K_{Ds} = D_s/\delta$ y $K_{Dm} = D_m/\delta$ las constantes de velocidad del transporte de masa del sustrato y del mediador reducido.

Las concentraciones de estos en el borde externo de la monocapa se definen como:

$$S_L = S^\infty - \frac{J_s}{K_{Ds}} = S^\infty \left(\frac{1 - J_s}{J_{Ds}} \right) \quad (24)$$

$$m_L = m^\infty - \frac{J_m}{K_{Dm}} = m^\infty \left(\frac{1 - J_m}{J_{Dm}} \right) \quad (25)$$

donde J_{Ds} y J_{Dm} representan el flujo máximo debido al transporte de masa del sustrato y del mediador reducido en disolución, donde $J_{Ds} = D_s S^\infty$ y $J_{Dm} = D_m m^\infty$.

Siguiendo el tratamiento de Lyons^[132] se sustituyen las concentraciones locales corregidas para el transporte de masa en la capa enzimática en la ecuación de flujo (Ecuación 19) obteniendo una ecuación para el flujo de sustrato:

$$J_s = \frac{1}{\frac{1}{LE_0 k \kappa_m m^\infty} \left(1 - \frac{J_m}{J_{Dm}}\right)^{-1} + \frac{1}{k_c LE_0} \left(1 + \frac{K_M}{\kappa_s S^\infty} \left(1 - \frac{J_s}{J_{Ds}}\right)^{-1}\right)} \quad (26)$$

Calculando el inverso para obtener el sentido físico de la ecuación se obtiene:

$$\frac{1}{J_s} = \frac{1}{LE_0 k \kappa_m m^\infty} \left(1 - \frac{J_m}{J_{Dm}}\right)^{-1} + \left(\frac{1}{k_c / K_M E_0 L \kappa_s S^\infty} \left(1 - \frac{J_s}{J_{Ds}}\right)^{-1} \right) + \frac{1}{k_c LE_0} \quad (27)$$

Según la ecuación (27) la concentración efectiva de sustrato (S_L) y mediador (m_L) en la interfase capa/disolución será considerablemente menor que sus valores en el seno de la disolución (m^∞ , S^∞). Por el contrario si $J_S \ll J_{DS}$ y $J_m \ll J_{Dm}$ entonces $m_L \sim m^\infty$ y $S_L \sim S^\infty$ siendo despreciable el gradiente de difusión existente en la capa de difusión de Nernst. Esta aproximación ha sido empleada por Bourdillon y Saveant^[134] para una monocapa de glucosa oxidasa con ferroceno metanol como mediador redox en disolución.

El flujo de reacción del sustrato J_S puede estar limitado por tres posibles procesos: la reacción de transferencia electrónica con el mediador que genera la forma oxidada del enzima (primer término), la cinética insaturada tipo Michaelis-Menten entre S y E_{ox} , unida al proceso de transporte de masa para el sustrato a través de δ (segundo término) o la cinética enzimática saturada que implica la descomposición del complejo ES para formar el producto y el enzima reducido E_{red} (tercer término).

Si la velocidad de descomposición (k_c) del complejo [ES] en productos y la regeneración mediada del enzima reducido y del mediador oxidado (k) son muy rápidas comparadas con las otras etapas (Ecuación 17), las reciprocas de estas velocidades son despreciables y por tanto el primer y tercer término son pequeños y su contribución al control de la velocidad total puede no tenerse en cuenta:

$$\frac{1}{J_S} = \frac{K_M}{k_c E_0 L K_S S^\infty} \left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)^{-1} \quad (28)$$

Con el fin de extraer información cinética a partir de los resultados experimentales se puede llevar a cabo una representación lineal de $1/J_S$ vs. $1/S^\infty$, obteniéndose a partir de la pendiente las constantes de velocidad características de la enzima inmovilizada. Esto significaría que el término $\left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)$ puede despreciarse. En este caso la concentración de S_L (en $x=L$) no es cero y por tanto el flujo será menor que su valor máximo.

$$J_S = K_{DS}(S^\infty - S_L) \ll J_{DS} = K_{DS}S^\infty \quad (29)$$

Es decir el transporte del sustrato es rápido comparado con las etapas siguientes y no determina la velocidad global del proceso.

Sin embargo, si el término $\left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)$ es significativo existirá una desviación de la linealidad. La representación de $1/J_S$ vs. $1/S^\infty$ en este caso, es análoga al gráfico de Lineweaver-Burk utilizado en cinética enzimática (Ecuación 14).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{k_c E_0 S^\infty} + \frac{1}{k_c E_0} \quad (30)$$

Si la desviación de la linealidad es para concentraciones bajas de sustrato es debido a que aparecen los efectos de la polarización por concentración de sustrato en la disolución.

Por el contrario, si la reacción catalítica o la velocidad para la reacción bimolecular enzima-mediador es lenta comparada con la etapa de transporte precedente, el primer y tercer término de la ecuación (27) no se pueden despreciar. Cada término muestra una dependencia diferente de las variables que se pueden controlar, concentración de sustrato, de enzima y de mediador. En este caso para probar el sistema experimentalmente se mantienen dos de estas concentraciones constantes y se investiga el efecto de la tercera sobre el flujo. Representando los gráficos recíprocos y midiendo la pendiente y al intersección se puede determinar la velocidad característica de cada etapa^[135, 136].

3.2 Técnicas no estacionarias para sistemas enzimáticos.

3.2.1 Voltametría cíclica para un proceso reversible

La voltametría ha encontrado una amplia aplicación en el análisis y en la investigación de mecanismos electródicos. Desde la aplicación del método por

Matheson y Nichols^[137], numerosos investigadores han contribuido al desarrollo teórico de la voltametría lineal o cíclica. Entre ellos, Nicholson y Shain^[138, 139] que en los años 60 desarrollaron el método para procesos electroquímicos, en los que se alcanza un equilibrio electroquímico entre dos especies solubles. Además, extendieron la teoría para el mecanismo catalítico de pseudo-primer orden^[138].

Básicamente, la técnica de voltametría consiste en aplicar al electrodo de trabajo, respecto a uno de referencia, un barrido de potencial que varía de forma lineal con el tiempo entre un potencial inicial (E_i) y un potencial final (E_f) (Figura 3). Esta dependencia puede expresarse para un proceso de oxidación como:

$$E = E_i + vt \quad \text{para } 0 < t < \lambda \quad (31)$$

$$E = E_i + 2v\lambda - vt \quad \text{para } \lambda \leq t \leq 2\lambda \quad (32)$$

donde v es la velocidad del barrido de potencial, t es el tiempo y λ es el tiempo de inversión de la rampa de potencial. Se mide la intensidad de corriente que pasa entre el electrodo auxiliar y el electrodo de trabajo, representándose frente al potencial impuesto. La curva intensidad-potencial resultante se denomina voltamograma (Figura 4).

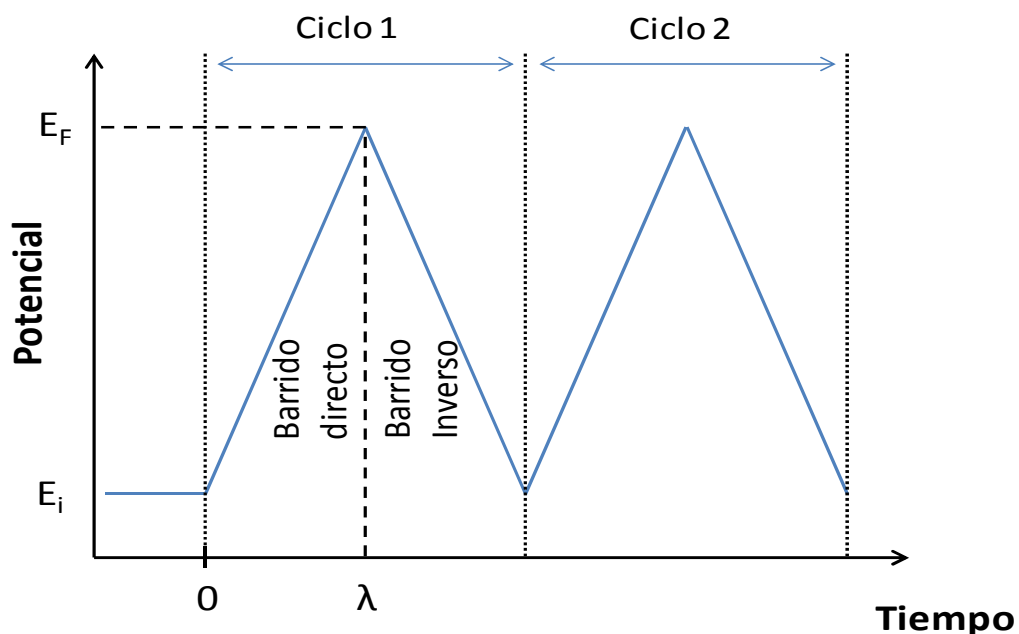


Figura 3: Esquema del programa de potencial en voltametría cíclica.

Consideremos la reacción de oxidación electroquímica:



donde la especie reducida (*Rd*) se transforma en una especie oxidada (*Ox*).

Este equilibrio electroquímico existe en la interfase, por tanto el potencial de electrodo y las concentraciones de la especie reducida $C_{Rd}(0, t)$ y de la especie oxidada $C_{Ox}(0, t)$ estarán relacionados mediante la ecuación de Nernst:

$$\frac{n(E - E'^0)}{59mV} = \log \frac{[m_{Ox}]}{[m_{Rd}]} = \log \frac{C_{Ox}(0, t)}{C_{Rd}(0, t)} \quad (34)$$

siendo E es el valor instantáneo del potencial y E'^0 el valor que se obtendría si las especies estuvieran presentes en el equilibrio en igual concentración y con el mismo coeficiente de actividad. Esta ecuación es una condición en el límite $x=0$ así como la relación entre flujos de la forma oxidada (*Ox*) y reducida (*Rd*) (conservación de la materia en el electrodo).

$$D_{Ox} \left(\frac{\partial C_{Ox}(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} + D_{Rd} \left(\frac{\partial C_{Rd}(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \quad (35)$$

Ambas ecuaciones son necesarias para resolver la ecuación en derivadas parciales resultante de la segunda ley de Fick:

$$\frac{\partial C_{Rd}(x, t)}{\partial t} = D_{Rd} \frac{\partial^2 C_{Rd}(x, t)}{\partial x^2} \quad \frac{\partial C_{Ox}(x, t)}{\partial t} = D_{Ox} \frac{\partial^2 C_{Ox}(x, t)}{\partial x^2} \quad (36)$$

La solución de la ecuación (36) conduce a una ecuación general para las concentraciones en $x=0$ como función del tiempo, a partir de las cuales es posible obtener las expresiones para el flujo así como una ecuación analítica para la intensidad de corriente, teniendo en cuenta que intensidad de corriente es igual al flujo de difusión en la interfase.

$$I = nFAD_{0x} \left(\frac{\partial C_{0x}(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (37)$$

Sin embargo, las limitaciones experimentales excluyen la medida directa de las concentraciones en la interfase. Por tanto, es necesario relacionar los cálculos precedentes con variables experimentales accesibles, como son: el potencial de electrodo medido respecto a uno de referencia (E) y la corriente que pasa a través del circuito.

El potencial aplicado al electrodo es una función lineal del tiempo, creciente para la variación de potencial positivo y decreciente para la variación de potencial negativo (Ecuaciones 31 y 32). La sustitución de $E(t)$ en la ecuación de Nernst y la posterior solución de las ecuaciones en $C_{Ox}(x, t)$ y $C_{Rd}(x, t)$ conduce a dos características del máximo de corriente, intensidad de pico I_p y potencial de pico E_p .

$$I = nFAC_{Rd}^* D_{Rd}^{1/2} \left(\frac{nF}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2} \pi^{1/2} \chi(E - E_{1/2}) \quad (38)$$

La función $\pi^{1/2} \chi(E - E_{1/2})$ está tabulada y alcanza un valor máximo de 0.4463 a 25°C. Sustituyendo:

$$I_p = 0.4463 n^{3/2} AC_{Rd}^* D_{Rd}^{1/2} \left(\frac{F^3}{RT} \right)^{1/2} v^{1/2} \quad (39)$$

donde D_0 está dado en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, C_0^b en $\text{moles} \cdot \text{cm}^{-3}$, v en $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ e I en Amperios.

Sustituyendo el valor de las constantes se obtiene:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} AC_{Rd}^* D_{Rd}^{1/2} v^{1/2} \quad (40)$$

Para un proceso reversible la intensidad de pico (así como la corriente en cualquier otro punto de la onda) es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad. Esta propiedad indica control difusivo y es un criterio de reversibilidad.

El máximo de corriente aparece a un potencial (E_p) situado a $(28,5/n)$ milivoltios más anódico que el potencial de onda un medio ($E_{1/2}$). Dicho potencial es independiente de la velocidad de barrido:

$$E_p = E_{1/2} + 1.109 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} + \frac{28,5}{n} mV \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (41)$$

siendo el potencial de onda un medio:

$$E_{1/2} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_{Rd}}{D_{Ox}} \quad (42)$$

Considerando que los coeficientes de difusión para la forma oxidada y reducida son similares ($D_{Ox} \approx D_{Rd}$) a partir de $E_{1/2}$ se puede obtener el potencial formal $E^{0'}$.

Sin embargo, el potencial de pico de corriente a veces es difícil de determinar, debido a que el pico es demasiado ancho y es más conveniente medir el potencial para $I_{p/2}$ ($E_{p/2}$):

$$E_{p/2} = E_{1/2} - 1.09 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} - \frac{28.0}{n} mV \quad (43)$$

Sustituyendo se obtiene uno de los criterios de diagnóstico para un proceso nernstiano.

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{56.5}{n} mV \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (44)$$

Por otra parte los potenciales de los dos picos anódico y catódico, son simétricos respecto a $E^{0'}$ y la diferencia nos da un tercer criterio de reversibilidad.

$$|E_{pa} - E_{pc}| = \frac{57}{n} mV \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (45)$$

Los valores de la intensidad de pico anódica y catódica, para un sistema reversible sin complicaciones cinéticas, son iguales:

$$I_{pa} / I_{pc} \approx 1 \quad (46)$$

La Figura 4 muestra el voltamograma característico para un proceso reversible:

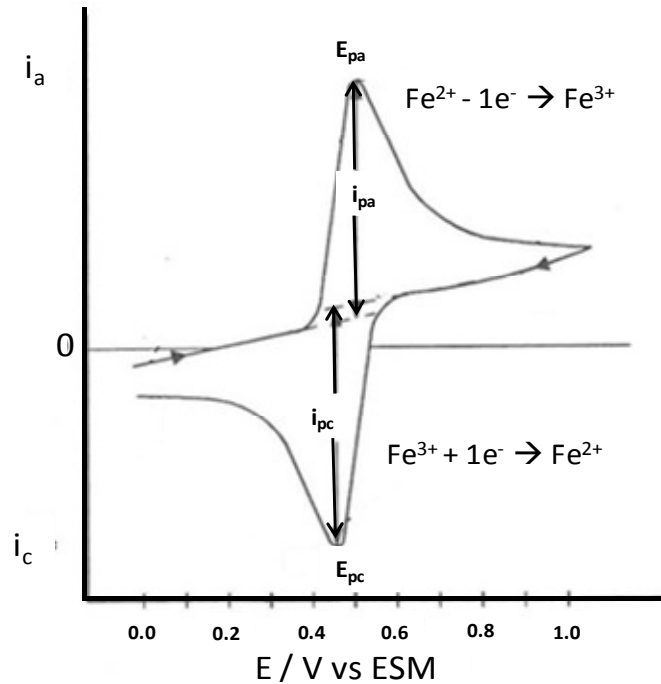
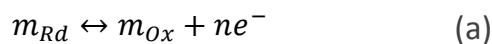


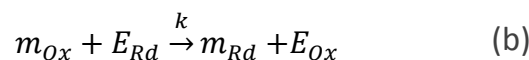
Figura 4: Voltamograma cíclico de Fe^{2+} en H_2SO_4 0.5M.

3.2.2 Voltametría cíclica para un proceso catalítico

Nicholson y Shain^[138] obtuvieron los criterios de diagnóstico para un mecanismo con una reacción catalítica irreversible, siguiendo a una transferencia de carga reversible (EC'):



(47)



De forma cualitativa, el efecto de la reacción química sobre la corriente anódica del voltamograma cíclico sería un aumento del máximo de corriente.

La intensidad viene dada por:

$$I = nFAm_{Rd}^{\infty} \sqrt{\pi D_{Rd} a} \chi(at) \quad (48)$$

siendo n el número de electrones intercambiados, F el valor de la constante de Faraday, A el área electroquímica del electrodo, m_{Rd}^{∞} la concentración del

mediador oxidado en el seno de la disolución, D_{Ra} su coeficiente de difusión, a un coeficiente función de la velocidad de barrido y $\chi(at)$ una función dependiente de la velocidad de barrido y el tiempo.

La solución a la función $\chi(at)$, en este caso es:

$$\chi(at) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^{j+1} \sqrt{\left(\frac{k_f}{a}\right) + j} \exp \left[\frac{jnF}{RT} (E - E_{1/2}) \right] \quad (49)$$

La función $\chi(at)$ presenta dos casos límite:

1. Si la relación k_f/a es baja (velocidades de barrido altas) la ecuación (49) se reduce a:

$$\chi(at) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^{j+1} \sqrt{j} \exp \left[\frac{jnF}{RT} (E - E_{1/2}) \right] \quad (50)$$

que corresponde a un proceso reversible obteniéndose experimentalmente el voltamograma característico.

2. Si la relación k_f/a es alta (velocidades de barrido bajas) la ecuación (49) se reduce a:

$$\chi(at) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^{j+1} \sqrt{\left(\frac{k_f}{a}\right) + j} \exp \left[\frac{jnF}{RT} (E - E_{1/2}) \right] \quad (51)$$

En este caso la ecuación (48) puede ser reescrita como:

$$I = \frac{nFAm_{Ra}^{\infty} \sqrt{D_{Ra} k_f}}{1 + \exp \left[-\frac{nF}{RT} (E - E_{1/2}) \right]} \quad (52)$$

Esta ecuación indica que la intensidad de corriente es directamente proporcional a $\sqrt{k_f}$, e independiente de la velocidad de barrido. Para potenciales muy anódicos, la ecuación (52) se reduce a la fórmula descrita por Saveant y Vianello^[140]:

$$I_{cat} = nF A m_{Rd}^{\infty} \sqrt{D_{Rd} k_f} \quad (53)$$

Bajo estas condiciones no se obtiene un pico sino una corriente limite (Figura 5(b)).

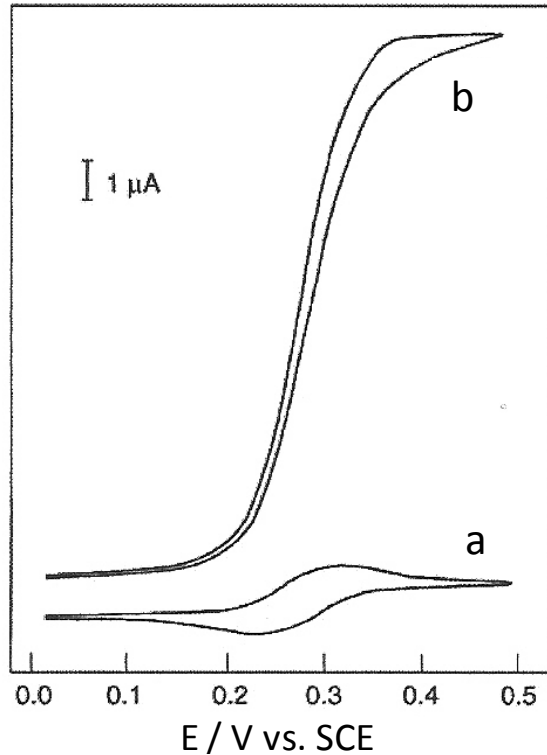


Figura 5: Voltamograma cíclico de 0.5M de ácido ferroceno carboxílico y glucosa 50mM a pH=7 y 25°C en ausencia (a) y en presencia de 10.9μM de glucosa oxidasa (b) a 1 mV·s⁻¹.^[130]

El tratamiento de Nicholson y Shain^[138] predice para un esquema EC', que el cociente de la corriente catalítica (i_{cat}) (Ecuación 53) respecto a la corriente limitada por difusión (i_{diff}) (Ecuación 39) viene dada por:

$$\frac{I_{cat}}{I_{dif}} = \frac{1}{0.4463} \left(\frac{k_f RT}{Fv} \right)^{1/2} \quad (54)$$

Donde k_f es una constante de velocidad de pseudo primer-orden y es el producto de la concentración de mediador por la constante de velocidad de segundo orden para la reacción $k_f = km_{Rd}$ ^[141].

Esta suposición solo es cierta cuando la regeneración electroquímica del mediador en la superficie electródica es rápida (Ecuación 47a) ya que en este caso la

concentración de mediador en la capa enzimática m_{Rd}^L es igual a la concentración total de mediador m_{Rd}^∞ . El valor de k_f puede ser obtenido a partir de la pendiente de $\frac{I_{cat}}{I_{dif}}$ vs. $\nu^{1/2}$ a distintas velocidades de barrido.

3.3 Técnicas electroquímicas periódicas

3.3.1 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)

La espectroscopia de impedancia electroquímica ha tenido un uso limitado, debido en parte a la complejidad de los equipos electrónicos requeridos y por otra parte a la dificultad que entrañaba la interpretación de los resultados experimentales. En este sentido, Sluyters y col^[142-150] en los años 60 publicaron importantes avances en cuanto a la interpretación de las medidas de impedancia se refiere, experimentando la técnica un extraordinario desarrollo en los años 80.

A pesar de ser un método electroquímico tradicionalmente empleado en estudios de corrosión, también se ha demostrado que la impedancia es un método muy eficaz para la caracterización de electrodos modificados, así como su empleo en el estudio de electrodos funcionalizados con biomateriales^[151]. Concretamente, esta técnica ha sido de gran utilidad para caracterizar biosensores enzimáticos^[152], inmunosensores^[153] o genosensores^[154].

Fundamentos de la técnica

En términos generales, la técnica de impedancia se basa en la aplicación de una señal de excitación, corriente o potencial, que varía periódicamente con el tiempo a una cierta frecuencia impuesta, obteniéndose una respuesta, potencial o corriente, también periódica^[155].

$$I(t) = \frac{1}{Z(\omega)} E(t) \quad (55)$$

donde $Z(\omega)$ es la impedancia electroquímica o resistencia del sistema. El hecho de que la perturbación impuesta sea cercana al potencial de equilibrio, al contrario que en los métodos basados en barrido o salto de potencial, donde el sistema se perturba desplazándolo lejos del potencial de equilibrio, ofrece la ventaja de que a la hora de obtener las soluciones de las ecuaciones matemáticas planteadas permite utilizar la forma límite de dichas ecuaciones, es decir, el término lineal de la expansión del término exponencial. Por tanto, si a un sistema con comportamiento lineal se le aplica un potencial que varía con el tiempo de forma sinusoidal:

$$E(t) = E_m + \Delta E = E_m + |\Delta E| \text{sen} \omega t \quad (56)$$

$$\text{siendo } \omega = 2\pi f$$

La respuesta obtenida es una intensidad que rota a la misma frecuencia que E, pero con distinta amplitud y desfasada respecto a la perturbación un ángulo ϕ :

$$I(t) = I_m + \Delta I = I_m + |\Delta I| \text{sen}(\omega t + \phi) \quad (57)$$

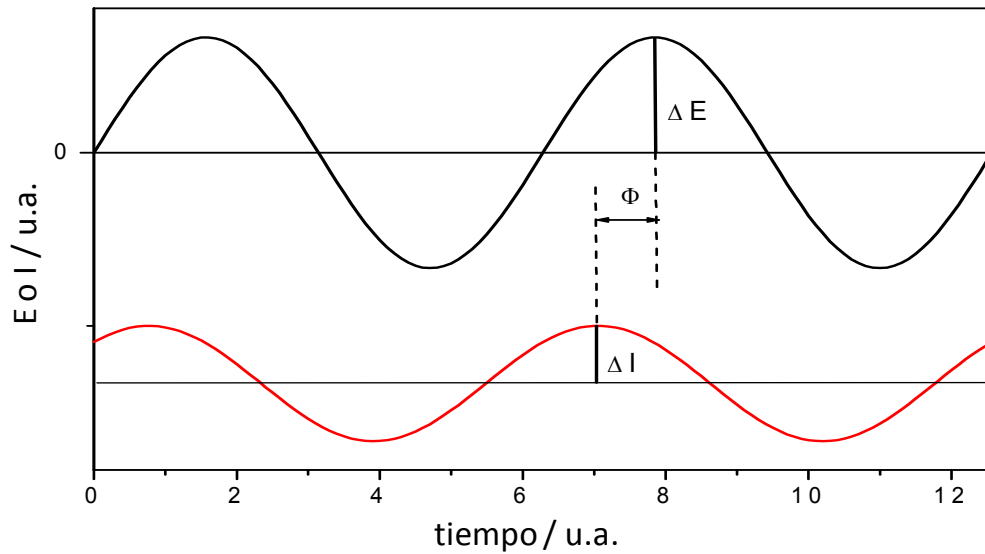


Figura 6: Diagrama de fasores que muestra la relación entre la señal alterna de corriente y la de potencial a la frecuencia ω .

Por tanto la impedancia (Ecuación 55) queda definida como:

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E}{\Delta I} = |Z| \exp j\omega\phi = Z_{re}(\omega) + jZ_{im}(\omega) \quad (58)$$

La impedancia es una resistencia que depende de la frecuencia (ω) y está compuesta por una parte real y una imaginaria. $|Z|$ es el módulo del vector de impedancia, cociente de amplitudes fundamentales de potencial y corriente. $|Z| = E_m/I_m$ y ϕ es el ángulo de desfase entre ellos. Por tanto, para cada frecuencia la respuesta del sistema vendrá caracterizada por dos valores, la relación de amplitudes entre perturbación y respuesta (módulo) y el desfase (ϕ).

Circuito equivalente

Al introducir un metal en una disolución, la interfase metal/electrolito puede considerarse como un sistema capaz de almacenar cargas. Debido a la electroneutralidad de la materia, la existencia de cargas eléctricas sobre un conductor electrónico crea una imagen de signo contrario en la otra cara de la misma interfase, dando lugar a la doble capa^[156].

La capacidad para almacenar carga de la doble capa electroquímica, provoca que su comportamiento se asimile al de un condensador de láminas paralelas. La doble capa electroquímica no es un condensador perfecto, la relación entre la carga a través de la interfase y el potencial aplicado no es lineal. Sin embargo, para pequeñas perturbaciones de potencial ($\Delta E < 20$ mV) sin adsorción y suponiendo que en el electrodo no hay reacción electroquímica, la relación $C = \Delta q / \Delta E$ es aproximadamente lineal. De esta forma, el sistema electroquímico más sencillo se puede simular por una resistencia (R_e o resistencia del electrolito), que representa la resistencia óhmica entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, en serie con un condensador, que simula la capacidad de la interfase polarizable electrodo/electrolito (C_{DL} o capacidad de la doble capa) (Figura 7).

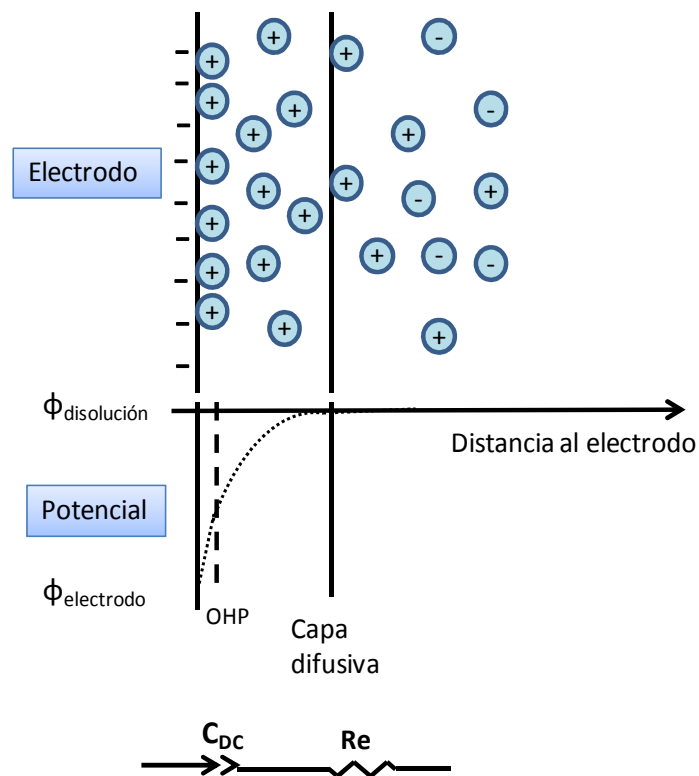


Figura 7: circuito eléctrico equivalente de una interfase polarizable.

Gracias a esta similitud entre la doble capa y un circuito equivalente, es posible modelar las transformaciones electroquímicas que ocurren en la interfase

electrodo/disolución mediante un circuito eléctrico equivalente, a partir de los resultados experimentales del espectro de impedancia.

Considerando un circuito simple de una resistencia en serie con una capacitancia, la impedancia será igual a:

$$Z = R_e + \frac{1}{j\omega C_{DL}} = R_e - j \frac{1}{\omega C_{DL}} = Z' - jZ'' \quad (59)$$

siendo R_e la parte real de Z y $1/j\omega C_{DL}$ la parte imaginaria. Si se representa la parte imaginaria (Z'') vs la parte real de la impedancia (Z') se obtendrá la gráfica de la Figura 8.

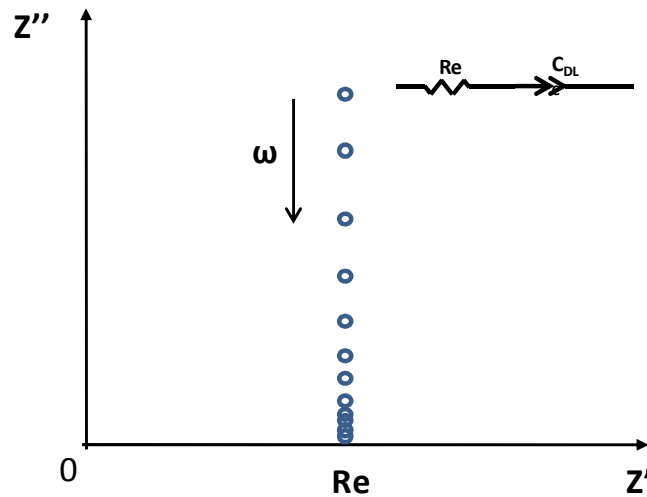


Figura 8: Componentes real (Z') e imaginaria (Z'') para una interfase polarizable representada por una resistencia (R) en serie con una capacidad (C).

Si la interfase es no polarizable y existe transferencia de carga, el circuito eléctrico equivalente vendrá dado por los siguientes elementos:

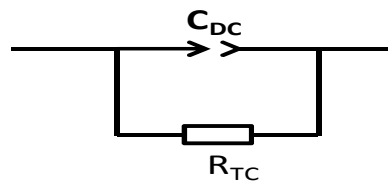


Figura 9: Circuito equivalente para una interfase no polarizable con una resistencia (R) en paralelo con un capacitor (C).

En este caso, la ecuación que define la impedancia será la siguiente:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R_{TC}} + j\omega C_{DL} \quad (60)$$

Si representamos en el eje horizontal la parte real de la impedancia del electrodo, es decir su componente resistiva y en el eje de ordenadas la componente imaginaria o reactancia capacitativa, obtendremos el diagrama de la Figura 10.

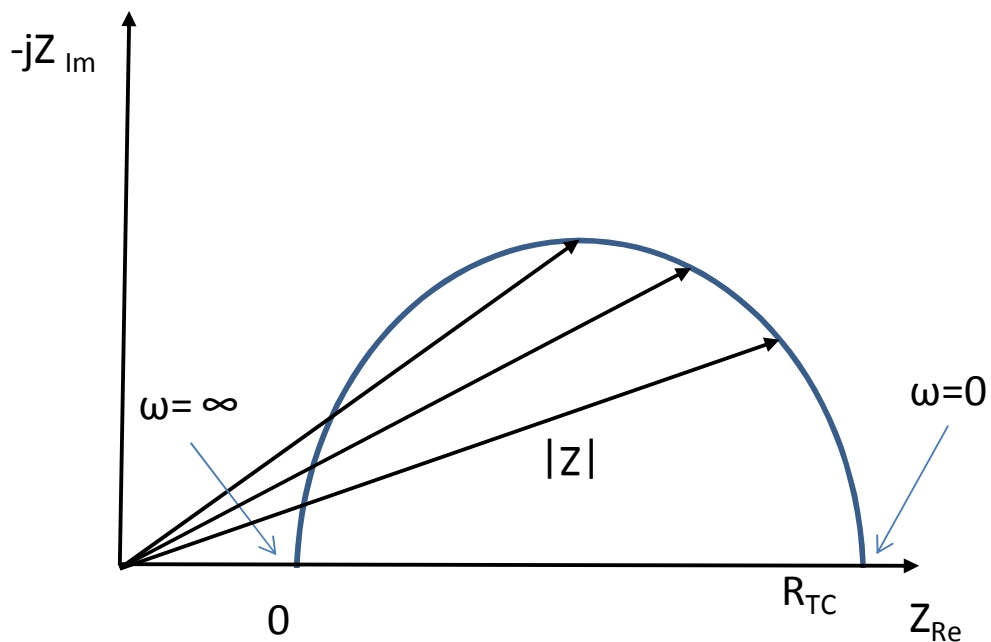


Figura 10: Diagrama de Nyquist

La impedancia es una magnitud vectorial. Para cada valor de frecuencia de la onda aplicada, se obtiene un par de valores Z' y Z'' que definen un nuevo vector impedancia $|Z|$. Estos vectores son vectores giratorios que pueden representarse en un plano complejo o diagrama de Argand. La sucesión de puntos correspondientes a los extremos de estos vectores, para los diferentes valores de frecuencia aplicados, constituye el diagrama de Nyquist.

A bajas frecuencias la impedancia es puramente resistiva, debido a que el condensador conduce cada vez menos, pues la reactancia capacitativa es inversamente proporcional a ω . A medida que la frecuencia aumenta, el valor de la

componente imaginaria de la impedancia (Z'') tiende a cero; situación en la que la capacitancia se puede considerar en cortocircuito.

Si añadimos la resistencia de la disolución existente entre el electrodo de referencia y el de trabajo, el circuito equivalente será:

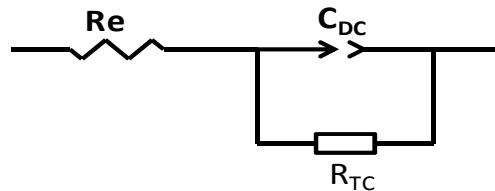


Figura 11: Circuito equivalente de una interfase no polarizable en disolución.

Este circuito está compuesto por la resistencia ofrecida por el electrolito al paso de la corriente (R_e), la capacidad de la doble capa correspondiente a la interfase disolución/electrodo de trabajo (C_{DC}) y la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}).

Si se incluye la R_e el valor de la impedancia se transforma en:

$$Z = R_e + \frac{R_{TC}}{1 + \omega^2 C^2 R_{TC}^2} - \frac{j\omega C R_{TC}^2}{1 + \omega^2 C^2 R_{TC}^2} \quad (61)$$

A frecuencias bajas, la impedancia asociada al proceso capacitativo es mucho mayor que la asociada al farádico y como están en paralelo toda la corriente circulará por la rama faradaica. En este caso la impedancia es igual a la suma $R_e + R_{TC}$, que viene dada por la intersección del semicírculo con el eje real a frecuencias bajas (Figura 12).

A frecuencias altas, del orden de 10 kHz o mayores, el condensador conduce tan fácilmente que cortocircuita R_{TC} y permanece sólo el efecto de la resistencia del electrolito y de las capas superficiales (R_e), valor que corresponde a la intersección izquierda del semicírculo con el eje de abscisas.

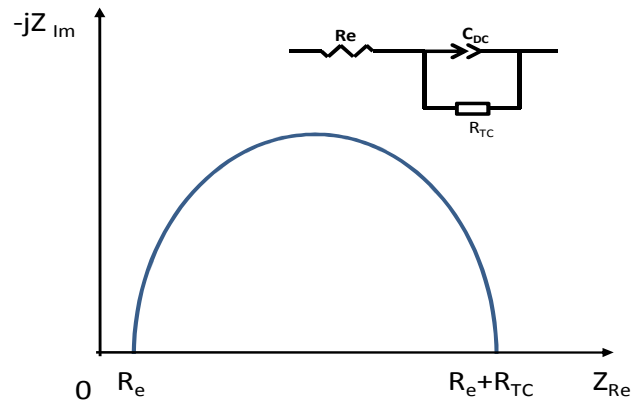


Figura 12: Diagrama de Nyquist correspondiente al circuito equivalente de una interfase no polarizable.

A partir de los resultados experimentales del espectro podemos determinar los valores de todos los elementos del circuito (Figura 13). El valor de R_e vendrá dado por el punto de corte del espectro con el eje real a altas frecuencias; R_{TC} es la diferencia entre el punto de corte a bajas frecuencias menos el valor de la R_e y C_{DC} se puede determinar a partir de la frecuencia donde el semicírculo dibuja un máximo en el eje imaginario

$$C_{DC} = -\frac{1}{\omega_{max} \cdot R_{TC}} \quad (62)$$

Hasta ahora no hemos considerado la impedancia que mide la dificultad del transporte de masa debido a la difusión de las especies electroactivas hacia la superficie del electrodo, como consecuencia del gradiente de concentración existente entre este y el seno de la disolución. Por tanto, es necesario incluir en el circuito equivalente otro elemento, Z_W o impedancia de Warburg ($Z_W = Z_{mat,Ox} + Z_{mat,Red}$). En 1947, Randles propuso el siguiente modelo de circuito equivalente que reproduce la respuesta de muchos sistemas electroquímicos^[157]:

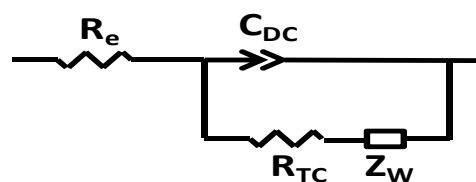


Figura 13: Circuito equivalente de Randles

Según Randles^[157], la reacción de transferencia de carga se puede representar por una impedancia faradaica Z_f , que es la suma de la resistencia de transferencia de carga (R_{TC}) y la impedancia de Warburg (Z_W)^[156]:

$$Z_f = R_{TC} + Z_W \quad (63)$$

Si la variación de concentración de las formas oxidada y reducida está controlada por difusión, la impedancia de Warburg en forma compleja será:

$$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} - j \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} \quad (64)$$

Por tanto:

$$Z_f = R_{TC} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} - j \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} = Z'_f - jZ''_f \quad (65)$$

La obtención del diagrama de impedancias en un amplio intervalo de frecuencias permite diferenciar los diversos procesos que intervienen en el sistema estudiado.

De forma explícita:

$$Z_f = R_e + \frac{R_{TC} + \sigma/\sqrt{\omega}}{(C\sigma\sqrt{\omega} + 1)^2 + C^2\omega^2(R_{TC} + \sigma/\sqrt{\omega})^2} - j \frac{\omega C(R_{TC} + \sigma/\sqrt{\omega})^2 + \sigma^2 C + \sigma/\sqrt{\omega}}{(C\sigma\sqrt{\omega} + 1)^2 + C^2\omega^2(R_{TC} + \sigma/\sqrt{\omega})^2} \quad (66)$$

Esta ecuación relaciona la impedancia faradaica con la capacidad de la doble capa y la resistencia óhmica, pudiendo considerarse dos casos límites:

1.- A bajas frecuencias, $\omega \rightarrow 0$

$$Z' = R_e + R_{TC} + \sigma/\sqrt{\omega} \quad (67)$$

$$Z'' = -\sigma/\sqrt{\omega} - 2\sigma^2 C \quad (68)$$

Este límite a baja frecuencia es una línea recta de pendiente unidad cuya intersección en el eje real es: $R_e + R_{TC} - 2\sigma^2 C$ (Figura 14). La recta corresponde a un proceso controlado por difusión y la impedancia es la impedancia de Warburg (Z_W), siendo el ángulo de fase 45° .

2.- En el límite de altas frecuencias ($\omega \rightarrow \infty$) el control es puramente cinético, siendo $R_{TC} \gg Z_\omega$.

$$Z' = R_e + \frac{R_{TC}}{1 + \omega^2 C^2 R_{TC}^2} \quad (69)$$

$$Z'' = -\frac{\omega C R_{TC}^2}{1 + \omega^2 C^2 R_{TC}^2} \quad (70)$$

Eliminando ω entre ambas expresiones:

$$\left(Z' - R_e - \frac{R_{TC}}{2}\right)^2 + (Z'')^2 = \frac{R_{TC}^2}{4} \quad (71)$$

se obtiene la ecuación de una circunferencia de radio $R_{TC}/2$ cuya intersección con el eje real (Z') es R_e ($\omega \rightarrow$ infinito) y $R_e + R_{TC}$ ($\omega \rightarrow 0$) (Figura 14).

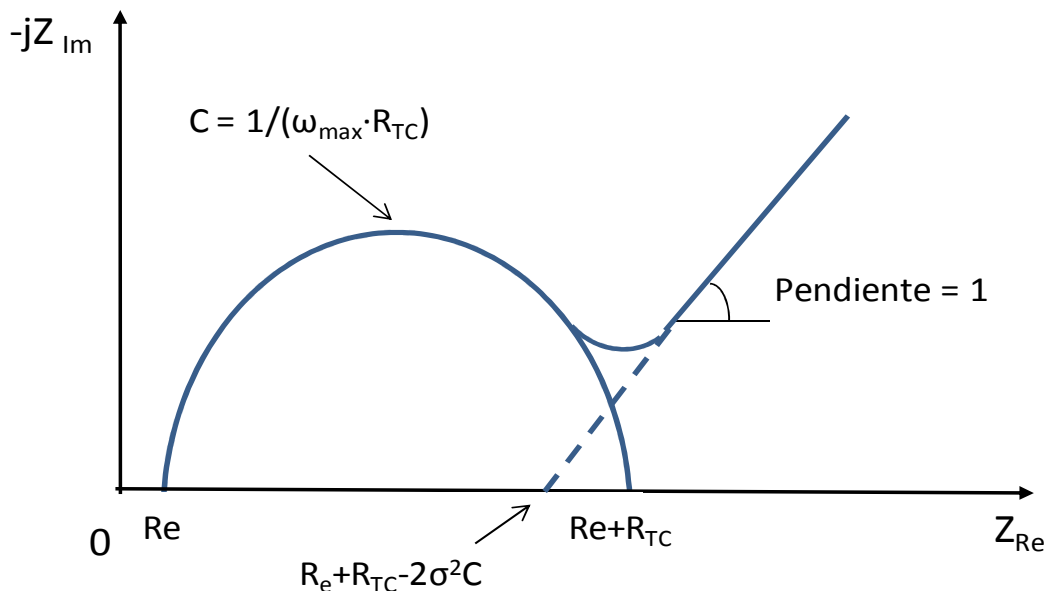


Figura 14: Diagrama de Nyquist correspondiente al circuito equivalente de Randles con impedancia de Warburg.

Es necesario señalar, que el circuito de Randles, es una aproximación y una simplificación al mismo tiempo. Cada sistema real tiene su circuito equivalente que no difiere sólo en la magnitud de sus componentes, sino también en el número y forma de combinarlos.

Las medidas de impedancia permiten obtener distintas representaciones de los resultados experimentales. Además de los diagramas de Nyquist, una representación habitual son los diagramas de Bode. A diferencia de los gráficos de Nyquist, las representaciones de Bode contienen toda la información de un ensayo de EIS, ya que incluyen los valores de frecuencia. Existen diferentes variantes de estos diagramas, pero las representaciones más utilizadas son:

- Logaritmo decimal del módulo de impedancia frente a logaritmo decimal de los valores de frecuencia aplicados ($\log |Z|$ vs $\log f$).
- Ángulo de fase frente al logaritmo decimal de la frecuencia (ϕ vs $\log f$).

En los diagramas de Bode (Figura 15) podemos distinguir varias regiones de frecuencia. El valor de la impedancia en la zona de frecuencias más altas, cuando el ángulo de fase es próximo a cero, nos proporciona el valor de la resistencia del electrolito (R_e). A valores de frecuencia intermedios aparece otro plató, que coincide con $\phi = 0$ en el diagrama de ángulo de fase, correspondiente a la suma de la resistencia del electrolito y la de transferencia de carga ($R_e + R_{TC}$). Para valores de frecuencia más bajos el módulo de la impedancia nos da la resistencia total del circuito ($R_e + R_{TC} + Z_W$).

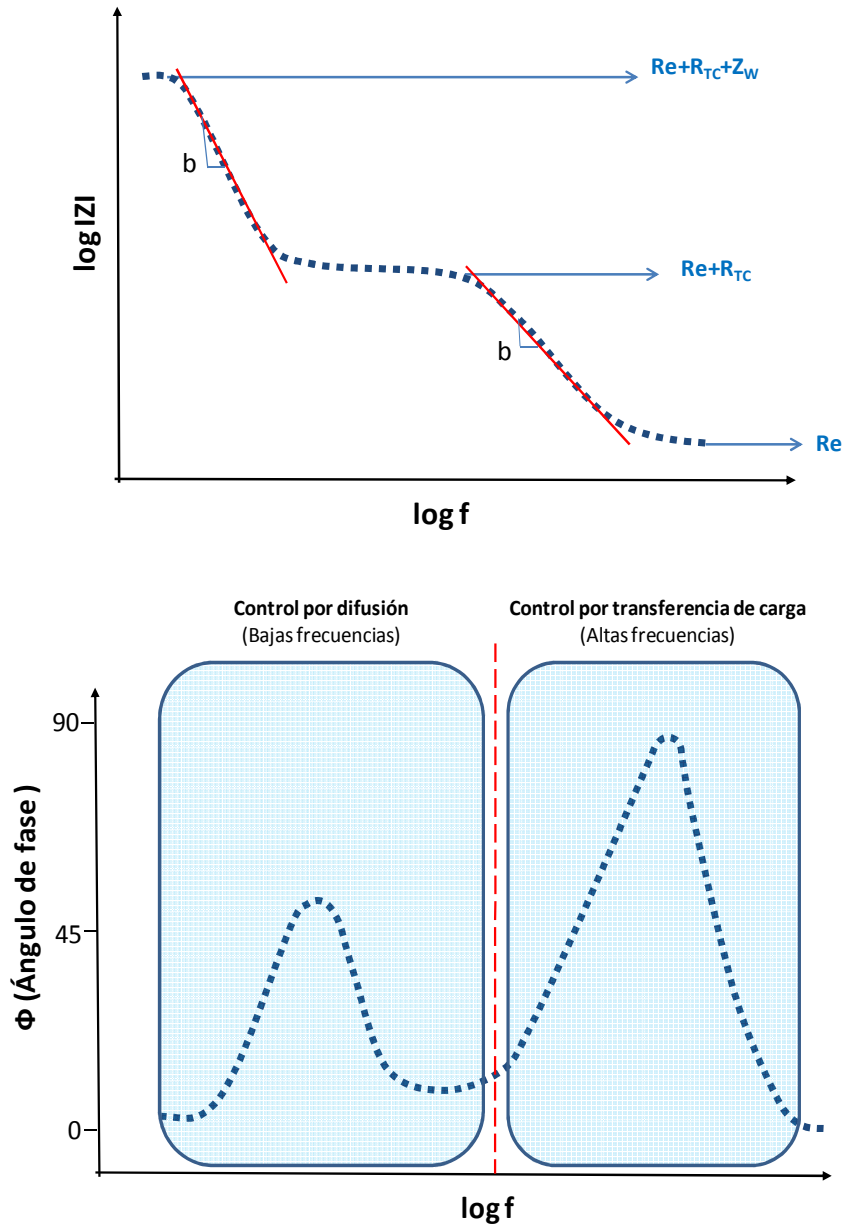


Figura 15: Diagramas de Bode

Transformadas de Kramers-Kronig

Las transformadas de *Kramers-Kronig* (K-K) ^[158] se emplean para determinar si los resultados de impedancia obtenidos se han distorsionado durante la adquisición de los datos experimentales. Debido a que estas transformadas se basan en relaciones matemáticas que no reflejan ninguna otra propiedad física del sistema objeto de estudio, no es necesario utilizar un circuito

eléctrico equivalente para determinar la consistencia de los resultados experimentales^[159]

Las transformadas de *K-K* se pueden aplicar siempre que el sistema objeto de estudio no varíe con el tiempo y cumpla las siguientes cuatro condiciones: *causalidad, linealidad, estabilidad, y valor finito*^[160, 161].

Un sistema es *causal* si su respuesta no precede a la perturbación^[160]. Si a un sistema en reposo se le aplica una perturbación en $t = 0$, la respuesta del sistema debe ser 0 para $t < 0$. Físicamente esto quiere decir que el sistema no genera ruido independiente de la señal aplicada para $t \geq 0$.

Un sistema es *lineal* si la relación entre la perturbación introducida y la respuesta se puede describir mediante ecuaciones diferenciales lineales^[158]. Esto significa que la impedancia obtenida es independiente de la perturbación recibida. Así, para asegurar la linealidad, se suele utilizar una amplitud de la perturbación entre 5 y 15 mV. Aunque hay que tener en cuenta que si la amplitud es demasiado pequeña el cociente señal/ruido disminuye^[161].

Un sistema electroquímico es *estable* si cuando cesa la perturbación impuesta el sistema vuelve al estado original^[161].

La impedancia debe tener un *valor finito* en todo el intervalo de frecuencia analizado, incluyendo $\omega \rightarrow 0$ y $\omega \rightarrow \infty$. Desde un punto de vista práctico, la condición de valor finito no es crítica. En estudios de corrosión, sin embargo, la falta de consistencia de los resultados electroquímicos al aplicar las relaciones de *K-K* es a menudo debida a un fallo en la condición de estabilidad^[162].

Las integrales de las transformadas de *K-K* se pueden expresar como^[163]:

$$Z'(\omega) = Z'(\infty) + \left(\frac{2}{\pi}\right) \int_0^{\infty} \frac{x Z''(x) - \omega Z''(\omega)}{x^2 - \omega^2} dx \quad (72)$$

$$Z''(\omega) = \left(\frac{2\omega}{\pi}\right) \int_0^{\infty} \frac{Z'(x) - Z'(\omega)}{x^2 - \omega^2} dx \quad (73)$$

donde $Z'(\omega)$ y $Z''(\omega)$ son funciones continuas que proporcionan la parte real e imaginaria de la impedancia respectivamente, en función de la frecuencia angular (ω) en rad/s ($0 < \omega < \infty$), siendo x una variable de integración entre $0 < x < \infty$. Utilizando las ecuaciones (72) y (73) es posible transformar la parte real de la impedancia en la parte imaginaria y viceversa^[163]. Las comparaciones de los diagramas obtenidos experimentalmente, con los obtenidos calculando las relaciones de K-K es un método de validación de la adquisición de resultados.

3.4 Técnicas de caracterización superficial

En este apartado se describen las técnicas de caracterización utilizadas para determinar la morfología y topografía superficial (microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM)), así como el tamaño de cristalita y la orientación cristalográfica (difracción de rayos X (DRX) de los distintos soportes empleados como transductores en la construcción del biosensor. Igualmente, la composición química del transductor funcionalizado se analizó por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).

3.4.1 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM: *Atomic Force Microscopy*) es una técnica relativamente nueva, fue inventada por G.Binnig en 1986^[164]. Esta técnica se engloba dentro de la microscopía SPM (*Scanning Probe Microscopy*) cuyo fundamento consiste, en una sonda acabada en punta que barre la superficie de una muestra, registrándose su interacción. Dentro de la microscopía SPM se encuentran técnicas como la microscopía de efecto túnel o STM (*Scanning Tunneling Microscopy*)^[165], la microscopía de fuerza magnética o MFM (*Magnetic*

Force Microscopy), la microscopía de fuerza eléctrica o EFM (*Electric Force Microscopy*), etc.

La microscopía de AFM, surgió con la finalidad de solventar las limitaciones de la microscopía STM, la cual sólo permite trabajar con muestras conductoras, ya que se basa en la medición de la corriente entre punta y muestra. En la microscopía de AFM, una punta se sitúa al final del brazo de un fleje o “cantilever” flexible de unas 100-200 μm de largo, con una constante de elasticidad específica. La punta se mueve con un sistema de piezoeléctricos, realizando un barrido de la superficie de la muestra, haciendo que el “cantilever” se doble más o menos según la fuerza de interacción que se ejerza entre la punta y la muestra. Esta variación del cantiléver en la dirección Z, permite obtener información topográfica de la superficie con resolución nanométrica.

El fundamento de la técnica consiste en mantener constante la interacción entre la punta y la muestra a medida que la muestra se barre en las direcciones XY. La interacción a nivel del eje Z, se mantiene constante gracias a un sistema que aplica un voltaje adecuado para ajustar el valor Z del piezo. La representación de estos voltajes nos proporciona la imagen topográfica de la muestra en estudio.

Las principales partes de un equipo de AFM son el elemento sensor (cantilever), la cabeza óptica (láser y sistema de detección), el sistema piezoeléctrico y una unidad de control, que regula los parámetros de operación y la adquisición de los datos. A continuación se puede ver un esquema de los componentes básicos de un sistema de AFM (Figura 16).

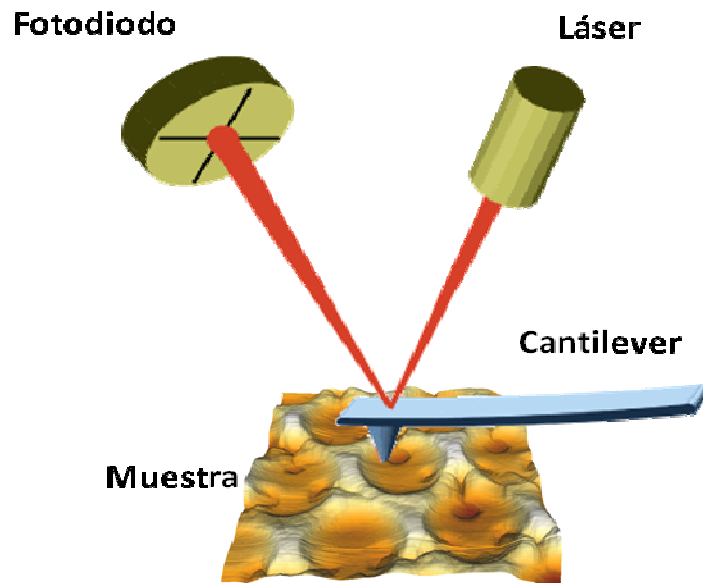


Figura 16: Esquema de los principales componentes de un microscopio de fuerza atómica.

- Cantilever: es el elemento sensor. En su extremo se encuentra la punta, que se elegirá en función de la muestra. Cuanto más afilada sea la punta mejor será la resolución de las imágenes obtenidas^[166]. Estas puntas se fabrican sobre el cantiléver mediante procesos de microfabricación^[167]. La Figura 17 muestra el aspecto de una punta. Las puntas más utilizadas, para obtener información topográfica, son las de nitruro de silicio, o las de silicio dopado con Antimonio. También existen cantilevers que se emplean para otro tipo de medidas, como las puntas magnéticas de silicio monolítico, o sondas conductoras que poseen un recubrimiento conductor de cromo/platino.

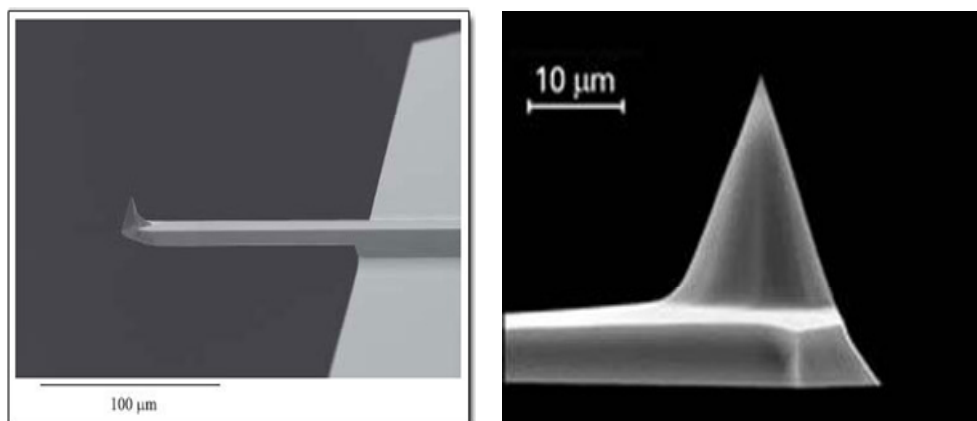


Figura 17: a) Micropalanca de AFM, b) punta de la micropalanca.

Las puntas se caracterizan por su **constante elástica o constante de fuerza (k)** que debe ser baja, para alcanzar la máxima sensibilidad posible (0.006-100N/m) y su **frecuencia de resonancia (f_0)** que debe ser alta, para alcanzar velocidades de medida elevadas y evitar ruidos mecánicos de baja frecuencia (13-500KHz). La elección de la micropalanca se hará en función de la muestra, el modo de medida y el medio en que se opere (aire, líquido o vacío).

El comportamiento mecánico del cantiléver, como respuesta a la interacción punta-muestra, se puede aproximar al de un muelle elástico que esté regido por la ley de Hooke:

$$F = -kx$$

Donde, F es la fuerza recuperadora del muelle, que equivale a la fuerza de interacción punta-muestra; k es la constante de recuperación del muelle, que equivale a la constante elástica de la micropalanca y x es la deformación del muelle, que equivale al desplazamiento o flexión en la dirección vertical que sufre la micropalanca debido a las fuerzas de interacción.

Para medir la flexión del cantiléver se utilizan sistemas de detección óptica. Se hace incidir un haz laser sobre el extremo de la micropalanca donde se sitúa la punta, que es reflejado hacia un detector compuesto por un fotodiodo segmentado en cuatro sectores. Para medir la deflexión vertical se mide la diferencia de señal entre los sectores superiores e inferiores (A-B). La diferencia de intensidad entre los sectores laterales mide la deflexión de torsión (C-D).

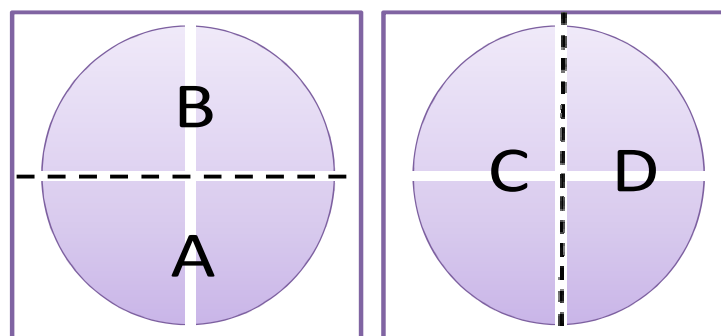


Figura 18: Fotodetector de cuatro segmentos

- Sistema piezoeléctrico: se emplea para mover la punta respecto a la muestra. Dependiendo del microscopio, el elemento móvil puede ser la punta o la muestra. Se basan en la utilización de materiales cerámicos que se expanden o contraen como respuesta a la aplicación de un voltaje. El tubo piezoeléctrico está segmentado y cada porción es responsable del movimiento en las direcciones X, Y o Z.

Principales modos de operación del AFM

Existen tres modos de operación básicos en AFM: modo contacto (dinámico), de no contacto (estático) y de contacto intermitente o “tapping” (dinámico).

Estos tres modos de operación se diferencian en la magnitud y tipo de fuerzas que se establecen entre punta y muestra. En el **modo de no contacto**, a medida que se acerca la punta a la muestra empiezan a actuar las fuerzas atractivas o de Van der Waals. En el **modo de contacto**, la punta recorre la superficie de la muestra manteniendo la distancia punta-muestra constante. La punta se sitúa a una distancia de la muestra tan corta, que las funciones de onda de los átomos de la punta y la muestra se solapan, generando una repulsión que provoca una deflexión constante en la micropalanca a lo largo de todo el barrido de la muestra. El sistema de retroalimentación enviará señales al piezoeléctrico para que mantenga el valor de la deflexión inicial. Trabajar a una deflexión constante es equivalente a trabajar a una fuerza constante, debido a que son proporcionales ($F = -kx$). El registro de los movimientos del sistema piezoeléctrico proporciona el mapa topográfico de la superficie de la muestra.

La magnitud de las fuerzas que intervienen en cada modo operacional es muy distinta. En el caso del modo de contacto es del orden de 10^{-7} N, mientras que en el régimen de no contacto es del orden de 10^{-13} N. Debido a esta diferencia, el modo de no contacto presenta peor resolución topográfica que el modo de

contacto. Sin embargo, el modo de contacto presenta limitaciones cuando las muestras son muy blandas o delicadas, por ejemplo muestras biológicas^[79]. Una solución a estas limitaciones, es el **modo de contacto intermitente o "tapping"**, que combina ambos modos. En este modo se aplica una señal sinusoidal que provoca la oscilación de la punta a su frecuencia de resonancia ($f_0 = 5 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^6$ ciclos/s), estableciendo contacto con la muestra al final de cada oscilación. La amplitud de oscilación, derivada de la aplicación de la frecuencia de resonancia, es la amplitud libre (A_0), que será la amplitud de trabajo constante que se empleará en el barrido de la muestra. Durante las oscilaciones de la punta, esta varía su distancia a la muestra y las fuerzas de interacción punta-muestra provocan una variación en la amplitud de oscilación. Igual que en el caso anterior, el sistema de retroalimentación enviará señales al piezoeléctrico para tratar de mantener el valor de la amplitud invariable. Registrando los movimientos del sistema piezoeléctrico se obtienen la imagen topográfica de la muestra. Operando en este modo se mejora la resolución topográfica al aproximarse más a la superficie (contacto), pero se evita dañarla cuando son muestras delicadas (no contacto).

3.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM: Scanning Electron Microscopy) permite obtener imágenes que ofrecen información tridimensional de las superficies con una resolución de unos pocos nanómetros. Para ello, las muestras se bombardean con un fino haz de electrones que se generan por efecto termo-iónico en un filamento (cátodo) que es generalmente de Wolframio, y se monocromatizan acelerándolos a través de un potencial en un sistema sometido a vacío. Este haz de electrones primarios es dirigido mediante lentes magnéticas e incide posteriormente en la muestra. El diámetro del haz, el llamado "spot", tiene que ser reducido en el SEM para producir una fina resolución espacial, por ello la corriente de haz ha de ser muy pequeña y como todas las señales producidas por

electrones son directamente proporcionales a esa corriente, la sensibilidad queda disminuida. Por lo tanto es necesario utilizar velocidades de barrido lentas para obtener imágenes libres de “ruido electrónico”.

Este haz de electrones primarios recorre mediante líneas paralelas, punto por punto, la superficie de la muestra, provocando, entre otros procesos, una emisión de electrones de distinta naturaleza:

- **Electrones secundarios**, que proporcionan información topográfica.

Los efectos de contraste topográfico de la superficie son debidos a los electrones secundarios que provienen de la banda de conducción. La señal obtenida varía gradualmente con los cambios locales de la pendiente de la superficie. En el contraste topográfico, las zonas más elevadas y más brillantes son aquellas donde existe mayor concentración de electrones, como por ejemplo los vértices y aristas, mientras que las más oscuras corresponden a valles o zonas más bajas.

Si hay zonas de la muestra que no son muy conductoras se pueden producir “efectos de carga”, es decir una alta concentración de electrones, que siguen llegando de forma continua a la muestra. Por tanto, desplazando el haz de electrones sobre la superficie y recogiendo las señales producidas en cada punto es posible obtener un mapa topográfico de dicha superficie.

- **Electrones retrodispersados**, que proporcionan el análisis químico de las muestras.

Los electrones retrodispersados dejan vacantes en niveles interiores de energía. El ión resultante se estabiliza, rellenando la vacante con un electrón de nivel superior y la diferencia de energía entre los orbitales electrónicos implicados es emitida en forma de radiación X. Los Rayos-X producidos tienen una energía que corresponde, exactamente, a una transición electrónica específica para cada

elemento. Dichos valores de energía dan lugar a las líneas características del elemento o radiación característica. Dependiendo del nivel energético del orbital atómico, al cual lleguen los electrones, tenemos las líneas K, L, M. La energía de estas líneas es función del número atómico de los elementos, lo que nos permite identificarlos y distinguirlos en un espectro de Energías Dispersivas de Rayos X (EDX).

Por tanto, la espectroscopia de energías dispersivas de Rayos-X proporciona información analítica sobre la composición del total, o de zonas de la muestra de hasta unas cuantas micras de diámetro, utilizándose para identificar o confirmar, elementos o sustancias conocidas o desconocidas en dicha muestra.

Con el espectro EDX podemos realizar los siguientes análisis:

- *Cualitativo*: El PC tiene memorizadas los valores de energías y se asigna a cada línea del espectro el elemento que corresponde.
- *Semicuantitativo*: Son aproximados, se emplea la relación entre altura de pico del elemento con la del fondo.

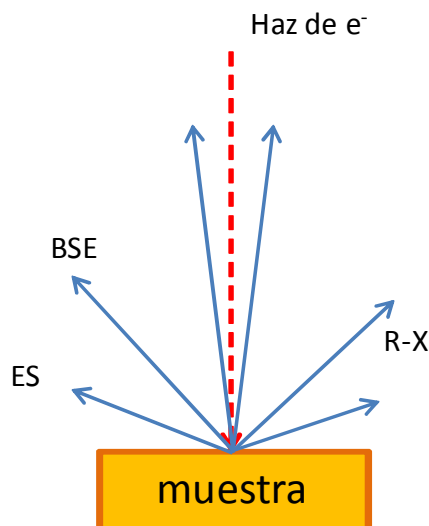


Figura 19: Esquema de los fundamentos básicos de la microscopia electrónica de barrido (SEM).

Los elementos básicos de un microscopio electrónico de barrido son:

1. Fuente de electrones: Hilo de Wolframio en atmósfera de vacío (3×10^{-6} torr) sometido a un potencial determinado, entre 1 y 30 KV.
2. Lentes condensadoras: Electromagnéticas y las encargadas de dar al haz de electrones la anchura necesaria para la observación de la muestra.
3. Goniómetro: Soporte que nos permite mover la muestra en las tres direcciones.
4. Apertura de objetivo y objetivo
5. Cámara de muestra
6. Sistemas de detección
 - Detector de electrones secundarios
 - Detector de electrones retrodispersados
 - Detector de Rayos X
7. Sistema de vacío

3.4.3 Difracción de Rayos-X (DRX)

La difracción de Rayos-X (DRX) es una técnica analítica no destructiva; una herramienta de trabajo de extraordinaria utilidad en muy diversas disciplinas científicas y tecnológicas, debido a la variedad de información que proporciona. El campo de aplicación más importante de la técnica se basa en la identificación de fases cristalinas presentes en la muestra sólida o de polvo, tanto en su aspecto cualitativo como cuantitativo^[168].

La difracción de rayos X de policristal es una técnica de caracterización estructural para muestras sólidas de estructura cristalina, basada en las interferencias constructivas generadas cuando se hace incidir un haz de rayos X de una cierta longitud de onda, del orden de las distancias interatómicas del sólido que se quiera estudiar.

La ley que rige la difracción es la llamada *ley de Bragg* ($n\lambda = 2d\sin\theta$); de ahí que los ángulos de desviación estén íntimamente relacionados con la distancia entre planos de las redes cristalinas; por ello, el diagrama de difracción (difractograma) de una sustancia es característico de la disposición u ordenamiento de los átomos que la componen. La señal de difracción emitida por un sólido cristalino es una huella de su estructura y la intensidad de las líneas de difracción es función de la concentración de las diferentes fases cristalinas^[169].

La identificación de las fases cristalinas existentes en la muestra se realiza comparando los difractogramas experimentales de la muestra a identificar, con los patrones de difracción registrados en las diferentes bases de datos existentes (CSD, ICSD, CDD, etc.). Actualmente, es el único procedimiento que permite abordar el estudio cristalográfico de las especies no monocristalinas.

Sin embargo, los difractómetros de polvo convencionales presentan un uso limitado en el estudio de láminas, ya que la penetración de los Rayos-X en la muestra normalmente sobrepasa el espesor de la película. Esta profundidad de penetración de los Rayos-X en la muestra se relaciona con la absorción de la muestra, con la longitud de onda (λ) de los Rayos-X incidentes y con el ángulo de incidencia, de forma que si el ángulo que forma la superficie de la muestra y la radiación incidente es bajo ($\leq 2^\circ$), el haz que incide abarca una superficie de muestra mayor y la profundidad efectiva perpendicular a la superficie se reduce.

El dispositivo de incidencia rasante transforma la geometría convencional de Bragg-Brentano, para un difractómetro de polvo, en una óptica de haces paralelos. Entre otras aplicaciones de la técnica, podríamos mencionar el estudio de la orientación preferencial y el del tamaño de partícula.

Determinación del tamaño de cristalita

En condiciones ideales, la ley de Bragg predice que la difracción en un cristal, de un haz de Rayos-X paralelo y estrictamente monocromático, se produce para valores discretos del ángulo θ .

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (74)$$

Por tanto, la Ley de Bragg es una consecuencia de la periodicidad de la red de átomos que forman el cristal, donde n puede valer ($n = 0, 1, 2, \dots$), d es la distancia entre los planos, y θ es el ángulo de incidencia medido con respecto a la dirección de los planos.

En la práctica, sin embargo, estas condiciones ideales no existen nunca y la desviación de las mismas originan, que el efecto de difracción, se produzca en un intervalo angular más o menos amplio, produciendo un ensanchamiento de las líneas alrededor del valor teórico de theta. Esta anchura adicional es debida, tanto a factores instrumentales como al grado de perfección cristalina de la muestra. El tamaño, excesivamente pequeño de los cristalitos, puede ser incluido entre estas imperfecciones.

La anchura, debida a factores instrumentales o anchura instrumental, es constante para un mismo dispositivo experimental e independiente de la que introduce los efectos de difracción propiamente dichos. Su origen es debido a diversos factores, tales como la divergencia del haz incidente o al tamaño finito del foco de Rayos-X, el diámetro de la muestra y el carácter no estrictamente monocromático de la radiación empleada, entre otros.

Si excluimos otras causas, que pueden afectar al valor de la inevitable anchura instrumental de la línea, las cuales citaremos más adelante, su magnitud puede experimentar variaciones apreciables en función del tamaño de las cristalitas.

En la discusión que sigue llamaremos W al valor de la anchura total observada en el máximo de difracción, la cual está integrada por la contribución de la anchura instrumental b y la del ensanchamiento “puro” β , debido al tamaño de las cristalitas de la muestra. La función de composición de estas dos magnitudes se verifica, según Scherrer, mediante una relación simplemente aditiva.

$$W = \beta + b \quad (75)$$

La extensión del ensanchamiento β , en función del tamaño de las cristalitas, viene dada por la fórmula de Scherrer:

$$\beta = \frac{K\lambda}{D_{hkl}\cos\theta} \quad (76)$$

donde D_{hkl} es la dimensión media de las cristalitas en la dirección normal a los planos (h,k,l) que difractan la radiación y K es una constante, cuyo valor depende de la forma de las cristalitas, de los índices (h,k,l) y de la magnitud adoptada para la definición de W .

Normalmente, W suele definirse como el valor de la anchura del máximo de difracción, medida en el punto medio de la vertical trazada por el pico (máxima intensidad). Teniendo en cuenta la definición dada para D_{hkl} y siendo $W_{1/2}$ la magnitud medida experimentalmente, el valor de K es aproximadamente 0.9 cuando se hace la suposición de que las partículas son esféricas. θ es el ángulo de difracción al que sale el pico de difracción y λ corresponde a la longitud de onda de la radiación $K\alpha$ del cobre. Para realizar el cálculo utilizaremos la media ponderada entre $\lambda_{\alpha_1}=1.54056\text{\AA}$ y $\lambda_{\alpha_2}=1.5443\text{\AA}$ con mayor aportación para la primera. Por tanto el valor de λ será 1.5418\AA .

Convencionalmente, todas las medidas de W se expresan en unidades 2θ y el valor de β empleado para resolver la ecuación de Scherrer ha de expresarse en radianes. La validez de la relación no es de carácter general, aunque si proporciona resultados satisfactorios para las reflexiones presentes a valores de 2θ elevados. El

problema básico del método es la determinación de β . Su valor puede deducirse a partir de las medidas experimentales de W y b . El valor de W se obtiene, midiéndolo directamente en la reflexión seleccionada de la sustancia problema. El valor de la anchura instrumental, b , se determina midiendo la anchura de un máximo de difracción, producido por una sustancia patrón, bien cristalizada y cuyos cristalitas tengan un tamaño medio comprendido entre 10000 Å (1 micra) y 100000 Å (10 micras), ya que puede admitirse que en este rango de dimensiones el valor de β es prácticamente nulo, es decir, la anchura observada del máximo de la sustancia patrón es debida exclusivamente a la contribución de la anchura instrumental: $W = b$.

Una vez restado el componente instrumental de la anchura de pico, se calcula el tamaño medio de cristalitas mediante la ecuación de Scherrer:

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (77)$$

3.4.4 Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X se basa en el efecto fotoeléctrico, descubierto por Hertz en 1887 y explicado por Einstein en 1905. Su desarrollo como una técnica analítica no llegó hasta los años 60, como resultado del trabajo de Siegbahn.

El XPS es una técnica de ultra alto vacío, de análisis cualitativo, semi-cuantitativo no destructiva. Esta técnica permite diferenciar distintos estados de oxidación y/o situaciones del entorno de los átomos en las muestras sólidas analizadas.

Para obtener los espectros, la muestra es irradiada por un haz de rayos X, lo que provoca una emisión de electrones a partir de los niveles internos de los átomos de la muestra. Los electrones emitidos son llamados fotoelectrones. Para

que la emisión de un fotoelectrón tenga lugar, los fotones deben de tener la frecuencia adecuada. A esta frecuencia ν , la energía del fotón es suficiente como para superar la función trabajo del metal ϕ . A frecuencias mayores, la energía en exceso de los fotones se convierte en energía cinética de los fotoelectrones:

$$h\nu = \phi + \frac{1}{2} m_e v^2 \quad (78)$$

donde m_e y v son la masa y la velocidad del fotoelectrón.

Al mismo tiempo que se hace incidir el haz de R-X, se mide la energía cinética y el número de electrones que escapan del material analizado. La distribución de energía cinética (E_C) de los fotoelectrones emitidos se mide empleando un analizador de energía de electrones para obtener el espectro de fotoelectrones.

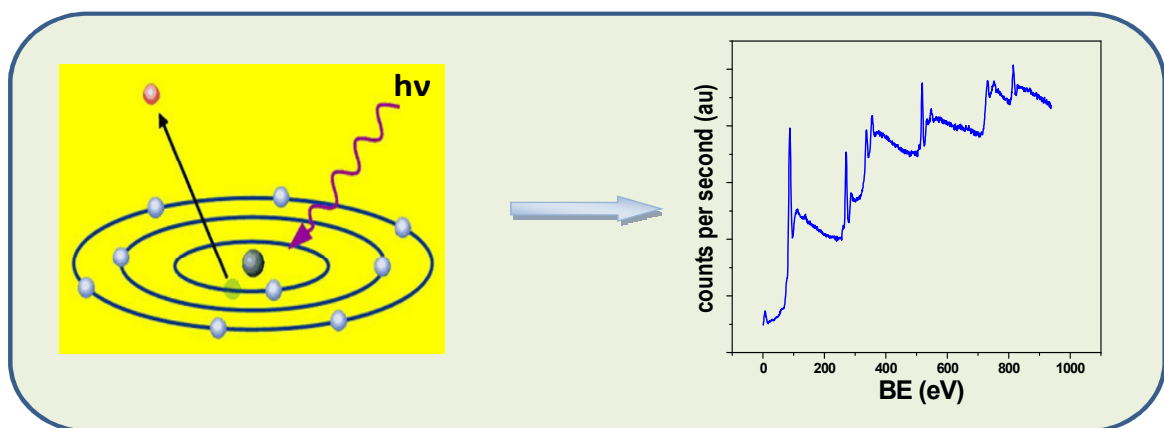


Figura 20: Fundamento de la técnica de Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS)

El proceso de fotoemisión se describe mediante la ecuación:

$$h\nu = E_B + E_C + \phi \text{ (analizador)} \quad (79)$$

donde:

- $h\nu$ es la energía de la fuente de rayos X
- E_B es la energía de enlace del electrón en el átomo
- E_C es la energía cinética del electrón detectado

- ϕ (analizador) es la función trabajo del espectrómetro. Se define como la energía mínima requerida para impulsar un electrón hacia el nivel más alto ocupado en el vacío. [$\phi(\text{analizador}) = E_{fermi} - E_{vacio}$]

Por tanto, la energía de enlace se define como:

$$E_B = h\nu - E_C - \phi(\text{analizador}) \quad (80)$$

En el espectro de fotoelectrones, cada elemento produce un conjunto característico de picos de XPS a unas energías cinéticas determinadas. Los valores de energía cinética a los que aparecen estos picos, identifican directamente todos los elementos que existen en la superficie del material que está siendo analizado. Por tanto, y debido a que no existen dos elementos que compartan el mismo conjunto de energías de ligadura electrónica, la medida de las energías cinéticas de estos electrones suministra un análisis elemental de la superficie de la muestra. Además, debido a que cualquier cambio en las energías de enlace implica un cambio en las energías cinéticas, esta técnica también nos proporciona información acerca del entorno de los átomos en cada muestra.

El XPS es una técnica de superficie, sensible exclusivamente a las primeras capas de la superficie de los sólidos. Esto es debido a que, cuando un fotón es adsorbido por la muestra, este produce la ionización y la emisión de un e^- , pero sólo los electrones que están más cerca de la superficie van a poder escapar, mientras que los electrones más interiores pierden su energía por las colisiones durante su recorrido hacia la superficie y no logran salir. Debido a esto, la sensibilidad superficial de la técnica se limita a 0.2-3nm. Esto permite obtener información sobre las propiedades químicas, físicas y electrónicas de las muestras analizadas.

Los componentes básicos de un equipo de XPS son:

- Precámara para la preparación de muestras.

- Cámara de ultra-alto vacío: en ella se analiza la muestra, y alcanza unos niveles de vacío de 10^{-6} torr. A continuación, se procede a alcanzar el ultra-alto vacío. Estas condiciones tan extremas son requeridas para evitar la adsorción de contaminantes sobre la superficie de la muestra a analizar.
- Fuente de rayos X. Las más utilizadas son las que emplean ánodos de Al o Mg.
- Sistema analizador-detector. Consta de un sistema analizador, constituido por lentes eficaces de captación de la radiación, un analizador hemisférico de energía del electrón y un sistema detector multicanal.
- Sistema de adquisición de datos. Este sistema consiste en un convertidor analógico-digital que transmite los datos recibidos al ordenador a través del cual se procesan los resultados del experimento realizado.

4 MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPOS UTILIZADOS

4 MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPOS UTILIZADOS

4.1 Reactivos y disoluciones

Activación y limpieza de electrodos

- **Ácido sulfúrico:** A partir del ácido sulfúrico concentrado comercial (98%) de Merck se prepararon disoluciones 0.5 M en agua desionizada ultrapura.

Preparación de electrodos

- **Au policristalino y rugoso:**
 - Hilo de oro: pureza del 99.99%; 1mm de diámetro.
- **Au 3DOM:**
 - *Láminas de oro:* láminas de vidrio de 1mm de espesor recubiertas de 10nm de cromo y posteriormente de 200nm de oro.
 - *Disolución electrolítica de oro:* ECF 60 Gold Plating Solution (10g/l) de Metalor. Esta disolución comercial se basa en un complejo de sulfito de oro y no contiene cianuro en su composición.
 - *Abrillantador:* E-3 Brightener de Metalor.
 - *Esferas de poliestireno* de 500 nm de Thermo Scientific.

Preparación del biosensor

- **DTSP:** Ditiobis (N-succinimidil propionato) o reactivo de Lomant (Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI)). Se preparó una disolución 4 mM en dimetil sulfóxido (DMSO) (Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI)).

- *Enzima*: Lactato Oxidasa (LOx) de *Pediococcus* species liofilizada (Número EC: 1.1.3.2) de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). A partir de las 50 unidades (≥ 20 U/mg de sólido) que contiene el envase comercial se obtuvo una disolución de 0.2U/ μ l disolviendo todo el contenido del envase en 250 μ l de tampón fosfato 0.1 M de pH=7.0. Se tomaron alícuotas de 20 μ l y se almacenaron a -30°C.
- *Sustrato enzimático*: Ácido L-(+)-láctico: sal de litio, al 97% de pureza de Aldrich Chemical Co. Se prepararon disoluciones 0.1M en tampón fosfato 0.1M a pH=7
- *Mediador*: Hidroximetilferroceno (HMF) (Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI)). Se prepararon disoluciones 1mM disolviendo la cantidad adecuada del reactivo comercial en tampón fosfato 0.1 M de pH=7.0.

Medidas de EIS

- *Disolución para las medidas de EIS*: 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ + 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ + 0.1 M KCl, en tampón fosfato 0.1 M (pH = 7).

Otros reactivos

- *Disolución reguladora de pH*: La disolución de tampón empleada fue una disolución fosfato 0.1M de pH=7 preparada a partir de los reactivos comerciales sólidos Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 (Merck).
- *Disolventes orgánicos*: DMF, DMSO, alcohol isopropílico.

Todos los reactivos generales empleados en el presente trabajo fueron reactivos para análisis y se utilizaron sin purificaciones adicionales. En la preparación de las disoluciones se utilizó agua purificada mediante el sistema Milli-Q y Milli-RO de Millipore que proporcionan agua ultrapura de conductividad $18.2 M\Omega^{-1}$.

4.2 Materiales

Electrodos

- ELECTRODOS DE TRABAJO:

Se han utilizado tres tipos diferentes de electrodos de trabajo:

- Los *electrodos de oro policristalino* se fabricaron a partir de un hilo de oro (pureza del 99.99%) de 1mm de diámetro. Para la limpieza del sustrato, el hilo se quemó con un mechero Bunsen y una vez enfriado se aclaró con agua destilada.

- Los electrodos de *oro rugoso*, al igual que en los electrodos de oro policristalino, se fabricaron a partir de un hilo de oro (pureza del 99.99%) de 1mm de diámetro. La limpieza del sustrato, se llevó a cabo igual que en los electrodos anteriores.

- Los *electrodos de oro macroporosos tridimensionales (3DOM)* se prepararon sobre soportes de oro evaporado. Estos sustratos son láminas de vidrio de 1mm de espesor, recubiertas de una fina capa de cromo de unos 10nm y posteriormente de 200nm de oro, depositados mediante deposición térmica en fase vapor (*thermal vapor deposition*). Cada lámina fue cortada cuidadosamente en piezas de aproximadamente 0.5x1 cm. Posteriormente, se limpiaron sumergiéndolas en alcohol isopropílico (IPA), en el ultrasonidos durante 90 minutos y por último, después de lavarse con agua destilada ultrapura, se secaron con nitrógeno.

En todos los electrodos, el contacto eléctrico se llevó a cabo de la misma manera. El electrodo de oro se conecta a una pinza metálica para hacer el contacto eléctrico y esta a su vez se conecta a un hilo de cobre. Para delimitar el área geométrica del electrodo y evitar que la pinza entre en contacto con la disolución, esta se cubrió con cinta de teflón.

- El **ELECTRODO AUXILIAR** utilizado fue un hilo de oro enrollado sobre sí mismo para obtener un área superficial considerablemente mayor que la del electrodo de trabajo. De este modo se evitan polarizaciones.
- El **ELECTRODO DE REFERENCIA** utilizado para todas las medidas fue un electrodo de sulfato mercurioso ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$ o ESM), cuyo potencial es de 0.647 V frente al electrodo normal de hidrógeno.

Celda electroquímica

Para realizar las medidas electroquímicas se utilizó una celda electroquímica de cinco bocas provista de doble pared, a fin de permitir la termostatación, ya que todas las medidas fueron realizadas a una temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Tres de las bocas se utilizan para introducir los electrodos de trabajo (WE), referencia (ER) y contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE). Debido a que el oxígeno es electroactivo, como etapa previa a cualquier experimento, se procedió a la desoxigenación de la disolución mediante el flujo de un gas inerte (N_2) durante veinte minutos. La entrada de nitrógeno en la célula se hace a través de una llave de doble paso; en una posición esta llave permite desoxigenar la disolución haciendo pasar una corriente de gas a través de una placa de vidrio poroso, y en la otra posición mantiene una atmósfera de N_2 , sobre dicha disolución, durante la medida. De este modo las medidas se realizan en reposo, evitando así la convección. La última boca permite la adición de sustancias a la celda.

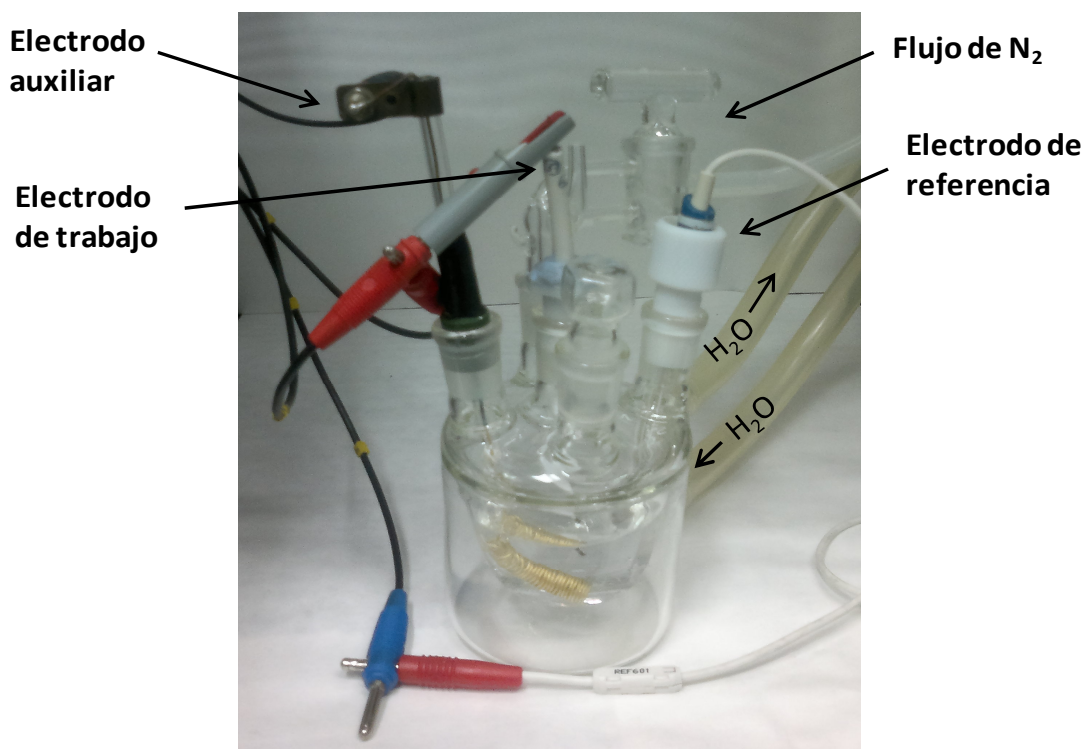


Figura 21: Celda electroquímica

4.3 Metodología

4.3.1 Caracterización superficial mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Con el objetivo de obtener información topográfica de los diferentes sustratos estudiados, se ha empleado la Microscopía de Fuerza Atómica en modo contacto intermitente. Las imágenes se tomaron al aire, y una vez obtenidas, se trataron usando ajustes con polinomios de orden cero o uno para compensar la inclinación de la muestra respecto a la punta. Esta inclinación se debe a que, al montar la muestra en el microscopio, no podemos garantizar que esta haya quedado totalmente perpendicular a la punta.

Para las medidas de AFM de los electrodos de oro policristalino y rugoso se utilizaron “cantilevers” de Si dopado con Antimonio con una constante de fuerza de 42 N/m, mientras que para las medidas de los electrodos macroporosos

(3DOM), así como, para los electrodepósitos sin patrón, los “cantilevers” empleados eran de Si_3N_4 con una constante de 0.73 N/m.

4.3.2 Procesos de inmovilización de la enzima sobre los distintos soportes

La inmovilización de la enzima sobre los distintos electrodos de oro se llevó a cabo siguiendo dos estrategias distintas: 1) sobre electrodos sin funcionalizar (inmovilización por adsorción) y 2) sobre electrodos previamente funcionalizados con un tiol bifuncional (inmovilización mediante enlace covalente).

Inmovilización por adsorción

Esta estrategia de inmovilización consiste en depositar de 10 μl de la disolución stock de enzima sobre el sustrato de oro, dejándola secar al aire. Posteriormente, el biosensor se lavó con tampón fosfato de pH=7 para eliminar los restos de enzima que puedan quedar débilmente enlazados al electrodo.

Inmovilización mediante enlace covalente

En este caso se incluye un paso previo a la deposición de la enzima, que consiste en la funcionalización del electrodo de oro mediante quimisorción del tiol DTSP. Para ello se introduce el electrodo de oro en una disolución de DTSP en DMSO (4mM) durante 3 horas^[79], para obtener una monocapa autoensamblada de tioles. Posteriormente, se depositan 10 μl de disolución stock de enzima sobre el electrodo de oro modificado y se deja secar al aire. De este modo la enzima queda anclada covalentemente al electrodo, ya que el DTSP es una molécula bifuncional, que al inmovilizarla sobre el oro a través del tiol, deja los grupos succinimida libres para formar un enlace covalente con las aminas de las lisinas libres de la enzima.

4.3.3 Análisis por espectroscopia fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)

- En primer lugar, con propósitos comparativos se analizó directamente el sólido comercial (*DTSP*).
- Tras inmovilizar el DTSP sobre un electrodo de oro evaporado, por inmersión en una disolución de DTSP/DMSO (4mM) durante 3 horas y posterior lavado con DMSO, con el propósito de eliminar el DTSP débilmente enlazado, se realizó el análisis del electrodo modificado. (*Au-DTSP lavada*).
- Se realizó el análisis de un electrodo de oro modificado de la misma forma que en el caso anterior pero se eliminó la última etapa de lavado, con el fin de obtener el espectro del DTSP adsorbido química y físicamente sobre el oro. (*Au-DTSP no lavada*).

4.3.4 Medidas electroquímicas

Todas las medidas electroquímicas en las que está presente la enzima se llevaron a cabo a 25°C en atmósfera de N₂ y en tampón fosfato a pH=7.

Las medidas de EIS se llevaron a cabo en tampón fosfato pH=7 en presencia de una concentración 10mM del par redox $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ y 0.1M de KCl. Para obtener el espectro de impedancia electroquímica se aplicó una onda sinusoidal de potencial de ± 10 mV de amplitud respecto al potencial de equilibrio del sistema redox (-0.21V vs. ESM) en un intervalo de frecuencias entre 10^5 y 10^{-3} Hz, obteniendo 15 puntos por década.

Los espectros obtenidos se analizaron mediante el ajuste de los resultados experimentales de impedancia a un circuito equivalente de Randles. Los parámetros eléctricos del circuito equivalente se calcularon con un programa de mínimos cuadrados no lineal (NLLS), utilizando el programa Z-plot/Z-view.

El criterio utilizado para estimar la calidad de los ajustes fue evaluar el valor de chi-cuadrado (χ^2) teniendo en cuenta los porcentajes de los errores de cálculo estimativo para cada uno de los componentes del circuito.

4.4 Equipos

4.4.1 Microscopio de fuerza atómica (AFM)

Para las medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) se utilizaron dos equipos diferentes.

Para los electrodos de oro policristalino y oro rugoso se utilizó un Nanoscope IIIa Multimode de Veeco. Las medidas se llevaron a cabo con cantilevers de Si dopados con Antimonio también de Veeco (Modelo TESP-SS; 2 nm < r < 5 nm; constante de fuerza: 42 N/m).

Para los electrodos de oro macroporoso (3DOM) y para los electrodeósitos de oro sin patrón, se utilizó un sistema JPK NanoWizard II. Las medidas se llevaron a cabo empleando “cantilevers” de Si_3N_4 de Olympus (Modelo OCML-RC800PSA; 71 kHz; constante de fuerza: 0.73 N/m).

4.4.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Para obtener imágenes de la topografía superficial de los distintos electrodos nanoestructurados preparados, se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL30 acoplado a un analizador de energía dispersiva de rayos-X (EDX DE4i) con cátodo de emisión de campo (*field emission gun* o FEG).

4.4.3 Difractómetro de Rayos-X (DRX)

Para realizar las medidas de difracción, se empleó un Difractómetro de 2 círculos independientes modelo SIEMENS D5000. La adquisición y el tratamiento de los picos del difractograma obtenido, se realizó con el software DIFRACCT-AT V3.00 y el programa Profile Fitting. Para determinar la composición de las muestras y proceder a su identificación, se utilizó la base de datos PDF 2000 (JCPDS-ICDD). La medida de la anchura a media altura de cada uno de los picos del difractograma, para la determinación del tamaño de cristalita, se realizó con el mismo programa (Profile Fitting). El difractómetro trabaja con la longitud de onda del cobre que es 1.5406 nm y el detector empleado fue el de centelleo.

4.4.4 Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Los análisis de XPS se realizaron con un espectrómetro VG Escalab 200R equipado con analizador hemisférico de electrones y una fuente de rayos-X MgK α ($h\nu = 1254.6$ eV, 1 eV = 1.6302×10^{-19} J), alimentada a 120W. La energía cinética de los fotoelectrones se midió con el analizador hemisférico de electrones trabajando en el modo de paso constante de energía (20 eV). La presión de fondo, en la cámara de análisis, se mantiene por debajo de 2×10^{-8} mbar durante la adquisición de datos. Los espectros de XPS se adquirieron con incrementos de 0,1 eV y tiempos de permanencia de 50 ms. Las energías de ligadura fueron calibradas respecto a la del pico C1s a 284,9 eV. Se obtuvieron espectros de alta resolución que fueron ajustados mediante el software "XPS peak". Los resultados fueron utilizados sin suavizado previo y para los ajustes se emplearon funciones producto de Gaussiana-Lorentziana simétricas. Las relaciones atómicas se calcularon a partir del cociente de intensidades experimentales y se normalizaron por los factores de sensibilidad atómica^[170].

4.4.5 Potenciostato – Galvanostato

Para llevar a cabo las medidas electroquímicas se utilizó un analizador electroquímico Autolab PGSTAT30 de EcoChemie con los software GPES 4.9, FRA 4.9 y Nova 1.8.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 TRANSDUCTOR DE ORO POLICRISTALINO

En primer lugar y con propósitos comparativos, se desarrolló y caracterizó un biosensor enzimático de lactato construido sobre un soporte de oro policristalino.

Los soportes de oro policristalino han sido ampliamente utilizados como transductores electroquímicos en el desarrollo de biosensores^[79, 171, 172]. Sin embargo, cada vez es más necesario desarrollar nuevos transductores que mejoren ciertas propiedades del sensor, como la sensibilidad, estabilidad, límite de detección, etc.

Actualmente el principal problema de los dispositivos que implican el empleo de enzimas, es que sus cortos tiempos de vida limitan su aplicabilidad, especialmente cuando tienen que ser inmovilizadas sobre un soporte. La mejora en la estabilidad de la enzima tras su inmovilización puede permitir una aplicación más práctica de todos estos dispositivos. Con este objetivo, entre otros, en los siguientes capítulos se fabricarán electrodos de oro con morfología nanoestructurada con el fin de favorecer la estabilidad de la actividad enzimática y de mejorar las propiedades de los biosensores desarrollados gracias a las propiedades únicas de los materiales a escala nanométrica.

Por tanto, los resultados obtenidos con el oro policristalino se utilizarán para realizar estudios comparativos del papel que juegan los nanomateriales desarrollados en los siguiente capítulos (Au rugoso y el Au 3DOM) en el desarrollo de biosensores enzimáticos.

5.1.1 Cálculo del área real del electrodo de oro.

Después de construir el electrodo de oro policristalino como se ha expuesto en el apartado “*Materiales y Métodos*”, este se activa electroquímicamente, en ausencia de oxígeno, mediante voltametría cíclica entre los límites de estabilidad del agua (-0.65V y 1.1V (vs.ESM)) a $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ con el fin de obtener un voltamograma estable y reproducible, característico del oro limpio.

Una vez activado el electrodo, se procedió al cálculo del área real así como a su caracterización superficial.

El oro es el más noble de los metales y tiene la propiedad de que comienza a adsorber oxígeno a potenciales más anódicos que otros metales. Por ello hay un amplio intervalo de potencial donde la única corriente que existe es debida a la carga de la doble capa. El área superficial electroactiva del electrodo de oro se puede determinar a partir del voltamograma cíclico obtenido para el electrodo de oro en H_2SO_4 0.5M, entre los límites de potencial correspondientes a la estabilidad del agua.

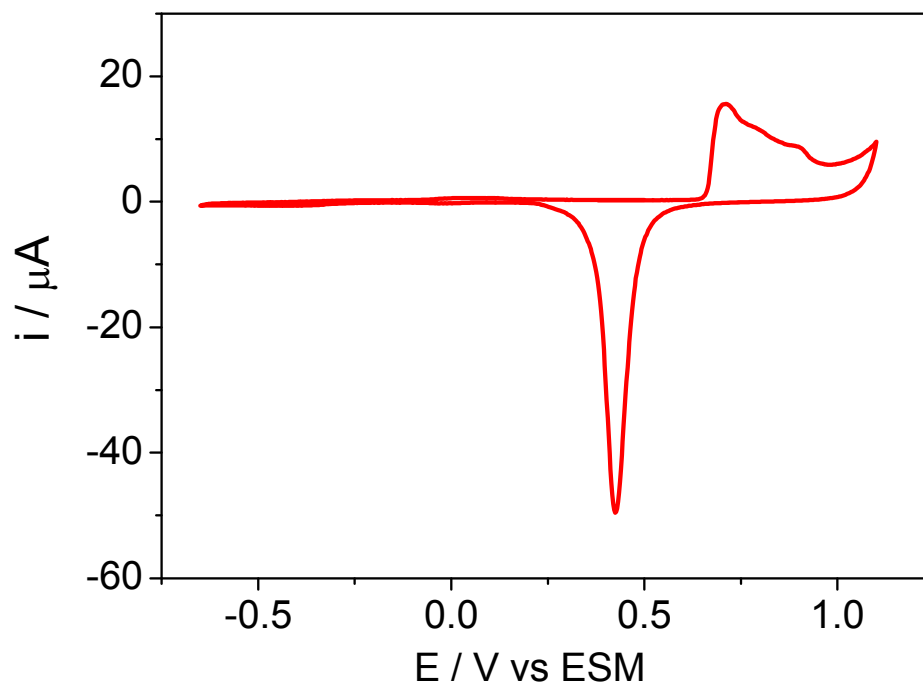


Figura 22: Voltamograma cíclico del electrodo de Au policristalino en 0.5 M H_2SO_4 registrado a $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

La densidad atómica de cada uno de las posibles orientaciones cristalográficas del oro son: $1.2 \cdot 10^{15} \text{atm} \cdot \text{cm}^{-2}$ para el plano [100], $1.39 \cdot 10^{15} \text{atm} \cdot \text{cm}^{-2}$ para el [111] y $0.85 \cdot 10^{15} \text{atm} \cdot \text{cm}^{-2}$ para el [110]. Si se considera que la contribución de cada uno de los planos al policristal es del 33%, la densidad media será $1.15 \cdot 10^{15} \text{atm} \cdot \text{cm}^{-2}$. Teniendo en cuenta que en medio ácido se forma una monocapa de AuO y la transferencia electrónica es de $2e^-$, es posible calcular el área real, una vez eliminada la contribución de la doble capa, utilizando el factor de conversión de $366 \mu\text{C}/\text{cm}^2$.

Este factor de conversión se obtiene teniendo en cuenta la densidad atómica del oro policristalino, el número de electrones transferidos por átomo de oro así como la carga de cada uno de ellos:

Este factor de conversión proviene de:

$$1.15 \cdot 10^{15} \frac{\text{átomo Au}}{\text{cm}^2} \cdot 2 \frac{e^-}{\text{átomo Au}} \cdot 1.6 \cdot 10^{-19} \frac{\text{C}}{e^-} = 366 \mu\text{C}/\text{cm}^2$$

Por tanto, midiendo el área del pico voltamétrico registrado durante el barrido catódico, correspondiente a la reducción de los óxidos de oro, se puede calcular la carga transferida durante el proceso, y con ella el área real del electrodo de trabajo^[173].

El área real de un electrodo puede ser varias veces mayor que el área geométrica y el cociente entre ambas se denomina factor de rugosidad. El factor de rugosidad media para los electrodos de oro policristalino (Au_p) utilizados fue de $R=1.5$.

5.1.2 Caracterización superficial

La morfología de la superficie del Au_p fue observada mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) y la orientación preferencial y el tamaño medio de la cristalita se determinó mediante difracción de rayos-X (DRX).

5.1.2.1 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La Figura 23 muestra la imagen de AFM ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$) de la estructura superficial de un oro policristalino cuya rugosidad es $R=1.5$.

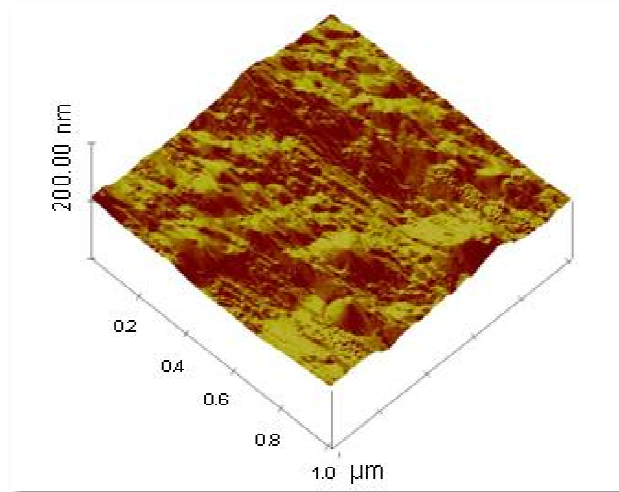


Figura 23: Imagen AFM en modo contacto intermitente $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ de un electrodo de oro policristalino $R=1.5$

El análisis topográfico (Figura 24) revela que la altura media es aproximadamente de 30nm, siendo la distribución de alturas una “gausiana”, cuyos valores máximos pueden alcanzar una altura de 60nm.

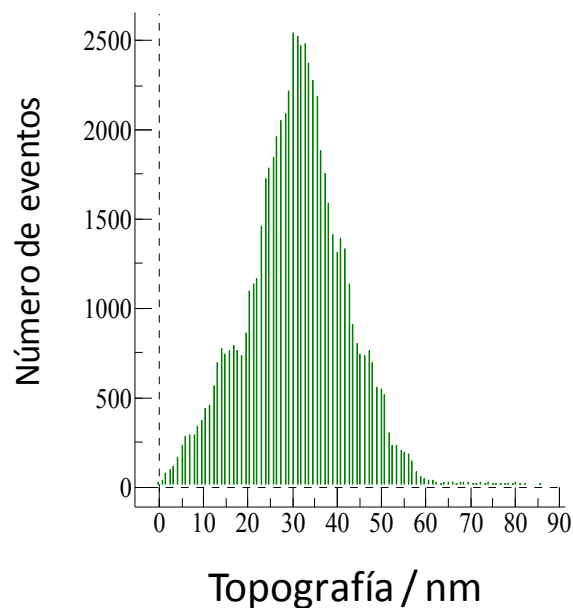


Figura 24: Análisis topográfico para una muestra de oro policristalino ($R=1.5$).

5.1.2.2 Difracción de Rayos-X (DRX)

Para la caracterización por difracción de rayos-X hay que tener en cuenta que el oro cristaliza en el sistema cubico centrado en las caras, cuyos parámetros de red son $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ y $a=b=c=4.0786$, siendo los principales planos cristalográficos el (111), (100) y el (110).

Los difractogramas de Rayos-X se registraron entre 30° y 100° , con ángulo de incidencia rasante para tratar de minimizar, en la medida de lo posible, la contribución del substrato. La Figura 25 muestra el difractograma obtenido para el oro policristalino, donde el pico de difracción de rayos-X de mayor intensidad corresponde a la orientación (111).

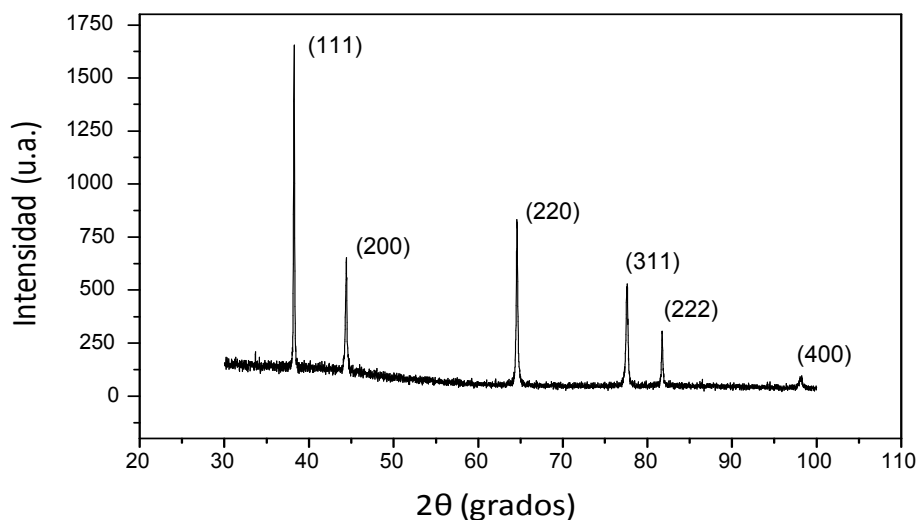


Figura 25: Difractograma de Rayos-X correspondiente a un electrodo de oro policristalino ($R=1.5$).

El cálculo del tamaño medio de cristalita se realizó a partir del valor de la anchura observada en el máximo de difracción ($W_{1/2}$), medida en el punto medio de la vertical trazada por el pico (máxima intensidad), para cada uno de los picos del espectro de Rayos-X. $W_{1/2}$ está formada por la contribución de la anchura instrumental b y la del ensanchamiento “puro” β , debida al tamaño de cristalita de la muestra.

$$W_{1/2} = \beta + b$$

Todas las medidas de $W_{1/2}$ se expresan en unidades 2θ y el valor de β usado para aplicar la ecuación de Scherrer^[168], se expresa en radianes. Por tanto:

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \cdot \frac{360}{2\pi}$$

siendo

- $K = 0.9$
- D_{hkl} es la dimensión media de los cristalitos en la dirección normal de los planos que difractan la radiación.
- θ es el ángulo de difracción de Bragg al que aparece el pico de difracción.
- λ corresponde a la longitud de onda de la radiación K_{α} del cobre. Para realizar el cálculo utilizaremos la media ponderada entre $\lambda_{\alpha_1}=1.54056\text{Å}$ y $\lambda_{\alpha_2}= 1.5443\text{Å}$ con mayor aportación para la primera. Por tanto, el valor de λ será 1.5418Å .

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I:

Tabla I

Resultados obtenidos a partir del difractograma de rayos X para un electrodo de oro policristalino y cálculo del tamaño medio de cristalita.

Orientación	2θ	θ	$\cos \theta$	$\beta = W_{1/2} - b$	$D_{hkl} (\text{Å})$
(111)	38.24	19.12	0.945	0.0844	996.82
(200)	44.43	22.21	0.926	0.1358	632.24
(220)	64.60	32.30	0.845	0.1735	542.29
(311)	77.59	38.79	0.779	0.1289	791.78
					$\bar{D}_{hkl} = 740\text{Å}$

El tamaño de cristalita para el oro policristalino, se calculó a partir del valor medio de los tamaños obtenidos para los picos de difracción de mayor intensidad del difractograma, obteniéndose un tamaño medio de 740Å . Este tamaño de cristalita es mucho mayor que el obtenido para el oro electrodepositado, ya sea a potencial

constante (Au_{3DOM})^[174, 175] o mediante pulsos de potencial repetitivos (RSWPP) (Au_R)^[28] crecidos ambos a volumen constante.

5.1.3 Estudio de la adsorción de DTSP sobre oro

5.1.3.1 Por espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Como primera etapa en la construcción del biosensor, una vez activado el electrodo de oro policristalino se modifico con una monocapa de ditiobis(N-succinimidil propionato) (DTSP), también conocido como reactivo de Lomant según los procedimientos descritos en materiales y métodos. Este compuesto bifuncional permitió la inmovilización de la enzima lactato oxidasa. El DTSP contiene un grupo tiol, a través del cual puede adsorberse sobre el transductor de oro, así como grupos succinimida que permiten formar enlaces covalentes con las lisinas de la enzima (Figura 26).

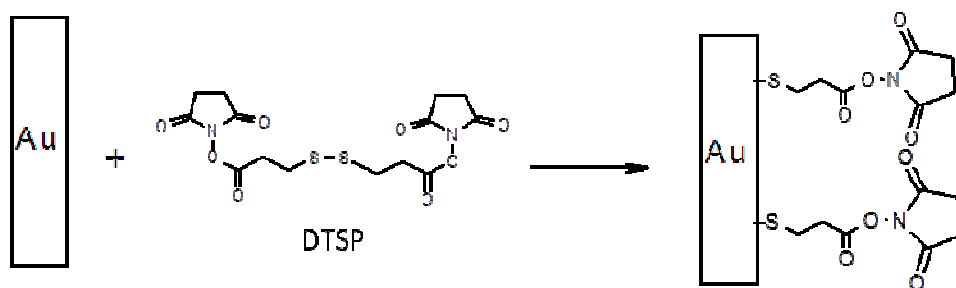


Figura 26: Proceso de adsorción de DTSP sobre Au.

Con el fin de analizar el tipo de enlace que se forma entre el grupo tiol y la superficie de oro, las moléculas de DTSP adsorbidas sobre dicha superficie se analizaron por espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS). Los espectros de XPS para Au4f, S2p, y N1s se muestran en la Figura 27 y las energías de ligadura de los niveles internos de las tres muestras en estudio en la Tabla II.

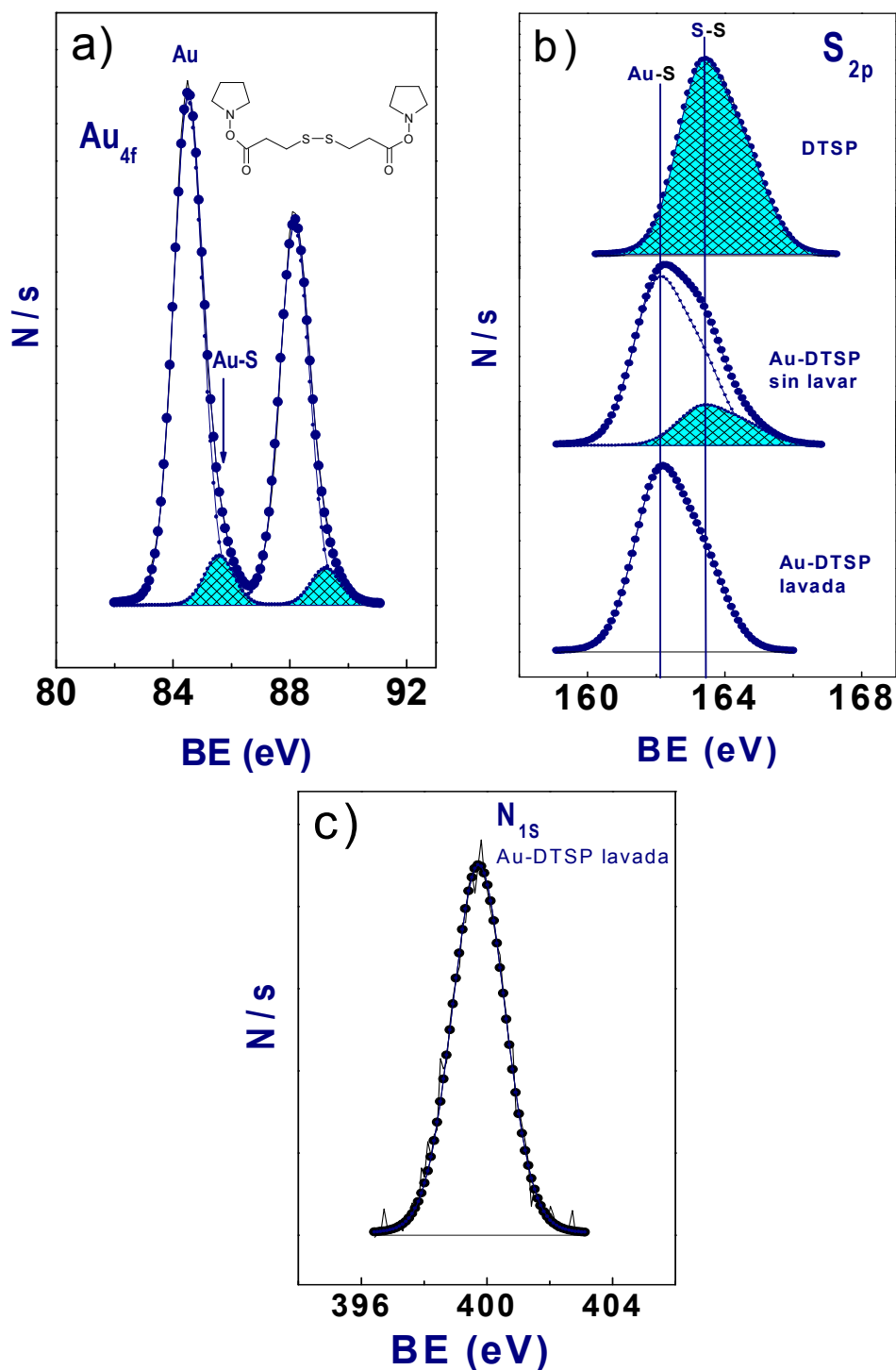


Figura 27: Espectro fotoelectrónico de rayos X: (a) Au 4f; (b) S 2p; y (c) N 1s.

El espectro correspondiente a Au4f (Figura 27(a)) muestra la separación spin-orbita $Au4f_{7/2}-Au4f_{5/2}$ característica cuya separación pico–pico es de 3.19 eV. Debido a que cada pico del doblete muestra una cola a valores de energía de ligadura más altos, el perfil se resolvió en dos componentes. El valor de energía de

ligadura para la componente mayoritaria del pico correspondiente a $Au4f_{7/2}$ aparece a 84.5 eV. Dicho valor es el esperado, según la bibliografía, para el oro en estado de oxidación cero^[176-178]. La energía de enlace para la componente minoritaria, que representa sólo el 9% del área total, aparece a 85.5 eV, característica de átomos de oro que están formando enlaces $Au-S$ ^[176]. Por tanto, los átomos de oro se encuentran en estados químicos distintos: átomos de oro sin modificar en estado metálico y átomos de oro oxidados.

Es necesario reseñar que, debido a que el camino libre medio del fotoelectrón en el oro es aproximadamente 2nm, la componente mayoritaria del pico $Au4f$ incluirá, los átomos de oro sin enlazar con el azufre, localizados en la superficie, así como los átomos de oro que se encuentran a mayor profundidad. Esta limitación de la técnica implica que la mayor parte de la señal va a corresponder a átomos de oro que no interaccionan con la monocapa, enmascarando en gran medida la contribución de átomos de oro en un estado de oxidación diferente.

La información acerca de la naturaleza de las especies de azufre adsorbidas sobre oro puede obtenerse a través del análisis detallado del perfil correspondiente al $S2p$ (Figura 27(b)). El pico del $S2p$ de la muestra de oro con DTSP inmovilizado pero sin lavar (*Au-DTSP no lavada*), aparece ligeramente asimétrico, ya que el espectro se registró en condiciones de alta resolución y la separación spin-órbita del nivel $S2p$ fue solamente de 1.2eV. Por tanto, el pico $S2p$ se deconvolucionó en dos componentes que están separadas 1.2eV y cuya proporción de intensidades ($2p_{1/2} : 2p_{3/2}$) es 1:2. La componente más intensa ($S2p_{3/2}$) aparece a 162.1 eV, valor que, de acuerdo a la bibliografía se asigna al azufre enlazado al oro ($S-Au$)^[177]. La componente menos intensa tiene una energía de ligadura de 163.2 eV, pudiendo asignarse a átomos de azufre formando disulfuros (R-S-S-R).

Con propósitos comparativos se registró el espectro de una muestra del sólido comercial (DTSP), obteniéndose un solo pico para el $S2p_{3/2}$ a una energía de ligadura de 163.2eV, el cual corresponde al grupo disulfuro presente en la molécula de DTSP.

Por tanto, en la muestra (*Au-DTSP no lavada*), la componente con mayor energía de ligadura (163.2) estaría asociada al DTSP débilmente adsorbido sobre la superficie del oro (enlace S-S), y la componente de menor energía de ligadura (162.1eV) correspondería al enlace azufre-oro (S-Au) del DTSP quimisorbido.

En la muestra de oro modificado con DTSP y lavada (*Au-DTSP lavada*), sólo aparece una componente a 162.1 eV que corresponde al enlace S-Au. Por tanto, podemos concluir que después del proceso de lavado, no quedan moléculas presentes de DTSP adsorbido sobre la superficie del oro. Tan sólo permanecerán las moléculas de DTSP que han reaccionado con el oro rompiendo el enlace S-S y formando enlaces S-Au (Figura 26).

En el espectro correspondiente al N1s (Figura 27(c)) aparece una señal centrada a 399.7 eV, que según la bibliografía se puede asignar al enlace N-O^[179]. Por tanto, este pico se puede asignar al átomo de nitrógeno presente en el grupo succinimida de la molécula de DTSP.

Por último, el valor de 531.9 eV (Tabla II), corresponde al O1s cuando forma el doble enlace carbono-oxígeno del grupo carbonilo (C=O) presente igualmente en el ditiobis(N-succinimidil propionato) (DTSP).

Tabla II

Energías de ligadura (eV) y % atómico de los espectros de alta resolución de XPS para el DTSP adsorbido sobre Au.

Muestra	Elemento	Energía de ligadura (eV)	% atómico
<i>DTSP referencia</i>	N1s	401.3	-
	O1s	531.9	-
	S2p	163.2	-
	Au4f _{7/2}	-	-
<i>Au-DTSP no lavada</i>	N1s	399.5 401.2	-
	O1s	531.8	-
	S2p	162.1 163.2	-
	Au4f _{7/2}	84.5 85.5	90 10
<i>Au-DTSP lavada</i>	N1s	399.7	-
	O1s	531.8	-
	S2p	162.1	-
	Au4f _{7/2}	84.5 85.5	91 9

5.1.4 Caracterización electroquímica del biosensor por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

5.1.4.1 Variación del recubrimiento de DTSP con el tiempo de adsorción

Con el fin de encontrar las condiciones experimentales óptimas para obtener un recubrimiento máximo de DTSP sobre la superficie del electrodo de oro policristalino, se realizó un estudio por impedancia electroquímica utilizando electrodos modificados con DTSP (Au_p-DTSP) a distintos tiempos de inmovilización. Cada electrodo se sumergió en una disolución 4mM DTSP en DMSO a temperatura ambiente, variando el tiempo de inmersión desde algunos minutos hasta 24 horas.

Posteriormente, se llevaron a cabo las medidas de impedancia en una disolución 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Los diagramas de Nyquist para el electrodo Au_p -DTSP, a diferentes tiempos de inmovilización, se muestran en la Figura 28.

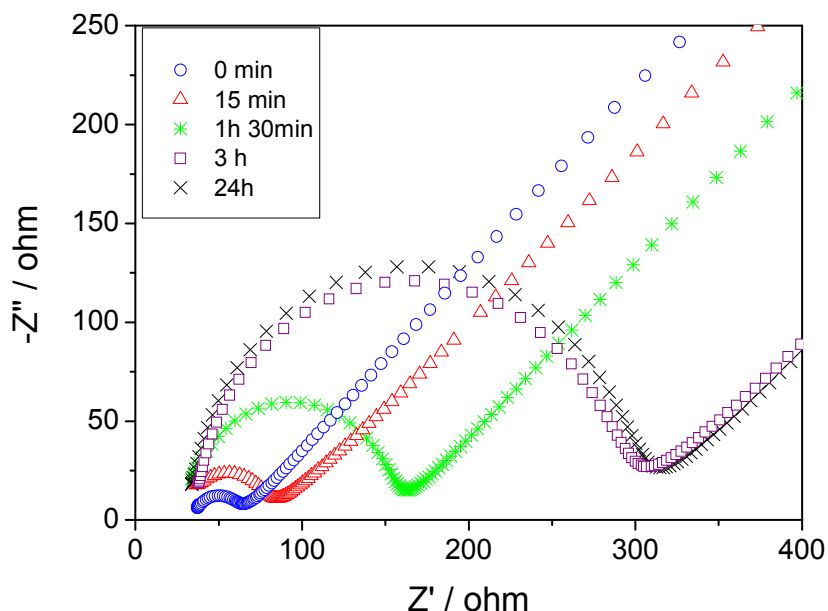


Figura 28: Diagrama de Nyquist para el DTSP inmovilizado sobre oro policristalino a distintos tiempos de inmersión: 0 minutos (O), 15 minutos (Δ), 1.5 horas (*), 3 horas (\square), 24 horas (\times)

El diagrama de Nyquist (parte imaginaria Z'' vs. parte real Z') muestra dos intervalos de frecuencia correspondientes a un control cinético y a un control difusional. La intersección, con el eje real, a altas frecuencias (alrededor de 10^5 Hz) corresponde a la resistencia del electrolito (R_e). Para frecuencias entre 10^5 Hz y 10 Hz, se puede calcular la resistencia correspondiente al proceso de transferencia de carga de los iones ferro/ferri sobre el electrodo de oro modificado con el tiol, a partir del radio del semicírculo ($R_{TC}/2$). La parte lineal, que aparece en la zona de bajas frecuencias, corresponde al proceso más lento como es la difusión de dichos iones a través de la monocapa tiolada.

El valor de la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) se puede relacionar con el recubrimiento de DTSP asumiendo que la reacción de

transferencia electrónica ocurre solamente en los huecos donde no existe recubrimiento del tiol y suponiendo que la difusión en estos sitios es plana.

Si esta suposición es correcta, es posible establecer una ecuación para el cálculo del recubrimiento superficial del electrodo en base a la resistencia a la transferencia de carga del electrodo sin recubrir ($\theta_{DTSP} = 0$)^[180, 181]:

$$\theta_{DTSP} = 1 - \frac{R_{TC}^0}{R_{TC}^{DTSP}} \quad (81)$$

donde, R_{TC}^0 es la resistencia a la transferencia de carga del electrodo de oro sin recubrir, y R_{TC}^{DTSP} la resistencia correspondiente al electrodo recubierto con DTSP a diferentes tiempos de adsorción. Los valores del recubrimiento con DTSP obtenidos aplicando la ecuación (81) se muestran en la Tabla III. Se puede comprobar cómo para un tiempo de inmovilización de 24 horas se ha alcanzado el recubrimiento máximo, con un valor próximo al recubrimiento total. Sin embargo, la diferencia de recubrimiento entre 3 y 24 horas es pequeño, por lo que, con el fin de ahorrar tiempo en la construcción del biosensor y además minimizar la desactivación del grupo succinimida, se eligieron 3 horas de incubación como tiempo óptimo para la adsorción del DTSP sobre Au policristalino.

Tabla III

Recubrimiento de DTSP sobre oro policristalino a distintos tiempos de inmovilización obtenidos mediante EIS.

Tiempo	$R_{TC} (\Omega \cdot \text{cm}^2)$	$C (\text{F} \cdot \text{cm}^{-2})$	$K_{app} (\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$	θ
0 m in	2.01	$1.15 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$	0.00
15 min	6.12	$1.53 \cdot 10^{-5}$	$4.34 \cdot 10^{-5}$	0.67
1.5 h	15.43	$5.49 \cdot 10^{-6}$	$1.72 \cdot 10^{-5}$	0.87
3 h	29.97	$5.34 \cdot 10^{-6}$	$8.87 \cdot 10^{-6}$	0.93
24 h	37.06	$8.47 \cdot 10^{-6}$	$7.18 \cdot 10^{-6}$	0.95

Como puede verse en el diagrama de Nyquist y en los resultados extraídos en la tabla, los valores de R_{TC} para electrodos modificados con DTSP son más altos que para el oro sin modificar. El aumento en la impedancia demuestra que las moléculas de DTSP adsorbidas impiden la transferencia electrónica entre los iones ferro/ferricianuro y la superficie del electrodo.

Los valores de capacidad pueden calcularse a partir del valor de la frecuencia (ω_{max}) para la cual el semicírculo dibuja un máximo en el eje imaginario:

$$C = \frac{1}{\omega_{max} R_{TC}} \quad (82)$$

siendo

$$\omega_{max} = 2\pi f_{max}$$

La disminución observada para los valores de capacidad correspondientes a la interfase formada entre la superficie de oro y el tiol, se debe a un aumento del recubrimiento superficial por DTSP con el tiempo de adsorción (Tabla III).

Puesto que la amplitud de la perturbación sinusoidal aplicada es pequeña (± 10 mV), es posible aplicar la ecuación $i-\eta$ linealizada, para obtener la constante cinética de la transferencia de carga. La aproximación a campo bajo de la ecuación de Butler-Volmer da lugar a:

$$i = i_0 \left(\frac{nF}{RT} \eta \right) \quad (83)$$

donde i_0 es la densidad de corriente de intercambio en el equilibrio y η la sobretensión de activación. La relación η/i tiene las dimensiones de una resistencia, resistencia a la transferencia de carga, R_{TC} :

$$R_{TC} = \frac{RT}{nF i_0} \quad (84)$$

donde la densidad de corriente de intercambio (i_0) viene dada por:

$$i_0 = nFk_{app}C \rightarrow k_{app} = \frac{i_0}{nFC} \quad (85)$$

siendo k_{app} la constante de velocidad de transferencia electrónica del par redox ferro/ferricianuro sobre los huecos que deja libre el DTSP durante el autoensamblado de la monocapa de tior; C es la concentración del par redox en el seno de la disolución; n es el número de electrones implicados en la reacción que tiene lugar sobre el electrodo ($n=1$); R es la constante universal de los gases ideales; T es la temperatura absoluta en °K (298°K) y F la constante de Faraday.

A partir de la ecuación que define el recubrimiento:

$$\theta = 1 - \frac{R_{TC}^0}{R_{TC}^X}$$

se puede obtener la relación entre la constante de velocidad y el recubrimiento superficial:

$$\theta = 1 - \frac{\frac{RT}{n^2F^2kC}}{\frac{RT}{n^2F^2k_{app}C}} = 1 - \frac{k_{app}}{k} \quad (86)$$

$$k_{app} = k(1 - \theta) \quad (87)$$

donde k_{app} y K son las constantes de velocidad de transferencia electrónica para el electrodo de oro modificado y sin modificar con el tior^[182]. El valor de K_{app} para la sonda redox sobre el electrodo de oro varía de $1.32 \cdot 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, para el electrodo sin recubrir a tiempo cero, hasta $7.18 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ para el electrodo modificado con DTSP, cuando el recubrimiento alcanza el valor máximo de 0.95 (Tabla III). Esto se debe a que en presencia de la monocapa se modifica la constante de velocidad aparente de la transferencia de carga. El valor de la constante disminuye a medida que aumenta el recubrimiento. Esto es debido al impedimento estérico provocado por las moléculas de DTSP adsorbidas.

5.1.4.2 *Construcción del biosensor*

Como ya se mencionó en el apartado de materiales y métodos, para la construcción del biosensor, la enzima se inmovilizó covalentemente sobre un transductor de oro policristalino, previamente modificado con el tiol bifuncional DTSP.

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es un método efectivo y no invasivo para analizar las propiedades interfaciales de los electrodos modificados, pudiendo monitorizar cada uno de los pasos de la construcción del biosensor. Por ello, se realizaron experimentos de EIS con electrodos modificados según las distintas etapas llevadas a cabo para la construcción del biosensor. Es decir, electrodo de oro sin modificar (Au_p), modificado con DTSP (Au_p -DTSP) y modificado con DTSP y la enzima lactato oxidasa (Au_p -DTSP-LOx).

La Figura 29 muestra la evolución del modulo de impedancia y el desplazamiento del ángulo de fase con la frecuencia (Diagrama de Bode) para los distintos electrodos. En la región de alta frecuencia (10^5 - 10^4 Hz) el modulo de impedancia forma un plató, con $\phi=0$, cuyo valor corresponde a la resistencia del electrolito (R_e) en cada caso. La resistencia del electrolito aumenta desde un valor de 35.67Ω para el Au hasta 40.40Ω para el electrodo modificado con DTSP y la enzima (Au_p -DTSP-LOx) (Tabla IV). Este resultado podría parecer erróneo, ya que la resistencia del electrolito no debería cambiar. Sin embargo, algunos autores^[142] definen la R_e como una combinación de la resistencia del electrolito entre los electrodos de referencia y de trabajo y alguna contribución del *film* existente sobre el electrodo de trabajo. Por tanto dicho incremento en R_e estaría justificado.

A frecuencias decrecientes los tres sistemas muestran dos pendientes (dos constantes de tiempo τ_{TC} , τ_W) con ϕ_{MAX} en el ángulo de fase, asociadas con un proceso cinético (altas frecuencias) y a un proceso difusivo (bajas frecuencias) (Figura 29).

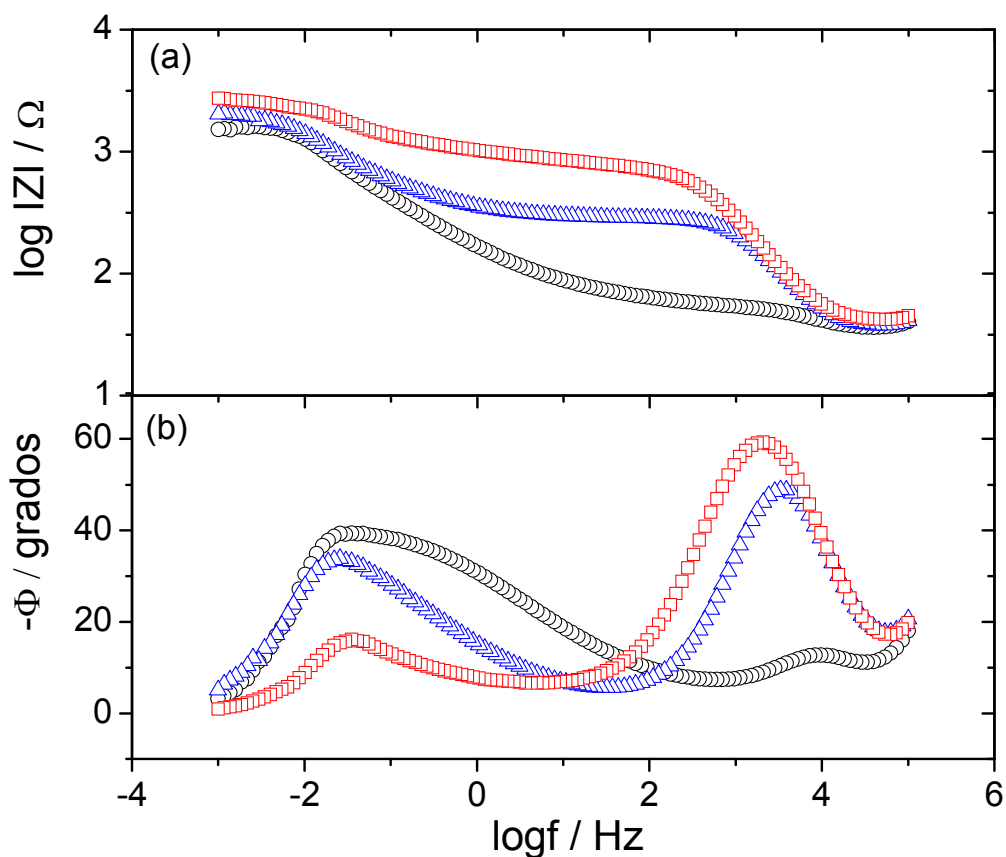


Figura 29: Diagrama de Bode para Au_p (o), Au_p -DTSP (Δ) y Au_p -DTSP-LOx (\square) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ + 10mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$. (a) Módulo de impedancia vs. log(frecuencia); (b) ángulo de fase vs. log(frecuencia).

En el intervalo de frecuencia 10^4 – 10^3 Hz, la pendiente de aproximadamente -0.67 puede ser atribuida a un capacitor en paralelo con una resistencia debido a la transferencia de carga (R_{TC}) a través de la interfase electrolito/DTSP- Au_p , adquiriendo el ángulo de fase un valor de -48.92° característico de un proceso reversible. Para la interfase electrolito/LOx-DTSP- Au_p , los valores de la pendiente (-0.79) y del ϕ_{MAX} (-59.28°) aumentan, indicando un carácter mas capacitivo después de inmovilizar la enzima. En concordancia con estos resultados, los valores de la capacidad (C_1), calculados a partir del valor de la frecuencia ω_{max} , muestran una disminución para el Au modificado con DTSP así como para el biosensor completo. En el intervalo de frecuencias 10^2 -1 Hz el valor de la impedancia nos da el valor de $R_{TC}+R_e$, observándose en el diagrama de Bode del ángulo de fase un valor mínimo a 10Hz. Es importante mencionar que los

intervalos de frecuencia dados son aproximados, ya que dependiendo del estadio de fabricación del biosensor, los intervalos de frecuencia en los que aparece cada proceso varían tal y como puede observarse en la Figura 29.

En el intervalo de frecuencia más bajo (10^{-2} - 10^{-3} Hz), el ángulo de fase es cercano a 0° , correspondiendo a un plató en el modulo de impedancia frente a la frecuencia. A partir de este valor constante se obtiene la resistencia total del circuito ($Z_{WR} + R_{TC} + R_e$) (Tabla IV).

La Figura 30 muestra el diagrama de Nyquist para el transductor sin modificar (Au_p), funcionalizado (Au_p -DTSP) y el biosensor completo (Au_p -DTSP-LOx). El semicírculo a altas frecuencias ($10^5 - 10^3$ Hz), corresponde al proceso cinético de la transferencia de carga a través de cada interfase en estudio, observándose el siguiente orden en los valores de la impedancia: $R_{TC} (Au_p) < R_{TC} (Au_p$ -DTSP) $< R_{TC} (Au_p$ -DTSP-LOx). La intersección con el eje real a altas frecuencias ($0.5 \cdot 10^5$ Hz), corresponde a la resistencia del electrolito (R_e) (Tabla IV).

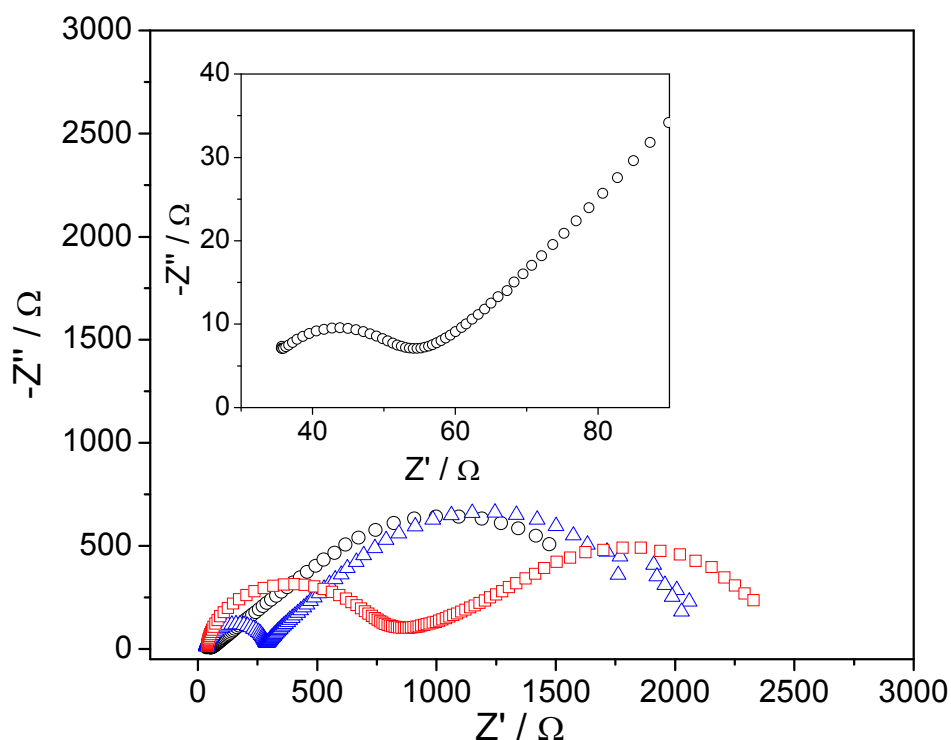


Figura 30: Diagramas Nyquist para Au policristalino (o) Au_p -DTSP (Δ) Au_p -DTSP-LOx (\square) en 0.1M KCl/0.1M tampón fosfato (pH=7) conteniendo 10mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ + 10mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$. Inset: Magnificación del diagrama de Nyquist para el Au policristalino.

A bajas frecuencias la parte lineal, debida a un proceso difusivo, tiene una particularidad para el electrodo modificado con DTSP ($\text{Au}_p\text{-DTSP}$) y con la enzima ($\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$). En estos dos casos, a muy bajas frecuencias, aparece un segundo semicírculo donde Z' se aproxima a la impedancia de Warburg (Z_{WR}) y Z'' tiende a cero. Este comportamiento es característico de un proceso de difusión a través de una capa de difusión de longitud finita. En nuestro caso se debería a la difusión de los iones ferro/ferri a través de los poros o canales generados por la inmovilización de la monocapa autoensamblada del DTSP sobre el Au_p , así como a través de la estructura molecular de la enzima. Los resultados muestran que la resistencia de Warburg aumenta en cada uno de los pasos seguidos para la construcción del biosensor (Tabla IV).

Con el fin de obtener el valor de la constante de velocidad de transferencia electrónica para el par redox ferro/ferricianuro (k^0) nos basamos en la relación lineal existente entre la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) y la densidad de corriente de intercambio en el equilibrio (i_0) para campo bajo:

$$R_{\text{TC}} = \frac{RT}{nFi_0} \quad (88)$$

$$i_0 = nFk^0C \quad (89)$$

Combinando las ecuaciones (88) y (89) llegamos a la siguiente expresión para k^0 :

$$k^0 = \frac{RT}{(n^2F^2R_{\text{TC}}C)} \quad (90)$$

Los valores de k^0 disminuyen un orden de magnitud en cada paso de la construcción del biosensor, debido al impedimento a la transferencia de carga generado por la SAM y por la enzima inmovilizada. El valor de k^0 para el oro sin modificar es de $1.34 \cdot 10^{-4} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, alcanzando para el biosensor completo ($\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$) el valor de $3.47 \cdot 10^{-6} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tabla IV).

Los diagramas de impedancia se ajustaron con el circuito equivalente de Randles (Figura 31):

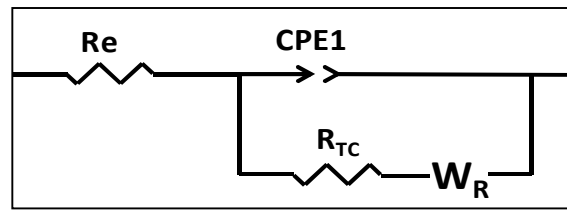


Figura 31: Circuito eléctrico equivalente

Este circuito incluye los siguientes elementos electrónicos:

- **R_e** : representa la resistencia del electrolito entre el electrodo de referencia y de trabajo (Au_p , Au_p -DTSP o Au_p -DTSP-LOx).
- **R_{TC}** : es la resistencia a la transferencia de carga. Esta resistencia proviene de la manifestación de dos efectos:
 - 1) la energía potencial asociada al evento de oxidación en el electrodo (el sobrepotencial);
 - 2) la barrera energética que las especies redox tienen que superar para alcanzar el electrodo. Este efecto es debido principalmente al impedimento estérico.
- ****CPE1****: o también denominado elemento constante de fase. Este elemento simula el comportamiento no ideal de un condensador y puede ser modelado por una combinación en serie de la capacidad de la superficie modificada y la capacidad de la doble capa, correspondiente a la interfase más externa del Au modificado o sin modificar. Este elemento se utiliza en sustitución de un capacitor cuando hay una distribución de los tiempos de relajación, debido a las inhomogeneidades presentes sobre la superficie. La impedancia de este elemento es $Z = 1/[T(j\omega)^n]$.
- **Z_{WR}** : representa la impedancia de Warburg. En el caso del circuito equivalente del Au_p se utilizó un Warburg abierto (Z_{WO}), mientras que para el Au_p -DTSP y Au_p -DTSP-LOx se utilizó un elemento de Warburg de longitud finita ($ZW_{cerrado}$).

o Z_{WS}), que representa la difusión a través de la estructura porosa generada por los canales de acceso desde la disolución hacia la superficie electródica, formados por el DTSP y la enzima.

En la Tabla IV se muestran, además de los resultados experimentales, los valores obtenidos a partir de los ajustes mediante el circuito eléctrico equivalente de Randles (Figura 31).

Tabla IV

Resultados experimentales y resultados del ajuste de las medidas de EIS para cada paso en la construcción del biosensor sobre un transductor de oro policristalino.

	Au_p	Au_p-DTSP	Au_p-DTSP-LOx
Resultados experimentales			
Re (Ω)	35.67	36.23	40.40
R_{TC} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	2.01	22.53	77.71
K⁰ ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	$1.34 \cdot 10^{-4}$	$1.18 \cdot 10^{-5}$	$3.47 \cdot 10^{-6}$
C₁ ($\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$)	$1.15 \cdot 10^{-5}$	$6.30 \cdot 10^{-6}$	$5.35 \cdot 10^{-6}$
τ_{TC} (s)	$2.31 \cdot 10^{-5}$	$1.42 \cdot 10^{-4}$	$4.16 \cdot 10^{-4}$
Z_{WR} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	151.77	155.71	165.55
τ_{ω} (s)	-	15.61	6.17
σ ($\Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$)	-	17.49	29.55
K ($\text{s}^{1/2}$)	-	8.90	5.59
δ (μm)	-	2.50	0.99
b	-0.93(-42.8°)	-1.045(-46.3°)	-0.61(-31.0°)
Resultados de los ajustes			
Re (Ω)	29.16	34.19	37.87
R_{TC} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	2.22	21.13	62.1
CPE1 ($\text{S} \cdot \text{s}^n \cdot \text{cm}^{-2}$)	$1.11 \cdot 10^{-4}$	$9.72 \cdot 10^{-6}$	$1.19 \cdot 10^{-5}$
n	0.76	0.95	0.92
Z_{WO} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	144.81	-	-
Z_{WS} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	-	147.33	176.76
Z_{WT}	33.64	35.65	35.73
Z_{WP}	0.47	0.49	0.34
X²	$3.8 \cdot 10^{-4}$	$3.9 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$

Los resultados obtenidos, tanto experimentales como del ajuste, muestran para el Au sin modificar, una resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) de $2.01 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Sin embargo, para el Au modificado con DTSP, la R_{TC} incrementa sustancialmente hasta $22.53 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\text{Au}_p\text{-DTSP}$), alcanzando su valor máximo para el biosensor completo ($\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}/77.71 \Omega \cdot \text{cm}^2$). El mismo comportamiento sigue la impedancia de Warburg. Para el oro desnudo el elemento de Warburg ($151.77 \Omega \cdot \text{cm}^2$) corresponde a una difusión lineal de la sonda redox hacia la superficie electródica, como muestran el valor de la pendiente de 0.93 y el valor del ángulo de 42.8° . Por el contrario, para el oro modificado el elemento de Warburg representa una difusión a través de una capa de difusión de longitud finita, cuya resistencia se incrementa desde $155.71 \Omega \cdot \text{cm}^2$ hasta $165.55 \Omega \cdot \text{cm}^2$ después de enlazar covalentemente la enzima ($\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$).

Otros parámetros interesantes que podemos obtener a partir de las medidas de impedancia son las constantes de tiempo correspondientes a los procesos de transferencia de carga (τ_{TC}) y a los procesos de difusión (τ_w).

La constante de tiempo del correspondiente proceso de transferencia de carga se puede calcular a partir del valor de la frecuencia máxima, ω_{max} . Este valor se obtiene a partir de la frecuencia donde el semicírculo dibuja un máximo en el eje imaginario. Empleando la siguiente ecuación^[156], se obtiene el valor de la constante de tiempo:

$$\tau_{TC} = 1/\omega_{max} = R_{TC} \cdot C_1 \quad (91)$$

El valor de la constante de tiempo aumenta en un orden de magnitud cuando pasamos del Au_p al $\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$. Esta constante de tiempo está relacionada con el tiempo de carga de la doble capa, que como es lógico irá aumentando progresivamente después de adsorberse la SAM y la enzima. Como indica la ecuación anterior, los valores de R_{TC} y de C_1 son inversamente proporcionales. En la Tabla IV podemos ver, como a medida que la R_{TC} aumenta, los valores de

capacidad, tanto de los datos experimentales, como los obtenidos a partir del ajuste mediante el circuito equivalente correspondiente, van disminuyendo. Teniendo en cuenta que la capacidad de un condensador es inversamente proporcional al espesor de la capa de dieléctrico existente entre sus placas, una disminución en el valor de la capacidad reflejaría un incremento del espesor de la capa debido en primer lugar a la película de tiol y después a la incorporación de la enzima.

La constante de tiempo para el proceso de difusión se puede obtener a partir de:

$$\tau_w = 1/\omega_{max}^w = K^2/5.08 \quad (92)$$

siendo ω_{max}^w el valor de la frecuencia a la cual el segundo semicírculo dibuja un máximo en el eje imaginario. A partir de ω_{max}^w también es posible calcular la constante K, definida por Dawson y John en 1980^[183] como $K = \delta(2/D)^{1/2}$, donde

D es el coeficiente de difusión de las especies iónicas y δ es el espesor de la capa de difusión. Para un sistema controlado por difusión, la constante K está relacionada con la parte real de la impedancia de Warburg (Z_{WR}) a través del coeficiente de Warburg (σ), siendo $Z_{WR} = \sigma K$. Este parámetro se puede utilizar como criterio de diagnóstico. En este caso, el diagrama de Nyquist es característico de un sistema con $R_{TC} \sim \sigma K$, característico de un control mixto. Los valores obtenidos para estos parámetros se muestran en la Tabla IV.

Por otra parte, teniendo en cuenta que una interfase IPE se asemeja a un circuito RC, se puede calcular el tiempo necesario para cargar la doble capa siendo igual a tres veces la constante de tiempo del sistema (τ)^[155]. Para una constante de tiempo del sistema típica de 20 μ s, el tiempo necesario para cargar la doble capa será $t=3\tau = 3 \times 20\mu s = 60 \mu s$. Para este tiempo el espesor de la capa de difusión es:

$$6(Dt)^{1/2} = 6 \cdot (0.632 \cdot 10^{-5} cm^2 s^{-1} \cdot 60\mu s)^{1/2} = 1.17 \cdot 10^{-4} cm = 1.17\mu m$$

Por tanto, los valores obtenidos por EIS para el espesor de la capa de difusión δ son del mismo orden que los correspondientes a tiempos de carga de la doble capa (Tabla IV).

5.1.4.3 *Transformadas de Kramers-Kronig (K-K)*

Debido a la complejidad que presenta la estructura del biosensor para los estudios de impedancia, es necesario aplicar las transformadas de *Kramers-Kronig (K-K)*^[158] para los resultados obtenidos en cada una de las etapas de fabricación del biosensor. De este modo se determina si los resultados obtenidos son válidos o se han distorsionado durante la adquisición de los resultados experimentales.

En la Figura 32 se representan los resultados experimentales y los calculados a partir de las transformadas de K-K para cada estadio de fabricación del biosensor sobre el transductor de oro policristalino.

Como se puede observar en la Figura 32, la consistencia de los resultados experimentales es buena. No obstante, se calcularon los errores medios comparando los resultados obtenidos de las transformadas de K-K con los resultados originales utilizando la ecuación:

$$\Delta \bar{Z} = \frac{100 \times \sum_{x=1}^N |Z_{ex}(x) - Z_{KK}(x)|}{N \times Z_{max}} \quad (93)$$

donde N es el número de puntos, Z_{ex} es el valor de la impedancia experimental, Z_{KK} es el valor de la impedancia obtenido por medio de los K-K y Z_{max} el valor máximo de la impedancia.

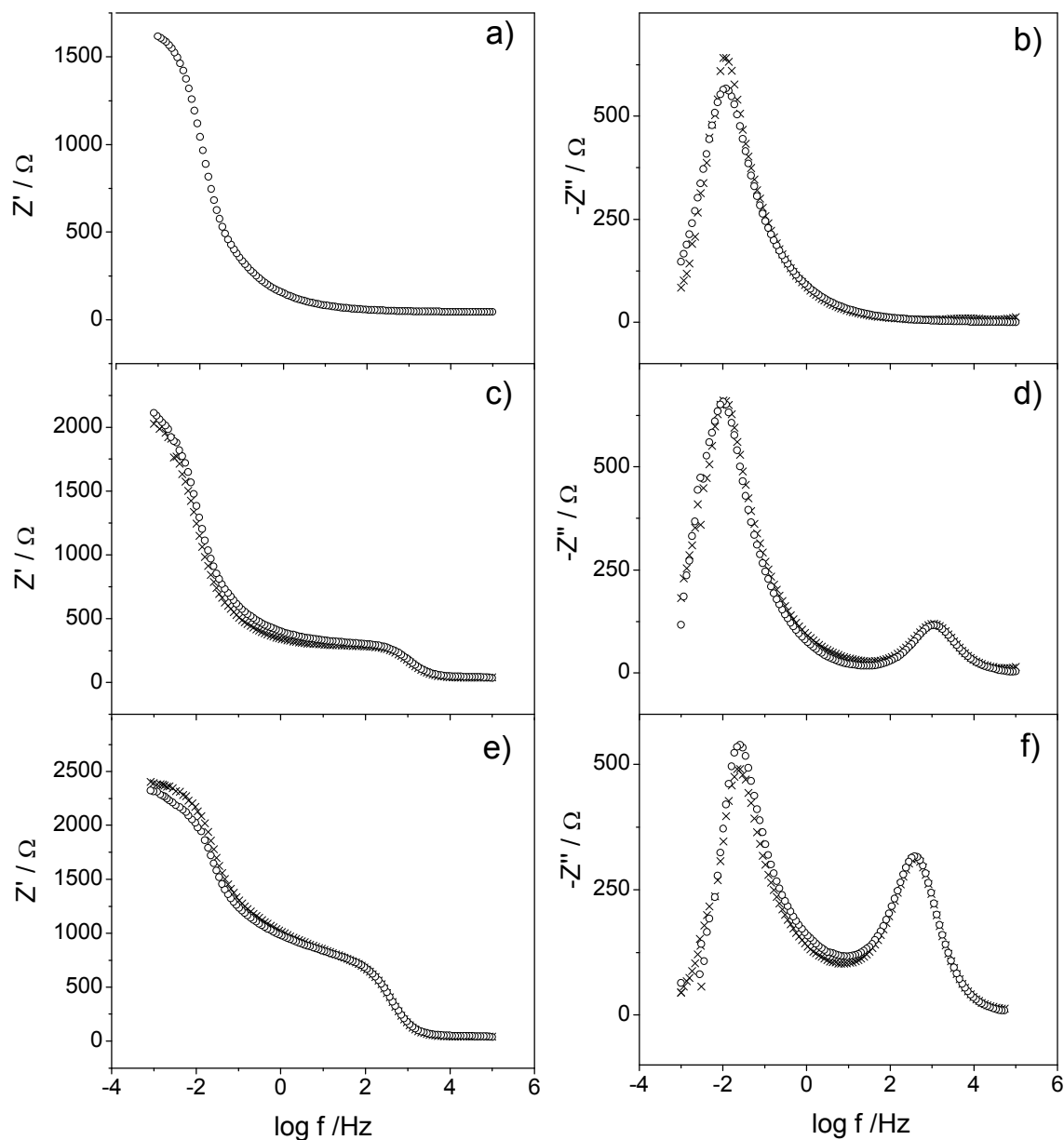


Figura 32: Resultados experimentales (O) y resultados obtenidos utilizando las relaciones de Kramers-Kronig (K-K)(+) correspondientes a la parte real e imaginaria de las medidas de EIS para el Au_p (a y b), $\text{Au}_p\text{-DTSP}$ (c y d) y $\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$ (e y f) obtenidas en 0.1M KCl/0.1M tampón fosfato (pH=7) conteniendo 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

En la Tabla V se recogen los errores medios de las componentes real e imaginaria de las medidas de EIS para cada paso de construcción del biosensor. Según Dougherty y Smedley^[184], la fiabilidad de los resultados obtenidos de las medidas de impedancia es buena o aceptable cuando el error medio, tanto de la componente real como de la imaginaria, se encuentra por debajo del 3%. El error

medio obtenido para cada una de las transformadas de K-K no supera este 3%, por lo tanto los resultados experimentales satisfacen las transformadas de K-K.

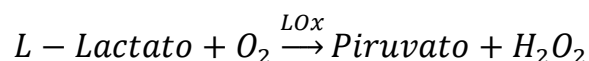
Tabla V

Errores medios de las medidas de EIS para el Au_p , Au_p -DTSP y Au_p -DTSP-LOx obtenidos a partir de las representaciones de Kramers-Kronig (K-K).

	Error medio (%)	
	Componente real (Z')	Componente imaginaria (Z'')
Au_p	0.241	0.009
Au_p -DTSP	2.238	1.255
Au_p -DTSP-LOx	2.596	2.890

5.1.5 Respuesta del biosensor

El elemento biológico de reconocimiento del biosensor desarrollado para la determinación de L-lactato fue la Lactato Oxidasa (LOx) de *Pediococcus species*; una enzima que cataliza, en presencia de oxígeno, la conversión de ácido láctico en ácido pirúvico.



La Lactato Oxidasa es una enzima perteneciente a la familia de las flavoenzimas, concretamente al grupo de enzimas flavin mononucleótido dependientes (FMN-dependientes), que catalizan la conversión de α -hidroxi ácidos a α -ceto ácidos a través de la reducción del cofactor FMN, involucrando un par de electrones en la reacción.

La estructura del cofactor (FMN o flavín mononucleótido), a través del cual esta enzima realiza la catálisis se muestra en la Figura 33.

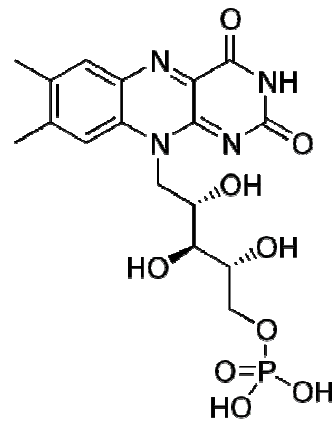


Figura 33: cofactor flavín mononucleótido (FMN)

La conversión reversible entre la forma oxidada (FMN) y reducida (FMNH₂) del coenzima se puede ver en el siguiente esquema:

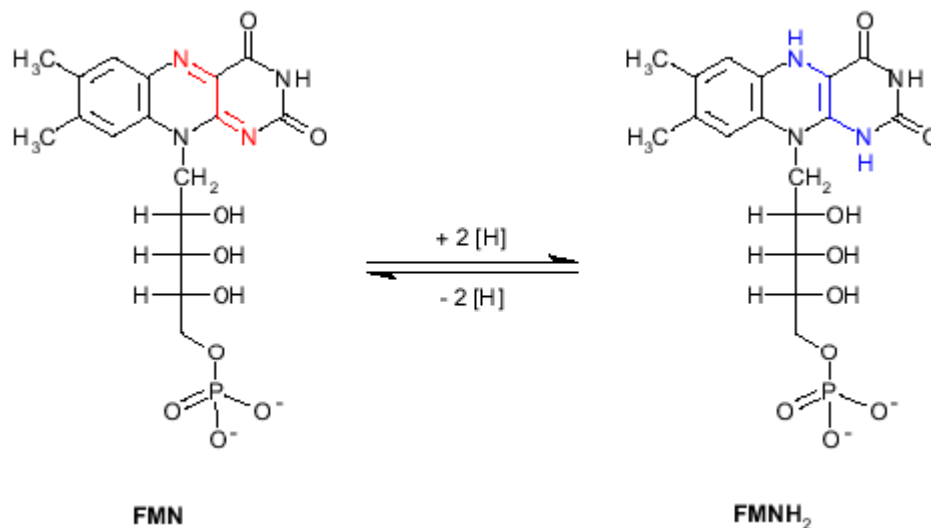


Figura 34: Conversión reversible entre la forma oxidada (FMN) y reducida (FMNH₂).

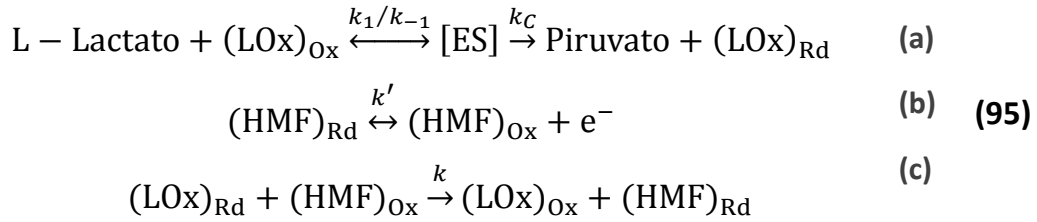
La estrategia para la detección en un biosensor electroquímico basado en LOx, cuando se utiliza oxígeno como aceptor de electrones, se basa bien en monitorizar el consumo de O₂ o bien la producción de H₂O₂ según el siguiente mecanismo de reacción^[86, 98, 99, 185].

(94)

Según este esquema, el sustrato es oxidado al mismo tiempo que la enzima pasa a su forma reducida. Seguidamente, el oxígeno actuando como aceptor natural de electrones, regenera la enzima a su forma oxidada produciendo H_2O_2 , el cual se oxida a oxígeno sobre el electrodo generando una señal electroquímica. Así, los biosensores basados en la LOx permiten la determinación del peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática^[85]. Pero la determinación electroquímica de peróxido de hidrógeno implica un alto potencial positivo y puede verse afectada por la presencia de interferentes como el ácido cítrico, ácido tartárico, glucosa, ácido úrico, etc., comúnmente presentes en muestras reales^[74]. Por otro lado, la sensibilidad del biosensor depende de la concentración de oxígeno molecular^[86, 87]. Una estrategia utilizada, para evitar estos problemas, es reemplazar el aceptor natural de electrones (O_2) por un mediador artificial, es decir una especie electroactiva que actúa como lanzadera de electrones, permitiendo un acoplamiento redox entre el electrodo y el centro redox del componente biológico del biosensor.

Además, en la mayoría de las enzimas redox, la velocidad de transferencia de carga sobre la superficie del electrodo es muy lenta, debido a que el centro redox activo se encuentra rodeado por la estructura de la proteína, que actúa como una barrera estérica ante el paso de los electrones. Para aumentar esta velocidad de transferencia electrónica se emplean mediadores, moléculas capaces de transportar electrones entre la superficie del electrodo y el centro redox de la enzima^[88].

Así, empleando el hidroximetilferroceno (HMF) como aceptor secundario de electrones, el proceso catalítico será el siguiente:



La enzima lactato oxidasa inmovilizada sobre el electrodo oxida el L-lactato a piruvato, en presencia del hidroximetilferroceno como mediador redox, de forma que en cada ciclo catalítico el $(\text{HMF})_{\text{Rd}}$ se transforma sobre el transductor en $(\text{HMF})_{\text{Ox}}$ y por tanto el potencial redox del sistema $(\text{HMF})_{\text{Rd}}/(\text{HMF})_{\text{Ox}}$ marcará el potencial de respuesta del biosensor. Posteriormente se regenera la enzima utilizando el mediador oxidado como aceptor de electrones.

Con el fin de estudiar la respuesta catalítica del biosensor construido sobre un electrodo de oro policristalino, este se introduce en una disolución reguladora de tampón fosfato de pH=7, en presencia de una concentración 1.0mM de hidroximetilferroceno y se registra un voltamograma entre -0.55 V y 0.05 V vs. ESM a una velocidad de barrido de $0.01\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$. La Figura 35 muestra su respuesta voltamétrica en ausencia (curva a) y en presencia de L-lactato (curva b).

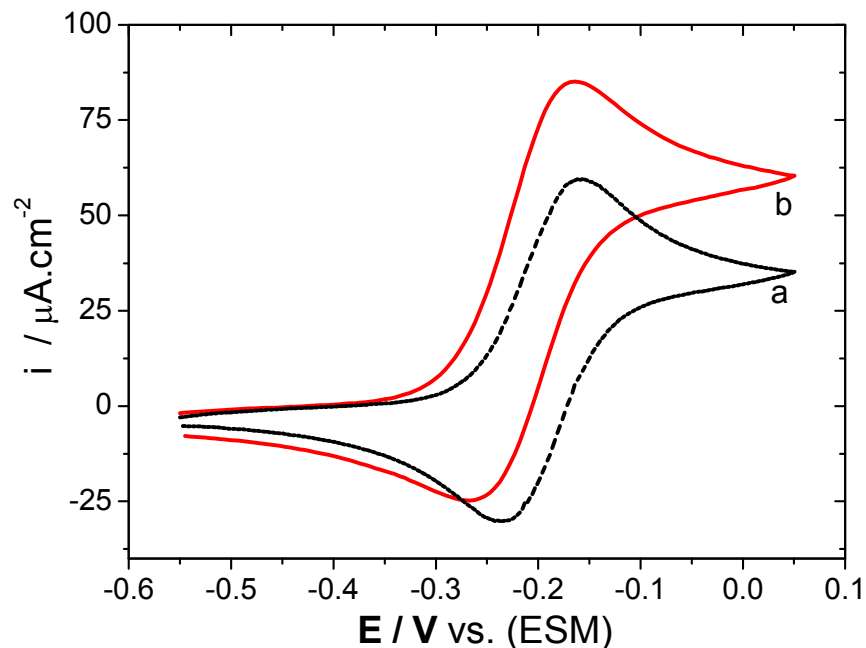


Figura 35: Voltamograma cíclico de un biosensor de lactato oxidasa construido sobre un electrodo de oro policristalino modificado con DTSP ($\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$), en una disolución 0.1M de tampón

fosfato que contiene 1.0 mM de hidroximetilferroceno, en ausencia de sustrato (curva a) y en presencia de 14 mM de L-lactato (curva b). ($v = 0.01\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$).

En ausencia de L-lactato se observa el voltamograma cíclico reversible correspondiente al par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, con una relación i_{pa}/i_{pc} próxima a la unidad. En presencia de sustrato se produce un aumento en la corriente de pico anódica y una disminución en la corriente catódica. Este comportamiento es característico de un proceso catalítico, por lo que la magnitud de la corriente catalítica (Figura 35; curva b), puede ser empleada como la señal analítica en la determinación de la concentración de L-lactato.

Curva de calibrado

Con el fin de estudiar la respuesta del biosensor para una determinada concentración de L-lactato, se obtuvo la correspondiente curva de calibrado mediante la representación de la corriente catalítica normalizada, adquirida a partir de las medidas de voltametría cíclica, frente a concentraciones crecientes de L-lactato. Estas determinaciones se llevaron a cabo, agitando después de cada adición de sustrato, y permaneciendo en reposo durante la medida. La Figura 36 representa la curva de calibrado obtenida.

Cada punto de la curva representa la corriente catalítica obtenida después de la adición de una determinada concentración de L-lactato, siendo esta el resultado de la diferencia entre el valor de la corriente estacionaria del correspondiente voltamograma en presencia de L-lactato (I) y en su ausencia (I_0). En el inset aparece el intervalo lineal de la curva del que posteriormente se extraerán las propiedades analíticas del biosensor. Para eliminar la influencia del área del electrodo, se ha representado $(I-I_0/I_0)$ y cada punto representa el valor medio de tres mediciones.

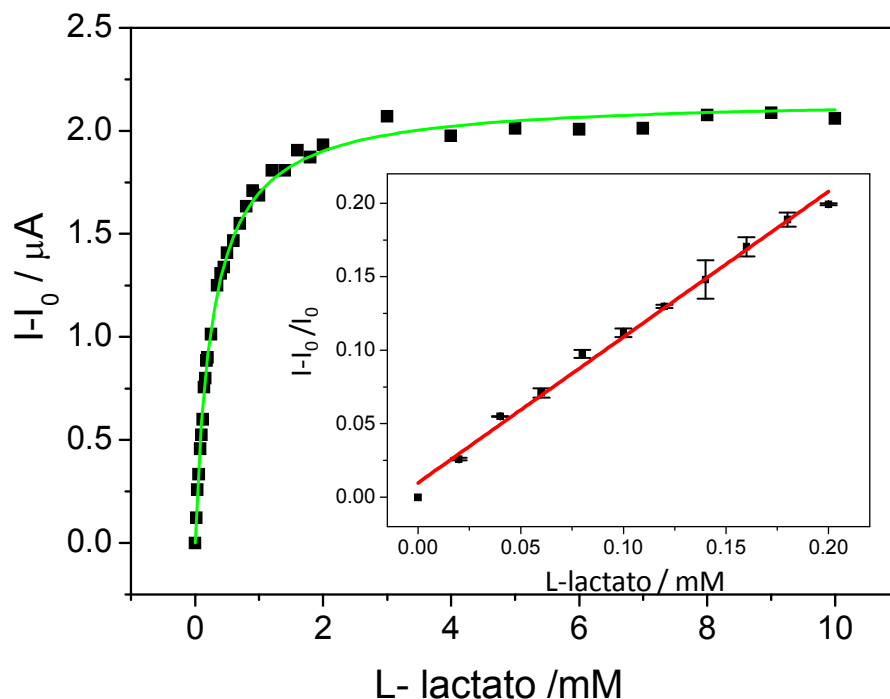


Figura 36: Curva de calibrado para el biosensor $\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$ obtenidas mediante voltametría cíclica en condiciones de estado estacionario ($v=0.1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) en una disolución 1.0mM de HMF en PBS pH=7.0 en presencia de cantidades crecientes de L-lactato. (•) Datos experimentales, (—) ajuste mediante regresión no lineal. En el inset se muestra el intervalo lineal.

La forma de la curva de calibrado es característica de un comportamiento michaeliano, alcanzando un valor de corriente máximo y constante a partir de una determinada concentración de sustrato (Figura 36). Este comportamiento sugiere que la respuesta electroquímica está bajo control enzimático.

5.1.5.1 Cálculo de constantes cinéticas del biosensor

Los resultados experimentales se ajustaron a una ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal, para calcular la constante aparente de Michaelis-Menten (K_M) (Figura 36). Las constantes de la cinética enzimática entre la enzima oxidada $(\text{LOx})_{\text{ox}}$ y el sustrato L-lactato para dar piruvato y el enzima reducido $(\text{LOx})_{\text{red}}$ según la secuencia de reacciones (95) están englobadas en K_M , siendo el valor de esta constante inversamente proporcional a la afinidad de la enzima por el sustrato. Para el caso del biosensor desarrollado ($\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$) se obtuvo un valor de K_M de 0.27mM y $(i - i_0)_{\text{max}}$ de $26.35 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

El valor de K_M también puede obtenerse a partir de las representaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 10) que relacionan la corriente catalítica con la concentración de sustrato.

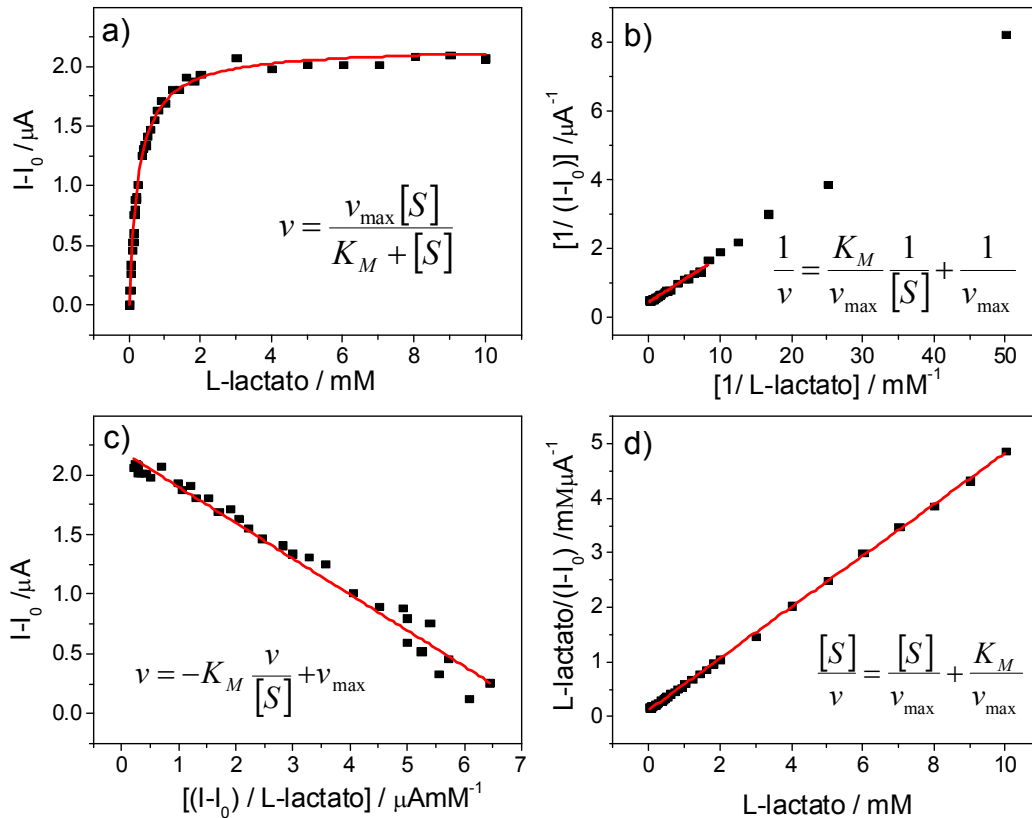


Figura 37: Distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre oro policristalino (Au_p -DTSP-LOx): a) Ajuste mediante regresión no lineal, b) Representación de Lineweaver Burk, c) Representación de Eadi-Hofstee, d) Representación Hanes.

En la Tabla VI se recogen los valores de K_M e $(I - I_0)_{max}$ así como el intervalo de concentración de sustrato donde se cumplen las ecuaciones teóricas, obtenidos a partir de las representaciones lineales. Como podemos observar el ajuste mediante regresión no lineal y la representación de Hanes, proporcionan resultados muy similares. Entre las representaciones lineales, la representación de **Hanes** es la que lleva asociado un error menor, ya que todos los puntos tienen el mismo peso en la regresión lineal y la velocidad de reacción (intensidad en nuestro

caso), que es un valor experimental con su error asociado, sólo está presente en uno de los ejes (Figura 37(d)).

Tabla VI

Parámetros obtenidos a partir de las distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre oro policristalino (Au_p-DTSP-LOx).

	Regresión no lineal	Lineweaver Burk	Eadi-Hofstee	Hanes
$(I-I_0)_{max}$ (μA)	2.11±0.01	3.03±0.02	2.73±0.03	2.660±0.002
K_M (mM)	-	0.370±0.002	0.300±0.008	0.26±0.005

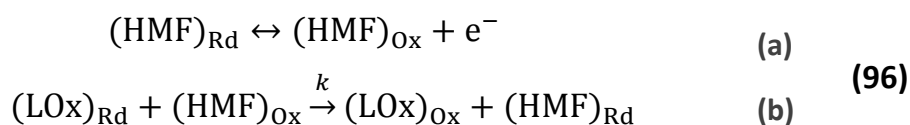
La representación de **Lineweaver-Burk** es la que presenta un mayor error, debido a que la región lineal queda definida por los puntos de menor concentración de L-lactato, que son los que lleva asociados un mayor error en la medida. Por este motivo, si nos fijamos en los valores de la tabla, en este caso se obtiene el valor de K_M que más se aleja del valor obtenido mediante el ajuste por regresión no lineal (0.370mM).

La representación de **Eadi-Hofstee** evita este problema representando la velocidad frente a $v/[S]$.

$$v = -K_M \frac{v}{[S]} + v_{max}$$

Aquí el valor de K_M se aproxima algo más al valor óptimo (0.30mM) aunque la dispersión de los puntos es mayor.

La siguiente reacción a considerar dentro de la secuencia de eventos redox presentes en el proceso catalítico, es el proceso reversible que tiene lugar en el electrodo para generar el mediador oxidado seguido por la cinética bimolecular entre el mediador oxidado y la enzima reducida (LOx_{Rd}), según el siguiente esquema:



El tratamiento de Nicholson y Shain^[138] predice para un esquema EC', que el cociente de la corriente catalítica (i_{cat}) respecto a la corriente limitada por difusión (i_{diff}) viene dada por la ecuación (54):

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

Siendo k_f una constante de velocidad de pseudo primer-orden que es igual al producto de la concentración del mediador por la constante de velocidad de segundo orden en la reacción (96b).

$$k_f = k (\text{HMF})_{\text{Rd}}$$

A partir de los voltamogramas obtenidos en ausencia y en presencia de una concentración saturante de L-lactato y registrados a distintas velocidades de barrido, en una disolución 1.0mM de HMF en tampón fosfato pH=7.0, empleando como electrodo de trabajo el biosensor Au_p-DTSP-LOx, se representó $\frac{i_{\text{cat}}}{i_{\text{dif}}}$ vs. $v^{-1/2}$ obteniéndose una relación lineal (Figura 38) de cuya pendiente, se calculó la constante de velocidad ($k_f = 0.012\text{s}^{-1}$).

Teniendo en cuenta la concentración de mediador utilizada, y el valor de K_f calculado, el valor obtenido para la constante de velocidad de segundo orden para la reacción bimolecular entre la enzima reducida y el mediador oxidado (Reacción 96(b)) es de $k = 10 \text{ molar}^{-1}\text{s}^{-1}$.

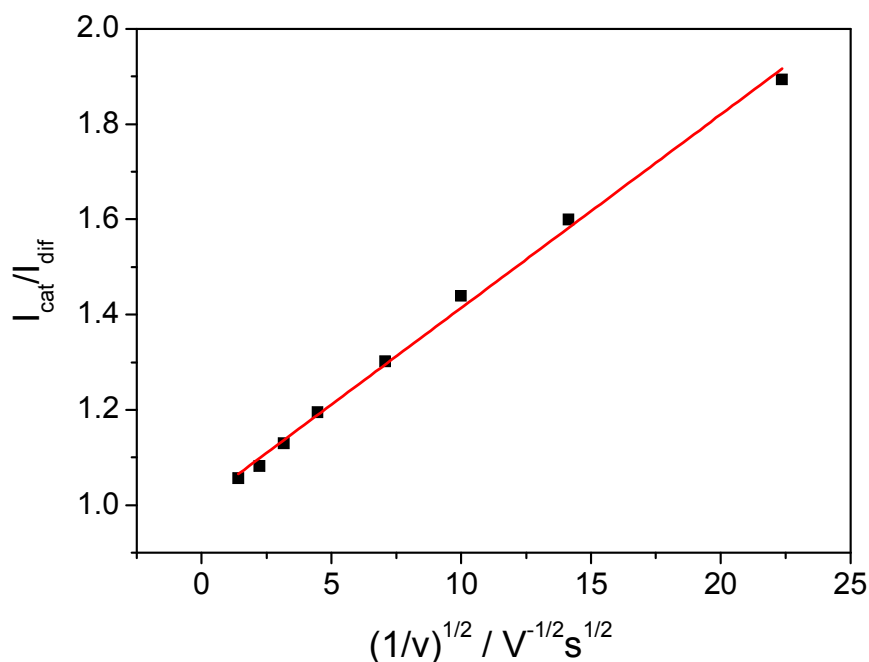


Figura 38: Representación $\frac{I_{cat}}{I_{dif}}$ vs. $v^{-1/2}$ obtenida a partir de los voltamogramas registrados en ausencia y en presencia de una concentración saturante de L-lactato en una disolución 1.0mM de HMF en PBS pH=7.0, empleando como electrodo de trabajo el biosensor Au_p-DTSP-LOx.

5.1.5.2 Determinación de las propiedades analíticas del biosensor

Las propiedades analíticas del biosensor construido sobre el electrodo de oro policristalino, se determinaron a partir del intervalo lineal de la curva de calibrado (inset Figura 36) y se recogen en la tabla siguiente:

Tabla VII

Propiedades analíticas del biosensor Au_p-DTSP-LOx.

	Au_p-DTSP-LOx
Respuesta lineal (mM)	<i>Hasta 0.2</i>
Sensibilidad ($\mu A \cdot mM^{-1}$)	<i>0.99±0.04</i>
Límite de detección (μM)	<i>14.40</i>
Límite de determinación (μM)	<i>48.01</i>
Repetibilidad (R.S.D.)	<i>0.3%</i>
Reproducibilidad (R.S.D.)	<i>2.9%</i>
Estabilidad	<i>50%</i>

La respuesta lineal obtenida, mediante voltametría cíclica, se extiende hasta 0.2mM. La sensibilidad se calculó a partir de la pendiente de la recta, alcanzando un valor de $0.99 \mu A \cdot mM^{-1}$. El límite de detección, calculado a partir de la media de tres veces la desviación estándar del blanco dividido por la sensibilidad, fue 14.40 μ M. El límite de determinación se calculó a partir de 10 veces la desviación estándar del blanco dividido por la sensibilidad. El valor fue de 48.01 μ M.

La repetibilidad se evaluó comparando las señales analíticas para cinco medidas sucesivas de un mismo biosensor, frente a una concentración de L-lactato 0.1mM, obteniéndose un valor de 0.3%.

La reproducibilidad se evaluó comparando las señales analíticas obtenidas utilizando cinco biosensores diferentes, preparados al mismo tiempo y empleados para medir una concentración 0.1mM de L-lactato. El valor obtenido fue de 2.9%.

Otra propiedad importante que debe tenerse en cuenta en la construcción de un biosensor, para permitir su posterior aplicación, es su estabilidad. Esta se evaluó a partir del porcentaje de señal analítica que se mantiene después de un mes. Para ello se midió la respuesta del biosensor en presencia de 0.1mM de L-lactato a lo largo de varios días, manteniendo el electrodo, entre medida y medida, sumergido en una disolución de tampón fosfato a pH = 7 a 4°C. Después de un mes, los biosensores basados en Au_p-DTSP-LOx, retienen el 50% de su respuesta original.

5.2 TRANSDUCTOR DE ORO RUGOSO

La nanoestructuración superficial aporta ventajas interesantes respecto a las superficies sin nanoestructurar, cuando se utilizan como transductores para biosensores electroquímicos. Entre estas ventajas destacan, la amplificación de la señal, lo que permite mayores intervalos de medida y en algunos casos la retención de la actividad biológica de la enzima, debido a la mayor libertad de orientación de las biomoléculas sobre estas estructuras^[186].

Las superficies de electrodos nanoestructuradas se pueden obtener por una gran variedad de métodos, tales como la modificación de superficies con materiales nanoestructurados o mediante nanoestructuración de la superficie en sí misma.

Una de las alternativas para nanoestructurar superficies metálicas (Au, Pt), consiste en rugosar la superficie mediante un cambio de fase^[1]. Estas estructuras fueron desarrolladas en los años 80 por Arví y col.^[2]. Los autores describieron un método para la obtención de electrodos de oro y platino con un área activa elevada, es decir con un alto factor de rugosidad. El procedimiento consiste, en la formación de una capa de óxido de oro mediante la aplicación de una perturbación de potencial periódico y posterior electroreducción.

Dependiendo de cómo se lleve a cabo el proceso de electroreducción del óxido generado, puede variar la morfología del depósito metálico obtenido. Si la electroreducción tiene lugar a sobrepotenciales bajos, el crecimiento del depósito estará controlado por la difusión de los adátomos de oro hacia las posiciones superficiales más estables (mayor índice de coordinación), dando lugar a un empaquetamiento compacto de los granos del depósito, exhibiendo por tanto una baja rugosidad. Sin embargo, si el sobrepotencial es elevado, el proceso de electroreducción estará controlado por la transferencia de carga, que será rápida,

teniendo lugar sobre sitios superficiales con bajo índice de coordinación. El rápido crecimiento del electrodepósito metálico, genera una estructura columnar terminada en una punta redondeada con un radio entre 10 y 20 nm, formándose en este caso un electrodo con un área superficial muy grande, es decir, con una elevada rugosidad^[1]. Además, es importante destacar la relación lineal existente entre la rugosidad y la carga acumulada en la formación del óxido así como con la altura de las columnas, siendo directamente proporcional. Cuando la electrorreducción se lleva a cabo a sobrepotenciales bajos, esta dependencia entre la rugosidad y la carga acumulada no existe, siendo la rugosidad similar a la del sustrato inicial.

La ecuación que define la rugosidad de estas estructuras columnares obtenidas a sobrepotencial (η) elevado, se define como:

$$R = (\pi/3) \left(kq/r \right) \quad (97)$$

Siendo $k = M/zF\rho$, q la carga acumulada y r el radio medio de las columnas.

La estabilidad de estas estructuras con el tiempo depende del coeficiente de difusión de los átomos de oro a través de su superficie. A su vez la difusión iónica depende de la temperatura y de los adsorbatos presentes en el medio (aire o disolución acuosa). El coeficiente de difusión (D_S) del oro en sulfúrico 0.5M es $5 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, lo que supone un *decay* de la estructura columnar con el tiempo de forma relativamente rápida. Sin embargo, en presencia de ciertos adsorbatos, este coeficiente puede variar considerablemente. Alonso y col^[187] estudiaron la influencia de dos tipos de adsorbatos: la piridina que produce una importante disminución en el valor del coeficiente de difusión, minimizando de este modo la coalescencia de la estructura rugosa con el tiempo, y por otro lado los iones Cl^- que producen el efecto contrario, aumentando la velocidad de *decay*. A la vista de estos resultados se pensó que el tiol (DTSP) empleado para inmovilizar la enzima

en la fabricación del biosensor, también podría fijar la estructura tridimensional del oro manteniéndola estable y conservando su rugosidad.

En este sentido, los electrodos de oro rugoso obtenidos por este método, muestran las ventajas de las superficies nanoestructuradas, a la vez que ofrecen una vía rápida y sencilla de preparación, por lo que pueden ser buenos candidatos para ser utilizados como transductores en biosensores.

5.2.1 Fabricación de los transductores de oro rugoso (Au_R)

El primer paso del procedimiento para la obtención de un electrodo de oro rugoso, consiste en la activación electroquímica mediante voltametría cíclica del electrodo de oro policristalino, en una disolución de ácido sulfúrico 0.5M en medio desoxigenado. Para ello, se aplicaron barridos cíclicos de potencial entre -0.65V y 1.1V (vs. ESM) a $0.1V \cdot s^{-1}$ hasta la obtención de una imagen estable y reproducible, característica del oro limpio (Figura 40(a)).

Una vez activado el electrodo, se procedió al rugosado de la superficie^[1, 2]. En primer lugar, es necesaria la electroformación de una capa de óxido gruesa para posteriormente aplicar una electrorreducción rápida donde el proceso limitante sea la velocidad de la transferencia de carga entre los iones Au^{3+} y la superficie electródica de oro policristalino.

Para ello se aplicó una perturbación de potencial de onda cuadrada repetitiva (RSWPP: repetitive square wave perturbing potential) a una frecuencia de 4 kHz durante un tiempo de dos minutos, siendo el tiempo de oxidación (0.15ms) mayor que el tiempo de reducción (0.10ms) (Figura 39). Como resultado se obtiene la acumulación de una capa de óxido metálico.

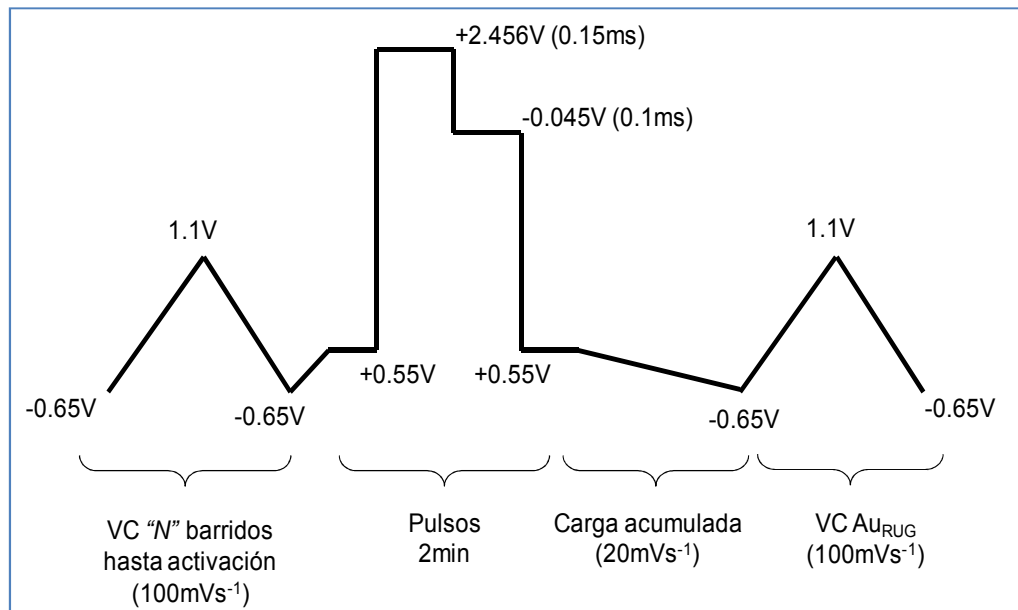


Figura 39: Programa de potencial para la fabricación de electrodos de oro rugoso.

A continuación se procedió a la electroreducción voltamétrica de la capa de óxido mediante un barrido lineal de potencial entre +0.55V y -0.65 V a $0.020\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[1], obteniendo el electrodo de oro electrodispersado (Figura 41(c)). A esta velocidad de barrido, el crecimiento de la capa de oro metálico es cercano a $10^{-5}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, dando lugar a una estructura columnar que proporciona una rugosidad máxima [188].

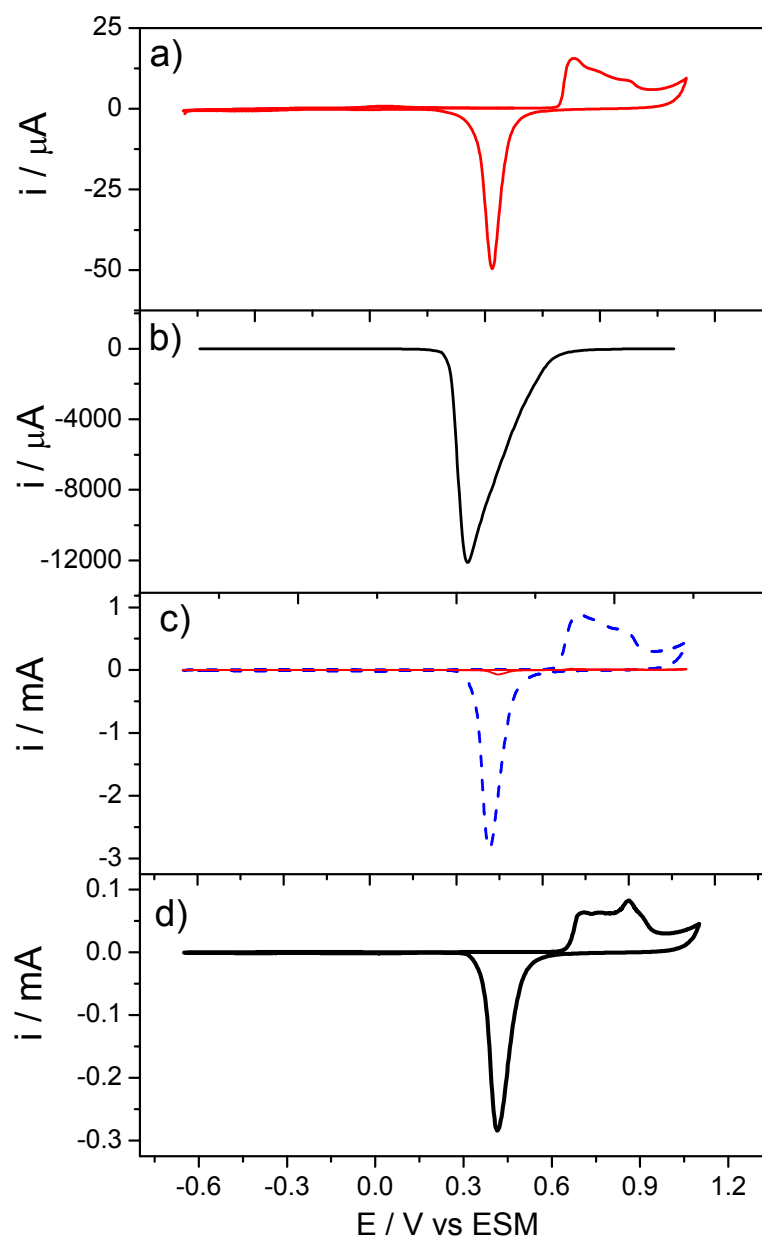


Figura 40: Curvas i - E correspondientes al procedimiento de obtención de oro rugoso (a) Voltamograma de un electrodo de oro policristalino en H_2SO_4 0.5M a $0.1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ (25°C); (b) Barrido lineal de electroreducción de la capa de óxido ($v=0.02\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) (—); (c) VC a $0.1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ del electrodo de oro policristalino (—); VC a $0.1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ del electrodo de oro rugoso cuya rugosidad es $R=66$ (---); (d) CV del oro rugoso después de un tiempo de relajación de siete días (—).

La evaluación de la rugosidad (R) del electrodo de oro generado se llevó a cabo a partir del cociente entre la carga de reducción de óxidos para el oro rugoso (Figura 40(c)) y para el electrodo de oro policristalino de partida (Figura 40(a)), midiendo ambas cargas mediante voltametría cíclica en las mismas condiciones^[2]. La rugosidad obtenida fue $R=66$.

5.2.2 Caracterización superficial

Una vez preparado el electrodo de oro rugoso, se procedió a su caracterización superficial. La morfología de la superficie fue observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM), mientras que la orientación preferencial y el tamaño medio de la cristalita se determinó mediante difracción de rayos-X (DRX).

5.2.2.1 *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

La morfología superficial de los depósitos de oro rugoso fue caracterizada por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo. La Figura 41 muestra las micrografías obtenidas para un electrodo de oro de rugosidad 66 a dos magnificaciones diferentes.

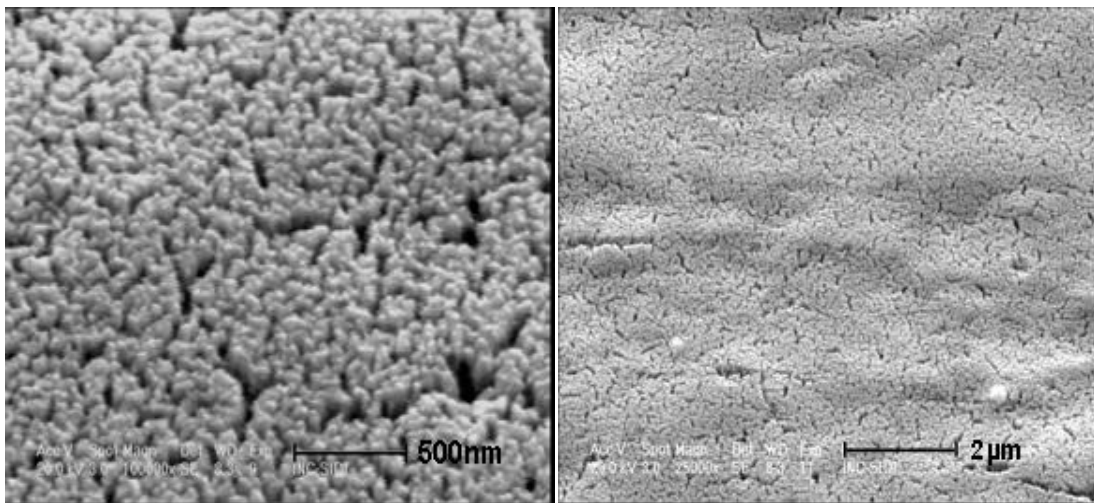


Figura 41: Imágenes SEM de un electrodo de oro rugoso a diferentes magnificaciones: 500nm y 2µm.

En las imágenes se observa que el depósito tiene un aspecto “tipo cerebro”, revelando la presencia de pequeños granos y canales de aproximadamente 150nm de anchura. Esta estructura forma dominios que pueden extenderse varios cientos de μm^2 . La apariencia es siempre similar, independientemente del grado de rugosidad de la muestra. Dicha morfología fue

previamente descrita por Vázquez y col.^[1] como característica de los depósitos de oro electrodispersado.

Según el modelo de desarrollado por Alonso y col.^[189], estas estructuras de oro rugoso están basadas en un electrodeposición 3D formado por una red rectangular de columnas de altura “h” terminadas en una cúpula hemisférica de radio medio “r” (Figura 42). La superficie de esta estructura tridimensional es responsable del drástico aumento del área del electrodo, y con ello de su elevada rugosidad.

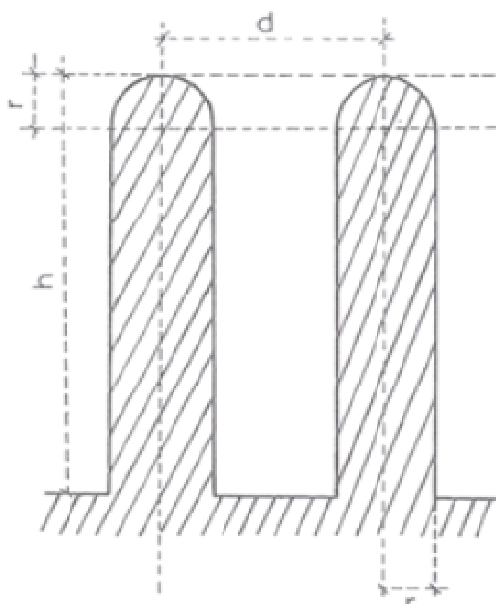
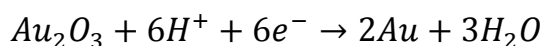


Figura 42: Modelo columnar teórico para un electrodo de oro rugoso^[189].

De acuerdo con este modelo, es posible estimar teóricamente los parámetros altura (h) y radio medio (r) de las columnas del depósito de oro a partir de los datos obtenidos electroquímicamente del proceso de electrorreducción^[189].

La electrorreducción de la capa de óxido, para dar lugar a oro rugoso, puede representarse mediante la siguiente reacción:



A partir de la capa de óxido depositada, y considerando que el cambio de fase tiene lugar a volumen constante, se puede calcular la altura media de las columnas del oro electrodepositado, mediante la ecuación siguiente:

$$h = Mq/ZF\rho \quad (98)$$

Siendo M la masa atómica del oro ($196.96\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), q la carga de óxido acumulada, Z el nº de electrones intercambiados ($3e^-$), F la constante de Faraday y ρ la densidad del oro electrodepositado ($19.32\text{g}\cdot\text{cc}^{-1}$).

Considerando que la carga de electrorreducción obtenida para una rugosidad $R=66$, (Figura 40(b)) es de $q=1.07\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$, la altura de las columnas será $h=3.8\cdot 10^{-5}$ cm (380nm).

De forma similar, aplicando este modelo, es posible calcular el radio medio de las columnas a partir del valor de la rugosidad y de la altura del óxido depositado, empleando la ecuación:

$$\text{Rugosidad: } R = \left(\frac{\pi}{3}\right) \cdot \left(\frac{h}{r}\right) \quad (99)$$

El valor obtenido fue de $r = 6\text{nm}$.

5.2.2.2 *Microscopía de fuerza atómica (AFM)*

La Figura 43 muestra la imagen de AFM de una muestra de oro rugoso obtenida en modo contacto intermitente. Corroborando el modelo teórico, la imagen revela el desarrollo de una estructura tipo columnar terminando en forma redondeada. La figura muestra un canal de unos 150 nm de ancho donde es posible observar la estructura de grano que indica el crecimiento columnar. Es necesario resaltar que las columnas que presentan un tamaño mayor (80-100nm) están formadas a su vez por subunidades nanométricas (20-40nm).

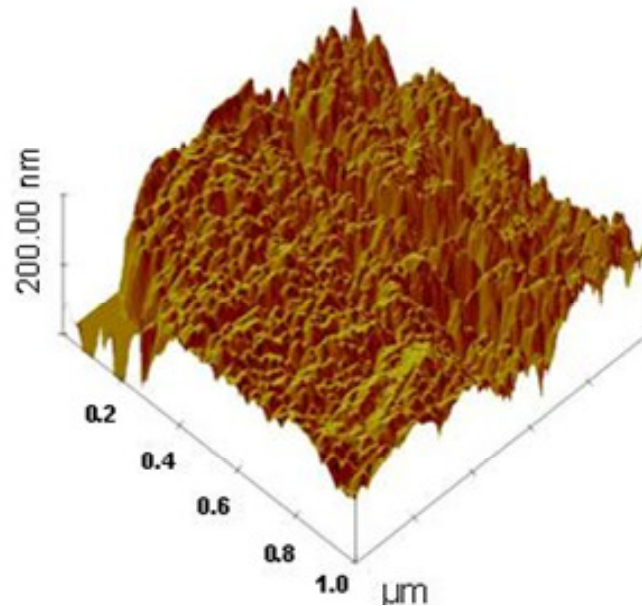


Figura 43: Imagen AFM en modo contacto intermitente $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ de un electrodo de oro rugoso $R=66$.

El análisis topográfico realizado a partir de los resultados obtenidos por AFM (Figura 44(a)), revela que la altura media para el oro rugoso esta próxima a 280nm mientras que para los sustratos de oro policristalino (Figura 44(b)) es de 30nm. Además de esta diferencia en alturas, puede observarse que su distribución es más uniforme cuando existe una estructura columnar, como es el caso del oro rugoso, respecto al oro policristalino.

Las imágenes obtenidas por AFM, así como su análisis topográfico, muestran la gran diferencia morfológica entre la estructura superficial de un electrodo de oro policristalino sin tratar, cuya rugosidad es $R=1.5$ (Figura 23) y un electrodo de oro rugoso de oro de rugosidad $R=66$ (Figura 43).

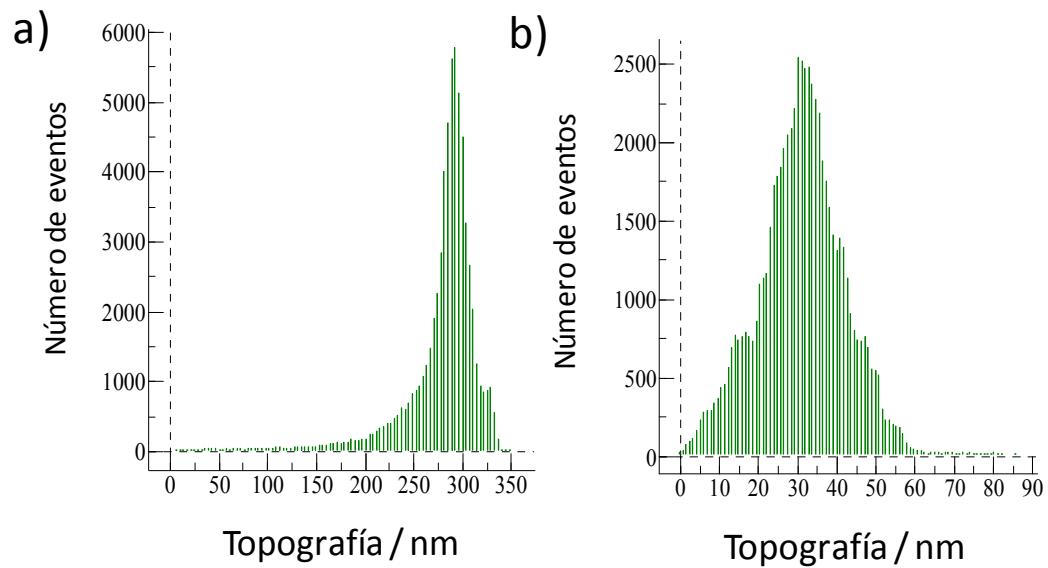


Figura 44: Análisis topográfico de un electrodo de oro rugoso, $R=66$ (a) y un electrodo de oro policristalino, $R=1.5$ (b).

Comparando los resultados experimentales obtenidos para la altura y el radio medio de las columnas de oro depositado, con los obtenidos a partir del modelo teórico, es importante reseñar que los valores de las alturas de las columnas obtenidos experimentalmente, a partir de las medidas de AFM, son menores y su radio medio es mayor (Tabla VIII).

Tabla VIII

Comparación experimental vs. teórica de las dimensiones de las columnas del oro rugoso.

	Radio medio	Altura media
Teóricamente	<i>6 nm</i>	<i>380 nm</i>
Experimentalmente	<i>20-40 nm</i>	<i>280nm</i>

Esta diferencia entre los resultados teóricos y experimentales puede ser debida por una parte a las limitaciones de la técnica de AFM y por otra al envejecimiento o *decay* de la estructura. Dicho proceso implica la coalescencia de las columnas con el tiempo, debido a la difusión superficial de los adátomos de oro de sitios de mayor potencial químico a sitios de menor potencial, con el fin de minimizar la energía libre superficial total del sistema^[189].

5.2.2.3 Difracción de Rayos-X (DRX)

La difracción de rayos X se utilizó para obtener la orientación preferencial y el tamaño medio de la cristalita del oro rugoso.

La Figura 45 muestra los difractogramas para el oro policristalino de partida (Figura 45(a)), el oro rugoso obtenido (Figura 45(b)) y el oro rugoso después de un tiempo de relajación de siete días (Figura 45(c)), durante los cuales ha tenido lugar la coalescencia parcial de la estructura columnar.

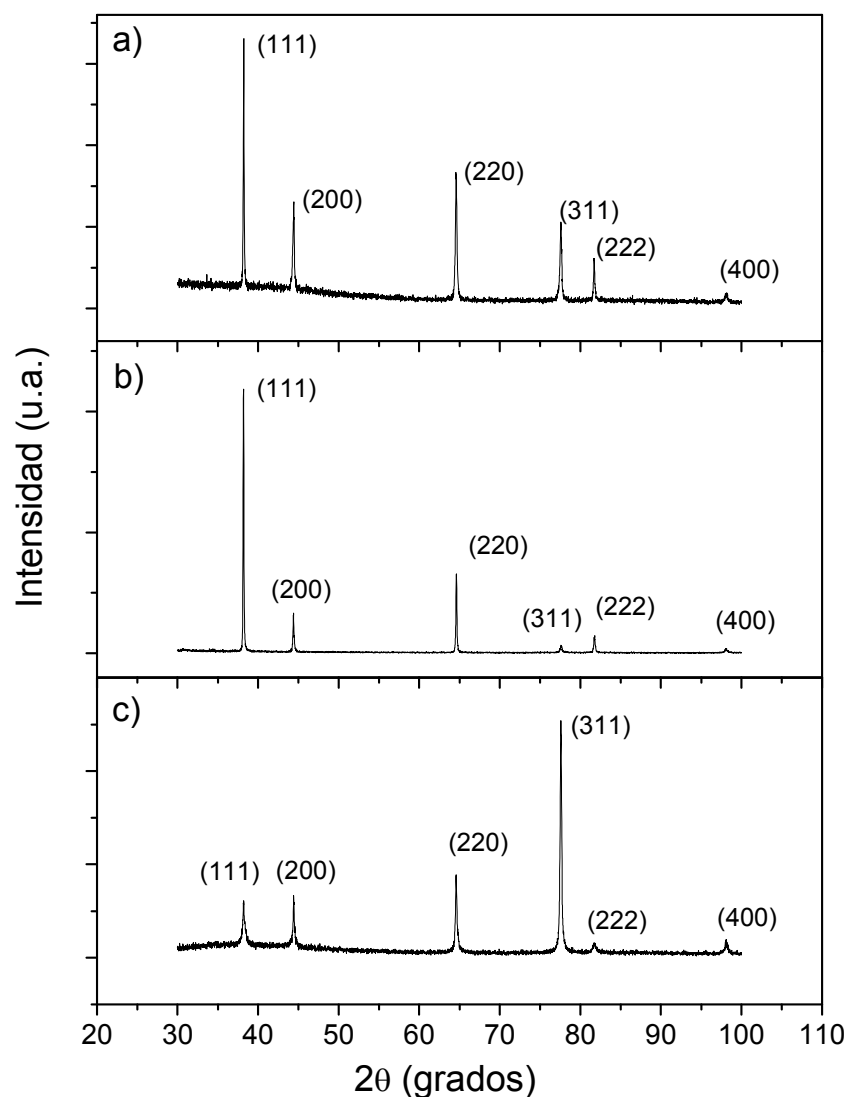


Figura 45: (a) DRX de una muestra de oro policristalino ($R=1.5$); (b) DRX de una muestra de oro rugoso obtenida mediante la aplicación de RSWPS (c) DRX de la muestra de oro rugoso después de un tiempo de relajación de siete días.

Como se puede observar en el difractograma obtenido para el oro policristalino, la señal de DRX de mayor intensidad corresponde a la orientación (111). Para el electrodo de oro rugoso se obtuvo un difractograma similar (Figura 45(b)) pero con dos excepciones. Por un lado, el cociente o la razón entre las intensidades medidas para las orientaciones preferenciales (111) y (200) tiene un valor muy elevado (8.8) si se compara con el valor obtenido para el oro policristalino (2.5) y por otro, la intensidad relativa del pico de difracción correspondiente a la orientación (311) es muy pequeña.

Dicha orientación preferencial también puede observarse en el voltamograma del oro rugoso (Figura 40(c)), donde se puede ver un cambio en el perfil voltamétrico respecto al oro policristalino de partida (Figura 40(a)) relacionado con la electroadsorción de átomos de O sobre átomos de Au.

En general la intensidad de los picos de difracción para el oro policristalino es menor, con una proporción señal/ruido mayor que la obtenida para el oro rugoso, debido al hecho de que la muestra es menos cristalina. Por lo tanto, el electrodo de oro rugoso posee una estructura más cristalina que el electrodo de oro policristalino, así como una orientación preferencial (111).

Por otro lado, el proceso de coalescencia de la estructura rugosa con el tiempo también implica el desarrollo de una orientación preferencial. La Figura 45(d) muestra el difractograma de una muestra de oro rugoso envejecida durante un periodo de siete días. En este caso el pico de difracción de mayor intensidad corresponde a la orientación (311). Este hecho es de capital importancia a la hora de utilizar este tipo de transductores para la construcción de un biosensor enzimático, puesto que si el área disminuye con el tiempo será necesario fijar la estructura rugosa mediante la inmovilización de un adsorbato (en nuestro caso un tiol /DTSP) en los primeros instantes de vida del oro electrodispersado.

A partir del difractograma de rayos X de se calculó el tamaño medio de cristalita para el oro rugoso (fundamentos teóricos página 75) (Tabla IX). Aplicando la ecuación de Scherrer^[168] para cada orientación se obtuvo un valor medio de 775 Å. Este valor es ligeramente mayor que el tamaño medio de cristalita obtenido para el oro policristalino que fue 740 Å.

Tabla IX

Resultados obtenidos a partir del difractograma de rayos X para el oro rugoso y cálculo del tamaño medio de cristalita.

Orientación	2θ	θ	$\cos \theta$	$\beta = W_{1/2} - b$	D_{hkl} (Å)
(111)	38.25	19.125	0.945	0.0784	1073.11
(200)	44.48	22.24	0.926	0.1744	492.30
(220)	64.64	32.31	0.845	0.1108	849.17
(311)	77.58	38.79	0.779	0.1491	684.51
					$\bar{D}_{hkl} = 775 \text{ \AA}$

5.2.3 Caracterización electroquímica del biosensor por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

5.2.3.1 Variación del recubrimiento de DTSP con el tiempo de adsorción

El primer paso en la construcción del biosensor de lactato es la modificación de la superficie de oro rugoso con DTSP, para posteriormente anclar la enzima covalentemente por formación de un enlace amida entre las lisinas de la enzima y los grupos succinimida del DTSP que quedan expuestos hacia el exterior.

El grado de recubrimiento del tiol (θ_{DTSP}) sobre la superficie de oro rugosa puede evaluarse empleando la espectroscopia de impedancia electroquímica, de la misma forma que para el Au_p , a partir de los valores de la resistencia a la transferencia de carga del Au_R recubierto por el tiol (R_{TC}^{DTSP}) y a recubrimiento cero (R_{TC}^0) (Ecuación 81):

$$\theta_{\text{DTSP}} = 1 - \frac{R_{\text{TC}}^0}{R_{\text{TC}}^{\text{DTSP}}}$$

Para ello se registraron los diagramas de Nyquist para varios electrodos incubados en una disolución 4mM de DTSP en DMSO durante diferentes tiempos (0min, 15min, 30min, 1.5h, 3h y 24h), en una disolución 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ en 0.1M de tampón fosfato (pH = 7) + 0.1M KCl (Figura 46).

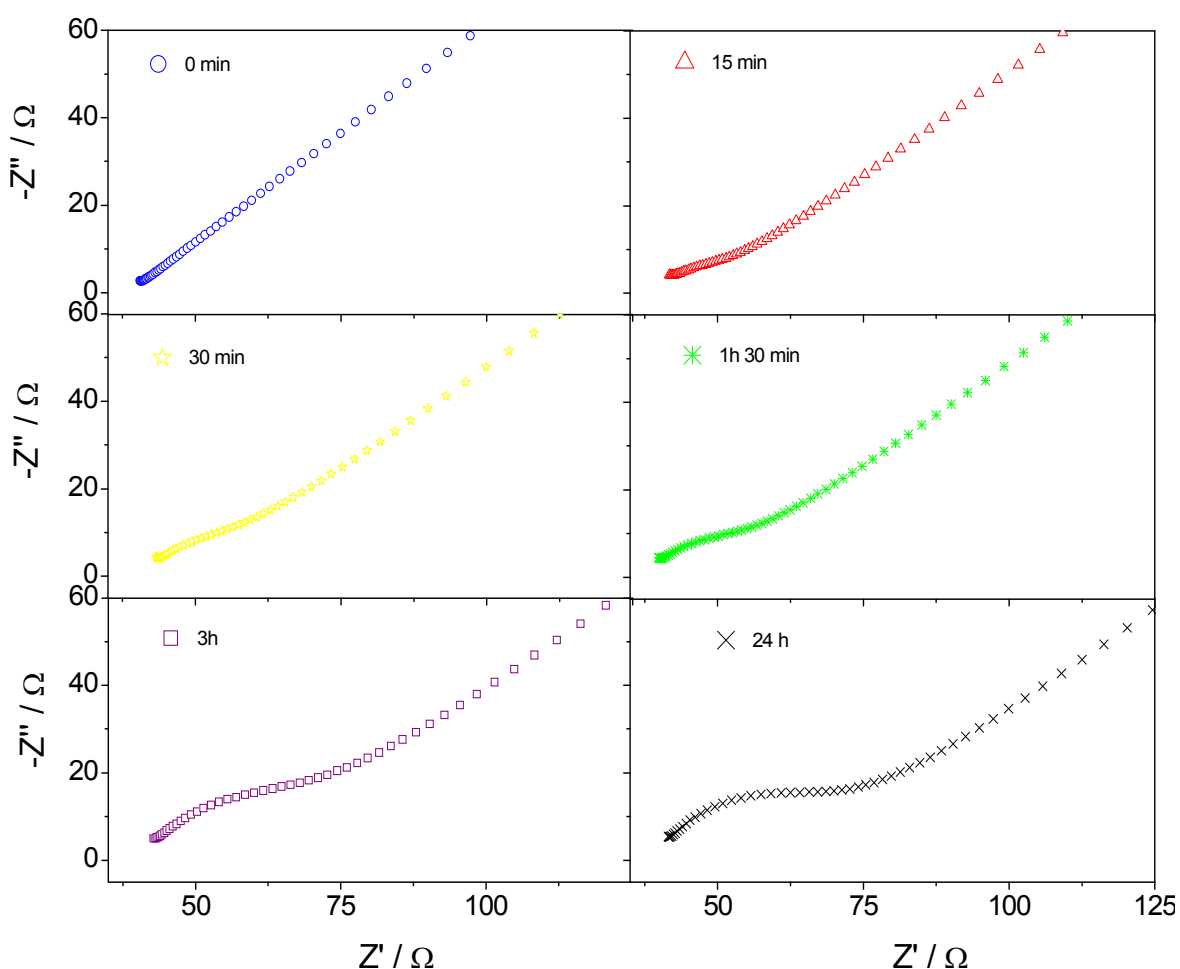


Figura 46: Diagramas de Nyquist para el Au_R modificado con DTSP a distintos tiempos de adsorción: 0 minutos (O), 15 minutos (Δ), 30 minutos (*), 1.5 horas (*), 3horas (\square), 24 horas (\times).

Para todos los electrodos de Au_R modificados con DTSP se observan dos procesos, uno de ellos relacionado con la transferencia de carga del par redox ferro/ferri que tiene lugar sobre los sitios libres del tiol (a altas frecuencias), y el proceso difusivo de dichos iones a través de la estructura rugosa tiolada, a bajas frecuencias. Sin embargo, para el oro rugoso sin modificar (Figura 46-0min) no aparece la

resistencia correspondiente al proceso cinético (R_{TC}^0). Por tanto, en el caso de los electrodos de oro rugoso es imposible determinar el valor R_{TC}^0 para recubrimiento cero, y en consecuencia el recubrimiento para cada tiempo de adsorción. En su lugar se calculó R_{TC}^{DTSP} para un tiempo de 3 horas ($394.56\Omega\cdot\text{cm}^2$) y se comparó con el de 24 horas ($425.95\Omega\cdot\text{cm}^2$) comprobándose que el grado de recubrimiento había llegado prácticamente al máximo con un tiempo de 3 horas. Por tanto, al igual que en el caso del oro policristalino, se fijó en 3 horas el tiempo óptimo de adsorción del tiol sobre los electrodos de oro rugoso con el fin de minimizar el tiempo de construcción del biosensor.

5.2.3.2 *Construcción del biosensor*

La espectroscopia de impedancia electroquímica permite detectar los cambios que se producen en la interfase electrodo-disolución. Por ello es una herramienta útil para estudiar los cambios que se producen en la interfase después de cada uno de los pasos seguidos en la construcción del biosensor.

En la Figura 47 se muestran los diagramas de Bode para un electrodo de oro rugoso (Au_R), modificado con DTSP ($\text{Au}_R\text{-DTSP}$) y modificado con DTSP y la enzima ($\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$).

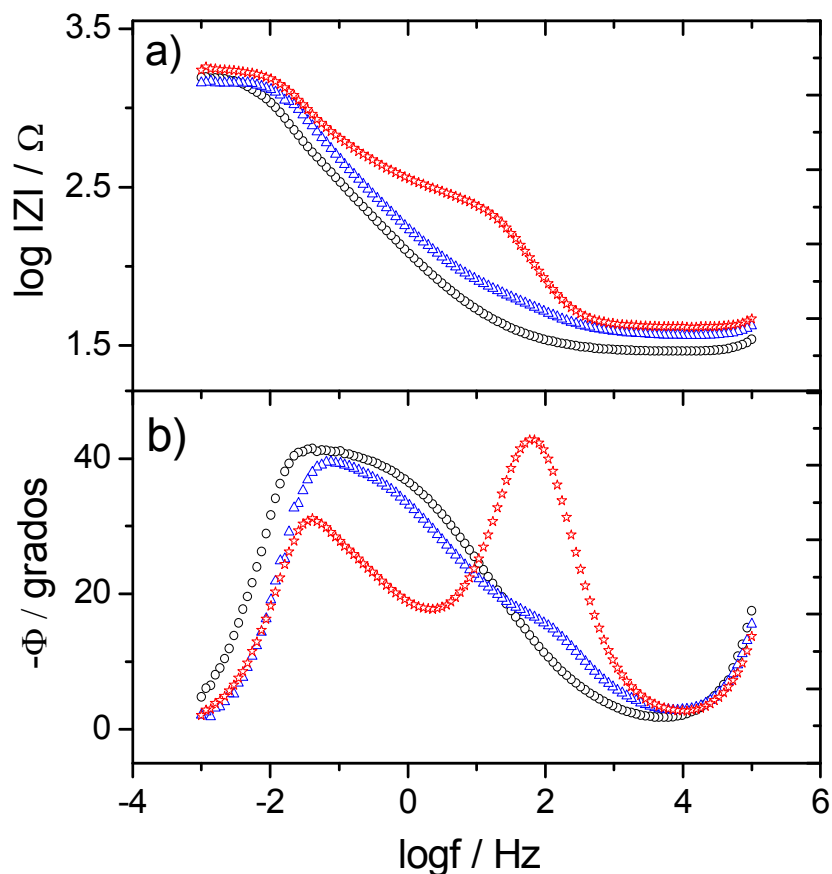


Figura 47: Diagramas de Bode: (a) Módulo de impedancia vs frecuencia y (b) ángulo de fase vs frecuencia para Au_R (o) Au_R -DTSP (Δ) Au_R -DTSP-LOx (*) medido en una disolución 0.1M KCl/0.1M tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ +10mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$.

El diagrama de Bode correspondiente al módulo de impedancia presenta un plató a altas frecuencias en los tres casos (Figura 47(a)). El valor de la impedancia en esta región, que coincide con un valor nulo del ángulo de fase ($\phi = 0^\circ$) (Figura 47(b)), nos proporciona la resistencia del electrolito (R_e) en cada caso. En el caso del Au_R a las frecuencias menores (10^2 - 10^{-2} Hz) se observa una sola pendiente, con un ángulo de fase próximo a -45° asociado a un proceso difusivo. Para el Au_R -DTSP, a frecuencias en torno a 10^2 Hz se intuye un ligero cambio de pendiente que coincide con un incipiente ángulo de fase. Este comportamiento se acentúa considerablemente para el biosensor completo (Au_R -DTSP-LOx). En este caso se observan dos pendientes y dos ángulos de fase claramente diferenciados, $\phi_{max} = -42.74^\circ$ (59.30 Hz) y $\phi_{max} = -31.07^\circ$ (0.04 Hz), asociados a un proceso cinético a altas frecuencias y a un proceso difusivo a bajas. El plató localizado entre 10 y

10^2 Hz corresponde con el valor de (R_e+R_{TC}) , pudiéndose obtener de este modo la resistencia a la transferencia de carga para el proceso redox que tiene lugar en el biosensor Au_R -DTSP-LOx. En el intervalo de frecuencias más baja (10^{-2} - 10^{-3} Hz) el ángulo de fase vuelve a estar próximo a 0° , correspondiendo con un segundo plató en el diagrama del módulo de impedancia. A partir de este valor constante de $|Z|$ se puede calcular la impedancia total del proceso ($W_R+R_{TC}+R_e$), así como la impedancia de Warburg relacionada con el proceso difusivo a través de la estructura de oro rugosa sin modificar o modificada con DTSP y LOx.

Una representación alternativa de los resultados experimentales de las medidas de EIS son los diagramas de Nyquist (Figura 48).

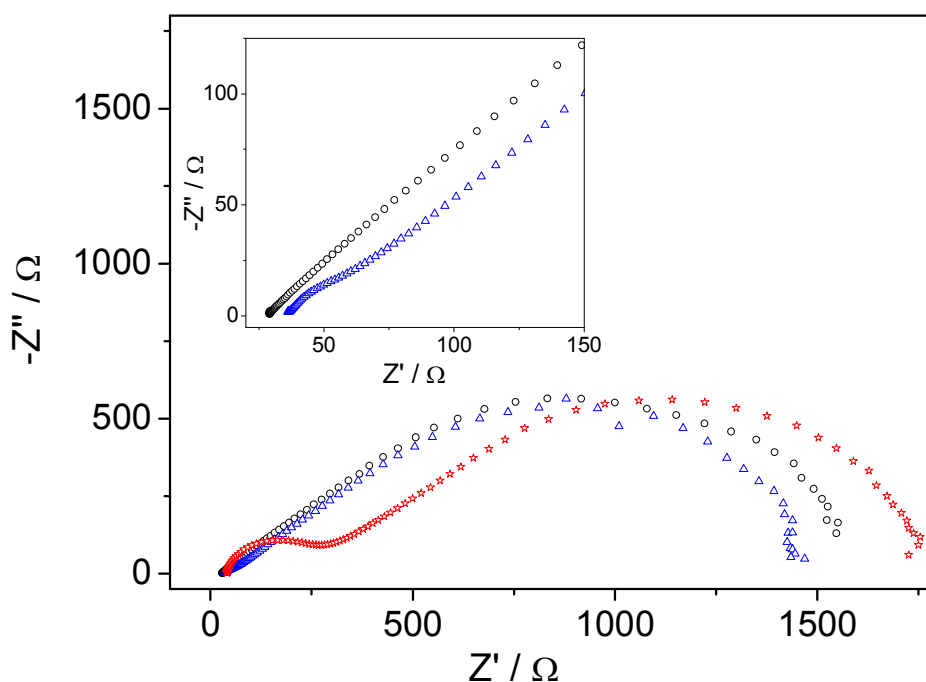


Figura 48: Diagramas de Nyquist para Au_R (o) Au_R -DTSP (Δ) Au_R -DTSP-LOx (*) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[Fe(CN)_6]^{3-}$ + 10mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$. Inset: Diagrama de Nyquist para Au_R , Au_R -DTSP.

La figura muestra dos intervalos de frecuencia bien diferenciados. A altas frecuencias (10^4 Hz), para el biosensor Au_R -DTSP-LOx aparece un semicírculo cuya intersección con el eje X, a menor frecuencia, está asociada a la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) de los iones ferro/ferricianuro en la interfase

electrolito/ Au_R -DTSP-LOx. En el diagrama correspondiente al oro rugoso modificado con el tiol (Au_R -DTSP), el semicírculo que se observa es menos pronunciado que en el caso del biosensor completo (inset Figura 48). Sin embargo, para el oro rugoso sin modificar no aparece el semicírculo característico de un proceso cinético limitante. La intersección con el eje real a altas frecuencias (10^4 Hz), corresponde a la resistencia del electrolito (R_e). Es necesario señalar que la intersección con el eje X es diferente para el Au_R y el Au_R -DTSP, reflejando la contribución de la interfase modificada a dicha resistencia.

A bajas frecuencias aparece una parte lineal debida al proceso más lento (difusivo), con la particularidad de que a muy bajas frecuencias (10^{-3} Hz), Z' se aproxima a la resistencia de Warburg (Z_{WR}) y Z'' tiende a cero. Esta conducta es característica de un proceso de difusión a través de una capa de longitud finita, en el que la difusión iónica tiene lugar a través de los canales existentes en la estructura columnar sin modificar o modificada con DTSP y enzima.

El diagrama de impedancia del oro rugoso se ha ajustado con el circuito equivalente de la Figura 49(a) puesto que no muestra la resistencia a la transferencia de carga del proceso cinético. Sin embargo, para el electrodo modificado (Au_R -DTSP y Au_R -DTSP-LOx) se ha utilizado el circuito de Randles (Figura 49(b)):

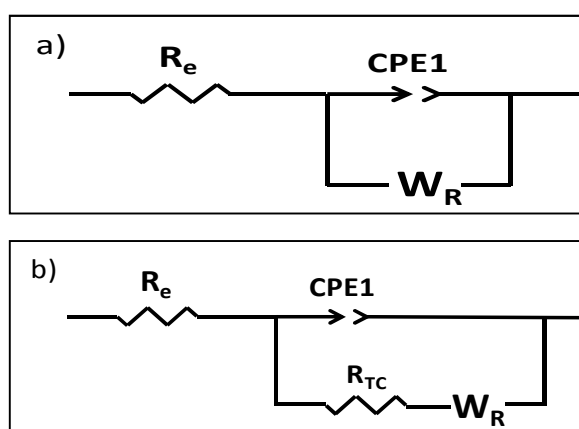


Figura 49: a) Circuito equivalente para el electrodo de oro rugoso sin modificar (Au_R); b) Circuito equivalente para el electrodo de oro rugoso modificado (Au_R -DTSP y Au_R -DTSP-LOx).

Ambos circuitos incluyen los siguientes elementos electrónicos:

- **R_e** : resistencia del electrolito medida entre el electrodo de referencia (ESM) y el de trabajo en cada caso (Au_R , Au_R -DTSP y Au_R -DTSP-LOx).
- **R_{TC}** : resistencia a la transferencia de carga del par redox en las interfases Au_R -DTSP y Au_R -DTSP-LOx debida en parte a la sobretensión intrínseca del proceso así como a la presencia de un efecto estérico.
- **CPE1**: elemento constante de fase que simula la conducta no-ideal de un capacitor. Es el resultado de una combinación en serie de la capacidad debida a la modificación superficial y la capacidad de la doble capa. Este elemento distributivo se utiliza para representar la superficie no homogénea del oro rugoso sin/o modificada.
- **Z_{WR}** : es la impedancia de Warburg de longitud finita. Representa la resistencia al proceso difusivo de los iones ferro/ferri a través de los canales existentes en la estructura columnar del oro rugoso en las interfases Au_R , Au_R -DTSP y Au_R -DTSP-LOx.

Los resultados obtenidos a partir del ajuste con sendos circuitos equivalentes, así como los resultados experimentales para el Au_R , Au_R -DTSP y el Au_R -DTSP-LOx, se muestran en la Tabla X. Con propósitos comparativos, en la tabla se han incluido otros parámetros calculados a partir de los resultados experimentales como la capacidad (C_1).

Tabla X

Resultados experimentales y de los ajustes de las medidas de impedancia para Au_R, Au_R-DTSP, Au_R-DTSP-LOx para un electrodo de rugosidad R=66.

	Au _R	Au _R -DTSP	Au _R -DTSP-LOx
<i>Resultados experimentales</i>			
Re (Ω)	29.10	35.90	41.07
R _{TC} (Ω·cm ²)	-	394.56	1575.31
k ⁰ (m·s ⁻¹)	-	6.74·10 ⁻⁷	1.69·10 ⁻⁷
C ₁ (F·cm ⁻²)	6.61·10 ⁻⁵	1.73·10 ⁻⁵	5.02·10 ⁻⁶
τ _{TC} (s)	-	6.83·10 ⁻³	7.90·10 ⁻³
Z _{WR} (Ω·cm ²)	5271.02	8400.10	9100.50
τ _ω (s)	13.37	7.19	8.40
σ (Ω·cm ² ·s ^{-1/2})	571.03	1339.04	1286.25
K (s ^{1/2})	8.24	6.04	6.53
δ (μm)	2.15	1.15	1.35
b	-0.92(-42.6°)	-0.92(-42.6°)	-0.82(-40.0°)
<i>Resultados de los ajustes</i>			
Re (Ω)	28.67	35.90	41.54
R _{TC} (Ω·cm ²)	-	143.51	1272.65
CPE1 (S·s ⁿ cm ⁻²)	1.42·10 ⁻⁴	3.90·10 ⁻⁵	6.16·10 ⁻⁶
n	0.74	0.75	0.93
Z _{WS} (Ω·cm ²)	5414.12	8743.75	9437.50
Z _{WT}	38.36	16.55	21.95
Z _{WP}	0.46	0.48	0.46
χ ²	2.4·10 ⁻⁴	9.3·10 ⁻⁴	2.1·10 ⁻⁴

Considerando los resultados obtenidos, tanto experimentalmente como los del ajuste, a partir del diagrama de Nyquist para el oro rugoso sin modificar (inset Figura 48 y Tabla X), se observa solamente el proceso de la difusión iónica a través de la estructura rugosa como muestra la recta de pendiente 0.92 y ángulo de fase 42.6°. Sin embargo, al modificar el electrodo con la monocapa de tiol (Au_R-DTSP) aparece el proceso cinético, cuya resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) es de 394.56Ω·cm⁻², la cual aumenta con la presencia de la enzima (Au_R-DTSP-LOx) hasta

un valor de $1575.31\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$ (Tabla X). Este aumento en la resistencia a la transferencia de carga al pasar del $\text{Au}_R\text{-DTSP}$ al $\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$ está justificado, ya que la presencia de las moléculas de DTSP quimisorbidas sobre Au_R a través del enlace Au-S, así como la enzima inmovilizada covalentemente, impiden la transferencia electrónica entre las moléculas de ferro/ferricianuro y la superficie del electrodo. Sin embargo, los valores obtenidos para la R_{TC} en el caso del oro electrodisperso modificado son hasta 20 veces más altas que para el oro policristalino modificado (Tabla X y Tabla IV). Dicho aumento puede ser debido al impedimento estérico que ofrece este tipo de estructura cuando está funcionalizada con el tiol (o con el tiol y la enzima) frente al tamaño de la sonda redox.

Teniendo en cuenta la relación lineal existente entre la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) y la densidad de corriente de intercambio en el equilibrio a campo bajo (Ecuaciones 88 y 89), se puede obtener el valor de la constante de velocidad de transferencia electrónica para el par redox ferro/ferricianuro (ecuación 90):

$$k^0 = \frac{RT}{(n^2 F^2 R_{TC} C)}$$

El valor de k^0 para el par redox en el electrodo de Au_R modificado con DTSP fue $6.74\cdot 10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Después de la inmovilización de la enzima sobre el oro rugoso modificado ($\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$), la constante de velocidad de transferencia de carga disminuye unas cuatro veces ($1.69\cdot 10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) (Tabla X). Es necesario señalar que ambos valores son en torno a un orden de magnitud menor que para el mismo proceso cinético sobre un transductor de oro policristalino.

Por otro lado, la capacidad disminuye desde un valor de $6.61\cdot 10^{-5} \text{ F}\cdot\text{cm}^{-2}$ para el Au_R , hasta $5.02\cdot 10^{-6} \text{ F}\cdot\text{cm}^{-2}$ para el biosensor completo ($\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$). La misma tendencia se observa en los valores de capacidad obtenidos a partir del

ajuste de los valores experimentales con los circuitos eléctricos equivalentes, en los que el valor del CPE1 para el biosensor completo disminuye un orden de magnitud respecto al Au_R-DTSP. Es importante destacar que el valor de n , asociado con el CPE1, aumenta en presencia de la enzima, indicando un aumento en el carácter capacitativo de la interfase enzima/disolución.

Para altas frecuencias, el diagrama de Nyquist representa la impedancia de Warburg (Z_{WR}) debido a un proceso difusional a través de una capa de longitud finita. El valor de Z_{WR} obtenido para el Au_R fue de $5271.02 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Además, en este intervalo de frecuencia, el valor de pendiente (Z'' vs. Z') próximo a la unidad, junto con un ángulo de fase cercano a 45° y el valor de $Z_{WP} \sim 0.5$ (Tabla X), indican que el proceso más lento es la difusión de los iones $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a través de la estructura columnar de oro electrodisperso. Como era de esperar la funcionalización superficial (Au_R-DTSP y Au_R-DTSP-LOx) incrementa el valor de Z_{WR} alcanzando $9100.50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ para el biosensor completo. Por tanto la estructura rugosa del transductor no mejora los parámetros cinéticos del biosensor construido sobre Au_p, i.e. la constante de velocidad de la transferencia de carga y la difusión iónica hacia la superficie electródica.

Como ya hemos mencionado estos dos procesos también se pueden identificar claramente a partir de los diagramas de Bode, tanto en la representación del módulo de impedancia como del ángulo de fase frente a la frecuencia (Figura 47). Para el biosensor completo (Au_R-DTSP-LOx) el sistema muestra claramente dos pendientes con dos constantes de tiempo distintas (τ_{TC} , τ_w), una a altas frecuencias que corresponde al control cinético y la otra a frecuencias bajas correspondiente con un proceso controlado por difusión.

Las constantes de tiempo correspondientes a los procesos de transferencia de carga (τ_{TC}) y a los procesos de difusión (τ_w) se calcularon a partir de los valores de ω_{max} y ω_{max}^w , que corresponden a los valores de la frecuencia máxima en el primer y el segundo semicírculo del diagrama de Nyquist respectivamente.

Para ello se emplearon las ecuaciones (91) y (92)^[156]:

$$\tau_{TC} = 1/\omega_{max} = R_{TC}C_1$$

$$\tau_w = 1/\omega_{max}^w = K^2/5.08$$

El valor de la constante de tiempo correspondientes a los procesos de transferencia de carga aumenta ligeramente de $6.83 \cdot 10^{-3}$ s para Au_R-DTSP a $7.90 \cdot 10^{-3}$ s para Au_R-DTSP-LOx, mostrando que la doble capa necesita más tiempo para completar su carga cuando el Au_R está modificado con DTSP ó DTSP-LOx. Por otro lado el valor de la constante de tiempo τ_w correspondiente a los procesos de difusión muestra valores altos en los tres casos indicando el control difusional.

A partir de ω_{max}^w también es posible calcular la constante K definida por Dawson and John (1980)^[183] como:

$$K = \delta \left(\frac{2}{D} \right)^{1/2}$$

siendo **D** el coeficiente de difusión de las especies iónicas y **δ** el espesor de la capa de difusión. Los valores de δ obtenidos a partir de K están en torno a 2 μ m y son del mismo orden que los correspondientes a tiempos de carga de la doble capa.

La constante K está relacionada con la parte real de la impedancia de Warburg (Z_{WR}) y el coeficiente de Warburg (σ), siendo $Z_{WR} = \sigma K$. Puesto que para el biosensor Au_R-DTSP-LOx, $Z_{WR} \ll \sigma K$ podemos concluir que el sistema está controlado por difusión (Tabla X). La elevada resistencia de Warburg provocada por la difusión de los iones a través de la estructura rugosa, hacen que en estos biosensores el control sea por difusión, al contrario de lo que ocurre en el biosensor construido sobre oro policristalino, en que el sistema con una relación $R_{TC} \sim \sigma K$ es característico de un control mixto.

Si comparamos los resultados obtenidos mediante espectroscopia de impedancia electroquímica para el biosensor construido sobre un electrodo de oro policristalino (Tabla IV) con los obtenidos para el biosensor construido sobre oro rugoso, el resultado más destacable es que el valor de la constante de velocidad ($k^0(m \cdot s^{-1})$) del proceso redox es un orden de magnitud mayor para el biosensor construido sobre un transductor de oro policristalino. El hecho de que la cinética del mediador sea más lenta sobre los soportes nanoestructurados, permite que la reacción entre la enzima reducida (LOx_{Rd}) y el mediador oxidado (HMF_{Ox}) sea más efectiva, como muestran las corrientes catalíticas obtenidas en los voltamogramas cíclicos para el Au_R (Figura 51), independientemente de que además la razón área/volumen para estos electrodos sea mayor.

5.2.4 Respuesta del biosensor

La respuesta del biosensor de lactato oxidasa se basa en la oxidación de L-lactato a piruvato en presencia de hidroximetilferrocinio (HMF)_{Ox} que actúa como aceptor de los electrones generados en la reacción enzimática, transformándose en su forma reducida. Este mediador difunde hacia el electrodo, donde es reoxidado. De este modo podemos considerar que el electrodo actúa como un aceptor secundario de electrones, regenerando el mediador redox empleado en la reacción enzimática de acuerdo al esquema siguiente:

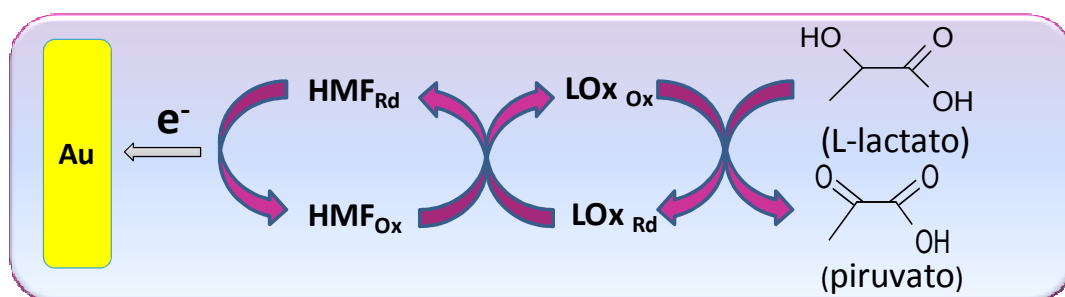


Figura 50: Esquema del ciclo catalítico de un biosensor de Lactato Oxidasa

La reoxidación del HMF sobre la superficie del electrodo conduce a una respuesta catalítica del biosensor proporcional a la concentración de sustrato presente en disolución.

5.2.4.1 *Respuesta del biosensor en función del tipo de inmovilización*

Con el fin de estudiar la influencia del método de anclaje de la enzima sobre los electrodos de oro rugoso, se registró la respuesta voltamétrica de un biosensor preparado mediante inmovilización por adsorción (Au_R -LOx) (Figura 51(b)) y se comparó con un biosensor preparado por inmovilización covalente a través de DTSP (Au_R -DTSP-LOx) (Figura 51(a)). Los voltamogramas se obtuvieron en una disolución 0.1M PBS (pH = 7.0) conteniendo 1.0mM HMF. Las curvas A y C corresponden a la respuesta redox característica del par redox ferroceno/ferrocinio en medio acuoso, mientras que después de la adición de una concentración 14mM de L-lactato, se observa un aumento de la corriente del pico anódica a la vez que disminuye la intensidad de corriente catódica característico de un proceso electrocatalítico. Comparando las corrientes electrocatalíticas obtenidas para ambos biosensores (curvas B y D) con la obtenida para el biosensor de referencia construido sobre el electrodo policristalino (Figura 35), se observa que el efecto electrocatalítico es mucho más relevante en los biosensores construidos sobre la superficie rugosa, demostrando que el empleo de la superficie nanoestructurada en la construcción del biosensor aumenta significativamente la respuesta del dispositivo resultante. Este efecto es mayor en el caso del biosensor en el que la enzima se ha anclado covalentemente mediante DTSP (Au_R -DTSP-LOx) que en el construido por adsorción directa de la enzima sobre el electrodo (Au_R -LOx).

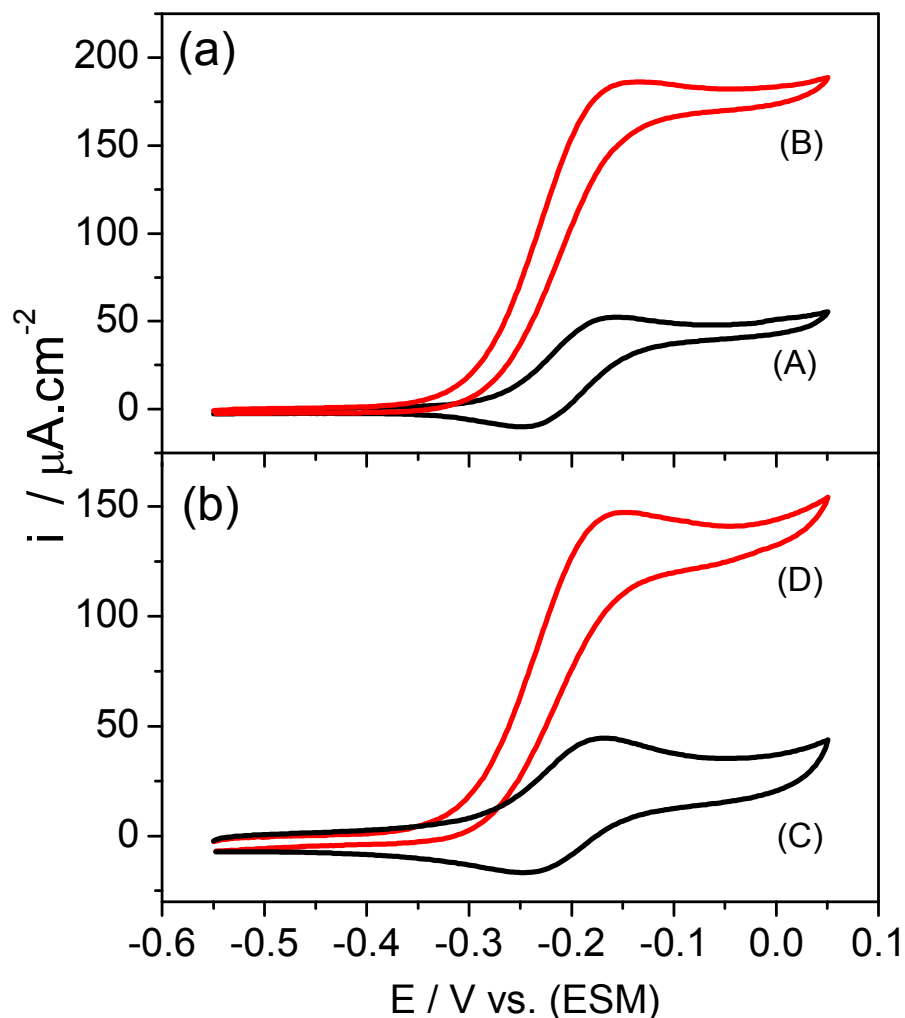


Figura 51: Voltamograma cíclico del biosensor de lactato oxidasa construido sobre: a) un electrodo de oro rugoso modificado con DTSP (Au_R-DTSP-LOx), y b) un electrodo de oro rugoso sin modificar (Au_R-LOx) obtenidos en ausencia (curvas A y C) y en presencia (curvas B y D) de 14mM de L-lactato (curva b) en 0.1M PBS (pH = 7.0) conteniendo 1.0mM HMF. ($\nu = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$).

Para confirmar el papel que juega la enzima en la respuesta catalítica en presencia de sustrato se registraron los voltamogramas cíclicos de un electrodo de oro rugoso sin modificar y modificado con DTSP, en 0.1M PBS (pH = 7.0) conteniendo 1.0mM HMF. Los resultados muestran que en ausencia de la enzima, después de la adición del sustrato (L-lactato), no se produce ninguna corriente catalítica asociada, y tan sólo se observa la respuesta voltamétrica asociada al proceso redox ferroceno/ferrocinio.

Curvas de calibrado

La Figura 52 representa las curvas de calibrado ($(i - i_0)$) vs la concentración de sustrato (L-lactato), tanto del biosensor construido (a) sobre oro rugoso modificado con el tiol ($\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$) (b) como sin modificar $\text{Au}_R\text{-LOx}$.

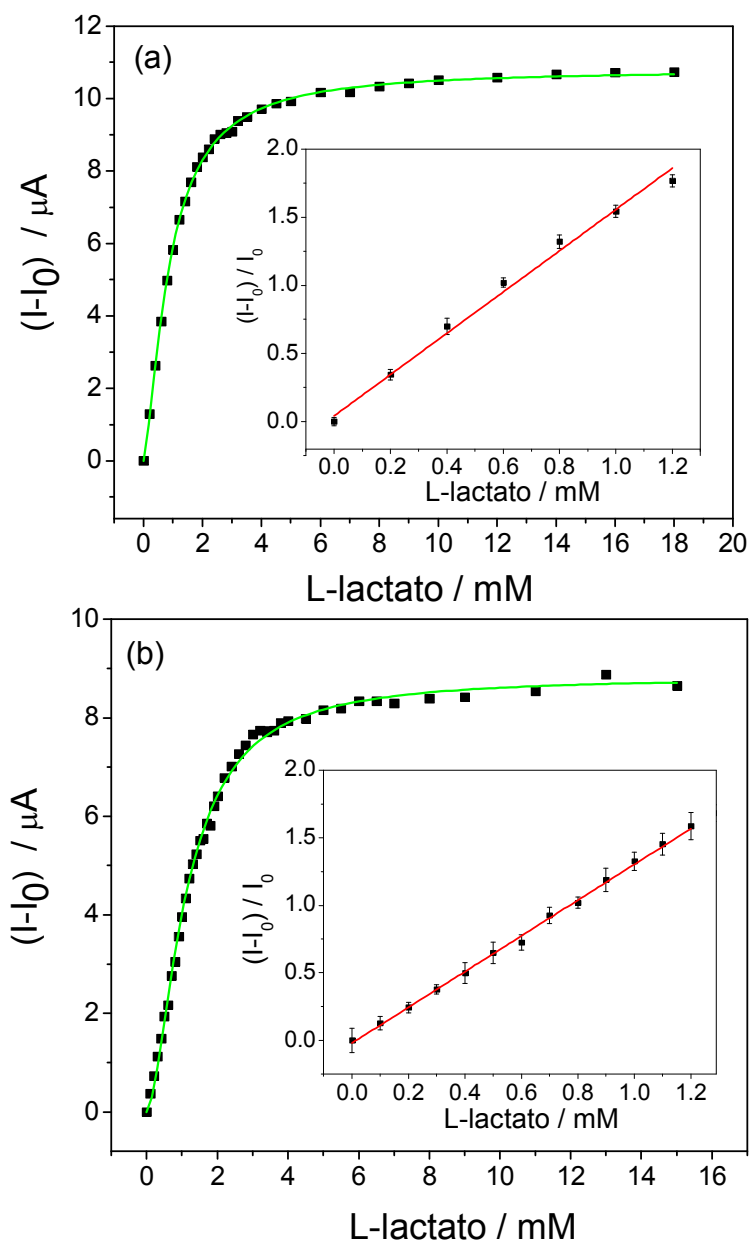


Figura 52: Curvas de calibrado obtenidas a partir de la corriente máxima menos I_0 del voltamograma obtenido en PB a pH=7 en presencia de cantidades crecientes de sustrato para a) $\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$ y b) $\text{Au}_R\text{-LOx}$. El inset corresponde al intervalo lineal en cada caso. (•) Resultados experimentales y (—) ajuste mediante regresión no lineal.

El valor de la corriente catalítica (I) fue calculado a partir de la corriente estacionaria de los voltamogramas a concentraciones crecientes de L-lactato (entre 0.0 y 14.0 mM) sustrayéndole después la corriente obtenida en ausencia de L-lactato (I_0) y normalizando posteriormente para eliminar la contribución del área. Cada punto de la gráfica representa la media de tres medidas y su desviación. La respuesta electrocatalítica obtenida se empleó como señal analítica en la determinación de la concentración de L-lactato.

Como se puede observar, la forma de ambas curvas corresponde a un comportamiento michaeliano, lo que indica que la respuesta electroquímica está bajo control enzimático. A partir del ajuste de los resultados experimentales mediante regresión no lineal se calculó el valor de la constante aparente de Michaelis-Menten (K_M), que corresponde al valor de la concentración de sustrato cuando la señal es la mitad de la máxima $\left(\frac{(I-I)_{max}}{2}\right)$. Este parámetro, que indica el grado de afinidad de la enzima por el sustrato, aumenta considerablemente en los biosensores fabricados sobre oro rugoso respecto a los fabricados sobre el electrodo de oro sin nanoestructurar, indicando que la afinidad enzima-sustrato es menor sobre el soporte rugoso. Los valores de K_M obtenidos para Au_R -LOx y Au_R -DTSP-LOx fueron 0.77mM y 0.93mM respectivamente, mientras que para el oro policristalino (Au_p -DTSP-LOx) fue de 0.27mM. Esto indica que no sólo el soporte, sino también el tipo de unión afecta a la constante de Michaelis-Menten (K_M) y por tanto a la afinidad de la enzima inmovilizada por el sustrato.

Cálculo de las constantes cinéticas del biosensor

A partir de las representaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor $\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$ (Figura 53), se pueden calcular los valores de K_M e $(I - I_0)_{max}$, así como el intervalo de concentraciones para el que se cumple la cinética michaeliana.

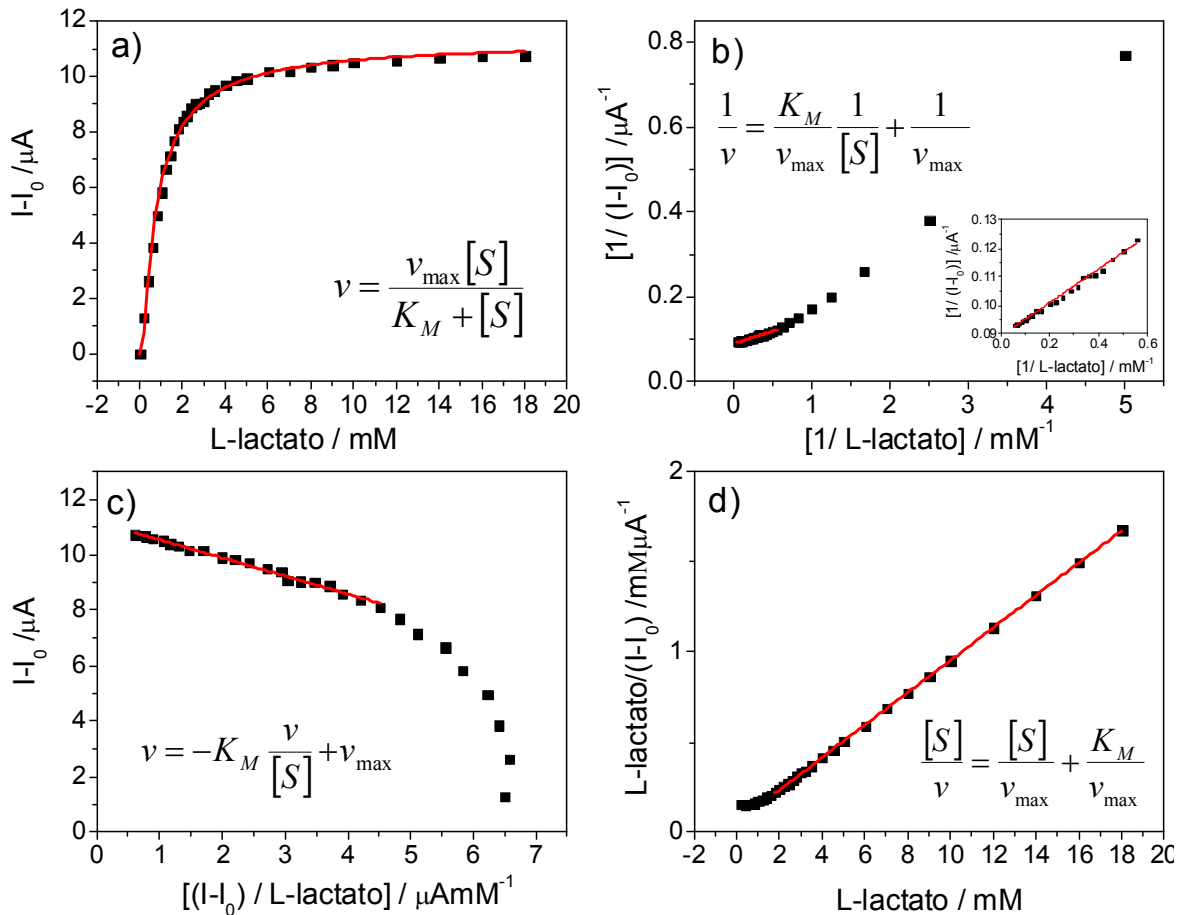


Figura 53: Distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre un transductor de oro rugoso ($\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$): a) Ajuste mediante regresión no lineal, b) Representación de Lineweaver Burk, c) Representación de Eadi-Hofstee, d) Representación Hanes.

Como podemos observar en la Figura 53, en el sistema basado en oro rugoso ($\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$), las representaciones de Lineweaver Burk (b), Eadi-Hofstee (c) y la de Hanes (d), pierden la linealidad a concentraciones bajas de sustrato. Esto puede ser debido, por una parte, a las limitaciones para la difusión tanto de sustrato como de producto que puede presentar la estructura columnar de estos electrodos.

Tabla XI

Parámetros obtenidos a partir de las distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre oro rugoso (Au_R-DTSP-LOx).

	Regresión no lineal	Lineweaver Burk	Eadi-Hofstee	Hanes
$(I-I_0)_{\max}$ (μA)	10.755±0.008	26.046±0.003	11.25±0.04	11.196±0.001
K_M (mM)	0.93±0.06	1.520±0.001	0.65±0.01	0.61±0.001
Intervalo lineal (mM)	-	1.8-18.0	1.8-18.0	1.8-18.0

Por otra parte, considerando el modelo cinético desarrollado por Lyons^[132] (Fundamentos teóricos página 40), correspondiente a un biosensor electroquímico con una monocapa de enzima inmovilizada y un mediador soluble, cuando la constante catalítica (k_c) y la constante k para la regeneración del enzima oxidado y del mediador reducido ($m_L = m^\infty$) son muy rápidas, se obtiene la ecuación (28):

$$\frac{1}{J_S} = \frac{K_M}{k_c e_{\Sigma} L K_S S^\infty} \left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)^{-1}$$

La representación de $1/J_S$ vs. $1/S^\infty$ (representación similar a la de Lineweaver Burk/Figura 53 (b)), sería lineal si el término $\left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)$ no es significativo. Esto se debe a que el flujo de sustrato (J_S) es mucho menor que el flujo máximo de sustrato (J_{DS}) ($J_S \ll J_{DS}$). Sin embargo, para flujos mayores de sustrato el término $\left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)$ no es despreciable dando lugar a una desviación de la linealidad.

Por tanto la desviación de la linealidad obtenida para concentraciones bajas de L-lactato en el biosensor construido sobre un electrodo de oro rugoso, se debe a que aparecen efectos de polarización por concentración de sustrato.

5.2.4.2 *Determinación de las propiedades analíticas del biosensor*

Las propiedades analíticas de los biosensores construidos mediante inmovilización covalente de la enzima (Au_R -DTSP-LOx) y por adsorción directa (Au_R -LOx), se obtuvieron a partir de las rectas de calibrado (inset de la Figura 52) y se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII

Propiedades analíticas de los biosensores Au_P -DTSP-LOx, Au_R -DTSP-LOx y Au_R -LOx.

	Au_P -DTSP-LOx	Au_R -DTSP-LOx	Au_R -LOx
Respuesta lineal (mM)	<i>Hasta 0.2</i>	<i>Hasta 1.2</i>	<i>Hasta 1.2</i>
Sensibilidad ($\mu A \text{ mM}^{-1}$)	<i>0.99±0.04</i>	<i>1.49±0.06</i>	<i>1.32±0.02</i>
Límite de detección (μM)	<i>14.40</i>	<i>21.54</i>	<i>2.60</i>
Límite de determinación (μM)	<i>48.01</i>	<i>71.80</i>	<i>8.66</i>
Repetibilidad (R.S.D.)	<i>0.3%</i>	<i>0.5%</i>	<i>0.5%</i>
Reproducibilidad (R.S.D.)	<i>2.9%</i>	<i>3.9%</i>	<i>5.0%</i>
Estabilidad	<i>50%</i>	<i>15%</i>	<i>12%</i>

Los valores de sensibilidad calculados a partir de la pendiente de la recta aumentan hasta $1.49 \mu A \cdot \text{mM}^{-1}$ para el Au_R -DTSP-LOx y $1.32 \mu A \cdot \text{mM}^{-1}$ para el Au_R -LOx respecto al valor de $0.99 \mu A \cdot \text{mM}^{-1}$ obtenido para Au_P -DTSP-LOx. Aunque las superficies rugosas proporcionan una mayor sensibilidad, los límites de detección y determinación del Au_R -DTSP-LOx ($21.54 \mu M$ y $71.80 \mu M$ respectivamente) no mejoran cuando se comparan con el biosensor construido sobre el electrodo de oro policristalino ($14.40 \mu M$ y $48.01 \mu M$ respectivamente). Sin embargo para el Au_R -LOx, estos parámetros alcanzan valores de $2.60 \mu M$ y $8.66 \mu M$.

Los análisis llevados a cabo para determinar la desviación estándar relativa de cinco medidas sucesivas con un mismo biosensor (repetitividad) y la reproducibilidad, empleando cinco biosensores distintos, se llevaron a cabo para una concentración de L-lactato 0.6mM . Los valores obtenidos fueron muy similares

a los encontrados para el Au_p-DTSP-LOx, consiguiéndose resultados ligeramente mejores en el caso de la modificación covalente (ver Tabla XII).

La estabilidad del biosensor fue calculada a partir de la respuesta electrocatalítica del biosensor para una concentración 0.5mM de L-lactato durante un mes, y almacenando el dispositivo en tampón fosfato a pH=7 a una temperatura de 4°C entre medida y medida. Para el Au_R-DTSP-LOx la respuesta disminuyó en torno a un 15% de su valor inicial después de un ensayo y se mantuvo constante durante un mes. Es sorprendente que el biosensor construido por adsorción directa sobre el electrodo rugoso (Au_R-LOx) presenta una estabilidad similar a la del construido por unión covalente. Este es un efecto de este transductor, ya que en ambos casos este parámetro mejora considerablemente respecto al construido sobre el electrodo policristalino, en el que la disminución de la señal alcanza el 50%.

5.3 TRANSDUCTOR DE ORO MACROPOROSO TRIDIMENSIONAL ORDENADO (3DOM)

Desde el punto de vista tecnológico, los sólidos macroporosos tridimensionalmente ordenados (3DOM) han sido profusamente estudiados en la última década, debido a su gran variedad de aplicaciones, entre las que destacan su empleo como cristales fotónicos, así como en catálisis, sistemas de separación, sensores, dispositivos magnéticos de almacenamiento de datos, etc.

En concreto, las superficies de oro 3DOM poseen unas fascinantes propiedades, tales como elevada conductividad, gran área superficial, alta estabilidad y biocompatibilidad^[15], que las convierte en un sustrato propicio para su empleo en biosensores.

Una manera de desarrollar materiales metálicos macroporosos controlando el tamaño y la disposición espacial de los poros, es el uso de estructuras de cristales coloidales como molde, para posteriormente electrodepositar el metal de interés entre los intersticios existentes entre las esferas^[190-192]. Posteriormente, las esferas se eliminan mediante un disolvente apropiado y se obtienen estructuras metálicas macroporosas inversas altamente ordenadas^[55, 193].

Debido a su gran superficie en relación al volumen, este tipo de estructura se puede considerar como un buen candidato para emplearse como transductor electroquímico en biosensores, ya que permite la inmovilización de una mayor cantidad de moléculas de enzima. Además de la ventaja evidente que supone el aumento de área electroactiva, estos nuevos transductores electroquímicos poseen otras propiedades interesantes, como el hecho de proporcionar un buen “microambiente” para el mantenimiento de la actividad biológica de la enzima, y además, al tratarse de una red metálica tridimensional interconectada, ofrece una mayor conductividad para la transferencia electrónica^[26].

Otra de las ventajas interesantes que presentan es que las enzimas adsorbidas retienen su actividad biológica, lo que no ocurre sobre otros materiales electródicos, como las superficies metálicas pulidas, debido probablemente a la mayor libertad de orientación que poseen las biomoléculas inmovilizadas sobre los materiales nanoestructurados^[186]. Por todo esto, la preparación y el empleo de superficies electródicas nanoestructuradas constituyen una línea de investigación de gran interés y actividad en electroanálisis.

En el presente capítulo se describe la preparación de sólidos de oro macroporoso tridimensionalmente ordenados, que pueden ser utilizados como transductores nanoestructurados para su empleo en el diseño de biosensores de lactato. Como veremos, este tipo de soporte mejora significativamente los resultados obtenidos previamente para los soportes de oro policristalino y en algunos aspectos a los de oro rugoso.

Cristales coloidales - Ensamblaje de las esferas

Entre los diversos métodos de crecimiento coloidal, vamos a centrarnos en los métodos basados en crecimiento capilar y su dependencia con las interacciones inter-partículas, el sustrato y la manipulación del menisco del disolvente.

Un sistema coloidal consiste en una dispersión de partículas insolubles, generalmente con dimensiones menores a $1\mu\text{m}$, en un disolvente. Cuando las partículas del sistema se ordenan en una matriz periódica, estas forman un cristal coloidal^[194].

Fischer y Zingsheim en 1981^[195] fueron los primeros en publicar un método para fabricar estructuras superficiales sub-microscópicas mediante una monocapa ordenada de partículas coloidales. El método se basa en la simple aplicación de una suspensión coloidal de partículas de 312nm de diámetro sobre una superficie de vidrio y dejarla evaporar. Posteriormente, los huecos intersticiales que quedan entre las esferas se llenan con platino mediante deposición en vacío. Sin embargo,

el autoensamblaje de las esferas simplemente por fuerzas gravitatorias es muy lento, lo que limita su aplicación ya que puede tardar incluso meses en terminar el proceso^[196]. La velocidad de sedimentación dependerá del tamaño y densidad de las partículas. Posteriormente, para agilizar este proceso, se aplicaron técnicas como la filtración y centrifugación^[197, 198], que disminuían el tiempo de preparación de la muestra, pero no ofrecían un buen control sobre la calidad del ensamblaje ni sobre el espesor del cristal. En el caso de esferas de sílice, cuya superficie está cargada negativamente a $\text{pH} > 2.5$, la velocidad se puede incrementar mediante la aplicación de un campo eléctrico^[199]. Este método se conoce como método de deposición electroforético^[200] y consiste en situar la suspensión coloidal entre dos electrodos paralelos y aplicar un voltaje en una u otra dirección con el fin de aumentar o disminuir la velocidad de la deposición.

Otros métodos destacados descritos para la obtención de monocapas coloidales son, por ejemplo el método litográfico utilizado por Hulteen y Van Duyne^[201], en el que mediante spin-coating consigue monocapas y capas dobles de esferas de poliestireno, variando la concentración de partículas y la velocidad de rotación. Por otro lado Micheletto y col.^[202] introdujeron otro método simple para la fabricación de monocapas. Este método condujo a buenos resultados para esferas de menos de 50nm de diámetro, y consiste en depositar una gota de la dispersión coloidal sobre un sustrato de vidrio y situarlo en una caja hermética controlando la velocidad de evaporación mediante la temperatura y la humedad.

Para la obtención de cristales coloidales 3D sobre superficies planas, el método más utilizado y eficaz es el desarrollado por Jiang y col.^[203], basado en el **método de deposición vertical**, que consiste en introducir una lámina de vidrio en posición vertical en un vial que contiene la suspensión de esferas y mantenerlo totalmente inmóvil a una temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, induciendo de este modo a un autoensamblaje de las partículas por evaporación sobre el sustrato. Mediante este método se pueden obtener muestras con un espesor desde dos

hasta cien capas de esferas en función del tamaño de las esferas y de la concentración de la disolución coloidal.

El mecanismo por el cual se ensamblan las esferas es muy similar al descrito por Nagayama para la formación de cristales coloidales sobre superficies planas^[204]. En él las fuerzas capilares son las responsables del ordenamiento de las esferas. Durante el proceso de evaporación del disolvente del sistema coloidal, debido a la tensión superficial en la interfase aire-esfera, se desarrollan fuerzas de atracción capilares, entre las esferas, que son las responsables de la organización del sistema. La Figura 54 representa estas fuerzas capilares de atracción lateral entre partículas, que aparecen cuando el menisco que se forma en torno a cada esfera queda por debajo del diámetro de la misma, es decir cuando $2R > h$, siendo R el radio de la esfera y h la altura del nivel del disolvente. Estas fuerzas capilares son lo bastante fuertes como para generar la agregación ordenada de las esferas^[204]. Concretamente, la componente horizontal de las fuerzas de tensión superficial es la responsable de la atracción entre las esferas.

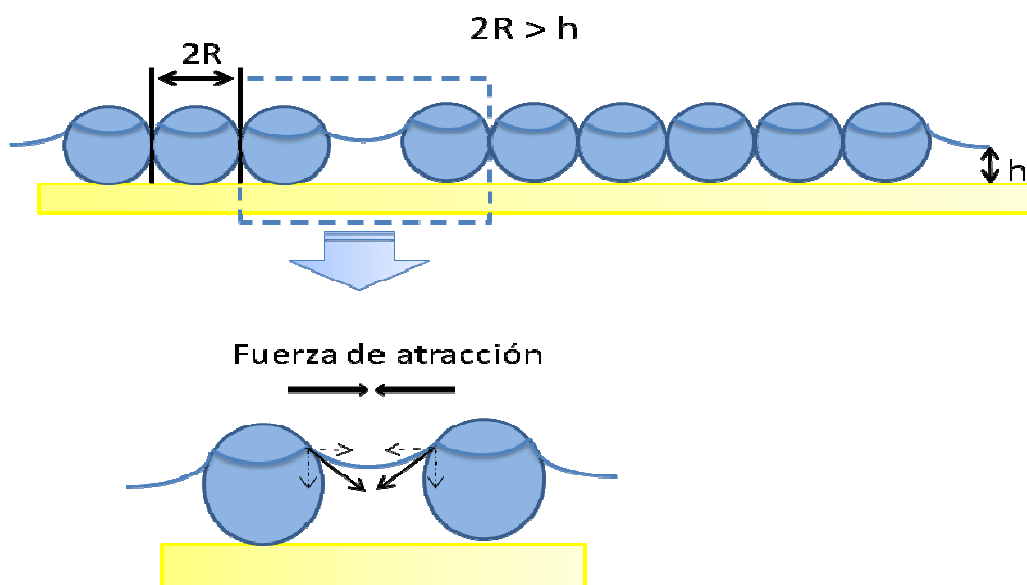


Figura 54: Fuerzas de atracción capilar.

En el método de deposición vertical, el proceso de ensamblaje por el cual las esferas se colocan de forma ordenada sobre el sustrato, se basa en el esquema de

la Figura 55. En él se muestran las principales fuerzas implicadas en la deposición de las esferas durante la evaporación: *fuerza de gravedad*, *interacción electrostática entre las esferas y la superficie* y *fuerzas capilares*.

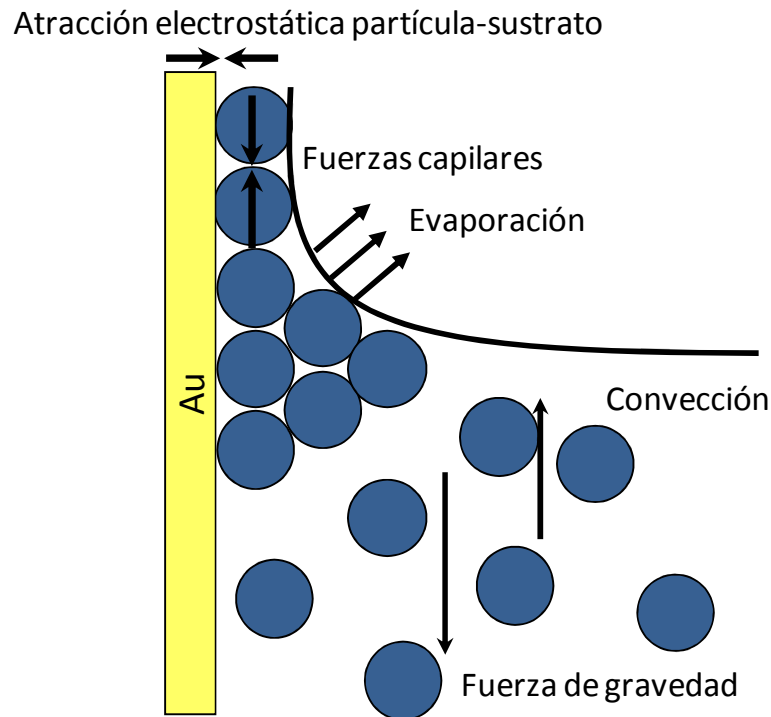


Figura 55: Esquema de las fuerzas implicadas en la deposición vertical de las esferas.

La fuerza gravitacional en el caso de esferas de PS no es muy significativa, ya que su densidad (1.05g/cc) es cercana a la del agua. La interacción electrostática entre sustrato y partícula es atractiva y la convección de las esferas generada por la evaporación del agua, es la fuerza que las transfiere desde las inmediaciones del menisco hacia el sustrato^[205].

Según describieron Nagayama y col.^[205] (Figura 56), la evaporación del agua del *film* (j_e) se ve compensada por un flujo de agua (j_w), y el consiguiente flujo de partículas (j_p) genera la acumulación de estas sobre el sustrato. Estos flujos unidos a las interacciones entre partículas dan lugar a la matriz de esferas.

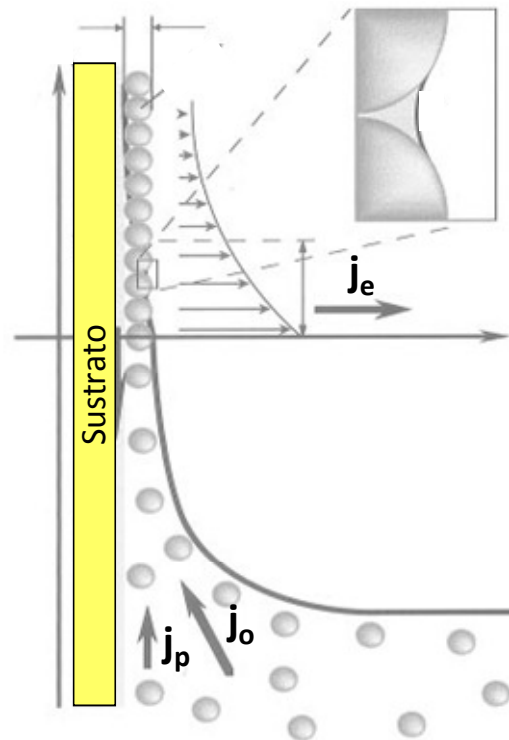


Figura 56: Esquema de los flujos de partículas y agua en las proximidades de una monocapa de partículas, donde j_e es el flujo de evaporación de disolvente, j_o el flujo de agua hacia el sustrato y j_p el de partículas.

Los fundamentos teóricos que describen las fuerzas implicadas en el método de deposición vertical se han tratado en un gran número de artículos^[204, 206-211]. Mediante este proceso la concentración de la suspensión coloidal aumenta a medida que se va evaporando el disolvente, resultando una matriz coloidal con diferente espesor a lo largo de la dirección de la evaporación. Además este método es muy lento, ya que está limitado por la velocidad de evaporación, lo que provoca la sedimentación de las partículas coloidales, induciendo a un ensamblaje ineficaz, especialmente si se utilizan partículas de gran tamaño. Por todo esto, muchos autores han hecho variaciones sobre el método para tratar de aumentar la uniformidad del depósito. Vlasov y col.^[212] introdujeron un gradiente de temperatura que provoca un flujo convectivo para minimizar la sedimentación de las esferas. Gu y col.^[213] desarrollaron un dispositivo basado en la elevación del sustrato hacia fuera de la suspensión, mientras que Zuocheng y col.^[214] sacaban la suspensión coloidal con una mini-bomba peristáltica.

En el método de deposición vertical desarrollado inicialmente, se asume que el menisco de la disolución en contacto con el sustrato está en reposo. La evaporación del disolvente juega el papel de ir desplazando hacia abajo el menisco. En este método se pone especial atención en mantener el menisco inmóvil (se emplean dispositivos anti-vibratorios). Sin embargo el crecimiento de ópalos también es posible en condiciones no estacionarias. Yang y col.^[215] demostraron que es posible crecer cristales altamente ordenados agitando la disolución, aunque siempre tratando de perturbar el menisco lo menos posible. Posteriormente, Cademartiri et al.^[216] desarrollaron un método en el que la evaporación de la suspensión coloidal sobre un sustrato inclinado se ve forzada por un flujo de gas externo aplicado sobre el menisco. En su trabajo afirman que las oscilaciones del menisco causadas por el flujo de aire, tienen un importante efecto en el orden de las esferas sobre el sustrato. Para ello, durante la deposición aplican un flujo de gas seco (aire o nitrógeno) entre 5 y 15 L/min directamente sobre el menisco, causando unas oscilaciones que pueden alcanzar los 2mm. Además la humedad relativa en las inmediaciones del depósito de esferas disminuye considerablemente. Este método resultó muy eficaz para depositar esferas en forma de multicapas en tiempos cortos y a partir de suspensiones muy diluidas. Los dos factores principales que influyen en la eficiencia de este método de crecimiento son: el flujo de gas y las oscilaciones del menisco. Aunque estos factores están claramente interrelacionados, tienen distintos efectos. En el caso de la deposición vertical estacionaria, como hemos visto, el flujo de partículas (j_p) hacia el sustrato es proporcional al flujo de evaporación (j_e). Sin embargo, si perturbamos el menisco, el flujo total de agua en la región del menisco vendrá dado por la suma de dos vectores: j_e o flujo de evaporación y j_o que corresponde al flujo de agua provocado por las oscilaciones. El vector j_o tendrá la misma dirección que j_e pero variando su módulo y su signo. Este método, además de acelerar el proceso de evaporación, mejora el proceso de auto-ensamblaje de las esferas. Durante la oscilación, cuando la onda sube, el flujo instantáneo es máximo, ya que

j_e y j_o tienen el mismo signo, lo que supone un aporte máximo de partículas en la interfase de crecimiento. Por el contrario cuando la onda baja, el flujo instantáneo disminuye, ya que los flujos j_e y j_o tienen signo contrario y las partículas que ya estaban depositadas en posiciones menos estables serán eliminadas. Otro de los efectos de las oscilaciones sobre el ordenamiento de las esferas se relaciona con la presión instantánea que se genera cuando la onda sube, forzando al agua a penetrar entre las cavidades del cristal formado, aumentando la presión y provocando un estado de movilidad temporal de las esferas. Cuando la onda baja, esta presión disminuye y las esferas se compactan dando lugar a una red hexagonal compacta (fcc).

La fabricación de los electrodos de oro macroporoso, en el presente trabajo, se basa en el auto-ensamblaje asistido por flujo de partículas coloidales que servirán de molde para la infiltración del metal a través de los huecos dejados en su estructura.

Electrodepósito de oro

La deposición electroquímica implica la transferencia de carga entre un sustrato conductor y los iones en disolución. En la deposición de un metal sobre un metal, los electrones son transferidos desde el nivel de energía de Fermi del metal a los estados aceptores del ión metálico en disolución. La energía del nivel de Fermi en el metal está determinada por la caída de potencial entre el metal y la disolución.

Según Fendler^[217] la deposición electroquímica tiene varias ventajas sobre otros métodos de deposición tradicionales. Entre estas ventajas destacan las bajas temperaturas de trabajo, el control del espesor del *film* a partir de la carga transferida, control en la composición del material infiltrado, la posible deposición del *film* metálico sobre formas complejas, control sobre el parámetro que gobierna el proceso como es el potencial o la intensidad y por último, posibles medidas *in*

situ del proceso de deposición. Otra de las indudables ventajas del método, es su amplia versatilidad. Existe un amplio abanico de materiales susceptibles de ser crecidos mediante electrodeposición: metales^[192, 218], semiconductores^[219], óxidos^[220, 221], aleaciones^[222], polímeros conductores^[223], etc. En lo que se refiere a electrodeposición de metales en ópalos, Bartlett y colaboradores han electrodepositado Au, Ag, Pt y Ni^[192, 218].

5.3.1 Fabricación de los soportes de oro 3DOM

La Figura 57 muestra el procedimiento general para la fabricación de las estructuras de oro macroporoso. En primer lugar, es necesario formar un ópalo artificial compuesto por esferas de poliestireno (PS) orientadas siguiendo una red cubica centrada en las caras, sobre un sustrato de oro. Seguidamente se procede a estabilizar la estructura opalina mediante sinterización. Posteriormente, se infiltrarán los intersticios existentes entre las esferas de PS con oro metálico, mediante electrodeposición electroquímica a potencial constante. Finalmente, se eliminará la matriz polimérica utilizando dimetil formamida (DMF) como disolvente, obteniendo de este modo una estructura inversa de oro macroporoso tridimensionalmente ordenada (3DOM).

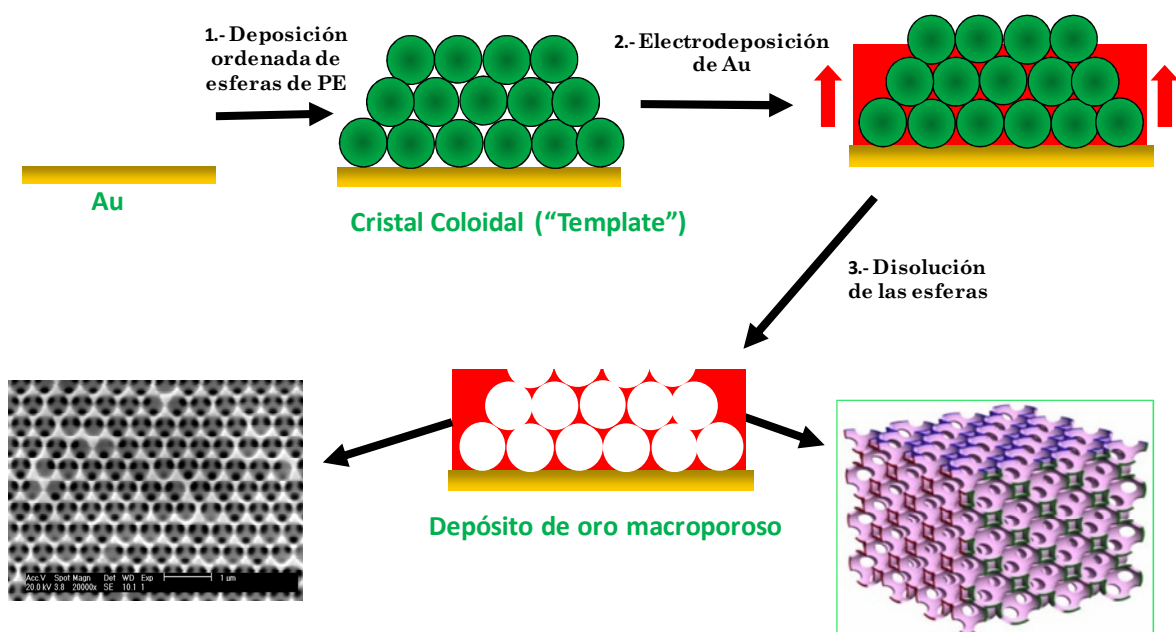


Figura 57: Esquema de fabricación de electrodos de oro (3DOM)

En este trabajo el método empleado para la deposición de las esferas fue el desarrollado por Cademartiri et al.^[216]. Para llevar a cabo la deposición de las esferas, se introduce el sustrato de oro evaporado en un vaso de precipitados de 5.0 ml con 2.5ml de una suspensión acuosa de 0.05% de esferas de poliestireno de

500 nm de diámetro. Es importante no poner el sustrato completamente vertical (se inclina de 30 a 40 grados respecto al eje vertical), ya que si no se obtendrían ópalos demasiado delgados (1-3 capas). De esta forma se obtienen entre 15-20 capas. La deposición se llevó a cabo a temperatura constante, termostalizando la disolución a 45°C y aplicando un flujo constante de nitrógeno sobre el menisco, provocando una constante oscilación del mismo. El sistema se mantiene hasta evaporación, obteniéndose un *template* con una orientación predominante (111).

En la Figura 58 se muestra el resultado obtenido después del proceso de deposición vertical de esferas de poliestireno sobre oro, observándose las irisaciones características de la estructura opalina dentro de la región del visible.

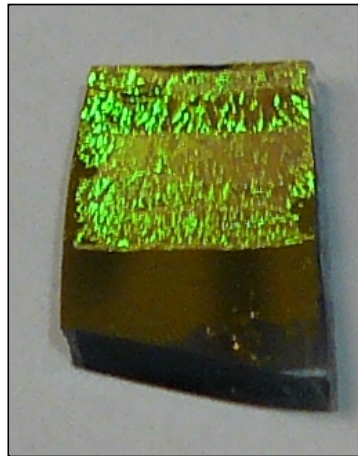


Figura 58: Fotografía de un depósito de esferas sobre un sustrato de oro.

Los ópalos una vez retirados del recipiente de sedimentación, no son mecánicamente resistentes, por lo que es necesario realizar un proceso de sinterización de la estructura, consistente en calentar la muestra durante 5 minutos a una temperatura entre 85-90°C sobre una placa calefactora.

La imagen de SEM (Figura 59) de la estructura opalina resultante muestra que en los puntos de contacto entre esferas, estas se han fundido formando una red continua y estable de PS.

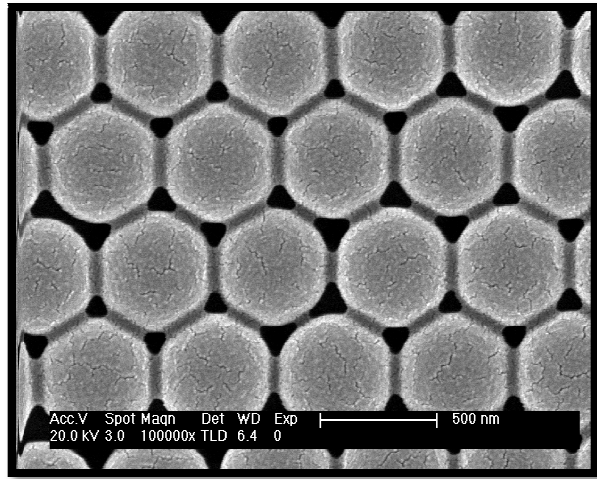


Figura 59: Imagen SEM de un ópalo de esferas de poliestireno estabilizado térmicamente.

En la Figura 60 se puede observar, a través de un defecto (ausencia de una de las esferas), la disposición de la capa superior con respecto a las capas inferiores en el interior del *template*.

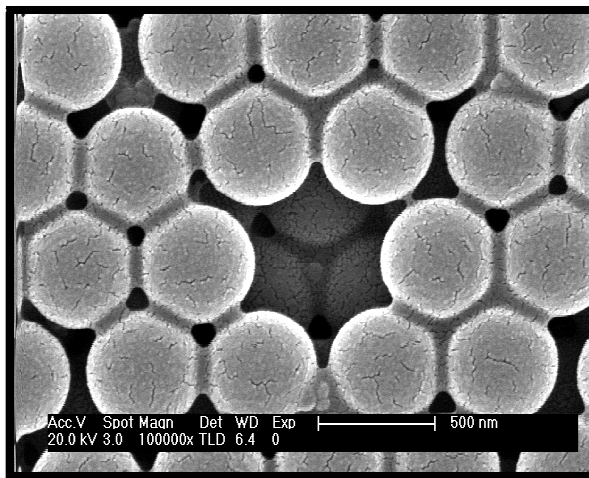


Figura 60: Imagen SEM que muestra la ausencia de una esfera en un ópalo de esferas de poliestireno estabilizado térmicamente.

De este modo, se consigue un molde de nanoesferas depositadas ordenadamente y fijadas sobre el sustrato de oro. Esta estructura es resistente para ser utilizada como electrodo de trabajo en la celda electroquímica, donde se llevará a cabo la infiltración metálica, en los intersticios de la matriz polimérica, por electrodeposición a potencial constante.

Electrodepósito de oro

Antes de proceder a la electrodeposición, las muestras se introducen en una disolución electrolítica de oro durante cinco minutos, para que la disolución penetre a través de los huecos del *template* y moje toda la estructura. Esta disolución está basada en un complejo de oro con sulfito, no conteniendo cianuro en su composición.

Para la elección del potencial aplicado se realizó previamente un voltamograma cíclico, empleando un electrodo de oro desnudo como electrodo de trabajo, en la disolución precursora del oro metálico (Figura 61). Durante el barrido catódico el potencial de inicio para la deposición de oro es aproximadamente -0.9V , a partir del cual la corriente aumenta hasta alcanzar un valor máximo a -1.12V vs. ESM, correspondiente al depósito másico. Para potenciales menos negativos que -1.0V , la corriente en el barrido anódico es mayor que en el barrido catódico debido a que el área expuesta para la deposición se ha incrementado, bien porque la rugosidad del Au depositado previamente es mayor o porque el depósito de oro crece sobre núcleos ya existentes y no sobre la superficie de oro libre.

Para potenciales cercanos al pie de la onda la deposición sería extremadamente lenta, y la rugosidad del depósito obtenido baja. Si por el contrario eligiéramos un potencial más catódico que el potencial de pico (-1.12V) estaríamos en una región controlada por difusión en la que los depósitos obtenidos serían más rugosos. Por tanto, se eligió un potencial de deposición constante de -1.05V donde el proceso de nucleación y crecimiento está controlado cinéticamente. El tiempo del pulso depende de la carga necesaria para formar un depósito de espesor determinado. En nuestro caso, el espesor del depósito corresponde al número de capas de esferas que conforman el ópalo. Con el fin de obtener una estructura abierta, con canales de interconexión para que penetre la disolución, la infiltración metálica de

la estructura macroporosa se realizara hasta el nivel correspondiente al diámetro de las esferas de la última capa.

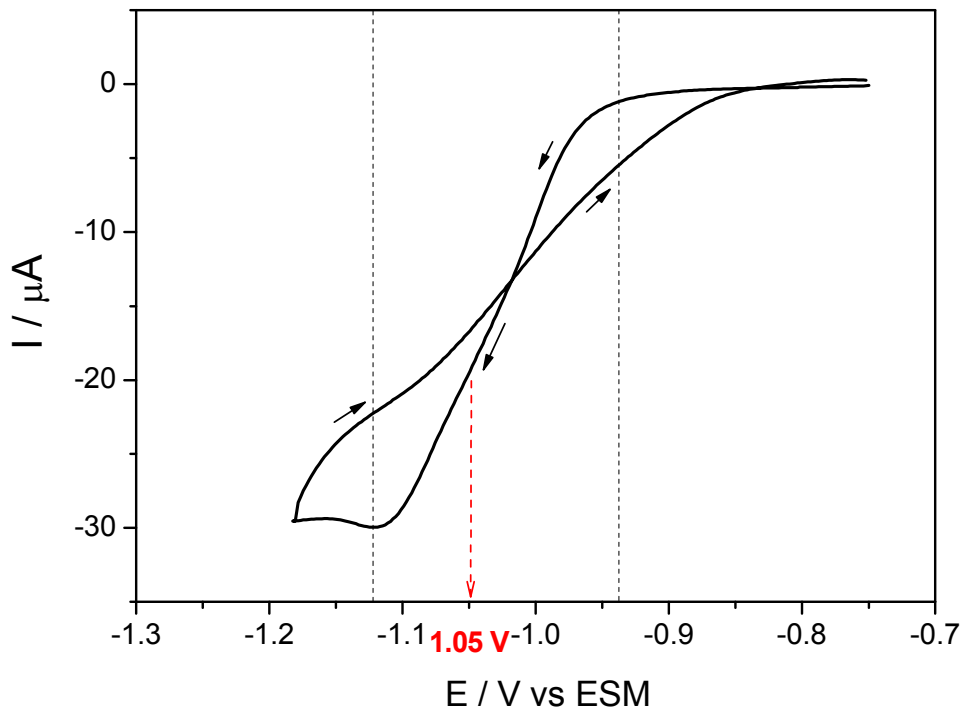


Figura 61: Voltamograma cíclico de un electrodo de oro en la disolución precursora de oro metálico a $20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ y $T=25^\circ\text{C}$.

Fijando el número de capas y tamaño de las esferas del *template*, se puede hacer el cálculo teórico de la carga que tiene que pasar durante la electrodeposición:

$$Q = A \cdot n \cdot \frac{5}{6} \cdot \phi \cdot F \cdot n_e \cdot \rho \cdot 0.26 \cdot \frac{1}{M}$$

Donde:

A: área geométrica del sustrato

n: número de capas

ϕ : diámetro de las esferas

F: constante de Faraday

n_e : número de electrones

ρ : densidad del material

M: peso molecular del material

Por tanto, la carga requerida para un depósito de oro a través de un *template* de esferas de 500 nm de diámetro en función del número de capas, vendrá determinada por:

$$Q = 0.10242 \cdot A \cdot n$$

En la Figura 62 se muestra el cronoamperograma obtenido durante la electrodeposición de oro macroporoso, en este caso para un depósito de 5.5 capas de esferas huecas.

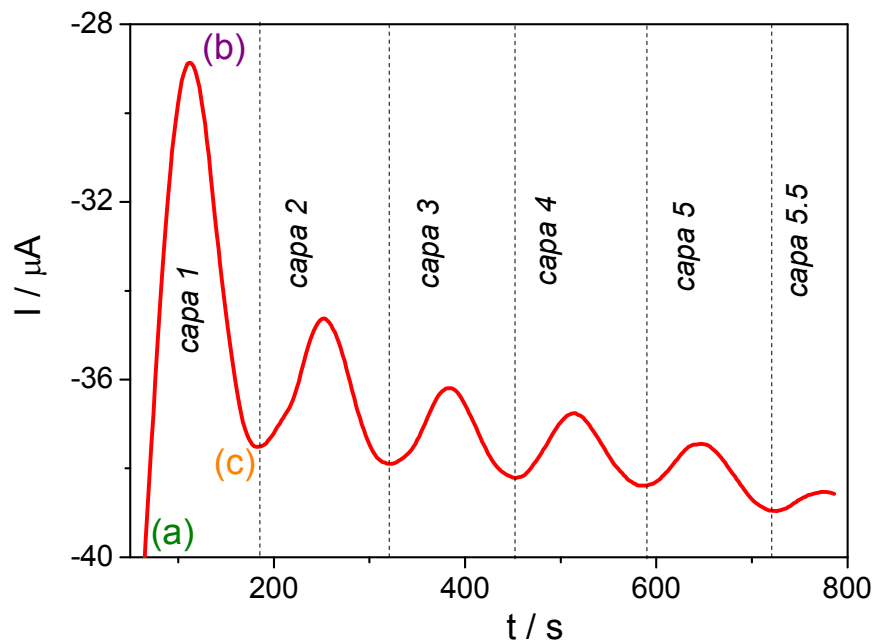


Figura 62: Cronoamperograma obtenido para un electrodeposición de oro de 5.5 capas crecido a partir de un *template* de esferas de poliestireno de 500nm. Potencial de deposición: -1.05 V vs ESM.

Las **oscilaciones temporales** de la corriente de reducción son características de la deposición de oro a través del *template*. Estas oscilaciones se deben a la variación periódica del área activa del electrodo durante la deposición.

Como se observa en la Figura 63, al principio del proceso de deposición, cada esfera de PS de la primera capa, está en contacto con la superficie del electrodo de

oro sólo en un punto. De este modo, tanto el área disponible para la electrodeposición como la corriente de reducción, serán máximas **(a)**.

A medida que crece el depósito, la superficie de área activa va disminuyendo, hasta llegar a un mínimo cuando el espesor del depósito metálico alcanza la mitad de la primera capa de esferas **(b)**.

A partir de este punto, debido al aumento de área, volvería a aumentar la corriente, hasta alcanzar otro máximo en el cronoamperograma **(c)**.

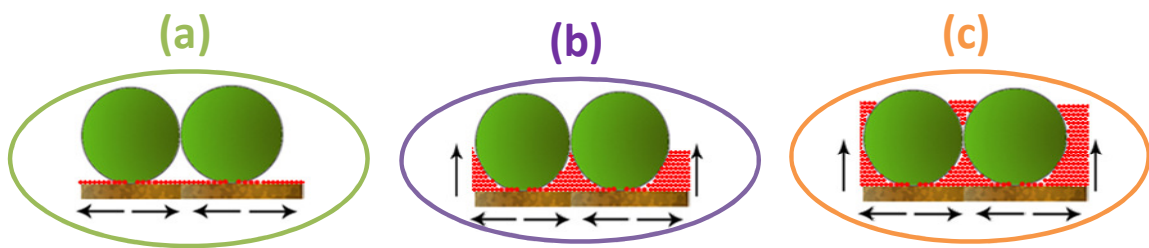


Figura 63: Variación del área electroactiva durante el proceso de electrodeposición.

Por tanto, podemos decir que estas oscilaciones nos proporcionan un método fácil y fiable para controlar el número de capas de esferas de PS infiltradas, y por tanto, el grosor final del depósito.

Obtención del ópalo inverso de oro

Una vez que se ha infiltrado el ópalo con oro metálico, las muestras se extraen de la celda electroquímica y se lavan con agua destilada por inmersión, dejando que se sequen al aire antes de su tratamiento posterior. Con el fin de eliminar la matriz de poliestireno, las muestras se sonicán al menos durante una hora en dimetilformamida (DMF), para proceder a su disolución y obtener, finalmente, un *film* tridimensional de oro macroporoso de espesor controlado (Figura 64).

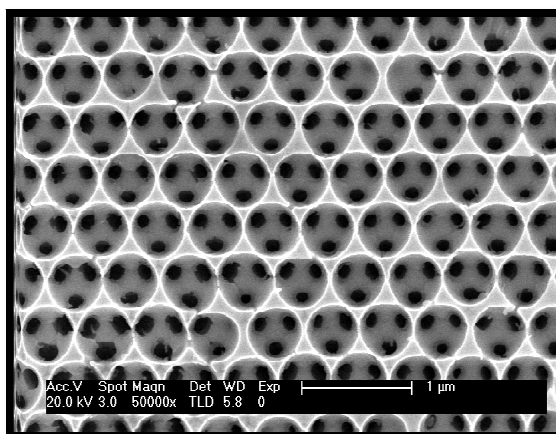


Figura 64: Imagen SEM de un ópalo inverso de oro de 5.5 capas crecido a partir de un *template* de esferas de poliestireno de 500nm (escala: 1 μ m).

Cálculo del área electroquímica en función del número de capas

El sólido macroporoso tridimensionalmente ordenado se caracterizó electroquímicamente mediante voltametría cíclica. El voltamograma (Figura 65) se obtuvo empleando un electrodo de Au_{3DOM} de 5.5 capas como electrodo de trabajo, barriendo a 0.1 V·s⁻¹ en una disolución 0.5M de ácido sulfúrico frente a ESM como referencia. Como era de esperar, el voltamograma corresponde a la imagen clásica de un electrodo de oro en medio ácido.

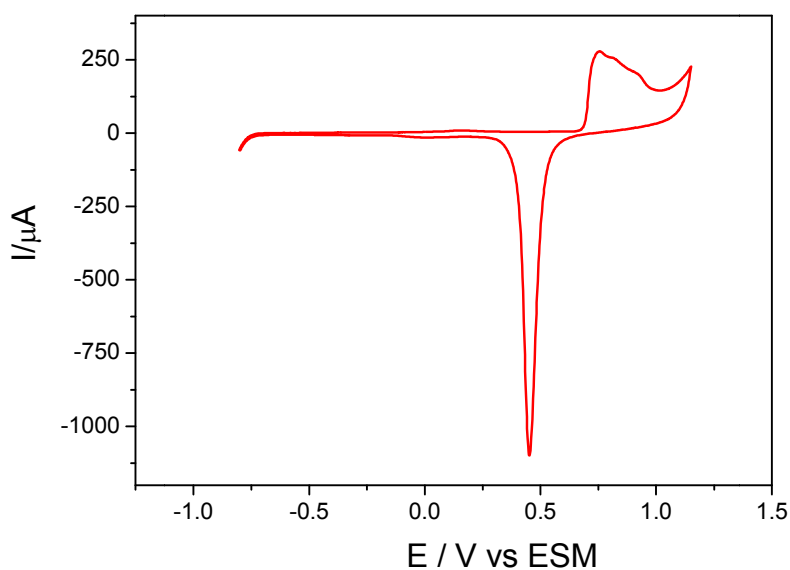


Figura 65: Voltamograma cíclico de un electrodo 3DOM de oro de 5.5 capas en H₂SO₄ 0.5M barrido a 0.01V·s⁻¹.

A pesar de los posibles defectos del *template*, se puede establecer una relación lineal entre el área electroactiva del ópalo inverso de oro (calculado a partir del pico de reducción de los óxidos de oro del voltamograma del Au_{3DOM} en H₂SO₄) y el número de capas del mismo (Figura 66). El área electroactiva de cada electrodo vendrá definida por su factor de rugosidad, siendo este el resultado del cociente entre la carga de reducción de óxidos de oro para el Au_{3DOM} y para el sustrato de oro sobre el que se deposita el *template*, midiendo ambas cargas mediante voltametría cíclica en las mismas condiciones.

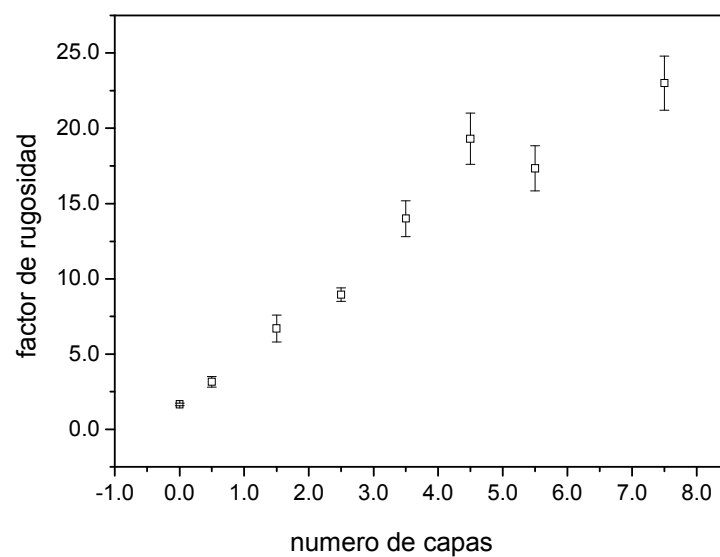


Figura 66: Factor de rugosidad para el oro 3DOM en función del espesor del depósito (expresado como número de capas de esferas)

Por ejemplo, en el caso de un ópalo de 5.5 capas su factor de rugosidad (R) está en torno a 18.6, mientras que el factor de rugosidad para un electrodo de oro sin ópalo es tan solo de 1.6.

5.3.2 Caracterización superficial

5.3.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido se empleó como una técnica de caracterización superficial para los ópalos inversos de oro.

En la Figura 67 podemos ver los distintos estadios de crecimiento del depósito. Si consideramos la última capa de esferas en el ópalo, el nivel de llenado con oro electrodepositado puede estar, por debajo del nivel del ecuador de las esferas ($x < d$), coincidir justo con ese nivel ($x = d$) o sobrepasar el mismo ($x > d$), conduciendo a diferentes espesores del depósito y a diferentes diámetros de los huecos en la estructura inversa. Las diferencias en el diámetro de los poros son la consecuencia de las variaciones en el nivel de llenado. Diámetros menores que 500nm indican que el *film* creció por debajo o por encima del nivel del ecuador de las esferas.

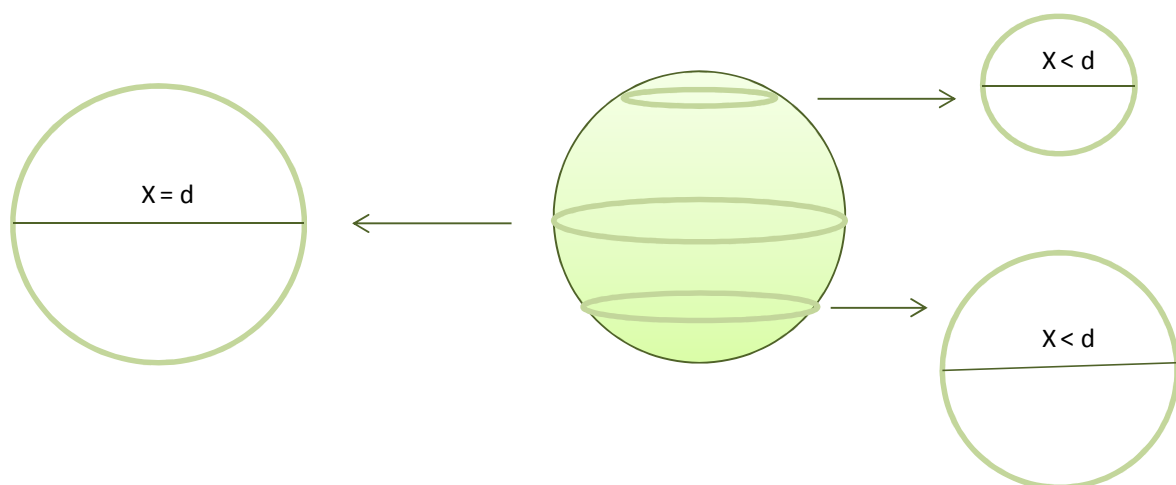


Figura 67: Relación entre el diámetro del poro que se puede observar en la foto de SEM (X) y las diferentes alturas que alcanza el depósito, siendo d el diámetro de las esferas del *template*.

Si el nivel de llenado, coincide con el ecuador de las esferas, la distancia centro a centro medida para los poros, prácticamente es la misma que el diámetro de las esferas de poliestireno utilizadas para hacer la plantilla. Por tanto, el diámetro de los poros en el *film* de oro y en otros *films* similares viene determinado por el diámetro de las esferas de PS utilizadas para hacer el ópalo. En consecuencia, la

dimensión periódica del ópalo inverso de oro puede cambiarse utilizando esferas de diferente tamaño. Por tanto, controlando la carga total pasada durante la electrodeposición se puede ajustar no solo el espesor del *film* sino también el tamaño del poro de la cavidad esférica.

Cuando aumenta el número de capas en el ópalo, debido a la geometría del empaquetamiento de las esferas (fcc), en la segunda capa del ópalo invertido es posible observar distintos niveles de crecimiento del depósito (Figura 68). La Figura 68(a) muestra una zona del $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ donde el espesor del *film* está muy por debajo del nivel correspondiente al diámetro de las esferas. Se observa que, el *film* ha empezado a crecer alrededor de las esferas de la segunda capa, apareciendo en la imagen como áreas triangulares (gris) correspondientes a los puntos más altos del *film* metálico, habiendo crecido desde el sustrato a través de los intersticios existentes entre las dos capas del *template*. La superficie del *film* no es lisa y su morfología está controlada por el proceso de deposición que tiene lugar entre las esferas más allá de la superficie plana del electrodo.

Igualmente, cuando el espesor del *film* alcanza el nivel del ecuador de las esferas (Figura 68(c)) se aprecian tres poros, vistos como círculos oscuros dentro de cada cavidad esférica. Estos pequeños poros son los canales internos que hacen permeable la estructura.

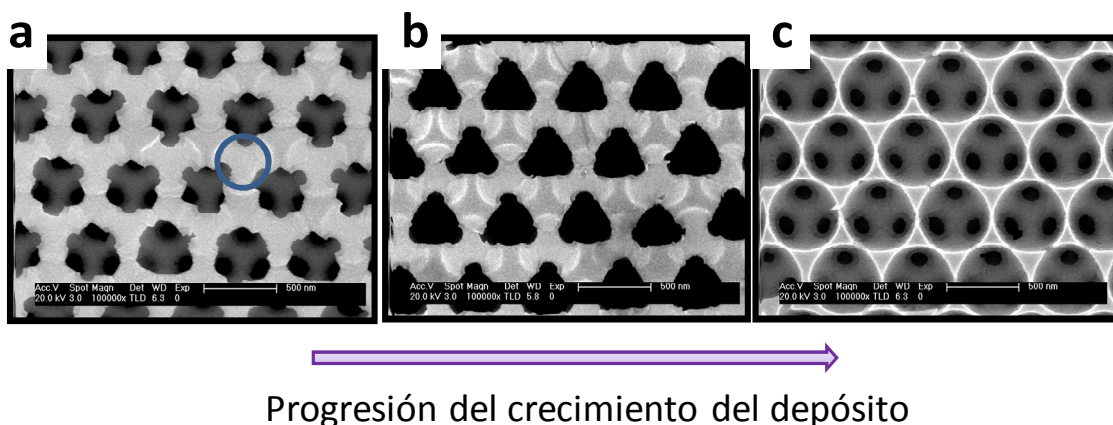


Figura 68: Progresión del crecimiento del depósito a través del ópalo.

Si el nivel del depósito sobrepasa el ecuador de las esferas, la boca del poro disminuye adquiriendo una forma triangular redondeada, como se puede observar en la parte derecha de la imagen de la Figura 69. En este caso el espesor está próximo a $\left(n + \frac{3}{4}\right) d$ siendo d el diámetro de la esfera y n el número de capas. Esto es una consecuencia de la forma en la que tiene lugar la deposición electroquímica, fuera del plano del sustrato, ya que está impedida por las esferas de PS. La presencia del *template* de esferas tiene dos efectos: por una parte las esferas bloquean el crecimiento del metal hacia fuera del sustrato, a la vez que dificultan la difusión de los iones metálicos desde la disolución hacia la interfase del metal que está creciendo. Esto provoca que cuando la capa tiene un espesor de $(n+1/2)d$, se encuentran pequeños huecos entre las bolas donde el *film* no es tan espeso (marcados por la flecha en la Figura 70). Sin embargo, para un tiempo donde la capa alcanza un espesor de $(n+3/4)d$ estos huecos se han llenado aunque su espesor no alcanza el de las capas inferiores. En consecuencia, alrededor de la boca del poro en la última capa, la altura del metal por encima del sustrato varía de tal forma que cuando se observa desde arriba aparece triangular aunque el poro siga siendo esférico^[218].

Si el espesor del depósito supera el espesor de las capas de esferas, se forma un depósito másico (el centro de la Figura 69). Esto debe evitarse, ya que este depósito sellaría la parte superior de la estructura, limitando la accesibilidad del ópalo a través de estas zonas, tanto del interior hacia el exterior como a la inversa.

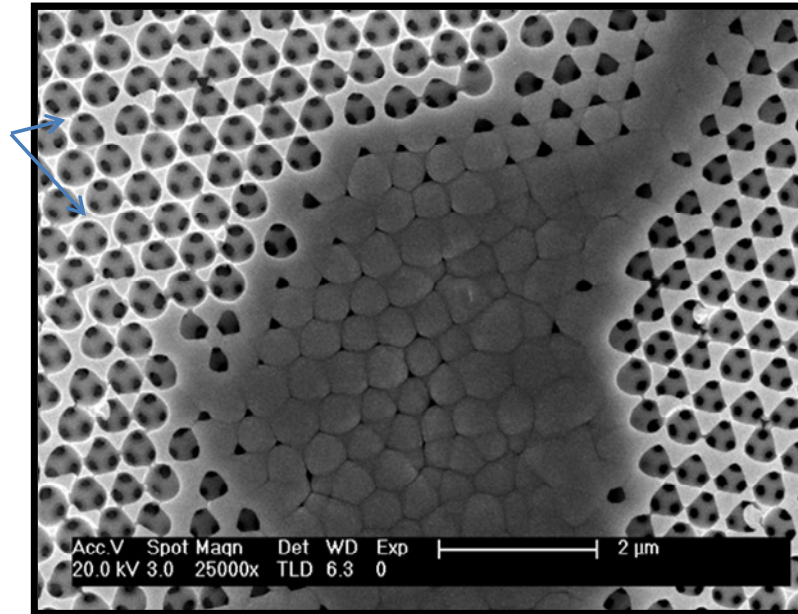


Figura 69: Depósito másico crecido sobre la última capa de esferas.

La Figura 70 muestra las imágenes SEM a diferentes magnificaciones de una estructura de oro macroporoso tridimensionalmente ordenado, formado por una red de poros esféricos de diámetro $500 \pm 10 \text{ nm}$, preparado por deposición electroquímica a potencial constante, dentro de los espacios intersticiales de un *template* formado por esferas de poliestireno (PS) de 500 nm de diámetro, autoensambladas sobre oro, por deposición vertical.

Las imágenes muestran que los poros esféricos formados por el oro depositado, después de remover el patrón inicial de PS, forman una estructura periódica altamente ordenada dando lugar a una red hexagonal compacta, con dominios que pueden extenderse varios cientos de μm^2 (Figura 70(a)).

La Figura 70(b) muestra que dentro de cada cavidad esférica se pueden observar claramente tres poros (50 nm), vistos como pequeños círculos oscuros. Estos son los canales internos de interconexión entre los macroporos de la capa superior y de la capa inferior y corresponderían a los puntos donde las esferas de PS originales de las dos capas estaban en contacto. Para que resulte más claro se han dibujado círculos sobre la imagen, para representar las posiciones de las

esferas del *template* originales en la capa superior (círculos verdes) y en la capa inferior (círculos amarillos).

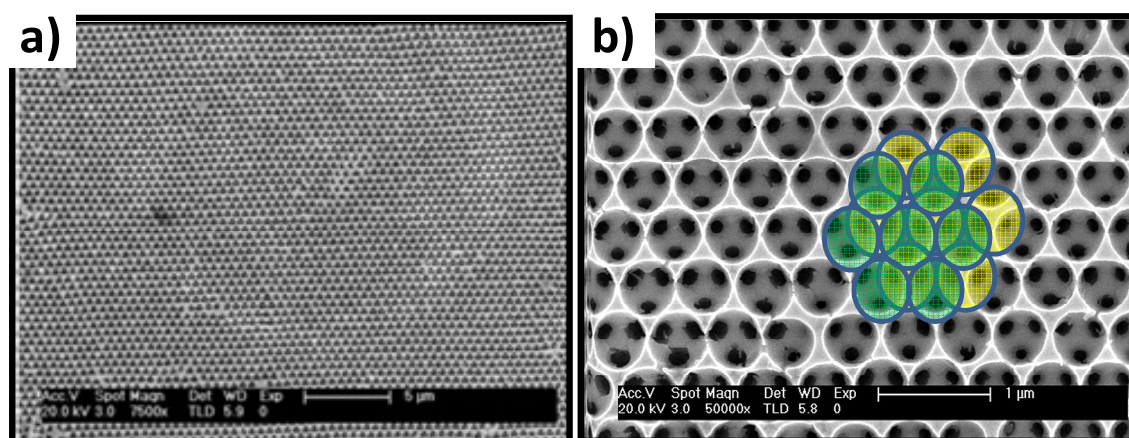


Figura 70: Imagen SEM de electrodos de oro macroporosos crecido sobre un sustrato de oro a través de esferas de PS de 500 nm de diámetro y esquema del mecanismo de interconexión entre las distintas capas del 3DOM. (— Capa inferior y — Capa superior).

Estas interconexiones entre las cavidades esféricas se producen gracias a que el depósito electroquímico no es capaz de llenar por completo las estrechas regiones existentes alrededor de los puntos de contacto entre las esferas del *template*^[218].

Las medidas de la distancia centro-centro para los poros de la Figura 70(b) confirman que los huecos esféricos dentro del ópalo inverso de oro tiene el mismo diámetro que las esferas de PS utilizadas para preparar el *template* (la distancia media centro a centro entre los poros, es de $500 \pm 10 \text{ nm}$). El resultado sugiere que no hay una contracción o expansión significativa de la estructura macroporosa después de eliminar la matriz polimérica y esta se ha disuelto sin degradar la estructura.

Por tanto teniendo en cuenta el diámetro de las bolas de PS y el diámetro observado para los poros, puede determinarse el espesor del *film*. En este caso, el diámetro medio de poro es $500 \pm 10 \text{ nm}$ y el espesor del *film* es aproximadamente:

$$(n+0.5) \cdot d = (5+0.5) \cdot 500 \text{ nm} = 2750 \text{ nm}$$

siendo “ d ” el diámetro del poro y “ n ” el número de capas de esferas electrodepositadas.

Como acabamos de ver, la estructura cristalina de un ópalo artificial, formado por esferas de poliestireno de 500nm de diámetro, corresponde a una red cúbica centrada en las caras (fcc), puesto que es la fase más estable que puede obtenerse en un empaquetamiento compacto.

Sin embargo, aunque menos frecuente, también es posible observar una simetría cuadrada, correspondiente a la orientación cristalina (100). Si el ópalo tiene varias capas, estas se pueden apilar, colocándose en la misma posición que la primera o en los huecos existentes entre las esferas vecinas, dando lugar a planos (100) o (111) (Figura 71). Estas dos orientaciones cristalográficas se pueden observar también cuando se fractura el ópalo o en los cantos del ópalo.

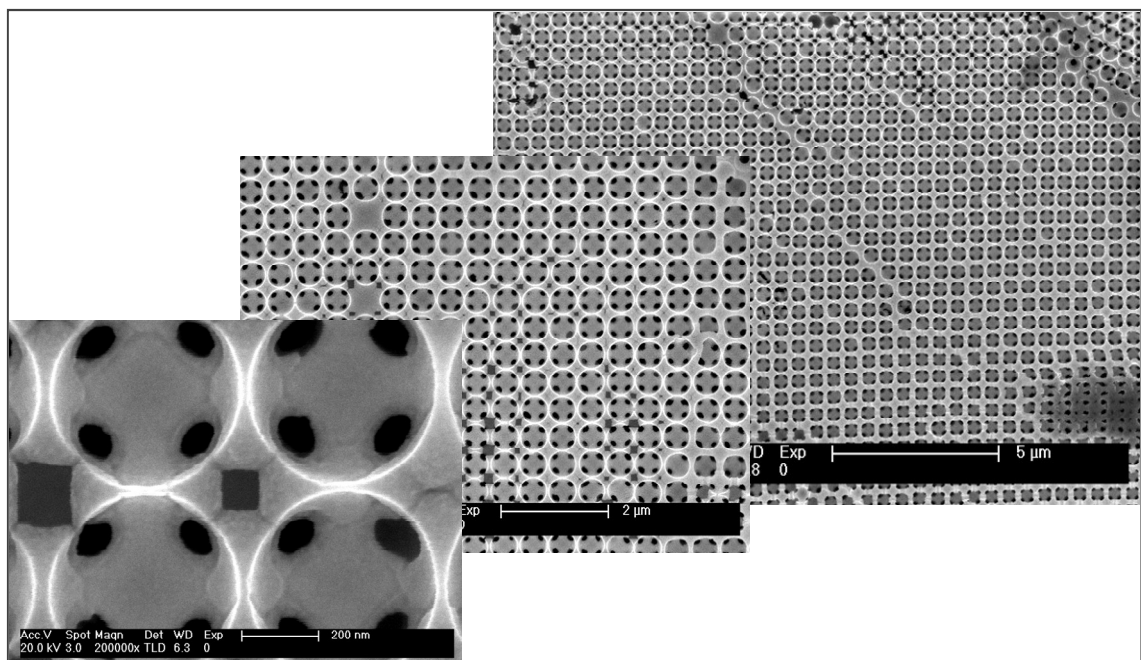


Figura 71: Imagen SEM de electrodos de oro macroporosos crecido con orientación (100) sobre un sustrato de oro a través de esferas de PS de 500 nm de diámetro.

5.3.2.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La técnica de AFM se utilizó para obtener imágenes de alta resolución de la superficie de los ópalos inversos de oro. Las figuras 72 y 73 muestran la imagen de AFM, tomada en modo contacto intermitente, de una superficie de oro macroporoso crecido sobre un sustrato de oro a través de un patrón de esferas de poliestireno de 500 nm de diámetro. La imagen muestra las cavidades esféricas que se forman en el *film* de oro después de eliminar las esferas de PS. Aunque, en principio, el crecimiento del depósito de oro está controlado por los transitorios de corriente, es posible observar pequeñas áreas con diferentes niveles de crecimiento. No obstante, se obtuvieron dominios altamente ordenados de poros esféricos monodispersos con simetría hexagonal compacta, sobre varios cientos de μm^2 .

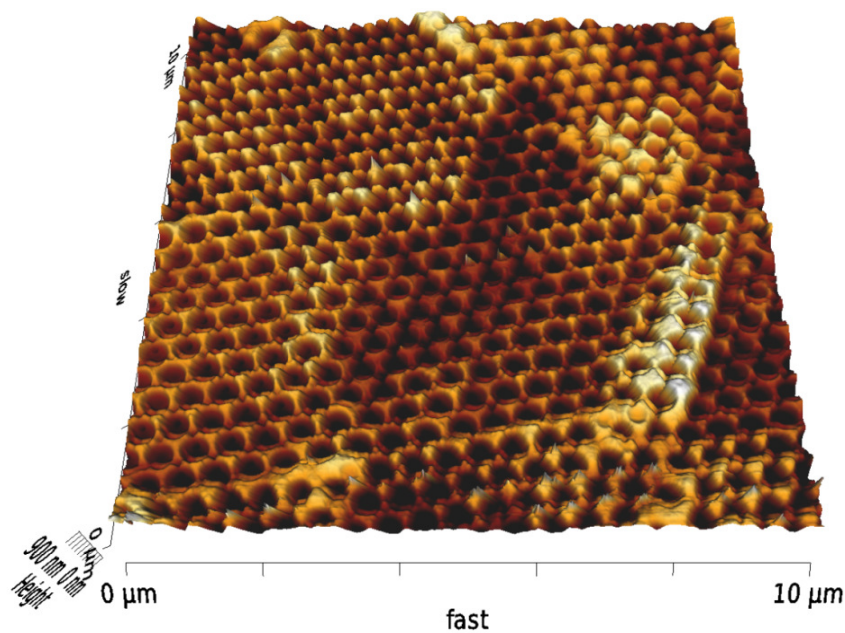


Figura 72: Imagen de AFM tomada en modo contacto intermitente de un ópalo inverso de oro obtenido mediante la electrodeposición de oro a través de esferas de poliestireno de 500nm ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$).

En la Figura 73 podemos ver una ampliación de $1.4 \mu\text{m} \times 1.4 \mu\text{m}$, donde se puede comprobar que el diámetro de poro coincide exactamente con el diámetro de las esferas precursoras de PS. Además, se pueden apreciar los tres pequeños círculos

oscuros dentro de cada cavidad esférica, correspondientes a las interconexiones entre los macroporos de la capa más superior de esferas con la capa inmediatamente inferior. Aquí radica la enorme ventaja de estas estructuras, ya que dichos canales permiten obtener un material con una elevada densidad de área por unidad de volumen.

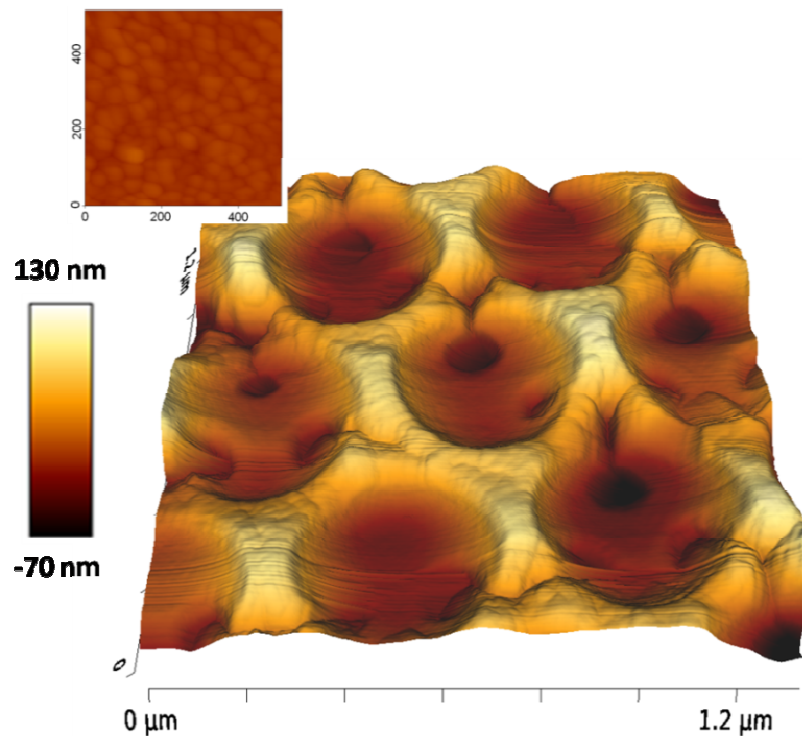


Figura 73: Imagen de AFM tomada en modo contacto intermitente de un electrodo de oro macroporoso obtenido por electrodeposición de oro a través de esferas de poliestireno de 500nm ($1.4 \mu\text{m} \times 1.4 \mu\text{m}$). Inset: Imagen de AFM de un depósito másico de oro crecido en ausencia de esferas.

Con propósitos comparativos, se caracterizó un electrodepósito de oro crecido sobre un sustrato de oro en las mismas condiciones i.e. a potencial constante, pero sin el *template* de PS (inset Figura 73). En principio, la morfología de ambos depósitos debería ser la misma^[224], sin embargo, cuando se lleva a cabo la electrodeposición a través de la estructura de esferas tridimensional, el cambio de fase tiene lugar a volumen constante, siendo la rugosidad del depósito obtenido (definida como la rugosidad media de la superficie promediando el perfil) menor que la del depósito generado sobre el sustrato de oro sin la matriz

polimérica. En el caso del oro depositado en los intersticios existentes entre los huecos esféricos, la rugosidad obtenida está en torno a 0.5 nm, mientras que si el cambio de fase tiene lugar sin restricciones la rugosidad obtenida es de 3.2 nm. Por tanto, el crecimiento de un *film* de oro dentro de la estructura opalina implica, no solo la obtención de una superficie nanoestructurada sino también, que el depósito es mucho más liso cuando el oro crece en un volumen confinado por las esferas.

5.3.2.3 *Difracción de Rayos X (DRX)*

La orientación preferencial, así como el tamaño de cristalita resultante después de la deposición de oro a través del *template* para formar el ópalo inverso de oro, se determinó mediante difracción de rayos-X (DRX).

Como se ha mencionado anteriormente, el oro cristaliza en un sistema cúbico centrado en las caras con $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ y $a = b = c = 4.0786$, siendo los planos cristalográficos principales el (111), (100) y (110). La Figura 74(a) muestra el difractograma obtenido para el depósito de oro policristalino sobre el sustrato sin *template* (inset de la Figura 73), en el cual el pico de difracción de rayos-X de mayor intensidad corresponde a la orientación (111). La Figura 74(b) corresponde al difractograma de un depósito de oro crecido sobre un sustrato con *template* ($\text{Au}_{3\text{DOM}}$). Se observa que las orientaciones cristalográficas así como sus intensidades son similares, en ambos casos, a las del Au policristalino. Por tanto, el depósito de oro crecido dentro de la estructura 3D no muestra ninguna orientación preferencial, con respecto al depósito crecido sobre el sustrato libre de ópalo.

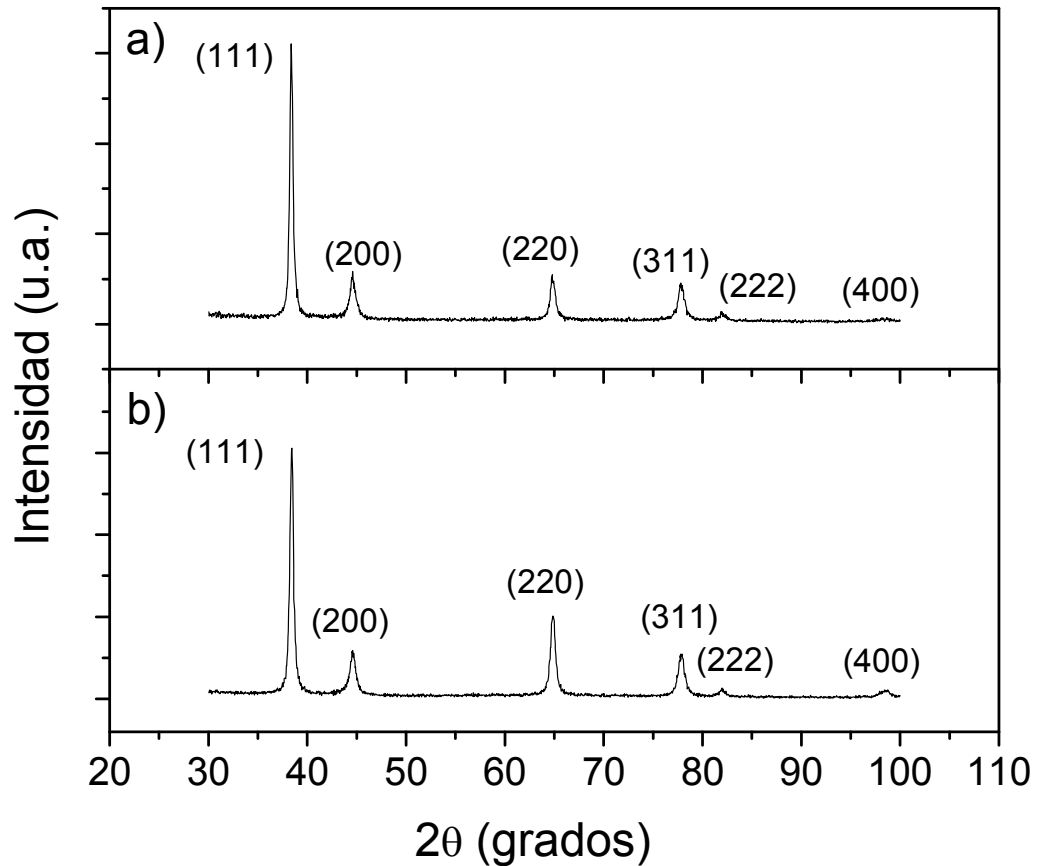


Figura 74: Difractograma de a) electrodo de oro electrodepositado b) electrodo de oro macroporoso.

El valor del tamaño de cristalita en ambos casos, para el oro electrodepositado bajo condiciones de potencial constante, fue calculado a partir del valor de la anchura a media altura para el máximo de difracción, calculada para cada uno de los picos de difracción de Rayos-X de mayor intensidad, que en este caso corresponden a las orientaciones (111), (200), (220) y (311).

En la Tabla XIII se muestra un cuadro resumen con los tamaños de cristalita obtenido mediante la ecuación de Scherrer, para cada una de las distintas orientaciones del oro electrodepositado sin *template* y para una estructura de oro 3DOM.

Tabla XIII

Resultados obtenidos a partir de difractograma de rayos X de un electrodo de oro electrodepositado y de un electrodo de Au_{3DOM}. Cálculo del tamaño medio de cristalita.

Au electrodepositado					
Orientación	2θ	θ	cos θ	β = W_{1/2} -b	D_{hkl} (Å)
(111)	38.33	19.16	0.945	0.323	260.79
(200)	44.50	22.25	0.925	0.603	142.63
(220)	64.76	32.38	0.844	0.451	208.96
(311)	77.70	38.85	0.779	0.564	180.86
					$\bar{D}_{hkl} = 198\text{Å}$

Au_{3DOM}					
Orientación	2θ	θ	cos θ	β = W_{1/2} -b	D_{hkl} (Å)
(111)	38.3	19.15	0.945	0.356	236.84
(200)	44.5	22.25	0.925	0.546	157.53
(220)	64.78	32.39	0.844	0.427	220.71
(311)	77.79	38.89	0.778	0.574	177.94
					$\bar{D}_{hkl} = 198\text{Å}$

Por tanto, el tamaño medio de cristalita obtenido para un depósito de oro crecido dentro de una estructura opalina (Au_{3DOM}) es similar al del oro electrodepositado sin restricciones de volumen (198 Å).

5.3.3 Caracterización electroquímica del biosensor por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

La espectroscopia de impedancia electroquímica es un método eficaz tanto para caracterizar electrodos modificados, como para obtener valores de recubrimiento. En nuestro caso se empleó para la caracterización de los distintos pasos seguidos en la preparación del biosensor con electrodos 3DOM.

5.3.3.1 Variación del recubrimiento de DTSP con el tiempo de adsorción

El primer paso en la construcción del biosensor de lactato consiste en la adsorción del DTSP sobre la superficie del transductor para posteriormente anclar covalentemente la enzima sobre el tiol. En este caso, la inmovilización de DTSP se realizó sobre un electrodeposición de oro obtenido en las mismas condiciones experimentales que el oro 3DOM pero sin el *template* de esferas de PS. Para que la morfología del electrodeposición fuera la misma para todas las medidas, se utilizó una única lámina de oro para hacer el depósito. Posteriormente se segmentó en varios fragmentos utilizando cada uno de ellos como un electrodo independiente.

Con el fin de evaluar el grado de recubrimiento de DTSP sobre la superficie del electrodo de Au_{3DOM} en función del tiempo de adsorción, se realizaron ensayos de impedancia electroquímica con electrodos incubados en una disolución 4mM DTSP/DMSO durante 0min, 15 min, 1.5h, 3h y 24h. A continuación, se llevaron a cabo las medidas de impedancia de cada uno de los electrodos preparados en una disolución 10 mM K₃Fe(CN)₆ + 10 mM K₄Fe(CN)₆ en 0.1 M PBS (pH = 7) + 0.1 M KCl.

La Figura 75 muestra el diagrama de Nyquist para las muestras de Au_{electrodep}-DTSP preparadas a diferentes tiempos de adsorción:

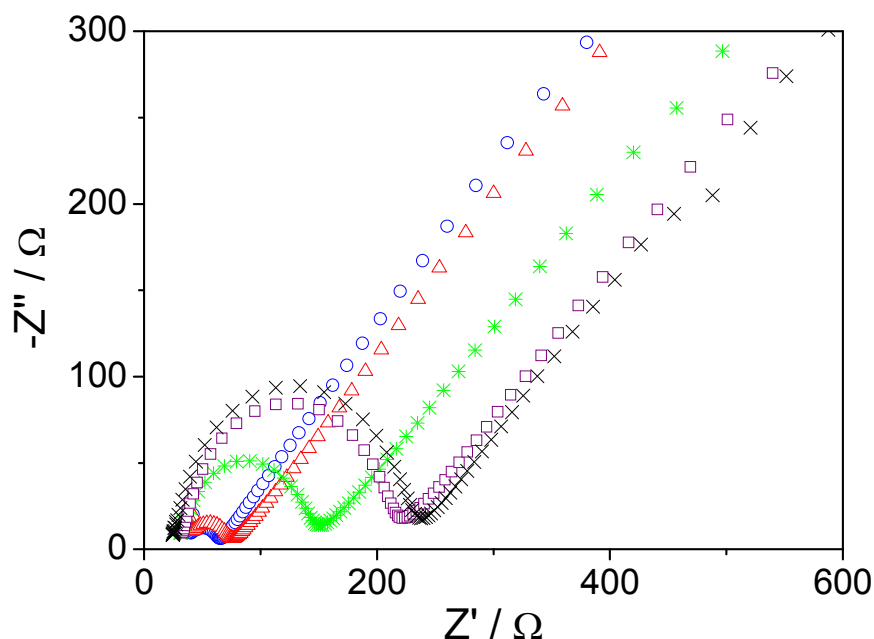


Figura 75: Diagrama de Nyquist para Au-DTSP a distintos tiempos de adsorción: 0 minutos (O), 15 minutos (Δ), 1.5 horas (*), 3 horas (□), 24 horas (×)

En todos los casos, el diagrama de Nyquist (parte imaginaria Z'' vs. parte real Z') muestra dos regiones de frecuencia. En la zona de altas frecuencias (10^5 -10Hz) aparece el semicírculo correspondiente al proceso limitado por la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) del par redox ferro/ferri sobre la interfase Au-DTSP/electrolito. La intersección con el eje real, a frecuencias en torno a 10^5 Hz, corresponde a la resistencia del electrolito (R_e). A frecuencias bajas la parte lineal corresponde a los procesos más lentos de difusión iónica a través de la capa tiolada.

Como ya hemos visto en los capítulos anteriores, el valor de la resistencia a la transferencia de carga se puede relacionar con el recubrimiento de DTSP, asumiendo que la reacción de transferencia de electrones tiene lugar en los sitios que no se han cubierto con las moléculas de tiol y asumiendo también, que la difusión hacia estos huecos es plana. En base a esta suposición, es posible calcular el recubrimiento superficial del electrodo en función de la resistencia a la transferencia de carga del electrodo sin recubrir^[180, 181]:

$$\theta_{\text{DTSP}} = 1 - \frac{R_{\text{TC}}^0}{R_{\text{TC}}^{\text{DTSP}}} \quad 100$$

siendo, R_{TC}^0 y $R_{\text{TC}}^{\text{DTSP}}$ la resistencia a la transferencia de carga del par redox ferro/ferri sobre el electrodepósito de oro, y sobre el electrodo recubierto con DTSP para los distintos tiempos de adsorción. Los valores del recubrimiento de DTSP obtenidos se muestran en la Tabla XIV.

Tabla XIV

Recubrimiento de DTSP sobre oro electrodepositado potenciostáticamente (-1.05V) a distintos tiempos de adsorción, obtenidos mediante medidas de EIS.

Tiempo	$R_{\text{TC}} (\Omega \cdot \text{cm}^2)$	$C (\text{F} \cdot \text{cm}^{-2})$	$K_{\text{app}} (\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$	θ
0min	2.95	$9.95 \cdot 10^{-6}$	$9.01 \cdot 10^{-5}$	0
15min	4.19	$6.83 \cdot 10^{-6}$	$6.35 \cdot 10^{-5}$	0.30
1.5h	9.33	$1.70 \cdot 10^{-5}$	$2.85 \cdot 10^{-5}$	0.68
3h	19.55	$1.25 \cdot 10^{-5}$	$1.36 \cdot 10^{-5}$	0.85
24h	41.13	$9.77 \cdot 10^{-6}$	$6.47 \cdot 10^{-6}$	0.93

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos para el Au policristalino, puesto que el recubrimiento máximo se alcanza para un tiempo de adsorción de 24 horas. Como el recubrimiento obtenido para un tiempo de adsorción de 3h es ligeramente menor ($\theta=0.85$), el tiempo escogido para la inmovilización del tiol será de 3h para evitar la desactivación del grupo succinimida.

El valor de la resistencia a la transferencia electrónica del ferro/ferricianuro sobre la superficie del Au electrodepositado aumenta al aumentar el grado de recubrimiento de DTSP. Dicha variación está de acuerdo con la disminución en los valores de capacidad (Ecuación 82) para dicha interfase (Au-DTSP/ferro-ferricianuro) (Tabla XIV).

Como ya se ha descrito en el capítulo 1, debido a la pequeña amplitud de la onda sinusoidal aplicada (EIS) se puede utilizar la ecuación de Butler-Volmer

linealizada (Ecuación 83), para obtener la constante cinética de transferencia de carga a través de su relación con el recubrimiento superficial:

$$K_{app} = K (1-\theta)$$

K_{app} y K son las constantes de velocidad de transferencia electrónica de los iones $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ sobre los sitios libres superficiales del electrodo de oro modificado y sin modificar con el tiol^[182].

El valor de K_{app} para la sonda redox sobre el electrodo de oro electrodepositado modificado con DTSP disminuye desde un valor de $9.01 \cdot 10^{-5} \text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ para un electrodo sin modificar, hasta $6.47 \cdot 10^{-6} \text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ para un electrodo modificado con un recubrimiento máximo de DTSP ($\theta=0.93$). Esta disminución de la constante de velocidad aparente al modificar el electrodo se debe, a que en presencia de la monocapa, aumenta la resistencia a la transferencia de carga entre el par redox y la superficie del electrodo, debido al impedimento estérico que sufren los iones $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ para acceder a la interfase.

Con propósitos comparativos se calculó el recubrimiento de DTSP para un tiempo de adsorción de 3 horas, (Ecuación 100) para un electrodo $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ de 5.5 capas obteniéndose un valor de 0.51. En principio este valor puede parecer bajo, pero es necesario tener en cuenta las interacciones laterales existentes entre las propias moléculas de DTSP, que están adsorbidas en las cavidades esféricas de estas estructuras macroporosas así como el tamaño de la propia molécula. Con estos resultados se concluyó, al igual que para los electrodos de Au policristalino y Au rugoso, que el tiempo óptimo para la adsorción del DTSP tanto sobre el Au electrodepositado como sobre $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ es de 3 horas, llegando a un compromiso entre el grado de recubrimiento y el tiempo invertido para la preparación del electrodo.

5.3.3.2 Construcción del biosensor

En la configuración del biosensor desarrollado, la enzima lactato oxidasa (LOx) se inmovilizó covalentemente sobre el transductor de Au_{3DOM} previamente modificado con DTSP.

La espectroscopia de impedancia electroquímica pone de manifiesto los cambios sufridos en la interfase en cada uno de los pasos seguidos para la construcción del biosensor. Los diagramas de impedancia obtenidos para Au_{3DOM} , Au_{3DOM} -DTSP y Au_{3DOM} -DTSP-LOx se muestran en las Figura 76 y Figura 77.

El módulo de impedancia de los diagramas de Bode (Figura 76(b)) presenta un plató a altas frecuencias. El valor de la impedancia en esta región, donde $\phi \approx 0$ (Figura 76(b)), proporciona la resistencia del electrolito (R_e) en cada caso. La resistencia del electrolito aumenta al modificar el Au_{3DOM} con DTSP así como con la inmovilización posterior de la enzima (Tabla XV). Como ya se ha mencionado anteriormente, este aumento puede ser debido a que además de la resistencia del electrolito entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, este parámetro (R_e) posee otra contribución debida a la modificación superficial del electrodo de trabajo^[142].

A lo largo de todo el intervalo de frecuencia, en los tres casos, se observan dos pendientes diferentes con dos constantes de tiempo (τ_{TC} , τ_W) y sus correspondientes valores máximos para el ángulo de fase (ϕ_{MAX}), asociados a un proceso cinético (frecuencias altas), y a un proceso difusivo (frecuencias bajas).

Para el electrodo Au_{3DOM} modificado con el tiol (Au_{3DOM} -DTSP), aparece una pendiente de -0.15 en la zona de altas frecuencias (10^3 - 10^4 Hz) con el correspondiente ángulo de fase de 12.65° . En el caso del biosensor completo (Au_{3DOM} -DTSP-LOx), la pendiente aparece a frecuencias más bajas (10 - 10^3 Hz) y su valor aumenta hasta alcanzar un valor de aproximadamente -0.79 y un ángulo de fase de -60.74° . Dicha pendiente puede ser atribuida a un capacitor en paralelo con una resistencia (R_{TC}). Por tanto, el aumento en la pendiente después de

inmovilizar la enzima indica un aumento en el carácter capacitativo del sistema. Este hecho también se ve reflejado en los valores de la capacidad (C_1) calculados a partir del valor de la frecuencia ω_{max} . Este valor aumenta desde $8.75 \cdot 10^{-7} \text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ para el $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ hasta $2.62 \cdot 10^{-6} \text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ para el biosensor completo ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$) (Tabla XV).

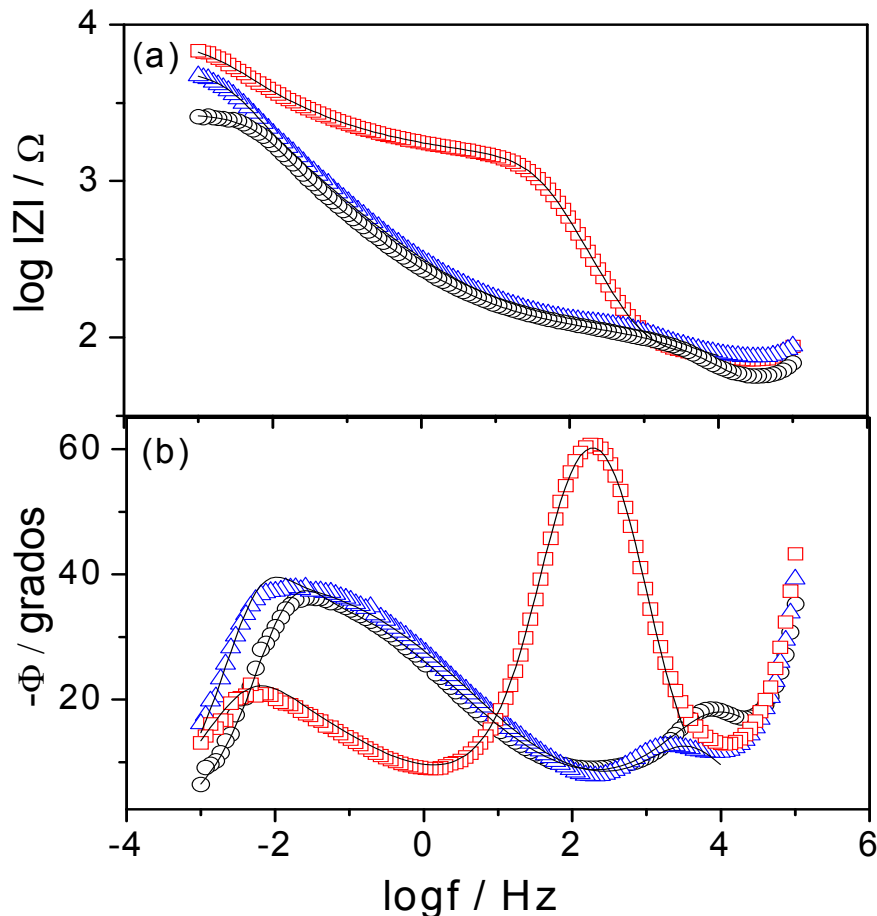


Figura 76: Diagramas de Bode para $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ (o), $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP}$ (Δ) y $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ (\square) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. (a) Diagrama de Bode de logaritmo del módulo de la impedancia frente al logaritmo de la frecuencia. (b) Diagrama de Bode de ángulo de fase frente al logaritmo de la frecuencia.

El valor de la impedancia en el plató a bajas frecuencias ($10^1 - 10^{-1} \text{Hz}$), nos proporciona el valor de $R_{\text{TC}} + R_e$. Es de destacar que la resistencia a la transferencia de carga en presencia de la enzima ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$), ha aumentado en más de un orden de magnitud en comparación con el electrodo sin modificar ($\text{Au}_{3\text{DOM}}$) o modificado con el tiol ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP}$).

La resistencia total del circuito ($Z_{WR}+R_{TC}+R_e$) se puede obtener a partir del plató existente a frecuencias más bajas (10^{-3} Hz) en el diagrama del módulo de impedancia vs. frecuencia, donde el ángulo de fase está próximo a cero (Figura 76).

Estos mismos parámetros pueden obtenerse a partir del diagrama de Nyquist (Figura 77). Los diagramas de Nyquist para Au_{3DOM} , Au_{3DOM} -DTSP y Au_{3DOM} -DTSP-LOx muestran dos intervalos de frecuencia bien diferenciados. A altas frecuencias (entre 10^4 y 10^1 Hz) aparece un semicírculo, cuya intersección con el eje real a frecuencias más altas corresponde a la resistencia del electrolito (R_e). La intersección del semicírculo con el eje real a frecuencias más bajas (R_e+R_{TC}) proporciona la resistencia a la transferencia de carga para cada una de las interfases electrolito/ Au_{3DOM} , Au_{3DOM} -DTSP y Au_{3DOM} -DTSP-LOx. En el inset de la Figura 77 se puede observar como la R_{TC} para el Au_{3DOM} y el Au_{3DOM} -DTSP es mucho menor que para el biosensor (Au_{3DOM} -DTSP-LOx).

A frecuencias más bajas, contrariamente al comportamiento seguido por el Au policristalino, se obtiene un semicírculo característico de un proceso difusivo a través de una capa finita para el Au_{3DOM} , indicando el carácter macroporoso de la superficie electródica. Este comportamiento es similar al encontrado para los electrodos de oro rugoso Au_R . A partir de la intersección con el eje real se puede calcular la resistencia de Warburg (Z_{WR}). En este caso, la conducta seguida por el electrodo Au_{3DOM} modificado tanto con el tiol como con la enzima es bastante similar a la del electrodo policristalino funcionalizado (Figura 77 y Figura 30). Sin embargo, el valor obtenido para la impedancia de Warburg (Z_{WR}) del biosensor Au_{3DOM} -DTSP-LOx es 30 veces mayor que para el biosensor Au_p -DTSP-LOx (Tabla XV).

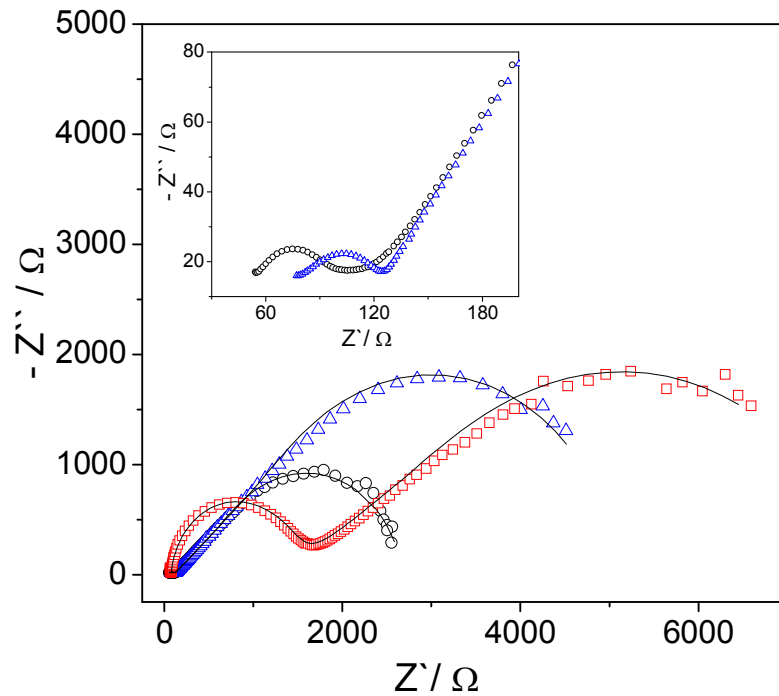


Figura 77: Diagrama de Nyquist para $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ (o), $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP}$ (Δ) y $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ (\square) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Los diagramas de impedancia se ajustaron considerando el circuito de Randles de la Figura 78:

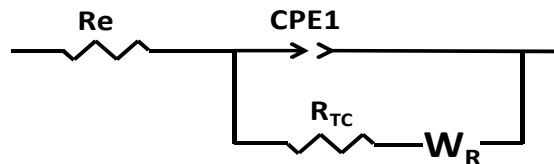


Figura 78: Circuito equivalente de Randles.

Este circuito incluye los siguientes elementos electrónicos:

- R_e : es la resistencia del electrolito entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo.
- R_{TC} : es la resistencia a la transferencia de carga debida por una parte a la sobretensión intrínseca de la reacción y por otra al impedimento estérico que sufren los iones ferro/ferricianuro en cada una de las interfases creadas en la construcción del biosensor.

- **CPE1**: es un elemento constante de fase que simula la conducta no-ideal del capacitor y que puede ser modelado como una combinación en serie de la capacidad debida a la modificación superficial y la capacidad de la doble capa. La componente debida a la modificación superficial depende del espesor y de la constante dieléctrica de la capa adsorbida. En este circuito se ha utilizado un elemento distributivo en lugar de un capacitor que representa las heterogeneidades existentes sobre la superficie.

R_{TC} y CPE1 corresponden a la interfase más externa del electrodo Au_{3DOM} modificado (Au_{3DOM} -DTSP y Au_{3DOM} -DTSP-LOx) o sin modificar (Au_{3DOM}) con la disolución.

- **Z_{WR}** : es una resistencia de Warburg de longitud finita que representa la difusión iónica del par redox a través de la estructura porosa del electrodo Au_{3DOM} modificado y sin modificar.

Los resultados experimentales así como los obtenidos a partir del ajuste de las medidas de EIS con el circuito equivalente, para cada uno de los pasos seguidos para construir el biosensor, se muestran en la Tabla XV.

Tabla XV

Resultados experimentales y de los ajustes de las medidas de EIS, para Au_{3DOM}-DTSP-LOx fabricado sobre un transductor de oro 3DOM de 5.5 capas.

	Au _{3DOM}	Au _{3DOM} -DTSP	Au _{3DOM} -DTSP-LOx
<i>Resultados experimentales</i>			
Re (Ω)	44.94	65.99	74.62
R _{TC} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	40.21	81.67	1616.64
k ⁰ ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	$6.61 \cdot 10^{-6}$	$3.26 \cdot 10^{-6}$	$1.64 \cdot 10^{-7}$
C ₁ ($\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$)	$8.75 \cdot 10^{-7}$	$1.49 \cdot 10^{-6}$	$2.62 \cdot 10^{-6}$
τ_{TC} (s)	$3.52 \cdot 10^{-5}$	$1.21 \cdot 10^{-4}$	$4.27 \cdot 10^{-3}$
Z _{WR} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	1593.51	4880.29	5659.46
τ_{ω} (s)	24.84	53.85	62.87
σ ($\Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$)	141.90	295.06	316.70
K ($\text{s}^{1/2}$)	11.23	16.54	17.87
δ (μm)	3.99	8.64	10.09
b	-0.85 (-40.3°)	-0.87(-40.9°)	-0.59 (-30.5°)
<i>Resultados de los ajustes</i>			
Re (Ω)	37.96	71.29	76.30
R _{TC} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	45.51	78.24	1497.22
CPE1($\text{S} \cdot \text{s}^n \text{cm}^{-2}$)	$1.61 \cdot 10^{-6}$	$2.42 \cdot 10^{-6}$	$3.43 \cdot 10^{-6}$
n	0.69	0.93	0.95
Z _{WS} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	1673.72	5574.42	7212.71
Z _{WT}	53.06	138.40	210.30
Z _{WP}	0.45	0.45	0.38
χ^2	$3 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$

A partir de los resultados obtenidos se observa que el Au_{3DOM} sin modificar presenta una resistencia a la transferencia de carga relativamente baja (40.21 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) para la sonda redox, respecto al Au_{3DOM} modificado (Au_{3DOM}-DTSP y Au_{3DOM}-DTSP-LOx). Después de modificar el transductor con DTSP (Au_{3DOM}-DTSP), la R_{TC} aumenta prácticamente al doble (81.67 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) (Tabla XV). Esto puede atribuirse al factor estérico que supone el DTSP inmovilizado sobre la estructura macroporosa para el acceso de los iones ferro/ferricianuro a la superficie libre.

Después de la inmovilización covalente de la enzima LOx ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$), a través de la reacción de sus aminas libres con los grupos succinimida terminales del DTSP, la R_{TC} aumenta drásticamente (Tabla XV). La enzima forma una capa superficial que dificulta la transferencia de carga entre el marcador redox que se encuentra en disolución y la superficie del electrodo. Sin embargo, el hecho de que la enzima este inmovilizada en las cavidades esféricas del electrodo de oro macroporoso ofrece un impedimento adicional que da lugar a valores muy altos de R_{TC} respecto al oro policristalino (Au_p). ($1616.64 \Omega \cdot \text{cm}^2$ vs. $77.71 \Omega \cdot \text{cm}^2$).

Por tanto, como acabamos de ver, un aumento en la impedancia indica que tanto las moléculas de DTSP como la enzima impiden la transferencia de carga entre los iones ferro/ferri y la superficie de $\text{Au}_{3\text{DOM}}$. El valor de k_0 para la sonda redox sobre el electrodo $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ modificado con DTSP ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP}$) es $3.26 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ (Tabla XV). Este valor de la constante de velocidad de transferencia de carga es un orden de magnitud menor que el obtenido para un electrodeposición de oro sin *template* de esferas y modificado con DTSP durante el mismo tiempo de adsorción ($t=3\text{h}$) ($K_{\text{app}}=1.36 \cdot 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$), indicando que la estructura 3DOM ofrece una mayor dificultad para la transferencia de carga.

Para el biosensor completo ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$), el valor de la constante de velocidad de transferencia de carga, k_0 , disminuye un orden de magnitud ($1.64 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$).

Por otro lado, la capacidad de la doble capa disminuye con la modificación superficial del $\text{Au}_{3\text{DOM}}$, de acuerdo con la variación obtenida para R_{TC} (Tabla XV). Los valores de capacidad muestran un bloqueo de la interfase, confirmando la modificación del transductor, así como la inmovilización de la enzima. Los valores de capacidad son consistentes con los observados previamente en la bibliografía^[181]. Si estudiamos los resultados del ajuste (Tabla XV), cabe destacar que el valor de n , asociado a CPE1, aumenta con la presencia de la enzima,

indicando un aumento en el carácter capacitativo de la interfase enzima/disolución.

La constante de tiempo del correspondiente proceso de transferencia de carga se puede calcular a partir del valor de la frecuencia, ω_{max} , (obtenido en el máximo del semicírculo en el eje imaginario), empleando la ecuación 91^[156]:

$$\tau_{TC} = 1/\omega_{max} = R_{TC} \cdot C_1$$

El valor de esta constante de tiempo aumenta desde $3.52 \cdot 10^{-5}$ s para el Au_{3DOM} a $4.27 \cdot 10^{-3}$ s para Au_{3DOM} -DTSP-LOx. Puesto que la constante de tiempo es el producto de una resistencia por la capacidad del condensador que simula la interfase donde tiene lugar el proceso cinético de la transferencia de carga, una disminución en el valor de este parámetro refleja que la modificación superficial del electrodo produce una ralentización del proceso de carga de la doble capa.

Los valores obtenidos para el elemento de Warburg de longitud finita (Z_{WR}) reflejan la dificultad que tiene los iones $[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ para difundir a través de la estructura macroporosa respecto al oro liso ($1593.51 \Omega \cdot cm^2$ vs. $151.77 \Omega \cdot cm^2$). Este impedimento aumenta con la modificación de la superficie del transductor, alcanzando valores superiores a $5000 \Omega \cdot cm^2$ para el biosensor completo (Au_{3DOM} -DTSP-LOx) (Figura 77 y Tabla III). Además en este intervalo de frecuencias, un valor de la pendiente (Z'' vs. Z') cercano a la unidad, junto con un ángulo de fase cercano a 45° y un valor de W_p de 0.38, indican que el proceso está controlado por difusión iónica (Tabla XV).

La constante de tiempo para el proceso de difusión se puede calcular a partir de la ecuación 92:

$$\tau_w = 1/\omega_{max}^w = K^2/5.08 \quad \text{Siendo:} \quad K = \delta \left(2/D \right)^{1/2}$$

El valor de τ_w aumenta en cada uno de los pasos seguidos para la construcción del biosensor (Tabla XV) indicando que el proceso de difusión iónica a través de la interfase es más lento cuando se adsorbe el tiol y se ancla la enzima.

Los valores del espesor de la capa de difusión (δ) son mayores que los correspondientes a la carga de la doble capa ($1.4\mu\text{m}$) obtenidos a partir de una difusión lineal semi-infinita, reflejando la complejidad del proceso de difusión en cada cavidad esférica así como a través del número de capas del ópalo inverso.

Como se ha visto anteriormente, para un sistema controlado por difusión la constante K está relacionada con la parte real de la impedancia de Warburg (Z_{WR}) a través del coeficiente de Warburg (σ), siendo $Z_{WR} = \sigma K$. En este caso, el diagrama de Nyquist es característico de un sistema con $R_{TC} \ll \sigma K$, en el que la resistencia a la transferencia de carga ($1616.64\Omega\cdot\text{cm}^2$) es mucho menor que la de difusión ($5659.46\Omega\cdot\text{cm}^2$). Los valores obtenidos para estos parámetros se muestran en la Tabla XV.

5.3.3.3 *Estudio de la respuesta de EIS en función del número de capas del $\text{Au}_{3\text{DOM}}$.*

Con el fin de establecer, cómo afecta, el aumento el número de capas de poros de un electrodo de oro 3DOM a su potencial actividad electrocatalítica, se estudió la respuesta de impedancia electroquímica en función del numero de capas del transductor $\text{Au}_{3\text{DOM}}$. El diagrama de Nyquist obtenido para un electrodo depósito de oro (0 capas) y para electrodos de oro 3DOM de 1.5, 2.5, 3.5 y 5.5 capas se representa en la Figura 79.

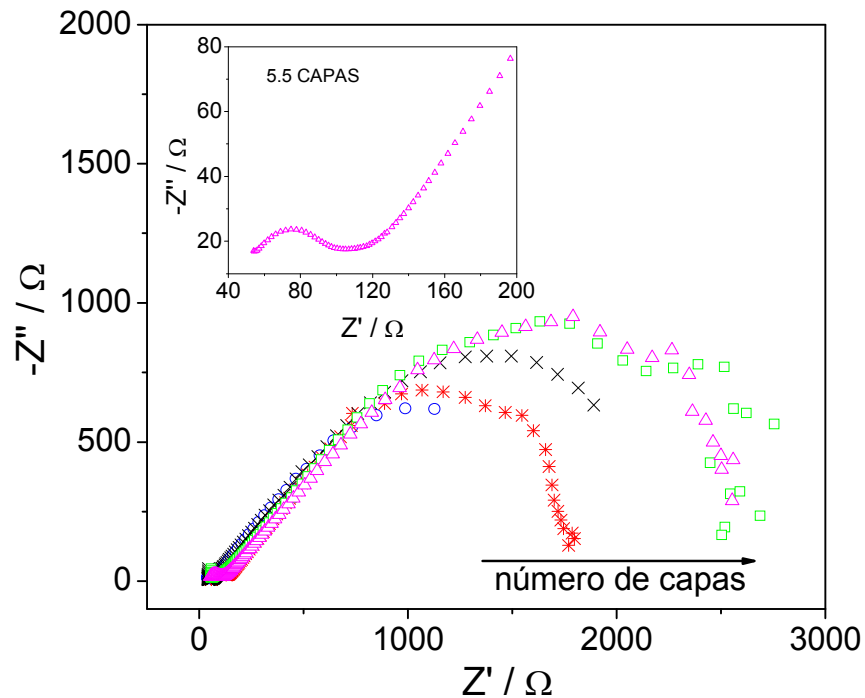


Figura 79: Diagrama de Nyquist para Au_{3DOM} con diferente número de capas en 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ + 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ en 0.1 M PBS (pH = 7) + 0.1 M KCl: electrodeposición de oro (O), 1.5 capas (*), 2.5 capas (x), 3.5 capas (\square), 5.5 capas (Δ).

Los diagramas de impedancia se ajustaron de acuerdo al siguiente circuito equivalente:

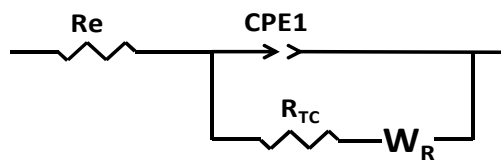


Figura 80: Circuito equivalente de Randles.

El circuito de Randles incluye los siguientes elementos electrónicos:

- R_e : representa la resistencia del electrolito entre el electrodo de trabajo (Au_{3DOM}) y el de referencia.
- R_{TC} : es la resistencia a la transferencia de carga en la interfase generada entre los iones ferro/ferricianuro y los electrodos de Au_{3DOM} con diferente número de capas de poros.
- **CPE1**: o elemento constante de fase. Representa la capacidad en la interfase electrolito/ Au_{3DOM} (N capas).

- Z_{WR} : es el elemento de Warburg de longitud finita y representa la difusión a través de una estructura porosa. En este caso la difusión a través de la estructura porosa de los electrodos Au_{3DOM} (N capas) sin modificar.

Los resultados experimentales obtenidos, así como los ajustes de las medidas de EIS con el circuito equivalente (Figura 80), se muestran en la Tabla XVI.

Tabla XVI

Resultados experimentales de las medidas de EIS para Au_{3DOM} con distinto número de capas de poros.

	Depósito	1.5 capas	3.5 capas	5.5 capas
Resultados experimentales				
Re (Ω)	33.84	54.93	50.54	44.94
R_{TC} ($\Omega \cdot cm^2$)	2.93	35.68	34.09	40.21
K_0 ($m \cdot s^{-1}$)	$9.08 \cdot 10^{-5}$	$7.45 \cdot 10^{-6}$	$7.80 \cdot 10^{-6}$	$6.61 \cdot 10^{-6}$
C_1 ($F \cdot cm^{-2}$)	$1.00 \cdot 10^{-5}$	$6.98 \cdot 10^{-6}$	$5.66 \cdot 10^{-6}$	$8.75 \cdot 10^{-7}$
Z_{WR} ($\Omega \cdot cm^2$)	136.85	948.25	1245.20	1593.51
b	-0.94 (-43.3°)	-0.93 (-42.9°)	-0.88 (-41.3°)	-0.85 (-40.3°)
Resultados del ajuste				
Re (Ω)	34.55	41.30	45.56	37.96
R_{TC} ($\Omega \cdot cm^2$)	2.41	28.6	29.46	45.51
$CPE1(S \cdot s^n cm^{-2})$	$2.93 \cdot 10^{-5}$	$1.48 \cdot 10^{-5}$	$6.30 \cdot 10^{-6}$	$1.61 \cdot 10^{-6}$
n	0.89	0.89	0.58	0.69
$Z_{WS}(\Omega \cdot cm^2)$	140.18	1171.92	1286.26	1673.72
Z_{WT}	49.91	96.77	32.11	53.06
Z_{WP}	0.48	0.45	0.46	0.45
χ^2	$6 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$

Los resultados muestran que el valor de R_{TC} aumenta un orden de magnitud para una estructura 3DOM respecto al mismo electrodeposito sobre oro liso. Sin embargo, la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) permanece prácticamente constante cuando aumenta el número de capas de poros del Au_{3DOM} . El valor de R_{TC} permanece en torno a $35 \Omega \cdot cm^2$, sufriendo un ligero aumento de $5 \Omega \cdot cm^2$ para los

electrodos de 5.5 capas (inset Figura 79). Este aumento de R_{TC} se traduce en una ligera disminución en el valor de la constante de velocidad de transferencia electrónica (k_0) para el par redox ferro/ferricianuro, desde $7.45 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ para el electrodo $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ de 1.5 capas, hasta un valor de $6.61 \cdot 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ para el $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ de 5.5 capas, según muestra la ecuación (90):

$$k^0 = \frac{RT}{(n^2 F^2 R_{TC} C)}$$

Para obtener la magnitud de la capacidad a partir de los resultados experimentales, se seleccionó la frecuencia (f_i) a la cual Z'' es máximo y se calculó la capacidad a partir de la inversa de la resistencia a la transferencia de carga:

$$C = 1/2\pi f_i R_{TC}$$

En concordancia con el ligero aumento de R_{TC} en función del número de capas de esferas que forman el ópalo, la capacidad disminuye a medida que aumenta el número de capas de poros.

A bajas frecuencias, a partir del diagrama de Nyquist se puede obtener la impedancia de Warburg (Z_{WR}). Los valores obtenidos para Z_{WR} aumentan con el número de capas de poros, desde $948.25 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ para el electrodo $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ de 1.5 capas hasta $1593.51 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ para el electrodo $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ de 5.5 capas. Este comportamiento indica que los iones $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sufren un cierto impedimento en la difusión a través de los poros existentes en la estructura tridimensional. Además, en este intervalo de frecuencias el valor de la pendiente b (Z'' vs. Z') es próxima a la unidad, con su valor del ángulo asociado cercano a 45° , lo que indica que el proceso más lento es la difusión lineal semi-infinita hacia la superficie electródica de oro sin ópalo. Sin embargo, una ligera disminución tanto en el valor de la pendiente así como en el ángulo correspondiente, a medida que aumenta el número de capas, refleja que el sistema se aleja de ese comportamiento teniendo lugar la difusión a través de una capa porosa de longitud finita.

Por lo tanto, aunque la difusión del mediador redox (HMF), esté ligeramente impedida al aumentar el número de capas de poros, la constante cinética de transferencia de carga es prácticamente la misma.

No obstante, el máximo número de capas infiltradas para formar un ópalo inverso de oro fue de 7.5, puesto que la amplitud de la onda en la cronoamperometría utilizada para electrodepositar el oro disminuye cuando el número de capas aumenta (Figura 62). Valores por encima de 7.5 capas dan lugar a corrientes demasiado pequeñas, siendo difícil controlar el espesor. De hecho, la relación entre el área de un electrodo de Au_{3DOM} y el número de capas de poros deja de ser lineal (Figura 66), debido a la presencia de defectos superficiales como por ejemplo diferentes niveles de crecimiento.

5.3.4 Respuesta del biosensor

5.3.4.1 *Respuesta del biosensor en función del número de capas de Au_{3DOM} .*

Con el fin de determinar el efecto del incremento en el número de capas de poros del transductor de oro, sobre la respuesta electrocatalítica del biosensor Au_{3DOM} -DTSP-LOx, se desarrollaron biosensores con distinto número de capas de poro. Para confirmar el papel de la enzima LOx en la respuesta catalítica al sustrato se registraron los voltamogramas cíclicos para los electrodos de Au_{3DOM} modificados con DTSP y sin modificar, en ausencia de enzima y en presencia del mediador. Los resultados obtenidos, en ambos casos, confirman que la adición de L-lactato no produce ningún efecto catalítico, solamente los picos característicos de un proceso reversible asociado con el par redox ferroceno/ferrocinio.

La Figura 81(a) muestra la respuesta voltamétrica para un biosensor construido sobre un electrodo de oro 3DOM de 5.5 capas (Au_{3DOM} -DTSP-LOx). La curva A corresponde a la señal obtenida antes de añadir el sustrato y la curva B a la señal en presencia de sustrato. Como era de esperar, en ausencia de sustrato la

respuesta redox obtenidas es características del par redox ferroceno/ferrocinio ($E_{pa}-E_{pc} = 73 \text{ mV}$). Al añadir una concentración de L-lactato, en el voltamograma se observa un aumento de la intensidad de pico anódica a la vez que disminuye la intensidad de corriente catódica. Este comportamiento es consistente con un fuerte efecto electrocatalítico, y confirma el papel de la enzima en la respuesta del biosensor al L-lactato.

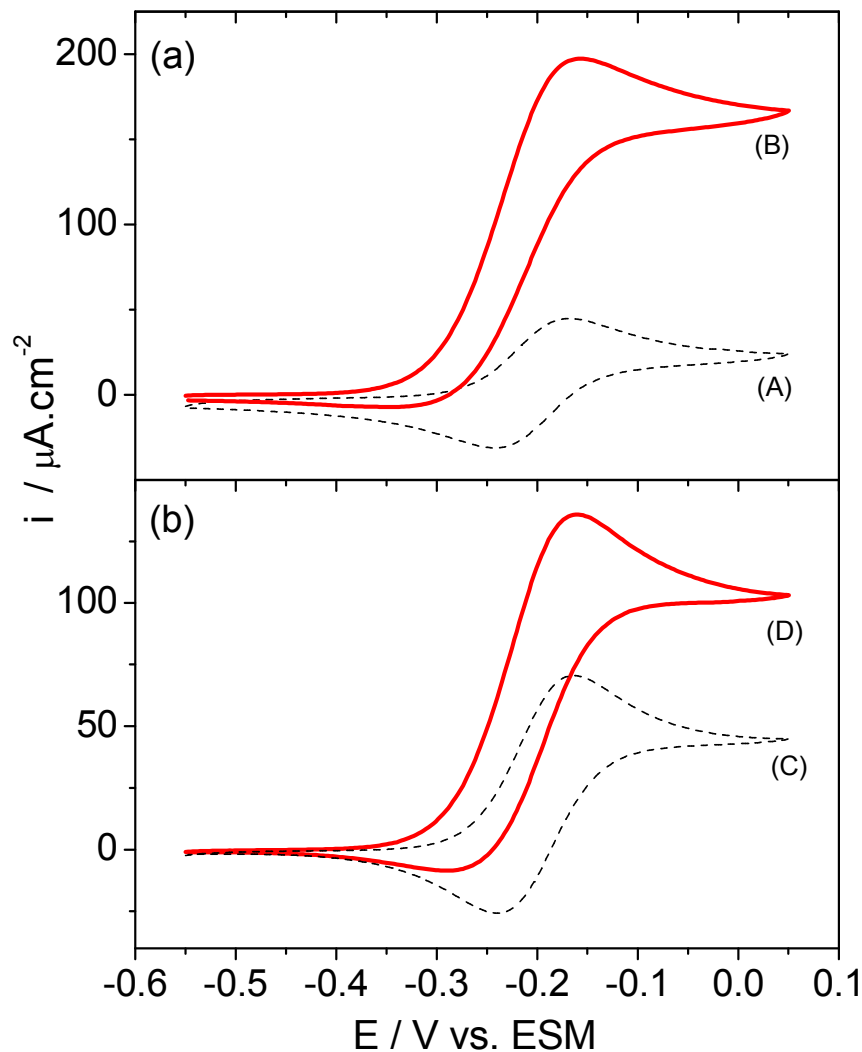


Figura 81: Voltamograma cíclico de los biosensores de lactato oxidasa inmovilizada sobre a) un electrodo macroporoso de oro modificado con DTSP ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$) y b) un electrodo de oro macroporoso sin modificar ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$), en una disolución 0.1M de tampón fosfato que contiene 1.0mM de hidroximetilferroceno, en ausencia de sustrato (curvas A y C) y en presencia de 14.0 mM de L-lactato (curvas B y D). Espesor del depósito: 5.5 capas de poros ($\nu = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$).

En la Figura 82 se ha representado la corriente catalítica del biosensor en función del número de capas de poro del transductor. Las corrientes presentadas se

obtuvieron a una concentración 14.0 mM de L-lactato en una disolución de tampón fosfato (pH=7), que contiene 1.0 mM HMF. El resultado muestra que la corriente catalítica aumenta proporcionalmente con el número de capas de poros del Au_{3DOM}, alcanzando un valor de 3 veces mayor que para el oro policristalino (Au_p) para un Au_{3DOM} de 7.5 capas.

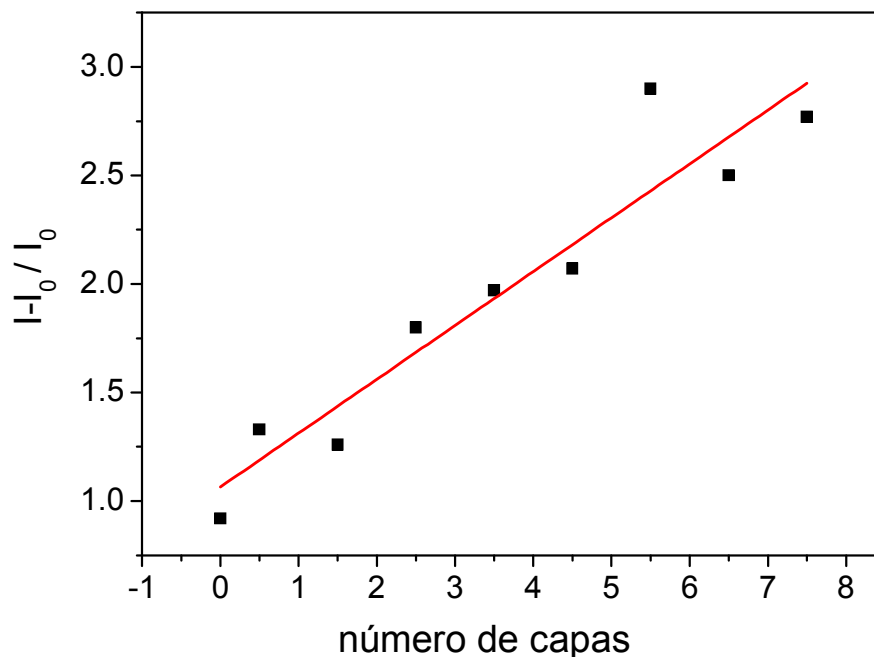


Figura 82: Respuesta electrocatalítica del biosensor en función del número de capas de poros del Au_{3DOM}.

Este hallazgo sugiere, como ha sido reportado anteriormente por Ben-Ali y col.^[31], que la superficie interior total del electrodo macroporoso es electroquímicamente activa. Es decir, todos los poros son accesibles para el mediador (HMF), independientemente de su localización respecto a la interfase externa electrodo/electrolito. Además este tipo de estructuras tridimensionales permiten que la enzima, inmovilizada a través del DTSP, permanezca activa y accesible para catalizar el L-lactato, así como el transporte del sustrato (ácido láctico) hacia el interior de la estructura y la difusión del producto generado por la actividad enzimática (piruvato) hacia el exterior.

Este fenómeno se debe a la interconexión entre los huecos esféricos a través de canales^[225]. Los resultados confirman que los electrodos de oro 3DOM constituyen

un buen soporte para emplearse como transductor en el desarrollo de biosensores, ya que permiten almacenar grandes cantidades de la biomolécula en un electrodo de volumen pequeño, dando lugar a la obtención de corrientes electrocatalíticas mayores que sobre un electrodo sin nanoestructurar.

5.3.4.2 *Respuesta del biosensor en función del tipo de inmovilización*

Se estudió la influencia del método de inmovilización de la enzima sobre electrodos de $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ (5.5 capas). Para ello se utilizó el método de inmovilización por adsorción directa ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$) y se comparó con el biosensor preparado por inmovilización covalente a través del tiol ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$). La Figura 81(a) muestra la respuesta voltamétrica para $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ y la Figura 81(b) para el $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$.

En ambos casos los voltamogramas se obtuvieron en una disolución reguladora de $\text{pH}=7$, en presencia de una concentración 1mM de hidroximetilferroceno. En ausencia de sustrato, curvas (A y C), la respuesta redox obtenidas es característica de un proceso reversible, observándose en presencia de sustrato, curvas (B y D), el efecto electrocatalítico. Sin embargo, la respuesta catalítica es mayor en el caso del biosensor basado en la inmovilización covalentemente de la enzima a través del DTSP ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$), que en el biosensor desarrollado por inmovilización directa de la enzima ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$).

Curvas de calibrado

Para obtener las curvas de calibrado de ambos biosensores ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$ y $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$) se emplearon como transductores, electrodos de $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ de 5.5 capas.

Se realizaron medidas de voltametría cíclica, introduciendo el electrodo en una disolución 1.0 mM de hidroximetilferroceno en tampón fosfato 0.1 M de $\text{pH} = 7$,

sobre la que se añadieron cantidades crecientes de lactado. El barrido de potencial fue desde -0.55 V hasta 0.50 V vs ESM a una velocidad de barrido de $0.1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.

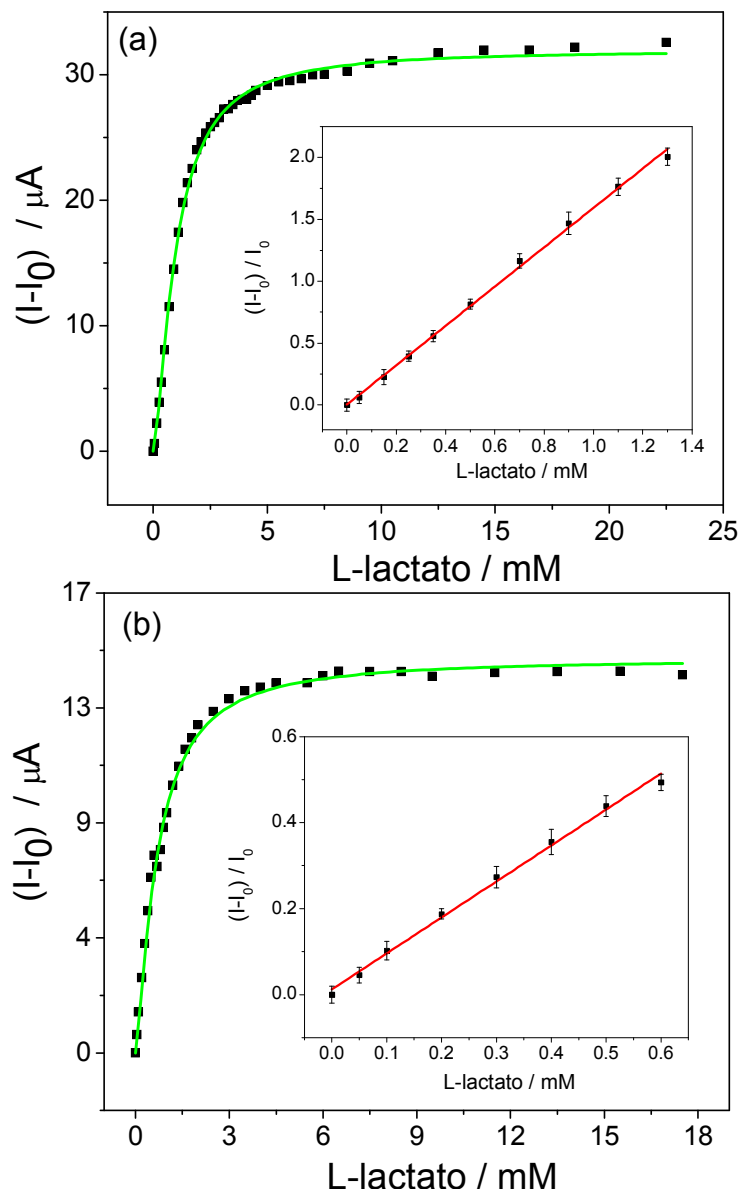


Figura 83: Curvas de calibrado obtenidas a partir de la corriente estacionaria menos I_0 del voltamograma obtenido en PB a $\text{pH}=7$ en presencia de cantidades crecientes de sustrato para a) $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ y b) $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$. Espesor del depósito: 5.5 capas. El inset corresponde al intervalo lineal en cada caso.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 83, donde se representa la corriente electrocatalítica en función de la concentración de L-lactato. Cada uno de estos datos fue obtenido, a partir de la medida de la corriente estacionaria de los voltamogramas realizados a distintas concentraciones de sustrato, restándole la

corriente correspondiente en ausencia de sustrato. Cada punto representa el valor medio de tres mediciones. El comportamiento en ambos tipos de biosensores, tanto en Au_{3DOM} -LOx como en Au_{3DOM} -DTSP-LOx, sugiere que la respuesta electroquímica está bajo control enzimático.

En la Figura 83 se observa que la respuesta de ambos biosensores sigue el modelo de Michaelis-Menten, alcanzando un valor de corriente máximo y constante a partir de una determinada concentración de sustrato.

Cálculo de las constantes cinéticas del biosensor

Los valores de K_M , calculados mediante el ajuste de regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, para Au_{3DOM} -LOx y Au_{3DOM} -DTSP-LOx, fueron 0.63 y 1.02mM respectivamente y sus corrientes máximas, obtenidas del máximo de la curva $((I-I_0)_{max})$, alcanzaron un valor de 14.33 y 32.52 $\mu A \cdot cm^{-2}$. Los valores de K_M indican que la afinidad de la enzima por el sustrato es menor cuando la enzima se ancla covalentemente al transductor que cuando se inmoviliza directamente por adsorción. El aumento en la magnitud de K_M amplía el límite superior de la respuesta lineal, pasando de 0.6 mM en Au_{3DOM} -LOx a 1.3 mM para Au_{3DOM} -DTSP-LOx. Por lo tanto, el intervalo lineal será más amplio para Au_{3DOM} -DTSP-LOx (Tabla XVIII).

La ecuación de Michaelis puede ser reescrita de varias formas para conducir a representaciones lineales (Fundamentos teóricos página 35). Las diferentes representaciones de los resultados experimentales obtenidos para el biosensor de Au_{3DOM} -DTSP-LOx, se muestran en la Figura 84. Los valores de los parámetros K_M e $(I - I_0)_{max}$, así como el intervalo de concentración de sustrato donde se cumplen las ecuaciones teóricas, aparecen en la Tabla VII.

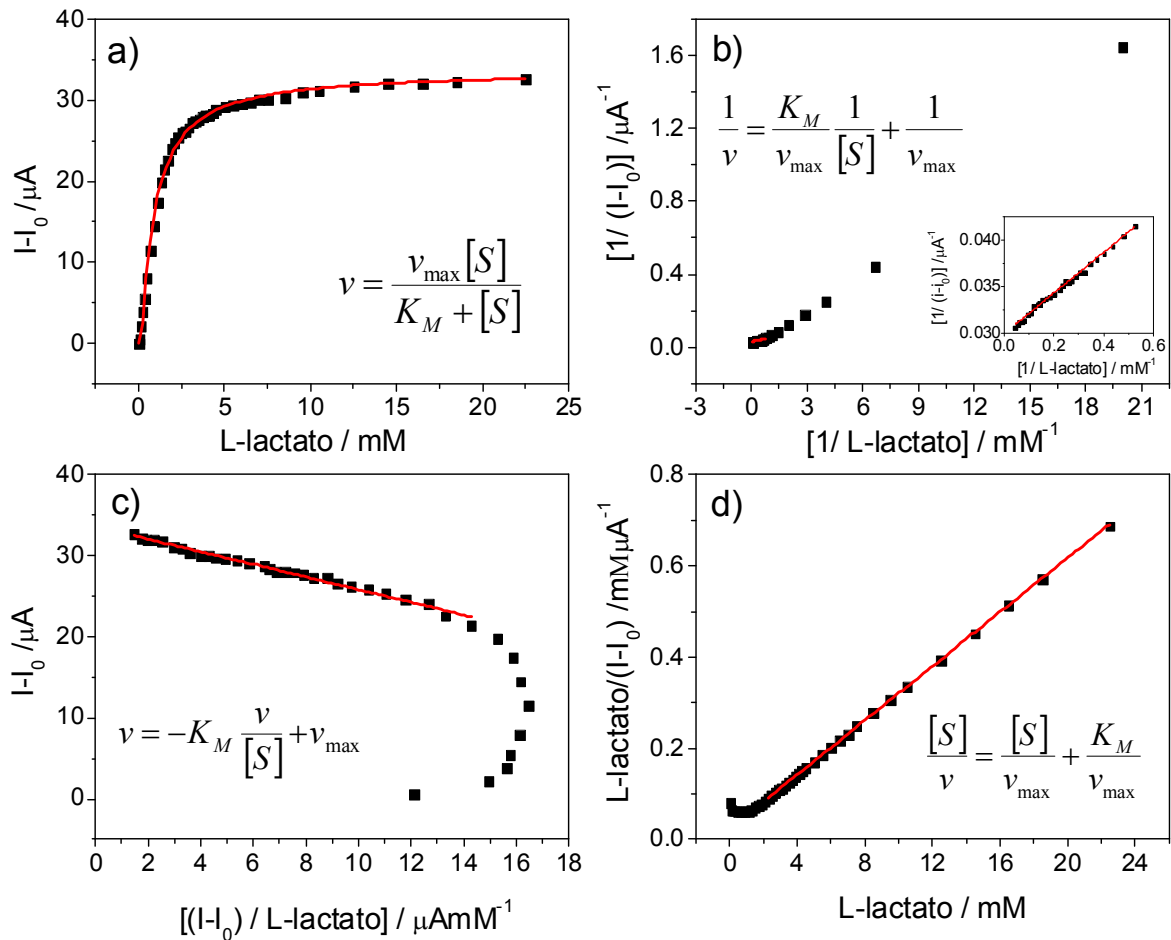


Figura 84: Distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre un electrodo de oro 3DOM de 5.5 capas ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$): a) Ajuste mediante regresión no lineal, b) Representación de Lineweaver Burk, c) Representación de Eadi-Hofstee, d) Representación Hanes.

Tabla XVII:

Parámetros obtenidos a partir de las distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre oro 3DOM ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$).

	Regresión no lineal	Lineweaver Burk	Eadi-Hofstee	Hanes
$(I-I_0)_{\max}$ (μA)	32.5175 ± 0.0001	33.879 ± 0.003	33.64 ± 0.06	33.6585 ± 0.0005
K_M (mM)	1.02 ± 0.01	0.8438 ± 0.0009	0.78 ± 0.02	0.78482 ± 0.00006
Intervalo lineal (mM)	-	1.9-22.5	1.9-22.5	1.9-22.5

Con las representaciones lineales de la ecuación de Michaelis-Menten se pone de manifiesto que la cinética michaeliana en el biosensor construido sobre un transductor de Au_{3DOM} , sólo se cumple para concentraciones de sustrato altas. Para concentraciones de L-lactato menores que 1.9mM, no existe una relación lineal entre la corriente catalítica y la concentración de sustrato.

Teniendo en cuenta el modelo cinético de Lyons^[132] (Fundamentos teóricos página 40), i.e. un biosensor electroquímico con una monocapa de enzima inmovilizada y un mediador soluble:

$$\frac{1}{J_S} = \frac{1}{Le_{\Sigma} k k_m m_L} + \frac{1}{k_c / K_M e_{\Sigma} L K_s S^{\infty}} + \frac{1}{k_c L e_{\Sigma}} \quad (101)$$

Si la constante catalítica (k_c) y la constante k para la regeneración del enzima oxidado y del mediador reducido ($m_L = m^{\infty}$) son muy rápidas comparadas con las otras etapas, la ecuación (101) queda reducida a:

$$\frac{1}{J_S} = \frac{K_M}{k_c e_{\Sigma} L K_s S^{\infty}} \left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)^{-1} \quad (102)$$

La representación de la inversa del flujo vs. $1/S^{\infty}$, sería lineal si el término $\left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)$ pudiera ser despreciado i.e. $J_S \ll J_{DS}$. Sin embargo, si el término $\left(1 - \frac{J_S}{J_{DS}}\right)$ es significativo existirá una desviación de la linealidad. Dicha representación es análoga al gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 84(b)), (Ecuación 14).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{k_c e_{\Sigma} S^{\infty}} + \frac{1}{k_c e_{\Sigma}} \quad (103)$$

Por tanto la desviación de la linealidad obtenida para concentraciones bajas de sustrato, cuando se utiliza una estructura macroporosa como el Au_{3DOM} , es debido a que aparecen efectos de polarización por concentración de sustrato, siendo el

flujo difusivo del sustrato, en la capa enzimática, muy diferente de su valor en el seno de la disolución.

5.3.4.3 *Determinación de las propiedades analíticas del biosensor*

Las propiedades analíticas de los biosensores preparados con y sin DTSP se obtuvieron a partir del intervalo lineal de la curva de calibrado (inset Figura 83). Con el fin de evitar las variaciones electrodo-electrodo, se ha representado la respuesta normalizada $(I-I_0)/I_0$ frente a la concentración de sustrato; donde I_0 e I representan las intensidades de corriente antes y después de la adición de sustrato. Los resultados obtenidos, se resumen en la tabla siguiente:

Tabla XVIII

Propiedades analíticas de los biosensores Au_{3DOM} -LOx y Au_{3DOM} -DTSP-LOx construidos sobre un transductor de oro 3DOM de 5.5 capas.

	Au_{3DOM}-LOx	Au_{3DOM}-DTSP-LOx
Respuesta lineal (mM)	<i>Hasta 0.6</i>	<i>Hasta 1.3</i>
Sensibilidad ($\mu A \cdot mM^{-1}$)	<i>0.79±0.02</i>	<i>1.63±0.02</i>
Límite de detección (μM)	<i>16.22</i>	<i>3.93</i>
Límite de determinación (μM)	<i>54.06</i>	<i>13.08</i>
Repetibilidad (R.S.D.)	<i>0.5%</i>	<i>0.3%</i>
Reproducibilidad (R.S.D.)	<i>3.9%</i>	<i>3.5%</i>
Estabilidad	<i>89%</i>	<i>100%</i>

Los valores de sensibilidad, calculados a partir de las pendientes de los intervalos lineales de los insets de la Figura 83, fueron $0.79\mu A \cdot mM^{-1}$ para Au_{3DOM} -LOx y $1.63\mu A \cdot mM^{-1}$ para Au_{3DOM} -DTSP-LOx. Este parámetro demuestra una importante ventaja en la inmovilización covalente de la enzima respecto a la

simple adsorción, obteniendo una mejora en la respuesta cuando la superficie de oro 3DOM se modifica con DTSP.

Los límites de detección y de determinación se definen como las concentraciones que dan lugar a una señal igual a tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de las señales correspondientes al blanco. Para el biosensor Au_{3DOM} -LOx los valores de estos parámetros fueron $16.22 \mu\text{M}$ y $54.06 \mu\text{M}$ respectivamente, mientras que para el Au_{3DOM} -DTSP-LOx se obtuvieron valores más bajos: $3.93 \mu\text{M}$ y $13.08 \mu\text{M}$, obteniéndose por tanto, mejores resultados cuando la enzima se inmoviliza de forma covalente.

La repetitividad se evaluó, comparando las señales analíticas obtenidas para cinco medidas sucesivas de un mismo biosensor, para una concentración de L-lactato 0.5M . La desviación estándar relativa obtenida fue 0.5% y 0.3% para Au_{3DOM} -LOx y para Au_{3DOM} -DTSP-LOx respectivamente.

Por otro lado, se evaluó la reproducibilidad, comparando las señales analíticas obtenidas con cinco electrodos diferentes, preparados del mismo modo y empleados para medir una concentración de sustrato 0.5mM , obteniéndose una desviación estándar de 3.9% y 3.5% .

Una de las propiedades más importantes que se debe tener en cuenta a la hora de construir un biosensor es que tenga una buena estabilidad. En nuestro caso, la estabilidad de almacenamiento se determinó midiendo durante un mes la respuesta catalítica de los biosensores de lactato a una concentración 0.5mM . Entre medida y medida, los biosensores se almacenaron en tampón fosfato $\text{pH} = 7$ a 4°C . Después de un mes, los biosensores basados en Au_{3DOM} -DTSP-LOx, retienen el 100% de su respuesta original, mientras que la respuesta de los biosensores basados en Au_{3DOM} -LOx, disminuye un 11% . Estos resultados vuelven a poner de manifiesto las ventajas de inmovilizar covalentemente la enzima, ya que en presencia de DTSP se mejora significativamente la estabilidad de los biosensores.

Como se ha demostrado para el biosensor $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ fabricado sobre un transductor de Au 3DOM de 5.5 capas^[174], estos dispositivos biosensores tienen un buen rendimiento analítico en cuanto a sensibilidad, límite de detección y estabilidad se refiere.

6 RESUMEN / ABSTRACT

6 RESUMEN / ABSTRACT

Con el objetivo de elaborar plataformas biosensoras con características operacionales mejoradas, se han fabricado dos tipos diferentes de estructuras de oro nanoestructurado (oro rugoso y oro 3DOM), estudiándose sus propiedades estructurales así como su influencia en la respuesta electrocatalítica del biosensor. Como punto de partida, y con propósitos comparativos, se construyó un biosensor enzimático de lactato utilizando como transductor un soporte de oro policristalino.

En primer lugar se analizó la morfología superficial de cada uno de los tres soportes de oro mediante SEM, AFM y DRX. La caracterización superficial del oro policristalino por microscopía de fuerza atómica (AFM), junto con su análisis topográfico, revelaron una estructura de rugosidad $R=1.5$ con una altura media de 30 nm, obteniéndose por difracción de rayos X (DRX) un tamaño de cristalita de 740Å. La morfología de las estructuras de oro rugoso es "tipo cerebro" y están basadas en un electrodeposición de oro tridimensional, formado por una red rectangular de columnas terminadas en una cúpula hemisférica. El radio medio de estas columnas se determinó por AFM y oscila entre 20-40nm, mientras que la altura media alcanza los 280nm, una altura casi 10 veces mayor que para el oro policristalino. En cuanto al tamaño medio de cristalita determinado por DRX (775Å), resultó ser del mismo orden que el obtenido para el oro policristalino aunque el electrodo rugoso presenta una estructura más cristalina. La mayor ventaja, de esta estructura tridimensional, radica en que proporciona un gran aumento del área superficial, alcanzándose un factor de rugosidad de hasta 100 veces el área inicial, lo que permitirá una mayor acumulación de material biológico en el biosensor que se desarrollará posteriormente.

En cuanto a las estructuras de oro macroporoso tridimensionalmente ordenado (Au_{3DOM}) analizadas mediante SEM y AFM, consisten en una red tridimensional de poros esféricos interconectados entre sí, ordenados formando

una red hexagonal compacta y abierta a través de la capa superior, lo que le proporciona una buena accesibilidad para que penetre la disolución del exterior hacia el interior y a la inversa. Esta estructura mantiene su periodicidad a lo largo de varios cientos de μm^2 y su morfología de cavidades esféricas resulta favorable para la acumulación de enzimas, sin que estas pierdan su actividad biológica. Al igual que en el soporte de oro rugoso, aunque en menor medida, con los soportes de $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ también se aumenta la relación área/volumen, alcanzándose un factor de rugosidad de 18.6 para un electrodo de 5.5 capas. La orientación preferencial, determinada por DRX, resultó similar a la encontrada para el oro policristalino, ofreciendo un tamaño medio de cristalita de 198 Å, considerablemente menor que los obtenidos para el Au_P y el Au_R .

Una vez fabricados y caracterizados los soportes nanoestructurados, se procedió a la preparación de los biosensores enzimáticos de lactato oxidasa (LOx) mediante dos metodologías diferentes: adsorción directa o mediante enlace covalente a través de un tiol bifuncional, el ditiobis (N-succinimidil propionato) o DTSP. Este se ancla a la superficie mediante un enlace Au-S y a la enzima a través de los grupos succinimida libres, que forman un enlace amida con las aminas de las lisinas de la enzima.

El tipo de enlace existente entre el DTSP inmovilizado y la superficie del oro se analizó mediante XPS, quedando demostrado, con la aparición en el espectro fotoelectrónico de rayos X de una nueva componente a 162.1 eV ($\text{S}2\text{p}_{3/2}$). Cuando el DTSP se inmoviliza sobre oro, rompe su enlace S-S para formar un enlace Au-S, descartando la presencia de especies disulfuro.

Mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se optimizó el tiempo de adsorción del tiol, sobre cada uno de los diferentes transductores de oro, para la obtención del recubrimiento máximo. A partir de la resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) del par redox ferro/ferri, sobre electrodos modificados con DTSP a distintos tiempos de inmovilización, se obtuvo el recubrimiento

superficial del tiol, concluyéndose que el tiempo óptimo para alcanzar un valor máximo, minimizando la desactivación del grupo succinimida presente en las moléculas de DTSP así como el tiempo de fabricación del biosensor, es de tres horas para los tres soportes.

La siguiente fase de la construcción del biosensor consiste en la inmovilización de la enzima. La inmovilización, tanto del DTSP como de la LOx sobre los diferentes soportes de oro, ha quedado demostrada con medidas de EIS. Los diagramas de Nyquist de los tres biosensores presentan dos intervalos de frecuencia bien diferenciados, con sus correspondientes constantes de tiempo. A altas frecuencias, tiene lugar el proceso de transferencia de carga del par redox sobre los sitios libres de la superficie electrodo, dejados por el DTSP ó el DTSP-LOx. Este proceso cinético lleva asociada una resistencia (R_{TC}) debida, por una parte, a la sobretensión inherente al proceso redox y por otra, al impedimento estérico que sufren los iones ferro/ferricianuro en las interfases creadas en cada paso de construcción del biosensor. El valor de R_{TC} para los electrodos modificados con el tiol (Au_p -DTSP, Au_R -DTSP y Au_{3DOM} -DTSP) son mayores que los valores correspondientes a los electrodos de oro sin funcionalizar, alcanzándose las resistencias más altas para los biosensores completos (Au_p -DTSP-LOx, Au_R -DTSP-LOx y Au_{3DOM} -DTSP-LOx). Es interesante resaltar que el valor obtenido para la constante de velocidad $k^0(m \cdot s^{-1})$ del proceso redox, disminuye con la modificación de la superficie, independientemente del soporte utilizado, siendo un orden de magnitud mayor para el biosensor construido sobre un transductor de oro policristalino. El hecho de que la cinética del mediador redox sea más lenta sobre los soportes nanoestructurados, lejos de ser un desventaja, permite que la reacción entre la enzima LOx reducida y el mediador oxidado sea más efectiva, como muestran las corrientes catalíticas obtenidas en los voltamogramas cíclicos para el Au_R y Au_{3DOM} (Figura 51 y Figura 81), independientemente de que además la razón área/volumen para estos electrodos sea mayor. De hecho, en el caso del Au_p (Figura 35) hubiera sido necesario aplicar velocidades de barrido del potencial

más lentas para obtener una corriente catalítica y eliminar el proceso de reducción de los iones Fe^{3+} , producidos en el barrido anódico y no consumidos por la enzima reducida (LOx_{Rd}) sobre la superficie electródica.

$K^0 \text{ (m}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$	Au_p	Au_p-DTSP	Au_p-DTSP-LOx
	$1.34\cdot 10^{-4}$	$1.18\cdot 10^{-5}$	$3.47\cdot 10^{-6}$
	Au_R	Au_R-DTSP	Au_R-DTSP-LOx
	-	$6.74\cdot 10^{-7}$	$1.69\cdot 10^{-7}$
	Au_{3DOM}	Au_{3DOM}-DTSP	Au_{3DOM}-DTSP-LOx
	$6.61\cdot 10^{-6}$	$3.26\cdot 10^{-6}$	$1.64\cdot 10^{-7}$

A frecuencias más bajas, para los tres biosensores, los diagramas de EIS muestran un proceso de difusión a través de una capa de difusión de longitud finita, cuya resistencia de Warburg (Z_{WR}), en el caso de un soporte policristalino es mucho menor ($165.55\Omega\cdot\text{cm}^2$) que para el oro rugoso ($\text{Au}_R/9100.50\Omega\cdot\text{cm}^2$) y el oro macroporoso ($\text{Au}_{3\text{DOM}}/5659.46\Omega\cdot\text{cm}^2$). Esta sustancial diferencia en los valores de la impedancia de Warburg se debe, a que en el biosensor $\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$ tiene lugar la difusión de los iones $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a través canales generados por el DTSP y la propia enzima, mientras que en los biosensores con soportes nanoestructurados el valor de Z_{WR} refleja la dificultad que tienen los iones $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ para difundir, a través de la estructura columnar de oro rugoso modificada ($\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$), o a través de la estructura macroporosa ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$).

La comparación entre las magnitudes de ambas resistencias (R_{TC} y Z_{WR}), sirve como criterio de diagnóstico para estudiar el tipo de control predominante en cada sistema. El biosensor construido sobre oro policristalino (Au_p) presenta una relación $R_{TC} \sim \sigma K$ característica de un control mixto, mientras que tanto el oro rugoso (Au_R) como el oro 3DOM ($\text{Au}_{3\text{DOM}}$), muestran que la relación entre estas dos magnitudes es $R_{TC} \ll \sigma K$, indicando que el proceso global está controlado por difusión.

Una vez fabricados y caracterizados los biosensores, se estudio la respuesta frente a concentraciones crecientes de lactato, en presencia de un mediador redox i.e. hidroximetilferroceno. La respuesta es característica de un proceso catalítico, siendo mucho más acusado cuando se emplean soportes nanoestructurados, que permiten una mayor acumulación de moléculas de enzima. La magnitud de la densidad de corriente catalítica, cuando se emplean soportes nanoestructurados, es más del doble que la obtenida con los soportes de oro policristalino. Representando el incremento de densidad de corriente obtenida frente a concentraciones crecientes de L-lactato, en los tres biosensores (Au_p -DTSP-LOx, Au_R -DTSP-LOx y Au_{3DOM} -DTSP-LOx), se obtienen curvas de calibrado características de un comportamiento michaeliano.

En los tres biosensores la respuesta electrocatalítica obtenida, a partir de la representación de Michaelis-Menten, muestra un intervalo de dependencia lineal respecto a la concentración de L-lactato en disolución, extendiéndose el intervalo lineal hasta 0.2, 1.2 y 1.3 mM para los electrodos Au_p -DTSP-LOx, Au_R -DTSP-LOx y Au_{3DOM} -DTSP-LOx, respectivamente. Este considerable aumento, en el límite superior del intervalo lineal, se debe a la posibilidad que presentan los soportes nanoestructurados de acumular mayor cantidad de moléculas de enzima. Sin embargo, las representaciones lineales de dicha ecuación (representaciones de Lineweaver Burk, Eadi-Hofstee y Hanes) muestran que los biosensores fabricados sobre soportes nanoestructurados pierden la linealidad a concentraciones bajas de sustrato ($[S] < 1.8\text{mM}$ para Au_R -DTSP-LOx y $[S] < 1.9\text{mM}$ para Au_{3DOM} -DTSP-LOx), mientras que el biosensor construido sobre el electrodo de oro policristalino, conserva la linealidad en todo el intervalo de concentraciones. Este comportamiento es debido a la limitación que pueden presentar tanto el soporte de oro rugoso como el de oro 3DOM a la difusión de sustrato hacia el interior de la estructura (apareciendo efectos de polarización por concentración de sustrato) o del producto resultante hacia la disolución.

Por otro lado, los tres biosensores construidos presentan una buena reproducibilidad y repetibilidad. Es de destacar como la estabilidad mejora, considerablemente, en el caso de los biosensores fabricados sobre soportes nanoestructurados, pasando de mantener un 50% de su señal el biosensor construido sobre oro policristalino, hasta un 85% el Au_R-DTSP-LOx y un 100% el Au_{3DOM}-DTSP-LOx, después de 30 días. Esta mejora en la estabilidad del biosensor se debe a que la topografía a nivel de nano-escala de estos soportes permite mejorar la actividad biocatalítica de las enzimas inmovilizadas. La inmovilización de enzimas implica una restricción de los grados de libertad de movimiento de la enzima debido a su anclaje al transductor. Durante dicho proceso, la enzima debe mantener su actividad catalítica. Sin embargo, cuando la inmovilización se lleva a cabo sobre superficies metálicas planas, las enzimas pueden llegar a desnaturalizarse, perdiendo su capacidad enzimática. Por tanto, los biosensores fabricados sobre superficies nanoestructuradas previenen la desnaturalización de la enzima, ya que proporcionan una morfología más adecuada para acomodarla, favoreciendo el íntimo contacto entre el biorreceptor y el transductor. También es importante resaltar que las estabilidades que presentan los biosensores Au_R-DTSP-LOx y Au_R-LOx son muy similares, mientras que sobre los soportes de oro policristalino y 3DOM mejora en el caso de la enzima inmovilizada covalentemente respecto a la inmovilizada por adsorción.

A partir del intervalo lineal, obtenido del ajuste mediante regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten para cada biosensor, se calcularon los siguientes parámetros: la sensibilidad, que mejora desde $0.99\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ para el Au_P-DTSP-LOx, hasta $1.49\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ y $1.63\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ para el Au_R-DTSP-LOx y Au_{3DOM}-DTSP-LOx respectivamente. El límite de detección para el biosensor construido sobre oro policristalino es de $14.40\mu\text{M}$, mientras que empeora ligeramente con el oro rugoso ($21.54\mu\text{M}$) y mejora con el oro 3DOM ($3.93\mu\text{M}$). Para el límite de determinación se observa la misma tendencia, para el Au_P-DTSP-LOx se alcanza un valor de $48.01\mu\text{M}$

y para el Au_R-DTSP-LOx y Au_{3DOM}-DTSP-LOx, el límite de determinación toma el valor de 71.80μM y 13.08μM respectivamente.

Estos parámetros son de elevada importancia a la hora de evaluar la aplicabilidad de un biosensor. A la vista de los resultados, podemos concluir que, los tres biosensores desarrollados reúnen las propiedades analíticas necesarias para su empleo como dispositivo analítico en la determinación de lactato, siendo una buena alternativa a los métodos tradicionales, debido a la simplicidad y rapidez de las medidas. Sin embargo, la mejora en las propiedades analíticas obtenida en los biosensores construidos sobre soportes nanoestructurados, abre el abanico de sus aplicaciones; por ejemplo, para medidas in vivo, o si se disponen de pequeños volúmenes de muestra, sería necesaria la miniaturización del dispositivo sensor, con la consiguiente pérdida de área activa del electrodo y disminución de la respuesta analítica. Con los soportes estudiados en este trabajo, al aumentar el área superficial por unidad de volumen, se logra aumentar la respuesta analítica sin necesidad de aumentar las dimensiones macroscópicas del dispositivo. La integración de nanomateriales, en el desarrollo de sensores y biosensores, ha sido una estrategia muy empleada en los últimos años para mejorarlos. Sus excelentes propiedades electrónicas y ópticas, además de su gran capacidad de transferencia de carga entre estructuras heterogéneas, unido a su elevada área específica, les convierten en materiales especialmente útiles en el desarrollo de plataformas sensoras electroquímicas.

ABSTRACT

With the objective of developing biosensor platforms with improved operational characteristics, two different nanostructured gold structures (rough and 3DOM gold) have been prepared. Their structural properties and their influence, on the electrocatalytic response of a lactate biosensor, have been studied. As starting point, for comparative purposes, a similar study was performed on a polycrystalline gold electrode.

First, all three of the structures were characterized by surface techniques such as scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and X-ray diffraction (XRD).

Studies by atomic force microscopy (AFM) on the surface morphology of the polycrystalline electrode, along with its topographic analysis revealed a roughness structure with $R=1.5$ and an average height of 30nm. The preferential orientation and an average crystallite size of 740Å were determined by X-ray diffraction (XRD). The surface morphology of the rough gold deposits was observed by scanning electron microscopy (SEM) revealing a brain-like appearance as characteristic of gold overlayers resulting from the electroreduction process. AFM reveals the development of a rounded cap columnar-type structure with an average radius of the columns ranging from 20 to 40nm, while the average height is close to 300nm (10 times greater than polycrystalline gold). The average crystallite size determined by XRD (775Å) was similar to that obtained for the polycrystalline gold but the roughness gold presents a more crystalline structure. The biggest advantage of this three-dimensional structure is that it provides a large specific area, reaching surface areas up to 100 times higher than for the polycrystalline gold, enabling high enzyme loading on the biosensor.

SEM and AFM images, of the three-dimensional ordered macroporous (3DOM) gold film show that, this structure consist of a three dimensional network of

interconnected spherical voids, arranged with hexagonal symmetry that can extend over several hundreds of μm^2 . The structure is open through the upper layer, which provides good accessibility to penetrate solution from outside to inside and vice versa. This morphology of spherical cavities is favorable for the accumulation of enzymes without losing its biological activity. As in the rough gold, although to a lesser extent, the 3DOM gold also increases the area/volume ratio, reaching a roughness factor of 18.6 for an inverse opal with 5.5 sphere layer. Preferential orientation determined by XRD, was similar to the polycrystalline gold, providing a mean particle size of 198 Å, which is considerably lower than for polycrystalline and rough gold.

Subsequently, these electrodes will be used as transducers in the preparation of biosensors based on lactate oxidase (LOx). The immobilization of the enzyme on the transducers was conducted using two different strategies: direct adsorption and covalent binding modifying the gold electrode with a self-assembled monolayer of dithiobis-N-succinimidyl propionate (DTSP). Since this bifunctional reagent adsorbs onto gold surfaces through the disulfide group, the terminal succinimidyl groups are exposed to the solution allowing further covalent immobilization of the enzyme through amine groups of its lysines.

The type of bond has been analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) concluding, by the appearance in the spectrum of a new component at 162.1 eV ($S2p_{3/2}$), that gold electrode is modified by DTSP by breaking S-S bonds, forming Au-S bonds. To establish the appropriate experimental conditions for obtaining the maximum DTSP coverage on the gold electrode surface, an electrochemical impedance spectroscopy (EIS) study has been performed as a function of adsorption time on each of the different gold transducers. Correlating the magnitude of charge transfer resistance (R_{CT}) and coverage of the electrode by DTSP and trying to save time in constructing the biosensor and minimize

succinimide group deactivation, an immobilization time of 3 h was selected in all the cases.

The next step of the construction of the biosensor is the enzyme immobilization. The immobilization of both DTSP and LOx, on different gold substrates has been demonstrated by EIS measurements. Nyquist diagrams of the three biosensors show two frequency regions with corresponding time constants. At high frequencies, the semicircular parts correspond to the charge transfer resistance-limiting process, that is associated with the charge transfer for $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ on free sites of the electrode surface. This kinetic control process has an associated resistance (R_{CT}) due partly to the inherent overpotential of the redox process and secondly, to the steric hindrance that ions ferro/ferricyanide suffer at the interfaces created, at each step of constructing the biosensor. The R_{CT} values for the electrodes modified with the thiol (Au_P -DTSP, Au_R -DTSP y $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ -DTSP) are greater than the values for the non-functionalized gold electrodes, reaching higher resistances to complete biosensors (Au_P -DTSP-LOx, Au_R -DTSP-LOx y $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ -DTSP-LOx).

It is interesting to note that the value obtained for electron transfer rate constant ($k^0(\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$), decreases with surface modification regardless of the electrode used, being an order of magnitude higher for the polycrystalline gold based biosensor.

$k^0 (\text{m} \cdot \text{s}^{-1})$	Au_P	Au_P-DTSP	Au_P-DTSP-LOx
	$1.34 \cdot 10^{-4}$	$1.18 \cdot 10^{-5}$	$3.47 \cdot 10^{-6}$
	Au_R	Au_R-DTSP	Au_R-DTSP-LOx
	-	$6.74 \cdot 10^{-7}$	$1.69 \cdot 10^{-7}$
	Au_{3DOM}	Au_{3DOM}-DTSP	Au_{3DOM}-DTSP-LOx
	$6.61 \cdot 10^{-6}$	$3.26 \cdot 10^{-6}$	$1.64 \cdot 10^{-7}$

The fact that the kinetics of the redox mediator is slower on nanostructured supports, far from being a disadvantage, allows a more effective reaction between

(LOx)_{Rd} and (HMF)_{Ox} as shown by the catalytic current obtained by cyclic voltammetric response in the presence of L-lactate.

At lower frequencies, the linear part for the three biosensors is due to control of the diffusion process; in particular, at very low frequencies, Z' approaches the Warburg resistance Z_{WR} and Z'' goes to zero. This behavior is characteristic of diffusion through a diffusion layer of finite length. The magnitude of this parameter is much lower for polycrystalline gold electrodes ($Au_p/165.55\Omega\cdot\text{cm}^2$) than for rough ($Au_R/9100.50\Omega\cdot\text{cm}^2$) and macroporous gold ($Au_{3DOM}/5659.46\Omega\cdot\text{cm}^2$). This substantial difference in the values of the Warburg impedance, is because in the biosensor Au_p -DTSP-LOx the Warburg resistance is due to the diffusion of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ions through the pores left by DTSP and the enzyme, while in the nanostructured biosensors, Z_{WR} value reflects the difficulty of ions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ to diffuse through the columnar structure in rough gold modified (Au_R -DTSP-LOx) or through macroporous structure in the case of Au_{3DOM} -DTSP-LOx.

The comparison between the magnitudes of both resistances (R_{CT} and Z_{WR}), serves as a diagnostic criterion to study the dominant control on each system. The biosensor constructed on polycrystalline gold presents a $R_{TC}\sim\sigma K$ characteristic of a mixed control, while in Au_R -DTSP-LOx and Au_{3DOM} -DTSP-LOx, the Nyquist diagram is typical of a system with $R_{CT}\ll\sigma K$, indicating that the process is diffusion controlled.

Once the biosensors are constructed and characterized, the response to increasing concentrations of L-lactate in the presence of a redox mediator (hydroxylmethylferrocene) was studied. The response is characteristic of a catalytic process, being much more evident when using nanostructured electrodes, which allow greater accumulation of enzyme molecules.

The magnitude of catalytic current density when employing nanostructured supports is more than twice that for polycrystalline gold. Representing the current density increase obtained by cyclic voltammetry versus increasing L-lactate

concentrations for the three biosensors ($\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$, $\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$ and $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$) calibration curves plotted show Michaelis–Menten like behavior.

In the three biosensors, electrocatalytic response obtained from the Michaelis-Menten representation, shows a range of linear dependence on the concentration of L-lactate, extending the linear range up to 0.2, 1.2 and 1.3 mM for the electrodes $\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$, $\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$ and $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ respectively. This considerable increase in the upper limit of the linear range for nanostructured supports is due to the possibility that they present to accumulate more quantity of enzyme molecules. However, linear representations of the equation (Lineweaver Burk, Eadi-Hofstee and Hanes representations) show that biosensors fabricated on nanostructured electrodes lose linearity at low substrate concentrations ($[\text{S}] < 1.8\text{mM}$ for $\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$ and $[\text{S}] < 1.9\text{mM}$ for $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$), while the polycrystalline biosensor retains the linearity over the entire concentration range. This behavior is due to the limitation that both the rough gold and 3DOM gold transducers present to the substrate diffusion into the structure (appearing concentration of substrate polarization effects) or the resulting product into solution.

On the other hand, the three biosensors have good repeatability and reproducibility while it should be noted the stability considerably improves in the case of biosensors fabricated on nanostructured electrodes. $\text{Au}_p\text{-DTSP-LOx}$ based biosensors retain 50% of its original response after one month, whereas $\text{Au}_R\text{-DTSP-LOx}$ and $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ retain 85% and 100% respectively. This improvement in the biosensor stability is due to the topography of a nano-scale level of these supports that allows improving the biocatalytic activity of the immobilized enzymes. Enzyme immobilization results in a restriction of the degrees of freedom movement of the enzyme because of its anchoring to the transducer. During this process, the enzyme must maintain its catalytic activity. However, when immobilization is carried out on flat metal surfaces, the enzymes can become denatured, losing its catalytic activity. Thus, biosensors fabricated on

nanostructured surfaces prevent enzyme denaturation because they provide a more suitable morphology to accommodate them, favoring the intimate contact between the transducer and the enzyme. It is also important to note that the biosensors stabilities for Au_R-DTSP-LOx and Au_R-LOx are very similar, while polycrystalline and 3DOM based biosensors present better stabilities when the enzyme is covalently immobilized than when it is immobilized by direct adsorption.

In addition to this, the analytical properties were obtained from the linear part of the Michaelis-Menten calibration curve for each biosensor. Parameters such as sensitivity, improve from 0.99 μA·cm⁻² for Au_p-DTSP-LOx to 1.49 μA·cm⁻² and 1.63 μA·cm⁻² for Au_R-DTSP-LOx y Au_{3DOM}-DTSP-LOx respectively.

The detection and determination limits of the biosensor based on rough gold (21.54 μM and 71.80 μM respectively) do not improve when compare to the polycrystalline gold (14.40 μM and 48.01 μM respectively), but these parameters improve with Au_{3DOM}-DTSP-LOx (3.93 μM y 13.08 μM respectively).

All these parameters are of great importance for evaluating the applicability of a biosensor. In view of the results, we can conclude that the three biosensors possess the necessary analytical properties to be used as an analytic tool in the determination of lactate, being a good alternative to traditional methods, due to the simplicity and speed of analysis. However, improved analytical properties obtained in nanostructured transducers based biosensors, expanding range of applications, for example for measuring in vivo, or for small sample volumes would be required miniaturization of sensor devices with consequent loss of active electrode area and reduced analytical response. The transducers studied in this work, increase the ratio area/volume improving analytical response without increasing the macroscopic dimensions of the device. The integration of nanomaterials in the development of sensors and biosensors has been a popular strategy used in recent years to improve them. Its excellent electronic and optical properties, as well as his great ability to charge transfer

between heterogeneous structures, coupled with its high specific area make them particularly useful in the development of electrochemical sensor platforms.

7 CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

7 CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

✓ La morfología superficial de los soporte de Au_R y Au_{3DOM}, analizada por SEM, AFM y DRX, presenta una elevada relación área/volumen respecto al Au_P lo que les permite una mayor acumulación de material biológico para la fabricación del biosensor.

✓ Por XPS se comprobó que el enlace formado entre el DTSP inmovilizado y la superficie del oro es un enlace Au-S. Mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se determinó, para los tres electrodos, un tiempo óptimo para obtener un recubrimiento superficial del tiol máximo de 3 horas.

✓ La inmovilización, tanto del DTSP como de la LOx, sobre los diferentes soportes de oro ha quedado demostrada con medidas de EIS. El valor de R_{TC} para los electrodos modificados con el tiol (Au_P-DTSP, Au_R-DTSP y Au_{3DOM}-DTSP) son mayores que los valores correspondientes a los electrodos de oro sin funcionalizar, alcanzándose las resistencias más altas para los biosensores completos (Au_P-DTSP-LOx, Au_R-DTSP-LOx y Au_{3DOM}-DTSP-LOx).

✓ Los diagramas de Nyquist de los tres biosensores presentan dos intervalos de frecuencia correspondientes a un proceso cinético, a altas frecuencias, con una resistencia a la transferencia de carga (R_{TC}) asociada y a un proceso difusivo, a bajas frecuencias, caracterizado por la difusión a través de una capa de difusión de longitud finita cuya resistencia de Warburg (Z_{WR}), en el caso de un soporte policristalino, es mucho menor que para el Au_R y el Au_{3DOM}. La comparación entre las magnitudes de R_{TC} y Z_{WR} confirma que el Au_P presenta un control mixto ($R_{TC} \sim \sigma K$), mientras que el Au_R y Au_{3DOM} presentan control por difusión ($R_{TC} \ll \sigma K$).

✓ La constante de velocidad $k^0(m \cdot s^{-1})$ del proceso redox es un orden de magnitud menor para los biosensores construidos con los soportes

nanoestructurado. El hecho de que la cinética del mediador sea más lenta favorece la interacción entre la enzima reducida y el mediador oxidado, aumentando la actividad electrocatalítica del biosensor.

✓ En los tres biosensores se obtienen curvas de calibrado características de un comportamiento michaeliano, con mayor intervalo lineal en los biosensores nanoestructurados, debido a la elevada capacidad que presentan para acumular moléculas de enzima.

✓ La pérdida de linealidad para las representaciones de Lineweaver Burk, Eadi-Hofstee y Hanes a concentraciones bajas de sustrato para los biosensores construidos sobre Au_R y Au_{3DOM} se debe, según la teoría de Lyons, a la polarización por concentración de sustrato.

✓ Los tres biosensores construidos presentan una buena reproducibilidad y repetibilidad, mientras que la estabilidad y la sensibilidad mejoran en los biosensores fabricados sobre soportes nanoestructurados. Los límites de detección y determinación son mejores para el Au_{3DOM} respecto al Au_P y al Au_R .

✓ En líneas generales la estrategia para inmovilizar la enzima covalentemente mejora el funcionamiento del biosensor comparada con la inmovilización por adsorción directa. Tanto la reproducibilidad como la repetitividad mejoran ligeramente en presencia de DTSP, ya que este proporciona una forma de inmovilización más controlada de la enzima. La sensibilidad, así como la estabilidad, también mejoran en presencia de DTSP, especialmente para el biosensor construido sobre Au_{3DOM} .

CONCLUSIONS

✓ Surface morphology of Au_{3DOM} and Au_R were analyzed by SEM, XRD and AFM, revealing a high area/volume ratio compared to Au_P , allowing them a greater accumulation of biological material in the construction of the biosensor.

✓ XPS and EIS techniques have been used to study the different steps followed in the construction of the biosensor. The combination of both techniques demonstrates that the gold electrodes are modified by DTSP forming Au-S bonds and giving rise to a complete monolayer after an adsorption time of 3 h.

✓ Both DTSP and LOx immobilization on different gold substrates has been demonstrated by EIS measurements. The R_{CT} values for the thiol modified electrodes (Au_P -DTSP, Au_R -DTSP y Au_{3DOM} -DTSP) are greater than the values for the non-functionalized gold electrodes, reaching higher resistances for complete biosensors (Au_P -DTSP-LOx, Au_R -DTSP-LOx y Au_{3DOM} -DTSP-LOx).

✓ Nyquist diagrams of the three biosensors have two frequency ranges corresponding to a kinetic process, at high frequencies, with a charge transfer resistance associated (R_{CT}) and a diffusion process, at low frequencies, characterized by diffusion through a diffusion layer of finite length, which Warburg resistance (Z_{WR}) is higher for Au_R and Au_{3DOM} than for Au_P . The comparison between the magnitudes R_{CT} and Z_{WR} is used as a diagnostic criterion that confirms that Au_P present a mixed control ($R_{TC} \sim \sigma K$), whereas Au_R and Au_{3DOM} present diffusion control ($R_{TC} \ll \sigma K$).

✓ The electron transfer rate constant of the redox process, k^0 ($m \cdot s^{-1}$), is one order of magnitude lower for biosensors constructed on nanostructured platforms than on polycrystalline gold. The fact that the kinetics of the mediator is slow favors interaction between the reduced enzyme and the oxidized mediator increasing the electrocatalytic activity of the biosensor.

✓ Calibration curves in all the three biosensors show Michaelis–Menten like behavior, which suggests that in all cases the electrochemical response is under

enzymatic control. Nanostructured biosensors extend the upper limit of the linear response due to its high capacity to accumulate enzyme molecules.

✓ Lineweaver Burk, Eadi-Hofstee and Hanes representations lose linearity for Au_R and Au_{3DOM} based biosensors at low substrate concentrations. According to the Lyons' theory this behavior is due to the substrate concentration polarization.

✓ Three biosensors have good reproducibility and repeatability while stability and sensitivity improve in biosensors fabricated on nanostructured supports. The detection and determination limits are better for the Au_{3DOM} regarding the Au_p and Au_R .

✓ In general terms, covalent immobilization of the enzyme improve the operational characteristics of the biosensor compared to direct adsorption immobilization. Both the reproducibility and repeatability slightly improved in the presence of DTSP, as this provides a more controlled immobilization of the enzyme. Sensitivity and stability, also improve in the presence of DTSP, especially for the biosensor constructed on Au_{3DOM} .

8 BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Vazquez, A. Bartolome, A. M. Baro, C. Alonso, R. C. Salvarezza, A. J. Arvia, *Surface Science* **1989**, *215*, 171.
- [2] J. Gomez, L. Vazquez, A. M. Baro, C. Alonso, E. Gonzalez, J. Gonzalez-Velasco, A. J. Arvia, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1988**, *240*, 77.
- [3] G. Cao, *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, Imperial College Press, London, **2004**.
- [4] V. V. Pokropivny, V. V. Skorokhod, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* **2007**, *27*, 990.
- [5] V. V. Pokropivny, V. V. Skorokhod, *Physica E-Low-Dimensional Systems & Nanostructures* **2008**, *40*, 2521.
- [6] R. W. Murray, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2688.
- [7] K. Abu Salah, S. A. Alrokyan, M. N. Khan, A. A. Ansari, *Sensors* **2010**, *10*, 963.
- [8] X. Q. Zhang, Q. Guo, D. X. Cui, *Sensors* **2009**, *9*, 1033.
- [9] A. A. Ansari, M. Alhoshan, M. S. Alsalhi, A. S. Aldwayyan, *Sensors* **2010**, *10*, 6535.
- [10] X. L. Luo, A. Morrin, A. J. Killard, M. R. Smyth, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 319.
- [11] A. K. Wanekaya, W. Chen, N. V. Myung, A. Mulchandani, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 533.
- [12] J. M. Klostranec, W. C. W. Chan, *Advanced Materials* **2006**, *18*, 1953.
- [13] K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Sensors* **2006**, *6*, 925.
- [14] J. M. Pingarron, P. Yanez-Sedeno, A. Gonzalez-Cortes, *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 5848.
- [15] J. Kim, J. W. Grate, P. Wang, *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 1017.
- [16] F. Valentini, G. Palleschi, *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 479.
- [17] E. Katz, I. Willner, J. Wang, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 19.
- [18] J. Wang, *Analyst* **2005**, *130*, 421.
- [19] L. C. Clark, C. Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, *102*, 29.
- [20] S. J. a. G. P. H. Updike, *Nature* **1967**, *214* (5092), 986.
- [21] F. N. Crespilho, *Nanobioelectrochemistry*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2013**.
- [22] A. Lupu, A. Valsesia, F. Bretagnol, P. Colpo, F. Rossi, *Sens. Actuators, B* **2007**, *B127*, 606.
- [23] J. Hahm, C. M. Lieber, *Nano Letters* **2004**, *4*, 51.
- [24] S. K. Mishra, R. Pasricha, A. M. Biradar, Rajesh, *Applied Physics Letters* **2012**, *100*.
- [25] G. Zhong, A. Liu, X. Xu, Z. Sun, J. Chen, K. Wang, Q. Liu, X. Lin, J. Lin, *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 527.
- [26] C. H. Wang, C. Yang, Y. Y. Song, W. Gao, X. H. Xia, *Advanced Functional Materials* **2005**, *15*, 1267.
- [27] B. Brunetti, P. Ugo, L. M. Moretto, C. R. Martin, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *491*, 166.
- [28] M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo, C. Alonso, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2038.
- [29] S. Ben-Ali, D. A. Cook, P. N. Bartlett, A. Kuhn, *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *579*, 181.
- [30] C. Jianrong, M. Yuqing, H. Nongyue, W. Xiaohua, L. Sijiao, *Biotechnology advances* **2004**, *22*, 505.
- [31] S. Ben-Ali, D. A. Cook, S. A. G. Evans, A. Thienpont, P. N. Bartlett, A. Kuhn, *Electrochem. Commun.* **2003**, *5*, 747.
- [32] K. W. Park, J. H. Choi, B. K. Kwon, S. A. Lee, Y. E. Sung, H. Y. Ha, S. A. Hong, H. Kim, A. Wieckowski, *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 1869.
- [33] M. S. El-Deab, T. Ohsaka, *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 288.
- [34] S. Hrapovic, Y. L. Liu, K. B. Male, J. H. T. Luong, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1083.
- [35] C.-Y. Liu, J.-M. Hu, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2149.
- [36] A. Sun, Q. Sheng, J. Zheng, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, *166*, 764.

- [37] A. Jabbari, H. Heli, M. Hajjizadeh, A. A. Moosavi-Movahedi, *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference* **2008**, 2008, 2314.
- [38] X.-M. Miao, R. Yuan, Y.-Q. Chai, Y.-T. Shi, Y.-Y. Yuan, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2008**, 612, 157.
- [39] R. Chai, R. Yuan, Y. Chai, C. Ou, S. Cao, X. Li, *Talanta* **2008**, 74, 1330.
- [40] O. Shulga, J. R. Kirchhoff, *Electrochem. Commun.* **2007**, 9, 935.
- [41] S. Q. Liu, D. Leech, H. X. Ju, *Anal. Lett.* **2003**, 36, 1.
- [42] K. Kerman, M. Saito, S. Yamamura, Y. Takamura, E. Tamiya, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2008**, 27, 585.
- [43] S. Iijima, *Nature* **1991**, 354, 56.
- [44] U. Yogeswaran, S.-M. Chen, *Anal. Lett.* **2008**, 41, 210.
- [45] N. Chopra, V. G. Gavalas, B. J. Hinds, L. G. Bachas, *Anal. Lett.* **2007**, 40, 2067.
- [46] M. Das, P. Goswami, *Bioelectrochemistry* **2013**, 89, 19.
- [47] Y. D. Zhao, W. D. Zhang, H. Chen, Q. M. Luo, S. F. Y. Li, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2002**, 87, 168.
- [48] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, *Science* **2004**, 306, 666.
- [49] M. Pumera, A. Ambrosi, A. Bonanni, E. L. K. Chng, H. L. Poh, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2010**, 29, 954.
- [50] C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska, L. Niu, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2378.
- [51] E. Casero, C. Alonso, L. Vazquez, M. D. Petit-Dominguez, A. M. Parra-Alfambra, M. de la Fuente, P. Merino, S. Alvarez-Garcia, A. de Andres, F. Pariente, E. Lorenzo, *Electroanalysis* **2013**, 25, 154.
- [52] J. H. Jung, D. S. Cheon, F. Liu, K. B. Lee, T. S. Seo, *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49, 5708.
- [53] Y. Bo, H. Yang, Y. Hu, T. Yao, S. Huang, *Electrochimica Acta* **2011**, 56, 2676.
- [54] Y. Y. Song, W. Z. Jia, C. Yang, X. H. Xia, *Advanced Functional Materials* **2007**, 17, 2377.
- [55] R. Szamocki, A. Velichko, C. Holzapfel, F. Muecklich, S. Ravaine, P. Garrigue, N. Sojic, R. Hempelmann, A. Kuhn, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 533.
- [56] J. D. Qiu, H. Z. Peng, R. P. Liang, M. Xiong, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1201.
- [57] X. J. Chen, Y. Y. Wang, J. J. Zhou, W. Yan, X. H. Li, J. J. Zhu, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2133.
- [58] J. Jia, L. Cao, Z. Wang, *Langmuir* **2008**, 24, 5932.
- [59] L. E. Ahangar, M. A. Mehrgardi, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 38, 252.
- [60] K. Li, J. Huang, G. Shi, W. Zhang, L. Jin, *Anal. Lett.* **2011**, 44, 2559.
- [61] G. Zhong, A. Liu, X. Chen, K. Wang, Z. Lian, Q. Liu, Y. Chen, M. Du, X. Lin, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 3812.
- [62] S. De Luca, M. Florescu, M. E. Ghica, A. Lupu, G. Palleschi, C. M. A. Brett, D. Compagnone, *Talanta* **2005**, 68, 171.
- [63] R. Zaydan, M. Dion, M. Boujtita, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 8.
- [64] G. Volpe, D. Moscone, D. Compagnone, G. Palleschi, *Sens. Actuators, B* **1995**, B24, 138.
- [65] J. P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K. C. Honeychurch, R. M. Pemberton, *Anal. Lett.* **2004**, 37, 789.
- [66] J. Bakker, P. Gris, M. Coffernils, R. J. Kahn, J. L. Vincent, *American Journal of Surgery* **1996**, 171, 221.
- [67] J. J. Burmeister, M. Palmer, G. A. Gerhardt, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 1772.
- [68] N. G. Patel, A. Erlenkotter, K. Cammann, G. C. Chemnitius, *Sens. Actuators, B* **2000**, B67, 134.
- [69] S. Porretta, E. Vicini, *International Journal of Food Science and Technology* **1993**, 28, 611.
- [70] C. R. Soccol, V. I. Stonoga, M. Raimbault, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **1994**, 10, 433.

- [71] A. J. Lawrence, *Australian Journal of Dairy Technology* **1975**, *30*, 14.
- [72] S. K. Stephens, I. E. Tothill, P. J. Warner, A. P. F. Turner, *Water Research* **1997**, *31*, 41.
- [73] Suman, A. Kumar, *Sens. Transducers J.* **2008**, *96*, 18.
- [74] N. Nikolaus, B. Strehnitz, *Microchim. Acta* **2008**, *160*, 15.
- [75] S. Perez, S. Sanchez, E. Fabregas, *Electroanalysis*, *24*, 967.
- [76] M. Yang, J. Wang, H. Li, J.-G. Zheng, N. N. Wu, *Nanotechnology* **2008**, *19*.
- [77] R. Garjonyte, V. Melvydas, A. Malinauskas, *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **2006**, *68*, 191.
- [78] V. Plegge, M. Slama, B. Suselbeck, D. Wienke, F. Spener, M. Knoll, C. Zaborosch, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2937.
- [79] A. Parra, E. Casero, L. Vazquez, F. Pariente, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *555*, 308.
- [80] E. I. Yashina, A. V. Borisova, E. E. Karyakina, O. I. Shchegolikhina, M. Y. Vagin, D. A. Sakharov, A. G. Tonevitsky, A. A. Karyakin, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1601.
- [81] M. R. Romero, F. Garay, A. M. Baruzzi, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2008**, *131*, 590.
- [82] B. K. Jena, C. R. Raj, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 816.
- [83] H. C. Shu, N. P. Wu, *Talanta* **2001**, *54*, 361.
- [84] S. L. Staskeviciene, N. K. Cenas, J. J. Kulys, *Anal. Chim. Acta* **1991**, *243*, 167.
- [85] J. Perdomo, C. Sundermeier, H. Hinkers, O. M. Morell, W. Seifert, M. Knoll, *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, *14*, 27.
- [86] F. Palmisano, M. Quinto, R. Rizzi, P. G. Zambonin, *Analyst (Cambridge, U. K.)* **2001**, *126*, 866.
- [87] I. Moser, G. Jobst, G. A. Urban, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 297.
- [88] R. Antiochia, A. E. G. Cass, G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *345*, 17.
- [89] M. L. Fultz, R. A. Durst, *Anal. Chim. Acta* **1982**, *140*, 1.
- [90] K. Hirano, H. Yamato, K. Kunimoto, M. Ohwa, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 315.
- [91] T. Ikeda, T. Shibata, M. Senda, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *261*, 351.
- [92] T. M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smyth, R. Freaney, A. J. McShane, *Talanta* **1997**, *44*, 973.
- [93] M. Boujtita, M. Chapleau, N. El Murr, *Electroanalysis* **1996**, *8*, 485.
- [94] Beynum, *Biotechnology letters* **1980**, *2*, 127.
- [95] M. Arroyo, *Ars pharmaceutica* **1998**, *39*, 23.
- [96] M. Iso, T. Shirahase, S. Hanamura, S. Urushiyama, S. Omi, *Journal of Microencapsulation* **1989**, *6*, 165.
- [97] C. Jimenez, J. Bartrol, N. F. deRooij, M. KoudelkaHep, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *351*, 169.
- [98] Q. L. Yang, P. Atanasov, E. Wilkins, *Electroanalysis* **1998**, *10*, 752.
- [99] F. Palmisano, R. Rizzi, D. Centonze, P. G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 531.
- [100] R. Garjonyte, Y. Yigzaw, R. Meskys, A. Malinauskas, L. Gorton, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2001**, *79*, 33.
- [101] G. Aydin, S. S. Celebi, H. Ozyoruk, A. Yildiz, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2002**, *87*, 8.
- [102] H. Y. Liu, Z. N. Zhang, X. L. Zhang, D. Y. Qi, Y. C. Liu, T. Y. Yu, J. Q. Deng, *Electrochimica Acta* **1997**, *42*, 349.
- [103] E. I. Iwuoha, A. Rock, M. R. Smyth, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 367.
- [104] F. Palmisano, G. E. De Benedetto, C. G. Zambonin, *Analyst (Cambridge, U. K.)* **1997**, *122*, 365.
- [105] J. Haccoun, B. Piro, L. D. Tran, L. A. Dang, M. C. Pham, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1325.
- [106] B. Serra, A. J. Reviejo, C. Parrado, J. M. Pingarron, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 505.
- [107] A. M. Herrero, T. Requena, A. J. Reviejo, J. M. Pingarron, *European Food Research and Technology* **2004**, *219*, 556.
- [108] J. Kulys, L. Z. Wang, A. Maksimoviene, *Anal. Chim. Acta* **1993**, *274*, 53.
- [109] S. Ledru, M. Boujtita, *Bioelectrochemistry* **2004**, *64*, 71.

- [110] B. Lillis, C. Grogan, H. Berney, W. A. Lane, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2000**, *68*, 109.
- [111] I. Leiros, E. Wang, T. Rasmussen, E. Oksanen, H. Repo, S. B. Petersen, P. Heikinheimo, E. Hough, *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **2006**, *62*, 1185.
- [112] A. A. Bogdanov, A. L. Klibanov, V. P. Torchilin, *Febs Letters* **1988**, *231*, 381.
- [113] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochemische Zeitschrift* **1913**, *49*, 333.
- [114] P. N. Bartlett, *Bioelectrochemistry - Fundamentals, Experimental Techniques And Applications* John Wiley & Sons, Southampton, **2008**.
- [115] L. D. Mell, J. T. Maloy, *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 299.
- [116] L. D. Mell, J. T. Maloy, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1597.
- [117] F. R. Shu, G. S. Wilson, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1679.
- [118] D. A. Gough, J. K. Leypoldt, *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 439.
- [119] D. A. Gough, J. K. Leypoldt, *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1126.
- [120] J. Y. Lucisano, D. A. Gough, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1272.
- [121] D. A. Gough, J. Y. Lucisano, P. H. S. Tse, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2351.
- [122] W. J. Blaedel, Boguslas.Rc, T. R. Kissel, *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 2030.
- [123] J. J. Kulys, V. V. Sorochnikii, R. A. Vidziunaite, *Biosensors* **1986**, *2*, 135.
- [124] P. N. Bartlett, R. G. Whitaker, *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *224*, 27.
- [125] P. N. Bartlett, R. G. Whitaker, *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *224*, 37.
- [126] M. Marchesiello, E. Genies, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *358*, 35.
- [127] P. N. Bartlett, K. F. E. Pratt, *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *397*, 61.
- [128] K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *273*, 107.
- [129] P. N. Bartlett, J. M. Cooper, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *362*, 1.
- [130] A. Chaubey, B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 441.
- [131] M. Gerard, A. Chaubey, B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 345.
- [132] M. E. G. Lyons, *Sensors* **2003**, *3*, 19.
- [133] P. N. Bartlett, P. Tebbutt, C. H. Tyrrell, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 138.
- [134] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, J. M. Saveant, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 11499.
- [135] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, *Biosensors: fundamentals and applications*, Oxford University Press, **1987**.
- [136] W. J. Albery, P. N. Bartlett, *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *194*, 211.
- [137] L. A. Matheson, N. Nichols, *Transactions of the American Electrochemical Society* **1938**, *73*, 193.
- [138] R. S. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 706.
- [139] Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.* **1965**, *37*, 178.
- [140] J. M. Saveant, E. Vianello, *Advances in Polarography, Vol. 1*, I. S. Longmuir, Ed., Pergamon Press: New York, **1960**.
- [141] J. Cooper, T. Cass, *Biosensors*, second ed., **2008**.
- [142] M. Sluyters-Rehbach, J. H. Sluyters, *Vol. 4, Electroanalytical Chemistry*, Ed. A.J. Bard, M. Dekker, New York **1970**.
- [143] M. Rehbach, J. H. Sluyters, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1961**, *80*, 469.
- [144] M. Rehbach, J. H. Sluyters, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1962**, *81*, 301.
- [145] J. H. Sluyters, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1960**, *79*, 1092.
- [146] J. H. Sluyters, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1963**, *82*, 100.

- [147] J. H. Sluyters, J. J. C. Oomen, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1960**, 79, 1101.
- [148] M. Sluytersrehabach, J. H. Sluyters, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1963**, 82, 525.
- [149] M. Sluytersrehabach, J. H. Sluyters, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1963**, 82, 535.
- [150] M. Sluytersrehabach, B. Timmer, J. H. Sluyters, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **1963**, 82, 553.
- [151] E. Katz, I. Willner, *Electroanalysis* **2003**, 15, 913.
- [152] H. Y. Gu, A. M. Yu, H. Y. Chen, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 516, 119.
- [153] V. M. Mirsky, M. Riepl, O. S. Wolfbeis, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 977.
- [154] F. Lucarelli, G. Marrazza, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 2001.
- [155] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**.
- [156] J. M. Bastidas, S. Feliu, M. Morcillo, *Rev. Metal. (Madrid)* **1986**, 22, 120.
- [157] J. E. B. Randles, *Dis Faraday Soc.* **1947**, 1, 11.
- [158] J. L. Polo, Universidad Pontificia de Comillas. **1999**.
- [159] J. L. Polo, C. L. Torres, E. Cano, J. M. Bastidas, *Revista De Metalurgia* **1999**, 35, 368.
- [160] D. D. Macdonald, E. Sikora, G. Engelhardt, *Electrochimica Acta* **1998**, 43, 87.
- [161] G. S. Popkirov, R. N. Schindler, *Electrochimica Acta* **1993**, 38, 861.
- [162] P. Agarwal, M. E. Orazem, L. H. Garciarubio, *J. Electrochem. Soc.* **1992**, 139, 1917.
- [163] D. M. Bastidas, E. Cano, *Surface Engineering* **2006**, 22, 384.
- [164] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930.
- [165] G. Binnig, H. Rohrer, *Surface Science* **1985**, 152, 17.
- [166] S. B. Velegol, S. Pardi, X. Li, D. Velegol, B. E. Logan, *Langmuir* **2003**, 19, 851.
- [167] M. B. Viani, T. E. Schaffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Gaub, P. K. Hansma, *Journal of Applied Physics* **1999**, 86, 2258.
- [168] B. D. Cullity, *Vol. Ch 9*, Elements of X-ray Diffraction, 2nd ed. Addison-Wesley Publishing Company **1978**.
- [169] N. González, *Vol. 2012*, **2012**.
<http://www.uam.es/investigacion/servicios/sidi/especifica/policristal.html>
- [170] C. D. Wagner, L. E. Davis, M. V. Zeller, J. A. Taylor, R. H. Raymond, L. H. Gale, *SIA, Surf. Interface Anal.* **1981**, 3, 211.
- [171] G. Gupta, V. Rajendran, P. Atanassov, *Electroanalysis* **2003**, 15, 1577.
- [172] K. V. Gobi, F. Mizutani, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2001**, 80, 272.
- [173] S. B. Brummer, A. C. Makrides, *J. Electrochem. Soc.* **1964**, 111, 1122.
- [174] M. Gamero, M. Sosna, F. Pariente, E. Lorenzo, P. N. Bartlett, C. Alonso, *Talanta* **2012**, 94, 328.
- [175] M. Gamero, J. L. G. Fierro, E. Lorenzo, C. Alonso, *Electroanalysis* **2013**, 25, 179.
- [176] S. K. Bhargava, F. Mohr, J. D. Gorman, *Journal of Organometallic Chemistry* **2000**, 607, 93.
- [177] Y. Joseph, I. Besnard, M. Rosenberger, B. Guse, H. G. Nothofer, J. M. Wessels, U. Wild, A. Knop-Gericke, D. S. Su, R. Schlogl, A. Yasuda, T. Vossmeier, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, 7406.
- [178] K. Heister, M. Zharnikov, M. Grunze, L. S. O. Johansson, *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, 4058.
- [179] Moulder J.F. , Stickle W.F. , Sobol P.E. , B. K.D., *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Minnesota, **1992**.
- [180] H. O. Finklea, *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances, Vol 19* **1996**, 19, 109.
- [181] R. P. Janek, W. R. Fawcett, A. Ulman, *Langmuir* **1998**, 14, 3011.
- [182] C. Amatore, J. M. Saveant, D. Tessier, *J. Electroanal. Chem.* **1983**, 147, 39.
- [183] J. L. Dawson, D. G. John, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1980**, 110, 37.

- [184] B. J. Dougherty, S. I. Smedley, in *Electrochemical Impedence : Analysis and Interpretation*, Vol. 1188, **1993**, pp. 154.
- [185] B.R.Eggins, *Biosensors: an Introduction*, Vol. 87, Wiley, New York, **1996**.
- [186] S. Q. Liu, H. X. Ju, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 177.
- [187] C. Alonso, R. C. Salvarezza, J. M. Vara, A. J. Arvia, *Electrochimica Acta* **1990**, *35*, 1331.
- [188] R. C. Salvarezza, C. A. Alonso, J. M. Vara, E. Albano, H. O. Martin, A. J. Arvia, *Physical Review B* **1990**, *41*, 12502.
- [189] C. Alonso, R. C. Salvarezza, J. M. Vara, A. J. Arvia, L. Vazquez, A. Bartolome, A. M. Baro, *Journal of the Electrochemical Society* **1990**, *137*, 2161.
- [190] J. E. G. J. Wijnhoven, S. J. M. Zevenhuizen, M. A. Hendriks, D. Vanmaekelbergh, J. J. Kelly, W. L. Vos, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2000**, *12*, 888.
- [191] L. Xu, J. B. Wiley, W. L. Zhou, C. Frommen, L. Malkinski, J.-Q. Wang, R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, *Chem. Commun. (Cambridge)* **2000**, 997.
- [192] P. N. Bartlett, P. R. Birkin, M. A. Ghanem, *Chem. Commun. (Cambridge)* **2000**, 1671.
- [193] R. Szamocki, S. Reculosa, S. Ravaine, P. N. Bartlett, A. Kuhn, R. Hempelmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1317.
- [194] P. Pieranski, *Contemporary Physics* **1983**, *24*, 25.
- [195] U. C. Fischer, H. P. Zingsheim, *Journal of Vacuum Science & Technology* **1981**, *19*, 881.
- [196] N. E. C. H., K. Y. K., W. C. C., *Colloidal Crystals, Modern Aspects of Bulk Crystal and Thin Film Preparation*, InTech, **2012**.
- [197] S. H. Park, B. Gates, Y. N. Xia, *Advanced Materials* **1999**, *11*, 462.
- [198] O. D. Velev, A. M. Lenhoff, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2000**, *5*, 56.
- [199] M. Bardosova, R. H. Tredgold, *Journal of Materials Chemistry* **2002**, *12*, 2835.
- [200] M. Trau, D. A. Saville, I. A. Aksay, *Science* **1996**, *272*, 706.
- [201] J. C. Hulteen, R. P. Vanduyne, *Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films* **1995**, *13*, 1553.
- [202] R. Micheletto, H. Fukuda, M. Ohtsu, *Langmuir* **1995**, *11*, 3333.
- [203] P. Jiang, J. F. Bertone, K. S. Hwang, V. L. Colvin, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 2132.
- [204] P. A. Kralchevsky, K. Nagayama, *Langmuir* **1994**, *10*, 23.
- [205] A. S. Dimitrov, K. Nagayama, *Langmuir* **1996**, *12*, 1303.
- [206] A. S. Dimitrov, K. Nagayama, *Chemical Physics Letters* **1995**, *243*, 462.
- [207] N. D. Denkov, O. D. Velev, P. A. Kralchevsky, I. B. Ivanov, H. Yoshimura, K. Nagayama, *Langmuir* **1992**, *8*, 3183.
- [208] C. D. Dushkin, K. Nagayama, T. Miwa, P. A. Kralchevsky, *Langmuir* **1993**, *9*, 3695.
- [209] P. A. Kralchevsky, V. N. Paunov, N. D. Denkov, I. B. Ivanov, K. Nagayama, *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, *155*, 420.
- [210] P. A. Kralchevsky, V. N. Paunov, I. B. Ivanov, K. Nagayama, *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *151*, 79.
- [211] V. N. Paunov, P. A. Kralchevsky, N. D. Denkov, K. Nagayama, *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, *157*, 100.
- [212] Y. A. Vlasov, X. Z. Bo, J. C. Sturm, D. J. Norris, *Nature* **2001**, *414*, 289.
- [213] G. Zhong-Ze, A. Fujishima, O. Sato, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 760.
- [214] Z. C. Zhou, X. S. Zhao, *Langmuir* **2004**, *20*, 1524.
- [215] S. M. Yang, H. Miguez, G. A. Ozin, *Advanced Functional Materials* **2002**, *12*, 425.
- [216] L. Cademartiri, A. Sutti, G. Calestani, C. Dionigi, P. Nozar, A. Mighori, *Langmuir* **2003**, *19*, 7944.
- [217] J. H. Fendler, Hilber, *Nanoparticles and Nanostructured Films: Preparation, Characterization and Applications* Wiley-VCH, **1998**.
- [218] P. N. Bartlett, J. J. Baumberg, P. R. Birkin, M. A. Ghanem, M. C. Netti, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2199.

- [219] L. K. van Vugt, A. F. van Driel, R. W. Tjerkstra, L. Bechger, W. L. Vos, D. Vanmaekelbergh, J. Kelly, *Chemical Communications* **2002**, 2054.
- [220] T. Sumida, Y. Wada, T. Kitamura, S. Yanagida, *Chemistry Letters* **2001**, 38.
- [221] B. H. Juarez, C. Lopez, C. Alonso, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 16708.
- [222] G. Luo, Z. J. Liu, L. Li, S. H. Xie, J. L. Kong, D. Y. Zhao, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 286.
- [223] T. Cassagneau, F. Caruso, *Advanced Materials* **2002**, *14*, 34.
- [224] Y. Y. Song, Y. Li, C. Yang, X. H. Xia, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390*, 333.
- [225] P. N. Bartlett, P. R. Birkin, M. A. Ghanem, C. S. Toh, *Journal of Materials Chemistry* **2001**, *11*, 849.
- [226] H. C. Shin, J. Dong, M. L. Liu, *Advanced Materials* **2003**, *15*, 1610.
- [227] F. Li, X. Han, S. Liu, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2619.
- [228] Y. Deng, W. Huang, X. Chen, Z. Li, *Electrochem. Commun.* **2008**, *10*, 810.
- [229] W. Zhao, J. J. Xu, C. G. Shi, H. Y. Chen, *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 773.
- [230] W. Gao, X.-H. Xia, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 12213.
- [231] Y. Li, Y.-Y. Song, C. Yang, X.-H. Xia, *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 981.

9 ANEXO

9 ANEXO

9.1 Índice de Figuras

Figura 1: Relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato en la cinética Michaeliana.	38
Figura 2: Representación esquemática de un biosensor enzimático con un mediador redox en disolución y perfiles de concentración de sus especies oxidadas y reducidas (m_{Rd} y m_{Ox}), así como de la concentración de sustrato (S).	42
Figura 3: Esquema del programa de potencial en voltametría cíclica.	47
Figura 4: Voltamograma cíclico de Fe^{2+} en H_2SO_4 0.5M.	51
Figura 5: Voltamograma cíclico de 0.5M de ácido ferroceno carboxílico y glucosa 50mM a pH=7 y 25°C en ausencia (a) y en presencia de 10.9 μ M de glucosa oxidasa (b) a 1 $mV \cdot s^{-1}$. ^[130]	53
Figura 6: Diagrama de fasores que muestra la relación entre la señal alterna de corriente y la de potencial a la frecuencia ω	56
Figura 7: circuito eléctrico equivalente de una interfase polarizable.	57
Figura 8: Componentes real (Z') e imaginaria (Z'') para una interfase polarizable representada por una resistencia (R) en serie con una capacidad (C).	58
Figura 9: Circuito equivalente para una interfase no polarizable con una resistencia (R) en paralelo con un capacitor (C).	58
Figura 10: Diagrama de Nyquist.	59
Figura 11: Circuito equivalente de una interfase no polarizable en disolución.	60
Figura 12: Diagrama de Nyquist correspondiente al circuito equivalente de una interfase no polarizable.	61
Figura 13: Circuito equivalente de Randles.	61
Figura 14: Diagrama de Nyquist correspondiente al circuito equivalente de Randles con impedancia de Warburg.	63
Figura 15: Diagramas de Bode.	65
Figura 16: Esquema de los principales componentes de un microscopio de fuerza atómica.	69
Figura 17: a) Micropalanca de AFM, b) punta de la micropalanca.	69
Figura 18: Fotodetector de cuatro segmentos.	70
Figura 19: Esquema de los fundamentos básicos de la microscopía electrónica de barrido (SEM).	74
Figura 20: Fundamento de la técnica de Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS).	80
Figura 21: Celda electroquímica.	89

- Figura 22:** Voltamograma cíclico del electrodo de Au policristalino en 0.5 M H₂SO₄ registrado a..... 98
- Figura 23:** Imagen AFM en modo contacto intermitente 1μm x1μm de un electrodo de oro policristalino R=1.5..... 100
- Figura 24:** Análisis topográfico para una muestra de oro policristalino (R=1.5)... 100
- Figura 25:** Difractograma de Rayos-X correspondiente a un electrodo de oro policristalino (R=1.5)..... 101
- Figura 26:** Proceso de adsorción de DTSP sobre Au. 103
- Figura 27:** Espectro fotoelectrónico de rayos X: (a) Au 4f; (b) S 2p; y (c) N 1s..... 104
- Figura 28:** Diagrama de Nyquist para el DTSP inmovilizado sobre oro policristalino a distintos tiempos de inmersión: 0 minutos (O), 15 minutos (Δ), 1.5 horas (*) 3horas (□), 24 horas (×) 108
- Figura 29:** Diagrama de Bode para Au_p (o), Au_p-DTSP (Δ) y Au_p-DTSP-LOx (□) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM [Fe(CN)₆]³⁻ + 10mM [Fe(CN)₆]⁴⁻.(a) Módulo de impedancia vs. log(frecuencia); (b) ángulo de fase vs. log(frecuencia)..... 113
- Figura 30:** Diagramas Nyquist para Au policristalino (o) Au_p-DTSP (Δ) Au_p-DTSP-LOx (□) en 0.1M KCl/0.1M tampón fosfato (pH=7) conteniendo 10mM [Fe(CN)₆]³⁻ + 10mM [Fe(CN)₆]⁴⁻. Inset: Magnificación del diagrama de Nyquist para el Au policristalino. 114
- Figura 31:** Circuito eléctrico equivalente 116
- Figura 32:** Resultados experimentales (O) y resultados obtenidos utilizando las relaciones de Kramers-Kronig (K-K)(+) correspondientes a la parte real e imaginaria de las medidas de EIS para el Au_p (a y b), Au_p-DTSP (c y d) y Au_p-DTSP-LOx (e y f) obtenidas en 0.1M KCl/0.1M tampón fosfato (pH=7) conteniendo 10mM [Fe(CN)₆]³⁻ + 10mM [Fe(CN)₆]⁴⁻. 121
- Figura 33:** cofactor flavín mononucleótido (FMN)..... 123
- Figura 34:** Conversión reversible entre la forma oxidada (FMN) y reducida (FMNH₂). 123
- Figura 35:** Voltamograma cíclico de un biosensor de lactato oxidasa construido sobre un electrodo de oro policristalino modificado con DTSP (Au_p-DTSP-LOx), en una disolución 0.1M de tampón fosfato que contiene 1.0 mM de hidroximetilferroceno, en ausencia de sustrato (curva a) y en presencia de 14 mM de L-lactato (curva b). (ν = 0.01V·s⁻¹). 125
- Figura 36:** Curva de calibrado para el biosensor Au_p-DTSP-LOx obtenidas mediante voltametría cíclica en condiciones de estado estacionario (ν=0.1V·s⁻¹) en una disolución 1.0mM de HMF en PBS pH=7.0 en presencia de cantidades crecientes de L-lactato. (•) Datos experimentales, (—) ajuste mediante regresión no lineal. En el inset se muestra el intervalo lineal..... 127
- Figura 37:** Distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre oro policristalino (Au_p-DTSP-LOx): a) Ajuste mediante regresión no lineal, b) Representación de Lineweaver Burk, c) Representación de Eadi-Hofstee, d) Representación Hanes. 128

- Figura 38:** Representación $I_{cat}Idif$ vs. $v - 1/2$ obtenida a partir de los voltamogramas registrados en ausencia y en presencia de una concentración saturante de L-lactato en una disolución 1.0mM de HMF en PBS pH=7.0, empleando como electrodo de trabajo el biosensor Au_p-DTSP-LOx. 131
- Figura 39:** Programa de potencial para la fabricación de electrodos de oro rugoso. 136
- Figura 40:** Curvas i-E correspondientes al procedimiento de obtención de oro rugoso (a) Voltamograma de un electrodo de oro policristalino en H₂SO₄ 0.5M a 0.1V·s⁻¹ (25°C); (b) Barrido lineal de electrorreducción de la capa de óxido ($v=0.02V\cdot s^{-1}$) (—); (c) VC a 0.1V·s⁻¹ del electrodo de oro policristalino (—); VC a 0.1V·s⁻¹ del electrodo de oro rugoso cuya rugosidad es R=66 (···); (d) CV del oro rugoso después de un tiempo de relajación de siete días (—)..... 137
- Figura 41:** Imágenes SEM de un electrodo de oro rugoso a diferentes magnificaciones: 500nm y 2µm..... 138
- Figura 42:** Modelo columnar teórico para un electrodo de oro rugoso^[189]. 139
- Figura 43:** Imagen AFM en modo contacto intermitente 1µm x1µm de un electrodo de oro rugoso R=66. 141
- Figura 44:** Análisis topográfico de un electrodo de oro rugoso, R=66 (a) y un electrodo de oro policristalino, R=1.5 (b)..... 142
- Figura 45:** (a) DRX de una muestra de oro policristalino (R=1.5); (b) DRX de una muestra de oro rugoso obtenida mediante la aplicación de RSWPS (c) DRX de la muestra de oro rugoso después de un tiempo de relajación de siete días..... 143
- Figura 46:** Diagramas de Nyquist para el Au_R modificado con DTSP a distintos tiempos de adsorción: 0 minutos (O), 15 minutos (Δ), 30 minutos (*), 1.5 horas (*), 3 horas (□), 24 horas (×)..... 146
- Figura 47:** Diagramas de Bode: (a) Módulo de impedancia vs frecuencia y (b) ángulo de fase vs frecuencia para Au_R (o) Au_R-DTSP (Δ) Au_R-DTSP-LOx (*) medido en una disolución 0.1M KCl/0.1M tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM [Fe(CN)₆]³⁻ +10mM [Fe(CN)₆]⁴⁻. 148
- Figura 48:** Diagramas de Nyquist para Au_R (o) Au_R-DTSP (Δ) Au_R-DTSP-LOx (*) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM [Fe(CN)₆]³⁻ + 10mM [Fe(CN)₆]⁴⁻. Inset: Diagrama de Nyquist para Au_R, Au_R-DTSP..... 149
- Figura 49:** a) Circuito equivalente para el electrodo de oro rugoso sin modificar (Au_R); b) Circuito equivalente para el electrodo de oro rugoso modificado (Au_R-DTSP y Au_R-DTSP-LOx). 150
- Figura 50:** Esquema del ciclo catalítico de un biosensor de Lactato Oxidasa..... 156
- Figura 51:** Voltamograma cíclico del biosensor de lactato oxidasa construido sobre: a) un electrodo de oro rugoso modificado con DTSP (Au_R-DTSP-LOx), y b) un electrodo de oro rugoso sin modificar (Au_R-LOx) obtenidos en ausencia (curvas A y C) y en presencia (curvas B y D) de 14mM de L-lactato (curva b) en 0.1M PBS (pH = 7.0) conteniendo 1.0mM HMF. ($v = 0.1 V\cdot s^{-1}$)..... 158
- Figura 52:** Curvas de calibrado obtenidas a partir de la corriente máxima menos I_0 del voltamograma obtenido en PB a pH=7 en presencia de cantidades crecientes

de sustrato para a) Au _R -DTSP-LOx y b) Au _R -LOx. El inset corresponde al intervalo lineal en cada caso. (•) Resultados experimentales y (—) ajuste mediante regresión no lineal.	159
Figura 53: Distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre un transductor de oro rugoso (Au _R -DTSP-LOx): a) Ajuste mediante regresión no lineal, b) Representación de Lineweaver Burk, c) Representación de Eadi-Hofstee, d) Representación Hanes.	161
Figura 54: Fuerzas de atracción capilar.....	168
Figura 55: Esquema de las fuerzas implicadas en la deposición vertical de las esferas.....	169
Figura 56: Esquema de los flujos de partículas y agua en las proximidades de una monocapa de partículas, donde j_e es el flujo de evaporación de disolvente, j_o el flujo de agua hacia el sustrato y j_p el de partículas.	170
Figura 57: Esquema de fabricación de electrodos de oro (3DOM).....	174
Figura 58: Fotografía de un depósito de esferas sobre un sustrato de oro.	175
Figura 59: Imagen SEM de un ópalo de esferas de poliestireno estabilizado térmicamente.	176
Figura 60: Imagen SEM que muestra la ausencia de una esfera en un ópalo de esferas de poliestireno estabilizado térmicamente.....	176
Figura 61: Voltamograma cíclico de un electrodo de oro en la disolución precursora de oro metálico a $20\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ y $T=25^\circ\text{C}$	178
Figura 62: Cronoamperograma obtenido para un electrodeposición de oro de 5.5 capas crecido a partir de un <i>template</i> de esferas de poliestireno de 500nm. Potencial de deposición: -1.05 V vs ESM	179
Figura 63: Variación del área electroactiva durante el proceso de electrodeposición.	180
Figura 64: Imagen SEM de un ópalo inverso de oro de 5.5 capas crecido a partir de un <i>template</i> de esferas de poliestireno de 500nm (escala: $1\mu\text{m}$).	181
Figura 65: Voltamograma cíclico de un electrodo 3DOM de oro de 5.5 capas en $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0.5\text{M}$ barrido a $0.01\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$	181
Figura 66: Factor de rugosidad para el oro 3DOM en función del espesor del depósito (expresado como número de capas de esferas)	182
Figura 67: Relación entre el diámetro del poro que se puede observar en la foto de SEM (X) y las diferentes alturas que alcanza el depósito, siendo d el diámetro de las esferas del <i>template</i>	183
Figura 68: Progresión del crecimiento del depósito a través del ópalo.	184
Figura 69: Depósito másico crecido sobre la última capa de esferas.....	186
Figura 70: Imagen SEM de electrodos de oro macroporosos crecido sobre un sustrato de oro a través de esferas de PS de 500 nm de diámetro y esquema del mecanismo de interconexión entre las distintas capas del 3DOM. (— Capa inferior y — Capa superior).	187

- Figura 71:** Imagen SEM de electrodos de oro macroporosos crecido con orientación (100) sobre un sustrato de oro a través de esferas de PS de 500 nm de diámetro. 188
- Figura 72:** Imagen de AFM tomada en modo contacto intermitente de un ópalo inverso de oro obtenido mediante la electrodeposición de oro a través de esferas de poliestireno de 500nm (10 μm \times 10 μm). 189
- Figura 73:** Imagen de AFM tomada en modo contacto intermitente de un electrodo de oro macroporoso obtenido por electrodeposición de oro a través de esferas de poliestireno de 500nm (1.4 μm \times 1.4 μm). Inset: Imagen de AFM de un depósito másico de oro crecido en ausencia de esferas. 190
- Figura 74:** Difractograma de a) electrodo de oro electrodepositado b) electrodo de oro macroporoso. 192
- Figura 75:** Diagrama de Nyquist para Au-DTSP a distintos tiempos de adsorción: 0 minutos (O), 15 minutos (Δ), 1.5 horas (*) 3horas (\square), 24 horas (\times)..... 195
- Figura 76:** Diagramas de Bode para $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ (o), $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP}$ (Δ) y $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ (\square) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. (a) Diagrama de Bode de logaritmo del módulo de la impedancia frente al logaritmo de la frecuencia. (b) Diagrama de Bode de ángulo de fase frente al logaritmo de la frecuencia. 199
- Figura 77:** Diagrama de Nyquist para $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ (o), $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP}$ (Δ) y $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ (\square) en 0.1M KCl/0.1M de tampón fosfato (pH = 7) conteniendo 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ + 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 201
- Figura 78:** Circuito equivalente de Randles. 201
- Figura 79:** Diagrama de Nyquist para $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ con diferente número de capas en 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 0.1 M PBS (pH = 7) + 0.1 M KCl: electrodepósito de oro (O), 1.5 capas (*), 2.5 capas (\times), 3.5 capas (\square), 5.5 capas (Δ)..... 207
- Figura 80:** Circuito equivalente de Randles. 207
- Figura 81:** Voltamograma cíclico de los biosensores de lactato oxidasa inmovilizada sobre a) un electrodo macroporoso de oro modificado con DTSP ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$) y b) un electrodo de oro macroporoso sin modificar ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$), en una disolución 0.1M de tampón fosfato que contiene 1.0mM de hidroximetilferroceno, en ausencia de sustrato (curvas A y C) y en presencia de 14.0 mM de L-lactato (curvas B y D). Espesor del depósito: 5.5 capas de poros ($\nu = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$). 211
- Figura 82:** Respuesta electrocatalítica del biosensor en función del número de capas de poros del $\text{Au}_{3\text{DOM}}$ 212
- Figura 83:** Curvas de calibrado obtenidas a partir de la corriente estacionaria menos I_0 del voltamograma obtenido en PB a pH=7 en presencia de cantidades crecientes de sustrato para a) $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-DTSP-LOx}$ y b) $\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-LOx}$. Espesor del depósito: 5.5 capas. El inset corresponde al intervalo lineal en cada caso. 214
- Figura 84:** Distintas representaciones de la ecuación de Michaelis-Menten para el biosensor construido sobre un electrodo de oro 3DOM de 5.5 capas ($\text{Au}_{3\text{DOM}}\text{-}$

DTSP-LOx): a) Ajuste mediante regresión no lineal, b) Representación de
Lineweaver Burk, c) Representación de Eadi-Hofstee, d) Representación Hanes.
..... 216

**10 PUBLICACIONES Y
CONTRIBUCIONES A CONGRESOS**

10 PUBLICACIONES Y CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

En este apartado se recogen las publicaciones a las que ha dado lugar la realización de esta Tesis Doctoral:

- **AUTORES:** M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo, C. Alonso.

TÍTULO: “Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors”

REFERENCIA: *Biosensors and Bioelectronics* (2010), Vol: 25 (9), pág.: 2038-2044.

- **AUTORES:** M. Gamero, M. Sosna, F. Pariente, E. Lorenzo, P.N. Bartlett, C. Alonso.

TÍTULO: “Influence of macroporous gold support and its functionalization on lactate oxidase-based biosensors response”

REFERENCIA: *Talanta* (2012), Vol: 94, pág.: 328-334.

- **AUTORES:** M. Gamero, J.L.G. Fierro, E. Lorenzo, C. Alonso.

TÍTULO: “EIS study of electrocatalytic activity of 3DOM macroporous Au electrode-based biosensors platforms as a function of pore layer number”

REFERENCIA: *Electroanalysis* (2012), Vol:25, pág: 179-188.

Otros trabajos publicados durante la realización de la tesis:

- **AUTORES:** M.Gamero, C.Alonso.

TÍTULO: “Deposition of nanostructured gold on n-doped silicon substrate by means of different electrochemical methods”

REFERENCIA: *J. Applied. Electrochem* (2010), Vol: 40, pág.: 175-190

- **AUTORES:** Jose María Abad, Mónica Revenga-Parra, Tania García, Miriam Gamero, Encarnación Lorenzo, Félix Pariente.

TÍTULO: “Interactions of Schiff-Base Ligands with Gold Nanoparticles: Structural, Optical and Electrocatalytic Studies”

REFERENCIA: *Physical Chemistry Chemical Physics* (2011), Vol: 13, pág.: 5668-5678.

- **AUTORES:** Concepción Alonso; Jorge A del Valle; María D Pereda; Miriam Gamero; Mónica Fernández Lorenzo.

TÍTULO: “Comparative study of fluoride conversion coatings formed on biodegradable powder metallurgy Mg: the effect of chlorides at physiological level”

REFERENCIA: *Materials Science and Engineering C – Materials for Biological Applications* (2011), Vol: 31, pág.: 858-865.

- **AUTORES:** Concepción Alonso; Jorge A. del Valle, María D. Pereda, Miriam Gamero, Mónica Fernández Lorenzo.

TÍTULO: “Do phosphate ions affect the biodegradation rate of fluoride-treated Mg?”

REFERENCIA: *Materials Letters* (2012), Vol.: 68, pág.: 149-152.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS:

- M. Gamero, E. Lorenzo, C. Alonso, F. Pariente. “New gold roughness substrates for the development of enzyme biosensors”, *XXX Reunión del grupo de Electroquímica de la RSEQ*, Tenerife (España), Julio **2009**. **Comunicación oral**.
- M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo, M. Sosna, P. N. Bartlett y C. Alonso. “Distintos soportes nanoestructurados de oro como transductores para el desarrollo de biosensores enzimáticos de Lactato Oxidasa”, *SIBAE; XIX Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica; GE-RSEQ; XXXI Reunión de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química*, Alcalá de Henares (Madrid), Junio-Julio **2010**. **Comunicación oral**.
- M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo, M. Sosna, P. N. Bartlett y C. Alonso. “Influence of different nanostructured gold transducers for the development of Lactate Oxidase-based biosensors” *ESEAC European Society for Electroanalytical Chemistry*, Gijón (Spain), Junio **2010**. **Comunicación oral**.
- M.D. Pereda, C. Alonso, M. Gamero, J. del Valle y M. Fernández Lorenzo. “Corrosion behaviour of powder metallurgy Mg with fluoride treatments in chloride solutions with and without phosphates”. *2nd Symposium on Biodegradable Metals*, Maratea (Italia), Agosto **2010**. **Comunicación oral**.
- I. Bravo, M. Revenga, T. García, M. Gamero, E. Lorenzo, F. Pariente, J.M. Abad. “Modulation of optical properties of schiff base ligand-gold nanoparticle hybrid systems”. *V Workshop sobre Nanociencia y Nanotecnología Analíticas*, Toledo (España), Septiembre **2011**. **Comunicación oral**.
- M. Revenga-Parra, T. García, M. Gamero, E. Lorenzo, F. Pariente. “Preparación y caracterización de nanopartículas de oro modificadas con derivados del N,N'-Bis(dihidroxibenciliden)-1,2-diaminobenceno para el desarrollo de sensores”. *I Workshop sobre Nanotecnología Analítica*. Córdoba (España), Julio de **2007**. **Póster**.
- M. Gamero, F. Pariente y C. Alonso. “Deposition of Nanostructured Gold on n-doped Silicon Substrate by means of different electrochemical Methods”. *XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica*. Pollensa (Mallorca), Octubre **2007**. **Póster**.

- M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo y C. Alonso. "Deposition of nanostructured Gold on n-doped silicon substrate by means of different electrochemical techniques". *59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)*. Sevilla (España), Septiembre **2008**. Póster.
- M. Gamero y C. Alonso. "Deposición de oro nanoestructurado sobre Si(n) mediante diferentes técnicas electroquímicas". *Simposio de Investigadores Jóvenes. Real Sociedad Española de Química*. Santiago de Compostela (España), Noviembre **2008**. Póster.
- M. Gamero, E. Lorenzo, C. Alonso y F. Pariente. "New patterned substrates as sensor surfaces for the development of biosensors". *60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)*. Pekín (China), Septiembre **2009**. Póster.
- L. Burgos-Asperilla, M.C. García-Alonso, M. Gamero y C. Alonso. "Electrochemical Characterization of the Titanium/DMEM Interface". *60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)*. Pekín (China), Septiembre **2009**. Póster.
- L. Burgos-Asperilla, M.C. García-Alonso, M. Gamero y C. Alonso. "In situ cell culture medium monitoring on Ti surface by electrochemical techniques". *XI Encontro Ibérico de Electroquímica*. Tenerife (España), Julio **2009**. Póster.
- M.D. Pereda, C. Alonso, M. Gamero, J. del Valle y M. Fernández Lorenzo. "Estudio de la inhibición de la corrosión del Mg pulvimetalúrgico por iones fluoruro a través de SECM. Efecto de los iones cloruros". *SIBAE; XIX Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica; GE-RSEQ; XXXI Reunión de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química*. Alcalá de Henares (España), Junio-Julio **2010**. Póster.
- M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo y C. Alonso. "Transductores nanoestructurados para el desarrollo de biosensores" *XXXII Reunión Grupo de Electroquímica de la RSEQ y XIII Encontro Ibérico de Electroquímica*. Murcia (España) Septiembre **2011**. Póster
- M. Gamero, F. Pariente, E. Lorenzo, C. Alonso. "Nanostructured transducers for the development of biosensors". *14th International Conference on Electroanalysis (ESEAC)*. Portorož (Eslovenia), Junio **2012**. Póster.

- M. Gamero, E. Lorenzo y C. Alonso. “Comparative study on different bioanalytical nanostructured platforms for biosensors applications”. *XXXIV Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química y XV Encuentro Ibérico de Electroquímica*. Valencia (España), Julio **2013**. *Póster*.



Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors

M. Gamero^a, F. Pariente^{b,*}, E. Lorenzo^b, C. Alonso^a

^a Department of Applied Physical Chemistry, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2009

Received in revised form 25 January 2010

Accepted 26 January 2010

Available online 2 February 2010

Keywords:

Rough gold

Lactate oxidase biosensor

AFM

EIS

ABSTRACT

The design and characterization of a lactate biosensor using a nanostructured rough gold surface as a transducer is reported. The biosensor is developed by immobilization of lactate oxidase (LOx), on a rough gold electrode modified with a self-assembled monolayer of dithiobis-N-succinimidyl propionate (DTSP). This bifunctional reagent preserves the rough gold structure and allows further covalent immobilization of the enzyme through the terminal succinimidyl groups. The rough gold electrode is characterized using field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and atomic force microscopy (AFM). The preferential orientation and average crystallite size are obtained by X-ray diffraction (XRD). The resulting lactate oxidase monolayers are characterized by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). This nanostructured transducer allows higher mediated electrocatalytic activity than polycrystalline ones. The biosensor response to increasing lactate concentrations, using hydroxymethylferrocene as a redox mediator in solution, is linear up to 1.2 mM with a sensitivity of 1.49 $\mu\text{A mM}^{-1}$.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lactate levels in blood or tissues are correlated to the presence of several diseases such as tissue hypoxia, cardiogenic or endotoxic shocks, respiratory failure and systemic disorders derived from neoplastic diseases, liver and renal failures or diabetes *mel-litus*. Thus, the development of highly sensitive and reliable lactate monitoring methods are of great interest in clinical diagnostics (Burmeister et al., 2005; Patel et al., 2000), food technology (De Luca et al., 2005), beverage and fermentation industries (Zaydan and Dion, 2004) and clinical medicine (Volpe et al., 1995; Hart et al., 2004). Various procedures have been proposed for the direct measurement and monitoring of lactic acid levels in very different samples. The fundamentals, advantages and disadvantages of some of these methodologies have been summarised and compared in a recent review (Suman and Ashok Kumar, 2008). Among them, biosensors are one of the most widely investigated devices for two fundamental reasons: (1) the immobilization of an enzyme on the electrode surface may be done in an easy and reproducible way; and (2) the specificity of enzymes allows analytical measurements to be performed directly on the sample, regardless of their complexity, reducing the analysis time. Biosensors based on L-lactate oxidase (LOx) and L-lactate dehydrogenase (LDH) have been widely used for the determination of L-lactate (Palmisano et al., 1997; Parra et

al., 2006; Jena and Raj, 2007). LOx-based biosensors are the most widely used configuration and allow the determination of hydrogen peroxide generated in the enzymatic reaction (Perdomo et al., 1999). The electrochemical determination of hydrogen peroxide involves high positive potentials and can be affected by the presence of interferents (Nikolaus and Strehlitz, 2008). On the other hand, the sensitivity of the biosensor depends on the molecular oxygen concentration (Palmisano et al., 2001; Moser et al., 2002). One strategy used to avoid these problems is to replace the natural electron acceptor (O_2) with an artificial mediator, such as hydroxymethylferrocene (Boujtita et al., 1996; Parra et al., 2006).

Recent reports show that the use of nanostructured electrode surfaces can improve the performance of electrochemical sensors and biosensors (Lupu et al., 2007).

Nanostructured electrode surfaces can be obtained in a variety of ways, such as the modification of surfaces with nanostructured materials or nanopatterning of the electrode surface itself. In this sense, gold electrodes can quickly and easily be nanostructured by electroreducing the thick accumulated oxide layers by applying relatively fast periodic potentials in acid solutions (Vazquez et al., 1989). This nanopatterning process gives rise to rough gold electrodes with a larger active area that can be used in the design of significantly improved lactate biosensors.

One key factor in the development of a reliable biosensor is the immobilization process, which affects most of the analytical properties of the device (Sung and Bae, 2006). Several methods for the immobilization of LOx on different types of electrodes have been reported. Most of them involve covalent immobilization (Nikolaus

* Corresponding author. Tel.: +34 91 497 8625; fax: +34 91 497 4931.
E-mail address: felix.pariante@uam.es (F. Pariente).



Influence of macroporous gold support and its functionalization on lactate oxidase-based biosensors response

M. Gamero^a, M. Sosna^c, F. Pariente^b, E. Lorenzo^b, P.N. Bartlett^c, C. Alonso^{a,*}

^a Department of Applied Physical Chemistry, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

^c School of Chemistry, University of Southampton, SO17 1BJ, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2011

Received in revised form 6 March 2012

Accepted 20 March 2012

Available online 4 April 2012

Keywords:

Macroporous gold

Lactate oxidase

Biosensor

Modified electrodes

ABSTRACT

A general bioanalytical platform for biosensor applications was developed based on three-dimensional ordered macroporous (3DOM) gold film modified electrodes using lactate oxidase (LOx) as a case study, within the framework of developing approaches of broad applicability. The electrode was electrochemically fabricated with an inverted opal template, making the surface area of the 3DOM gold electrode up to 18 times higher than that of bare flat gold electrodes. These new electrochemical transducers were characterized by using Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), Atomic Force Microscopy (AFM) and the X-ray diffraction (XRD). The biosensor was developed by immobilization of lactate oxidase (LOx), on a 3DOM gold electrode modified with a self-assembled monolayer of dithiobis-N-succinimidyl propionate (DTSP). The resulting lactate oxidase biosensor was characterized by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The 3DOM gold electrode not only provides a good biocompatible microenvironment but also promotes the increase of conductivity and stability. Thus, the developed lactate oxidase bioanalytical platforms showed higher mediated bioelectrocatalytic activity compared to others previously described based on polycrystalline gold transducers. The response to varying lactate concentrations has been obtained in the presence of hydroxymethylferrocene as redox mediator in solution. Under these conditions, the bioanalytical platform response for DTSP covalently bound enzyme was improved with respect to that obtained in absence of DTSP.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biosensors based on flat gold electrode surfaces modified with self-assembled monolayers are widely used, including fundamental studies of electrochemical processes on modified electrodes. For some applications, such as in vivo measurements, it may be necessary to use miniaturized electrodes and smaller active electrode surface will lead to lower analytical response. Therefore, to achieve a sufficiently high rate of electrochemical conversion, the electrode surface area must be increased artificially by using nanostructured [1] or porous materials [2]. An ideal way to develop metallic macroporous materials with controlled size and the spatial arrangement of the pores is to use colloidal crystal films as templates for subsequent electrodeposition [3–5]. Afterwards, the template is removed by an appropriate solvent and highly ordered structures of macroporous metal are obtained [6,7]. Due to its large surface area to

volume ratio, this kind of structure can be considered as a good candidate for biosensors. Thus, Xia and co-workers developed a 3DOM gold film modified electrode to study the direct electron transfer of hemoglobin [8,9]. Macroporous ultramicroelectrodes [7], 3DOM Prussian blue film and 3DOM gold film modified electrodes have also been prepared for glucose detection [10,11].

Recently, 3DOM gold film modified electrodes have also been used for immunosensor development [12,13]. In these systems, the sensing enhancement was significantly higher than that of respective nonporous electrodes.

The development of methods for the determination of L-lactic acid is of great importance in several areas such as medicine and food industry [14–20].

Our efforts over the past years in this field have been addressed to design L-lactic acid biosensors based on lactate oxidase (LOx). In the present work, we describe the preparation and characterization of a 3D macroporous gold inverse opal films, using polystyrene colloidal crystals as templates, in order to obtain a nanostructured electrodes that can be used in the design of significantly improved lactate biosensors. To achieve the enzyme immobilization we have employed two strategies: (i) direct adsorption onto the 3D macroporous gold surface and (ii) covalent bonding to 3D gold surfaces

* Corresponding author at: Dto. Química Física Aplicada, Universidad Autónoma de Madrid, C/FranciscoTomás y Valiente 7, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 4978742; fax: +34 4974785.

E-mail address: concepcion.alonso@uam.es (C. Alonso).

Electrocatalytic Activity of 3-Dimensional Ordered Macroporous Gold Electrode-Based Lactate Biosensors Platforms as a Function of Pore Layer Number

M. Gamero,^a J. L. G. Fierro,^d E. Lorenzo,^{b,c} C. Alonso^{*a}

^a Department of Applied Physical Chemistry Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

^c Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA-Nanociencia), Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^d Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

*e-mail: concepcion.alonso@uam.es

Received: August 1, 2012

Accepted: September 12, 2012

Published online: November 21, 2012

Abstract

We report the electrocatalytic response of a lactate biosensor, based on a 3-dimensional ordered macroporous (3DOM) gold electrode, as a function of the pore layer number. The biosensor was developed by covalent immobilization of lactate oxidase (LOx) to a self-assembled monolayer of dithiobis-*N*-succinimidyl propionate (DTSP). The binding of DTSP to the gold surface was studied by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), indicating the existence of S–Au bonds. The DTSP coverage and the different steps followed in the construction of the biosensor were examined by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The catalytic response to a 14 mM lactate concentration, increased linearly with the pore layer number of the 3DOM gold electrode, reaching a value 3 times higher, than for polycrystalline gold electrodes, for 7.5 layers.

Keywords: 3D ordered macroporous gold electrode, Lactate oxidase biosensor, Electrochemical impedance spectroscopy (EIS), Atomic force microscopy (AFM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

DOI: 10.1002/elan.201200419

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201200419>.

1 Introduction

There is a great interest in the development of highly sensitive and reliable lactate monitoring methods due to their importance in clinical chemistry [1–3], dairy products and food industries [4,5], biotechnology, and sports medicine [6–11]. Different procedures have been proposed for the direct measurement and quantification of lactic acid levels in very different samples [12], being the biosensors one of the most investigated devices.

Biosensors based on L-lactate oxidase (LOx) and L-lactate dehydrogenase (LDH) have been widely used for the determination of L-lactate [8,13,14]. LOx-based biosensors are the most widely used configuration and allow the determination of hydrogen peroxide generated in the enzymatic reaction [15]. The electrochemical determination of hydrogen peroxide involves high positive potentials and can be affected by the presence of interferents [16]. On the other hand, the sensitivity of the biosensor depends on the molecular oxygen concentration [17,18]. For all these reasons, although some lactate biosensors are described in the literature, it is still necessary to improve the analytical properties of these devices, in particular their sensitivity and stability.

Recent reports show that the use of nanostructured materials have attracted considerable attentions for their application as electrode materials since they can improve the performance of electrochemical biosensors [19], because of their large internal surface, three-dimensional open porosity and high electrocatalytic activity [20–25]. Among them, the gold nanostructured surfaces, especially porous, have been widely used in biosensors, due to their fascinating properties such as their well-ordered pore structure, high-specific surface area and high-specific pore volume as well as by their high conductivity, stability and biocompatibility.

An ideal method of developing metallic macroporous materials with controlled size and spatial arrangement of pores is to use colloidal crystal films as templates for subsequent electrodeposition [26]. Due to its large surface area-to-volume ratio, this type of structure is a good candidate for biosensors. To this end, Xia et al. developed a 3DOM gold film-modified electrode to study the direct electron transfer of hemoglobin [27,28]. Macroporous ultramicroelectrodes [29] and 3DOM Prussian blue film and 3DOM gold film modified electrodes have also been prepared to detect glucose [30,31].